



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년01월20일
(11) 등록번호 10-1106964
(24) 등록일자 2012년01월11일

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006.01) A01G 33/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0012452

(22) 출원일자 2009년02월16일

심사청구일자 2009년02월16일

(65) 공개번호 10-2010-0093323

(43) 공개일자 2010년08월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090010470 A

KR1020090010471 A

KR1020070080665 A

US6858430 B1

전체 청구항 수 : 총 5 항

(73) 특허권자
대한민국

(72) 발명자

황은경

전남 목포시 부흥동 우미블루빌아파트 303-202호

위미영

광주광역시 서구 상무1동 부건빛고을아파트 804호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

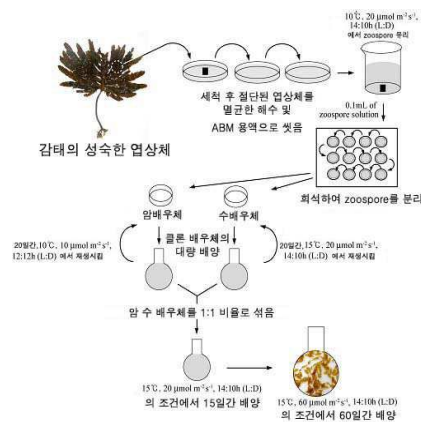
심사관 : 김민정

(54) 감태 유리배우체의 분리 배양 및 성숙 유도를 통한 감태 대량 생산 방법

(57) 요약

본원 발명은 대형 갈조류인 감태의 대량 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 감태로부터 암수 유리배우체를 분리하여 각각 수거하고, 온도, 조도 및 광주기를 조절함으로써 최적의 조건을 설정하고, 그 조건에서 대량으로 배양한 뒤, 성숙을 유도하여 감태를 생산하는 방법에 관한 것으로서, 이러한 방법을 통하여 감태 인공채묘기법을 개발하고 대량 양식에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김성철

전라남도 목포시 산정동 신안비치 3차 아파트 30
2동 1008호

황미숙

전라남도 목포시 산정동 신안비치 3차아파트 302동
401호

백재민

전남 완도군 완도읍 정도리 591

박찬선

부산광역시 부산진구 양정1동 양정현대아파트 209
동 705호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 4-가-4

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관

연구사업명 감태 양식기술개발

연구과제명 해조류 양식기술개발

기여율

주관기관 국립수산물과학원 해조류연구센터

연구기간 2007-2009

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 감태(*Ecklonia cava*)의 자낭반 부위를 절단한 다음, 상기 자낭반에서 유주자의 방출을 유도하는 단계;
- 2) 상기 방출된 유주자를 배양시켜 배우체를 형성시키는 단계;
- 3) 상기 형성된 배우체를 암·수 배우체로 분리하는 단계;
- 4) 상기 분리된 암·수 배우체를 각각 직경 3 mm ~ 10 mm 크기에 도달할 때까지 배양하는 단계;
- 5) 상기 배양된 암·수 배우체를 각각 100 ~ 200 μm 의 크기로 절단하는 단계;
- 6) 상기 절단된 암·수 배우체를 각각 세포수 4 ~ 11 cell/ind., 온도 10 ~ 20℃, 조도 20 ~ 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 및 광주기 14:10(L:D)의 조건으로 배양하여 감태 배우체를 생산하는 단계;
- 7) 상기 단계 6)에서 생산된 암배우체를 온도 15 ~ 20 °C, 조도 20 ~ 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 성숙을 유도하여 장란기를 형성시키고, 상기 단계 6)에서 생산된 수배우체를 온도 5 ~ 10 °C, 조도 5 ~ 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기는 10:14(L:D)의 조건으로 성숙을 유도하여 장정기를 형성시키는 단계;
- 8) 상기 단계 7)에서 형성된 장란기 및 장정기를 교배하는 단계를 포함하는, 감태의 대량 생산 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 배양 또는 성숙 유도는 PESI(Provasoli's enriched seawater media) 액체배지를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 5)의 절단은 호모게나이저를 이용하여 8,000rpm으로 1분간 분쇄하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 5)의 크기가 140 ~ 180 μm 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 6)의 배양은 각각 세포 수 4 ~ 11 cell/ind., 온도 15℃, 조도 20 ~ 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 및 광주기 14:10(L:D)의 조건에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류의 일종인 대형 갈조류인 감태의 대량 생산에 관한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감태(*Ecklonia cava*)는 갈조식물 다시마목 미역과의 여러해살이 해조류로서 간조시에도 물이 빠지지 않고 항상 물속에 잠겨있는 점심대의 깊은 곳에 서식하는 성체의 길이는 1~2m까지 성장하는 해조류이다.

[0003] 특히, 우리나라의 남해안과 제주도 그리고 일본 등지에 널리 분포하며, 해중립을 구성하는 해조로서 연안생태계에서 1차 생산자로서의 중요한 기능을 담당하고 있다 (Kang and Yoo, 1993; Brown and Lamare, 1994). 또한 감태는 일본에서 식용으로 널리 이용되고 있으며, 우리나라의 경우 톳을 가공할 때 천연 착색제로 사용하거나 기능성 물질의 추출원으로 이용 (Athukorala et al., 2006; Hong et al., 2006)되고 있다. 이러한 이용도의 증가에 반하여 자연군락의 감태 자원은 점차 감소되고 있는 경향으로, 해양수산부에서는 수산자원보호령 제9조에서 5월부터 7월까지 감태의 채취금지기간을 설정하고 있으며, 제주도의 경우 연중 감태의 채취를 금하고 있는 실정이다(국립수산물학원, 2007). 따라서 감태 자연자원의 보호와 효율적인 이용을 위해서는 감태의 대량 증식과 이식 등의 방안을 마련하는 것이 필요하다.

[0004] 감태는 이형세대교번을 하는 해조류로서 엽상형의 포자체 세대와 현미경적 크기의 미소체인 배우체 세대가 교번한다 (Hori, 1993). 이형세대교번을 하는 다시마과의 해조류는 배우체 세대에서 암수배우체를 각각 분리하여 무성적으로 증식시킬 수 있으며, 배우자형성을 유도할 수 있음이 확인되었다(Luning, 1980). 또한 최근 칠레에서는 전복 먹이원으로써 다시마류의 대량양식에 실내에서 대량증식시킨 유리 배우체를 이용하는 방안이 보고된 바 있다(Westermeier et al., 2006; Edding and Tala, 2003).

[0005] 현재 우리나라에서 행해지고 있는 미역이나 다시마 등의 양식방법은 모조로부터 얻어진 유주자를 기질에 채묘하여 양식을 하는 방법을 사용하고 있으나 이러한 종묘생산 방법은 매년 성숙된 많은 양의 모조를 필요로 하므로 자연군락의 훼손을 야기할 가능성이 높다. 한번 훼손된 감태의 자연군락은 원래의 안정된 군락으로 회복되기 위해선 적어도 3-4년의 긴 시간이 소요된다. 그러나 유리배우체의 배양에 의한 증식 방법은 소량의 성숙 엽체만으로도 많은 양의 배우체 확보가 가능하며, 확보된 배우체는 무성적으로 대량 증식이 용이하고 지속적인 계대 배양이 가능하며, 클론 배우체의 유도를 통한 우량 품종의 교배와 선발육종의 기초를 다질 수 있는 유용한 방법이라 할 수 있다.

[0006] 현재까지 감태에 대한 특허로는 '감태 추출물을 함유하는 미백 화장품(등록번호 : 10-0359996)', '감태 추출물을 함유하는 주름개선 화장품 조성물 (등록번호 : 10-0429590)', '감태를 주 원료로 한 건식식품의 제조방법(등록번호 : 10-0392482)' 및 '감태추출물을 함유한 기질 금속단백질분해효소활성 억제용 조성물 (등록번호 : 10-0771928)' 등과 같은 추출물의 이용에 대해서 초점이 맞추어져 있었다.

[0007] 그러나 감태와 같은 유용한 해조류를 이용하기 위해서는 자연군락의 훼손이 불가피 하다. 최근에는 이러한 문제점이 대두되었고, Westermeier et al. (2006) 등은 다시마과의 대형갈조류인 *Lessonia trabeculata*와 *Macrocystis pyrifera*의 유리배우체 배양에 의한 양식에 성공함으로써 유리배우체의 배양을 이용한 대량양식이 가능함을 입증한 바 있다.

[0008] 또한, 최근 등록된 대한민국 등록특허 제864686호는 토종 다시마의 배우체를 분리하고 보존하는 방법을 개시하고 있으나, 성숙 유도 방법에 대하여 현재까지 알려진 것은 전혀 없다.

[0009] 이에 본원 발명에서는 이러한 문제점을 인식하고, 감태 자연자원의 보호와 효율적인 이용을 위한 양식의 기초로서 감태 암수 배우체의 분리 배양 및 성장과 성숙 조건을 파악하여 안정적인 유리배우체의 확보와 대량배양조건을 확립을 통하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 대형 갈조류인 감태 유리배우체의 대량 생산 방법 및 암수 배우체를 성숙시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0012] 1) 감태(*Ecklonia cava*)의 자낭반 부위를 절단한 다음, 상기 자낭반에서 유주자의 방출을 유도하는 단계;
- [0013] 2) 상기 방출된 유주자를 액체배지에서 발아시켜 배우체를 형성시키는 단계;
- [0014] 3) 상기 형성된 배우체를 암·수 배우체로 분리하는 단계;
- [0015] 4) 상기 분리된 암·수 배우체를 액체배지에서 직경 3mm ~ 10mm 크기에 도달할 때까지 배양하는 단계;
- [0016] 5) 상기 배양된 암·수 배우체를 균질기로 균질화하여 100 ~ 200 μ m의 크기로 절단하는 단계; 및
- [0017] 6) 상기 절단된 배우체를 액체배지에서 온도 10 ~ 20℃, 조도 5 ~ 40 μ mol m⁻² s⁻¹, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 배우체의 대량생산 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은, 1항에서 수득한 암배우체를 온도 15 ~ 20℃, 조도 20 ~ 40 μ mol m⁻² s⁻¹, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 암배우체의 성숙 방법을 제공한다.
- [0019] 아울러, 본 발명은, 1항에서 수득한 수배우체를 온도 5 ~ 10℃, 조도 5 ~ 10 μ mol m⁻² s⁻¹, 광주기는 10:14(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 수배우체의 성숙 방법을 제공한다.

효과

- [0020] 본 연구는 감태 암수배우체의 분리배양시 유리배우체의 분리하는 방법, 재생하는 방법 및 성숙 유도 방법을 최적화하여 감태 생산을 위한 최적배양 조건을 구현하여, 이용한 인공채묘기법을 개발하여 대량 양식에 이용할 있다. 이를 통하여 감태의 대량 생산을 가능하게 하며 인공 재배를 가능하게 하여 환경 보호 및 어업인의 소득증진에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0022] 1) 감태(*Ecklonia cava*)의 자낭반 부위를 절단한 다음, 상기 자낭반에서 유주자의 방출을 유도하는 단계;
- [0023] 2) 상기 방출된 유주자를 액체배지에서 발아시켜 배우체를 형성시키는 단계;
- [0024] 3) 상기 형성된 배우체를 암·수 배우체로 분리하는 단계;
- [0025] 4) 상기 분리된 암·수 배우체를 액체배지에서 직경 3mm ~ 10mm 크기에 도달할 때까지 배양하는 단계;
- [0026] 5) 상기 배양된 암·수 배우체를 균질기로 균질화하여 100 ~ 200 μ m의 크기로 절단하는 단계; 및
- [0027] 6) 상기 절단된 배우체는 액체배지에서 온도 10 ~ 20℃, 조도 5 ~ 40 μ mol m⁻² s⁻¹, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 배우체의 대량생산 방법을 제공한다.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 감태의 자낭반 부위를 절단한 뒤 잡물의 제거가 수반될 수 있는데 이는 브러쉬로 2-3회 솔질함으로써 수행되는 것이 바람직하다.
- [0029] 또한, 단계 1)의 유주자 방출은 실내에서 음건을 통해 수행되는 것이 바람직한데, 음건은 10℃의 온도조건에서,

1 ~ 4시간 동안 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 광량 $10 \sim 20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 및 광주기 10:14(L:D)가 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 방출된 유주자를 추가적으로 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 메쉬를 통해 여과하여 잡물을 제거하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 배지는 액체배지 또는 고체배지인 것이 바람직하며, 액체배지가 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 액체배지는 해조류 배양에 사용되는 배지라면 어느 것을 사용하여도 무방하나, 무기질 배지인 것이 바람직하며, PESI(Tatewaki, 1966)인 것이 더욱 바람직하다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 배우체의 분리는 현미경하에서, 유리판 끝을 녹여 제조한 구멍 직경 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ 의 미세관을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 배우체의 크기가 $3\text{mm} \sim 10\text{mm}$ 로 키우면 가능하나, 다음에 유리배우체의 절단을 위하여 5mm 가 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 상기 방법에 있어서, 단계 5)의 절단된 배우체의 크기는 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 인 것이 더욱 바람직하고, 가장 바람직하게는 $140\mu\text{m} \sim 180\mu\text{m}$ 정도인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 방법에 있어서, 단계 6)의 액체배지는 PESI인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 절단된 배우체는 액체배지에서 온도 $10 \sim 20^\circ\text{C}$, 조도 $5 \sim 40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 것이 바람직하며, 온도 15°C , 조도 $20 \sim 40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 및 광주기 14:10(L:D)에서 배양하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 감태 배우체의 대량 생산 방법에서 수득한 암배우체를 온도 $15 \sim 20^\circ\text{C}$, 조도 $20 \sim 40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 암배우체의 성숙 방법을 제공한다.

[0036] 감태는 단순히 유리배우체인 암 수 배우체가 존재하는 것만으로는 포자체를 형성하지 않는다. 포자체를 이루기 위해서는 암 수 배우체를 성숙시켜 암 수 생식세포를 형성하여야 한다. 특히 암 배우체의 성숙(도면 2의 L 참조)을 유도하기 위하여 대량으로 배양된 암배우체를 온도 $15 \sim 20^\circ\text{C}$, 조도 $20 \sim 40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 것이 바람직하며, 온도 15°C , 조도 $20 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 14:10(L:D)의 조건으로 배양하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 감태 배우체의 대량 생산 방법에서 수득한 수배우체를 온도 $5 \sim 10^\circ\text{C}$, 조도 $5 \sim 10 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 10:14(L:D)의 조건으로 배양하는 단계를 포함하는 감태 수배우체의 성숙 방법을 제공한다.

[0038] 암 배우체의 성숙(도면 2M 참조)을 유도하기 위하여 대량으로 배양된 암배우체를 온도 $5 \sim 10^\circ\text{C}$, 조도 $5 \sim 10 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 10:14(L:D)의 조건으로 배양하는 것이 바람직하며, 온도 $5 \sim 10^\circ\text{C}$, 조도 $10 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기는 10:14(L:D)의 조건으로 배양하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 아울러, 본 발명은 상기 암배우체를 성숙시키는 방법에 의해 얻은 성숙한 암배우체 및 상기 수배우체를 성숙시키는 방법에 의해 얻은 성숙한 수배우체를 이용한 감태의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0040] 상기의 암배우체를 성숙시키는 방법에 의해 성숙한 암배우체가 장란기를 형성하여 생식 가능한 상태가 되었고, 상기의 수배우체를 성숙시키는 방법에 의해 성숙한 수배우체가 장정기를 형성하여 생식 가능한 상태가 되었으므로, 이를 이용하여 감태의 대량 생산이 가능하다.

실시예

[0041] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0042] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1> 유주자 방출 및 배우체 분리

[0044] 본 연구에 사용된 성숙 모조는 2007년 11월에 국립수산물과학원 해조류연구센터에서 양식 실험중인 전남 완도군 약산면의 시험어장에서 채취하였다. 채취된 성숙 모조는 Ice box에 넣어 즉시 실험실로 운반한 뒤, 자낭반 부분을 절취하여 멸균해수로 수 회 세척한 후 멸균해수를 200 mL 채운 500 mL 용량의 비이커에 자낭반 조각을 넣고, Incubator (EYELA MTI-202B, Japan)을 이용하여 10℃, $20 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ 및 10:14h (L:D)조건에서 4시간 동안 유주자 방출을 유도하였다. 방출된 유주자액 0.1mL를 취하여 12 multi well-plate를 이용한 희석법으로 도. 2 과 같이 유주자액을 차례로 분주하여 밀도를 낮추었다. 4-5일 후 배우체가 암수로 구별되면 도립현미경 (Axio Observer A1, Carl zeiss, Germany)하에서 각각 암배우체와 수배우체로 구분하여 별도의 직경 5cm의 멸균된 Petri dish에 수용하여 PESI 배양액 (Tatewaki, 1966) 20 mL를 넣어 배양하면서 배양액은 2-3일 간격으로 환수 하였다. 암수 배우체의 생장에 따라 배양용기를 250 mL로 옮겨 주고 PESI 배지를 첨가하여 각각의 암수배우체 덩어리가 직경 5mm 크기에 도달할 때까지 50-60일간 배양하였다.

[0045] <실시예 2> 유리 배우체 단편의 절단 크기별 재생

[0046] 유리배우체 단편의 절단 크기별 재생을 파악하기 위하여 무성적으로 대량배양된 암수 배우체 덩어리 0.1g-fresh wt.를 멸균해수 100mL와 함께 250mL 비이커에 넣고 각각 호모게나이저 (DI 25basic, GMBH & Co., Germany)의 회전속도 (8,000, 9,500, 13,500, 20,500 및 24,000 rpm) 구간별로 60초간 세단한 후 15℃와 $20 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 조건에서 12 multi well-plate를 사용하여 20일간 정지배양한 후 배우체의 길이생장과 세포수를 도립현미경 하에서 측정하였다. 세단된 배우체의 크기 그룹별 길이 및 세포수의 생장은 배양 개시시의 배우체 평균길이 및 평균 세포수를 배양종료시의 그것과 비교하여 구하였다.

[0047] <실험예 1> 배양조건별 유리배우체 단편의 성장 및 성숙

[0048] 유리배우체의 세단 후 유리배우체 단편의 성장 및 성숙 유도에 유리한 최적 환경조건을 파악하기 위해 덩어리로 자란 암수 유리배우체를 각각 호모게나이저로 재생장이 가장 좋았던 세단 조건인 8,000 rpm의 속도로 1분간 분쇄하여, 12 multi well-plate에 PESI 배지 1mL를 채우고 한 well당 1개씩의 암수배우체를 각각 수용하였다. 배양조건은 4개 온도구간 (5, 10, 15, 20℃)과 4개 조도구간 ($5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) 및 3개 광주기 구간 [10:14, 12:12, 14:10h (L:D)]으로 설정하여 Multi room incubator (DS-14MCLP)를 이용하여, 배우체의 길이생장 및 성숙 여부를 도립현미경으로 관찰하였다. 조도의 측정은 LI-1400 (LI-COR, USA)으로 하였고, 조도 구간의 조정은 중성필터 (Lee Filter) ND 209, 210, 211호를 사용하여 조절하였다. 길이생장은 호모게나이저 로 분쇄 후 절단된 배우체는 분지가 없는 상태의 것을 선별해 측정하였으며 PESI 배지는 7일마다 교환해 주었다. 유리배우체의 상대성장율 (RGR)은 Serisawa et al. (2002)의 방법을 응용하여 하기와 같은 [수학식 1] 을 구하였다.

수학식 1

[0049]
$$\text{RGR} (\% \text{ day}^{-1}) = 100t^{-1} \ln (V_a/V_b)$$

[0050] V_a : length at time t_2

[0051] V_b : length at time t_1

[0052] t : number of days from t_1 to t_2

[0053] 또한, 실내배양실험에서 얻어진 배우체 단편의 성장율에 대한 온도, 조도 및 광주기 조건에 대한 각각의 유의성 분석은 분산분석법 (one-way ANOVA)을 이용하여 실시하였으며 (Zar, 1984), 통계프로그램은 SPSS ver. 8.0과 SYSTAT ver. 9.0을 이용하여 0.05 수준에서 이루어졌다. 성장율 데이터는 통계분석 이전에 arcsine transformation하였다 (Parker, 1979).

[0054] <실험예 2> 배우체의 성장

[0055] 감태 엽체 (도 2A)의 자낭반 (도 2B)으로부터 방출된 유주자 (도 2C)는 방출 즉시 기물에 부착하여 구형으로 착생하였다. 10℃, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 및 14:10h (L:D) 광주기 조건에서 배양 3일후 각각 암배우체 (도 2D) 또는 수배우체 (도 2E)로 성장하였다. 각각의 암수 배우체는 통기 조건하에서 약 30일이 경과되면 도 2F-G와 같이 배우체는 덩어리로 증식되었다. 호모게나이저를 이용하여 절단된 암수 배우체의 절편 (도 2H-I)은 정치배양 40일후 도 2J-K와 같이 각각 배우체 덩어리로 증식하였다. 이들 배우체 덩어리를 다시 세단하여 성숙을 유도한 결과 도 2L-M과 같이 각각 장란기와 장정기를 형성하였으며 배양 60일 후 유엽 (도 2N)으로 성장하였다.

[0056] <실험예 3> 유리배우체 단편 크기별 재생

[0057] 유리배우체의 단편 크기별 길이생장은 도 3A와 같이 배양 개시시 유리배우체의 세단 크기가 가장 작았던 173.6±93.6 μm 조건에서 배양 20일후 485.1±112.6 μm 로 증가하여 성장율이 5.1±0.6% day^{-1} 로 가장 높았다. 유리배우체의 배양개시시 세단 크기가 클수록 성장율은 2.4~1.2% day^{-1} 로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 유리배우체의 단편 크기별 세포수 구간별 성장율은 도 3B와 같이 세단시 세포수가 가장 적었던 7.9±3.0 cell/ind. 조건에서 배양 20일후 세포수가 45.7±16.8 cells/ind.로 증가하여 성장율이 8.8±0.6% day^{-1} 로 가장 높았다. 유리배우체의 배양 개시시 세포수가 많을수록 성장율은 4.5~0.1% day^{-1} 로 감소하는 경향을 나타내었다.

[0058] <실험예 4> 배양조건별 유리배우체 단편의 성장

[0059] 암배우체의 온도조건별 길이생장은 배양 10일 이후부터 15℃ 조건에서 빠르게 길이생장이 증가하기 시작하여 20일후 최대 341.6±62.7 μm 로 타 온도 구간에 비하여 가장 높았다 (도 4A). 조도구간별로는 배양 10일 이후부터 5와 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 조건에 비하여 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상의 조도구간에서 암배우체의 길이생장이 빠르게 증가하였다 (도 4B). 광주기 조건별로는 배양 5일까지는 10:14h (L:D) 조건에서 길이생장이 빠르게 증가하였으나 이후 14:10h (L:D) 조건에서 타 광주기 조건에 비하여 길이생장이 빠르게 증가하여 배양 20일 후 최대 371.0±37.1 μm 에 달하였다 (도 4C).

표 1

[0060] 감태의 유리 배우체의 온도, 조도 및 광주기에 따른 성장비

실험 조건		초기 길이($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)		최종 길이($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)		상대적인 성장 비(% day^{-1})	
		암	수	암	수	암	수
온도(℃)	5	122.1 ±23.6	152.4 ±30.3	210.9±35.2	206.0 ±46.9	2.7±0.2 ^a	1.5±0.3 ^a
	10			247.8±50.5	242.1 ±47.6	3.5±0.4 ^b	2.3±0.2 ^b
	15			341.6±62.8	371.0 ±37.1	5.1±0.1 ^c	4.4±0.1 ^c
	20			243.3±53.4	270.7 ±33.9	3.4±0.1 ^b	2.9±0.2 ^b

조도 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	5	122.1 ± 23.6	152.4 ± 30.3	225.1 ± 20.5	207.2 ± 16.7	3.1 $\pm 0.1^a$	1.5 $\pm 0.1^a$
	10			236.0 ± 48.9	223.2 ± 53.8	3.3 $\pm 0.3^a$	1.9 $\pm 0.2^a$
	20			341.6 ± 62.8	371.0 ± 37.1	5.1 $\pm 0.1^b$	4.4 $\pm 0.1^b$
	40			323.8 ± 55.1	286.8 ± 34.0	4.9 $\pm 0.3^b$	3.2 $\pm 0.2^c$
광주기 (L:D)	14:10	122.1 ± 23.6	152.4 ± 30.3	341.6 ± 62.8	371.0 ± 37.1	5.1 $\pm 0.1^a$	4.4 $\pm 0.1^a$
	12:12			304.2 ± 33.7	282.3 ± 31.0	4.6 $\pm 0.2^b$	3.1 $\pm 0.2^b$
	10:14			253.0 ± 37.4	260.7 ± 36.7	3.6 $\pm 0.3^c$	2.7 $\pm 0.1^b$

* 윗 첨자는 통계학적으로 유의성을 갖는지 여부를 나타내는 것이다.

암배우체의 온도조건별 성장율은 표 1과 같이 15℃조건에서 5.1 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 높았으며, 5℃조건에서 2.6 ± 0.2 $\mu\text{m/day}$ 로 가장 낮았다 (p<0.05). 조도 구간별로는 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 5.1 ± 0.1 $\mu\text{m/day}$ 로 가장 높았으며, 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 3.1 ± 0.7 % day⁻¹로 가장 낮았다 (p<0.05). 광주기 조건별로는 14:10h (L:D) 조건에서 5.1 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 높았고, 10:14h (L:D)에서 3.6 ± 0.3 % day⁻¹로 가장 낮았다 (p<0.05).

수배우체의 온도조건별 생장은 배양 15일 후부터 15℃ 조건에서 빠르게 길이생장이 증가하기 시작하여 배양 20일 후 최대 371.0 ± 37.1 μm 로 타 온도 조건에 비하여 가장 높았으며, 5℃에서 길이생장이 가장 저조하였다 (도 5A). 조도구간별로는 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 길이생장의 증가가 가장 빨랐으며, 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 가장 저조하였다 (도 5B). 광주기 구간별로는 14:10h (L:D) 조건에서 길이생장이 가장 빠르게 증가하여 371.0 ± 37.1 μm 로 최대치를 보였으며, 12:12와 10:14h (L:D) 조건에서는 253.0~304.2 μm 로 길이생장이 저조하였다 (도 5).

수배우체의 온도조건별 성장율은 표 1과 같이 15℃조건에서 4.4 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 높았으며 5℃조건에서 1.5 ± 0.3 % day⁻¹로 가장 낮았다 (p<0.05). 조도구간별로는 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 4.4 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 높았으며, 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 1.5 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 낮았다 (p<0.05). 광주기 조건별로는 14:10h (L:D) 조건에서 4.4 ± 0.1 % day⁻¹로 가장 높았으나 10:14h (L:D)과 12:12h (L:D)에서는 각각 2.7 ± 0.1 % day⁻¹ 및 3.1 ± 0.2 % day⁻¹로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

<실험예 5> 배양조건별 유리배우체 단편의 성숙

암배우체의 성숙은 표 2와 같이 온도, 조도 및 광주기 조건별로 차이를 나타내었다. 온도조건별로는 15℃ 조건에서 배양 10일 후 가장 먼저 장란기가 형성되기 시작하여, 15일 후 30% 이상의 암배우체가 장란기를 형성하였고, 배양 20일 후에는 약 50% 이상의 암배우체가 장란기 형성을 나타내었다. 그러나 5-10℃ 조건에서는 배양 20일까지 장란기의 형성이 관찰되지 않았다. 조도조건별로는 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 배양 10일 후 약 10%의 암배우체가 장란기를 형성하였으며 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서는 배양 15일 후 장란기의 형성을 나타내었으나, 5-10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서는 배양 20일까지 장란기가 형성되지 않았다. 광주기 조건별로는 14:10h (L:D) 조건에서 배양 10일 후 가장 먼저 장란기의 형성이 관찰되었으며 12:12h 및 10:14h (L:D) 조건에서는 배양 20일 후 장란기의 형성이 관찰되었다.

표 2

[0067] 감태의 온도, 조도 및 광주기 조건하에서 암 배우체의 장란기 형성 비율

조건		날짜				
		0	5	10	15	20
온도 (℃)	5	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	++	+++
	20	-	-	-	+	++
조도 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	5	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	++	+++
	40	-	-	-	+	+++
광주기 (L:D)	14:10	-	-	+	++	+++
	12:12	-	-	-	-	+
	10:14	-	-	-	-	+

[0068] * -, 불임; +, 장란기 형성이 10% 이하인 경우; ++, 장란기 형성이 30% 이하인 경우; +++, 장란기 형성이 50% 이하인 경우

[0069] 수배우체의 성숙은 표 3과 같이 온도, 조도 및 광주기 조건별로 차이를 나타내었다. 온도조건별로는 배양 5일후 5~10℃ 조건에서 장정기의 형성이 나타나기 시작하였으나, 15~20℃ 조건에서는 배양 20일까지 장정기의 형성이 관찰되지 않았다. 조도조건별로는 배양 10일후 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서 가장 먼저 장정기의 형성이 관찰되었으며, 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서는 배양 15일후 장정기의 형성이 관찰되었으나, 20~40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건에서는 배양 20일까지 장정기의 형성이 관찰되지 않았다. 광주기 조건별로는 10:14h (L:D) 조건에서 배양 10일 후 가장 먼저 장정기가 형성되기 시작하였으며, 12:12h (L:D)에서는 배양 20일 후 장정기의 형성이 관찰되었으나, 14:10h (L:D)에서는 배양 10일까지 장정기의 형성이 관찰되지 않았다.

표 3

[0070] 감태의 온도, 조도 및 광주기 조건하에서 수 배우체의 장정기 형성비율

조건		날짜				
		0	5	10	15	20
온도 (℃)	5	-	+	+	+	+
	10	-	+	+	+	+
	15	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
조도 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	5	-	-	-	+	+
	10	-	-	+	+	+
	20	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
광주기 (L:D)	14:10	-	-	-	-	-
	12:12	-	-	-	-	+
	10:14	-	-	+	+	+

[0071] * -, 불임; +, 장정기 형성

산업이용 가능성

[0072] 본 발명은 감태 배우체의 분리방법, 대량 증식방법 및 배우자의 성숙방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 감태 육종에 유용하게 사용될 수 있는 배우체의 대량 증식을 통하여, 멸종위기에 있는 감태의 생태복원에 유용하

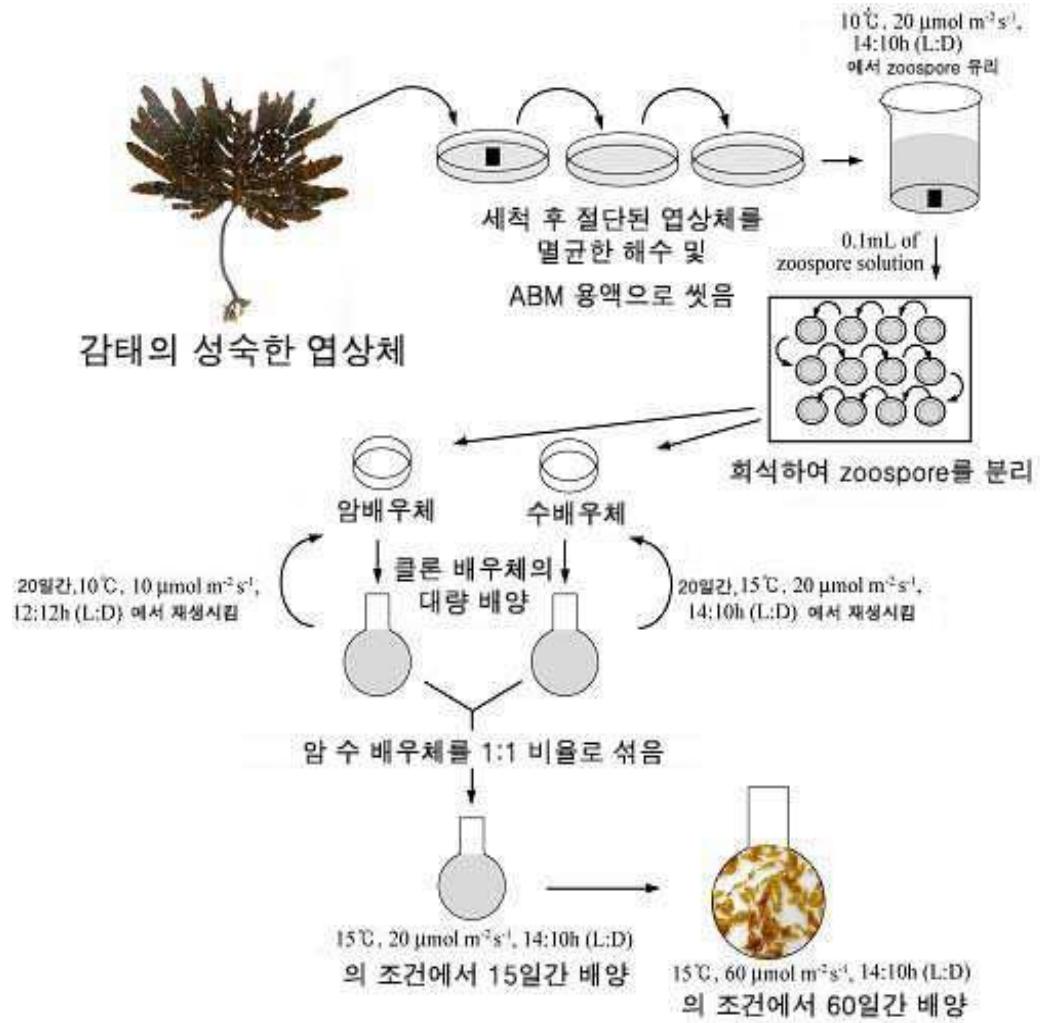
게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 어업인의 소득증대에 기여할 수 있다. 더 나아가 본 발명은 감태의 대량 생산을 통해 고부가 가치성을 창출하는 화장품, 의약품 및 건강식품 원료 공급에 적극적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

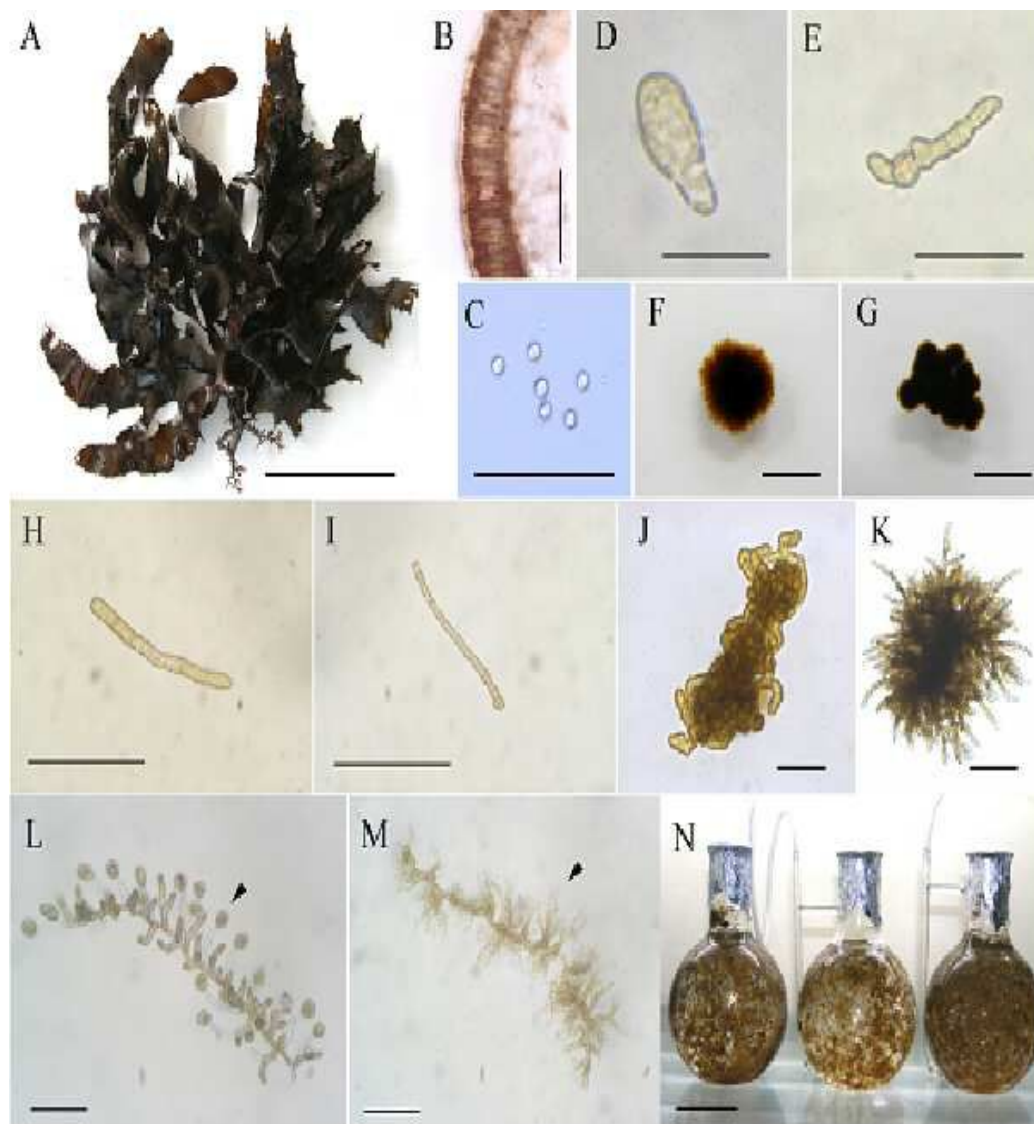
- [0073] 도 1은 본 발명을 개략적으로 보인 모식도이다.
- [0074] 도 2는 감태의 유리배우체를 분리 및 배양하는 각 단계에서의 현미경하 사진을 나타낸 도면이다.
- [0075] A : 성숙한 감태의 포자체(sporophyte)
- [0076] B : 감태 유주자낭의 단면
- [0077] C : 착생된 유주자
- [0078] D : 3일간 배양된 암 배우체
- [0079] E : 3일간 배양된 수 배우체
- [0080] F : 암배우체 클러스터
- [0081] G : 수배우체 클러스터
- [0082] H : 암배우체의 절편
- [0083] I : 수배우체의 절편
- [0084] J : 유주자(zospore)로부터 얻은 암배우체의 클론 클러스터
- [0085] K : 유주자(zospore)로부터 얻은 수배우체의 클론 클러스터
- [0086] L : 암배우체로부터 생성된 장란기
- [0087] M : 수배우체로부터 생성된 장정기
- [0088] N : 유리배우체로부터 얻은 잎
- [0089] 도 3은 초기 배우체 절편 길이에 따른 성장율을 나타낸 도면이다.
- [0090] A : 길이 성장율
- [0091] B : 세포수 증가율
- [0092] 도 4는 암배우체의 온도, 조도 및 광도에 따른 길이 성장을 도시한 도면이다.
- [0093] 도 5는 수배우체의 온도, 조도 및 광도에 따른 길이 성장을 도시한 도면이다.

도면

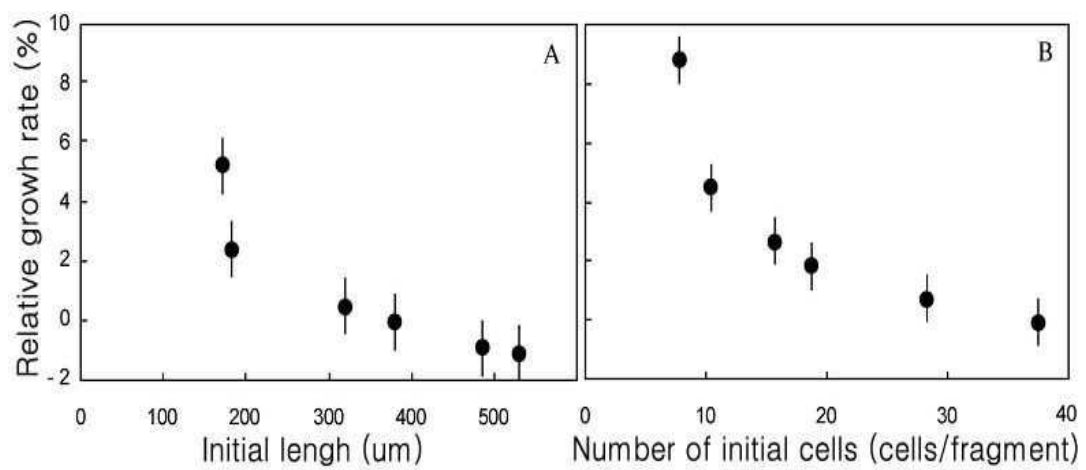
도면1



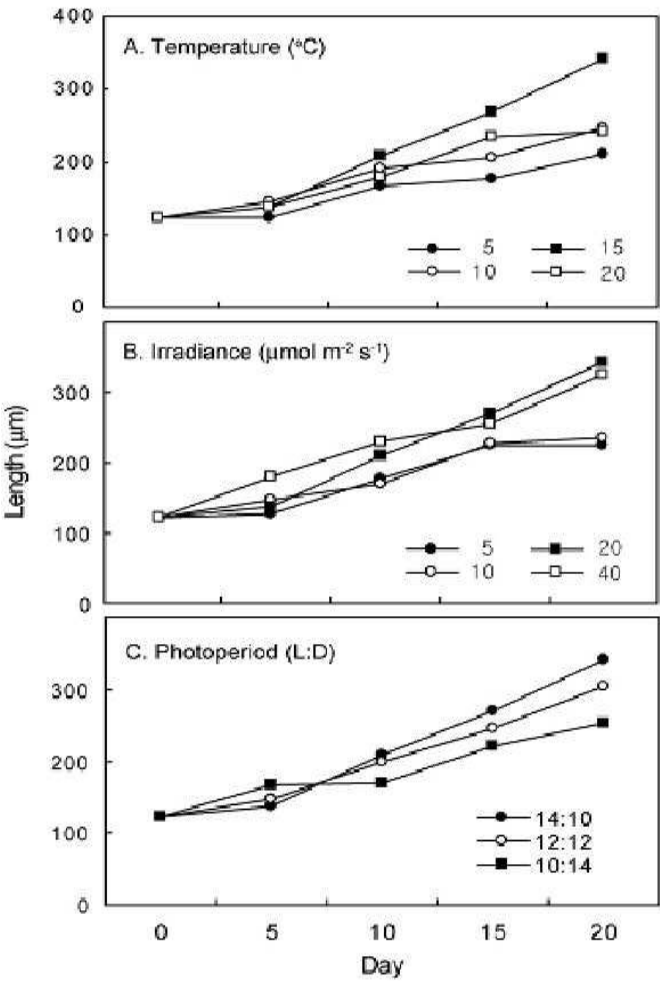
도면2



도면3



도면4



도면5

