



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월30일
(11) 등록번호 10-1973759
(24) 등록일자 2019년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 6/46 (2018.01) A01G 22/20 (2018.01)
A01H 1/02 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01H 6/4678 (2018.05)
A01G 22/20 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2019-0023922
(22) 출원일자 2019년02월28일
심사청구일자 2019년02월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180003699 A
Korean J. Breed. Sci. 46(3):203-208(2014.9)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
서용원
경기도 남양주시 별내3로 185, 2610동 403 (별내동, 별내효성해링턴코트아파트)
김대연
서울특별시 노원구 화랑로51나길 15, 102동 304호 (공릉동, 태릉현대홈타운스위트1단지)
고찬섭
서울특별시 서대문구 독립문공원길 13, 112동 1704호 (현저동, 독립문극동아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 5 항

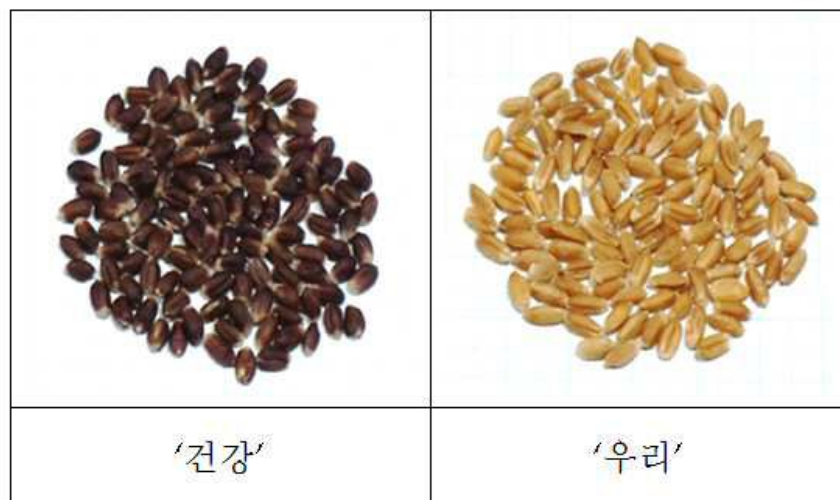
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ 및 이의 육종방법

(57) 요약

본 발명은 안토시아닌 고함유 신품종 밀 및 이의 육종방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ KCTC 13813BP 및 ‘우리’ 밀과 ‘951188’ 밀을 인공교배하는 단계를 포함하는 안토시아닌 고함유 신품종 밀의 육종방법에 관한 것이다. 본 발명의 신품종 밀 ‘건강’은 항산화 관련 기능성 물질인 안토시아닌의 함량이 ‘우리’ 밀보다 12배 정도 높아 영양 및 기능성이 강화되어 통밀빵이나 밀기울을 활용한 다양한 식품 가공에 활용될 수 있다. 따라서, 고부가가치 기능성 밀 ‘건강’은 밀 재배 면적 확대를 통한 생산농가의 수익증대뿐만 아니라 가공, 유통 업체까지로의 밀 산업 전반에 활용될 수 있으며, 수입대체 효과 및 국내 밀 관련 산업에 사용되는 국산밀 자급률 향상에 큰 기여를 할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01H 1/02 (2013.01)

A01H 5/10 (2018.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395053780

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 경질밀 육성체계 확립을 위한 글루텐 유전자 분석 및 환경스트레스 저항성 분자육종연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 13813BP로 기탁된 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신품종 밀 ‘건강’은 하기와 같은 식물학적 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 신품종 밀 ‘건강’:

초장: 82~98cm;

간장: 6.3~8.3cm;

수장: 74~91cm; 및

천립중: 43.35~50.65(g).

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 안토시아닌은 3.83 내지 4.55unit/mg의 함량으로 포함되는 것을 특징으로 하는 신품종 밀 ‘건강’.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신품종 밀 ‘건강’은 ‘우리’ 밀; 및 ‘951188’ 밀을 인공교배하여 육종된 것을 특징으로 하는 신품종 밀 ‘건강’.

청구항 5

‘우리’ 밀; 및 ‘951188’ 밀을 인공교배하고, 인공교배된 밀을 재배한 후, 후대밀인 ‘건강’을 수확하는 단계를 포함하는, 수탁번호 KCTC 13813BP로 기탁된 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’의 육종방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안토시아닌 고함유 신품종 밀 및 이의 육종방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ KCTC 13813BP 및 ‘우리’ 밀과 ‘951188’ 밀을 인공교배하는 단계를 포함하는 안토시아닌 고함유 신품종 밀의 육종방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 국내 밀 소비량은 연평균 400만 톤을 넘어서고 있으며, 국민 1인당 밀 소비량 또한 32.1kg으로 크게 증가하는 추세이다(농림축산식품 주요통계 2017). 밀은 우리나라에서 쌀 다음으로 소비가 많은 곡물로서 총 곡물소비량의 약 23%를 차지하나, 국내 밀의 식량자급도는 1.8%에 불과하다(농림축산식품 주요통계 2017). 값싼 수입 밀을 대체하여 국산 밀을 소비할 장점이 전혀 없는 것이 현재 국내 밀 산업의 현황이다.

[0004] 국민의 건강에 대한 관심 증대, 소비자 및 생산자의 요구 다양화 등 사회 분위기의 변화로 안전, 고품질, 기능성

농산물에 대한 요구가 증대되고 있으며 품질, 영양, 기능성 등이 강화된 작물 품종 및 생산기술의 개발에 대한 관심이 커지고 있다. 건강기능성 관련 식품 시장이 2017년 1조 4800억원에 달하고 연평균 10.6%의 성장률을 보이고 있는 만큼 건강기능성 식품에 대한 국민적 수요가 나날이 증가하고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 미토콘드리아의 ATP 생성과정에서 약 2-3%의 산소가 완전히 산화하지 못하고 불안정해진 활성산소가 된다. 체내 대사과정에서 발생하는 다양한 형태의 라디칼(superoxide, peroxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등)은 짝을 짓지 못한 전자를 가지고 있어 반응성이 매우 크기 때문에 세포사멸, 세포노화뿐만 아니라 암, 심장병, 당뇨병 등 다양한 질병의 유발원인으로 작용한다.

[0006] 안토시아닌(Anthocyanin)은 대사과정에서 생기는 활성산소를 파괴하는 항산화 작용을 하기 때문에 항산화, 콜레스테롤저하, 시력개선효과, 혈관보호기능, 동맥경화, 심장병예방, 항궤양기능, 항암, 항염증, 당뇨억제, 자외선으로부터의 보호기능 등 다양한 생리활성을 나타낸다. 안토시아닌은 식물의 꽃, 과일, 줄기, 잎 등에 폭넓게 함유되어 있는 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid 색소이며 1835년 Marquart가 꽃잎에 함유된 푸른색의 색소를 명명하기 위하여 최초로 사용하였다. 안토시아닌은 건강식품 및 신의약품 창출의 새로운 대상으로 주목받고 있으며, 다양한 유색 작물(벼, 콩, 고구마, 감자, 밀, 보리 등)에 대한 개발 연구가 진행되고 있다.

[0007] 일반적으로 밀기울에는 비타민 B1, B2, 칼슘, 철, 아연 등 다양한 무기 및 섬유질이 풍부하기 때문에 성인병, 대장암 등에 대한 예방 효과가 높다. 이에 더하여 일반 밀보다 안토시아닌, 폴리페놀 성분을 많이 함유하여 항산화 능력이 뛰어난 밀 신품종은 고부가가치 기능성 식품의 원재료로 직접 사용이 가능하며, 생산농가의 수익증대뿐 아니라 가공, 유통 업체까지로의 밀 산업 전반에 활용될 수 있으며, 수입대체 효과 및 국내 밀 관련 산업에 사용되는 국산밀 자급률 향상에 기여를 할 수 있을 것이다.

[0009] 이에 본 발명자들은 기능성 안토시아닌 함유 밀을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, ‘우리’ 밀과 ‘951188’ 밀을 인공교배하고 우량계통을 선발하여 안토시아닌 고함유 밀이 육종됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 안토시아닌 고함유 신품종 밀을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 안토시아닌 고함유 신품종 밀의 육종방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ (KCTC 13813BP)을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, ‘우리’ 밀과 ‘951188’ 밀을 인공교배하는 단계를 포함하는 안토시아닌 고함유 신품종 밀의 육종방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 신품종 밀 ‘건강’은 항산화 관련 기능성 물질인 안토시아닌의 함량이 ‘우리’ 밀보다 12배 정도 높아 영양 및 기능성이 강화되어 통밀빵이나 밀기울을 활용한 다양한 식품 가공에 활용될 수 있다. 따라서, 고부가가치 기능성 밀 ‘건강’은 밀 재배 면적 확대를 통한 생산농가의 수익증대뿐만 아니라 가공, 유통 업체까지로의 밀 산업 전반에 활용될 수 있으며, 수입대체 효과 및 국내 밀 관련 산업에 사용되는 국산밀 자급률 향상에 큰 기여를 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 ‘건강’과 ‘우리’의 출수기 및 성숙기 비교 사진이다(2018년).

도 2는 ‘건강’과 ‘우리’의 종자 사진이다.

도 3은 ‘건강’의 CIE LAB L*a*b* 색차 분석을 위한 L*a*b* 좌표를 나타낸 것이다.

도 4는 ‘건강’ 과 ‘우리’ 의 안토시아닌 추출 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 ‘건강’ 과 ‘우리’ 의 고분자량 글루테닌 분석을 위한 1D SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 ‘건강’ 과 ‘우리’ 의 DNA 분자마커를 이용한 고분자량 글루테닌 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0024] 본 발명에서는 ‘우리’ (IT175538, 국립농업과학원 농업유전자원센터) 밀과 ‘951188’ (‘Fleming’ *4/3/ ‘PI02580’ // ‘T83103’ *2/) Hamlet의 다교배로부터 얻은 F₁ 식물체) 밀을 인공교배하고 우수계통 선발 및 육성을 통해 안토시아닌 고함유 신품종 밀을 개발하였다.
- [0025] 본 발명에 따른 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ 은 한국생명공학연구원에 2019년 2월 13일자로 기탁번호 KCTC 13813BP로 기탁되었다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 수탁번호 KCTC 13813BP로 기탁된 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’ 에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 신품종 밀 ‘건강’ 은 초장: 82~98cm; 간장: 6.3~8.3cm; 수장: 74~91cm; 및 천립중: 43.35~50.65(g)과 같은 식물학적 특성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 ‘건강’ 은 초장, 간장, 수장 모두 통계적으로 유의한 수준에서 대조품종 ‘우리’ 보다 크게 측정되었다.
- [0029] 본 발명에 따른 ‘건강’ 은 천립중의 경우 통계적으로 유의한 범위에서 ‘우리’ 보다 크게 측정되었다. 리터중과 수량은 통계적으로 유의하지 않았으나, ‘건강’ 이 ‘우리’ 보다 다소 높게 측정되었다.
- [0030] 본 발명의 따른 ‘건강’ 의 종피색 특성을 분석한 결과, ‘건강’ 의 종피색이 ‘우리’ 보다 명도가 낮고 짙은 종피색을 보유함을 확인하였다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 안토시아닌은 3.83 내지 4.55unit/mg의 함량으로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 ‘건강’ 의 total 안토시아닌 함량 측정 결과, 평균 4.19unit/mg으로 측정되었으며, ‘우리’ 는 평균 0.346unit/mg으로 측정되었다. ‘건강’ 이 ‘우리’ 의 12.1배에 달하는 많은 양의 total 안토시아닌을 보유하고 있음을 확인할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따른 ‘건강’ 의 항산화 효소 활성 분석 결과, APX는 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 2.09배의 활성을 보였으며, POD는 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 4.14배의 활성을 보였다. CAT는 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.33배의 활성을 보였고, SOD는 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.74배의 활성을 보였다. 총 페놀 함량은 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.86배의 총 페놀 함량을 보유하고 있었다.
- [0034] 결과적으로 본 발명에 따른 신품종 밀 ‘건강’ 은 높은 항산화 능력을 보유한 안토시아닌 고함유 6배체 밀로 규정된다.
- [0035] 또한 본 발명에 따른 ‘건강’ 의 품질관련 유전적 특성을 분석하기 위해 *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*의 조합을 검정하였다. Payne score(Payne 등, 1987) 등에 따라 종자저장단백질의 1D SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, ‘건강’ 의 제빵적성과 관련된 고분자량 글루테닌 조성의 경우, *Glu-A1*은 null, *Glu-B1*은 7+8, *Glu-D1*은 2+12로 확인되었으며 ‘우리’ 는 *Glu-A1*은 null, *Glu-B1*은 7+8, *Glu-D1*은 2.2+12로 확인되었다. ‘건강’ 은 *Glu-D1*을 제외한 sub-unit이 ‘우리’ 와 동일한 것으로 확인되었다.
- [0036] 또한, 고분자량 글루테닌 대립유전자의 분자마커를 이용하여 각 대립유전자의 유전자형 분석을 실시한 결과, ‘건강’ 과 ‘우리’ 의 고분자량 글루테닌 대립유전자 변이는 동일하게 나타났으며, 1D SDS-PAGE 결과와 일치하는 결과임을 확인하였다. 다만, *GluD1x*의 2와 2.2 subunit의 경우 1D SDS-PAGE 상에서는 차이가 나지만(도 5), DNA 분자마커로 구별할 경우 같은 크기(299bp)의 PCR product를 확인하였다(도 6).
- [0037] 따라서 본 발명에 따른 ‘건강’ 은 체면용(중력분)으로 적합한 것으로 판단된다.

- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 신품종 밀 ‘건강’은 ‘우리’ 밀; 및 ‘951188’ 밀을 인공교배하여 육종된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 다른 관점에서, ‘우리’ 밀; 및 ‘951188’ 밀을 인공교배하고, 인공교배된 밀을 재배한 후, 후대밀을 수확하는 단계를 포함하는 안토시아닌 고함유 신품종 밀 ‘건강’의 육종방법에 관한 것이다.
- [0041] 이때, 상기 수확된 후대밀은 그의 종자에 안토시아닌을 높은 함량으로 포함하는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 기탁번호 KCTC 13813BP로 기탁된 신품종 밀일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서, ‘우리’ (IT175538, 국립농업과학원 농업유전자원센터) 밀을 모본(maternal parents)으로, 육성 순계계통인 ‘951188’ (‘Fleming’ *4/3/ ‘PI02580’ // ‘T83103’ *2/’ Hamlet의 다교배로부터 얻은 F₁ 식물체) 밀을 부본(paternal parents)으로 인공교배를 실시하였다. 상기 모본과 부본 F₁ 종자를 교종하여 F₂ 종자를 얻었다. 증식한 F₂ 종자는 매년 수(spike) 선발과 수선발 계통(head row) 평가를 지속하였다. 헤시안파리(*Mayetiola destructor*)에 대한 저항성 평가를 수행하여 완전 저항성(completely resistance) 계통에 대하여 선발하였다. 제농업적특성이 우수하고 자색(purple)의 특성을 지닌 계통을 최종 선발하였으며, 선발된 품종은 높은 항산화 능력을 보유한 안토시아닌 고함유 6배체 밀로 규정될 수 있음을 확인하고, 한국생명공학연구원에 2019년 2월 13일자로 기탁번호 KCTC 13813BP로 기탁하였다.
- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0046] **실시예 1: ‘건강’의 육성과정**
- [0047] 1997년 ‘우리’ (IT175538, 국립농업과학원 농업유전자원센터) 밀을 모본(maternal parents)으로, 육성 순계계통인 ‘951188’ (‘Fleming’ *4/3/ ‘PI02580’ // ‘T83103’ *2/’ Hamlet의 다교배로부터 얻은 F₁ 식물체) 밀을 부본(paternal parents)으로 교배 후, 계통평가 및 선발을 통하여 제농업적특성이 우수하고 자색(purple)의 특성을 지닌 계통을 최종 선발하였으며, ‘건강’ (*Triticum aestivum* L.)으로 밀 품종명을 부여하였다.
- [0048] 1997년에 얻은 F₁ 종자를 1998년-1999년 온실에 교종하여 F₂ 종자를 얻었다. 증식한 F₂ 종자는 2000년-2001년 space planing하여 약 3500개의 수(spike) 선발을 하였으며 2001년-2002년 포장기간부터 2006년-2007년에 걸쳐 매년 수(spike) 선발과 수선발 계통(head row) 평가를 지속하였다. 특히, 2006년-2007년 선발계통은 헤시안파리(*Mayetiola destructor*)에 대한 저항성 평가를 수행하여 moderate resistance와 susceptible 계통은 탈락시키고 오직 완전 저항성(completely resistance) 계통에 대하여 선발하였다. 따라서 선발된 계통들은 *H21* 저항성 유전자를 보유하고 있다.
- [0049] 2007년-2008년 분리계통 중 종피색깔이 노란색과 자주색으로 현저하게 분리하는 계통을 선발하여 자색종피색은 분리시킨 후 2008년-2009년부터는 자색계통간의 계통선발 및 평가를 2000년-2010년까지 수행하였으며, 수량성, 개화특성 등 제농업특성이 우수한 계통을 선발하여 2011년-2012년부터 2017년-2018년까지 plot test를 수행하였다.
- [0050] 최종적으로 중부(경기도 남양주시) 지역 및 남부(전라북도 정읍시) 지역 평가결과와 성분분석결과를 종합하여 ‘건강’ 밀을 최종 품종으로 선발하였다.
- [0051] 본 발명의 ‘건강’의 육성경위를 도식화하면 하기 표 1과 같다.

표 1

‘건강’의 육성경위

연도	'97	'98 - '99	'99-'00	'00-'07	'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'17	'18
세대	F ₁	F ₂	F ₃	F ₃ - F ₁₀	F ₁₀₋₁₁	F ₁₀₋₁₂	F ₁₀₋₁₃	F ₁₀₋₁₄	F ₁₀₋₁₅	F ₁₀₋₁₆	F ₁₀₋₁₇	F ₁₀₋₁₈	F ₁₀₋₁₉	F ₁₀₋₂₀	F ₁₀₋₂₁
육성 정보	우리 951188 } 97067	F ₂ seed increasing	*SSS	*HRS	HRS	HRS	HRS	HRS	*PYT	PYT	PYT	*RYT	RYT	RYT	Seed increasing

*SSS: Single Spike Selection

*HRS: Head Row Selection

*PYT: Preliminary Yield Test

*RYT: Regional Yield Test

[0052]

[0054] 실시예 2: ‘건강’의 생육특성 분석

[0055] ‘건강’의 생육특성 검정을 위하여 ‘건강’과 대조품종 ‘우리’에 대한 생육 조사를 경기도 남양주 덕소에서 실시하였으며, 출수기 및 성숙기의 실험포 사진은 도 1과 같다.

[0056] ‘건강’과 ‘우리’의 생육특성은 구체적으로 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0057] ‘건강’과 ‘우리’의 초장, 간장, 수장의 생육특성 분석

	평균		표준편차		t 값	p 값
	건강	우리	건강	우리		
초장 (cm)	89.83	77.18	8.17	6.59	6.472	0.00**
간장 (cm)	7.30	6.67	1.01	0.80	2.653	0.01**
수장 (cm)	82.43	70.66	8.61	6.97	5.07	0.00**

[0058] ** P<0.01, * P<0.05

[0059] 초장 평균은 ‘건강’ 89cm, ‘우리’ 77cm로 측정되었으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 간장 평균은 ‘건강’ 7.3cm, ‘우리’ 6.67cm로 측정되었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 수장 평균은 ‘건강’ 82.4cm, ‘우리’ 70.6cm로 측정되었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

[0060] ‘건강’은 초장, 간장, 수장 모두 통계적으로 유의한 수준에서 ‘우리’보다 크게 측정되었다.

[0062] 실시예 3: ‘건강’의 수량구성요소 분석

[0063] ‘건강’의 수량구성요소 분석 결과는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

표 3

[0064] ‘건강’과 ‘우리’의 천립중, 리터중, 수량의 비교 분석

	평균		표준편차		t 값	p 값
	건강	우리	건강	우리		
천립중 (g)	47.0	38.5	3.65	2.57	7.081	0.00**
리터중 (g)	791.5	782.2	27.5	18.1	0.961	0.345
수량 (kg/10a)	470.0	449.1	72.0	85.3	0.711	0.483

[0065] ** P<0.01, * P<0.05

- [0066] 천립중의 경우 ‘건강’ 47.0g, ‘우리’ 38.5g으로 측정되었으며, ‘건강’의 천립중이 통계적으로 유의한 범위에서 ‘우리’보다 크게 측정되었다.
- [0067] 리터중은 ‘건강’ 791.5g, ‘우리’ 782.2g으로 측정되었으며, 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0068] 수량은 ‘건강’ 470kg/10a, ‘우리’ 449.1kg/10a으로 ‘건강’ 밀이 다소 높게 측정되었으나 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0069] ‘건강’은 수량구성요소에서 ‘우리’보다 평균적으로는 다소 높게 측정되었으나, 천립중을 제외한 리터중과 수량은 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0071] **실시예 4: ‘건강’ 종피색 관련 특성 검정**
- [0072] ‘건강’과 ‘우리’의 종자 사진은 도 2와 같다. 대조품종인 ‘우리’의 경우 적립계로서 다소 붉은 빛을 띠는 반면 ‘건강’은 짙은 자주색 종피를 가지고 있음을 확인할 수 있다.
- [0073] ‘건강’의 종피색 관련 특성검정을 위하여 CIE LAB L*a*b* 색차 분석을 실시하였다. L*는 명도(밝기)를 나타내는 수치이며 a*는 플러스(+)값이 클수록 빨강, 마이너스(-)값이 클수록 녹색을 나타낸다. 마지막으로 b*는 플러스(+)값이 클수록 노랑, 마이너스(-)값이 클수록 파랑을 나타낸다(도 3).
- [0074] ‘건강’과 ‘우리’의 L*a*b* 색차 분석 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

‘건강’과 ‘우리’의 L*a*b* 색차 분석

	평균		표준편차		t 값	p 값
	건강	우리	건강	우리		
L	38.93	61.78	5.84	1.64	6.525	0.003**
a	9.85	13.06	0.74	0.80	5.130	0.007**
b	1.28	17.65	0.83	0.90	23.09	0.000**
CIELAB						

** P<0.01, * P<0.05

- [0075]
- [0076] L* 값은 ‘건강’ 38.93, ‘우리’ 61.8로 측정되었다. ‘건강’의 L* 값이 ‘우리’보다 작게 측정되었다는 것은 ‘건강’의 종피색 명도(밝기)가 ‘우리’보다 낮다는 것을 의미한다.
- [0077] a* 값은 ‘건강’ 9.85, ‘우리’ 13.06으로 측정되었다. ‘건강’의 a* 값이 ‘우리’ 대비 플러스(+) 범위에서 작게 측정되었으며, 이는 ‘우리’의 종피색이 ‘건강’의 종피색보다 적자색에 가깝다는 것을 의미한다.
- [0078] b* 값은 ‘건강’ 1.28, ‘우리’ 17.65로 측정되었다. ‘건강’의 b* 값이 ‘우리’ 대비 플러스(+) 범위에서 작게 측정되었으며, 이는 ‘건강’의 종피색이 ‘우리’의 종피색보다 노랑이 아닌 파랑에 가깝다는 것을 의미한다.
- [0079] CIE LAB L*a*b* 색차 분석 결과, ‘건강’의 종피색이 ‘우리’보다 명도가 낮고 짙은 종피색을 보유함을 확인할 수 있다.
- [0081] **실시예 5: ‘건강’의 안토시아닌 함량 측정**
- [0082] ‘건강’의 종피색과 안토시아닌 함량과의 상관관계를 확인하기 위하여 ‘건강’과 대조품종 ‘우리’의 total 안토시아닌 함량을 측정하였다. ‘건강’과 ‘우리’ 종자 1g을 액체질소와 함께 고운 분말이 되도록 파쇄한 후, 1ml의 MeOH-HCL(1% HCL, w/v)를 추가하고, 암조건 4℃에서 24시간 동안 보관하였다. 이후 UV-Vis Spectrophotometer를 사용하여 530nm와 657nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌(total anthocyanin content, TAC)는 다음의 함수식을 통하여 측정하였다.

[0084]
$$\text{Total anthocyanin content} = Q\left(\frac{\text{unit}}{\text{mg}}\right) = A_{530} - 0.25A_{657} \times \frac{\text{hydrolysis volume (ml)}}{\text{sample weight (mg)}}$$

[0086] ‘건강’의 total 안토시아닌 함량 측정 결과, ‘건강’은 4.19unit/mg, ‘우리’는 0.346unit/mg으로 측정되었다. 이를 ‘우리’ 기준 비율로 환산하면 ‘건강’의 경우 ‘우리’의 12.1배에 달하는 많은 양의 total 안토시아닌을 보유하고 있음을 확인할 수 있다(도 4 및 표 5).

표 5

[0087] ‘건강’과 ‘우리’의 total 안토시아닌 함량 분석

	평균		표준편차		t 값	p 값
	건강	우리	건강	우리		
안토시아닌 함량 (unit/mg)	4.190	0.346	0.36	0.12	20.265	0.000**

[0088] ** P<0.01, * P<0.05

[0090] **실시예 6: ‘건강’의 항산화 효소 활성 분석**

[0091] 식물체에서 활성화되는 항산화 효소들은 세포막의 지질 과산화, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화, 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 활성산소종을 불활성화 시키거나 제거하는 항산화 작용을 진행한다. 이에 따라, 종자의 항산화효소 활성 등의 생리 기능적 효능을 검증하여 그 이용성을 확대하고자 하는 목적에서 실험을 수행하였다.

[0092] Ascorbate Peroxidase(APX)는 ascorbate를 산화시킴으로써 H₂O₂를 불활성화시키고, 생체 내에서 활성 산소로부터 생체를 보호하는 작용을 함으로써 각종 성인병 예방 및 항암, 항노화 기능을 수행한다. Catalase(CAT)는 생체내의 유해 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 APX와 함께 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. Superoxide dismutase(SOD)는 세포 내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키며 생성된 H₂O₂를 CAT와 peroxidase(POD)가 몰로 전환하여 독성을 상실하게 된다. 이를 바탕으로 각 효소들의 활성도가 높을 때 식품 개발의 소재로서 유용하게 활용이 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0093] ‘건강’과 ‘우리’의 항산화 효소 활성 분석 방법은 다음과 같다. Total protein은 0.2g의 종자 분쇄물을 0.2M, pH 7.0 potassium phosphate buffer에 0.1mM EDTA가 첨가된 용액 1ml와 충분히 섞어준 후 x12,000g, 4℃에서 15분간 원심분리를 진행하여 나온 상등액을 이용하였다. 추출한 총 단백질함량은 Bradford assay로 분석했다.

[0094] Ascorbate Peroxidase(APX)는 50mM, pH7.0 HEPES buffer에 0.1mM EDTA가 첨가된 용액 800 μl, 0.6mM Ascorbic acid 50 μl, 1mM H₂O₂ 100 μl와 함께 단백질 추출용액 50 μl를 넣어 충분히 섞어준 후 290nm에서 1분 30초간 측정하며 흡광도의 변화를 확인하였다.

[0095] Superoxide dismutase(SOD)는 50mM, pH 7.8 potassium phosphate buffer에 0.1mM EDTA가 첨가된 용액 800 μl, 0.1mM NBT용액 420 μl, 13mM methionine 용액 420 μl, 10uM riboflavin 용액 60 μl와 단백질 추출용액 60 μl를 넣어 충분히 섞어준 후 강한 빛에서 20분간 색의 변화를 주었으며, 560nm에서 측정하여 각 품종들의 흡광도 차이를 측정하였다.

[0096] Peroxidase(POD)는 0.1M, pH 6.0 potassium phosphate buffer에 0.1mM EDTA가 첨가된 용액 106.6 μl, 0.147M H₂O₂ 53.3 μl, 5% pyrogallol 106.6 μl, D.W 700 μl와 단백질 추출용액 33.3 μl를 넣어 충분히 섞어준 후 420nm에서 20초간 측정하며 흡광도의 변화를 확인하였다.

[0097] Catalase(CAT)는 50mM, pH 7.0 potassium phosphate buffer 660 μl, 30% H₂O₂ 330 μl와 단백질 추출용액 10 μl를 넣어 충분히 섞어준 후 240nm에서 1분간 측정하며 흡광도의 변화를 확인하였다.

[0098] ‘건강’과 ‘우리’의 항산화 효소 활성 분석 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0099]

‘건강’ 과 ‘우리’ 의 항산화 효소 활성 및 총 페놀 함량 분석

	평균		표준편차		t 값	p 값
	건강	우리	건강	우리		
Ascorbate peroxidase (unit/mg)	4.06	1.94	0.72	0.40	4.40	0.012*
Peroxidase (unit/mg)	1.49	0.36	0.12	0.90	13.06	0.000**
Catalase (unit/mg)	4.36	3.29	0.33	0.35	3.85	0.018*
Superoxide dismutase (unit/mg)	14.49	8.32	0.91	1.01	7.85	0.001**
Total phenolic content (μg/ml)	17.54	9.42	0.67	0.65	10.62	0.000**

[0100]

** P<0.01, * P<0.05

[0101]

항산화 효소 활성 분석 결과, APX는 ‘건강’ 4.06unit/mg, ‘우리’ 1.948unit/mg 으로 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 2.09배의 활성을 보였으며, POD는 ‘건강’ 1.49unit/mg, ‘우리’ 0.36unit/mg으로 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 4.14배의 활성을 보였다. 또한, CAT는 ‘건강’ 4.36unit/mg, ‘우리’ 3.29unit/mg으로 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.33배의 활성을 보였고, SOD는 ‘건강’ 14.49unit/mg, ‘우리’ 8.32unit/mg으로 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.74배의 활성을 보였다. 총 페놀 함량 측정 결과 ‘건강’ 17.54 μg/ml ‘우리’ 9.42 μg/ml으로 ‘건강’ 이 ‘우리’ 대비 1.86배의 총 페놀 함량을 보유하고 있다(표 6).

[0102]

결과적으로 본 발명에 따른 신제품 밀 ‘건강’ 은 높은 항산화 능력을 보유한 안토시아닌 고함유 6배체 밀로 규정된다.

[0104]

실시예 7: ‘건강’ 품질관련 유전적 특성 분석

[0105]

밀 품질은 종실 내 함유된 밀 저장단백질인 글루텐의 양과 질적 특성에 의해 결정된다. 글루텐은 glutenin과 gliadin으로 구성되어 있으며 일반적으로 glutenin은 밀가루의 탄성과 관련이 높고 gliadin은 점성과 신축성과 관련이 있다.

[0106]

Glutenin 중 고분자량 글루테닌(HMW-GS)은 *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*에 의해 암호화되며 밀가루 반죽의 탄력성에 영향을 주고 발효과정 중 효모에 의해 발생하는 이산화탄소를 보유하여 빵을 부풀리는 데 중요한 역할을 한다. ‘건강’ 과 ‘우리’ 의 품질관련 유전적 특성을 분석하기 위해 *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*의 조합을 검정하였다.

[0107]

1D SDS-PAGE를 통해 종자저장단백질의 subunit profiling하여 품질관련 유전적 특성을 확인하였다. 고분자량 글루테닌 조성의 gluten score(글루텐 점수)는 payne score(Payne 등, 1987)에 준하여 수치화하였다(표 7).

표 7

[0108]

‘건강’ 과 ‘우리’ 의 고분자량 글루테닌 변이 분석

	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	Gluten score
우리	null	7+8	2.2+12	6
건강	null	7+8	2+12	6

[0109]

품질특성은 상기 표 7 및 도 5에 나타난 바와 같다. ‘건강’ 의 제빵적성과 관련된 고분자량 글루테닌 조성의 경우, *Glu-A1*은 null, *Glu-B1*은 7+8, *Glu-D1*은 2+12로 확인되었으며 ‘우리’ 는 *Glu-A1*은 null, *Glu-B1*은 7+8, *Glu-D1*은 2.2+12로 확인되었다. ‘건강’ 은 *Glu-D1*을 제외한 sub-unit이 ‘우리’ 와 동일한 것으로 확인되었다.

[0111]

고분자량 글루테닌 대립유전자의 분자마커를 이용하여 각 대립유전자의 유전자형 분석을 실시하였다. 분자마커는 발표된 연구정보(Butow et al. 2004; Lei et al. 2006; Liu et al. 2008)를 기반으로 선별하였다(표 8).

표 8

[0112] ‘건강’과 ‘우리’의 고분자량 글루테닌 DNA 분석을 위해 사용된 프라이머 정보

마커명	프라이머 서열	어닐링 온도(℃)	목표 산물 크기(bp)
<i>Glu-A1x</i>	F: CGAGACAATATGAGCAGCAAG (서열번호 1) R: CTGCCATGGAGAAGTTGGA (서열번호 2)	60	Ax2*: 344 Ax1, AxNull1: 362
<i>Glu-B1x</i>	F: CCTCAGCATGCAAACATGCAGC (서열번호 3) R: CTGAAACCTTTGGCCAGTCATGTC (서열번호 4)	58	Bx7: 563
<i>Glu-B1y</i>	F: TTAGCGCTAAGTGCCGTCT (서열번호 5) R: TTGTCCTATTGCTGCCCTT (서열번호 6)	64	By8: 527
<i>Glu-D1x</i>	F: GGGACAATACGAGCAGCAAA (서열번호 7) R: CTTGTTCCGGTTGTGCCA (서열번호 8)	60	Dx2: 299, Dx2.2: 299 Dx5: 281
<i>Glu-D1y</i>	F: CGCAAGACAATATGAGCAAACT (서열번호 9) R: TTGCCTTTGTCTGTGTGC (서열번호 10)	60	Dy10: 397 Dy12: 415

[0113] Genomic DNA는 Genomic DNA extraction Kit(iNtRON Biotechnology Inc., Korea)를 사용하여 추출하였으며 Nano drop을 이용하여 50ng으로 정량화하였다. 이후 PCR은 genomic DNA 50ng, 프라이머 각 쌍 0.1μmol/l, MgCl₂와 dNTP 2.0mmol/l, Taq 중합효소(Ex Taq polymerase, TaKaRa Korea Biomedical Inc., Korea) 1 unit을 기본 조성으로 총 반응액은 25μl로 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분간 변성반응을 거친 후, 증폭단계에서 94℃에서 30초, 어닐링(anealing) 온도는 각 프라이머 조건에 맞는 온도에 30초를 진행하였고, 72℃ 20초를 35회 반복하여 진행하였으며, 최종 신장반응은 72℃에서 2분간 수행하였다. PCR 산물은 EtBr(0.1μg/ml)이 포함된 2.0% 아가로스 겔에서 160V로 50분간 동안 전기영동한 후 UV Gel-doctor를 이용하여 확인하였다.

[0115] ‘건강’과 ‘우리’의 고분자량 글루테닌 DNA 분석 결과는 하기 표 9 및 도 6에 나타낸 바와 같다.

표 9

[0116] ‘건강’과 ‘우리’ 고분자량 글루테닌 대립유전자 변이 분석

		<i>Glu-A1x</i>	<i>Glu-B1x</i>	<i>Glu-B1y</i>	<i>Glu-D1x</i>	<i>Glu-D1y</i>
우리	Type	null	7	8	2.2	12
	산물크기 (bp)	362	563	527	299	415
건강	Type	null	7	8	2	12
	산물크기 (bp)	362	563	527	299	415

[0117] ‘건강’과 ‘우리’의 고분자량 글루테닌 대립유전자 변이는 동일하게 나타났으며, 1D SDS-PAGE 결과(표 9, 도 5)와 일치하는 결과임을 확인하였다.

[0118] 다만, 현재 *GluD1x*의 2와 2.2 subunit을 구별할수 있는 DNA 분자마커가 존재하지 않기 때문에 *GluD1x*의 2와 2.2 subunit의 경우 1D SDS-PAGE 상에서는 차이가 나지만(도 5), DNA 분자마커로 구별할 경우 같은 크기(299bp)의 PCR product를 확인하였다(도 6).

[0119] 따라서 ‘건강’은 용도별 분류에 있어서 제면용(중력분)으로 적합하다고 판단된다.

[0121] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0123]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13813BP

수탁일자 : 20190213

도면

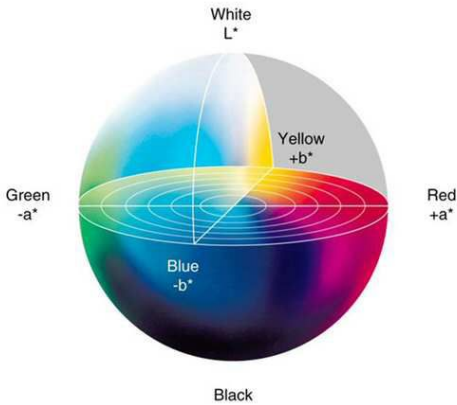
도면1

출수기 (경기 남양주, 덕소)		성숙기 (경기 남양주, 덕소)	
			
‘건강’	‘우리’	‘건강’	‘우리’

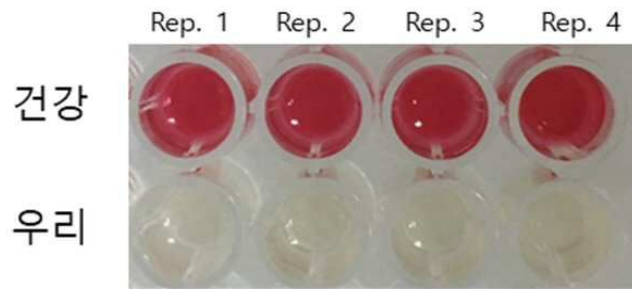
도면2

	
‘건강’	‘우리’

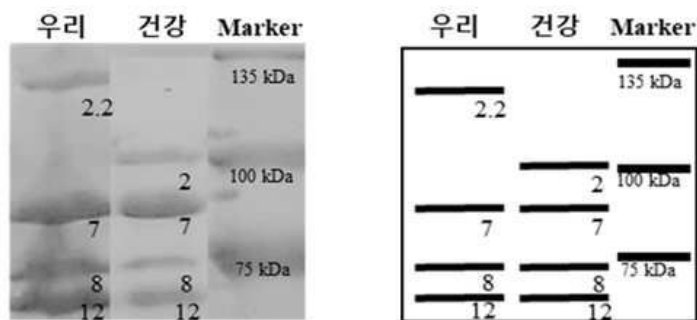
도면3



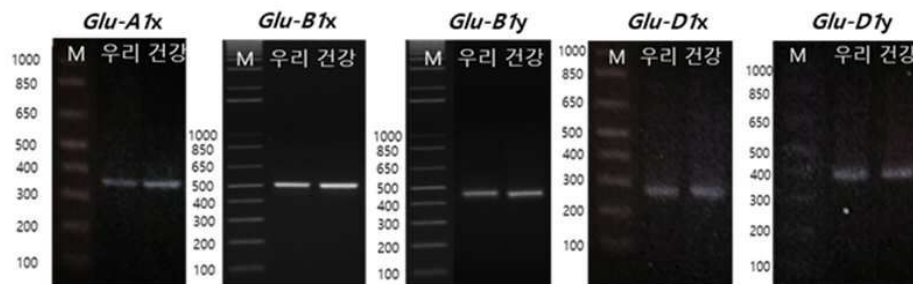
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research & Business Foundation
- <120> Novel Cultivar Anthocyanin-Rich Wheat 'Geongang' and Breeding Method Thereof
- <130> P19-B050
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 cgagacaata tgagcagcaa g 21
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2

 ctgccatgga gaagttgga 19
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 cctcagcatg caaacatgca gc 22
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ctgaaacctt tggccagtca tgtc 24
 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> primer
 <400> 5
 ttagcgctaa gtgccgtct 19

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ttgtcctatt tgctgccctt 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gggacaatac gagcagcaaa 20
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 cttgttccgg ttgttgcca 19
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 cgcaagacaa tatgagcaaa ct 22
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10

ttgcctttgt cctgtgtgc

19