(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0115845
(43) 공개일자 2021년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 8/35 (2006.01) *A61K 8/99* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0032201
(22) 출원일자 2020년03월16일
심사청구일자 2020년03월16일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이승엽
서울특별시 서초구 방배중앙로21길 55, 303동 1203호
김태윤
경기도 성남시 분당구 야탑로 245번길 11, 102동 304호 (목련마을 대원빌라)
이상효
경기도 성남시 중원구 원터로 18번길 19, 102동 809호
(74) 대리인
김현진

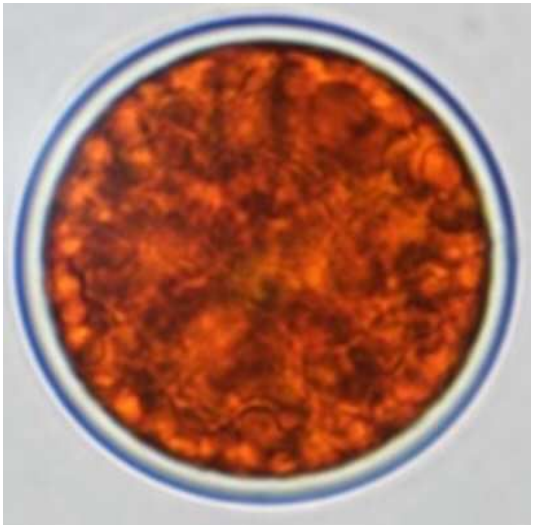
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 헤마토코쿠스 종 S o g a n g 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 헤마토코쿠스 종에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 아스타잔틴 생산능 및 방사성 핵종 제거능을 가진 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)에 대한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 8/35 (2013.01)
A61K 8/99 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C12R 2001/89 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019002790006
부처명 환경부
과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원
연구사업명 자연환경기술개발사업
연구과제명 딱총새우의 버블 충격파를 모사한 녹조 제거용 나노버블 충격파 발생 장치 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.04.17 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20161520101210
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지자원융합원천기술개발사업
연구과제명 미세조류를 활용한 방사성 오염수 처리 상용화 기술 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.06.02 ~ 2019.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018M2B2A9065873
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 원자력연구기반확충사업
연구과제명 친환경 천연 섬유-제올라이트 막을 이용한 방사성 물질 흡착 및 감용 기술
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아스타잔틴 생산능을 갖는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P).

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 6의 rbc L 유전자 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P).

청구항 3

제1항에 있어서,

방사성 핵종 흡착능을 가지는 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 방사성 핵종은 세슘 또는 코발트인 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P).

청구항 5

제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방사성 핵종 제거용 조성물.

청구항 6

제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)으로부터 추출된 아스타잔틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)으로부터 추출된 아스타잔틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 헤마토코쿠스 종에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 아스타잔틴 생산능 및 방사성 핵종 제거능을 가진 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세조류에서 다양한 생리활성물질(유용성분)이 발견되어 이를 자원으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 일 예로 하기 특허문헌에 기재된 것처럼, 미세조류의 한 종류인 헤마토코쿠스 종에서 축적되는 아스타잔틴은 면역증진, 항암 및 시력보호 등의 기능을 가져, 화장품, 식품, 의약 분야에서 이용되고 있다.

[0003] <특허문헌>

[0004] 특허공개공보 제10-2016-0008921호(2016 01 25 공개) "세포 재분화를 이용하여 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법"

[0005] 하지만, 산업적 스케일에서, 헤마토코쿠스 종의 배양은 주로 자연 환경 배양 조건을 그대로 이용하는데, 기존의 헤마토코쿠스 종은 대부분 외국에서 발견된 것으로, 배양 시 우리나라의 자연 환경 조건에 완벽하게 적응하지

못하는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,

[0007] 본 발명은 향상된 아스타잔틴 생산능을 가진 신규한 헤마토코쿠스 종을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 방사성 핵종 제거능을 가진 신규 헤마토코쿠스 종을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)은 아스타잔틴 생산능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)은 서열번호 6의 rbc L 유전자 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)은 방사성 핵종 흡착능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)에 있어서 상기 방사성 핵종은 세슘 또는 코발트인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 방사성 핵종 제거용 조성물은 제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)으로부터 추출된 아스타잔틴을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 식품 조성물은 제1항의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)으로부터 추출된 아스타잔틴을 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)은 아스타잔틴 생산능 및 방사성 핵종 제거능을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 한국의 서강대학교 아담샬관 옥상에서 수집한 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P) 샘플을 나타내는 도면.

도 2는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 배양 시간별로 세포수를 측정한 그래프.

도 3은 Green Cell 상태의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 광학 현미경 이미지.

도 4는 Induction 상태의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 광학 현미경 이미지.

도 5는 Stationary 상태의 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 광학 현미경 이미지.

도 6은 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 계통발생적 위치를 보여주는 18S rRNA 유전자 트리.

도 7은 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 계통발생적 위치를 보여주는 rbc L 유전자 트리.

도 8 및 9는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)의 방사성 핵종 제거율을 나타내는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하에서는 본 발명에 따른 신규한 헤마토코쿠스 종 Sogang 및 이의 용도를 첨부된 도면을 참조하여 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서는 향상된 아스타잔틴 생산능과 방사성 핵종 제거능을 가지는 미세조류를 개발하기 위하여, 서강대학교 아담샬관 옥상(37° 33′ 00.6″ N, 126° 56′ 30.2″ E)에서 채취한 샘플에서 미세조류를 분리하였다.

[0024] 본 발명에 따른 미세조류를 배양 시기별로 광학 현미경을 이용하여 형태학적 분석을 한 결과, 헤마토코쿠스 종의 가장 일반적인 특징인 bi-flagella motile cell들이 생장 단계와 무관하게 관찰되어 상기 미세조류가 헤마토코쿠스 종에 속함을 확인하였다. 또한, 상기 미세조류에 대해 18S rRNA 유전자 및 rbc L 유전자의 분석을 통해 유전적 계통을 확인한 결과, 18S ribosomal RNA 유전자 분석에서 상기 미세조류는 현재까지 전세계적으로 보고된 헤마토코쿠스들과 99.55 내지 99.94%의 일치율을 보이고, rbc L 유전자 분석에서 상기 미세조류는 다른 헤마토코쿠스 종들과 3-9%의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 18S rRNA 유전자의 특성상 유전정보가 같은 종 간에 높은 서열 일치율을 보이고, rbc L 유전자는 신규 종일 경우 기존에 보고된 다른 헤마토코쿠스와 서열에 차이가 있게 되는데, 위의 결과를 통해 상기 미세조류가 헤마토코쿠스의 신규한 종임을 알 수 있다. 따라서, 분리된 미세조류를 헤마토코쿠스 종 Sogang(*Hematococus* sp. Sogang)으로 명명하고, KCTC에 수탁번호 KCTC18802P로 기탁하였다.

[0026] 따라서, 본 발명의 일 실시예는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)에 대한 것으로, 상기 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)은 향상된 아스타잔틴 생산능 및 방사성 핵종 제거능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명의 다른 실시예는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)을 포함하는 방사성 핵종 제거용 조성물에 대한 것이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 실시예에는 헤마토코쿠스 에스피 Sogang(KCTC18802P)으로부터 추출된 아스타잔틴을 포함하는 식품 또는/및 화장료 조성물에 대한 것이다.

[0032] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] <실시예 1> 균주의 분리 및 배양

[0035] 1. 균주의 분리

[0036] 서강대학교 아담샬관 옥상(37° 33′ 00.6″ N, 126° 56′ 30.2″ E)에서 샘플을 수집하고(도 1 참조), 현미경 하에서 적색 형성 미세조류의 단일 균주를 분리하고, 이를 Sogang이라 명명하였다. 상기 Sogang은 영하 15℃의 자연 환경에도 생존하고 있었으며, 이후 실험실 환경(20-28℃ 조건)에서 원할한 성장을 보였다.

[0037] 2. 분리된 균주의 배양

[0038] (1) 상기 Sogang을 3N-BBM 배지를 이용하여 상온에서 50 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 강도의 형광등 조건에서 14시간의 광주기와 10시간의 암주기로 13일 동안 배양하였다(Green cell 상태). 상기 배양시 일정 날짜 간격으로 세포수를 측정하여, 도 2에 나타내었는데, 이를 보면 13일 동안 원활한 성장이 이루어짐을 확인할 수 있다.

[0039] (2) 이후, 배지를 제거하고 세척한 후, 질소원이 제거되고 $NaHCO_3$ 30ppm이 추가된 배지에 접종하여, 상온에서 100 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 강도의 Red LED Lights 조건에서 60시간 배양하였다(Induction 상태).

[0040] (3) 이후, 상온에서 15 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 강도의 Blue LED Lights 조건에서 10일 동안 배양하였다(Stationary 상태).

[0042] <실시예 2> 분리된 균주의 형태학적 분석

[0043] 1. 실시예 1의 2의 배양 상태별로, Sogang을 광확 현미경으로 촬영하여, 그 결과를 도 3 내지 5에 나타내었다. 도 3은 Green Cell 상태의 Sogang을 나타내며, 도 4는 Induction 상태의 Sogang을 나타내고, 도 5는 Stationary 상태의 Sogang을 나타낸다.

[0044] 2. 헤마토코쿠스 속 미세조류의 생애주기는 크게 세포 분열을 통해 성장하는 단계(Green cell 상태), 세포 분열을 멈추고 세포 성장이 일어나는 단계(Induction 상태), 세포 내부에 색소가 축적되고 세포벽이 두꺼워지고 단계(Stationary 상태)를 포함하는데, 도 3 내지 5를 보면, 세포는 20-60um 범위의 사이즈를 가지며, Green Cell 상태에 있는 세포들의 경우 모두 녹색을 나타내었고 핵과 엽록체를 비롯한 다수의 세포 소기관들을 관찰할 수 있고, 해마토코쿠스의 가장 일반적인 특징인 bi-flagella motile cell들을 생장 단계와는 상관 없이 관찰 할 수 있었다. 또한, 배지 내 질소원을 제한한 환경에서 강한 빛으로 스트레스를 주기 시작했을 때 대부분의 세포는 갈색을 나타내며 항산화 물질인 아스타잔틴(Astaxanthin)을 축적하기 시작했으며 수일 이내에 완전한 붉은색을 나타남과 동시에 1um 이상의 두꺼운 세포벽을 가진 세포 형태로 변화되는 것을 확인하였다.

[0046] <실시예 3> 분리된 균주의 유전적 계통의 분석

[0047] 1. 실시예 1의 1에서 분리된 균주(Sogang)의 유전적 계통 분석은 게놈 DNA로부터 증폭된 18S rRNA 유전자와 rbc L 유전자의 서열을 기존에 알려진 다양한 미세조류들과 비교하는 방법으로 진행하였다. 먼저, PCR의 template가 될 게놈 DNA를 DNeasy Blood & Tissue kit(QIAGEN)을 이용하여 추출하였다.

[0048] 2. 18S rRNA 유전자 DNA 증폭은, Forward primer[5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'(서열번호:1)] 및 Reverse primer[5'-GCAGGTTCACCTACGGARACC-3'(서열번호:2)]를 이용하여 PCR을 통해 수행되었다(Initial denaturation 95℃ for 3min, 30cycle of 94℃ for 30sec, 51℃ for 30sec, 72℃ for 2min, final extension at 72℃ for 10min). 이후, 아가로스 젤에서 DNA 단편을 추출하고 클로닝 후, 18S rRNA 유전자 DNA에 대한 서열을 분석하고, 그 결과를 하기에 나타내었다.

[0049] <18S rRNA 유전자 DNA 서열(서열번호:3)>

[0050] TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACGGTGAAACTGCGAATGGCTCATT
AAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACTTTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTATATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTAT
TAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCTATGGCGAATCATGATAACTTCACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCC
TATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACA
TCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATCAATGTCTGGTAATTGGAATGAG
AACAATTTAAATCCCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT
AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCCAGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGCTGTGGCCTACCTTTCTGCCGGGGACGTGTTCCTGGGCTTCATT
GTCCGGGACTCGAATTCGGCGAGGATACTTTGAGTAAAACAGCGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATGCATTAGCATGGAATATCACGATAGGACTCT
GGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAG
ACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAA
CGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTTTATTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCT
GAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACACGGGAAGGAT
TGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACC
TCAGCCTGCTAAATAGTCAAGCGTACCTTGGTACGCGCCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGACGTTTAGTCAGTGGAAGTGTGAGGCTATAACAGGTCTGTG
ATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAGCGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGAT
GGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC
CGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGACTTCAGCGGTGGGCAACCTCTGCTGTCGTTGAGAAGATCATTAAACCCTCCCACCTA
GAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCAATCGAATTCCCG

[0051] 3. rbc L 유전자 DNA의 증폭은, Forward primer[5'-GCNGGTGTWAAAGAYTAYGG-3'(서열번호:4)] 및 Reverse primer[5'-TACCACCWGAAGCWACHGGCA-3'(서열번호:5)]를 이용하여 PCR을 통해 수행되었다(Initial denaturation 95℃ for 3min, 30cycle of 94℃ for 30sec, 52℃ for 30sec, 72℃ for 1min, final extension at 72℃ for 10min). 증폭 이후, 이후, 아가로스 젤에서 DNA 단편을 추출하고 클로닝 후, rbc L 유전자 DNA에 대한 서열을 분석하고, 그 결과를 하기에 나타내었다.

[0052] <rbc L 유전자 DNA 서열(서열번호:6)>

[0053] CGTTTAACGTATTACACACCAGATTACGTTGTTAGAGATACTGATATTTTAGCAGCGTTCCGTATGACACCACAACCAGGTGTACCACCAGAAGAATGTGGT
GCAGCAGTAGCAGCTGAATCATCAACAGGTACTTGGACAACAGTATGGACAGATGGTTTAACAAGTTTAGACCGTTACAAAGGTAGATGCTACGACATCGAG
CCAGTACCAGGCGAGGAAAACCAATACATCGCTTACGTAGCTTACCCTATCGATTTATTTGAAGAAGGTTCGGTAACTAACATGTTTACTTCAATTGTAGGA
AACGTATTTGGGTTTAAAGCATTACGTGCATTACGTTTAGAAGATTTACGTATTCCACCAGCACATGTAAAAACATTCTCAGGACCTCCACACGGTATTCAA
GTTGAACGTGACAAAATTAACAAATACGGCCGTGGTTTATTAGGCTGTACTATCAAGCCGAAATTAGGACTTTCAGCAAAAAATTATGGACGTGCCGTATAC
GAATGTTTACGCGGTGGTCTCGACTTTACACAAGACGACGAGAACGTAACTTCACAGCCTTTTATGCGCTGGAGAGACCGTTTCTTATTCGTAGCTGAAGCT
ATTTACAAAGCACAATCAGAAACAGGCGAAGTTAAGGGCCATTATTTAGACGCAACTGCTGGTACAGCAGAAGAAATGCTTACACGTGCACAATGTGCTAAG
GAGTTGGGTGTGCCGATCATCATGCATGACTACCTTACAGGGGGGTTTACATCACATACTTCATTAGCACATTTCTGTCGTGATAATGGCTTATTATTACAC
ATGCACCGTGCTATGCATGCTGTAATCGACCGCCACACAGACCATGGTATTCATTTCCGTGTATTACCGAACGCTTTACGTATGTCAGGTGGTGACCACTTA
CACTCTGGAACAGCTGTAAGTAAATTAGAATGTGAACGTGAAGTAACATTAGGTTTCGTAGAATCATGCGAGATGATTACATTGAACAAGATCGTAACCGTG
GTATTTACGTTAGCA

[0054] 4. 균리된 균주가 헤마토코쿠스의 신규한 종임을 확인

[0055] (1) 18S ribosomal RNA 유전자 분석

[0056] 1) 실시예 3의 2에서 얻은 Sogang의 18S ribosomal RNA 유전자의 DNA 서열(서열번호 3)을 토대로, 미국 생물학 정보 센터(NCBI)의 BLAST search tool을 이용하여 분석한 결과, 수치적으로는 현재까지 전세계적으로 보고된 헤마토코쿠스들과 99.55 내지 99.94%의 일치율을 보이고, 계통적으로는 도 6과 같이 표시됨을 확인하였다.

[0057] 2) 18S rRNA 유전자의 특성상 유전정보가 같은 종 간에 높은 서열 일치율을 보이는데, 상기 BLAST search tool의 결과를 보면, 상기 Sogang은 다른 헤마토코쿠스 종들과 18S ribosomal RNA 유전자의 서열에 대하여 높은 일치율을 보임을 확인할 수 있어, 상기 Sogang이 헤마토코쿠스 종임을 알 수 있다.

[0058] (2) rbc L 분석

[0059] 1) 실시예 3의 3에서 얻은 Sogang의 rbc L 유전자의 서열(서열번호 6)을 토대로, 미국 생물학 정보 센터(NCBI)의 BLAST search tool을 이용하여 분석한 결과, 수치적으로는 현재까지 전세계적으로 보고된 헤마토코쿠스들과 91 내지 97%의 일치율을 보이고, 계통적으로는 도 7과 같이 표시됨을 확인하였다.

[0060] 2) rbc L 유전자는 신규 종일 경우, 기존에 보고된 다른 헤마토코쿠스의 rbc L 유전자와 서열에 차이가 있을 확률이 높은데, 상기 Sogang은 다른 헤마토코쿠스 종들과 rbc L의 서열에 대하여 3-9%의 차이가 있음을 확인할 수 있어, 상기 Sogang이 헤마토코쿠스의 신규한 종임을 알 수 있다. 따라서, 분리 균주를 헤마토코쿠스 종 Sogang(*Hematococus* sp. Sogang)로 명명하고, 2020년 1월 3자로 KCTC에 기탁하였다(KCTC18802P).

[0062] <실시예 4> 세포 내 아스타잔틴의 측정

[0063] (1) 실시예 1의 2의 최종 배양액을 4000rpm, 10min 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하고 펠릿에 5%(v/v) 수산화칼륨(KOH)과 30%(v/v) 메탄올(Methanol)을 처리하여 65℃의 수조에서 15min 동안 반응시켜, 비누화반응(saponification)을 통하여 엽록소를 제거하였다. 이후, 상층액을 제거하고 탈염수로 세척하고, 잔류하는 펠릿은 5ml DMSO(99.5%)를 가지고 10분 동안 초음파 처리를 통해 추출하였다. 세포의 debris가 완전히 백색을 보일 때까지 상기의 마지막 과정을 반복하고, 이때 추출된 상층액을 490, 680nm에서 흡광도를 측정하여, 아스타잔틴의 농도(C)를 계산하고(C(mg/L)=4.5×OD490×Va/Vb, Va는 추출용매의 용량, Vb는 배양 샘플의 용량을 의미함), '강창덕 et al.,2006'의 방법에 따라 dry cell weight 값(dry cell weight(g/L)=0.668×OD680)을 구하고 이를 통해 건조 중량 1g 당 아스타잔틴 함유량을 계산하였다.

[0064] (2) 상기 과정을 통한 측정 결과, 추출 시 mL당 세포수는 평균 531,250개였으며, 평균 80mg/L의 농도로 함유되어 있고, 건조 중량 1g 당 약 6.3%의 아스타잔틴이 포함되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 기존 헤마토코쿠

스 상업 균주들의 평균 3% 함량을 뛰어넘는 값으로, 신규한 헤마토코구스 종 Sogang이 많은 양의 아스타잔틴을 생성할 수 있음을 알 수 있다.

[0066] <실시예 5> 방사성 핵종의 제거 효율 평가

[0067] 1. 실시예 1의 1에서 분리된 상기 Sogang을 배지에 접종하고, 백색 발광다이오드 조건에서 12시간의 광주기와 12시간의 암주기로 세포가 비운동성을 가지는 시기까지 배양하고, 이후 빛의 강도를 300 $\mu molm^{-2}s^{-1}$로 바꾸어 총 10일간 배양하고, 배양된 Sogang을 이온이 최소화된 버퍼용액(3mM $NaHCO_3$ 용액)으로 3번 이상 세척하고 영양염류를 제거한 버퍼용액(3mM $NaHCO_3$ 용액)에 보관하고, 보관된 Sogang을 분주하여 헤마토사이토미터를 이용하여 세포수를 측정한 후 Sogang을 희석하여 시료 1을 준비하였다.

[0068] 2. C. vulgaris(KMMCC-9(UTEX-26))를 배지에 접종하고, 백색 발광다이오드 조건에서 16시간의 광주기와 8시간의 암주기로 10일 동안 배양하고, 배양된 Sogang 대신배양된 C. Vulgaris를 사용한 것을 제외하고는 세척, 보관, 측정 및 희석 조건을 실시예 5의 1과 동일하게 하여 시료 2를 준비하였다.

[0069] 3. V. Crystalliferum(NIES-2860)를 배지에 접종하고, 100 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 빛의 강도로 10일 동안 배양하고, 배양된 Sogang 대신 배양된 V. Crystalliferum을 사용한 것을 제외하고는 세척, 보관, 측정 및 희석 조건을 실시예 5의 1과 동일하게 하여 시료 3을 준비하였다.

[0070] 4. 방사성 핵종(1.5Bq/ml 방사성 세슘(Cesium-137))의 주입이 완료된 원심튜브에 주사기를 이용하여 시료 1(4.14×10^5cells/ml 농도)을 주입하여 반응용액을 형성하였다. 이후, 원심튜브를 인큐베이터에 넣고 25℃, 150rpm, 24시간 광조건의 항온상태를 유지시켰다. 이후, 일정 시간 간격으로 원심튜브에서 반응용액을 채취하여, MCA(Multi channel analyzer)를 이용한 γ-선 분석을 통해 미세조류 흡착율을 측정하여 도 8에 표기하였다.

[0071] 5. 방사성 세슘 대신에 Cobalt-60을 사용하고, 시료 1 대신에 시료 1(2.67×10^6cells/ml), 시료 2(2.67×10^6cells/ml), 시료 3(6.43×10^5cells/ml) 각각을 사용하여 실험한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 5의 4와 동일하게 실험하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0072] 6. 도 8을 보면, 시간이 지난수록 방사성 핵종(Cs-137)의 제거율이 증가함을 알 수 있고, 24시간 지난 후 80% 이상의 방사성 핵종이 제거됨을 확인할 수 있어, 상기 Sogang은 방사성 핵종에 대하여 강한 생존력뿐 아니라 우수한 방사성 핵종 제거 능력을 가짐을 알 수 있다. 또한, 도 9를 보면, Cobalt-60에 대해서도 제거능이 뛰어남을 알 수 있고, 방사성 핵종 Cobalt-60에 대하여 상기 Sogang은 다른 미세조류에 비하여 높은 제거능을 보임을 알 수 있다.

[0074] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0075]

기탁기관명 : 학국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18802P

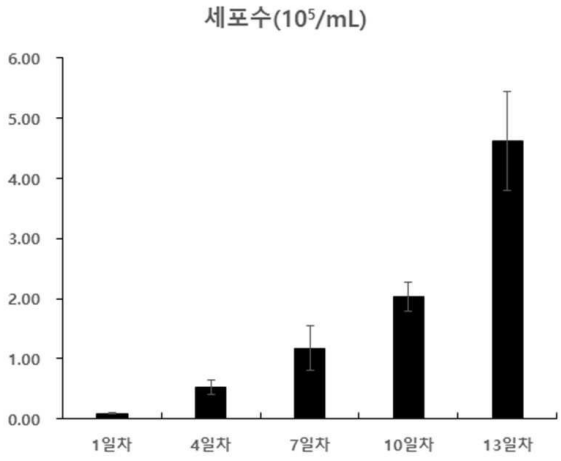
수탁일자 : 20200103

도면

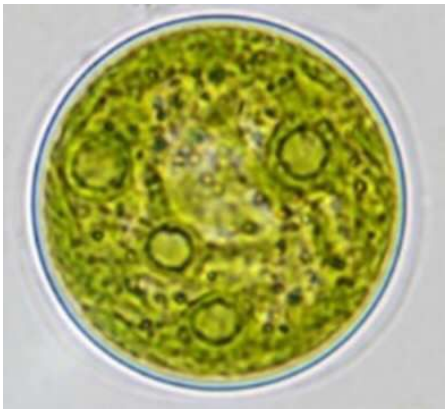
도면1



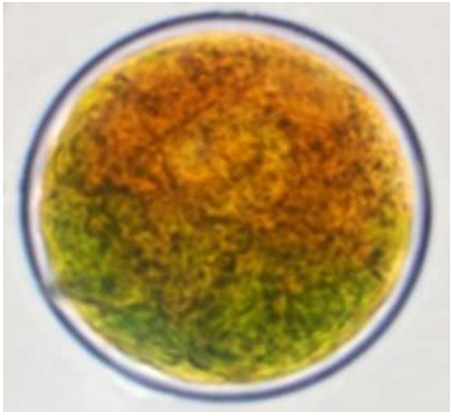
도면2



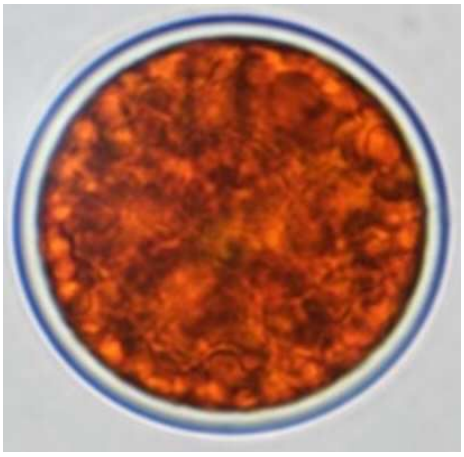
도면3



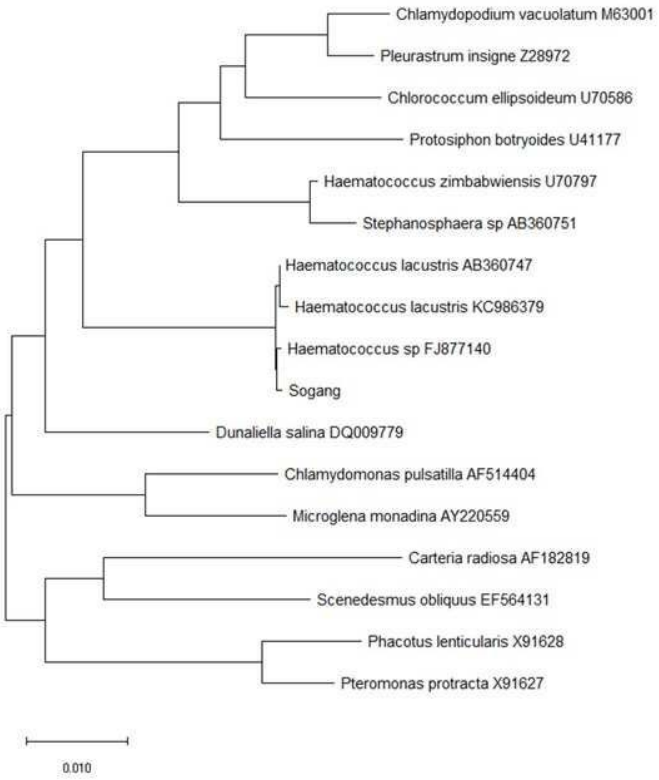
도면4



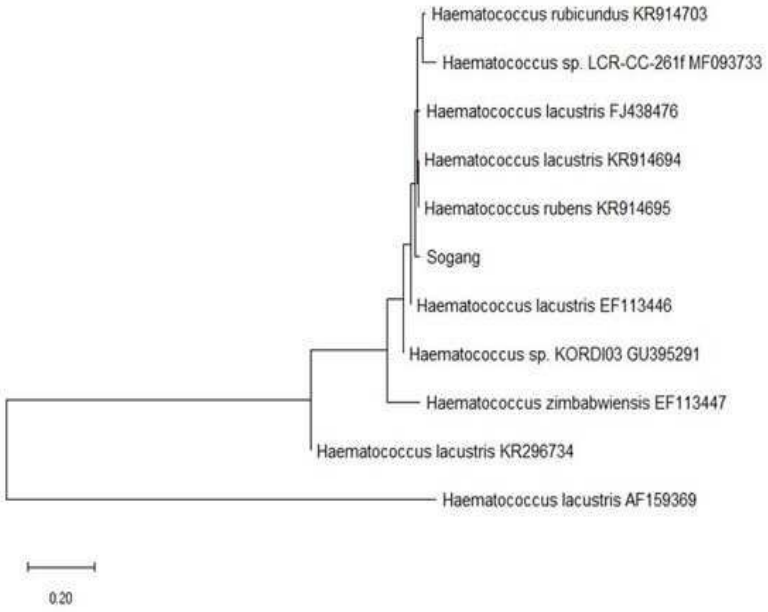
도면5



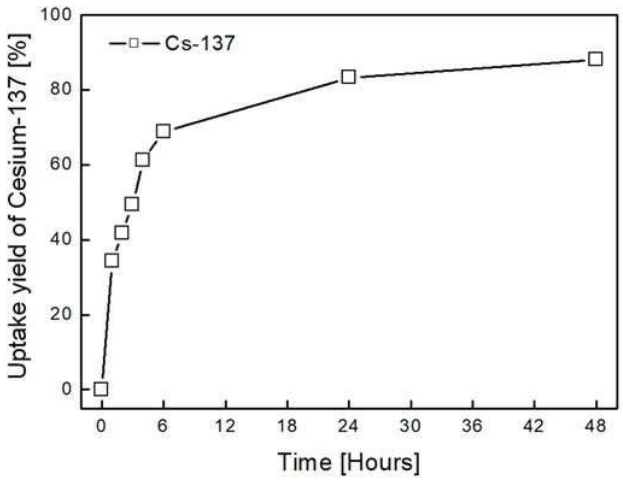
도면6


Chlamydopodium vacuolatum M63001
Pleurastrum insigne Z28972
Chlorococcum ellipsoideum U70586
Protosiphon botryoides U41177
Haematococcus zimbabwiensis U70797
Stephanosphaera sp AB360751
Haematococcus lacustris AB360747
Haematococcus lacustris KC986379
Haematococcus sp FJ877140
Sogang
Dunaliella salina DQ009779
Chlamydomonas pulsatilla AF514404
Microglena monadina AY220559
Carteria radiosa AF182819
Scenedesmus obliquus EF564131
Phacotus lenticularis X91628
Pteromonas protracta X91627
0.010

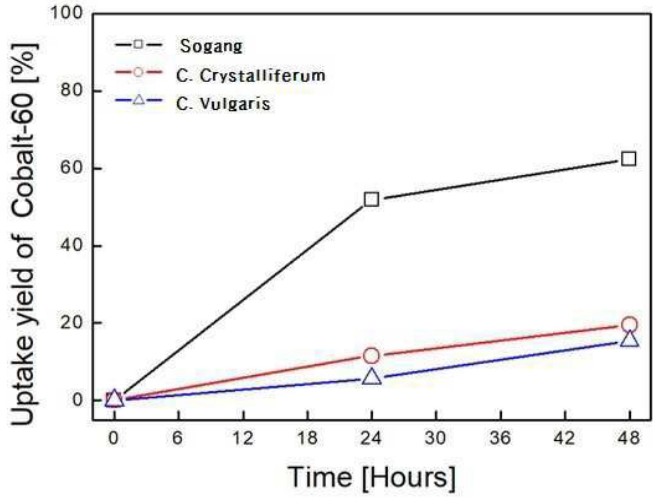
도면7


Haematococcus rubicundus KR914703
Haematococcus sp. LCR-CC-261f MF093733
Haematococcus lacustris FJ438476
Haematococcus lacustris KR914694
Haematococcus rubens KR914695
Sogang
Haematococcus lacustris EF113446
Haematococcus sp. KORDI03 GU395291
Haematococcus zimbabwiensis EF113447
Haematococcus lacustris KR296734
Haematococcus lacustris AF159369
0.20

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Novel Hematococus sp. Sogang and Use thereof

<130> PDAHJ-19221

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for 18S rRNA gene pcr

<400> 1

tacctggttg atcctgccag 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for 18S rRNA gene pcr

<400

> 2

gcaggttcac ctacggarac c 21

<210> 3

<211> 1790

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18s rRNA gene sequence of hematocus sp. Sogang

<400> 3

tacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct 60

aagtataaac tgcttatacg gtgaaactgc gaatggctca ttaaatcagt tatagtttat 120

ttgatggtac tttactcgga taaccgtagt aattctagag ctaatacgtg cgtatatccc 180

gacttctgga agggacgtat ttattagata aaaggccagc cgggcttgcc cgacctatgg 240

cgaatcatga taacttcacg aatcgcacgg ccttgcgccg gcgatgtttc attcaaattt 300

ctgccctatc aactttcgat ggtaggatag aggcctacca tggtggtaac gggtgacgga 360

ggattagggt tcgattccgg agagggagcc tgagaaacgg ctaccacatc caaggaaggc 420

agcaggcgcg caaattaccc aatcccgaca cggggaggta gtgacaataa ataacaatac 480

cgggcatcaa tgtctggtaa ttggaatgag aacaatttaa atcccttaac gagtatccat 540

tggagggcaa gtctggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatatttaa 600

gttgttgcag ttaaaaagct cgtagttgga tttcgggtgg gttccagcgg tctgcctctg 660

gtatgtactg ctgtggccta cctttctgcc ggggacgtgt tcctgggctt cattgtccgg 720

gactcgaatt cggcgaggat actttgagta aaacagcgtg ttcaaagcaa gcctacgctc 780

tgaatgcatt agcatggaat atcacgatag gactctggcc tatcttgttg gtctgtagga 840

ccggagtaat gattaagagg gacagtcggg ggcattcgta tttcattgtc agaggtgaaa 900

ttcttggatt tatgaaagac gaacttctgc gaaagcattt gccaaggatg ttttcattaa 960

tcaagaacga aagttggggg ctcgaagacg attagatacc gtcgtagtct caaccataaa 1020

cgatgccgac tagggattgg caggtgtttt attgatgacc ctgccagcac cttatgagaa 1080

atcaaagttt ttgggttccg gggggagtat ggtcgcaagg ctgaaactta aaggaattga 1140

cggaagggca ccaccaggcg tggagcctgc ggcttaattt gactcaacac gggaaaactt 1200

accaggtcca gacacgggaa ggattgacag attgagagct ctttcttgat tctgtgggtg 1260

gtggtgcatg gccgttctta gttggtgggt tgccttgtca ggttgattcc ggtaacgaac 1320

gagacctcag cctgctaaat agtcaagcgt accttggtac gcgcctgact tcttagaggg 1380

actattgacg tttagtcagt ggaagtgtga ggctataaca ggtctgtgat gcccttagat 1440

gttctgggcc gcacgcgcgc tacactgatg cattcagcga gcctatcctt ggccgagagg 1500

tccgggtaat ctttgaaact gcatcgtgat ggggatagat tattgcaatt attagtcttc 1560

aacgaggaat gcctagtaag cgcgagtcat cagctcgcgt tgattacgtc cctgcccttt 1620

gtacacaccg cccgtcgctc ctaccgattg ggtgtgctgg tgaagtgttc ggattgactt 1680

cagcggtggg caacctctgc tgtcgttgag aagatcatta aaccctccca cctagaggaa 1740

ggagaagtcg taacaaggtc tccgtaggtg aacctgcaat cgaattcccg 1790

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for rbc L gene pcr

<400> 4

gcnggtgtwa aagaytaygg 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for rbc L gene pcr

<400> 5

taccaccwga agcwachggc a 21

<210> 6

<211> 1035

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rbc L gene sequence of hematocus sp. Sogang

<400> 6

cgtttaacgt attacacacc agattacgtt gttagagata ctgatatttt agcagcgttc 60

cgtatgacac cacaaccagg tgtaccacca gaagaatgtg gtgcagcagt agcagctgaa 120

tcatcaacag gtacttggac aacagtatgg acagatggtt taacaagttt agaccgttac 180

aaaggtagat gctacgacat cgagccagta ccaggcgagg aaaaccaata catcgcttac 240

gtagcttacc ctatcgattt atttgaagaa ggttcggtaa ctaacatgtt tacttcaatt 300

gtaggaaacg tatttgggtt taaagcatta cgtgcattac gtttagaaga tttacgtatt 360

ccaccagcac atgtaaaaac attctcagga cctccacacg gtattcaagt tgaacgtgac 420

aaaattaaca aatacggccg tggtttatta ggctgtacta tcaagccgaa attaggactt 480

tcagcaaaaa attatggacg tgccgtatac gaatgtttac gcggtggtct cgactttaca 540

caagacgacg agaacgtaac ttcacagcct tttatgcgct ggagagaccg tttcttattc 600

gtagctgaag ctatttacaa agcacaatca gaaacaggcg aagttaaggg ccattattta 660

gacgcaactg ctggtacagc agaagaaatg cttacacgtg cacaatgtgc taaggagttg 720

ggtgtgccga tcatcatgca tgactacctt acagggggggt ttacatcaca tacttcatta 780

gcacatttct gtcgtgataa tggcttatta ttacacatgc accgtgctat gcatgctgta 840

atcgaccgcc acacagacca tggtattcat ttccgtgtat taccgaacgc tttacgtatg 900

tcaggtggtg accacttaca ctctggaaca gctgtaagta aattagaatg tgaacgtgaa 960

gtaacattag gtttcgtaga atcatgcgag atgattacat tgaacaagat cgtaaccgtg 1020

gtatttacgt tagca 1035