



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월28일
(11) 등록번호 10-1802459
(24) 등록일자 2017년11월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C02F 1/40 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01)
B01D 35/02 (2006.01) C02F 1/00 (2006.01)
C02F 1/22 (2006.01) C02F 1/36 (2006.01)
C02F 1/38 (2006.01) C02F 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C02F 1/40 (2013.01)
B01D 15/08 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0100664
(22) 출원일자 2016년08월08일
심사청구일자 2016년08월08일
- (56) 선행기술조사문헌
JP2003342489 A*
US09131724 B2*
KR1020110130420 A
Lawton&Edwards. Purification of microcystins.
Journal of Chromatography A. 2001, 912,
191-209*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
한국수자원공사
대전광역시 대덕구 신탄진로 200(연축동)
- (72) 발명자
최재원
대전광역시 대덕구 중리서로 31 영진로얄아파트
101동 307호
김진영
대전광역시 대덕구 동춘당로 114번길 60 선비마을
209동 906호
안수나
대전광역시 대덕구 대덕대로 1555 금강엑슬루타워
102동 1603호
- (74) 대리인
특허법인 아이퍼스

전체 청구항 수 : 총 3 항

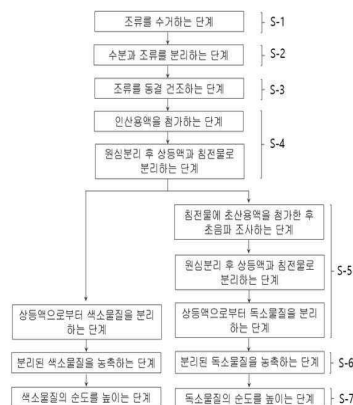
심사관 : 이진욱

(54) 발명의 명칭 **납조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 수계에 발생한 조류로부터 색소물질인 피코시아닌과 독소물질인 마이크로시스틴을 고순도로 분리 정제할 수 있는 방법에 관한 것으로, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 제1 원심분리 및 여과하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 인산염 완충액을 첨가한 후 제2 원심분리하여 제2 상등액과 제2 침전물로 분리하는 S-4 단계, 상기 제2 상등액으로부터 색소물질을 분리하고, 상기 제2 침전물로부터 독소물질을 분리하는 S-5 단계 및 분리된 색소물질과 독소물질을 각각 농축하는 S-6 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

B01D 35/02 (2013.01)

C02F 1/001 (2013.01)

C02F 1/22 (2013.01)

C02F 1/36 (2013.01)

C02F 1/385 (2013.01)

C02F 9/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계;

수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 제1 원심분리 및 여과하는 S-2 단계;

수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계;

인산염 완충액을 첨가한 후 제2 원심분리하여 제2 상등액과 제2 침전물로 분리하는 S-4 단계;

상기 제2 상등액으로부터 색소물질인 피코시아닌을 분리하고, 상기 제2 침전물로부터 독소물질인 마이크로시스틴을 분리하는 S-5 단계; 및

분리된 피코시아닌과 마이크로시스틴을 각각 농축하는 S-6 단계를 포함하되,

상기 S-4 단계에서는 건조된 조류 1g에 대하여 1M 인산용액을 50ml 내지 100ml 첨가하며, 제2 원심분리단계는 3,500 내지 4,500 rpm에서 15분 내지 25분간 실시하고,

상기 S-5 단계에서의 피코시아닌은 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 615nm 파장에서 검출되고, 마이크로시스틴은 상기 제2 침전물에 4 부피% 내지 6 부피%에 해당되도록 초산용액을 첨가하는 단계, 초음파를 조사하는 단계, 제3 원심분리 단계 및 제3 상등액을 수득하는 단계를 포함하되,

상기 초음파를 조사하는 단계에서는 조사강도 18 KHz 내지 22 KHz 및 4~15℃에서 1 내지 2분 조사와 1 내지 2분 정지를 반복하면서 25분 내지 35분 실시하는 것을 특징으로 하는 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

분리된 색소물질과 독소물질을 농축하는 S-6 단계는 40~50℃에서 감압농축하는 것을 특징으로 하는 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 감압농축하는 S-6 단계 이후에 색소물질과 독소물질의 순도를 높이는 S-7 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수계에 발생한 조류로부터 색소물질인 피코시아닌과 독소물질인 마이크로시스틴을 고순도로 분리 정제할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 기후변화로 인하여 조류가 수시로 발생하고 있어 이로 인한 냄새와 독성물질은 큰 사회적 이슈로 부각되고 있다. 특히 수온이 높은 여름철에는 남조류(blue green algae)의 발생빈도가 증가하고 있는 상황이며, 이러한

남조류는 독성을 가지고 있기 때문에 상수원이나 정수장 등 먹는 물과 관련된 기관에서는 이들 남조류로 인한 독성물질이 함유되었는지 확인하기 위하여 표준물질을 사용하여 주기적 또는 비주기적으로 빈번하게 확인하고 있다.

[0004] 따라서 이와 같이 독소물질을 측정하기 위한 표준물질의 수요가 급증하고 있으며, 이들 독소표준물질은 전량 수입에 의존하고 있는 상황이다. 그러나 그 독성으로 인하여 최근 자국 외 수출을 제한하고 있어 독소표준물질의 수입이 용이하지 않고, 이는 결과적으로 국내에서 자체적으로 생산을 하거나 또는 분석횟수를 줄일 수 밖에 없는 상황에 직면하게 된다. 이 외에도 피코시아닌(phyococyanin)이라는 표준물질로 남조류의 발생 빈도나 강도를 예측하고 있지만, 피코시아닌도 전량 수입에 의존하고 있을 뿐만 아니라, 그 가격이 1g 당 약 5.5백만원으로 막대한 외화가 낭비되고 있는 상황이다.

[0005] 따라서 조류 발생으로 인한 빈도의 예측이나, 독성물질의 함유여부를 정확하게 확인하고, 안전한 수돗물을 공급하기 위해서는 상기와 같은 표준물질들이 저렴하면서도 안정되게 공급이 이루어져야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허공보 제10-2011-0115681호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명에서는 남조류가 발생하는 수준을 예측하고 나아가 독성여부를 판단하는 표준물질을 저렴하면서도 안정적으로 제공할 수 있는 분리 정제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한 본 발명에서는 단순히 폐기 처분하고 있는 수계에 발생한 조류를 재활용할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 제1 원심분리 및 여과하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 인산염 완충액을 첨가한 후 제2 원심분리하여 제2 상등액과 제2 침전물로 분리하는 S-4 단계, 상기 제2 상등액으로부터 색소물질을 분리하고, 상기 제2 침전물로부터 독소물질을 분리하는 S-5 단계 및 분리된 색소물질과 독소물질을 각각 농축하는 S-6 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한 상기 S-4 단계에서는 건조된 조류 1g에 대하여 1M 인산용액을 50ml 내지 100ml 첨가하고, 상기 제2 원심분리단계는 3,500 ~ 4,500 rpm에서 15분 내지 25분간 실시하는 것이 바람직하다.

[0013] 또한 상기 S-5 단계에서의 색소물질은 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 615nm 파장에서 검출되는 성분이고, 독소물질은 4 부피% 내지 6 부피% 초산용액을 첨가하는 단계, 초음파를 조사하는 단계, 제3 원심분리 단계 및 제3 상등액을 수득하는 단계를 포함하되, 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 238nm 파장에서 검출되는 상기 제3 상등액에 포함된 성분인 것을 특징으로 한다.

[0014] 여기서, 상기 초음파를 조사하는 단계에서는 조사강도 18 KHz 내지 22 KHz 및 4~15℃에서 25분 내지 35분 실시하는 것이 바람직하다.

[0015] 또한 분리된 색소물질과 독소물질을 농축하는 S-6 단계는 40~50℃에서 감압농축하는 것이 바람직하고, 상기 감압농축하는 S-6 단계 이후에 색소물질과 독소물질의 순도를 높이는 S-7 단계를 더 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[0016] 또한 상기에서 색소물질은 피코시아닌이고, 상기 독소물질은 마이크로시스틴이다.

[0017] 또한 본 발명에 따른 조류로부터 색소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계,

수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 색소 추출 용매를 첨가하는 S-4' 단계, 색소물질을 분리하는 S-5' 단계 및 분리된 색소물질을 농축하는 S-6' 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 여기서, 상기 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계는 제1 원심분리 후 여과하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 게다가 상기 색소 추출 용매를 첨가하는 S-4' 단계는 1M 인산용액을 첨가하는 단계 및 제2 원심분리하는 단계를 포함하되, 상기 1M 인산용액은 건조된 조류 1g에 대하여 50ml 내지 100ml 첨가하고, 상기 제2 원심분리단계는 3,500 내지 4,500 rpm에서 15분 내지 25분간 실시하는 것이 바람직하다.

[0020] 여기서, 상기 색소물질을 분리하는 S-5' 단계는 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 615nm 파장에서 검출되는 성분을 분리하고, 상기 분리된 색소물질을 농축하는 S-6' 단계는 40~50℃에서 감압농축하는 것이 바람직하다.

[0021] 아울러 상기 색소물질은 피코시아닌일 수 있다.

[0022] 또한 본 발명에서는 상기 정제 방법에 의해 얻어지는 피코시아닌을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명에 따른 조류로부터 독소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 독소 추출 용매를 첨가하는 S-4" 단계, 독소물질을 분리하는 S-5" 단계 및 분리된 독소물질을 농축하는 S-6" 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 여기서, 상기 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계는 제1 원심분리 후 여과하는 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 또한 상기 독소 추출 용매를 첨가하는 S-4" 단계에서는 4 부피% 내지 6 부피% 초산용액을 첨가하는 단계, 초음파를 조사하는 단계 및 제2 원심분리하는 단계를 포함하되, 상기 초음파 조사는 조사강도 18 KHz 내지 22 KHz 및 4~15℃에서 25분 내지 35분 실시하는 것이 바람직하고, 상기 독소물질을 분리하는 S-5" 단계는 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 238nm 파장에서 검출되는 성분을 분리하고, 상기 분리된 독소물질을 농축하는 S-6" 단계는 40~50℃에서 감압농축하는 것이 보다 바람직하다.

[0026] 아울러 상기 독소물질은 마이크로시스틴일 수 있다.

[0027] 또한 본 발명에서는 상기 정제 방법에 의해 얻어지는 마이크로시스틴을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에서는 수거 후 폐기처분되는 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리하고, 분리된 물질들을 표준물질로 사용할 수 있어 종래 색소물질과 독소물질의 제조비용을 절감할 수 있다는 효과가 있다.

[0030] 또한 본 발명에서는 색소물질과 독소물질을 동시에 분리 정제하거나 또는 필요에 따라 개별적으로 분리 정제할 수 있기 때문에 색소물질과 독소물질의 활용성을 증가시킬 수 있다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 색소물질인 피코시아닌의 구조식이다.

도 2는 독소물질인 마이크로시스틴-LR의 구조식이다.

도 3은 본 발명의 제1 실시예인 조류로부터 색소물질과 독소물질을 동시에 분리 정제하는 방법을 나타내는 흐름도이다.

도 4는 색소물질인 피코시아닌의 검출결과이다(615nm).

도 5는 독소물질인 마이크로시스틴의 검출결과이다(238nm).

도 6은 마이크로시스틴-RR, YR 및 LR의 구조식이다

도 7은 분취형 액체크로마토그래피로 분리한 마이크로시스틴-RR, YR 및 LR 독소의 검출결과이다.

도 8은 건조 조류 0.1g으로부터 추출한 독소량 결과이다.

도 9는 본 발명의 제2 실시예인 조류로부터 색소물질을 분리 정제하는 방법과 제3 실시예인 조류로부터 독소물질을 분리 정제하는 방법을 나타내는 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명하기로 한다. 본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 이하에서는 첨부된 도 3을 참조하면서, 본 발명의 제1 실시예인 조류로부터 색소물질과 독소물질을 동시에 분리 정제하는 방법에 관하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0036] 본 발명에 의한 조류로부터 색소물질과 독소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 제2 상등액과 제2 침전물을 분리하는 S-4 단계, 제2 상등액으로부터 색소물질을 분리하고, 제2 침전물로부터 독소물질을 분리하는 S-5 단계, 분리된 색소물질과 독소물질을 농축하는 S-6 단계 및 색소물질과 독소물질의 순도를 높이는 S-7 단계를 포함한다.
- [0038] 이하 각 단계의 구성에 관하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0039] 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계
- [0040] 하천이나 호소 등 수계에서 발생한 남조류를 채취하여 수분이 잘 배출될 수 있는 다공성 용기에 보관한다. 채취하는 방법이나 도구는 특별히 제한하지 않으며, 바람직하게는 식물성 플랑크톤 네트(mesh size 20 μ m)를 사용하여 수면 부근에 부유하는 남조류를 채취할 수 있다.
- [0042] 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계
- [0043] 수거한 조류를 최대한 신속하게 수분과 조류를 분리하거나 그렇지 못할 경우에는 4° C 냉암소에서 보관하는 것이 바람직하며, 수거한 조류를 장시간 방치하여 둘 경우, 조류로부터 배출되는 독소와 색소성분이 혼합되어 각각의 성분을 분리하는 과정이 곤란해지고, 또 여름철에는 쉽게 부패할 수 있기 때문이다.
- [0044] 수거한 조류로부터 수분을 분리하는 방법은 특별히 제한하지 않지만, 먼저 원심분리하여 수분층과 조류층으로 분리한 후, 침전된 조류층을 여과하여 수분을 제거하는 것이 바람직하다.
- [0045] 만약 수거한 조류를 바로 여과할 경우에는, 조류가 여과지의 기공을 폐색하여 수분이 잘 빠지지 않기 때문에 최대한 수분을 제거한 후 여과하는 것이 효과적이다. 상기와 같은 과정을 통하게 되면, 조류에 포함된 대부분의 수분이 제거되어 이후 단계인 동결건조가 가능하지만, 냉풍이나 저온 열풍 등 공지의 건조수단을 통하여 미량으로 존재하는 수분을 제거하는 공정을 더 부가할 수도 있다.
- [0047] 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계
- [0048] 최근 기상 이변 등으로 인하여 조류가 발생하는 시기나 발생 영역이 광범위해지고 있지만, 비교적 수온이 떨어지는 봄이나 가을에는 조류를 수거하는 것이 곤란한 수역들이 있다. 본 발명에서는 시료를 안정적으로 보관하여 조류를 수거하기 어려운 경우에도 색소물질과 독소물질을 분리 정제하여 표준물질로 사용할 수 있도록 동결 건조하는 단계를 더 포함하고 있다. 상기 동결 건조방법은 공지된 기술에 해당되므로 상세한 설명은 생략하기로 한다.
- [0050] 인산용액을 첨가하여 상등액과 침전물로 분리하는 S-4 단계
- [0051] 동결건조한 조류나 수분을 제거한 조류에 인산염 완충액(phosphate buffer)을 첨가하고, 상기 인산염 완충액 함유 혼합물을 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리한다.
- [0052] 상기와 같이 인산염 완충액을 첨가하면 색소 물질인 피코시아닌은 인산염 완충액에 용해되지만 독소물질인 마이크로시스틴은 여전히 조류의 세포막 내에 존재하게 되므로, 독소물질을 거의 함유하지 않는 색소물질을 분리하는 것을 가능하게 한다. 즉, 원리분리과정을 통해 얻어진 상등액은 색소를 분리 정제하기 위한 시료로 사용되고, 침전물인 조류 입자는 독소를 분리 정제하기 위한 시료로 이용되는 것이다.
- [0053] 여기서, 인산용액은 건조된 조류 1g에 대하여 1M 인산염 완충액을 50ml 내지 100ml 첨가하는 것이 바람직하고, 또 원심분리조건은 3,500 내지 4,500 rpm에서 15분 내지 25분간 실시하는 것이 바람직하다.
- [0054] 인산염 완충액의 첨가량이 상기 범위를 벗어나거나, 회전수와 시간 등 원심분리조건이 상기 범위를 벗어나게 되면 독소물질인 마이크로시스틴이 세포막 외부로 유출될 수 있어 상기 조건으로 실시하는 것이 바람직하다.

- [0056] 색소물질과 독소물질을 각각 분리하는 S-5 단계
- [0057] S-5 단계는 상기 S-4 단계에서 얻어진 상등액으로부터 색소물질을 분리하고, 침전물로부터는 독소물질을 분리하는 단계이다.
- [0058] 먼저, 색소물질을 분리하는 단계에 관하여 설명하면, 전술한 바와 같이 색소물질인 피코시아닌은 인산염 완충액에 용해되어 있는 상태이므로, 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography ; SEC)를 사용하여 자외선 검출기의 615nm 파장에서 용해된 피코시아닌을 분리할 수 있다(도 4).
- [0059] 여기서, 상기 SEC는 제조사 Phenomenex, 모델명 BioSep-SEC-s3000이며, 내경 7.8mm와 길이 300mm인 칼럼에 직경 5 μ m인 입자가 충전되어 있다. 또 분리시 운전조건으로는 pH 7.0으로 조절된 0.1 M의 인산염 완충액(phosphate buffer)을 사용하였고, 이동상의 유속은 1.0mL/min으로 공급하였다.
- [0060] 다음으로 상기 S-5 단계에서 얻어진 침전물로부터 독소물질을 분리하는 단계에 관하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0061] 독소물질을 분리하는 단계는 초산용액을 첨가하는 단계, 초음파를 조사하는 단계, 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계 및 상기 상등액에 포함된 독소물질인 마이크로시스틴을 분리하는 단계로 이루어진다.
- [0062] 마이크로시스틴을 분리하기 위해서는 조류의 세포벽과 세포막을 파괴시켜야 하지만, 이들 세포벽과 세포막은 쉽게 파괴되지 않는다. 본 발명에서는 세포벽과 세포막의 강도를 완화시킬 목적으로 초산용액을 첨가하며, 초산용액에 의해 약해진 세포벽과 세포막에 초음파 조사함으로써 마이크로시스틴을 완벽하게 세포벽 외부로 추출할 수 있다.
- [0063] 여기서 초산농도는 4~6 부피%인 것이 바람직하다. 초산농도가 4 부피% 미만이면 마이크로시스틴의 세포벽과 세포막의 강도를 충분하게 완화시킬 수 없고, 반대로 6 부피%를 초과하면 마이크로시스틴의 세포벽과 세포막강도를 충분하게 완화시킬 수 있지만 필요 이상의 고농도 초산을 사용하게 되어 분리 정제 비용이 증가할 뿐만 아니라 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography ; SEC)를 통한 마이크로시스틴 분리시 방해물질로 작용할 수 있기 때문에 초산농도는 상기 범위인 것이 바람직하다.
- [0064] 아울러 초음파 조사단계에서는 조사강도 18 KHz 내지 22 KHz 및 4~15℃(얼음물 중탕)에서 25분 내지 35분 실시하는 것이 바람직하다.
- [0065] 특히, 초음파 조사시에는 1분 내지 2분 조사한 이후에는 1분 내지 2분 정지시키는 과정을 반복하는 것이 바람직하다. 연속적으로 초음파를 조사하게 되면 열이 발생하고, 이러한 열은 마이크로시스틴을 분해하는 등 최종적으로 얻어질 마이크로시스틴의 수율을 저하시킬 수 있기 때문이다.
- [0066] 이상에서와 같이 세포벽과 세포막으로부터 추출된 마이크로시스틴은 초산용액에 용해되며, 원심분리를 통해 상등액을 분리함으로써 마이크로시스틴을 함유한 초산용액을 얻게 된다.
- [0067] 이렇게 얻어진 마이크로시스틴 함유 초산용액은 전술한 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography ; SEC)를 사용하여 자외선 검출기의 238nm 파장에서 용해된 마이크로시스틴을 분리하였다(도 5).
- [0068] 마이크로시스틴 분리시 사용한 SEC는 상기 피코시아닌을 분리할 때 사용한 SEC와 동일하고, 분리시의 운전조건인 완충액, 이동상 속도도 동일하므로 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0069] 색소물질과 독소물질을 분리하는 S-5 단계를 설명하면서, 색소물질과 독소물질을 각각의 SEC로 분리하는 것으로 설명하였으나, 하나의 SEC를 사용하여 색소물질과 독소물질을 함께 분리하는 것도 가능하다.
- [0070] 즉, 피코시아닌이 이미 용해되어 있는 S-4 단계에서 얻어진 상등액과, 초산용액 첨가와 초음파 조사를 실시한 마이크로시스틴 함유 원심분리 상등액을 혼합한 혼합물을 SEC로 공급함으로써, 238nm 파장에서는 마이크로시스틴 그리고 615nm 파장에서는 용해된 피코시아닌을 분리하는 것이 가능하다.
- [0072] 분리된 색소물질과 독소물질을 농축하는 S-6 단계
- [0073] SEC분리방법을 통하여 독소물질인 마이크로시스틴은 238nm 파장, 색소물질인 피코시아닌은 615nm 파장에서는 분리된다. 그러나 SEC 방법을 통한 분리시에는 각 물질들을 이동시키기 위한 이동상 용매(본 발명에서는 인산염 완충액)가 사용되기 때문에 농도가 낮다. 따라서 이들 마이크로시스틴과 피코시아닌 함량을 높이기 위하여 농축하는 단계를 더 실시하는 것이 바람직하다.

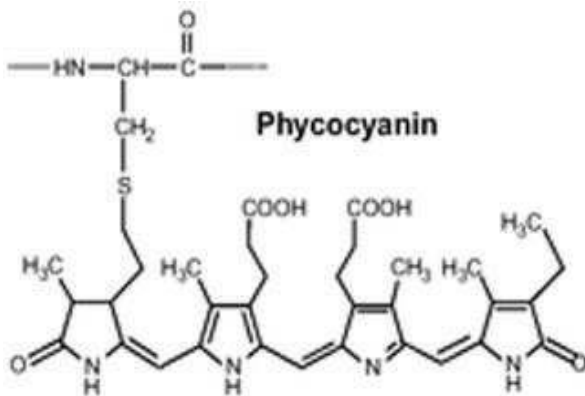
- [0074] 여기서, 상기 물질들의 농축방법은 감압회전농축기를 사용하는 것이 바람직하고, 마이크로시스틴과 피코시아닌이 열에 의해 분해되거나 변질되는 것을 방지하기 위하여 40~50℃에서 농축하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0076] 색소물질과 독소물질의 순도를 높이는 S-7 단계
- [0077] 특정 물질들은 각자가 발현하는 고유 파장을 가지며, 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography; SEC)는 이러한 특징을 이용하고 있기 때문에 물질들의 분리나 정제에 많이 적용되고 있다.
- [0078] 그러나 각 물질별로 고유의 파장을 가지고 있지만, 어떠한 물질들은 고유 파장이 매우 근접하거나 또는 용해된 물질들의 종류나 농도 등에 따라 원하지 않는 물질들도 함께 분리되는 경우가 있다. 본 발명에서는 분리된 피코시아닌과 마이크로시스틴의 순도를 높이기 위하여 이들 물질들에 포함된 불순물을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0079] 일례로 고순도 피코시아닌을 얻기 위해서는 투석 및 겔여과, 고순도 마이크로시스틴은 고상추출법 및 분취형 액체크로마토그래피(preplc)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0080] 특히, 독소물질인 마이크로시스틴은 도 6에 도시한 구조식을 갖는 RR, YR 및 LR 등 3종류의 이성체가 존재하며, 이들 중 마이크로시스틴-LR이 독성이 강하고, 마이크로시스틴-YR과 RR은 독성이 약한 것으로 알려져 있다. 따라서 조류가 발생한 수역의 독성평가를 효과적으로 실시하기 위해서는 상기 3종류의 이성체를 모두 확보하는 것이 중요하다.
- [0081] 본 발명에서는 독소 물질의 순도를 높이는 것과 함께 상기와 같은 3종류의 독소물질을 고순도로 분리 정제하기 위하여 HLB(Hydrophobic Lipophilic Balance) 재질의 고상추출법(Solid Phase Extraction)으로 마이크로시스틴을 분리한 후 분취형 액체크로마토그래피(Preparative LC)로 RR, YR 및 LR를 분리하였다.
- [0082] 극성 물질에 해당되는 마이크로시스틴을 선택적으로 추출 및 회수하기 위하여 HLB(Hydrophobic Lipophilic Balance) 재질을 사용한 고상추출법을 채용하였으며, 구체적으로는 100% 메탄올을 소정량 통과시켜 카트리지를 활성화시킨 후, 다시 증류수를 소정량 통과시켜 활성화된 카트리지를 세척하였다.
- [0083] 다음으로, 활성화 및 세척한 카트리지에 초산으로 추출하고 농축한 시료를 통과시켜 마이크로시스틴을 흡착시키고, 20% 메탄올을 소정량 통과시켜 불순물을 제거하였다. 이어서, 마이크로시스틴이 잘 용해되는 80% 메탄올을 통과시켜 순도가 높은 마이크로시스틴을 수득하였다.
- [0084] 이렇게 얻어진 고순도 마이크로시스틴을 0.22 μ m필터로 여과한 후, 분취형 액체크로마토그래피(Preparative LC)로 공급하여 RR, YR 및 LR 독소를 고순도로 분리하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, Retention 약 5.1분에서 마이크로시스틴-RR이 먼저 분리되었고, 이어서 8.6분에서 마이크로시스틴-YR 그리고 마지막으로 9.4분에서 마이크로시스틴-LR이 분리되었다. 본 발명에서는 0.1g의 건조 조류로부터 마이크로시스틴-RR 13 μ g/ml, 마이크로시스틴-LR 5.4 μ g/ml, 마이크로시스틴-YR 1.7 μ g/ml을 추출하였다(도 8).
- [0085] 한편, 본 발명의 분취형 액체크로마토그래피(preplc)에서 사용한 컬럼은 ODS C18로서, 내경 4.6 mm 및 길이 150 mm이다.
- [0087] 이하에서는 첨부된 도 9를 참조하면서, 본 발명의 제2 실시예인 조류로부터 색소물질을 분리 정제하는 방법 및 제3 실시예인 조류로부터 독소물질을 분리 정제하는 방법에 관하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0088] 먼저 제2 실시예에 해당되는 본 발명에 의한 조류로부터 색소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 색소 추출 용매를 첨가하는 S-4' 단계, 색소물질을 분리하는 S-5' 단계, 분리된 색소물질을 농축하는 S-6' 단계 및 색소물질의 순도를 높이는 S-7' 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0089] 제1 실시예와는 달리 제2 실시예에서는 색소물질만을 분리할 수도 있다. S-1 단계 내지 S-3 단계는 제1 실시예와 동일하고, 또 S-4' 단계 내지 S-7'는 제1 실시예의 S-4 단계 내지 S-7 단계와 동일하므로, 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0090] 제3 실시예에 해당되는 본 발명에 의한 조류로부터 독소물질을 분리 정제하는 방법은, 수계에 발생한 조류를 수거하는 S-1 단계, 수거한 조류에 함유된 수분과 조류를 분리하는 S-2 단계, 수분이 제거된 조류를 동결 건조하는 S-3 단계, 독소 추출 용매를 첨가하는 S-4" 단계, 독소물질을 분리하는 S-5" 단계, 분리된 독소물질을 농축하는 S-6" 및 독소물질의 순도를 높이는 S-7" 단계를 포함한다.

[0091] 제1 및 제2 실시예와는 달리 제3 실시예에서는 독소물질만을 분리할 수도 있다. S-1 단계 내지 S-3 단계는 제1 실시예와 동일하고, 또 S-4" 단계 내지 S-7"는 제1 실시예의 S-4 단계 내지 S-7와 동일하므로, 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

[0093] 이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

도면

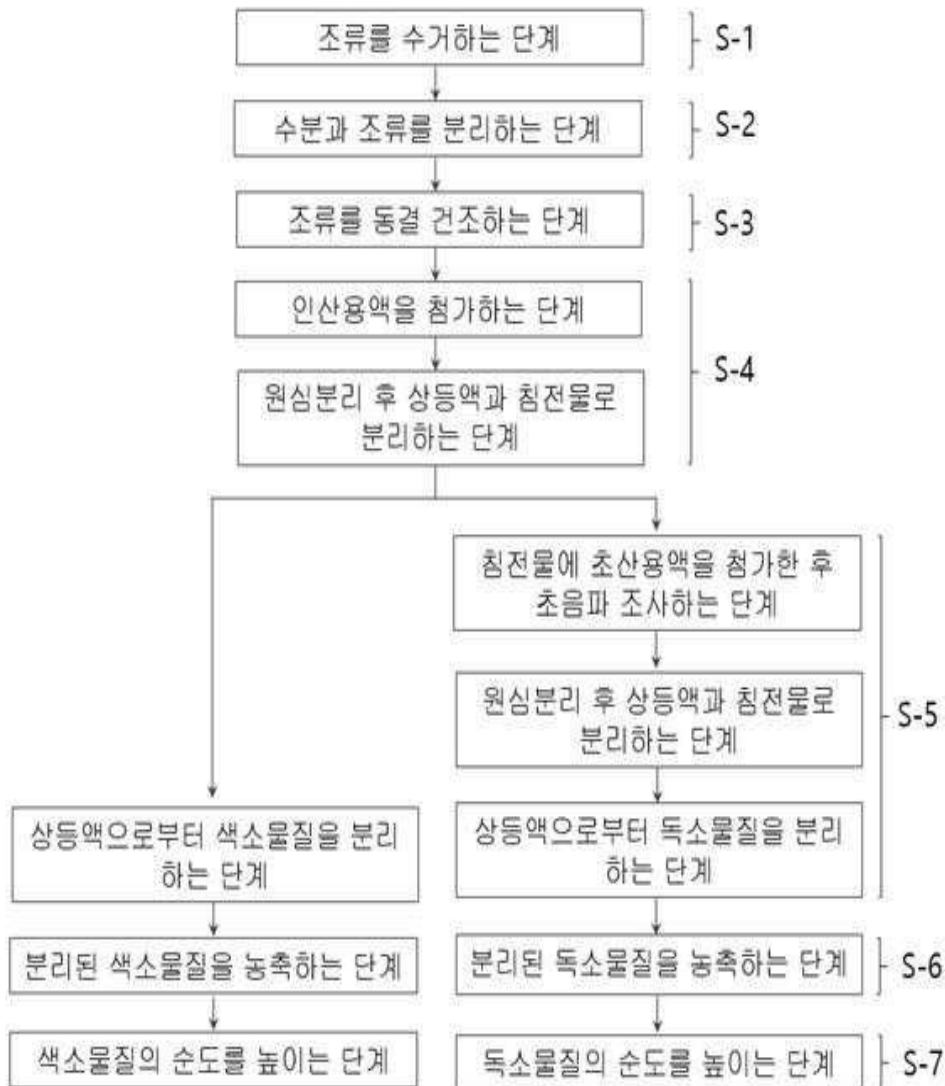
도면1



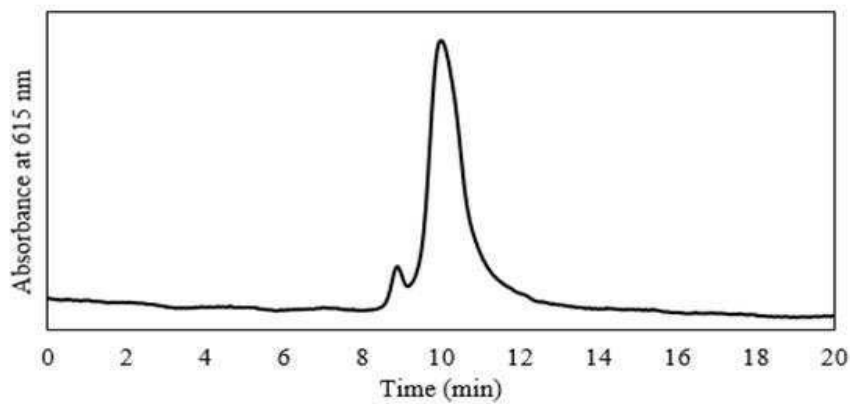
도면2



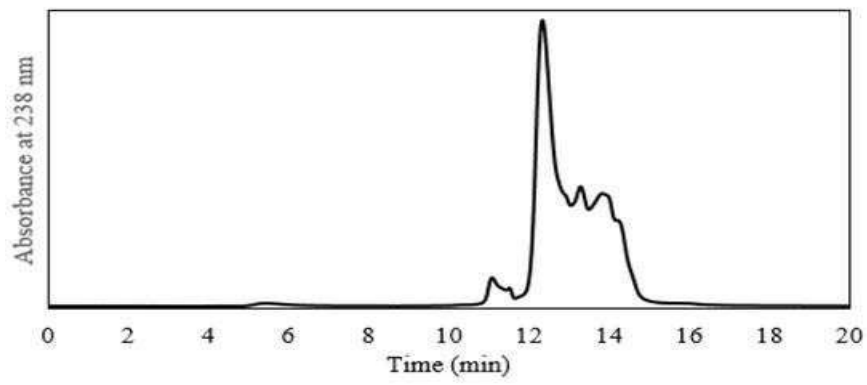
도면3



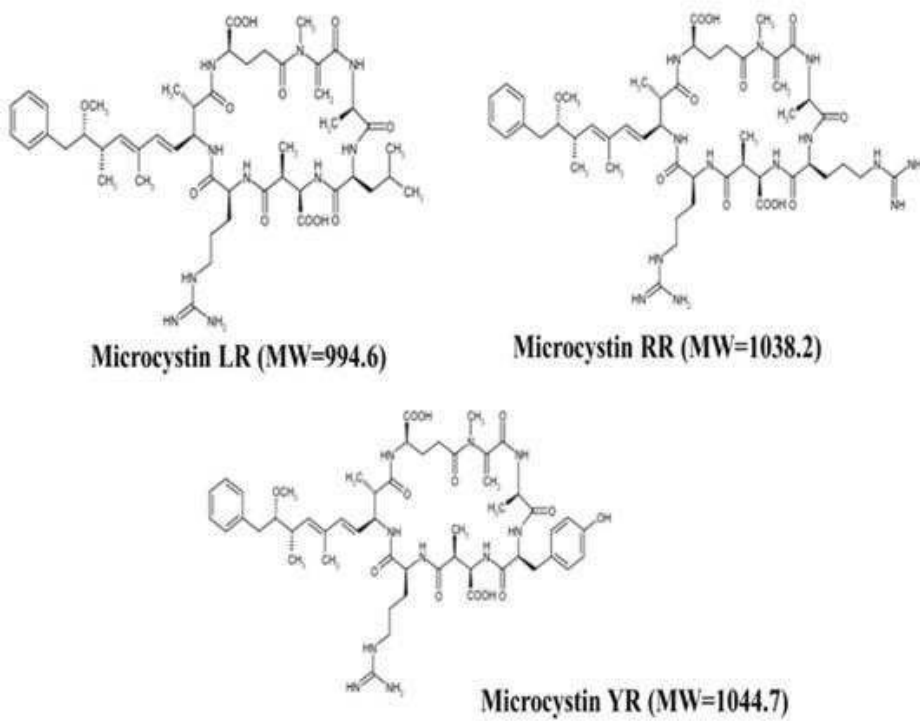
도면4



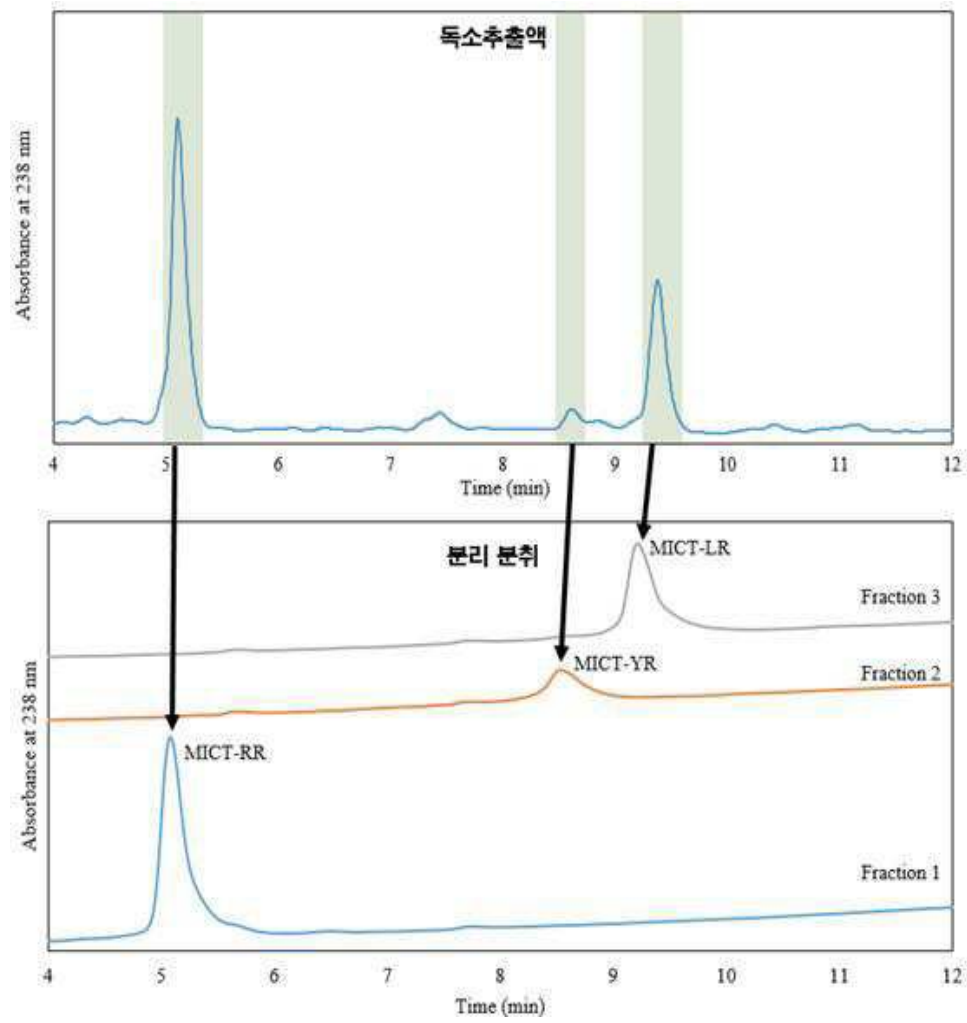
도면5



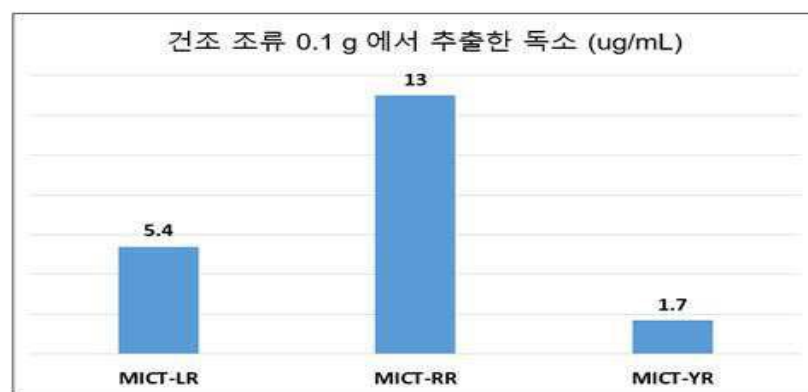
도면6



도면7



도면8



도면9

