



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085535
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12M 1/002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0178657
(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 2019년12월30일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
오석진
부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교대연캠퍼스 남기택
부산광역시 남구 용소로21번길 118, 203호(대연동, 대영원룸)
(74) 대리인
오위환, 나성곤, 정기택

전체 청구항 수 : 총 8 항

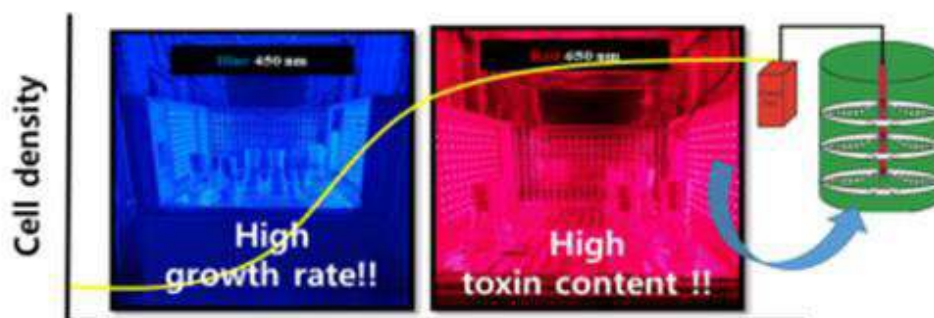
(54) 발명의 명칭 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유독 와편모조류를 대수생장 중기까지 성장시키고, 접종 후, 대수생장기 후기까지에 성장시키는 방법에 있어서, LED의 다양한 파장을 이용하여 유독 와편모조류의 성장속도 및 독함량을 조절함으로써, 경제적이고 친환경적으로 마비성 패독을 수득할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1

For efficient cultivation, toxic dinoflagellate should be incubated at different light color stages ⇒ Two - phase Culture



(52) CPC특허분류

C12N 2500/60 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

C12N 2529/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	19-3-70-73
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	국립환경과학원
연구사업명	환경현안기술개발
연구과제명	부산연안 마비성 폐독(PSP) 조절을 위한 친환경적 발광다이오드 적용 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 유독 와편모조류를 제 1 광원으로 조사하여 상기 유독 와편모조류의 세포수를 대수생장 중기까지 증가시키는 1차 배양 단계;
- b) 상기 유독 와편모조류를 최종 세포밀도가 $1.0 \times 10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ 이상이 되도록 배지에 접종시키는 접종 단계; 및
- c) 상기 배지에 접종된 유독 와편모조류를 제 2 광원으로 조사하여 대수생장 후기에 상기 유독 와편모조류의 패독 함량을 축적시키는 2차 배양 단계;
- 를 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 유독 와편모조류는 *Alexandrium catenella* 또는 *Alexandrium pacificum* 인 것을 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 1차 배양 단계에서의 유독 와편모조류는,

수온 15 내지 20 °C, 염분 25 내지 30 psu인 최초배지에 접종되어 제 1 광원으로 조사되는 것을 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제 1 광원은 450 내지 490 nm의 청색파장, 및

상기 제 2 광원은 635 내지 700 nm의 적색파장인 것을 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 제 1 광원은 150 내지 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량, 및

상기 제 2 광원은 50 내지 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량인 것을 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 배지는 수온 15 내지 20 ℃, 염분 25 내지 30 psu 인 것을 포함하는, 빛의 파장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따르는 방법에 의해 제조된 패독 함량이 증가된 유독 와편모조류.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따르는 방법을 이용하는 광배양기.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파장을 이용하여 유독 와편모조류의 마비성 패독량의 함량을 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 복수파장 또는 단일파장을 이용하여 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *Alexandrium pacificum*의 패독 함량을 조절하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 마비성 패독(Paralytic shellfish poisoning, PSP)은 환경요인에 따라 독함량 및 조성이 변화한다. 현재까지 알려진 PSP 함량에 변화를 주는 주요 환경인자로는 수온, 염분, 그리고 영양염 등이 있다.

[0004] PSP 중 saxitoxin, neo-saxitoxin 및 gonyautoxins는 근육의 나트륨 채널에 대한 특이적 차단제로서 작용한다. 이러한 생리학적 효과에 기인하여 이들 화합물은 미량으로 체내 투여하여 근육 경력 및 국소 긴장이상과 같은 근육 과다활동과 연관된 근육 활성 억제제로 사용되고 있다. 또한 이들 물질은 해양성 천연물성분으로 난치성 만성질환의 치료를 위한 새로운 의약품 개발의 후보물질이 될 수 있는 가능성도 있으며, 분자 모델링을 통한 유도체의 합성을 실시하여 새로운 약효물질의 도출도 가능하다는 보고도 있다.

[0005]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 친환경적이고 경제성이 우수한 발광다이오드(LED)의 파장을 이용하여 마비성 패독(PSP)의 원인종의 패독 함량을 조절하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 실시형태는 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법에 관한 것으로,

[0009] a) 유독 와편모조류를 제 1 광원으로 조사하여 상기 유독 와편모조류의 세포 수를 대수성장 중기까지 증가시키는 1차 배양 단계;

[0010] b) 상기 유독 와편모조류를 $1.0 \times 10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ 이상이 되도록 배지에 접종시키는 접종 단계; 및

- [0011] c) 상기 배지에 접종된 유독 와편모조류를 제 2 광원으로 조사하여 대수생장 후기에 상기 유독 와편모조류의 패독 함량을 축적시키는 2차 배양 단계;를 포함한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 유독 와편모조류는 *Alexandrium catenella* 또는 *Alexandrium pacificum* 인 것을 포함한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 1차 배양 단계에서의 유독 와편모조류는, 수온 15 내지 20 °C, 염분 25 내지 30 psu 인 최초배지에 접종되어 제 1 광원으로 조사되는 것을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 제 1 광원은 450 내지 490 nm의 청색파장, 및 제 2 광원은 635 내지 700 nm의 적색파장인 것을 포함한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 제 1 광원은 150 내지 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량, 및 제 2 광원은 50 내지 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량인 것을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 배지는 수온 15 내지 20 °C, 염분 25 내지 30 psu 인 것을 포함한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 본 발명에 의한 방법에 의해 제조된 패독 함량이 증가된 유독 와편모조류를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 본 발명에 의한 방법을 이용하는 광배양기를 포함한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 의한 과장을 이용하여 유독 와편모조류의 마비성 패독의 함량을 조절하는 방법은, LED가 갖는 모든 가시광선대의 과장을 구현, 장수명, 저소비전력, 빠른 반응시간, 열을 발산하지 않는 장점 등이 있어 경제적이고 친환경적인 효과가 있다.
- [0021] 본 발명에 의한 PSP의 함량 증가를 통해, 근육의 나트륨 채널에 대한 특이적 차단제로서 작용할 수 있는 saxitoxin, neo-saxitoxin 및 gonyautoxins 등을 보다 저비용으로 합성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 유독 와편모조류의 독 농도 및 독성을 증가시키기 위한 다단배양방법을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 과장에 따른 조도별 *A. catenella*의 생장곡선을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 각 과장에 따른 조도별 *A. pacificum*의 생장곡선을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 *A. catenella*의 PSP에 대한 HPLC 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 과장별 *A. catenella*의 단백질 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 과장에 따른 조도별 *A. catenella*의 독 함량(toxin content) 및 독성(toxicity)의 변화 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 과장에 따른 조도별 *A. pacificum*의 독 함량(toxin content) 및 독성(toxicity)의 변화 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들에 의한 빛의 과장을 이용한 유독 와편모조류의 마비성 패독 함량을 조절하는 방법 및 이를 이용한 유독 와편모조류에 대하여 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다. 첨부된 도면에 있어서, 구조물들의 치수는 본 발명의 명확성을 기하

기 위하여 실제보다 확대하거나, 개략적인 구성을 이해하기 위하여 실제보다 축소하여 도시한 것이다.

[0025] 또한, 제1 및 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제1 구성요소는 제2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성요소도 제1 구성요소로 명명될 수 있다. 한편, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0026] 이하, 본 발명을 도면을 참조하여 보다 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 친환경적이고 경제성이 우수한 발광다이오드(LED) 파장을 이용하여 마비성 패독(PSP)의 원인종의 독함량을 조절할 수 있는 방법에 관한 것이다. 파장을 통해 PSP 증감을 조절할 수 있다면, 대량배양에 응용하여 고품질 표준물질 및 해양천연신소재의 대량생산에 기여할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 파장을 이용하여 유독 와편모조류의 마비성 패독의 함량을 조절하는 방법은 LED 파장에 따른 마비성 패독 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *Alexandrium pacificum*의 독함량 변화를 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 일반적으로 LED는 식물의 광합성 및 성장에 필요한 파장역을 단일 또는 혼합하여 임의로 조절이 가능하며, 빛 조사시간 동안 분 단위 또는 초 단위의 간헐적인 광 제어가 가능하다. 이러한 장점을 바탕으로 LED는 육상 식물의 육성을 위한 인공광원으로 활발히 이용되고 있으며, 최근에는 미세조류의 배양 효율을 극대화시키기 위한 광원으로도 주목받고 있다.

[0031] 본 발명에 대해 이하 각 단계별로 설명한다.

[0032] 제 1단계 : 1차 배양 단계

[0033] 유독 와편모조류를 제 1 광원으로 조사하여 유독 와편모조류의 세포 수를 대수성장 중기까지 증가시킨다.

[0034] 상기 유독 와편모조류는 플랑크톤으로, 해양 독소를 생성하며 한국에서 대표적으로 발생하는 *Alexandrium catenella* 또는 *Alexandrium pacificum* 이 바람직하다.

[0035] 유독 와편모조류가 제 1 광원으로 조사되기 전에 최초배지에 접종될 수 있으며, 최초배지는 대수성장 중기까지 증가될 때 이용되는 것으로, 초기 세포수량의 확보, 빠른 성장속도를 유도하기에 적합한 조건 범위를 가질 수 있으며, 해수 또는 수온 15 내지 20 ℃, 염분 25 내지 30 psu 일 수 있다. 이때 수온은 *Alexandrium catenella* 및 *Alexandrium pacificum*의 빠른 수확을 위해서 최적생장이 보이는 수온영역에서 실험을 수행하는 것이 좋으며 15 내지 20 ℃ 가 바람직하다. 염분 또한 *Alexandrium catenella* 및 *Alexandrium pacificum*의 빠른 수확을 위해서 최적생장이 보이는 염분영역에서 실험을 수행하는 것이 좋으며 25 내지 30 psu 가 바람직하다. 수온 및 염분이 해당 범위를 벗어나는 경우 최적생장 범위를 벗어나 생장이 늦어지고, 수확이 느려지기 때문에 해당 범위가 적절하다.

[0036] 상기 제 1 광원은 반일 광주기 조건(12L:12D)의 백색 형광등, 청색파장, 녹색파장, 적색파장 등이 사용될 수 있으며, 독함량을 증가시키고자 하는 경우 초기 배양 단계에서 고밀도의 세포축적을 위해 청색파장이 바람직하다.

[0037] 또한, 제 1 광원은 $150 \text{ 내지 } 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량일 수 있다.

[0038] 대수성장기는 세포의 수가 대수적으로 증가해 나가는 시기로, 세포를 용기나 배지에 접종을 하는 경우 처음에는 세포가 조건에 적응하는 얼마간의 시간이 필요하며, 이어 세포는 대수성장기로 들어서 점점 증가하고, 배양액의 열화로 인해 세포의 생장이 정지하고 정상기로 들어간다. 대수성장기는 중간 시기 및 후반 시기로 중기, 후기로 나뉘 수 있으며, 대수성장기 후기 이후 정상기로 진행된다.

[0039] 일 실시예에 따른 도 2 파장 조도별 생장곡선을 통해서, 확연히 달라지는 그래프의 기울기를 기준으로 대수성장기 및 정상기를 확인할 수 있다. 도 2 우측 상단의 청색파장을 일 예로, 증가하고 있는 그래프를 통해 대수성장기, 그래프의 기울기가 꺾이는 시점이 정상기로 판단할 수 있고, 이에 따라 2일 내지 12일까지는 대수성장기 중

기, 12일 내지 14일이 대수증식기 후기, 14일 이후는 정상기이며, 대수생장기의 후기는 정상기로 접어들기 약 1~2일 전으로 해석되며, 대수생장기의 중기는 대수생장기 후기 이전의 시기를 의미한다.

제 2단계 : 접종 단계

유독 와편모조류를 최종 세포밀도가 1.0×10^2 cells ml⁻¹ 이상이 되도록 배지에 접종한다.

최종밀도가 1.0×10^2 cells ml⁻¹ 이하 일 경우 유도기가 증가하여, 전체적으로 세포수확을 위한 시간이 감소하게 된다. 가급적 1.0×10^2 cells ml⁻¹ 이상의 최종세포밀도가 되도록 접종하는 것이 좋다.

배지는 유독 와편모조류가 접종 및 패독 함량을 축적시킬 때 이용되는 것으로, 세포 내 독함유량 증가, 생화학적 축적을 유도하는 적합한 조건의 범위를 가질 수 있으며, 해수 또는 수온 15 내지 20 °C, 염분 25 내지 30 psu 일 수 있다.

제 3단계 : 2차 배양 단계

배지에 접종된 유독 와편모조류를 제 2 광원으로 조사하여 대수생장 후기에 상기 유독 와편모조류의 패독 함량을 축적시킨다.

상기 제 2 광원은 세포가 갖는 독을 조절하기 위해 사용되는 것으로, 모든 파장의 광원이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 복수파장의 형광램프, 단일파장의 청색 LED(400 내지 500 nm), 녹색 LED(500 내지 550nm), 적색 LED(630 내지 700nm)가 이용될 수 있고, 원하는 성장속도, 독함량 등을 위해 각각 개별적으로 이용되거나, 두 개 이상의 파장이 동시에 이용될 수 있다.

또한, 세포당 독농도를 증가시키려는 경우, 초기의 제 1 광원은 세포 수량의 확보 및 빠른 성장속도를 유도하기 위해 청색파장을 이용하고, 대수생장기 후기의 제 2 광원은 적색파장을 주사하는 다단배양방법을 통해 세포 내 독함유량을 증가시킬 수 있다. 다단배양방법은 배양 초기에는 성장최적의 환경조건, 이후 정상기에 도달하면 생장에 스트레스를 주는 환경조건으로 생화학적 축적을 유도할 수 있다.

본 발명에서는 LED 파장에 따른 마비성 패독 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella* 와 *Alexandrium pacificum* 의 독함량 변화를 파악하였다.

이하, 실시예를 통하여 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

LED 파장에 따른 마비성 패독 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella* 와 *Alexandrium pacificum* 성장 특이성 파악

파장에 따른 *Alexandrium catenella* KNU-YS-01과 *Alexandrium pacificum* LIMS-PS-2729의 성장특성을 파악하기 위해서 각각의 유독 와편모조류 수온 20°C 염분 30 psu, 광량 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp)에서 대수생장 중기까지 성장시켰으며, 배양 튜브(DH. TT10100, DAIHAN, Won-ju)에 5 mL 주입한 후 세포수가 약 100 cells mL⁻¹이 되도록 첨가하였다. 파장의 광원은 복수파장으로 형광램프(fluorescent lamp)를 이용하였으며, 단일파장은 청색 LED(450 nm), 녹색 LED(525 nm) 그리고 적색 LED(650 nm)를 이용하였다.

수온 20°C, 염분 30 psu, 광량 10, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (QSL-2100, Biospherical Instruments Inc., San Diego, CA. USA)조건에서 수행되었으며 접종 직후를 포함하여 이를 간격으로 동일한 시간에 in vivo chlorophyll 형광값을 측정하였고, 세포의 성장속도(growth rate; μ)는 대수생장기(exponential

growth)를 보였던 기간 동안의 형광값을 이용하여 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0}$$

[0058]

[0059] N_0 : 대수성장기에서 초기의 세포수(cells mL⁻¹)

[0060] N_t : 대수성장기에서 t시간 후의 세포수(cells mL⁻¹)

[0062] 파장 실험은 triplicate로 수행하였으며, 성장속도는 이들의 평균값으로 나타났다. 단, 오류로 판명된 값은 제외하여 계산하였다.

[0063] 성장속도와 광량의 관계를 Lederman and Tett (1981)의 모델을 개량한 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{I - I_0}{(K_s + I_0) + (I - I_0)}$$

[0064]

[0065] μ : 성장속도(specific growth rate; day⁻¹)

[0066] $\mu_{\max}$: 최대성장속도(maximum specific growth rate; day⁻¹)

[0067] I : 광량(irradiance; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

[0068] I_0 : 보상광량(compensation PFD; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

[0069] K_s : 반포화광량(half-saturation light intensity; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

[0071] *Alexandrium catenella*는 파장별 광량이 증가함에 따라 세포밀도가 증가하였으며, 일정광량 이상의 조건에서는 세포밀도가 일정하였다. 복수파장에서는 10 ~ 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 청색파장에서는 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 녹색파장에서는 10 ~ 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 그리고 적색파장에서는 10 ~ 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서의 세포밀도는 변화가 크지 않았다. 하지만, 각 파장별로 그 상위 조도에서는 시간에 따라 점차 증가하는 양상을 나타내었으며, 높은 조도일수록 대수성장기 후기 및 퇴조기에서 세포밀도는 가장 높았다.

[0072] *Alexandrium pacificum*도 *Alexandrium catenella*와 같이 파장별 광량이 증가함에 따라 세포밀도가 증가하였으며, 일정광량 이상의 조건에서는 세포밀도가 일정하였다. 복수파장과 청색에서는 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 녹색과 적색파장에서는 10 ~ 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 세포밀도의 변화가 크지 않았다. 하지만, 각 파장별로 그 상위 조도에서는 시간에 따라 점차 증가하는 양상을 나타내었으며, 높은 조도일수록 대수성장기 후기 및 퇴조기에서 세포밀도는 가장 높았다.

실시예 2

[0074] LED 파장에 따른 마비성 폐독 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella* 질소 이용성 파악

[0075] PSP의 전구물질로 알려진 arginine는 단백질 구성하는 아미노산의 일종이며, 이 물질을 측정하기 위해서는 아미노산 분석기를 이용하여야 하지만, 본 실시예에서는 단백질을 측정함으로써 간접적으로 PSP의 전구물질인 arginine의 농도를 추론하였다.

[0076] 과장의 광원은 복수과장으로 형광램프(fluorescent lamp)를 이용하였으며, 단일과장은 청색 LED(450 nm), 녹색 LED(525 nm) 그리고 적색 LED(650 nm)를 이용하였다. *Alexandrium catenella*를 전술한 과장에서 전 배양을 거친 후, 세포내 함유하고 있는 단백질을 분석하였다. 단백질은 Lowry et al. (1951)의 방법으로 분석하였다. Protein standard solution을 이용하여 표준용액을 조제하고, 혼합시약인 alkaline copper solution 5 ml를 첨가하여 균질하게 혼합하였다. 10분 방치 후 단백질을 추출한 뒤, folin ciocalteu로 1시간 30분간 방치하고 균질 혼합하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 후, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

[0078] *Alexandrium catenella*는 적색과장에서 가장 높은 농도를 보였고($1,108 \text{ pg cell}^{-1}$), 형광램프와 청색과장이 733 pg cell^{-1} 로 유사하였으며, 녹색과장에서 538 pg cell^{-1} 로 가장 낮게 나타났다. 이를 통해 생장이 Ks가 대체적으로 높았던 적색과장에서 가장 높은 단백질 함량을 보이는 것을 확인하였다. 또한 Ks가 낮아 생장에 친화성이 우수할 것으로 생각되는 청색과장과 기존에 미세조류를 배양에서 사용되는 형광램프보다 약 1.5배 높은 단백질 함량을 보였다.

실시예 3

[0080] 우리나라 대표 유독 와편모조류 *Alexandrium catenella*와 *Alexandrium pacificum*의 strain별 독 조성

[0081] 우리나라에서 대표적으로 유독 와편모조류인 *Alexandrium catenella*와 *Alexandrium pacificum*의 strain별 독 조성의 형태를 알아보기 위해서, 각각의 종별(*Alexandrium catenella*: KNU-BS-01, KNU-YS-01, *Alexandrium pacificum*: LIMS-PS-2729, LIMS-PS-2607)로 각각 2개 종주를 확보하여 배양한 후, 대수생장기 후기에서 독조성을 분석하였다.

[0083] *Alexandrium catenella*의 독조성을 보면, 주요성분은 N-sulfocarbamoyl 독성으로 C1+2, GTX 5, 그리고 carbamoyl 독성으로 GTX1+4와 neoSTX이며, 미량성분은 carbamoyl 독성인 GTX2+3이었다. strain별로는 주요성분 및 미량성분의 차이는 크지 않았으며, 함량도 차이가 크지 않았다. 함량으로 보면 C1+2가 60%이상을 차지하였으며, 비교적 강독으로 보이는 neoSTX도 약 10%정도를 나타내었다.

[0084] *Alexandrium pacificum*의 경우, 주요성분은 N-sulfocarbamoyl 독성으로 C1+2, GTX 5+6 그리고 carbamoyl 독성으로 GTX1+4이며, 미량성분은 *Alexandrium catenella*와 같이 carbamoyl 독성인 GTX2+3이었다. *Alexandrium catenella*와 다르게 strain별로 주요성분 및 미량성분의 차이가 크게 나타났다. LIMS-PS-2607의 경우, GTX1+4, GTX2+3이 검출되지 않은 반면, LIMS-PS-2729는 두 carbamoyl 독성이 검출되었다. *Alexandrium catenella*와 같이 두 strain 모두 C1+2가 60%이상의 함량을 보였지만, 강독으로 고려되는 neoSTX는 낮은 함량을 나타내었다(약 1%; 표 1).

표 1

[0085]

	Alexandrium catenella		Alexandrium pacificum	
	KNU-BS-01	KNU-YS-01	LIMS-PS-2607	LIMS-PS-2729
C1+2	70.4	61.5	85.7	56.3
GTX1+4	6.06	9.97	0.00	19.00
GTX2+3	0.18	0.17	0.05	0.11
GTX5+6	14.8	18.1	13.0	24.6
dcGTX2+3	0.00	0.00	0.00	0.04
neoSTX	8.56	10.3	1.23	0.00

실시예 4

[0087] **과장에 따른 마비성 패독 원인 플라크톤의 독함량 조절**

[0088] 과장에 따른 *Alexandrium catenella* KNU-YS-01과 *Alexandrium pacificum* LIMS-PS-2729의 독농도 및 독성 변화를 파악하기 위해서 수온 20℃ 염분 30 psu의 최초배지에, 광량 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp)에서 대수생장 중기까지 성장시킨 후, 200 ml 배양플라스크에 부산 청사포에서 채수한 해수를 바탕으로 한 f/2배지 100 ml에 최종 세포밀도가 약 $2.0 \times 10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ 이 되도록 접종하였다. 과장의 광원은 복수과장으로 형광램프(fluorescent lamp)를 이용하였으며, 단일과장은 청색 LED(450 nm), 녹색 LED(525 nm) 그리고 적색 LED(650 nm)를 이용하였다. 수온 20℃, 염분 30 psu, 광량 50, 100과 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp) 조건에서 수행되었으며 대수생장 후기의 세포를 수확하여 독을 분석하였다.

[0089] PSP의 분석은 역상계 컬럼(Hypersil GOLD C8 column; 250 mm×4.6 mm; Thermo Scientific, Massachusetts)으로 각 성분을 분리한 후, periodic acid로 산화시켜 형광 유도체를 만든 다음 형광검출기로 분석하는 post-column 법(Oshima, 1995)을 이용하였으며, 분석에 사용된 표준독소는 National Research Council Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada)로 분석된 시료의 독농도는 표준독소와의 상대 면적비로부터 계산하였다. 또한 독농도(fmole cell⁻¹)를 독성(STXeq)을 전환시키기 위해서 Oshima가 제안한 toxicity equivalent factors(TEFs)를 활용하여 계산하였다.

[0090] PSP을 분석하기 위한 시료의 전처리는 대수생장기 후기의 *Alexandrium catenella* 와 *Alexandrium pacificum*을 반복 계수한 후, 배지 성분 제거를 위하여 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 후 0.5 N acetic acid를 첨가하고, -20 ℃에 24시간 냉동보관 후 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄한 후, 원심 분리하여 상등액을 분취하였다. 분취한 상등액을 한외여과기(Ultrafree-MC; M. W., 10,000, Millipore, Massachusetts)에 넣어 한외여과 후, 얻어진 여과 시료를 마비성 패독 분석 전까지 -20 ℃에 보관하였다.

[0091] PSP의 분석은 역상계 컬럼(Hypersil GOLD C8 column; 250 mm×4.6 mm; Thermo Scientific, Massachusetts)으로 각 성분을 분리한 후, periodic acid로 산화시켜 형광 유도체를 만든 다음 형광검출기로 분석하는 post-column 법(Oshima, 1995)을 이용하였으며, 분석에 사용된 표준독소는 National Research Council Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada)로 분석된 시료의 독농도는 표준독소와의 상대 면적비로부터 계산하였다. 또한 독농도(fmole cell⁻¹)를 독성(STXeq)을 전환시키기 위해서 Oshima가 제안한 toxicity equivalent factors (TEFs)를 활용하여 계산하였다.

표 2

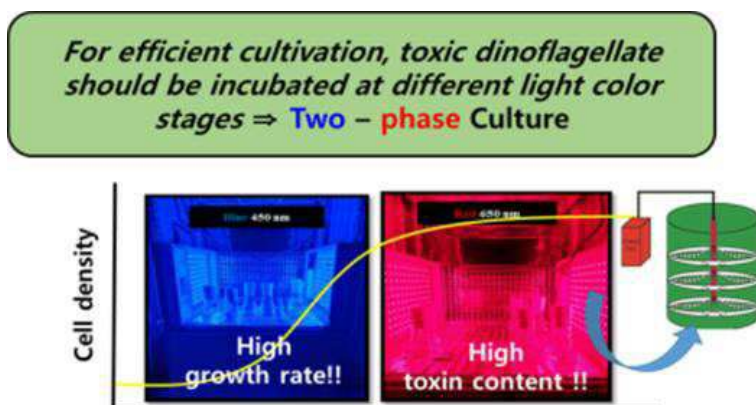
[0093]

Toxin	Toxicity equivalent factors (TEFs)
C1	0.01
C2	0.1
C3	0.02
C4	0.1
dcGTX2	0.2
dcGTX3	0.4
dcGTX1	0.5
dcGTX4	0.5
GTX2	0.4
GTX3	0.6
GTX1	1
GTX4	0.7
GTX5	0.1
GTX6	0.1
dcNEO	0.4
STX	1
Neo-STX	1

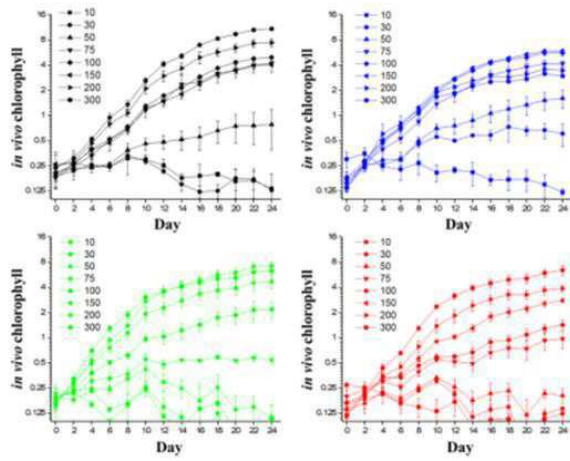
- [0095] 상기 실시예 들을 통해 *Alexandrium catenella* 와 *Alexandrium pacificum*의 독함량 변화를 확인하였다.
- [0096] LED 파장에 따른 조도별 *Alexandrium catenella*의 독농도(toxin content)의 경우, 형광램프, 청색파장 그리고 녹색파장에서 낮은 조도($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 높은 농도를 보였으며, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상에서는 농도가 낮아지는 경향을 나타내었다. 적색파장에서는 다른 파장과 다르게 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 보다는 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 높게 나타났다(360 fmol cell⁻¹), $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 다소 감소하였다. 같은 조도에서 적색파장이 다른 파장보다 독농도는 높게 나타났으며, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 그 차이가 뚜렷하였고, 크기는 8배(형광램프 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 높은 농도를 보였다.
- [0097] Saxitoxin으로 환산한 독성(toxicity) 평가에서도 형광램프, 청색파장 그리고 녹색파장의 경우, 독농도와 그 분포경향이 크게 다르지 않았으며, 같은 파장역의 경우 낮은 광량에서 독성이 높았으며, 조도가 높아질수록 독성은 낮아지는 경향을 보였다. 적색파장에서는 독농도와 같이 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 다른 조도보다 가장 높은 독성을 보였다. 파장별 비교에서도 적색파장이 다른 파장대보다 같은 조도일 때 대체적으로 높은 독성을 나타내었다($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 48 STX eq).
- [0099] *Alexandrium pacificum*의 독함량의 경우, *Alexandrium catenella*와 다르게 형광램프, 청색파장 그리고 녹색파장의 낮은 조도($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 낮은 함량을 보였으며, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 다른 조도보다 높았다. 적색파장도 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 보다 100과 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 높게 나타났다. 같은 조도에서는 녹색파장과 적색파장이 다른 파장보다 독농도는 높게 나타났으며, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 약 3.4배 적색파장에서 높게 나타났다.
- [0100] Saxitoxin으로 환산한 독성(toxicity) 평가에서도 형광램프, 청색파장, 녹색파장 그리고 적색파장의 경우, 독농도와 그 분포경향이 크게 다르지 않았으며, 같은 파장역의 경우 낮은 광량에서 독성이 낮았으며, 조도가 높아질수록 독성은 높아지는 경향을 보였다. 적색파장에서는 독농도와 같이 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 과 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 다른 파장의 동 조도보다 높은 독성을 보였다(약 140 STXeq).
- [0102] 상기에서는 본 발명에 따른 실시예를 기준으로 본 발명의 구성과 특징을 설명하였으나 본 발명은 이에 한정하지 않으며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 다양하게 변경 또는 변형할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 명백한 것이며, 따라서 이와 같은 변경 또는 변형은 첨부된 특허청구범위에 속함을 밝혀둔다.

도면

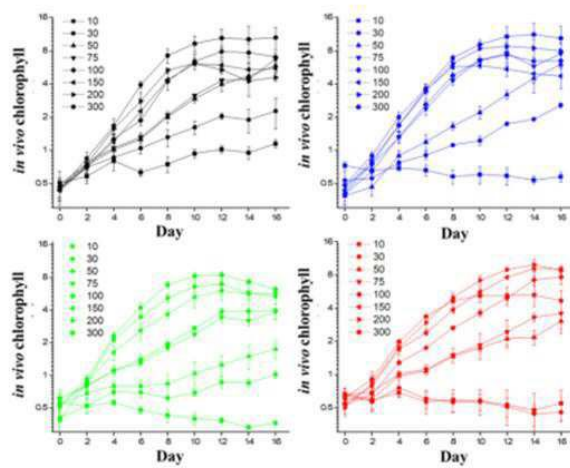
도면1



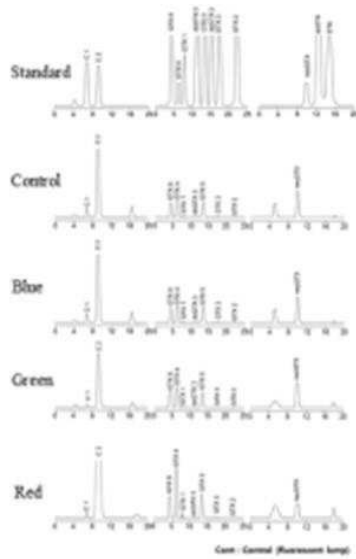
도면2



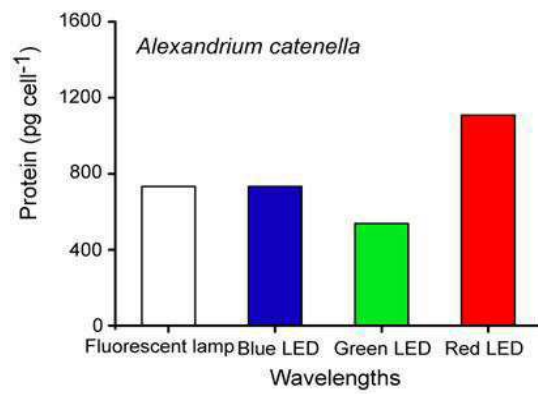
도면3



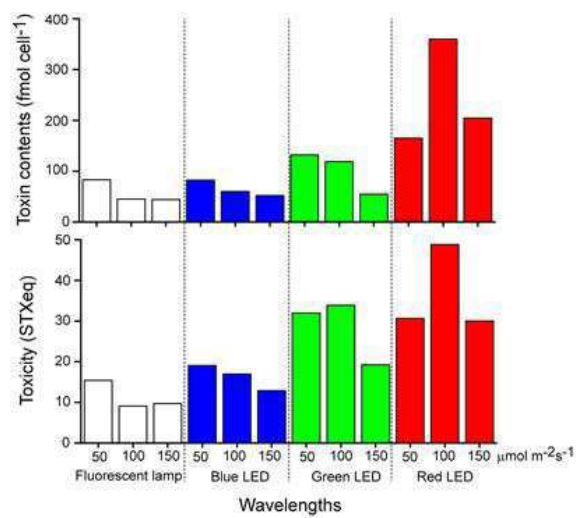
도면4



도면5



도면6



도면7

