(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월09일
(11) 등록번호 10-0835701
(24) 등록일자 2008년05월30일

(51) Int. Cl.
A01K 67/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0138305
(22) 출원일자 2006년12월29일
심사청구일자 2006년12월29일
(56) 선행기술조사문헌
대한민국공개특허공보 제1020050003508호(2005. 01. 12.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
송준임
서울특별시 종로구 청운동 106
조인영
충북 충주시 수안보면 화천리 523
김한나
경기 부천시 소사구 괴안동 202-3 성우아파트 가동 408호
(74) 대리인
특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김정태

(54) 연산호류의 자가절단 유도에 의한 대량증식 방법

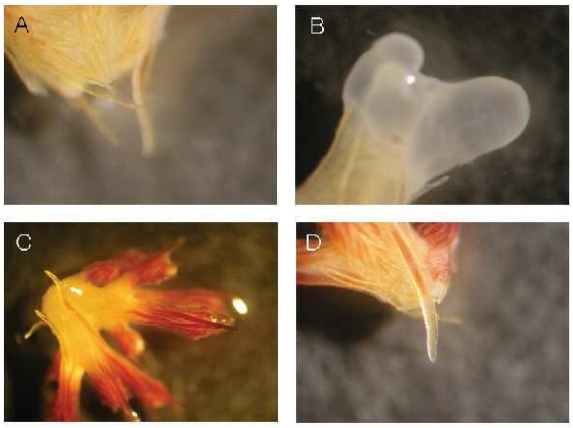
(57) 요 약

본 발명은 연산호류의 배양에 있어서,

1) 채취할 연산호류의 대상 종을 선정하는 단계, 2) 선정된 연산호류를 모 군체로부터 채취하는 단계, 3) 채취한 연산호류를 이동시키는 단계, 4) 수송된 연산호류를 수온차이를 이용하여 자가절단을 유도하는 단계, 5) 자가절단된 연산호류 절편을 채취하는 단계; 6) 기질에 부착시키는 단계, 및 7) 부착된 연산호류를 배양하는 단계를 포함하는 연산호류의 배양방법을 제공한다.

본 발명의 연산호류 배양방법을 통해 연산호류는 인위적으로 자가절단이 유도되어 무성번식이 가능하므로 적은 양의 모군체로부터 다량의 개체들로 증식할 수 있다. 또한, 자가절단된 연산호류 절편은 인공절단한 경우보다 건강한 상태를 지속적으로 유지하여 기질 부착율 및 생존율이 최대화됨으로써 증식률도 매우 높아지는 작용 효과를 나타낸다. 따라서 본 발명은 연산호류의 대량증식에 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

연산호류의 자가절단 유도에 의한 대량증식에 있어서,

1) 채취할 연산호류의 대상 종을 선정하는 단계, 2) 선정된 연산호류를 모 군체로부터 채취하는 단계, 3) 채취된 연산호류를 서식처 해수와 7~10 ℃ 수온차이가 있는 배양수로 이동시키는 단계, 4) 상기 수온차이를 이용하여 이동된 연산호류의 자가절단을 유도하는 단계, 4-1) 22~24 ℃의 수온에서 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계, 5) 자가절단된 연산호류 절편을 채취하는 단계, 6) 채취된 연산호류 절편을 기질에 부착시키는 단계, 및 7) 부착된 자가절단 연산호류 절편을 배양하는 단계를 포함하는 연산호류의 자가절단 유도에 의한 대량증식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상 종은 자색수지맨드라미(*Dendronephthya putteri*) 또는 검붉은수지맨드라미(*Dendronephthya suensoni*)인 것을 특징으로 하는 연산호류의 자가절단 유도에 의한 대량증식 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 5단계의 연산호류 절편은 자가절단을 유도한 지 3일 이내에 발생한 절편인 것을 특징으로 하는 연산호류의 자가절단 유도에 의한 대량증식 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<7> 본 발명은 연산호류의 인위적인 자가절단 유도를 통한 연산호류 배양방법에 관한 것이다.

<8> 산호충류는 화려하고 아름다운 모양새로 '바다의 꽃'이라 불리며 과거에는 보석이나 장신구로 상품화되어 왔지만, 최근에는 고부가가치의 관광자원으로 이용되고 있으며 산호 추출물의 항암 항균 작용이 보고되면서 약물개발과 산호의 골격을 이용한 인공뼈 등 의학 분야에 중요한 소재로 주목받고 있다. 산호류는 전 세계적으로 CITES (Convention on Internation Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에서 3,500여 종을 무역 규제종으로 지정하고 있다. 한국에서는 1998년에 환경부 지정 '한국의 멸종위기 및 보호야생 동·식물' 중 산호충류 15종을 보호야생종으로 지정한 바 있고, 2004년에 문화재청에서 제주 연안 연산호군락지를 천연기념물 제 442호로 지정하였으며, 2005년에는 해송 (천기 456호)과 긴가지해송(천기 457호)을 지정하여 보호하기에 이르렀다. 지구 역사상 산호초 형성은 지구상에 생물이 살 수 있는 환경을 만들어 주었고, 현재도 산호 서식지는 어장이 형성되게 하는 역할을 하며 다양한 생물이 어울려 살 수 있는 생태학적으로 매우 중요한 위치에 있다. 또한 이산화탄소를 이용해 석회석을 형성하기도 하는 산호초는 지구 온난화의 속도를 늦춰 주는 해양의 열대우

림 역할을 하고 있다.

<9> 온대해역인 우리나라의 경우, 제주도 해역 중 서귀포 앞의 범섬, 새섬, 문섬, 숲섬, 지귀도 등지의 해역이 국내 최대의 산호 서식지이자 다양한 해양생물이 분포하는 독특한 해양 생태계를 이루고 있다. 이 지역은 잘 발달한 조하대 암반 기질에 다양한 부착생물이 서식하며, 특히 연산호류, 해양류 등이 군집을 이루고 있어 우리나라에서 종 다양성이 가장 높은 지역으로 간주되어 제주 연안 연산호 군락이 천연기념물 442호(2004년)로 지정된 바 있다. 또한 이 지역의 화려한 연산호 군락은 열대나 아열대에서는 볼 수 없는 것으로 UNEP의 ICRI에 2000년에 이미 보고되었을 뿐만 아니라, 세계 해양보존지역(MPA) 위원회에서도 해양보호지역으로 선포하여 보호하려는 계획을 세우고 있다.

<10> 그러나 최근에는 귀중한 연산호 군락지가 무분별한 채취와 어업, 잠수함관광, 방파제 공사 등과 같은 각종 산업활동에 의하여 급속도로 파고 되어가고 있으며, 산호충류가 오랫동안 각종 보석용이나 장식용으로 사용되면서 귀중한 산호자원이 고갈되어 왔다. 그러므로 미국의 플로리다, 하와이, 괌 등에서는 대규모 산호 양식장을 건설하여 종 보존과 복원을 위한 사업 및 관상용과 상업용 자원으로 생산 개발하고 있다. 그러나 이들은 주로 돌산호류의 대량 증식이 이루어지고 있으며, 연산호류에 대한 증식은 극히 일부 시도되고 있다.

<11> 국내에서는 산호류를 대량 증식시키려는 시도가 최근에 시도되고 있으며, 극소수 수조업계에서 외국산 산호종을 일부 수입하여 해수 수조를 장식하는 정도에 그치고 있으므로 이와 같은 연구는 초기 단계를 이루고 있을 뿐이다.

<12> 이에 본 발명자는 국내공개특허 제10-2005-3508호에서 한국산 산호충류의 무성생식을 통한 대량증식방법을 개시한 바 있다. 위의 대량증식방법에서 산호충류를 인공절단하는 경우에는 대량증식을 위하여 많은 양의 산호류의 모 군체를 필요로 하고 많은 양의 모 군체를 이동시켜야하는 불편한 단점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 따라서, 본 발명자는 연산호류에서 보이는 자가절단이라는 무성생식현상으로 발생된 절편의 경우, 적은 양의 모 군체의 채취로 다량의 개체들로 증식이 가능하며 채취된 모 군체 산호와 증식된 어린 산호들이 모두 생존력이 강하며 건강한 상태를 지속적으로 유지할 수 있다. 또한, 산호류의 증가율이 매우 높은 것을 특징으로 할 수 있다. 이러한 장점이 있으므로, 이를 연산호류의 대량증식을 위한 배양방법에 이용하고자 자가절단 현상을 인위적으로 유도할 수 있는 조건에 대하여 연구하였다. 그 결과, 연산호류 배양 시 온도 차이를 줌으로써 자가절단을 유도할 수 있음을 확인하여 이를 이용한 연산호류 배양방법에 대한 본 발명을 완성하였다.

<14> 이에 본 발명은 연산호류를 배양함에 있어서 수온차이로 인한 자가절단 유도를 통한 연산호류의 배양방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용

<15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 연산호류의 배양에 있어서,

<16> 1) 채취할 연산호류의 대상 종(species)을 선정하는 단계, 2) 선정된 연산호류를 모 군체로부터 채취(sampling)하는 단계, 3) 채취한 연산호류를 이동(transportation)시키는 단계, 4) 수송된 연산호류를 수온차이를 이용하여 자가절단을 유도하는 단계, 5) 자가절단된 연산호류 절편을 채취하는 단계; 6) 기질에 부착(attaching)시키는 단계, 및 7) 부착된 연산호류를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 연산호류의 배양방법을 제공한다.

<17> 또한, 본 발명은 상기 연산호류의 대량 증식방법의 4단계 이후 4-1) 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진하는 단계를 추가로 포함하는 연산호류의 대량증식방법을 제공한다.

<18> 본 발명의 연산호류 배양방법을 통해 연산호류는 인위적으로 자가절단이 유도되어 무성번식이 가능하므로 적은 양의 모군체로부터 다량의 개체들로 증식할 수 있다. 또한, 자가절단된 연산호류 절편은 인공절단한 경우보다 건강한 상태를 지속적으로 유지하여 기질 부착율 및 생존율이 최대화됨으로써 증식률도 매우 높아, 연산호류의 대량증식에 효과적으로 이용될 수 있다.

<19> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<20> 본 발명의 배양방법 1)단계는 채취할 연산호류의 대상 종(species)을 선택하는 단계로, 바람직하게는 자가절단 현상을 보이는 특징이 있는 종을 현장조사를 통해 선정한다. 채취대상 종으로 특히 자색수지맨드라미

(*Dendronephthya putteri*), 검붉은수지맨드라미(*Dendronephthya suensoni*) 및 아직 동정되지 않은 소수종의 연산호(*Dendronephthya* sp.)로 이루어진 무리 중 선택된 1종 이상이 될 수 있고, 특히 검붉은수지맨드라미가 제주도 서귀포 연안에 다량으로 증가하기 시작했으며, 수심 15~25 미터에 우점을 하고 있음으로 채취가 비교적 쉽고 성장 속도가 빨라서 대상종으로 바람직하다.

<21> 본 발명의 배양방법 2)단계는 선정된 연산호류를 채취하는 단계로, 자연서식처의 건강한 모 군체에서 약 3~5cm 크기의 가지를 절단하는 단계이다. 이 때 중요한 것은 모 군체의 선택과 절단이다. 모 군체를 선택할 때는 너무 작은 군체는 피하고 10 ㎝ 이상의 건강한 군체를 선택하는 것이 바람직한데 절단 후의 바이러스나 세균에 의한 감염으로부터 모 군체를 보호할 수 있기 때문이다. 또한, 상기 2)단계에서 군체를 절단하는 방법으로 인공절단 방법을 포함하고, 인공절단 시 절단에 사용된 도구는 스테인레스 재질로 된 날카로운 가위가 바람직하다. 절단 시에 날카로운 가위를 이용하여 절단 면적을 최소화함으로 모 군체와 절단 가지를 감염으로부터 보호할 수 있다.

<22> 본 발명의 배양방법에서, 상기 2)단계 후에 치유하는 과정을 추가로 수행할 수 있다. 이 과정은 수송 전에 절단면을 치유하는 과정이다.

<23> 모 군체에서 절단된 가지는 절단면을 치유하기 위해 자체적으로 다량의 점액질을 분비한다. 본 발명의 치유 단계는 해수에 에어펌프 등으로 산소와 수류를 공급하여 점액질의 일부를 씻어 주어 폴립이 원활하게 가스교환을 하는 단계를 의미한다. 이때, 에어펌프는 18~20시간 동안 산소와 수류를 공급하고, 수온은 서식처 온도로 유지하는 것이 바람직하다. 치유 단계 없이 바로 수송을 하는 경우에는 분비된 다량의 점액질이 유기물질로 변하여 수질 조건을 악화시키기 때문에 수송 전에 치유 단계를 거치는 것이 채취된 가지의 생존율을 높일 수 있다.

<24> 본 발명의 배양방법 3)단계는 상기 2)단계에서 채취된 연산호류 가지를 원하는 곳으로 수송하여 순응시키는 과정이다.

<25> 본 발명의 수송하는 단계는 치유된 가지들을 이중 비닐 주머니에 넣어 산소를 채운 상태에서 수송하는 과정이다. 이때, 산소는 100% 산소가 바람직하고, 사용되는 산소량은 비닐 안에 들어있는 해수 양의 4~6배 정도, 특히 5배 정도가 바람직하다. 또한, 이중 비닐 주머니에 산소를 채운 후에는 산소가 새어나가지 않도록 비닐을 묶어주고 고무줄을 이용하여 이중으로 봉해주는 것이 바람직하다. 이중 비닐 주머니에 넣은 가지들은 큰 비닐에 넣어 다시 한 번 봉하여 운송 시 물이 새는 경우를 미리 방지한다.

<26> 또한, 표본들이 들어간 큰 비닐을 신문지로 덮고 얼음 팩을 이용하여 운송 시 발생하는 온도 상승을 방지한다. 수송 시 서식처와 동일한 온도로 일정하게 유지하는 것이 바람직하다.

<27> 또한, 운송 시 표본들은 아이스박스에 넣는 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써, 운송 시 발생하는 온도 상승과 물리적 충돌에서 채취된 가지에 가해지는 충격이 완화될 수 있고, 표본을 포장하는 단계를 신속하게 하여 표본에 가해지는 충격을 최소화한다.

<28> 본원발명의 순응단계는 표본을 배양수조의 수온과 배양액에 순응시키는 단계이다. 실험실로 운송된 표본은 비닐채로 배양 수조에 10~30분, 바람직하게는 20분 정도 넣어 이후 배양될 온도에서 순응시키는 것이 좋다. 온도 적응이 끝나면 비닐을 개봉하여 담겨진 자연해수와 배양수(인공해수)를 2:1~1:2, 바람직하게는 1:1로 섞어가며 수조에 넣는다.

<29> 본 발명의 배양방법 4)단계는 상기 수송된 연산호류를 수온차이를 이용하여 자가절단을 유도하는 과정이다.

<30> 수송된 연산호류를 서식처 해수온도와 차이가 나도록 조절한 배양수(서식처 해수, 인공해수 등)의 온도를 일정하게 유지하여 배양함으로써 본 발명의 연산호류 자가절단을 인위적으로 유도한다. 이때, 온도차이는 약 2~14℃, 특히 약 6~10℃가 되도록 조절하는 것이 바람직하다. 연산호류의 서식처 수온을 기준으로 배양 시 수온이 2~14℃, 바람직하게는 6~10℃ 높은 경우 및 낮은 경우를 모두 포함한다.

<31> 또한, 본 발명의 연산호류 자가절단은 상기 온도 차이를 고려하면서 배양수 온도 13~28℃에서, 특히 18~28℃에서 유도하는 것이 좋다.

<32> 그 다음 본 발명의 배양방법 5)단계는 상기 4)단계에서 자가절단된 연산호류 절편을 채취하는 과정이다.

<33> 상기 4)단계에서 발생된 연산호류 절편의 크기는 3~5 ㎝ 정도 되고, 수온차로 변화를 주어 자가절단을 유도하면 절편이 발생하여 유도 5일째까지 이어지며 이 중 3일 이내 총 절편의 대부분이 발생된다.

<34> 따라서 절편 채취 시, 온도차이로 자가절단을 유도한 지 3일 이내 발생된 절편을 채취하는 것이 바람직하며, 이

러한 절편이 상태가 건강하여 부서지는 경우도 적고 이후 절편의 생존율이 높으며 RPLs의 형성도 더 잘되어, 연산호류를 건강하게 배양하고 대량증식 하는데 유리하다.

<35> 또한, 4)단계의 연산호류의 자가절단을 유도하는 과정에서 배양수조의 배양수에 바구니를 띄워 고정하고 바구니 내에 채취한 연산호류를 넣고 배양함으로써, 자가절단 유도로 생긴 절편이 아래로 떨어지게 하여 절편의 채취를 용이하게 할 수 있다.

<36> 본원발명의 자가절단 유도방법에 따라 생산된 연산호류의 절편은 인공절단된 연산호류보다 건강하여 이후 대량증식을 위한 배양 중의 생존력이 뛰어나 배양효율이 우수하고, 건강한 연산호류로 배양할 수 있으며 배양 시 관리가 용이한 장점이 있다.

<37> 본 발명의 배양방법에서, 상기 6)단계의 부착단계는 상기 RLPs 가 형성된 연산호류 가지를 기질에 부착시키는 단계를 의미한다.

<38> 이 때, 부착 기질은 칼슘을 다량 포함하고 있는 자연물질 또는 인공기질을 사용할 수 있다. 자연기질로는 굴껍데기, 다공성 현무암, 조개껍질, 산호조각, 바위 등이 될 수 있고, 특히 석회질을 함유한 굴 껍데기와 다공성 현무암이 바람직하다.

<39> 또한, 부착을 원활하게 하기 위하여 수류를 약하게 하여 물리적인 충격을 최소화하는 것이 바람직하다. 기질에 부착된 절편은 수류를 먼 곳에서 흘리며 배양하여 수류를 약하게 하고, 또한 케이지 안에 넣어 절편을 보호한다.

<40> 본 발명의 배양방법에서, 상기 7)단계는 기질에 부착된 연산호류를 배양하는 단계이다.

<41> 상기 절편을 기질에 부착시켜 6~7일 동안 수류를 약하게 하여 배양하면 절편이 기질에 완전히 부착하게 된다. 이를 케이지에서 빼내고, 좀더 강한 수류, 산소, 배양수 첨가농도 100~600mg/liter 정도의 칼슘, 식물성, 동물성 플랑크톤 등의 먹이를 공급하면서 배양한다.

<42> 이 때, 베를린(Berlin) 방식의 배양수조를 이용하여 배양하는 것이 바람직하다. 베를린 시스템이란 생물학적 여과와 질소분해 작용을 라이브락 표면에 서식하는 호기성 및 혐기성 박테리아에 의지하고 있는 시스템으로, 수조 내 유기물을 프로테인 스키머(protein skimmer)로 제거하는 시스템이다.

<43> 또한, 상기 본 발명의 연산호류의 배양방법에서, 상기 4-1)단계로 연산호류 가지를 최적의 온도 및 산소공급 조건에 맞춰 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계를 추가로 포함하는 연산호류의 배양방법을 제공한다.

<44> 상기 RLPs는 뿌리형성 과정(root-like processes, 이하 RLPs라고 한다)으로, 산호류를 절단하였을 경우, 절단면이 아물면서 식물 뿌리모양의 RLPs라는 돌기물이 만들어지고, 이 RLPs에 의해 절단면이 기질에 부착할 수 있다는 것으로 알려져 있다(Barneah et al., Invertebrate Biology, Vol.12(2), pp. 81-90, 2002).

<45> 본 발명에서 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진하는 적정수온은 22~25 ℃, 바람직하게는 22~24 ℃, 가장 바람직하게는 23 ℃이고, 이 온도로 유지하는 것이 RLPs 형성을 빠르게 하고, 또한 RLPs 형성율이 높으며, 건강한 부착돌기를 형성하는데 좋다. 동시에 연속적으로 산소를 공급하는 것이 바람직하다.

<46> 상기와 같이 온도 및 산소공급의 최적의 조건에서 배양하여 절단 후 2~6일 정도가 경과하면 절단면에서 RLPs가 완전히 형성되어 기질에 부착할 수 있다.

<47> 또한, 상기와 같이 본 발명은 연산호류를 배양함에 있어서 수온차를 이용한 연산호류의 자가절단 유도, 자세하게는 채취한 연산호류의 서식처의 수온과 배양 시 수온에 차이가 생기도록 변화를 주어 연산호류의 자가절단을 인위적으로 유도하는 것을 포함하는 연산호류의 자가절단 유도방법도 제공한다.

<48> 위에서 살펴본 바와 같이, 연산호류는 수온 조절을 통하여 인위적으로 자가절단이 유도되어 무성번식이 가능하고, 따라서 적은 양의 모군체로부터 다량의 개체들로 증식이 가능하며, 자가절단된 연산호류 절편은 인공절단한 경우보다 건강한 상태를 지속적으로 유지하여 기질 부착율 및 생존율이 최대화됨으로써 증식률도 매우 높아지는 작용 효과를 나타낸다.

<49> 따라서 본 발명은 연산호류의 대량증식에 효과적으로 이용되어 산호자원의 보전 및 복원에도 널리 이용될 수 있으며, 연구 및 천연물 추출에 필요한 표본 확보에 매우 중요한 수단이 될 수 있다. 또한 관상용 해양수조에도 이용할 수 있으므로 경제적으로도 좋은 효과를 나타낸다.

<50> 본 발명의 연산호류의 배양에 있어서 일반적인 배양 조건은 당업계에 공지된 산호충류의 일반적인 배양 조건과

동일하거나 적절히 변형시켜 사용할 수 있으며, 국내특허공개 제10-2005-3508호를 참고하여 사용할 수 있다.

<51> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<52> **[실시예 1] 본 발명의 연산호류 자가절단 유도 최적조건 확인**

<53> 연산호류의 무성생식방법인 자가절단을 인위적으로 유도할 수 있는 조건으로 온도를 선택하고, 채취된 연산호류를 다양한 온도에서 배양하여 자가절단 현상을 확인하였다.

<54> 먼저, 서식지에서 채취된 연산호류를 실험실로 옮겨 4단계의 온도가 개별적으로 설정된 배양기(Multi-Tier Incubator)에 넣어 자가절단을 유도하였다(도 1).

<55> 연산호류에서 자가절단된 절편이 음성 부력이 있는 것을 고려하여 자가절단할 때 절편이 바구니 아래로 떨어지도록 각 배양기의 수조에 바구니를 띄워 고정 설치하였다. 각 배양기의 온도 조건을 설정하였고, 온도 이외의 외부 요인을 배제하기 위하여 동일한 공기펌프를 사용하였으며, 동일한 양의 해수와 광을 제공하였다. 모든 실험은 6일 내에 이루어졌다.

<56> 그 결과로서 각 온도 조건에 따른 자가절단의 발생률은 시도된 가지들로부터 자가절단되어 떨어진 절편의 수로 측정하였다.

<57> **가. 온도조건에 따른 자가절단 발생률 확인**

<58> 1차 실험은 2005년 2월 28일 ~ 2005년 3월 4일인 5일간 실시하였다. 자연 서식지 수온은 14℃ 이었으며, 채취한 연산호류는 자가절단을 일으키는 온도에 적정한 것으로 예측되는 18℃와 23℃에서 실험하였다.

<59> 실험 결과, 18℃에서는 19개의 절편이 관찰되었고, 23℃에서는 140개가 관찰되었다.

<60> 위의 결과로 온도조건에 따른 자가절단 발생률의 뚜렷한 차이를 확인하였다.

<61> 또한, 1차 실험을 통하여 자가절단을 일으키는 온도의 주된 원인이 특정 온도 범위인 점과 동시에 온도변화의 폭임을 확인하였다.

<62> 이를 세부적으로 분석, 확인하기 위하여 2, 3, 4차 후속 실험을 진행하였다.

<63> 2차 실험은 2005년 3월 22일 ~ 2005년 3월 26일인 6일간, 3차 실험은 2005년 6월 27일 ~ 2005년 7월 1일인 5일간, 4차 실험은 2005년 8월 4일 ~ 8월 7일인 4일간 동안 실시하였다.

<64> 자연 서식지 수온은 2차 실험시 14℃, 3차 실험시 18℃, 4차 실험시 20℃ 이었으며, 실험은 4단계의 온도 조건인 13℃, 18℃, 23℃, 28℃에서 이루어졌다.

<65> 그 결과를 표 1, 도 2 및 도 3에 나타내었다.

<66> 결과를 보면, 2월과 3월에는 서식처와의 온도차가 9℃인 23℃에서 자가절단의 발생률이 각각 88%, 56.4%로 가장 높게 나타났으며, 6월에는 온도차가 10℃인 28℃에서 64.7%로 자가절단 발생률이 가장 높은 것으로 조사되었다. 8월의 경우에도 현지 수온과 7 ~ 8℃ 차이가 나는 13℃에서 34.6%의 자가절단이 발생하였다.

표 1

<67> 월별 온도조건에 따른 자가절단을 통한 절편 발생 개수

자가절단 절편 발생 개수 (자가절단 발생률*)					
배양온도 월 (서식처온도)	13℃	18℃	23℃	28℃	합계
2월 (14℃)	-	19 (12%)	140 (88%)	-	159
3월 (14℃)	5 (1.4%)	40 (11%)	206 (56.4%)	114 (31.2%)	365

6월 (18℃)	2 (2.4%)	1 (1.2%)	27 (31.7%)	55 (64.7%)	85
8월 (20℃)	102 (34.6%)	88 (29.8%)	34 (11.5%)	71 (24.1%)	295
*자가절단 발생률 : (각 온도별 자가절단 발생 개수/합계)X 100					

<68> 위의 결과와 같이, 연산호류에서 자가절단을 유도하기 위해서는 채취된 연산호류의 서식 환경요인 중 수온에 대하여 서식처 해수온도와 절대온도 7~10℃ 정도의 차이로 배양수에 온도변화를 주어야 함을 알 수 있다.

<69> **나. 자가절단된 절편을 채취하는 최적 시기 확인**

<70> 상기 자가절단 유도 중, 경과시간에 따른 자가절단으로 인하여 발생된 절편개수를 도 4에 나타내었다.

<71> 도 4에서 보는 바와 같이, 2월의 경우 1, 2일의 절편 발생률이 5일간 발생의 96%를 차지하고 있으며, 3월의 경우에는 93%, 6월의 경우 94%, 8월의 경우 77%를 차지하고 있었다. 주로 온도차이를 준지 1, 2, 3일째에 집중적으로 일어나 전체 절편의 대부분이 이 시기에 발생하며, 그 이후에는 매우 적은 수의 자가절단 절편이 발생함을 알 수 있었다.

<72> 또한, 온도 차이를 준지 2~3일 내에 채취한 가지의 건강 상태도 높았으며 떨어진 절편이 부서지는 일도 드물게 일어나, 이후 과정인 절편의 생존 및 RLPs 형성에도 더 유리한 것으로 나타났다.

<73> 이후에 발생하는 절편의 경우에는 물의 탁함 정도나 오염 등의 다른 요인으로 인하여 이후 생존율에 영향을 받게 되며, 가지 자체의 온도 적응력 등으로 더 이상의 절편이 발생하지 않는 것으로 추정되었다.

<74> 따라서, 연산호류가 생존력이 강하고 건강한 상태를 지속적으로 유지하면서 배양이 가능하게 하기 위해서는 온도 차이로 자가절단 유도한 지 3일 이내에 발생된 절편을 채취하여 배양, 대량증식해야 효과적임을 알 수 있었다.

<75> **[실시예 2] 본 발명의 연산호류의 자가절단 유도 후 뿌리형성과정 최적조건 확인**

<76> 상기 자가절단 유도된 연산호류 절편(어린 개체)을 기질에 부착시키고 배양하여 성장시키기 위해서는 말단 기부 부위에서 부착돌기인 뿌리형성과정(부착 돌기생성, root-like processes)이 되어야 한다. 따라서, 자가절단을 일으키는 온도 범위 뿐 아니라, 뿌리형성(부착돌기)을 생성하는 온도 범위를 알아내는 것이 무성증식 기법 개발에 있어서 매우 중요하다.

<77> 절편의 뿌리형성과정(RLPs) 발달은 위 실시예 1에서 자가절단이 일어나는 기간 동안 각 온도별로 절편을 무작위로 선택하여 광학현미경을 사용하여 RLPs를 관찰하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

<78> 도 5는 온도에 따른 뿌리형성과정(RLPs)의 발달 정도를 찍은 사진으로(A: 28℃, B: 23℃, C: 18℃, D: 13℃), 절편의 뿌리형성은 주로 23℃에서 많이 생성되는 것으로 조사되었다(도 5의 B). 28℃에서는 자가절단으로 떨어진 절편의 말단 기부부위의 공육 부분이 분해되어 있었고 뿌리돌기가 형성되지 않았다. 또한, 28℃에서는 이후 절편의 생존률 또한 매우 낮게 나타났으므로 28℃의 고온 조건은 산호충류의 생존에 스트레스 요인으로 작용한 것으로 예측된다(도 5의 A). 또한, 18℃에서는 자가절단에 의한 절편의 말단 부위의 봉합은 이루어졌으나 부착돌기의 생성은 거의 이루어지지 않았다(도 5의 C).

<79> 위의 결과를 통해, 절편의 뿌리형성과정에서 뿌리 생성이 온도와 밀접한 관계를 갖고 있는 것을 알 수 있었으며, 자가절단 및 뿌리의 생성이 약 23℃에서 가장 효과적으로 이루어지는 것으로 나타났다.

<80> **[실시예 3] 본 발명의 연산호류 자가절단유도 및 뿌리형성과정유도를 이용한 배양**

<81> 2005년 3월 제주도 서귀포 일대(해수온도 14℃)의 검붉은수지맨드라미의 모 군체로부터 스테인레스 재질의 날카로운 가위를 이용하여 검붉은수지맨드라미의 가지를 3~5 ㎝ 정도의 크기로 20개체를 채집하였다. 채집한 가지들은 14℃의 해수에 에어펌프로 산소와 수류를 공급하는 수조에 넣고 18~20 시간 동안 두어 절단면의 점액질을 제거하면서 절단면을 치유하였다.

<82> 이렇게 치유된 가지들을 자연해수가 들어있는 이중 비닐 주머니에 넣고, 해수량의 5배 정도로 100% 산소를 채운 후 비닐을 고무줄로 묶어 산소가 새어나가지 않도록 봉했다. 다시 한번 큰 비닐봉투에 넣어 봉하고, 이를 아이스박스에 넣어 운송하였다.

<83> 실험실로 운송된 후, 채집된 연산호류 가지는 비닐봉투 채로 배양수조의 23℃의 물에 넣어 20분간 순응시켰다. 온도 적응 후에 비닐에서 채집된 가지들을 꺼내어 자연해수와 배양수(인공해수)를 1:1로 섞으면서 배양 수조로 옮겼다.

<84> 이 때 배양수조는 배양수(인공해수)를 넣고 23℃로 유지되도록 하였다. 배양수조에 높이 7~10 cm, 격자 구멍의 크기가 < 0.5x0.5 cm인 플라스틱 바구니를 띄운 후, 바구니 안에 순응이 끝난 연산호류 가지들을 넣었다. 산소를 지속적으로 공급하면서 자가절단되어 떨어지는 절편의 수를 관찰하였다.

<85> 본 발명의 자가절단 유도방법으로 생성된 절편은 1일째 141 개, 2일째 61개, 3일째 4개, 4일째 0개이었다.

<86> 또한, 절편의 뿌리형성과정(RLPs) 발달은 자가절단이 일어나는 기간 동안 절편을 무작위로 선택하여 광학현미경을 사용하여 RLPs를 관찰하였고, 70% 이상의 절편이 3일 이내에 RLPs가 형성되어 기질에 붙일 수 있는 상태가 되었다.

<87> 이 중에서 3일 이내 형성된 절편들을 모아 깨끗한 인공 해수에 넣어주고 위와 동일한 온도 23℃에서 광 및 산소를 공급하여 기질에 부착시키고 배양하는 과정을 수행하였다.

<88> RLPs 가 완전히 형성된 자가절단 절편을 다공성 현무암에 부착시켰다. 접착제는 사용하지 않았고, 부착된 산호충류에 물리적 충격을 가하지 않기 위해 케이지 안에 넣어서 배양하였고, 부착 후 2~3일 동안 수조내의 수류는 절편이 부착된 기질과 먼 곳에서 흘려주어 수류를 약하게 해주면서 배양하였다.

<89> 일주일 이상 지나게 되면 절편이 완전히 기질에 부착되고, 그 후에 기질을 케이지 밖으로 꺼낸 후 강한 수류와 산소를 공급해 주었다. 또한 칼슘은 배양수에 농도 500 mg/liter로 함유시키고 식물성 플랑크톤 등의 먹이를 공급하면서 배양하였다. 도 6은 상기 배양과정 이후 어린 검붉은수지맨드라미의 성장 모습을 찍은 사진이다(A: 초기 배양모습, B: 8개월 경과 후).

발명의 효과

<90> 위에서 살펴본 바와 같이, 연산호류는 수온 조절을 통하여 인위적으로 자가절단이 유도되어 무성번식이 가능하므로 적은 양의 모군체로부터 다량의 개체들로 증식할 수 있고, 자가절단된 연산호류 절편은 인공절단한 경우보다 건강한 상태를 지속적으로 유지하여 기질 부착율 및 생존율이 최대화됨으로써 증식률도 매우 높아지는 작용효과를 나타낸다.

<91> 따라서 본 발명은 연산호류의 대량증식에 효과적으로 이용되어 산호자원의 보전 및 복원에도 널리 이용될 수 있으며, 연구 및 천연물 추출에 필요한 표본 확보에 매우 중요한 수단이 될 수 있다. 또한 관상용 해양수조에도 이용할 수 있으므로 경제적으로도 좋은 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 배양기를 이용하여 다양한 온도에서 연산호류의 자가절단을 유도하는 과정이다.

<2> 도 2는 검붉은수지맨드라미의 월별 서식처 수온 및 배양수 온도(13,18,23,28℃)별 자가절단 절편의 개수를 나타낸 도이다.

<3> 도 3은 검붉은수지맨드라미의 월별 서식처와 배양수의 수온간 차이에 따른 절편 발생 비율을 나타낸 도이다.

<4> 도 4는 검붉은수지맨드라미 자가절단 유도 후 경과일에 따른 자가절단 절편 발생 개수를 나타낸 도이다.

<5> 도 5는 온도에 따른 뿌리형성과정(RLPs)의 발달 정도를 찍은 사진이다(A: 28℃, B:23℃, C: 18℃, D: 13℃).

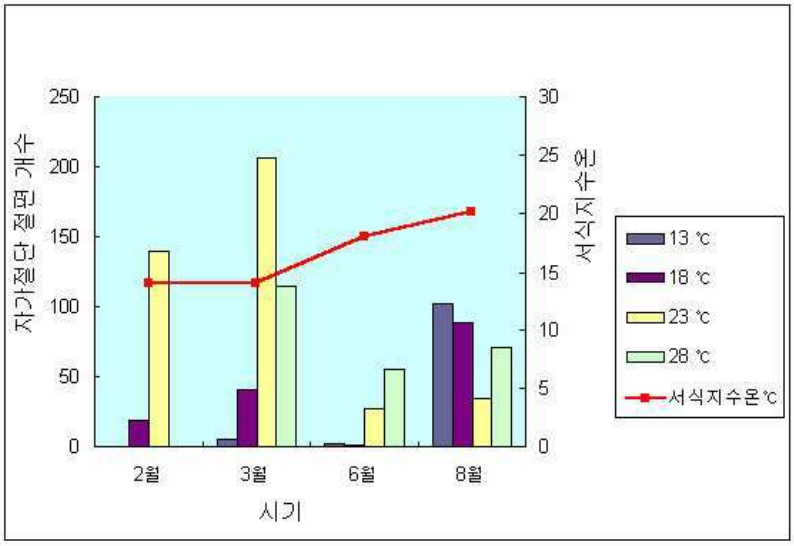
<6> 도 6은 배양 이후 어린 검붉은수지맨드라미의 성장 모습을 찍은 사진이다(A: 초기 배양모습, B: 8개월 경과 후).

도면

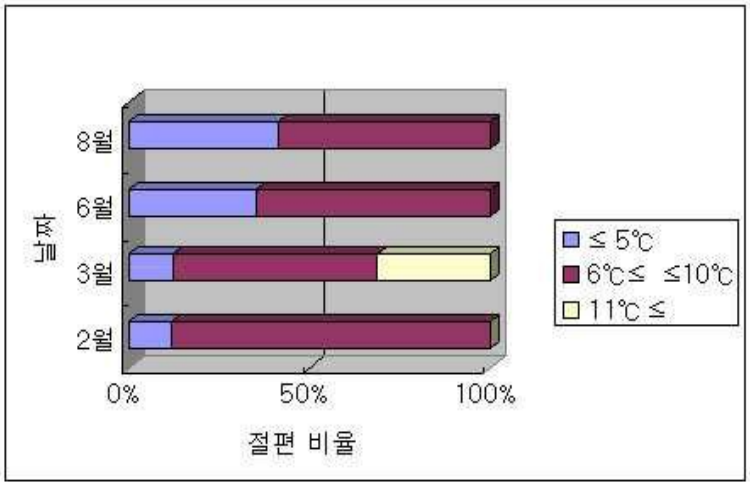
도면1



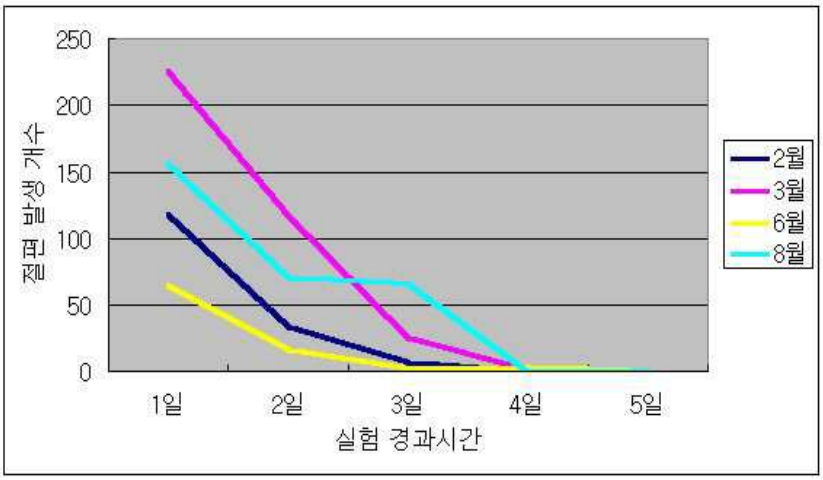
도면2


250
200
150
100
50
0
30
25
20
15
10
5
0
2월
3월
6월
8월
시기
자가절단 절편 개수
서식지수온
13 ℃
18 ℃
23 ℃
28 ℃
서식지수온℃

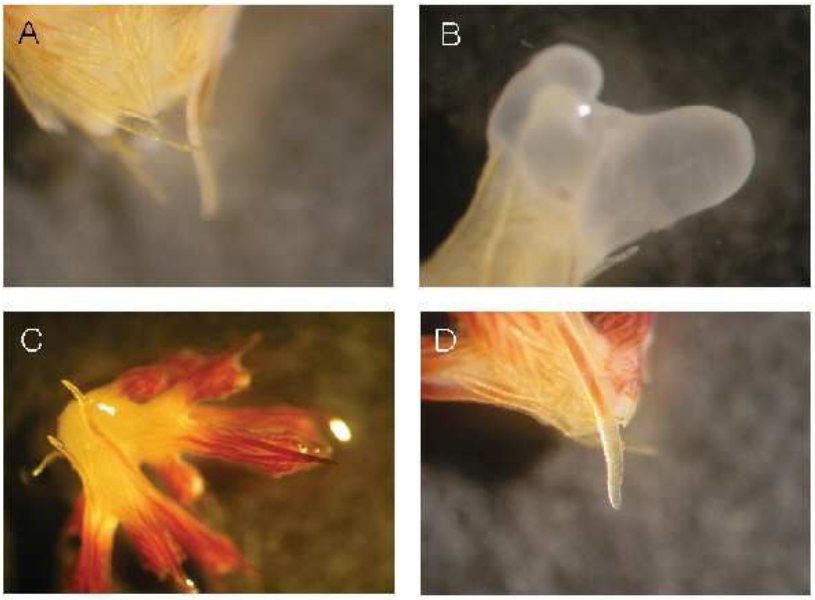
도면3


8월
6월
3월
2월
날짜
0%
50%
100%
절편 비율
≤ 5℃
6℃≤ ≤10℃
11℃ ≤

도면4


250
200
150
100
50
0
절편 발생 개수
1일
2일
3일
4일
5일
실험 경과시간
2월
3월
6월
8월

도면5



도면6

