



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월24일

(11) 등록번호 10-1476148

(24) 등록일자 2014년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01G 7/06 (2006.01) A01G 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0064103(분할)

(22) 출원일자 2014년05월28일

심사청구일자 2014년05월28일

(62) 원출원 특허 10-2014-0034730

원출원일자 2014년03월25일

심사청구일자 2014년03월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090024838 A

KR1020130062032 A

(73) 특허권자

주식회사 그린파이오니아

인천광역시 연수구 갯벌로 169, 201호 (송도동, 인천대학교 미래관)

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)

(72) 발명자

한태준

인천광역시 연수구 해송로 143, 404동 2503호(송도동, 송도웰카운티1단지아파트)

박지혜

경기 부천시 원미구 수도로 206번길 65-20 다동 B01호

(74) 대리인

고영갑, 권정기, 임상엽

전체 청구항 수 : 총 6 항

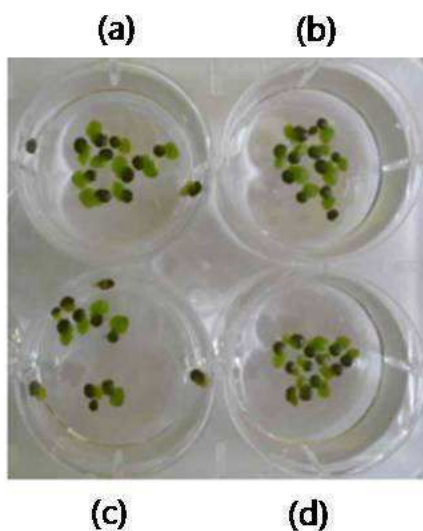
심사관 : 유진오

(54) 발명의 명칭 열 처리를 통한 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법

(57) 요약

본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 휴면 상태의 잠아를 60~70℃로 30초 내지 10분 동안 열 처리((heat shock) 하는 단계 및 열 처리된 잠아를 15~35℃의 온도 조건 및 50~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 2~4일 동안 배양하는 단계를 포함하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법을 사용하는 경우 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 보관 기간에 관계없이 쉽게 높은 비율로 발아시킬 수 있으므로, 바이오웨어로서 개구리밥이 필요한 경우 바로 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 개구리밥의 생물학적, 산업적 활용성을 높이는 데에 초석이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 401-111-001

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 차세대 에코이노베이션 기술개발사업

연구과제명 수생태 독성 진단용 키트 개발

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 그린파이오니아

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 개구리밥으로부터 분리된 휴면 상태의 잠아를 60~70℃로 30초 내지 10분 동안 열 처리(heat shock) 하는 단계; 및

(b) 상기 열 처리된 잠아를 15~35℃의 온도 조건 및 50~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 2~4일 동안 배양하는 단계를 포함하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 열 처리 전에 암 조건 및 0~25℃의 온도 조건에서 2개월 미만의 기간으로 보관된 것을 특징으로 하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 (a) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 열 처리 전에 0~5℃의 냉장 조건에서 보관된 것을 특징으로 하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 열 처리 시간은 45초 내지 5분인 것을 특징으로 하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 잠아를 배양하기 위한 배지는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 것을 특징으로 하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양시 배양 온도는 20~30℃이고, 광 조사량은 90~120 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고, 배양 시간은 3~4일인 것을 특징으로 하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법에 관한 것으로서, 본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 잠아에 소정의 열 충격(heat shock)을 통해 잠아의 발아율을 향상시키는 것을 특징으로 한다.

배경기술

[0002] 수생식물(hydrophytes)은 식물체의 여러 기관이 서식환경에 알맞게 변형되어 형태적으로 다양해지는 유연성을 지닌다. 일부 수생식물의 경우, 이들이 처한 특수한 수중환경에 적응하여 생존하기 위해 뿌리, 줄기, 잎 등의 기관을 형성하지 않는 매우 축소된 식물체로의 구조 변형이 일어난다.

[0003] 식물체가 극도로 축소된 개구리밥(*Spirodela polyrriza*)은 식물체 전체가 엽상체, 연결사, 뿌리의 3부분으로 이루어진 아주 작은 개체로 발달한다(Lee, 1996). 이들은 5~8 mm 크기의 부엽성 수생식물로 엽상체(frond)로 영양

번식(reproductive reproduction)을 하여 식물체가 수일 이내에 2배가 되는 매우 빠른 속도로 개체를 증식시킨다(Landolt, 1986; Appenroth, 2003). 수생식물이 생활환을 마칠 때에는 육상식물에서와 같이 종자를 형성하거나, 혹은 생장이 정지된 상태를 유지할 수 있는 특수한 구조를 형성하여 동절기 휴면상태에 들어간다. 다년생 초본식물인 개구리밥은 휴면구조로 겨울눈의 일종인 잠아(turion)를 형성하여 겨울철 휴면상태를 유지한다. 생장기간 동안 엽상체는 빠른 분열로 그 수를 늘리며 개체를 증식시켜 식물체 용적의 대부분을 차지하게 된다. 이러한 엽상체는 기온이 내려가기 시작하면 영양번식을 멈추고 엽육조직 내부에 잠아원기(turion primordium)를 형성한다(Kwak & Kim, 2008). 이후 잠아는 모엽상체(mother frond)에서 분리되어 물 밑에 가라앉아 월동하고 다음 해 기온이 상승하기 시작하면 수면 위로 부상하여 새로운 식물체로 발달하는 생활환을 반복한다. 이들의 잠아에서는 휴면기 이후 기온상승으로 보호조직(vegetative sheath) 및 잠아 엽육조직 내에 싸여 있던 엽상체 원기(frond primordium)가 발아하여 엽상체가 기원한다. 기온하강 시 휴면상태를 유지하도록 하는 개구리밥 잠아의 이러한 특성으로 수생식물의 휴면 구조 형성 및 발달과정 추적 연구에 대표적인 모델시스템 종으로 제안된 바 있다(Smart, 1996). 엽상체, 연결사 및 뿌리로만 구성된 매우 축소된 개구리밥의 식물체는 잠아 및 엽상체 원기를 엽상체 및 잠아조직 내에 미리 형성하여 휴면기 이후 신속하게 생장을 재개하거나 생장기에서 휴면상태로 바로 진입할 수 있는 구조적 특징을 지녀 축소된 식물체의 생활환 순환에 중요한 역할을 한다(Newton et al., 1978; Sibasaki & Oda, 1979; Kim & Kim, 2000; Reimann et al., 2007; Kwak & Kim, 2008).

[0004]

한편, 개구리밥의 엽상체는 건중량 당 단백질 함량이 최대 45%를 차지하여 축산 사료로 잠재적 가치가 우수하다(Chang et al. 1977; Faskin 1999). 또한, 한방에서는 개구리밥의 전초를 말려서 해열, 이뇨작용은 물론 심장혈관계통 약제로 사용하고 있다. 또한 개구리밥의 빠른 증식 및 간단한 대량 배양체계를 활용하여 인체에 유용한 의료용 단백질의 대량 생산 연구가 수행되고 있다(Yamamoto et al. 2001). 또한, 국제공인기관인 ISO의 수질분야 생태독성 시험법에서는 바이오마커로 개구리밥을 사용하고 있다. 이와 같이 개구리밥은 약리적, 산업적 활용 가치가 매우 높고, 수질 독성 평가 등과 같은 생물학적 진단 분야에서도 중요한 위치를 차지하고 있다. 일반적으로 개구리밥의 활용은 대부분 성체나 엽상체를 통해 이루어지는데, 자연 상태에서는 추운 겨울이나 환경이 악화되었을 때 잠아가 개구리밥의 성체로부터 분리되어 침강하고 기온이 상승하였을 때 잠아가 수면으로 떠올라 엽상체를 형성하는 것과 같이 종자번식은 거의 일어나지 않고 잠아에 의한 활발한 영양번식으로 개체가 유지된다. 따라서, 개구리밥의 생물학적, 산업적 활용성을 높이기 위해 휴면 상태에 있는 개구리밥 잠아의 발아율을 향상시키는 방법에 관해 연구가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명은 이러한 배경하에 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 개구리밥으로부터 분리된 휴면 상태의 잠아를 효과적으로 발아시킬 수 있는 방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006]

본 발명의 발명자들은 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 소정의 조건으로 열 처리(heat shock)하면 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 보관 시간에 관계없이 잠아를 효과적으로 발아시킬 수 있다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0007]

상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 휴면 상태의 잠아를 60~70℃로 30초 내지 10분 동안 열 처리((heat shock) 하는 단계; 및 상기 열 처리된 잠아를 15~35℃의 온도 조건 및 50~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량 조건에서 2~4일 동안 배양하는 단계를 포함하는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법을 제공한다. 이때, 상기 (a) 단계의 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 바람직하게는 열 처리 전에 암 조건 및 0~25℃의 온도 조건에서 2개월 미만의 기간으로 보관된 것이고, 더 바람직하게는 0~5℃의 냉장 조건에서 보관된 것이다. 또한, 상기 (a) 단계의 열 처리 시간은 45초 내지 5분인 것이 바람직하다. 또한, 상기 (b) 단계의 잠아를 배양하기 위한 배지는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 것이 바람직하다. 또한, 상기 (b) 단계의 배양시 배양 온도는 20~30℃이고, 광 조사량은 90~120 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 이고, 배양 시간은 3~4일인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0008]

본 발명에 따른 방법을 사용하는 경우 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 보관 기간에 관계없이 쉽게 높은 비율로 발아시킬 수 있으므로, 바이오웨어로서 개구리밥이 필요한 경우 바로 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 개구

리밥의 생물학적, 산업적 활용성을 높이는 데에 초석이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 스테인버그 배지 기반으로 보관, 열 처리 및 배양한 잠아의 발아 상태를 나타낸 사진이다. 도 1의 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 순서대로 시험에 1, 시험에 2, 시험에 3 및 시험에 4의 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 호그랜드 배지 기반으로 보관, 열 처리 및 배양한 잠아의 발아 상태를 나타낸 사진이다. 도 2의 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 순서대로 시험에 4, 시험에 5, 시험에 6 및 시험에 7의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0011] 본 발명은 개구리밥으로부터 분리된 휴면 상태의 잠아를 효과적으로 발아시킬 수 있는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법은 (a) 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 60~70℃로 열 처리(heat shock) 하는 단계; 및 (b) 열 처리된 잠아를 배양하는 단계를 포함한다. 이하, 본 발명에 따른 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아 방법을 단계별로 나누어 설명한다.

[0012] 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 열 처리 하는 단계

[0013] 본 발명에서 개구리밥으로부터 분리된 잠아를 열 처리 하는 단계는 성숙한 개구리밥 개체의 엽상체로부터 분리된 잠아 또는 성숙한 개구리밥 개체의 엽상체로부터 분리된 후 소정의 조건에서 보관된 잠아를 소정의 온도 조건에서 가열하는 것으로 이루어진다. 이때, 본 발명에서 사용되는 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 휴면 상태에 있는 것으로서, 바람직하게는 열 처리 전에 암 조건 및 0~25℃의 온도 조건에서 2개월 미만, 예를 들어 10일 내지 50일, 더 바람직하게는 15일 내지 45일의 기간으로 보관된 것이다. 또한, 열 처리에 의한 잠아의 발아율을 고려할 때, 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 열 처리 전에 암 조건 및 0~5℃의 냉장 조건에서 보관되는 것이 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아는 이의 배양용 배지 내에서 보관되는 것이 바람직하며, 상기 잠아의 배양용 배지로는 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)가 있고, 이 중 스테인버그 배지(Steinberg's medium)가 더 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 열 처리 온도는 60~70℃인 것이 바람직하다. 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 열 처리 온도가 60℃ 미만인 경우, 열 처리 후 잠아의 배양시 잠아가 수면 위로 부상하더라도 엽상체 원기의 생장이 원활하지 않아 발아율의 향상이 미비할 염려가 있다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 열 처리 온도가 70℃를 초과하는 경우 잠아가 열에 의해 변성되어, 열 처리 후 잠아의 배양시 잠아가 수면 위로 부상하는 것이 원활하지 않고, 수면 위로 부상하더라도 발아가 제대로 이루어지지 않을 염려가 있다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 열 처리 시간은 크게 제한되지 않으나, 30초 내지 10분인 것이 바람직하고, 열 처리에 의한 잠아의 발아율을 향상시키고 열 처리에 의한 잠아의 변성을 최소화하는 관점에서 45초 내지 5분인 것이 더 바람직하고, 45초 내지 2분인 것이 가장 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 열 처리는 잠아가 건조된 상태에서 바로 사멸하는 점을 고려할 때, 소정의 온도로 가열된 액상 배지 내에서 이루어지는 것이 바람직하며, 이러한 액상 배지로는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)가 있다.

[0014] 열 처리된 잠아를 배양하는 단계

[0015] 본 발명에서 열 처리된 잠아를 배양하는 단계는 열 처리된 잠아를 소정의 배양용 배지에 넣고 소정의 온도, 광 조사량 조건에서 소정의 시간 동안 배양하는 것으로 이루어진다. 이때, 열 처리된 잠아를 배양하기 위한 배지는 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 배양에 사용되는 다양한 공지의 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)가 있으며, 잠아의 발아율을 고려할 때 스테인버그 배지(Steinberg's medium)인 것이 바람직하다. 또한, 열 처리된 잠아의 배양 시간은 크게 제한되지 않으나 잠아의 발아율에 대한 신뢰성을 확보하는 측면에서 적어도 2일 이상인 것이 바람직하고, 2~4일인 것이 더 바람직하며, 3~4일인 것이 가장 바람직하다. 또한, 열 처리된 잠아의 배양시 광 조사량은 50~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 바람직하고, 75~150 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 더 바람직하며, 90~120 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 인 것이 가장 바람직하다. 또한, 열 처리된 잠아의 배양시 배양 온도는 15~35℃인 것이 바람직하고, 20~30

℃인 것이 더 바람직하다.

[0016]

또한, 본 발명의 다른 측면은 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아용 키트는 개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아, 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 용기 및 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 배지를 포함할 수 있고, 바람직하게는 열 처리 수단을 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 개구리밥으로부터 분리된 휴면상태의 잠아는 바람직하게는 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)와 같은 배지에 보관된 바이오웨어 형태로 제공된다. 또한, 상기 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 용기는 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 웰 플레이트(Well plate) 또는 시험관(Test tube)에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 용기가 시험관인 경우 본 발명의 다른 예에 따른 수질 독성 진단 키트는 상기 시험관을 고정할 수 있는 시험관 고정수단(예를 들어 시험관 고정박스)를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 배지는 공지의 다양한 배지에서 선택될 수 있으며, 이 중 스테인버그 배지(Steinberg's medium) 또는 호그랜드 배지(Hoagland's medium)와 같은 인공 배지인 것이 바람직하다. 또한, 상기 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 배지가 스테인버그 배지(Steinberg's medium)인 경우 스테인버그 배지(Steinberg's medium)는 이를 구성하는 스톡 용액(Stock solution)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 상기 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 배지가 호그랜드 배지(Hoagland's medium)인 경우 호그랜드 배지(Hoagland's medium)는 이를 구성하는 스톡 용액(Stock solution)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 상기 열 처리 수단은 개구리밥의 잠아 및 개구리밥의 잠아를 배양하기 위한 배지를 수용하고 있는 용기를 소정의 시간 동안 일정한 온도로 유지시킬 수 있는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 열풍 건조기, 수욕(water bath) 등이 있으며, 이를 구현한 소형의 장치인 것이 바람직하다. 또한, 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아용 키트의 사용자가 열 처리 수단을 별도로 소유하고 있는 경우 열 처리 수단은 키트의 구성요소로 포함되지 않는다. 또한, 본 발명의 개구리밥으로부터 분리된 잠아의 발아용 키트는 개구리밥의 잠아를 배양용 용기에 옮기기 위한 핀셋, 펌프리 디쉬 등을 더 포함할 수 있으나, 여기에 반드시 한정되는 것은 아니다.

[0017]

본 발명의 방법을 사용하는 경우 성숙한 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 잠아를 보관기간에 상관없이 효과적으로 발아시킬 수 있다. 일반적으로 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 잠아는 냉장조건에서 2개월 이상 보관하지 않으면 이후 최적 배양 조건에서 배양하더라도 잠아의 발아율이 매우 낮은 것으로 알려져 있는데, 본 발명의 방법을 사용하는 성숙한 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 직후 또는 성숙한 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 후 2개월 미만, 예를 들어 1개월 동안 보관된 잠아를 약 90% 이상 발아시킬 수 있다.

[0018]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0019]

1. 스테인버그 배지(Steinberg medium) 및 호그랜드 배지(Hoagland's medium)

[0020]

하기 표 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 인공 배지인 스테인버그 배지에 포함되는 성분과 농도를 나타낸 것이다. 표 1에 나타나는 바와 같이 스테인버그 배지는 총 5개의 스톡 용액(Stock solution)을 포함하며, 각각의 스톡 용액은 개구리밥의 배양에 필요한 무기 성분 내지 유기 성분을 포함하는 용액으로 구성된다. 또한, 스테인버그 배지의 pH는 7 ± 0.2 수준이다.

표 1

[0021]

스톡 용액 구분	스톡 용액을 구성하는 성분의 종류	스톡 용액내에서의 구성 성분의 농도(g/ℓ)	인공 배지 1리터당 스톡 용액이 차지하는 부피(ml/ℓ)
I	KNO ₃	17.5	20
	K ₂ HPO ₄	4.5	
	KH ₂ PO ₄	0.63	
II	MgSO ₄ 7H ₂ O	5	20

III	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14.75	20
IV	H_3BO_3	0.12	1
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.18	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.044	
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18	
V	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.76	1
	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5	

[0022]

하기 표 2는 본 발명의 실시예에서 사용된 인공 배지인 호그랜드 배지에 포함되는 성분과 농도를 나타낸 것이다. 표 2에 나타나는 바와 같이 호그랜드 배지는 총 6개의 스톡 용액(Stock solution)을 포함하며, 각각의 스톡 용액은 개구리밥의 배양에 필요한 무기 성분 내지 유기 성분을 포함하는 용액으로 구성된다. 또한, 호그랜드 배지의 pH는 7 ± 0.2 수준이다.

표 2

[0023]

스톡 용액 구분	스톡 용액을 구성하는 성분의 종류	스톡 용액내에서의 구성 성분의 농도(g/ℓ)	인공 배지 1리터당 스톡 용액이 차지하는 부피(ml/ℓ)
I	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	1.0
II	K_2HPO_4	236	2.3
III	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	136	0.5
IV	KNO_3	101	2.5
V	H_3BO_3	2.86	0.5
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.82	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22	
	$\text{Cu}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.09	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.09	
VI	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.484	20
	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5	

[0024]

2. 개구리밥으로부터의 잠아의 분리 및 보관

[0025]

성숙한 국내산 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 잠아를 채취한 후 이를 스테인버그 배지 또는 호그랜드 배지가 채워진 플라스틱 튜브에 넣고, 빛을 차단한 조건, 즉 암 조건에서 일정 기간 동안 보관하였다.

[0026]

3. 채취된 잠아의 열 처리 조건에 따른 발아율 시험

[0027]

국내산 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 잠아를 채취한 후, 별도로 보관하지 않고 바로 열 처리한 후 배양하여 잠아의 발아율을 관찰하였다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다. 스테인버그 배지를 소정의 온도로 가열한 후, 여기에 채취한 잠아를 넣고 소정의 온도에서 소정의 시간 동안 열 처리하였다. 열 처리를 마친 잠아 10개를 약 15ml의 스테인버그 배지가 채워진 페트리디쉬(petridish)에 바로 옮겨 놓고 $90\text{--}100 \mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량(광 주기는 24시간 연속광 조건임) 및 25°C 의 온도에서 약 72시간 동안 배양하였다. 열 처리한 잠아의 배양을 완료한 후 발아된 잠아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 또한, 대조구로 채취한 잠아를 열 처리 없이 동일한 조건으로 바로 배양하였고, 배양을 완료한 후 발아된 잠아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 동일한 조건의 실험을 총 10회 반복하였다.

[0028]

하기 표 3에 열 처리 온도 및 시간에 따른 잠아의 발아율을 나타내었다.

표 3

[0029]

채취된 잠아의 열 처리 조건		잠아의 발아율(%)
온도(℃)	시간(min)	
35	1	0
45	1	0
55	1	0
60	1	68
65	1	72
70	1	70
75	1	0
85	1	0
95	1	0
35	5	0
45	5	0
55	5	0
60	5	69
65	5	73
70	5	71
75	5	31
85	5	0
95	5	0
열 처리 하지 않음		0

[0030]

4. 채취 후 30일 동안 냉장보관한 잠아의 열 처리 조건에 따른 수면 부상율 및 발아율 시험

[0031]

국내산 개구리밥 개체의 염상체에서 분리된 잠아를 채취한 후 이를 스테인버그 배지가 채워진 플라스틱 튜브에 넣고, 빛을 차단한 조건, 즉 암 조건에서 약 4℃의 냉장조건으로 30일 동안 보관하였다. 이후, 스테인버그 배지를 소정의 온도로 가열한 후, 여기에 30일 동안 냉장보관한 잠아를 넣고 소정의 온도에서 소정의 시간 동안 열 처리하였다. 열 처리를 마친 잠아 10개를 약 15mℓ의 스테인버그 배지가 채워진 페트리디쉬(petridish)에 바로 옮겨 놓고 90~100 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량(광 주기는 24시간 연속광 조건임) 및 25℃의 온도에서 배양하였다. 열 처리한 잠아의 배양 개시 후 48시간이 경과하였을 때 수면 위로 부상하는 잠아의 수를 관찰하여 수면 부상율을 계산하였고, 배양 개시 후 72시간이 경과하였을 때 발아된 잠아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 또한, 대조구로 30일 동안 냉장보관한 잠아를 열 처리 없이 동일한 조건으로 바로 배양하였고, 배양 개시 후 48시간이 경과하였을 때 수면 위로 부상하는 잠아의 수를 관찰하여 수면 부상율을 계산하였고, 배양 개시 후 72시간이 경과하였을 때 발아된 잠아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 동일한 조건의 실험을 총 10회 반복하였다.

[0032]

하기 표 4에 채취 후 30일 동안 냉장보관한 잠아의 열 처리 온도 및 시간에 따른 수면 부상율 및 발아율을 나타내었다.

표 4

[0033]

30일 동안 냉장보관한 잠아의 열 처리 조건		잠아의 수면 부상율(%)	잠아의 발아율(%)
온도(℃)	시간(min)		
35	1	25	10
45	1	50	10
55	1	80	13
60	1	96	93
65	1	100	100
70	1	98	95
75	1	55	35
85	1	0	0
95	1	0	0
35	5	50	11
45	5	55	12
55	5	90	15

60	5	98	91
65	5	100	92
70	5	98	89
75	5	60	30
85	5	0	0
95	5	0	0
열 처리 하지 않음		22	20

[0034] 상기 표 4에서 보이는 바와 같이 30일 동안 냉장보관한 감아를 60℃ 미만의 온도에서 열 처리한 후 배양하면 감아는 일부가 부상하였으나, 그 상태를 유지하면 대부분 발아하지 못하였다. 또한, 30일 동안 냉장보관한 감아를 75℃ 이상의 온도에서 열 처리하는 경우 감아의 색상이 짙은 녹색에서 황갈색으로 변하기 시작하였고, 85℃ 이상의 온도에서 열 처리 하는 경우 감아는 부상하지 않고 모두 사멸하는 것으로 나타났다.

[0035] 5. 채취 후 30일 동안 보관한 감아의 보관 조건, 열 처리 조건 및 배양용 배지에 따른 발아율 시험

[0036] 국내산 개구리밥 개체의 엽상체에서 분리된 감아를 채취한 후 이를 스테인버그 배지 또는 호그랜드 배지가 채워진 플라스틱 튜브에 넣고, 빛을 차단한 조건, 즉 암 조건에서 4℃의 냉장조건 또는 25℃의 실온조건으로 30일 동안 보관하였다. 이후, 스테인버그 배지 또는 호그랜드 배지를 65℃의 온도로 가열한 후, 여기에 30일 동안 냉장보관 또는 실온보관한 감아를 넣고 65℃의 온도에서 1분 또는 5분 동안 열 처리하였다. 열 처리를 마친 감아 10개를 약 15mL의 스테인버그 배지 또는 호그랜드 배지가 채워진 페트리디쉬(petridish)에 바로 옮겨 넣고 90~100 $\mu\text{mol photon/m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광 조사량(광 주기는 24시간 연속광 조건임) 및 25℃의 온도에서 배양하였다. 배양 개시 후 72시간이 경과하였을 때 발아된 감아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 또한, 대조구로 스테인버그 배지 또는 호그랜드 배지 내에서 30일 동안 냉장보관 또한 실온보관한 감아를 열 처리 없이 동일한 조건으로 바로 배양하였고, 배양 개시 후 72시간이 경과하였을 때 발아된 감아의 수를 관찰하여 발아율을 계산하였다. 동일한 조건의 실험을 총 10회 반복하였다.

[0037] 하기 표 5에 채취 후 30일 동안 소정의 조건에서 보관한 감아의 열 처리 여부에 따른 발아율을 나타내었다.

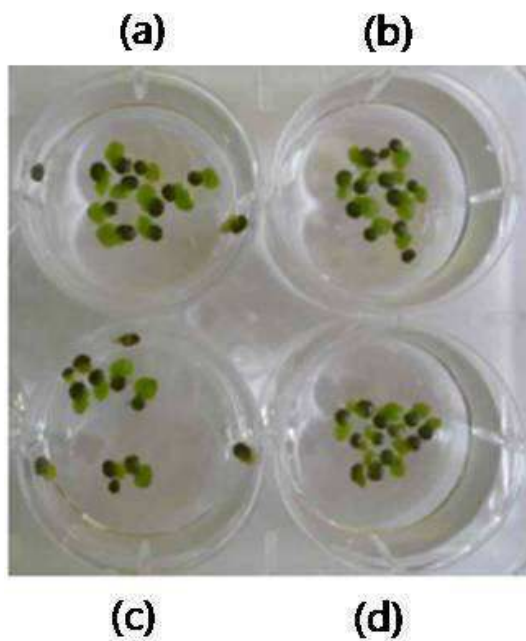
표 5

시험예 구분	보관 조건(보관용액, 보관온도, 보관시간)	열 처리 조건(열 처리용 배지, 열 처리 온도, 열 처리 시간)	배양용 배지	감아의 발아율(%)
시험예 1	스테인버그 배지, 4℃, 30일	스테인버그 배지, 65℃, 1분	스테인버그 배지	100
시험예 2	스테인버그 배지, 4℃, 30일	스테인버그 배지, 65℃, 5분	스테인버그 배지	92
비교시험예 1	스테인버그 배지, 4℃, 30일	열 처리 없음	스테인버그 배지	20
시험예 3	스테인버그 배지, 25℃, 30일	스테인버그 배지, 65℃, 1분	스테인버그 배지	84
시험예 4	스테인버그 배지, 25℃, 30일	스테인버그 배지, 65℃, 5분	스테인버그 배지	100
비교시험예 2	스테인버그 배지, 25℃, 30일	열 처리 없음	스테인버그 배지	10
시험예 5	호그랜드 배지, 4℃, 30일	호그랜드 배지, 65℃, 1분	호그랜드 배지	84
시험예 6	호그랜드 배지, 4℃, 30일	호그랜드 배지, 65℃, 5분	호그랜드 배지	100
비교시험예 3	호그랜드 배지, 4℃, 30일	열 처리 없음	호그랜드 배지	17
시험예 7	호그랜드 배지, 25℃, 30일	호그랜드 배지, 65℃, 1분	호그랜드 배지	67
시험예 8	호그랜드 배지, 25℃, 30일	호그랜드 배지, 65℃, 5분	호그랜드 배지	67
비교시험예 4	호그랜드 배지, 25℃, 30일	열 처리 없음	호그랜드 배지	8

- [0039] 도 1은 스테인버그 배지 기반으로 보관, 열 처리 및 배양한 잠아의 발아 상태를 나타낸 사진이다. 도 1의 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 순서대로 시험예 1, 시험예 2, 시험예 3 및 시험예 4의 결과를 나타낸 것이다. 또한, 도 2는 호그랜드 배지 기반으로 보관, 열 처리 및 배양한 잠아의 발아 상태를 나타낸 사진이다. 도 2의 (a), (b), (c) 및 (d)는 각각 순서대로 시험예 4, 시험예 5, 시험예 6 및 시험예 7의 결과를 나타낸 것이다.
- [0040] 상기 표 5, 도 1 및 도 2에서 보이는 바와 같이 소정의 열 처리 조건을 만족하는 경우, 보관 온도 및 배양용 배지와 관계없이 잠아는 높은 발아율을 나타내었다. 또한, 잠아의 발아율은 냉장조건에서 보관하는 경우 또는 배양용 배지로 스테인버그 배지를 사용하는 경우가 더 유리한 것으로 나타났다.
- [0041] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태들을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2

