



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0031237
(43) 공개일자 2024년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/02 (2017.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) C07D 209/70 (2006.01)
C07D 209/94 (2006.01) C09B 61/00 (2006.01)
C09B 67/44 (2006.01) C09B 67/48 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/02 (2013.01)
A61K 8/492 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7044891
(22) 출원일자(국제) 2022년05월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/PL2022/050034
(87) 국제공개번호 WO 2022/250557
국제공개일자 2022년12월01일
(30) 우선권주장
P.437991 2021년05월28일 폴란드(PL)

(71) 출원인
유베라 에스.에이.
폴란드, 90-151 우쯔, 3.18, 2, 무신스키에고
(72) 발명자
키치악 아담
폴란드, 00-788 바르샤바, 비비엑 19
안데르 막달레나
폴란드, 02-717 바르샤바, 치허 포록 9/1
(74) 대리인
특허법인한얼

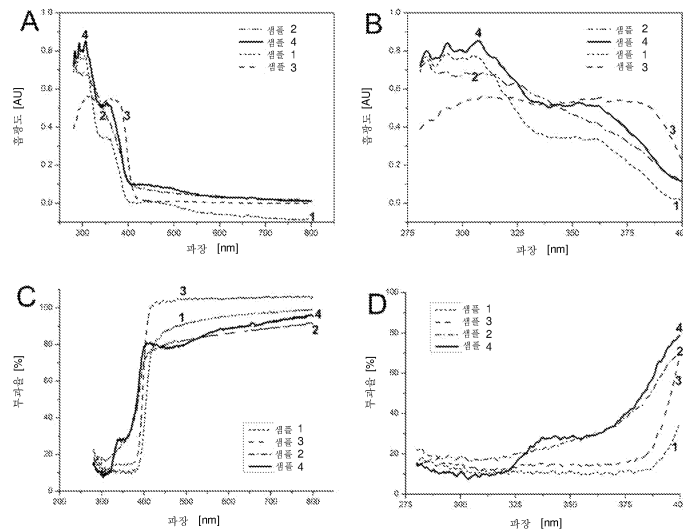
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 균주의 단리 및 배양 방법, 상기 균주, 이의 용도, 이의 배양용 배지 및 스시토네민 형태

(57) 요약

본 발명의 목적은 균주의 단리 및 배양 방법, 상기 균주, 이의 용도, 이의 배양용 배지 및 스시토네민 형태이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/004 (2013.01)

C07D 209/70 (2013.01)

C07D 209/94 (2013.01)

C09B 61/00 (2013.01)

C09B 67/0025 (2013.01)

C09B 67/0083 (2013.01)

C12N 1/205 (2021.05)

C12R 2001/01 (2021.05)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 배지 수용액 1000 mL당 하기 조성: 1.5 g NaNO_3 , 0.04 g K_2HPO_4 , 0.075 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6.0 mg 시트르산, 6.0 mg 시트르산철암모늄, 1 mg EDTA, 0.02 g Na_2CO_3 , A5 블렌드(blend) 수용액 1000 mL당 하기 조성: 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.222 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49.4 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 를 갖는 미량 금속의 A5 블렌드 1 mL를 갖는 배지 수용액 1000 mL당 200 g의 양으로 질량 백분율로 하기 함량: 97.6% 석영, 0.4% 백운모-흑운모 1.2% 인회석 및 0.8% 다른 미량 미네랄(mineral)을 포함하는 누비아 형성(Nubian formation)으로부터 유래하는 천연 사암(sandstone)에서 발견되는 미량영양소 및 다량영양소를 강화시킨 후, 이어서, 생성된 현탁액을 25℃에서 24시간 동안 교반하고, 이어서, 25℃에서 5시간 동안 침강시키고, 이를 여과함으로써 성장 배지를 제조하는 단계;

b) 환경으로부터 박테리아를 수집하는 단계;

c) 단계 b)에서 수집된 생물학적 물질을 단계 a)에서 수득된 액체 배지, 즉, 스톤(stone)이 강화된 표 1에 따른 액체 배지 중에서 계대집중(passaging)하는 단계로서, 여기서 추가 아가(agar)의 극단 함량(end content)은 처음에 2중량% 내지 마지막에 0.5중량%이고, 바람직하게는, 5개 단계, 즉, 2개의 극단 단계(초기, 최종) 및 3개의 중간 단계 각각 4주씩 3개의 중간 단계에서, 여기서 중간 단계에서 성장 배지는 추가 아가를 하기 정량: 단계 a)에서 수득된 배지 대비 각각 1.75중량%, 1.5중량%, 1중량%로 함유하는 것인 단계;

d) 최종 단계 c)로부터의 배양액, 즉, 0.5% 아가를 함유하는 배양액을, 조성이 단계 A에 개시된 바와 같지만, 단, 스톤은 첨가되지 않은 것인 배지 수용액에 용해시키고, 교반하면서 25℃에서 2주 동안 인큐베이션(incubation)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 특히, 번호 BEA_IDA_0068B 또는 BEA_IDA_0075B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행(Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC)에 기탁된 시아노박테리아(*Cyanobacteria*) 균주의 단리 및 배양 방법.

청구항 2

번호 BEA_IDA_0068B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 신규한 박테리아 균주.

청구항 3

번호 BEA_IDA_0075B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 신규한 박테리아 균주.

청구항 4

UV 흡수 특성을 갖는 안료(pigment), 특히, 스시토네민(scytonemin) 또는 이의 유도체의 제조를 위한, 제2항 또는 제3항에서 정의된 바와 같은 균주의 용도.

청구항 5

제4항에 있어서, 화장품 제품(sunscreen product), 특히, 선스크린(sunscreen)의 제조를 위한, 생성된 안료, 특히, 스시토네민 또는 이의 유도체의 적용을 포함하는 용도.

청구항 6

배지 수용액 1000 mL당 연마석 200 g의 양으로 질량 백분율로 하기 함량: 97.6% 석영, 0.4% 백운모-흑운모 1.2% 인회석 및 0.8% 다른 미량 미네랄을 포함하는 천연 누비아 사암을 함유하는 것을 특징으로 하는, 배지 수용액 1000 mL 중 1.5 g NaNO_3 , 0.04 g K_2HPO_4 , 0.075 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6.0 mg 시트르산, 6.0 mg 시트르산철암모늄, 1 mg EDTA, 0.02 g Na_2CO_3 , A5 블렌드 수용액 1000 mL당 하기 조성: 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.222 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49.4 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

를 갖는 미량 금속의 A5 블렌드 1 mL를 함유하는 시아노박테리아(Cyanobacteria)를 배양하기 위한 배지.

청구항 7

하기:

- 2.500° , 4.589° , 5.062° , 8.630° 및 9.197° 의 2 세타 각 값(2 theta angle value)에서 특징적인 피크(characteristic peak)를 갖는 X선 분말 회절 스펙트럼인 특성,
- IR 스펙트럼 (KBr)에서 3345, 3065, 2961, 2926, 1713, 1591, 1516, 1449, 1296, 1175, 1145, 957, 932, 930, 833 [cm^{-1}]의 특정 적외선 흡수 대역인 특성,
- 열중량 측정/시차 열 분석 (가열/냉각 속도: $15/20^{\circ}\text{C}/\text{min}$)에서 피크는 약 380.3°C 인, 365°C 내지 380.3°C 범위의 분해 온도인 특성,
- δ 8.98 ppm; 7.99 ppm; 7.86 ppm; 7.75 ppm; 7.48 ppm; 7.33 ppm; 7.22 ppm의 피리딘- d_5 함유 신호에서 기록된 ^1H NMR 스펙트럼인 특성,
- 표 4 내지 7에 열거되고, 도 8a 내지 d에 제시된 기하학적 파라미터에 의해 기술된 구조 X선 분석 (XRD)에 기초한 구조 모델인 특성,
- 393 nm에서의 DMSO 중 비흡광(specific extinction) 1%: 730 및 305 nm에서의 DMSO 중 비흡광 1%: 330인 특성으로부터 선택되는 적어도 하나의 특성을 갖는 스시토네민 결정.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 목적은 균주의 단리 및 배양 방법, 상기 균주, 이의 용도, 이의 배양용 배지 및 스시토네민(scytonemin) 형태이다. 본 발명은 생명공학 및 화장품 산업에 적용가능하다.

배경 기술

[0002] 세포내 용해 미세 환경 (예를 들어, 스톤(stone) 공극)으로부터 생물학적 물질을 직접 배양 배지 (BG11)로 수집하거나 (문헌 [Singh et al., 2014]), 또는 (문헌 [Wolk, 1998]에 따라) 모노클로날 시아노박테리움(Cyanobacterium)의 선별을 위해 2% 아가(agar) 및 BG11 성장 배지를 포함하는 플레이트 상에 단리된 생물학적 물질을 배치한 후, 이어서, 콜로니를 직접 BG11 액체 배지로 옮기는 것을 포함하는 표준 단리 및 배양 방법이 공지되어 있다 (문헌 [Rippka et al., 1979]; [Anahas and Muralitharan, 2015]; [Singh et al., 2014]). 생물학적 물질을 BG11 액체 배지로 직접 수집하는 것은 모노클로날 박테리아 균주의 추가 정제 및 단리가 필요하기 때문에, 많은 경우에는 적용되지 않을 수 있다. 극도로 건조한 환경에서 수집된 시아노박테리아(Cyanobacteria) 콜로니는 극도로 느리게 증식하거나, 또는 전혀 증식하지 못하기 때문에, (문헌 [Wolk, 1998]에 따라) 아가 및 BG11을 포함하는 플레이트 상에서의 아나하스(Anahas) 및 무랄리타란(Muralitharan) (2015)에 의해 보고된 배양 및 정제 방법은 예상한 결과를 달성하지 못한다. 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 실험실 조건에서 배양하는 것이 불가능하거나, 적어도 달성하기 어려운 환경으로부터 단리된 다양한 시아노박테리아 균주가 용이하게 증식할 수 있도록 하는 배양 방법을 제공하는 것이 바람직하다. 결과적으로 이 방법을 적용하면 고유의 유리한 특성을 보이는, 특히, 안료(pigment) 생산성이 높고, 천연 자외선 (UV) 방사선 필터이기도 한 신규의 시아노박테리아 균주를 단리시킬 수 있을 것으로 예상된다. 본 발명은 예상외로 상기 언급된 문제를 해결하였다.

발명의 내용

[0003] 본 발명의 제1 목적은

[0004] a) 배지 수용액 1000 mL당 하기 조성: 1.5 g NaNO_3 , 0.04 g K_2HPO_4 , 0.075 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6.0 mg 시트르산, 6.0 mg 시트르산철암모늄, 1 mg EDTA, 0.02 g Na_2CO_3 , A5 블렌드(blend) 수용액 1000 mL당 하기 조성: 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.222 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49.4 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 를 갖는 미량 금속의 A5 블렌드 1 mL를 갖는 배지 수용액 1000 mL당 200 g의 양으로 질량 백분율로 하기 함량: 97.6% 석영, 0.4% 백운모-흑운모, 1.2% 인회석 및 0.8% 다른 미량 미네랄(mineral)을 포함하는 누비아(Nubian) 형성으로부터 유래하는 천연 사암(sandstone)에서 발견되는 미량영양소 및 다량영양소를 강화시킨 후, 이어서, 생성된 현탁액을 25℃에서 24시간 동안 교반하고, 이어서, 25℃에서 5시간 동안 침강시키고, 이를 여과하여 성장 배지를 제조하는 단계로서; 본 출원인이 순수한 상 BG11 배지 또는 아가 무함유 BG11 배지 또는 BG11 배지 또는 문헌 [Rippka et al. (1979)]에 따른 배지 또는 표 1의 조성을 갖는 배지 또는 조성이 단계 a)에 개시된 바와 같지만, 단, 스톤은 첨가되지 않은 배지를 사용하는 경우에는 언제든지, 이는 하기 표 1에 열거된 조성물을 갖는 배지인 것을 의미하는 것인 단계:

표 1

성분 번호	화학명	수용액인 배지 1000 mL당 성분 정량
1	NaNO_3	1.5 g
2	K_2HPO_4	0.04 g
3	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.075 g
4	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.036 g
5	시트르산	6.0 mg
6	시트르산철암모늄	6.0 mg
7	EDTA	1 mg
8	Na_2CO_3	0.02 g
9	A5 블렌드 수용액 1000 mL당 하기 조성: 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g MnCl_2 $\times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.222 g $\text{ZnSO}_4 \times$ $7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times$ $2\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g $\text{CuSO}_4 \times$ $5\text{H}_2\text{O}$, 49.4 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times$ $6\text{H}_2\text{O}$ 를 갖는 미량 금속의 A5 블렌드	1 mL

[0005]

[0006]

b) 환경으로부터 박테리아를 수집하는 단계;

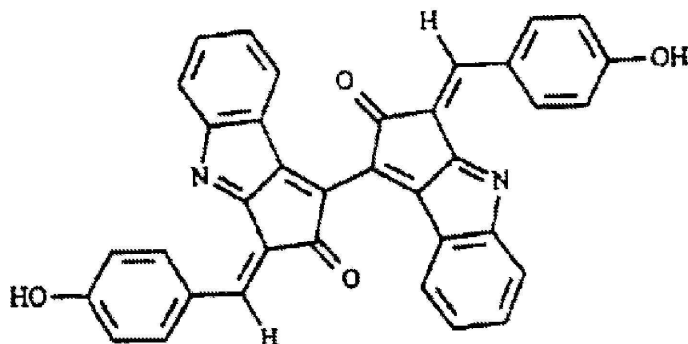
[0007]

c) 단계 b)에서 수집된 생물학적 물질을 단계 a)에서 수득된 액체 배지, 즉, 스톤이 강화된 표 1에 따른 액체 배지 중에서 계대접종(passaging)하는 단계로서, 여기서 추가 아가의 극단 함량(end content)은 처음에 2중량% 내지 마지막에 0.5중량%이고, 바람직하게는, 5개 단계, 즉, 2개의 극단 단계 (초기, 최종) 및 3개의 중간 단계 각각 4주씩 3개의 중간 단계에서, 여기서 중간 단계에서 성장 배지는 추가 아가를 하기 정량: 단계 a)에서 수득된 배지 대비 각각 1.75중량%, 1.5중량%, 1중량%로 함유하는 것인 단계;

[0008]

d) 최종 단계 c)로부터의 배양액, 즉, 0.5% 아가를 함유하는 배양액을, 조성이 단계 a)에 개시된 바와 같지만, 단, 스톤은 첨가되지 않은 것인 배지 수용액에 용해시키고, 교반하면서 25℃에서 2주 동안 인큐베이션 (incubation)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 특히, 번호 BEA_IDA_0068B 또는 BEA_IDA_0075B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행(Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC)에 기탁된 시아노박테리아 균주의 단리 및 배양 방법이다.

- [0009] 본 발명의 제2 목적은 번호 BEA_IDA_0068B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 박테리아 균주이다.
- [0010] 본 발명의 제3 목적은 번호 BEA_IDA_0075B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 박테리아 균주이다.
- [0011] 본 발명의 제4 목적은 UV 흡수 특성을 갖는 안료, 특히, 스시토네민 또는 이의 유도체의 제조를 위한 본 발명의 제2 목적으로 정의된 본 발명의 균주의 용도이다. 동등하게 바람직하게는, 본 발명의 용도는 화장품 제품(cosmetic product), 특히, 선스크린(sunscreen)의 제조를 위한, 생성된 안료, 특히, 스시토네민 또는 이의 유도체의 적용을 포함한다.
- [0012] 본 발명의 제5 목적은 배지 수용액 1000 mL당 연마석 200 g의 양으로 질량 백분율로 하기 함량: 97.6% 석영, 0.4% 백운모-흑운모 1.2% 인회석 및 0.8% 다른 미량 미네랄을 포함하는 천연 누비아 사암을 함유하는 것을 특징으로 하는, 배지 수용액 1000 mL 중 1.5 g NaNO₃, 0.04 g K₂HPO₄, 0.075 g MgSO₄ x 7H₂O, 0.036 g CaCl₂ x 2H₂O, 6.0 mg 시트르산, 6.0 mg 시트르산철암모늄, 1 mg EDTA, 0.02 g Na₂CO₃, A5 블렌드 수용액 1000 mL당 하기 조성: 2.86 g H₃BO₃, 1.81 g MnCl₂ x 4H₂O, 0.222 g ZnSO₄ x 7H₂O, 0.39 g Na₂MoO₄ x 2H₂O, 0.079 g CuSO₄ x 5H₂O, 49.4 mg Co(NO₃)₂ x 6H₂O를 갖는 미량 금속의 A5 블렌드 1 mL를 함유하는 시아노박테리아 배양용 배지이다. 개시된 배지는 안료, 특히, 스시토네민을 생산하는 시아노박테리아를 배양하는 데 적합하다.
- [0013] 본 발명의 제6 목적은 하기:
- [0014] - 2.500° , 4.589° , 5.062° , 8.630° 및 9.197° 의 2 세타 각 값(2 theta angle value)에서 특징적인 피크(characteristic peak)를 갖는 X선 분말 회절 스펙트럼인 특성,
- [0015] - IR 스펙트럼 (KBr)에서 3345, 3065, 2961, 2926, 1713, 1591, 1516, 1449, 1296, 1175, 1145, 957, 932, 930, 833 [cm⁻¹]의 특정 적외선 흡수 대역인 특성,
- [0016] - 열중량 측정/시차 열 분석 (가열/냉각 속도: 15/20°C/min)에서 피크는 약 380.3°C인, 365°C 내지 380.3°C 범위의 분해 온도인 특성,
- [0017] - δ 8.98 ppm, 7.99 ppm, 7.86 ppm, 7.75 ppm, 7.48 ppm, 7.33 ppm 및 7.22 ppm의 피리딘-d₅ 함유 신호에서 기록된 1H NMR 스펙트럼인 특성으로부터 선택되는 적어도 하나의 특성을 갖는 스시토네민 결정이다.
- [0018] 본 발명에 의해, 당업계에 공지된 방법을 사용해서는 실험실 조건에서 배양이 불가능하거나, 또는 적어도 달성하기 어려운 자연 환경으로부터 단리된 원하는 시아노박테리아 균주를 용이하게 증식시킬 수 있는 배양 방법을 효과적으로 제공할 수 있게 되었다. 본 발명의 방법을 사용함으로써, 매우 바람직한 특성, 특히, 하기 화학식 1의 스시토네민, 특히, 이의 산화된 형태의 것에 대한 높은 생산성, 즉, 시아노박테리움 건조 중량당 적어도 1.5%를 갖는 특정 시아노박테리움 균주를 단리시킬 수 있었다.



화학식 1

- [0019]
- [0020] 광학 현미경법 분석 및 문헌 [Komerek et al. (2014)] 및 상기 논문에서 발견된 문헌 보고서에 발표된 최신 가

이드라인에 기초하여 시아노박테리움 군주의 분류학적 특징을 결정하였다. 시험 군주의 미세형태학적 특징은 상기 군주가 크로오코시디옵시다세아에(*Chroococcidiopsidaceae*) 과 (문헌 [Komerek et al., 2014]) 및 크로오코시디옵시스(*Chroococcidiopsis*) 속에 속한다는 것을 보여준다 (문헌 [Geitler, 1932]).

[0021] 생성된 군주의 미세형태학적 설명:

[0022] 본 발명의 배양물에서 수득된 시아노박테리움 세포는 하기와 같은 특징을 가졌다:

[0023] a) 색상: 청록색, 황색 내지 연갈색;

[0024] b) 형태: 수개 내지 20개 미만의 세포가 콜로니로 클러스터링되거나 또는 그렇지 않으면 전형적으로 뚜렷한 쉬쓰(sheath)로 둘러싸인, 응집체를 형성하는, 직경이 1.5 내지 5 μm 인 단일 및 구형 세포.

[0025] c) 분열: 세포는 2개 이상의 평면을 따라 분열한다. 분열 후 세포 코트는 일반적으로 확장되고, 딸세포를 포함하며, 이는 콜로니 초의 층으로 관찰된다.

[0026] d) 틸라코이드 배열: 세포벽 근처에 원형으로 배열.

도면의 간단한 설명

[0027] 본 발명의 실시양태는 도면에 제시되어 있으며, 여기서 도 1은 SPF가 30 및 50인 선택된 상업적으로 이용가능한 크림 (샘플 1-3) 및 스티토네민이 첨가된 샘플 (4번)에 대한 흡광도 (a 및 b) 및 투과율 (c 및 d) 시험의 비교 결과를 보여주는 것으로, 여기서 시험은 인공 피부를 시뮬레이션하기 위해 얇은 층의 물질 (3M[®] 수술용 테이프)을 사용하여 수행되었고, 도 1a는 UVB (280-320 nm), UVA (320-400 nm) 내지 최대 800 nm 범위의 샘플에 대한 흡광도 곡선을 보여주는 것이고, 도 1b는 UVB (280-320 nm) 내지 UVA (320-400 nm) 범위의 샘플에 대한 흡광도 곡선을 보여주는 것이고, 도 1c는 UVB (280-320 nm), UVA (320-400 nm) 내지 최대 800 nm 범위의 샘플에 대한 투과율 곡선을 보여주는 것이고, 도 1d는 UVB (280-320 nm) 내지 UVA (320-400 nm) 범위의 샘플에 대한 투과율 곡선을 보여주는 것이고, 여기서 곡선 기호: "볼트" 연속 라인은 스티토네민이 첨가된 제제 4이고; 샘플 1은 ----- ; 샘플 2는 -.-.-.- 및 샘플 3은 - - - -이고, 도 2는 SCY 샘플의 FTIR 스펙트럼을 도시한 것이고, 도 3은 350-520°C 온도 범위에서의 샘플 가열 온도 (검은색 곡선) 및 열 흐름 곡선 (회색 곡선)에 따른 중량 손실 곡선을 보여주는 것이며, 여기서 최대 분해 온도는 380.3°C이고, 도 4는 본 발명의 스티토네민 형태의 PXRD (다결정 X선 회절 방법)를 사용하여 수득한 X선 회절도를 보여주는 것이며, 여기서 주요 피크는 "*"로 마킹되어 있고, 도 5 및 5a는 피리딘-*d*₅ 중에서 기록된 스티토네민 샘플의 양성자 핵 자기 공명 (¹H NMR) 스펙트럼 (δ 스케일 [ppm])을 제시하는 것이고, 여기서 도 5는 전체 스펙트럼 (범위: -0.5 내지 10.5 ppm)을 포함하는 것이고, 도 5a는 확장된 7.1 - 9.1 ppm 범위를 보여주는 것이고, 도 6은 실시예 2.2에 개시된 화장료에 사용된 선택된 용액에서 스티토네민 분산 정도에 대한 조사 결과를 제시하는 것이고, 도 7a 및 7b는 실시예 8에 기술된 결정을 보여주는 것이고, 도 8a-8d는 MERCURY 소프트웨어 (문헌 [Macrae et al., 2020])를 이용하여 수득된 SCY 구조의 그래픽 모델을 보여주는 것이고: 비대칭 단위 (도 8a), 단위 셀 패킹의 전체도 (도 8b), 및 단위 셀 패킹을 [001] 방향을 따라 본 뷰 (도 8c) 및 [100] 방향을 따라 본 뷰 (도 8d).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 실시예 1

[0029] 1.1 성장 배지 제조

[0030] 성장 배지의 제조는 시아노박테리아의 공급원이 되는 누비아 형성(Nubian formation)으로부터 유래하는 사암에서 발견되는 미량영양소 및 다량영양소 강화를 포함하였다. 따라서, 200 g의 멸균된 스톤을 마노 막자사발에서 분쇄하고, 표 1에 따라 순수한 BG11 배지 매 1000 mL당 첨가하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 25°C에서 24시간 동안 교반한 후, 최종 5시간 동안 침강시키고, 직경 25 mm, 공극 크기 0.2 μm 의 필터 (사이클로포어 트랙-이치 멤브레인즈(Cyclopore Track-Etch Membranes), 와트만(Whatman))를 통해 여과하였다. 사암으로부터의 미량영양소 및 다량영양소가 강화된 생성된 BG11 배지를 60°C로 가열하였다. 이어서, 최종 양 2중량%의 건조 아가를 생성된 용액에 첨가하였다. 이어서, 아가가 용해될 때까지 전체 내용물을 교반하고, 페트리 디쉬 (R)에 붓고, 25°C로 냉각시키고, 환경으로부터의 시아노박테리아 수집 및 배지가 있는 플레이트에 시딩하기 위해 멸균 조건에서 커버하여 보관하였다.

- [0031] 1.1.1.
- [0032] 스톤의 특징
- [0033] 세포내 용해 미생물이 있는 스톤은 누비아 사암 형성으로부터 유래한다. 총 중량이 52 g인 스톤 샘플 5개의 광물학적 조성을 정량적으로 분석하기 위해 X선 회절 (XRD)을 사용하였다. 사암의 평균 함량은 석영 97.6%, 백운모-흑운모 0.4%, 인회석 1.2% 및 다른 미량 미네랄 0.8%였다.
- [0034] 1.2 환경으로부터의 시아노박테리아 수집
- [0035] 본 발명의 목적인 2개의 시아노박테리아 균주에 의한 세포내 용해 콜로니화가 이루어진 작은 스톤 단편 2개를 멸균 란셋을 이용하여 상기 1.1항의 페트리 디쉬에 기계적으로 스크래핑하여 누비아 사암으로부터의 미량영양소 및 다량영양소가 강화된, 두 균주에 대한 별개의 두 배양물을 셋업하였다. 시아노박테리아를 18 W 저온 형광 램프 (필립스TLD18W(PhilipsTLD18W)/33)에 의해 제공되는 대략 $30\text{--}50\text{ }\mu\text{mol 광자 m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 의 PAR (광합성 유효 방사, 400-700 nm) 범위의 광도하에 25℃에서 명/암 요법 (12/12 hrs.)으로 시딩하였다. 5-10주 후, 유로맥스 옥시온 인버서(Euromex Oxion Inverso) OX.2053-PL 광학 현미경 + Cmax 3 카메라를 사용하여 아가 디쉬를 시아노박테리아 존재에 대해 시험하였다.
- [0036] 1.3 계대접종
- [0037] 단계 1.2로부터의 생물학적 물질의 점진적 계대접종을 단계 1.1에서 수득한 고체 배지에서 수행하고, 추가의 아가 함량은 처음에 배지의 2중량%에서 최종적으로 0.5중량%까지, 바람직하게는, 3개의 중간 단계에서 아가 함량은 1.75중량%, 1.5중량%, 1중량%인 것으로 수행되었다. 계대접종 시간은 $35\text{ }\mu\text{mol 광자 m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 에서 연속 PAR (400 - 700 nm) 방사선조사하에 25℃에서 각 중간 및 최종 단계에 대해 4주였다.
- [0038] 1.4 배양
- [0039] 아가 함량이 0.5중량%인 배지로부터의 두 균주에 대한 단계 1.3으로부터 생성된 콜로니를, 스톤으로부터의 미량영양소 및 다량영양소의 첨가를 이용하여 변형되지 않은, 조성이 표 1에 개시된 바와 같은 단계 1.1로부터의 배지 수용액에 용해시키고, IKA KS 501 오비탈 셰이커(Orbital Shaker)를 사용하여 동시 연속 궤도 진탕시키면서 (20 rpm) $35\text{ }\mu\text{mol 광자 m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 에서 연속 PAR 방사선조사 (400-700 nm)하에 25℃에서 2주 동안 인큐베이션하고, 본 발명의 목적인 두 균주에 대한 별개의 두 배양물을 추가로 유지시켰다.
- [0040] 스톤으로부터의 미량영양소 및 다량영양소의 첨가를 이용하여 변형되지 않은, 단계 1.1의 배지 중에서의 본 발명의 두 균주의 안정한 모노클로날 배양물 제조.
- [0041] 현미경하에 단리된 시아노박테리아 콜로니를 pH 8.2; 온도 25℃ 및 PAR 광도 $20\text{ }\mu\text{mol 광자 m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 에서, 스톤이 첨가되지 않은, 조성이 표 1에 열거된 단계 1.1의 배지 수용액 중에 넣고, 재현탁을 위해 특정 간격으로 진탕시켰다. 신선한 배양을 유지시키기 위해 배양물 중 일부 (2 mL)를 매 2주마다, 스톤이 첨가되지 않은, 단계 1.1의 신선한 표준 배지 100 mL에 첨가하였다. 액체 배지 중에서 시아노박테리아를 배양하는 동안 광주기는 연속 또는 혼합 모드로 명기 110-12시간, 및 암기 12-14시간이었다.
- [0042] 스시토네민 합성을 위한 시아노박테리아 배양 유도 및 이의 생산성 측정
- [0043] 방법론은 문헌 [Fleming and Castenholtz (2007)]을 인용하였다. 간단하게, 상기 배지, 즉, 스톤이 첨가되지 않은 단계 1.1의 배지로부터의 시아노박테리아 용액을 여과하고, 필터를 아가 함량이 2%인 BG-11 고체 아가 배지 상에 배치하였다. 필터가 있는 디쉬에 PAR ($65\text{ }\mu\text{mol 광자 m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 또는 40 W/m^2) 및 UV 방사선조사 (1.8 W/m^2)를 가하였다. 방사선조사된 시아노박테리아가 포함된 일부 필터를 매 3일마다 스시토네민 함량에 대해 분석하였다. 따라서, 하기 제시된 바와 같이 분광광도법 기술을 사용하였다:
- [0044] HP 8452A 다이오드 어레이 단일 빔 분광광도계 (휴렛-팩커드(Hewlett-Packard: 일본 도쿄))를 사용하여 추출된 (메탄올/에틸 아세테이트 (v/v 1:1)) 스시토네민의 흡수 스펙트럼을 수득하였다. 삼색 방정식 및 흡광 계수를 사용하여 스시토네민 [mg/g 건조 중량 (DW)]의 반정량 검정을 위해 특정 파장에 대한 흡광도 값 (각 안료의 최대 피크)을 선택하였다 (문헌 [Lichtenthaler, 1987]).
- [0045] 1.5 본 발명의 스시토네민의 생산성 평가 방법

- [0046] 배양 종료 후 단계 1.4의 배지로부터의 시아노박테리아를 함유하는 배양액을 0.2 μm 필터를 이용하여 여과하였다. 필터를 BG-11 고체 아가 배지 (2%)에 배치하였다. 필터가 있는 디쉬에 65 μmol 광자 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (또는 40 W/m^2)으로 PAR 방사선조사 및 1.8 W/m^2 로 UVA 방사선조사를 가하였다. 방사선조사된 시아노박테리아가 포함된 일부 필터를 매 3일마다 스시토네민 함량에 대해 분석하였다. 따라서, 하기 제시된 바와 같이 분광광도법 기술을 사용하였다:
- [0047] HP 8452A 다이오드 어레이 단일 빔 분광광도계 (휴렛-팩커드: 일본 도쿄)를 사용하여 추출된 (메탄올/에틸 아세테이트 (v/v 1:1)) 스시토네민 (다른 안료 포함)의 흡수 스펙트럼을 획득하였다. 삼색 방정식 및 흡광 계수를 사용하여 스시토네민 [mg/g 건조 중량 (DW)]의 반정량 검정을 위해 특정 파장에 대한 흡광도 값 (각 안료의 최대 피크)을 선택하였다 (문헌 [Lichtenthaler, 1987]).
- [0048] 번호 BEA_IDA_0075B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 박테리아 균주 및 번호 BEA_IDA_0068B 하에 라스 팔마스 데 GC의 대학교의 스페인 조류 은행에 기탁된 박테리아 균주에 대한 생성된 스시토네민 생산성은 시아노박테리움의 건조 중량당 적어도 1.75%였고, 즉, 시아노박테리아의 건조 중량 (DW)당 0.03 - 0.09% 스시토네민인 당업계의 것보다 훨씬 더 높았고 (문헌 [Balskus et al., 2011]); 따라서, 생산성은 19 내지 58배만큼 더 높았다.
- [0049] 1.6 스시토네민의 추출 및 정제
- [0050] 배양액에 현탁된, 상기 항에서의 기술내용에 따라 수득된 바이오매스를 원심분리 (또는 여과)에 의해 분리한다. 생성된 바이오매스에 대해 클로로포름:헥산 혼합물 (v/v 1:1) 중에서 예비 정제를 수행한다. 이 단계에서, 용매 혼합물이 포함된 바이오매스를 10분 동안 진탕시키고, 이 또한 10분 동안 초음파처리한다. 이어서, 원심분리하고 (10 min 동안 6000 rpm), 침전물 위에서 상청액을 수집한다. 용매 혼합물의 또 다른 새로운 부분을 침전물에 첨가하고, 절차를 반복한다. 또 다른 원심분리 후, 두 원심분리의 상청액을 합치고, 재사용을 위해 진공 증발기를 사용하여 정제할 수 있다. 이어서, 제1 정제 단계 이후의 바이오매스에 대해 에틸 아세테이트:메탄올 혼합물 (v/v 1:1) 또는 아세톤 중에서 1차 추출을 수행한다. 본 단계에서 10분 사이클로 원심분리 및 초음파처리도 사용한다. 원심분리는 모든 사이클을 따르고, 상청액을 수집한다. 상청액이 색상을 상실하기 시작할 때까지 추가의 새로운 용매 부분으로 추출을 반복한다 (전형적으로 3 내지 5회). 수집된 상청액은 이후 재사용을 위해 진공 증발기 (40 $^{\circ}\text{C}$)를 사용하여 증발시킨다. 증발 후 건조된 잔류물에 대해 최종 정제 절차를 수행한다. 클로로포름:헥산 (v/v 1:1) 또한 본 단계에서 진탕, 초음파처리 및 원심분리와 함께 사용한다. 정제 단계의 수는 샘플의 오염 정도에 따라 달라지며, 원심분리 후 투명한 무색 상청액을 수득할 때까지 반복된다. 이러한 효과가 달성되면, 침전물 (스시토네민)을 헥산으로 추가로 2회 세척한다. 마지막 원심분리 및 침전물 위에서의 상청액 수집 후, 진공 건조기 (40 $^{\circ}\text{C}$)에서 건조시킨 후, 이어서, 중량을 측정한다. 건조된 침전물을 HPLC에 의해 검정하여 생성된 생성물의 순도를 평가한다.
- [0051] 실시예 2 스시토네민의 용도
- [0052] 2.1. 자외선 차단 효율
- [0053] 다양한 브랜드의 선스크린, 및 활성 성분으로서 시아노박테리움 추출물 기반의 스시토네민을 사용한, 본 출원인에 의해 제안된 선스크린 제품 (샘플 4)의 자외선 차단 효율을 입증하기 위해 분광광도법 기술을 사용하였다. 따라서, 상업적으로 이용가능한 선스크린 제품, 및 시험된 샘플 4를 인간 피부 시뮬레이션 (3M 수술용 테이프)을 이용한 실험에서 흡광도 및 투과율에 대해 분석하였다. 상업적으로 이용가능한 3M (R) 테이프를 평가 대상 제품의 얇은 층이 적용된 2x2cm 석영 유리 테이프에 적용하였다. FLAME-S (오션 옵틱스(Ocean Optics: 미국 플로리다주)) 시스템 및 분광계를 사용하여 20분 후 플레이트의 흡광도 및 투과율에 대해 시험하였다.
- [0054] 본 발명의 스시토네민 생성물의 자외선 차단 효율은 SPF (자외선 차단 지수) (문헌 [Greiter, 1974])가 30 및 50인 선택된 상업적으로 이용가능한 제품 (샘플 1-3) 및 스시토네민이 첨가된 샘플 4에 대한 흡광도 (a 및 b) 및 투과율 (c 및 d) 시험의 비교 결과를 제시하는 도 1에 나타나 있다. 시험은 인공 피부를 시뮬레이션한 얇은 층의 물질 (3M® 수술용 테이프)을 사용하여 수행하였다. 도 1a는 UVB (280-320 nm), UVA (320-400 nm) 내지 최대 800 nm 범위의 샘플에 대한 흡광도 곡선을 보여주는 것이고, 도 1b는 UVB (280-320 nm) 내지 UVA (320-400 nm) 범위의 샘플에 대한 흡광도 곡선을 보여주는 것이고, 도 1c는 UVB (280-320 nm), UVA (320-400 nm) 내지 최대 800 nm 범위의 샘플에 대한 투과율 곡선을 보여주는 것이고, 도 1d는 UVB (280-320 nm) 내지 UVA (320-400 nm) 범위의 샘플에 대한 투과율 곡선을 보여주는 것이고, 여기서 곡선 기호: "볼트" 연속 라인은 스시

토네민이 첨가된 제제 4이고; 샘플 1은 ----- ; 샘플 2는 -.-.-.- 및 샘플 3은 - - - -이다.

- [0055] 비교 분석을 위해 특정 조성이 하기에 열거된 바와 같은 상업적으로 이용가능한 제품을 선택하였다.
- [0056] 샘플 1 2-에틸헥실 4-메톡시신나메이트 / 옥티녹세이트 + 2-히드록시-4-메톡시벤조페논 / 옥시벤존 + 이산화티타늄 (TiO₂) [제품 중 함량(%): 각각 7.5%, 4% 및 10%] + q.s. (충분한 양): 글리세린 + 글리세롤 스테아레이트 + 물 + 실리카 + 알콜.
- [0057] 샘플 2 이산화티타늄 (TiO₂) + 산화아연 (ZnO) [제품 중 함량(%): 각각 10% 및 17%] + q.s.: 글리세린 + 글리세롤 스테아레이트 + 물 + 실리카 + 알콜.
- [0058] 샘플 3 산화아연 (ZnO) + (2-에틸헥실 4-메톡시신나메이트) / 옥티녹세이트 [제품 중 함량(%): 각각 15.5% 및 7.5%] + q.s.: 글리세린 + 글리세롤 스테아레이트 + 물 + 실리카 + 알콜.
- [0059] 샘플 4 0.8% 스시토네민 + 디프로베이스(Diprobace) q.s. 여기서 조성은 하기와 같다: 백색 바셀린, 액체 파라핀, 마크로콜 세토스테아릴 에테르, 세토스테아릴 알콜, 인산이수소나트륨 이수화물, 클로로크레졸, 수산화나트륨, 진한 인산, 정제수.
- [0060] 관찰결과: 스시토네민이 첨가된 제제는 SPF가 30 및 50인 상업적으로 이용가능한 크림과 유사한 수준으로 UVB 및 UVA 범위에서 높은 흡광도 값 및 낮은 투과율 값을 보였다.
- [0061] 2.2 화장료에 사용되는 선택된 용액의 스시토네민 분산 정도 시험
- [0062] 2.2.1
- [0063] 0.5 mg 스시토네민을 분석 저울로 계량하고, 1 g의 용액에 현탁시켰다:
- [0064] 1) 프로필렌 글리콜 (INCI: 프로필렌 글리콜)
- [0065] 2) 정제된 살구 오일 (INCI: 프루누스 아르메니아카(*Prunus Armeniaca*) (살구) 커널 오일)
- [0066] 3) 글리세린 (INCI: 글리세린)
- [0067] 4) 이소헥사데칸 (INCI: 이소헥사데칸)
- [0068] 5) 2-옥틸도데칸-1-올 ODD (INCI: 옥틸도데카놀)
- [0069] 6) SLP 유화제 (INCI: 소르비탄 라우레이트 / 폴리글리세릴-4 라우레이트 / 디라우릴시트레이트).
- [0070] 이어서, 샘플을 대략 1 min 동안 진탕기를 사용하여 혼합하고, 더 높은 분산 수준을 달성하기 위해 초음파 배스에서 10 min 동안 유지시켰다.
- [0071] 결과:
- [0072] 1. 활성 성분의 높은 분산 수준; 글리콜 용액은 즉시 갈색-녹색으로 변색되고; 현탁액의 작은 입자가 보인다 (도 6a 참조).
- [0073] 2. 용액 중 활성 성분의 매우 낮은 분산 수준; 용해되지 않은 현탁액은 시간이 경과함에 따라 침전되는 것이 명확하게 관찰된다 (도 6b 참조).
- [0074] 3. 활성 성분의 낮은 분산 수준; 현탁액은 시간이 경과함에 따라 점진적으로 용해되고, 용액에 약간의 색조를 띠는 것이 명확하게 관찰된다 (도 6c 참조).
- [0075] 4. 활성 성분의 높은 분산 수준. 현탁 후, 고르게 분산된 회색 현탁액 수득; 시간이 경과함에 따라 침전되는 물질의 입자가 관찰된다 (매우 미세) (도 6d 참조).
- [0076] 5. 활성 성분의 상대적으로 높은 분산 수준. 연녹색 용액이 수득되었고; 바닥에 현탁액 침강이 관찰된다 (도 6e 참조).
- [0077] 6. 유화제 용액 중 활성 성분의 낮은 분산 수준. 바닥에 침강된 미세한 입자가 관찰되고; 용액은 시간이 경과함에 따라 점진적으로 착색되었다 (도 6f 참조).
- [0078] 요약:
- [0079] 활성 성분의 최고의 분산 수준은 0.5 mg/g 글리콜 농도의 샘플 1에서 수득되었다. 분산 수준의 감소는 하기 순

서로 연속 샘플에서 나타났다 (샘플은 매트릭스에서 스시토네민의 가장 높은 분산 수준에서 가장 낮은 분산 수준으로 배열되어 있다):

[0080] 1 > 4 > 5 > 6 > 3 > 2.

[0081] 2.2.2

[0082] 제조:

[0083] 0.5 mg 스시토네민을 분석 저울로 계량하고, 5 g의 용액에 현탁시켰다:

[0084] 7) 글리세린 + 글리세롤 스테아레이트 + 물 + 실리카 + 알콜

[0085] 샘플을 실험실용 교반기를 사용하여 5 min 동안 교반하였다.

[0086] 결과:

[0087] 원료 베이스 및 활성 성분을 혼합한 후, 스시토네민 입자가 육안상 보이는 균질한 황백색 베이스를 획득하였다. 물질은 용해되지 않았지만, 더 작은 입자로 분해되었다. 효과는 이소헥사데칸 (현탁액)을 사용한 샘플 4와 유사하였다 (도 6g 참조).

[0088] 1 > 4, 7 > 5 > 6 > 3 > 2.

[0089] 실시예 3. 비교 실시예 - 최신 기술 - 표준 단리 및 배양 방법

[0090] BG11 배지에서의 배양이 사용된 문헌 [Rippka et al. (1979)]; BG-11N₀ 배지에서의 배양이 사용된 문헌 [Anahas and Muralitharan (2015)]; 10 mM NaHCO₃으로 변형된 BG11 배지에서의 배양이 사용된 문헌 [Singh et al. (2014)]에 의한 표준 방법을 이용하였을 때에는 본 출원의 목적인 박테리아 균주를 단리시킬 수 없었고, 훨씬 더 적게 배양되었다. 박테리아 콜로니는 일찍 사멸하였고, 스시토네민 생산을 위해 필요한 바이오매스는 수득할 수 없었다.

[0091] 실시예 4

[0092] 열중량 측정/시차 열 분석 (TG/DTA)을 동반한 푸리에 변환 적외선 분광법 (FTIR)

[0093] 샘플 식별: SCY

[0094] 분말 형태의 암갈색 고체

[0095] 중량: 8.3 mg

[0096] 도입

[0097] 하기 설명되는 기술: 하기 기술되는 구체적인 절차에 따라 시차 열 분석/열중량 측정 (TG/DTA) 및 푸리에 변환 적외선 분광법 (FTIR)을 사용하여 추가로 분석하기 위해 기탁 번호 BEA_IDA_0075B 하의 본 발명의 목적인 균주로부터 수득된, 이하 SCY로 지칭되는 샘플을 제조하였다. 분석을 위해 사전 샘플 제조는 필요하지 않았다. 이어서, 균주 BEA_IDA_0068B 샘플에 대한 반복 실험에서도 유사한 결과가 나타났다. 실시예에 제시된 모든 결과는 본 발명의 목적인 두 균주로부터 수득된 동일한 물질을 나타낸다.

[0098] SCY 샘플은 분석할 때까지 실온에서 밀폐된 용기에 보관하였다.

[0099] 4.1

[0100] FTIR

[0101] FTIR 분석을 위해 110°C에서 5시간 동안 미리 건조된 209.9 mg KBr을 계량하고, 진공 건조기에서 실온으로 냉각시켰다. 0.4 mg의 샘플을 KBr에 첨가하고, 혼합물을 적외선 램프 하에 마노 막자사발에서 분쇄하여 수분 흡수를 방지하였다.

[0102] 하기 조건에서 스펙트럼을 수득하였다:

[0103] 장비

[0104] 시마즈(Shimadzu) FTIR 8400 분광광도계 (시마즈: 일본 교토).

- [0105] PIKE 프레스 (파이크 테크놀로지스(Pike Technologies: 미국 매디슨)).
- [0106] 측정 파라미터:
- [0107] 측정: % 투과율
- [0108] 범위: 400 - 4000 cm^{-1}
- [0109] 아포디제이션: 하프-겐젤(Happ-Genzel)
- [0110] 스캔 넘버: 45
- [0111] 해상도: 4.0
- [0112] 결과:
- [0113] 피크 값을 얻기 위해 시마즈 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다. 피크 값 및 밴드는 이용가능한 문헌에 따라 할당되었다 (문헌 [Pretsch, E. et al.: "Tablas para la elucidacion estructural de compuestos organicos por metodos espectroscopicos" Ed. Alhambra. Madrid, 1980] 및 [Flett, M. "Characteristic Frequencies of Chemical Groups in the Infra-red" Elsevier Monographs. Elsevier, 1963]). 도 2는 (실시예 1에서 수득된) SCY 샘플의 FTIR 스펙트럼을 보여주는 것이며, 여기서 주요 밴드가 마킹되어 있다. 표 2는 가장 가능성이 높은 확인된 작용기/결합에 할당된 파수 값을 보여준다.

표 2

3345	O-H 스트레칭
3065	=C-H 스트레칭 (알켄, 방향족)
1713	C=O 스트레칭
1591	C=C 스트레칭 (방향족)
1516	C=C 스트레칭 (방향족)
1449	C=C 스트레칭 (방향족)
1296	O-H 변형
1175	C-O 스트레칭
957	C-H 평면내 변형 (방향족)
833	C-H 평면외 변형 (방향족)

- [0114]
- [0115] 실시예 1에서 번호 BEA_IDA_0068B 하에 기탁된 균주로부터 제조된 화합물에 대해 동일한 분석을 수행하였다. 생성된 스펙트럼은 도 2의 것과 동일하였다.
- [0116] 4.2 TG/DTA
- [0117] 3.7 mg의 샘플을 계량하여 알루미늄 도가니에 넣고, 34.6 mg의 순금 와이어 (99.999%)를 첨가하여 막대 중량과 마이크로저울 평행주의 균형을 맞추었다.
- [0118] 샘플 제조
- [0119] 분석을 위해 특별한 제조가 필요하지는 않았다.
- [0120] 기구
- [0121] SETARAM SETSYS 6000 분석기
- [0122] 실험 조건

- [0123] 측정 파라미터:
- [0124] 2 atm의 아르곤 유동
- [0125] 샘플 중량: 3.7 mg
- [0126] 도가니: 100 μl Al_2O_3
- [0127] 참조 도가니: Al_2O_3
- [0128] 온도 램프:

온도 (시작 - 종료) [$^{\circ}\text{C}$]	시간 [s]	램프율 [$^{\circ}\text{C}/\text{분}$]
25-25	300	-
25-900	5250	15
900-40	2580	20

[0129]

[0130] 결과

[0131] 연속 단계에서의 중량 손실은 열중량 측정 곡선에 기초하여 계산하였고, 샘플 가열 중의 발열 및 흡열 과정의 존재는 열 흐름 곡선으로부터 결정하였다.

[0132] 도 3은 샘플 가열 온도에 따른 중량 손실 곡선 (검은색 곡선) 및 350 $^{\circ}\text{C}$ 내지 520 $^{\circ}\text{C}$ 온도 범위에서의 열 흐름 곡선 (회색 곡선)을 보여주는 것이다. 상기 온도 범위에서 SCY의 뚜렷한 중량 손실 (검은색 곡선)이 관찰되었다. 물질의 열 분해는 발열 과정 (회색 곡선의 열 흐름 값 증가)이고, 365.4 $^{\circ}\text{C}$ (도 3의 수직 점선)에서 시작하여 380.3 $^{\circ}\text{C}$ (도 3의 수직 실선)에서 이의 최대치에 도달한다. 발열 과정과 관련하여 365.4 $^{\circ}\text{C}$ 내지 380.3 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위에서 SCY의 4.32%의 중량 손실이 발생한 것으로 밝혀졌으며, 이를 통해 상기 온도 범위가 SCY의 분해 온도이며, 380.3 $^{\circ}\text{C}$ 에서 뚜렷한 최대치를 갖는 것으로 확인되었다. SCY의 중량 손실은 흡열 과정 (회색 곡선의 값 감소)과 관련된 이 온도보다 높은 온도에서도 여전히 나타났으며, 이를 통해 405-412 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위를 제외하고 SCY 분해 생성물의 가스 방출 및 재구성 과정이 확인되었으며, 상기 405-412 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위에서는 SCY 분해 생성물의 2차 분해와 관련된 발열 과정이 관찰되었다.

[0133] SCY 분해의 T 범위 = 365.4 - 380.3 $^{\circ}\text{C}$

[0134] 중량 손실 최대치 = 380.3 $^{\circ}\text{C}$

[0135] Δ 중량 = 0.16 mg (4.32%).

[0136] 실시예 1에 따라 배양 및 단리된, 본 발명의 목적인 두 균주로부터 수득된 화합물에 대해 유사한 스펙트럼을 수득하였다.

[0137] 실시예 5

[0138] 다결정 X선 회절 (PXRD)

[0139] 측정 방법

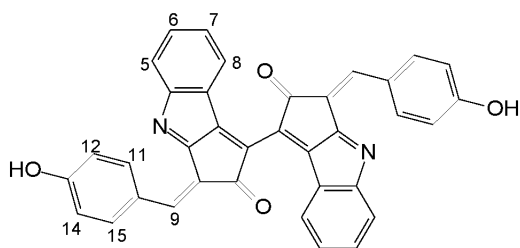
[0140] 본 발명의 목적인 두 균주로부터 SCY를 추출한 후, 용매를 증발시켜 2 내지 20 μm 크기의 단일 침상 결정 (결정질 형태, 본 발명의 형태), 또는 침상 결정이 방사형으로 배열된 이의 응집체로서 갈색 분말 8.3 mg을 수득하였다. 결정질 물질의 특성은 광학현미경법 (AXIO 이미저 DM2(AXIO Imager DM2) 현미경, 자이스(Zeiss), 칼 자이스(Carl Zeiss), 독일, 아포크롬(Apochrome) 63x 렌즈, n=1.4 자이스)을 이용하여 관찰하였다.

[0141] PXRD 분말 분석은 본 발명의 목적인 두 균주로부터 수득한 SCY로 구성된 결정질 물질 (본 발명의 형태)에서 수행하였고, 이에 대해 유사한 두 PXRD 회절도가 기록되었다. PXRD 측정은 브루커 D8-디스커버(Bruker D8-Discover) 다결정 회절계를 사용하여 수행하였다. 실온에서 X선 소스로 X선 튜브 (Cu 양극, 50 kV, 30 mA의 K α 및 2 mm 슬릿이 있는 콜리메이터)를 사용하여 분말 회절도를 수득하였다. 측정값은 연속 작동 모드; 2 세타 각도 스캐닝 범위는 2-60도, 측정 스텝 0.02도, 스캐닝 속도 0.7 sec/측정 스텝으로 기록하였다.

- [0142] 생성된 회절도 데이터 분석을 위해 Diffrac.EVA v5.1 소프트웨어를 이용하였다.
- [0143] 도 4에 제시된 분말 X선 회절 스펙트럼 (본 발명의 형태) 분석 결과는 하기와 같다:
- [0144] 1. SCY의 회절 패턴은 비정질 상을 보이지 않는다.
- [0145] 2. PXRD 회절 패턴은 2 내지 43도의 2 세타 각 범위에서 대략 35개의 유의적인 회절 피크를 함유한다. 회절 패턴의 품질이 더 불량하였고, 이 값보다 높은 피크 파라미터를 명확하게 결정 (확인)할 수 없었기 때문에, 분석을 수행하지 않았다.
- [0146] 3. 이의 특징 (높은 결정화도를 확인시켜 주는 낮은 반치전폭(low full width at half maximum: FWHM))을 고려하여, 이용가능한 소프트웨어에 기초하여 결정된 하기 2 세타 각 값에서 적어도 5개의 낮은 각 회절 각: 2.500°, 4.589°, 5.062°, 8.630° 및 9.197°를 사용하여 물질을 확인할 수 있다.
- [0147] 도 4에서 피크는 "*"로 마킹되어 있다.
- [0148] 4. FWHM 값이 더 높은 다른 더 낮고, 더 넓은 피크의 존재는 결정화도가 더 낮은 (결정자 크기 감소) 결정질 물질이 샘플 중에 존재한다는 것을 보여주는 것이다.
- [0149] 5. 기록된 회절 피크는 SCY에 특이적이며, 물질을 식별하는 데 사용될 수 있다. 다결정 데이터의 이용가능한 결정학적 데이터베이스에 기초하여, 상기 회절 패턴을 갖는 다른 알려진 물질은 발견되지 않았다.
- [0150] 실시예 6

[0151] 스시토네민의 ^1H NMR (양성자 핵 공명) 측정

[0152] 스시토네민 (1.6 mg)의 ^1H NMR 스펙트럼은 실온에서 300.13 MHz의 기본 주파수에서 브루커 어드밴스 II 300(Bruker Avance II 300) 분광계에서 피리딘- d_5 (0.75 ml) 중에서 기록하였다. δ 화학적 이동은 ppm 단위로 제공되고, J 결합 상수는 Hz 단위로 제공된다. 스펙트럼은 8.727 ppm에서 피리딘- d_5 의 H-2 양성자의 잔류 신호에 대해 표준화하였다. 상 및 기준선을 수동으로 보정하였다. 통합 영역을 유사한 방식으로 선택하였다. 신호는 이전 문헌 데이터 (문헌 [Proteau et al., 1993])에 기초하여 할당하였다. 실험적 δ 화학적 이동 데이터는 인용된 데이터와 일치한다. -OH 페놀 기의 불안정한 양성자의 빠른 교환에 기인하여, 이의 신호는 설명에 포함하지 않았다. 미량 불순물 (물 및 n -헥산)의 신호는 각각 δ 4.93 및 약 δ 1.0에서 발견된다.



[0153] ^1H NMR (피리딘- d_5) δ [ppm]: 8.98 (d, 2H, J 8.7; H-11,15); 7.99 (s, 1H; H-9); 7.86 (d, 1H, J 7.5; H-8); 7.75 (d, 1H, J 7.6; H-5); 7.48 (td, 1H, J 7.6, 1.2; H-6); 7.33 (d, 2H, J 8.8; H-12,14); 7.22 (m, 1H, H-7 /피리딘- d_5 H-3 양성자의 잔류 신호와 오버랩/).

[0154]

[0155] 도 5 및 5a는 피리딘- d_5 중에서 기록된 스시토네민 샘플의 양성자 스펙트럼 (^1H NMR) (δ 스케일 [ppm])을 제시하는 것이고, 여기서 도 5는 전체 스펙트럼 (범위 -0.5 내지 10.5 ppm)을 포함하는 것이고, 도 5a는 확장된 7.1 - 9.1 ppm 범위를 포함하는 것이다.

[0156] 실시예 7

[0157] 실시예 1에서 제조된 화합물을 실온 조건 (온도 25°C)에서 10개월 동안 보관하였다. 보관 시험 전과 후의 흡광도 스펙트럼이 동일하며, 이를 통해 화합물의 안정성이 확인된다. 추가로, 스시토네민은 2개월의 연속 UVA 방

사선조사 (5 W/m²) 후에도, 또는 2개월 동안 60℃로의 가열 후에도 실질적으로 변함 없는 특징적인 흡광도 스펙트럼을 가지고 있는 것으로 제시되어 있는 논문 (문헌 [Fleming and Castenholz 2007]) 및 (문헌 [Rastogi and Incharoensakdi 2014])에서도 스시토네민의 높은 안정성은 확인되었다. 본 발명의 스시토네민의 결정질 형태는 안정적이다.

- [0158] 실시예 8
- [0159] X선 회절 (XRD)을 사용한 스시토네민 구조 모델 (SCY) 결정
- [0160] SCY의 단결정 샘플 제조
- [0161] X선 회절 (XRD)을 사용하여 분석하기 위한 스시토네민의 단결정 샘플은 2:1 부피비로 테트라히드로푸란 (THF)-에탄올 (EtOH) 시스템에서 결정화하여 제조하였다. 본 공정에서는 대략 30 mg의 화합물 및 12 mL의 THF-EtOH 혼합물을 사용하였다. 샘플을 초기에 THF 8 mL에 용해시키고, 이어서, 4 mL EtOH를 첨가한 후, 생성된 용액을 실온에서 자유 증발에 의해 천천히 (대략 7일) 농축시켰다.
- [0162] 데이터 수집 및 축소
- [0163] 0.011 x 0.035 x 0.131 mm 크기의 진한 갈색 평행육면체 결정 하나를 시험 샘플로부터 선택하였다 (도 7a 및 7b).
- [0164] 선택된 SCY 결정에 대한 회절 데이터는 CuK α 방사선원 (1.54184 Å), 흑연 모노크로미터 및 저온 측정을 위한 옥스포드 크리오스트림(Oxford CryoStream) 800 샘플 냉각 시스템이 장착된 리가쿠 옥스포드 회절 시너지-S 4-사이클 회절계(Rigaku Oxford Diffraction Synergy-S four-cycle diffractometer)를 사용하여 100 K에서 수집하였다. 회절계 제조업체의 소프트웨어를 사용하여 셀 파라미터의 리파인먼트 및 데이터 축소를 수행하였다 (문헌 [Rigaku Oxford Diffraction, 2018]).
- [0165] 구조 해결 및 리파이닝
- [0166] 위상 문제는 고유 위상 조정에 의해 해결되었으며, 구조 모델에서의 원자 위치는 SHELXT를 사용하여 결정되었다 (문헌 [Sheldrick, 2015- Section A]). 회절 데이터의 품질을 고려하여, 구조 인자 제곱 ($F^2(hkl)$)에 기초한 비수소 원자의 위치 및 등방성 원자 변위 파라미터의 전체 매트릭스 리파인먼트만 수행하였다. 구조 리파인먼트를 개선하고, 분자 기하학적 파라미터를 보정하기 위해, 벤젠 고리 (AFIX 66) 및 카르보닐기를 갖는 말단 5원 고리 (AFIX 56)에 대한 기하학적 제약을 사용하였다.
- [0167] SHELXL2014를 이용하여 구조 모델 리파인먼트 및 추가 계산을 수행하였다 (문헌 [Sheldrick, 2015-Section C])
- [0168] SCY에 대한 회절 측정, 결정 격자 및 구조 모델 리파인먼트의 파라미터는 표 3에 열거되어 있다. SCY의 기하학적으로 결정된 구조 모델의 파라미터는 표 4-7에 열거되어 있다. 이는 각각 단위 셀 파라미터 ($\text{\AA} \times 10^4$)의 분수로 표시된 원자 좌표 및 SCY에 대한 등가 등방성 원자 변위 파라미터 U_{eq} ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) (여기서 U_{eq} 값은 직교 U_{ij} 텐서 트레이스의 1/3로 정의된다) (표 4), 결합 길이 (표 5) 뿐만 아니라, 원자가 (표 6) 및 비틀림 각 (표 7)이다.
- [0169] MERCURY 소프트웨어 (문헌 [Macrae et al., 2020])를 사용하여 SCY 구조 모델을 그래프로 표현하였다: 비대칭 단위 (도 8a),
- [0170] 단위 셀 패킹의 전체도 (도 8b), 및 단위 셀 패킹을 [001] 방향을 따라 본 뷰 (도 8c) 및 [100] 방향을 따라 본 뷰 (도 8d).

표 3

명칭	SCY
분자식	C ₃₆ H ₂₀ N ₂ O ₄
분자량 /g mol ⁻¹	544.57
온도 측정값 /K	100.00 (15)
결정계	단사정계
공간군	Pc
a/Å	35.5024 (13)
b/Å	3.78158 (10)
c/Å	20.4422 (6)
α/°	90
β/°	95.338 (3)
γ/°	90
단위 셀 부피 /Å ³	2732.57 (15)
Z	4
밀도 _{calc} /g cm ⁻³	1.304
μ/mm ⁻¹	0.716
결정 치수 /mm ³	0.131 × 0.035 × 0.011
방사선원	CuKα (λ = 1.54184)
기록된 데이터에 대한 2θ 각 범위/°	5 내지 149.748.
측정된 hkl 파라미터 범위	-41 ≤ h ≤ 44, -4 ≤ k ≤ 4, -24 ≤ l ≤ 24
기록된 반사수	6816
기록된 대칭 독립 반사수	6816 [R _{시그마} = 0.0239]

[0171]

반사수/제약수/리파이닝된 파라미터 수	6816/16/215
F(hkl) ² 기반 구조 모델 적합도 파라미터	3.675
R 인자 [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.2424, wR ₂ = 0.5534
차이 전자 밀도 맵에서 최고 값/최저 값/e Å ⁻³	2.38/-1.65

[0172]

표 4

원자	x	y	z	Ueq
C1	7477 (4)	-3830 (50)	6963 (8)	30 (4)
C2	7274 (5)	-2300 (50)	6402 (7)	43 (6)
C3	6889 (4)	-2040 (60)	6526 (10)	37 (5)
C4	6853 (4)	-3410 (70)	7164 (10)	68 (9)
C12	7217 (5)	-4520 (60)	7434 (7)	39 (5)
N5	6580 (6)	-2680 (60)	7543 (9)	39 (5)
C11	7088 (5)	-5090 (60)	8061 (6)	55 (8)
C6	6716 (5)	-4110 (70)	8129 (8)	47 (7)
C7	6568 (4)	-4510 (70)	8731 (10)	62 (8)
C8	6792 (5)	-5880 (70)	9265 (7)	56 (8)
C9	7164 (5)	-6860 (50)	9197 (6)	37 (5)
C10	7312 (4)	-6460 (50)	8595 (7)	21 (4)
C13	6634 (14)	-210 (150)	6110 (30)	80 (12)
C14	6238 (6)	790 (70)	5931 (12)	41 (6)
C15	6071 (10)	1590 (120)	5306 (12)	95 (16)
C16	5694 (11)	2630 (150)	5220 (20)	110 (20)
C17	5484 (8)	2870 (170)	5760 (30)	140 (30)

[0173]

C18	5650 (10)	2070 (170)	6380 (20)	180 (50)
C19	6027 (10)	1030 (110)	6470 (13)	72 (10)
O20	5077 (9)	3230 (90)	5546 (18)	72 (8)
O21	7389 (10)	-1730 (100)	5910 (20)	83 (9)
C22	7872 (4)	-4610 (60)	7096 (9)	43 (6)
C23	8059 (5)	-4180 (60)	7736 (7)	38 (6)
C24	8437 (5)	-5380 (50)	7725 (8)	32 (5)
C25	8484 (4)	-6570 (60)	7079 (9)	40 (6)
C33	8135 (6)	-6090 (60)	6690 (6)	49 (7)
N26	8740 (8)	-7660 (120)	6664 (12)	79 (10)
C32	8180 (4)	-7000 (50)	6027 (6)	29 (5)
C27	8550 (4)	-8240 (50)	6046 (7)	34 (5)
C28	8693 (4)	-9390 (50)	5473 (9)	36 (5)
C29	8467 (6)	-9310 (60)	4881 (7)	48 (7)
C30	8097 (5)	-8070 (70)	4861 (6)	65 (10)
C31	7954 (4)	-6920 (60)	5434 (8)	48 (7)
C34	8684 (5)	-5060 (50)	8250 (9)	17 (3)
C35	9093 (5)	-6120 (70)	8481 (9)	51 (7)
C36	9236 (4)	-5740 (50)	9133 (8)	34 (5)
C37	9598 (4)	-6940 (50)	9338 (8)	25 (4)
C38	9817 (4)	-8530 (60)	8890 (10)	82 (12)
C39	9673 (6)	-8910 (70)	8238 (10)	44 (6)
C40	9311 (7)	-7710 (80)	8033 (8)	130 (30)
O41	10201 (6)	-9340 (60)	9131 (12)	49 (5)
O42	7964 (6)	-2120 (50)	8222 (10)	41 (4)
C51	2566 (3)	13380 (50)	2948 (7)	44 (6)

[0174]

C52	2750 (4)	11940 (40)	3534 (5)	26 (4)
C53	3136 (3)	11400 (40)	3433 (6)	17 (3)
C54	3190 (3)	12500 (40)	2785 (6)	16 (3)
C62	2838 (4)	13730 (50)	2485 (5)	30 (4)
N55	3453 (6)	12750 (70)	2335 (10)	47 (6)
C61	2864 (4)	14900 (50)	1841 (6)	26 (4)
C56	3247 (4)	14290 (60)	1805 (7)	34 (5)
C57	3412 (4)	15100 (70)	1232 (10)	68 (10)
C58	3193 (6)	16510 (70)	696 (8)	51 (7)
C59	2810 (6)	17130 (70)	733 (8)	71 (10)
C60	2645 (4)	16320 (70)	1305 (9)	58 (8)
C63	3389 (5)	10270 (50)	4038 (9)	19 (3)
C64	3783 (3)	9350 (60)	4039 (8)	81 (12)
C65	3921 (4)	8090 (50)	4654 (7)	36 (5)
C66	4301 (4)	7240 (40)	4779 (6)	21 (4)
C67	4545 (3)	7660 (50)	4290 (8)	38 (5)
C68	4407 (4)	8920 (50)	3675 (7)	36 (5)
C69	4026 (4)	9770 (50)	3549 (7)	29 (4)
O70	4886 (11)	5840 (110)	4330 (20)	89 (10)
O71	2577 (4)	11830 (40)	4085 (7)	18 (3)
C72	2128 (3)	14310 (50)	2856 (7)	41 (5)
C73	1915 (4)	13840 (40)	2239 (6)	20 (4)
C74	1539 (4)	14990 (60)	2303 (8)	58 (8)
C75	1520 (4)	16160 (50)	2959 (9)	37 (5)
C83	1884 (4)	15740 (50)	3301 (6)	23 (4)
N76	1276 (4)	17990 (40)	3265 (7)	21 (3)

[0175]

C82	1841 (4)	17100 (40)	3931 (5)	35 (5)
C77	1470 (4)	18330 (50)	3868 (5)	26 (4)
C78	1309 (3)	19640 (50)	4413 (8)	49 (7)
C79	1519 (4)	19700 (40)	5023 (6)	23 (4)
C80	1889 (4)	18470 (40)	5086 (5)	20 (4)
C81	2050 (3)	17170 (40)	4540 (6)	21 (4)
C84	1242 (6)	15190 (60)	1567 (12)	29 (4)
C85	896 (4)	16160 (50)	1462 (8)	38 (6)
C86	755 (5)	15490 (60)	817 (8)	64 (9)
C87	390 (5)	16520 (60)	595 (7)	49 (7)
C88	165 (4)	18230 (50)	1019 (9)	27 (4)
C89	305 (4)	18890 (50)	1665 (8)	63 (9)
C90	671 (4)	17860 (50)	1886 (7)	21 (4)
O91	-169 (7)	18650 (70)	817 (13)	53 (5)
O92	2030 (5)	12180 (50)	1792 (9)	33 (4)
C101	10609 (7)	-12320 (60)	8307 (12)	29 (5)
C102	-592 (11)	22390 (110)	1630 (20)	59 (8)

[0176]

표 5

원자	원자	길이/Å		원자	원자	길이/Å
C1	C2	1.4200		C51	C52	1.4200
C1	C12	1.4200		C51	C62	1.4200
C1	C22	1.434 (18)		C51	C72	1.586 (15)
C2	C3	1.4200		C52	C53	1.4200
C2	O21	1.13 (4)		C52	O71	1.333 (17)
C3	C4	1.4200		C53	C54	1.4200

[0177]

C3	C13	1.36(6)		C53	C63	1.52(2)
C4	C12	1.4200		C54	C62	1.4200
C4	N5	1.325(18)		C54	N55	1.373(18)
C12	C11	1.418(15)		C62	C61	1.400(14)
N5	C6	1.362(18)		N55	C56	1.380(19)
C11	C6	1.3900		C61	C56	1.3900
C11	C10	1.3900		C61	C60	1.3900
C6	C7	1.3900		C56	C57	1.3900
C7	C8	1.3900		C57	C58	1.3900
C8	C9	1.3900		C58	C59	1.3900
C9	C10	1.3900		C59	C60	1.3900
C13	C14	1.47(5)		C63	C64	1.44(2)
C14	C15	1.3900		C64	C65	1.3900
C14	C19	1.3900		C64	C69	1.3900
C15	C16	1.3900		C65	C66	1.3900
C16	C17	1.3900		C66	C67	1.3900
C17	C18	1.3900		C67	C68	1.3900
C17	O20	1.48(4)		C67	O70	1.39(4)
C18	C19	1.3900		C68	C69	1.3900
C22	C23	1.4200		C72	C73	1.4200
C22	C33	1.4200		C72	C83	1.4200
C23	C24	1.4200		C73	C74	1.4200
C23	O42	1.33(2)		C73	O92	1.21(2)
C24	C25	1.4200		C74	C75	1.4200
C24	C34	1.33(2)		C74	C84	1.76(3)
C25	C33	1.4200		C75	C83	1.4200

[0178]

C25	N26	1.36 (2)		C75	N76	1.314 (15)
C33	C32	1.422 (15)		C83	C82	1.409 (13)
N26	C27	1.39 (2)		N76	C77	1.360 (15)
C32	C27	1.3900		C82	C77	1.3900
C32	C31	1.3900		C82	C81	1.3900
C27	C28	1.3900		C77	C78	1.3900
C28	C29	1.3900		C78	C79	1.3900
C29	C30	1.3900		C79	C80	1.3900
C30	C31	1.3900		C80	C81	1.3900
C34	C35	1.54 (2)		C84	C85	1.28 (2)
C35	C36	1.3900		C85	C86	1.3900
C35	C40	1.3900		C85	C90	1.3900
C36	C37	1.3900		C86	C87	1.3900
C37	C38	1.3900		C87	C88	1.3900
C38	C39	1.3900		C88	C89	1.3900
C38	O41	1.44 (3)		C88	O91	1.23 (3)
C39	C40	1.3900		C89	C90	1.3900

[0179]

표 6

원자	원자	원자	각/°		원자	원자	원자	각/°
C2	C1	C22	130.7 (14)		C52	C51	C62	108.0
C12	C1	C2	108.0		C52	C51	C72	123.7 (12)
C12	C1	C22	121.3 (14)		C62	C51	C72	128.3 (11)
C1	C2	C3	108.0		C53	C52	C51	108.0
O21	C2	C1	126 (2)		O71	C52	C51	120.8 (12)
O21	C2	C3	125 (2)		O71	C52	C53	130.2 (11)
C2	C3	C13	121 (3)		C52	C53	C54	108.0

[0180]

C4	C3	C2	108.0		C52	C53	C63	115.3(11)
C4	C3	C13	130(3)		C54	C53	C63	136.1(11)
C12	C4	C3	108.0		C62	C54	C53	108.0
N5	C4	C3	126.4(17)		N55	C54	C53	143.5(12)
N5	C4	C12	121.5(17)		N55	C54	C62	108.4(12)
C1	C12	C4	108.0		C54	C62	C51	108.0
C11	C12	C1	157.9(15)		C61	C62	C51	139.9(12)
C11	C12	C4	92.2(14)		C61	C62	C54	112.1(12)
C4	N5	C6	102.3(17)		C54	N55	C56	102.1(15)
C6	C11	C12	116.0(14)		C56	C61	C62	98.5(12)
C6	C11	C10	120.0		C56	C61	C60	120.0
C10	C11	C12	124.0(14)		C60	C61	C62	141.5(12)
N5	C6	C11	106.3(14)		N55	C56	C61	118.6(14)
N5	C6	C7	133.5(14)		N55	C56	C57	121.3(14)
C11	C6	C7	120.0		C57	C56	C61	120.0
C8	C7	C6	120.0		C56	C57	C58	120.0
C9	C8	C7	120.0		C57	C58	C59	120.0
C8	C9	C10	120.0		C58	C59	C60	120.0
C9	C10	C11	120.0		C59	C60	C61	120.0
C14	C13	C3	148(5)		C64	C63	C53	124.7(15)
C15	C14	C13	127(3)		C65	C64	C63	110.1(12)
C15	C14	C19	120.0		C65	C64	C69	120.0
C19	C14	C13	113(3)		C69	C64	C63	129.8(12)
C16	C15	C14	120.0		C66	C65	C64	120.0
C15	C16	C17	120.0		C65	C66	C67	120.0
C16	C17	C18	120.0		C68	C67	C66	120.0

[0181]

C16	C17	O20	111.4		O70	C67	C66	120.2
C18	C17	O20	128.4		O70	C67	C68	117.2
C19	C18	C17	120.0		C67	C68	C69	120.0
C18	C19	C14	120.0		C68	C69	C64	120.0
C23	C22	C1	121.1(14)		C73	C72	C51	120.8(11)
C23	C22	C33	108.0		C83	C72	C51	131.1(12)
C33	C22	C1	130.8(14)		C83	C72	C73	108.0
C22	C23	C24	108.0		C74	C73	C72	108.0
O42	C23	C22	128.9(16)		O92	C73	C72	123.1(14)
O42	C23	C24	120.3(16)		O92	C73	C74	127.7(14)
C25	C24	C23	108.0		C73	C74	C75	108.0
C34	C24	C23	120.8(15)		C73	C74	C84	115.5(12)
C34	C24	C25	131.0(15)		C75	C74	C84	135.8(12)
C24	C25	C33	108.0		C83	C75	C74	108.0
N26	C25	C24	144.7(17)		N76	C75	C74	135.0(13)
N26	C25	C33	106.8(17)		N76	C75	C83	115.8(13)
C22	C33	C32	142.3(15)		C75	C83	C72	108.0
C25	C33	C22	108.0		C82	C83	C72	148.2(12)
C25	C33	C32	109.4(15)		C82	C83	C75	103.7(12)
C25	N26	C27	108.2		C75	N76	C77	100.4(13)
C27	C32	C33	104.1(14)		C77	C82	C83	102.8(11)
C27	C32	C31	120.0		C77	C82	C81	120.0
C31	C32	C33	135.9(14)		C81	C82	C83	136.9(11)
C32	C27	N26	110.5(15)		N76	C77	C82	116.6(12)
C28	C27	N26	128.9(15)		N76	C77	C78	123.3(12)
C28	C27	C32	120.0		C82	C77	C78	120.0

[0182]

C27	C28	C29	120.0		C77	C78	C79	120.0
C30	C29	C28	120.0		C80	C79	C78	120.0
C29	C30	C31	120.0		C81	C80	C79	120.0
C30	C31	C32	120.0		C80	C81	C82	120.0
C24	C34	C35	139.2 (18)		C85	C84	C74	130.3 (19)
C36	C35	C34	121.2 (14)		C84	C85	C86	111.1 (15)
C36	C35	C40	120.0		C84	C85	C90	128.8 (15)
C40	C35	C34	118.7 (14)		C86	C85	C90	120.0
C35	C36	C37	120.0		C85	C86	C87	120.0
C38	C37	C36	120.0		C86	C87	C88	120.0
C37	C38	O41	115.8 (15)		C89	C88	C87	120.0
C39	C38	C37	120.0		O91	C88	C87	116.3 (18)
C39	C38	O41	123.8 (15)		O91	C88	C89	123.1 (18)
C38	C39	C40	120.0		C90	C89	C88	120.0
C39	C40	C35	120.0		C89	C90	C85	120.0

[0183]

표 7

A	B	C	D	각/°		A	B	C	D	각/°
C1	C2	C3	C4	0.0		C51	C52	C53	C54	0.0
C1	C2	C3	C13	171 (3)		C51	C52	C53	C63	172.9 (16)
C1	C12	C11	C6	152 (4)		C51	C62	C61	C56	179.0 (17)
C1	C12	C11	C10	-27 (6)		C51	C62	C61	C60	-1 (3)
C1	C22	C23	C24	176 (2)		C51	C72	C73	C74	-178 (2)
C1	C22	C23	O42	-23 (3)		C51	C72	C73	O92	14 (2)
C1	C22	C33	C25	-175 (3)		C51	C72	C83	C75	178 (2)
C1	C22	C33	C32	11 (4)		C51	C72	C83	C82	2 (3)
C2	C1	C12	C4	0.0		C52	C51	C62	C54	0.0

[0184]

C2	C1	C12	C11	-155 (5)		C52	C51	C62	C61	-180 (2)
C2	C1	C22	C23	142.9 (16)		C52	C51	C72	C73	- 144.8 (14)
C2	C1	C22	C33	-42 (3)		C52	C51	C72	C83	38 (2)
C2	C3	C4	C12	0.0		C52	C53	C54	C62	0.0
C2	C3	C4	N5	157 (3)		C52	C53	C54	N55	-178 (3)
C2	C3	C13	C14	173 (7)		C52	C53	C63	C64	175.7 (18)
C3	C4	C12	C1	0.0		C53	C54	C62	C51	0.0
C3	C4	C12	C11	171 (2)		C53	C54	C62	C61	179.7 (16)
C3	C4	N5	C6	- 169.2 (19)		C53	C54	N55	C56	- 179.1 (18)
C3	C13	C14	C15	-150 (7)		C53	C63	C64	C65	- 173.7 (14)
C3	C13	C14	C19	32 (10)		C53	C63	C64	C69	11 (3)
C4	C3	C13	C14	-19 (11)		C54	C53	C63	C64	-14 (3)
C4	C12	C11	C6	-5.0 (15)		C54	C62	C61	C56	-0.5 (16)
C4	C12	C11	C10	176.5 (16)		C54	C62	C61	C60	179.8 (17)
C4	N5	C6	C11	9 (2)		C54	N55	C56	C61	-4 (3)
C4	N5	C6	C7	-175 (2)		C54	N55	C56	C57	178.7 (14)
C12	C1	C2	C3	0.0		C62	C51	C52	C53	0.0
C12	C1	C2	O21	-172 (3)		C62	C51	C52	O71	169.7 (16)
C12	C1	C22	C23	-36 (3)		C62	C51	C72	C73	34 (2)
C12	C1	C22	C33	139.2 (18)		C62	C51	C72	C83	- 143.8 (14)
C12	C4	N5	C6	-15 (3)		C62	C54	N55	C56	3 (2)
C12	C11	C6	N5	-2 (2)		C62	C61	C56	N55	3 (2)
C12	C11	C6	C7	-179 (2)		C62	C61	C56	C57	- 179.8 (15)

[0185]

C12	C11	C10	C9	178 (2)		C62	C61	C60	C59	180 (2)
N5	C4	C12	C1	-158 (3)		N55	C54	C62	C51	178.5 (18)
N5	C4	C12	C11	12 (2)		N55	C54	C62	C61	-2 (2)
N5	C6	C7	C8	-175 (3)		N55	C56	C57	C58	177 (2)
C11	C6	C7	C8	0.0		C61	C56	C57	C58	0.0
C6	C11	C10	C9	0.0		C56	C61	C60	C59	0.0
C6	C7	C8	C9	0.0		C56	C57	C58	C59	0.0
C7	C8	C9	C10	0.0		C57	C58	C59	C60	0.0
C8	C9	C10	C11	0.0		C58	C59	C60	C61	0.0
C10	C11	C6	N5	176 (2)		C60	C61	C56	N55	-177 (2)
C10	C11	C6	C7	0.0		C60	C61	C56	C57	0.0
C13	C3	C4	C12	-170 (4)		C63	C53	C54	C62	-171 (2)
C13	C3	C4	N5	-12 (4)		C63	C53	C54	N55	12 (3)
C13	C14	C15	C16	-177 (4)		C63	C64	C65	C66	-176 (2)
C13	C14	C19	C18	178 (4)		C63	C64	C69	C68	175 (2)
C14	C15	C16	C17	0.0		C64	C65	C66	C67	0.0
C15	C14	C19	C18	0.0		C65	C64	C69	C68	0.0
C15	C16	C17	C18	0.0		C65	C66	C67	C68	0.0
C15	C16	C17	O20	-167 (5)		C65	C66	C67	O70	-159 (3)
C16	C17	C18	C19	0.0		C66	C67	C68	C69	0.0
C17	C18	C19	C14	0.0		C67	C68	C69	C64	0.0
C19	C14	C15	C16	0.0		C69	C64	C65	C66	0.0
O20	C17	C18	C19	165 (5)		O70	C67	C68	C69	160 (3)
O21	C2	C3	C4	172 (3)		O71	C52	C53	C54	- 168.4 (18)
O21	C2	C3	C13	-17 (4)		O71	C52	C53	C63	5 (2)
C22	C1	C2	C3	-179 (2)		C72	C51	C52	C53	178.8 (19)

[0186]

C22	C1	C2	O21	9 (4)		C72	C51	C52	O71	-11 (2)
C22	C1	C12	C4	179 (2)		C72	C51	C62	C54	-179 (2)
C22	C1	C12	C11	24 (6)		C72	C51	C62	C61	2 (3)
C22	C23	C24	C25	0.0		C72	C73	C74	C75	0.0
C22	C23	C24	C34	175 (2)		C72	C73	C74	C84	172.0 (19)
C22	C33	C32	C27	177 (2)		C72	C83	C82	C77	172 (2)
C22	C33	C32	C31	-3 (4)		C72	C83	C82	C81	-15 (3)
C23	C22	C33	C25	0.0		C73	C72	C83	C75	0.0
C23	C22	C33	C32	-173 (3)		C73	C72	C83	C82	-175 (3)
C23	C24	C25	C33	0.0		C73	C74	C75	C83	0.0
C23	C24	C25	N26	170 (5)		C73	C74	C75	N76	166 (2)
C23	C24	C34	C35	175 (2)		C73	C74	C84	C85	-179 (2)
C24	C25	C33	C22	0.0		C74	C75	C83	C72	0.0
C24	C25	C33	C32	176 (2)		C74	C75	C83	C82	177.5 (15)
C24	C25	N26	C27	-177 (2)		C74	C75	N76	C77	- 174.2 (15)
C24	C34	C35	C36	-169 (2)		C74	C84	C85	C86	- 172.5 (19)
C24	C34	C35	C40	6 (3)		C74	C84	C85	C90	11 (4)
C25	C24	C34	C35	-11 (4)		C75	C74	C84	C85	-10 (4)
C25	C33	C32	C27	4.0 (17)		C75	C83	C82	C77	-3.6 (14)
C25	C33	C32	C31	- 176.2 (16)		C75	C83	C82	C81	169.7 (15)
C25	N26	C27	C32	9 (4)		C75	N76	C77	C82	6.2 (18)
C25	N26	C27	C28	- 179.5 (19)		C75	N76	C77	C78	- 169.9 (13)
C33	C22	C23	C24	0.0		C83	C72	C73	C74	0.0

[0187]

C33	C22	C23	O42	161 (3)		C83	C72	C73	O92	-168.4 (19)
C33	C25	N26	C27	-6 (4)		C83	C75	N76	C77	-9 (2)
C33	C32	C27	N26	-8 (3)		C83	C82	C77	N76	-1.5 (15)
C33	C32	C27	C28	179.8 (18)		C83	C82	C77	C78	174.7 (14)
C33	C32	C31	C30	-180 (3)		C83	C82	C81	C80	-172 (2)
N26	C25	C33	C22	-174 (3)		N76	C75	C83	C72	-169.2 (19)
N26	C25	C33	C32	1 (3)		N76	C75	C83	C82	8 (2)
N26	C27	C28	C29	-171 (3)		N76	C77	C78	C79	176.0 (17)
C32	C27	C28	C29	0.0		C82	C77	C78	C79	0.0
C27	C32	C31	C30	0.0		C77	C82	C81	C80	0.0
C27	C28	C29	C30	0.0		C77	C78	C79	C80	0.0
C28	C29	C30	C31	0.0		C78	C79	C80	C81	0.0
C29	C30	C31	C32	0.0		C79	C80	C81	C82	0.0
C31	C32	C27	N26	172 (3)		C81	C82	C77	N76	-176.2 (16)
C31	C32	C27	C28	0.0		C81	C82	C77	C78	0.0
C34	C24	C25	C33	-175 (2)		C84	C74	C75	C83	-170 (2)
C34	C24	C25	N26	-4 (5)		C84	C74	C75	N76	-3 (3)
C34	C35	C36	C37	176 (2)		C84	C85	C86	C87	-177 (2)
C34	C35	C40	C39	-176 (2)		C84	C85	C90	C89	176 (2)
C35	C36	C37	C38	0.0		C85	C86	C87	C88	0.0
C36	C35	C40	C39	0.0		C86	C85	C90	C89	0.0
C36	C37	C38	C39	0.0		C86	C87	C88	C89	0.0
C36	C37	C38	O41	173 (2)		C86	C87	C88	O91	-171 (2)
C37	C38	C39	C40	0.0		C87	C88	C89	C90	0.0

[0188]

C38	C39	C40	C35	0.0		C88	C89	C90	C85	0.0
C40	C35	C36	C37	0.0		C90	C85	C86	C87	0.0
O41	C38	C39	C40	-173 (2)		O91	C88	C89	C90	170 (2)
O42	C23	C24	C25	-163 (2)		O92	C73	C74	C75	168 (2)
O42	C23	C24	C34	13 (2)		O92	C73	C74	C84	-20 (2)

[0189]

[0190]

노트

[0191]

수집된 회절 데이터 프로세싱에서 결정이 다중으로 쌍정된 것으로 발견되었으며, 소프트웨어 제조업체에 의해 구현된 적절한 절차가 사용되어야 했다는 점에 주목한다. 구조 모델 리파인먼트 파라미터 (R_1 , wR_2 , GoF) (표 4)는 만족스럽지 못하지만, 위상 문제 해결 동안 수득한 원래 모델이 기대와 일치하고, 화학적으로 일관적이라는 사실은 가정된 구조 모델이 정확했다는 것을 강력하게 시사하였다. 추가로, 모델은 리파인먼트 동안 상대적으로 안정적인 거동을 보였으며, 이는 구조 모델이 실제와 일치하지 않을 때마다 빈번하게 발생하더라도, 모델

붕괴는 발생하지 않았다는 것을 의미한다.

[0192] 제안된 구조 모델은 Pc 공간군과 일치하는 격자 대칭을 취한다. 비대칭 단위는 분석된 화합물의 두 분자를 포함한다 (도 8a).

[0193] 각 분자는 크게 동일 평면에 있는 2개의 단편으로 구성된다. 따라서 상당한 정도의 비틀림 각은 분석된 분자의 입체구조를 결정한다: C2-C1-C22-C23 $-142.9(16)^\circ$ 및 C52-C51-C72-C73 $-144.8(14)^\circ$.

[0194] 020과 070 말단 히드록실 산소 원자 사이의 거리가 2.71 Å인 것은 원자 사이의 수소 결합을 시사한다.

[0195] 탄소 원자로 예비 분류된, 공유 결합되지 않은 두 C101 및 C102 원자가 모델에서 주목되고 있다. 이는 획득된 데이터의 품질로 인한 아티팩트일 수 있지만, 이의 히드록실 산소 원자로부터의 거리 (O41-C101 2.679 Å 및 O91-C102 2.734 Å)는 상기 위치에 수소 결합이 존재할 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, 이는 잔류 용매 분자에서 발견되는 산소 원자일 것이라고 가정할 수 있다.

[0196] 실시예 9

[0197] 실시예 1에 따라 수득된 스시토네민 샘플을 DMSO (디메틸설폭시드)에 1중량% 농도로 용해시킨 후, 표준절차에 따라 사용되는 분광광도계 (제조사: 배리언(Varian), 모델: CARY 100 스캔)를 이용하여 두께가 1 cm인 큐벳에서 2개의 파장 (305 및 393 nm)에 대하여 흡광도를 측정하였다. 하기와 같은 결과가 수득하였다:

[0198] UV 흡수 및 흡광 계수:

[0199] · 비흡광(specific extinction)/1% (305 nm에서): 330

[0200] · 비흡광/1% (393 nm에 대해): 730

[0201] ·

[0202]

참고문헌

- Proteau PJ, Gerwick WH, Garcia-Pichel F, Castenholz R. *Experientia* 1993, 49, 825-829.
- Fleming ED, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 9: 1448-1455.
- Rastogi RP, Incharoensakdi A. 2014. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 244-256.
- Wolk CP. (1988) Purification and storage of nitrogen fixing filamentous cyanobacteria *Methods Enzymol.*, 167, pp. 93-100
- Anahas AMP, Muralitharan G (2015) Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Bioresource technology* 184:9-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.003>
- Balskus EP, Case RJ, Walsh CT (2011) The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiol Ecol* 77 (2):322-332. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01113.x
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111 (1):1-61
- Singh J, Tripathi R, Thakur IS (2014) Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO₂ and biodiesel production. *Bioresource technology* 166:345-352. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.055>
- Greiter F, (1974) Sun protection factor-development methods. *Parf Kosm.* 55:70-75

[0203]

- Rigaku Oxford Diffraction 2018, CrysAlisPro Software system, version 1.171.64.93a, Rigaku Corporation, Oxford, UK.
- Sheldrick GM, SHELXT-Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination, *Acta Crystallographica Section A* 2015, A71, 3-8.
- Sheldrick GM, Crystal structure refinement with SHELXL *Acta Crystallographica, Section C* 2015, C71, 3-8.
- Macrae CF, Sovago I, Cottrell SJ, Galek PTA, McCabe P, Pidcock E, Platings M, Shields GP, Stevens JS, Towler M and Wood PA, Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction, *J. Appl. Cryst.* 2020, 53, 226-235.

[0204]

스페인 조류 은행

그란 카나리아 데 라스 팔마스의 대학

특허 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약
원기탁에 대한 수탁증

국제양식

수신
명칭: 유베라 에스.에이.
주소: 폴란드
90-151 우즈
ul. Dr. 안 무진스키 2 / 3.18

페이지 하단에 표시된
스페인 조류 은행(BEA)에 의해
규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물 동정	
기탁자에 의한 식별 참조번호: <i>Choococidiopsis</i> UVERA_03	BEA에 의한 수탁번호: BEA_IDA_0068B
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
상기 I의 미생물에는 하기의 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다. () 과학적 설명 (X) 분류학상 위치 (해당되는 경우에 표시함)	
III. 수령 및 수탁	
BEA는 2019년 10월 2일(원 기탁일) ¹ 에 수령된 상기 I의 미생물을 수탁한다.	
IV. 이관 청구의 수령	
BEA는 (이용가능하지 않은) (원 기탁일)에 상기 I의 미생물을 수탁하였으며, (이용가능하지 않은) (이관 청구 수령일)에 원 기탁을 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관 청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 스페인 조류 은행(BEA) 주소: 스페인 라스 팔마스 - s/n 35214 델데 무에에 데 파리아르페 라스 팔마스 데 GC의 대학	날짜: 2019년 10월 2일 BEA 배양 컬렉션의 관리자 안테라 마르텔 키타나 박사 라스 팔마스 데 GC의 대학의 법정 대리인 연구 개발 및 혁신 담당 부총장 호세 파블로 수아레즈 리베로 박사

¹ 규칙 6.4.d)가 적용되는 경우, 이 날짜는 국제기탁기관의 자격이 획득된 날짜이다.

양식 BEA BP/4(단독면)

[0205]

스페인 조류 은행

그란 카나리아 데 라스 팔마스의 대학

특허 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제양식

수신
명칭: 유베라 에스.에이.
주소: 폴란드
90-151 우쯔
ul. Dr. 안 무진스키 2 / 3.10

하기 페이지에 표시된
스페인 조류 은행에 의해
규칙 10.2에 따라 발행된
생존 진술서

I. 기탁자	II. 미생물 등정
명칭: 유베라 에스.에이. 주소: 폴란드 90-151 우쯔 ul. Dr. 안 무진스키 2 / 3.10	BNA 수탁번호: BEA_IDA_0068B 기탁일 또는 이전일 ¹ : 2019년 10월 2일
III. 생존 진술	
상기 II의 미생물 생존성은 2019년 10월 2일자로 시험되었다 ² . 시험일에, 이 미생물은 (X) ³ 생존가능한 상태였다. () ³ 더 이상 생존 불가능한 상태였다.	

¹ 원 기탁일, 또는 기탁이나 이전이 이루어진 경우, 가장 최근일(신규 기탁일 또는 이전일)을 가리킨다.
² 규칙 10.2 a)iii) 및 iii)이 적용되는 경우, 가장 최근의 생존 시험을 의미한다.
³ 해당되는 칸에 표시한다.

양식 BEA BP/9(첫 면)

[0206]

스페인 조류 은행

그런 카나리아 데 라스 팔마스의 대하

IV. 생존시험 수행시의 조건⁴

생존시험은 Chococoddidiopsis UVERA_03 균주를 액체 BG11에서 계대배양함으로써(Rippka et al., 1979)(25°C, 55µmol 광자 m⁻²s⁻¹, 14:10 (명:암) 광주기) 및 냉동보존(Brand J: Protocols in www-cyanosite.bio.purdue.edu/protocols/cryo.html)함으로써 수행되었다. 각각 여러 차례의 계대배양과 해동 후, 배양물이 생존가능한 것으로 나타났다.

V. 국제기탁기관

명칭: 스페인 조류 은행(BEA) 주소: 스페인 라스 팔마스 - s/n 35214 텔데 무예에 데 파리아르데 라스 팔마스 데 GC의 대학	날짜: 2019년 10월 2일 BEA 배양 컬렉션의 관리자 안테라 마르텔 키타나 박사	라스 팔마스 데 GC의 대학의 법정 대리인 연구 개발 및 혁신 담당 부총장 호세 마블로 수아레스 리베로 박사
--	---	--

⁴ 정보가 요청되는 시험 결과가 음성인 경우 기입한다.

양식 BEA BP/9(2면 및 최종면)

스페인 조류 은행

그란 카나리아 데 라스 팔마스의 대학

특허 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약
원기탁에 대한 수탁증

국제양식

수신
명칭: 유페라 에스.에이.
주소: 폴란드
90-151 우프
무진스키 2 / 3.18

페이지 하단에 표시된
스페인 조류 은행(BEA)에 의해
규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물 동정	
기탁자에 의한 식별 참조번호: UVERA_02	BEA에 의한 수탁번호: BEA_IDA_0075B
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
상기 I의 미생물에는 하기의 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다. () 과학적 설명 (X) 분류학상 위치 (해당되는 경우에 표시함)	
III. 수령 및 수탁	
BEA는 2020년 10월 5일(원 기탁일) ¹ 에 수령된 상기 I의 미생물을 수탁한다.	
IV. 이관 청구의 수령	
BEA는 (이용가능하지 않은) (원 기탁일)에 상기 I의 미생물을 수탁하였으며, (이용가능하지 않은) (이관 청구 수령일)에 원 기탁을 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관 청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 스페인 조류 은행(BEA) 주소: 스페인 라스 팔마스 - s/n 35214 델데 무에예 데 파리아르페 라스 팔마스 데 GC의 대학	날짜: 2020년 10월 5일 BEA 배양 컬렉션의 관리자 안테라 마르텔 키타나 박사 라스 팔마스 데 GC의 대학의 법정 대리인 연구 개발 및 혁신 담당 부총장 호세 파블로 수아레스 리베로 박사

¹ 규칙 6.4.d)가 적용되는 경우, 이 날짜는 국제기탁기관의 자격이 획득된 날짜이다.

양식 BEA BP/4(단독면)

[0208]

스페인 조류 은행

그란 카나리아 데 라스 팔마스의 대학

특허 절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제양식

수신 명칭: 유베라 에스.에이. 주소: 폴란드 90-151 우쯔 무진스키 2 / 3.18	하기 페이지에 표시된 스페인 조류 은행에 의해 규칙 10.2에 따라 발행된 생존 진술서
I. 기탁자 명칭: 유베라 에스.에이. 주소: 폴란드 90-151 우쯔 무진스키 2 / 3.18	II. 미생물 동정 BNA 수탁번호: BEA_IDA_0075B 기탁일 또는 이전일¹: 2020년 10월 5일
III. 생존 진술 상기 II의 미생물 생존성은 2019년 10월 2일자로 시험되었다². 시험일에, 이 미생물은 (X)⁸ 생존가능한 상태였다. ()⁸ 더 이상 생존 불가능한 상태였다.	

¹ 원 기탁일, 또는 기탁이나 이전이 이루어진 경우, 가장 최근일(신규 기탁일 또는 이전일)을 가리킨다.
² 규칙 10.2 a)iii) 및 iii)이 적용되는 경우, 가장 최근의 생존 시험을 의미한다.
⁸ 해당되는 칸에 표시한다.

양식 BEA BP/9(첫 면)

[0209]

스페인 조류 은행

그란 카나리아 데 라스 팔마스의 대학

IV. 생존시험 수행시의 조건 ⁴		
생존시험은 BP/1 양식 내 기탁자에 의해 설명된 조건 하에 수행되었다.		
V. 국제기탁기관		
명칭: 스페인 조류 은행(BEA) 주소: 스페인 라스 팔마스 - s/n 35214 델데 무에예 데 파리아르페 라스 팔마스 데 GC의 대학	날짜: 2020년 10월 5일 BEA 배양 컬렉션의 관리자	라스 팔마스 데 GC의 대학의 법정 대리인 연구 개발 및 혁신 담당 부총장 안테라 마르텔 키타나 박사 호세 파블로 수아레스 리베로 박사

⁴ 정보가 요청되는 시험 결과가 음성인 경우 기입한다.

[0210] 양식 BEA BP/9(2면 및 최종면)

수탁번호

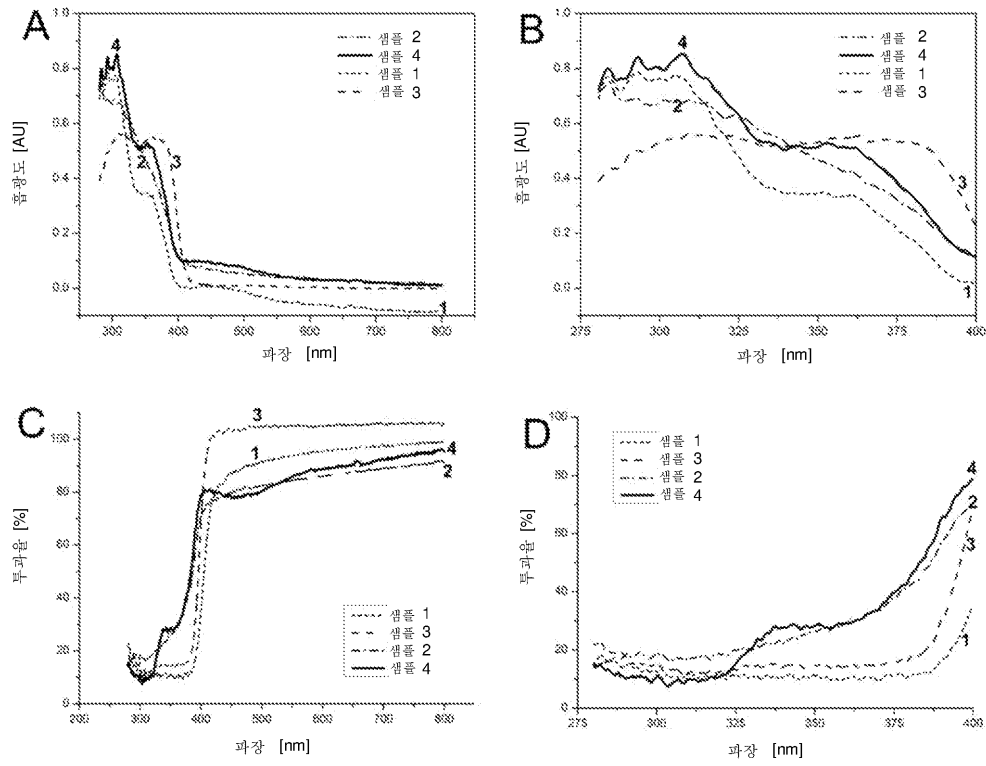
[0211]

기탁기관명 : BEA
수탁번호 : BEA-IDA-0068B
수탁일자 : 20191002

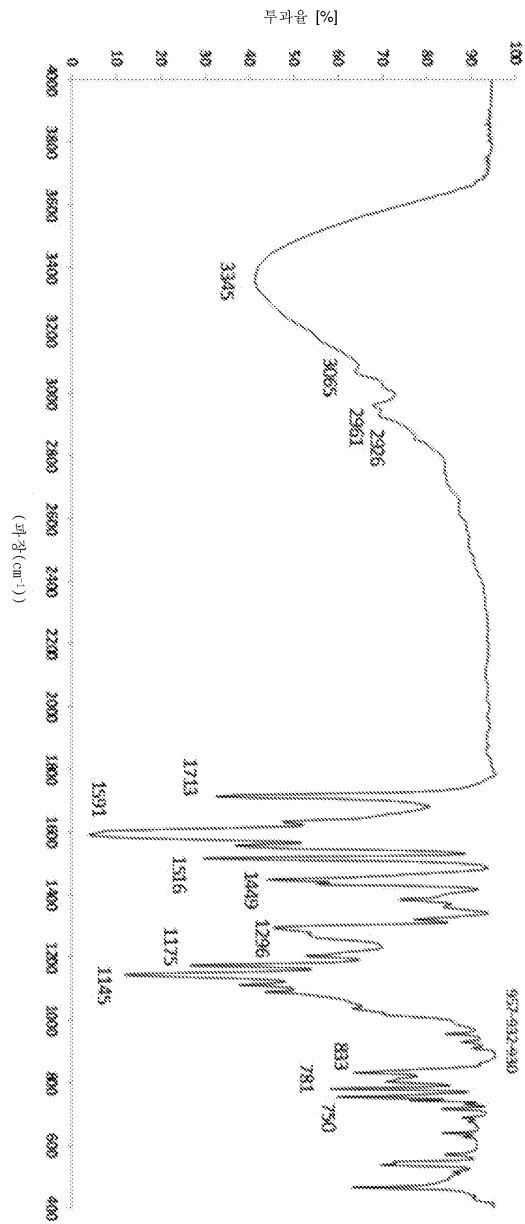
기탁기관명 : BEA
수탁번호 : BEA-IDA-0075B
수탁일자 : 20201005

도면

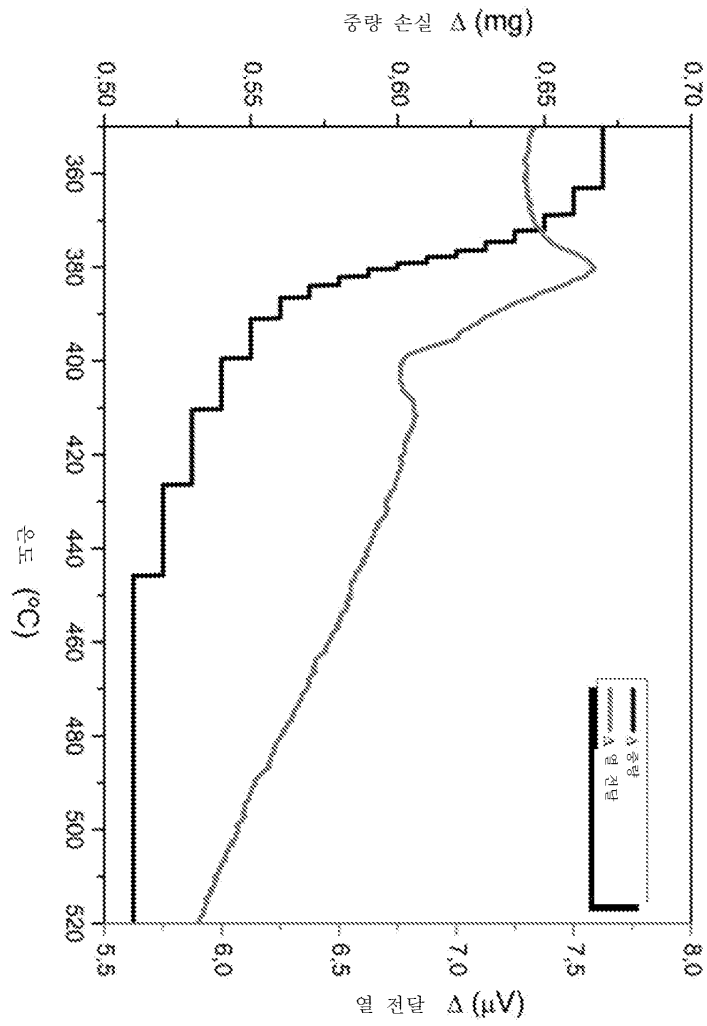
도면1



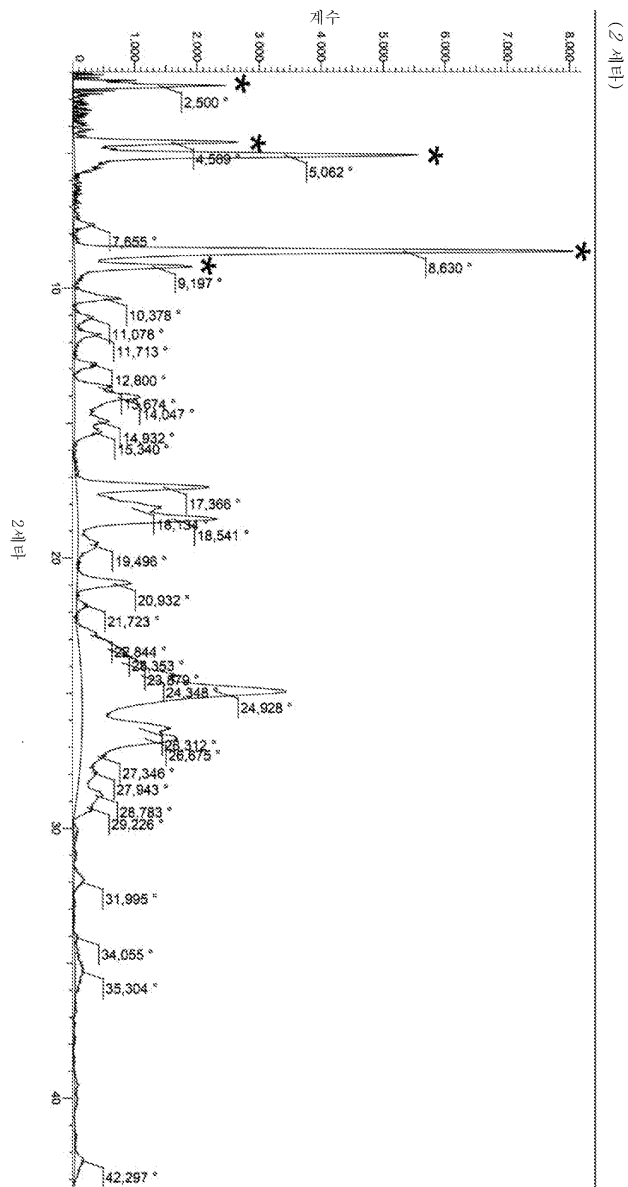
도면2



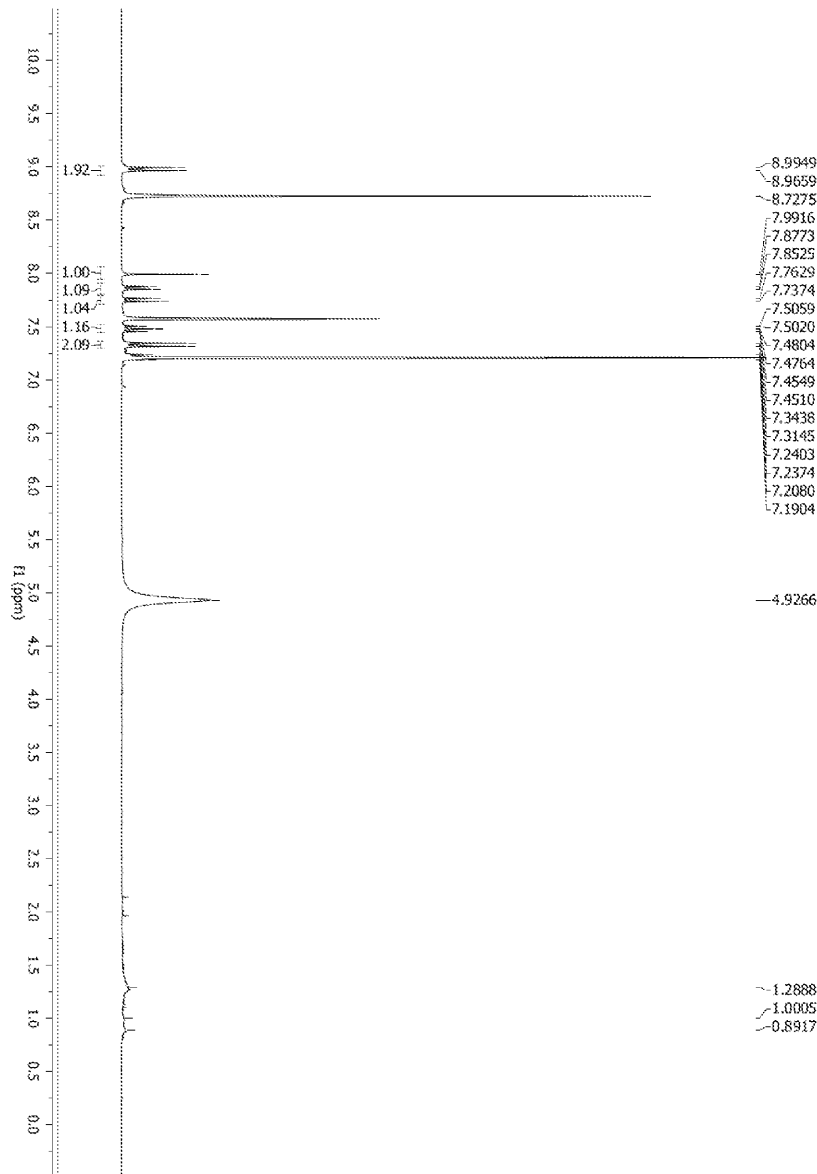
도면3



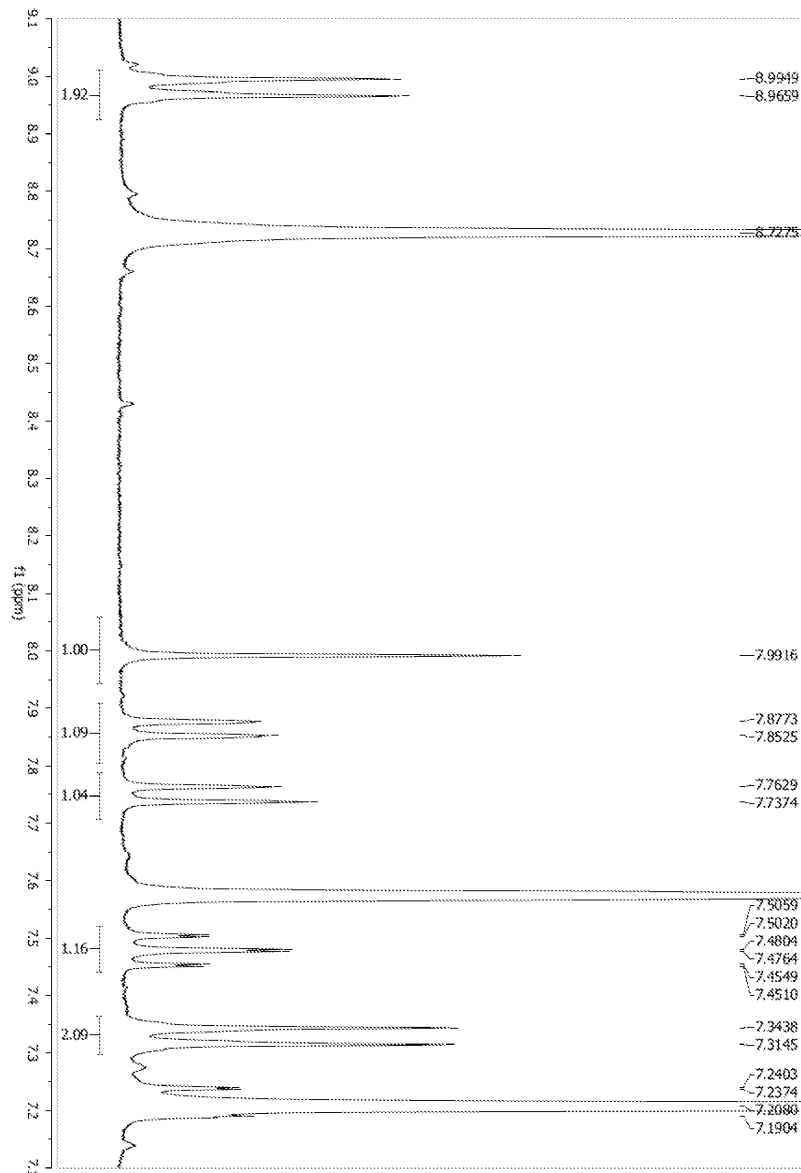
도면4



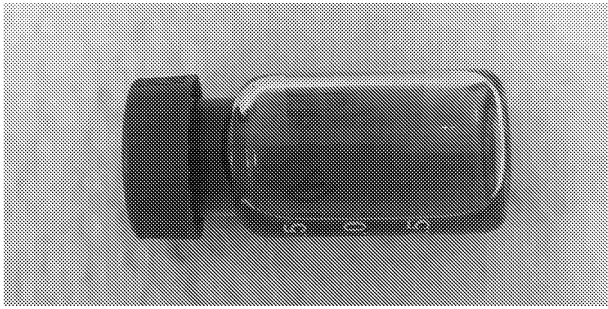
도면5



도면5a



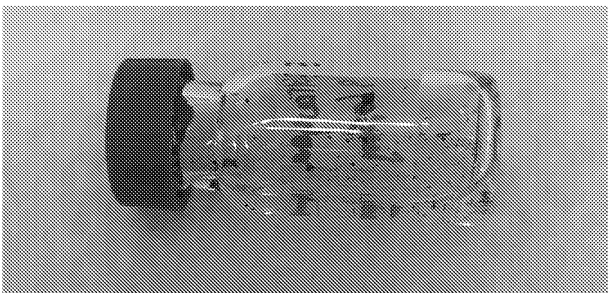
도면6ac



도 6a



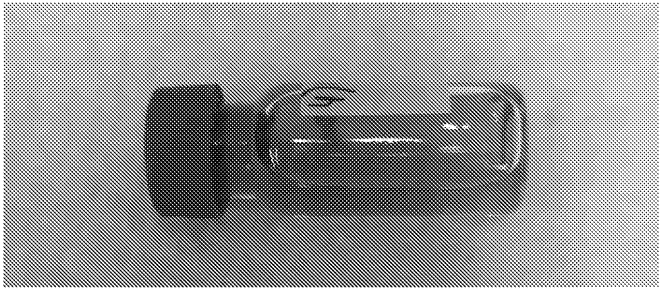
도 6b



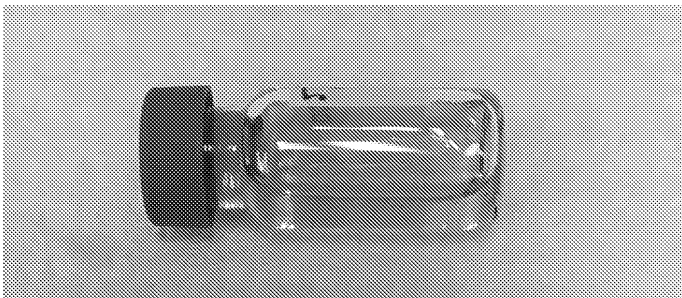
도 6c

도면6df

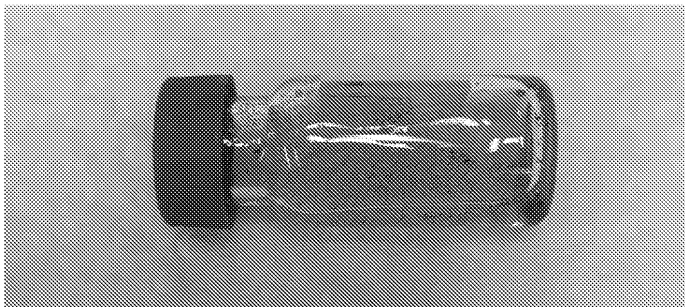
도 6d



도 6d

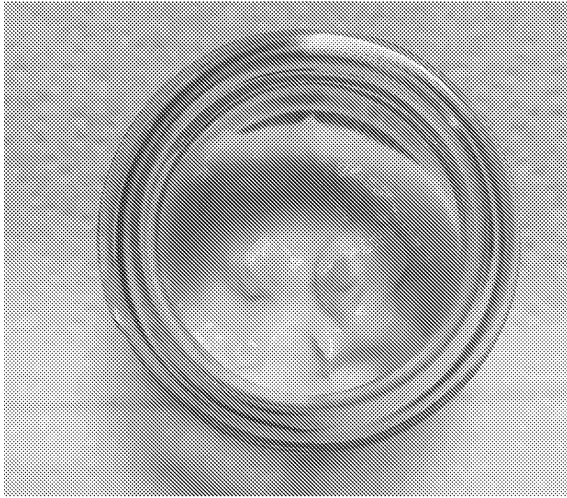


도 6e



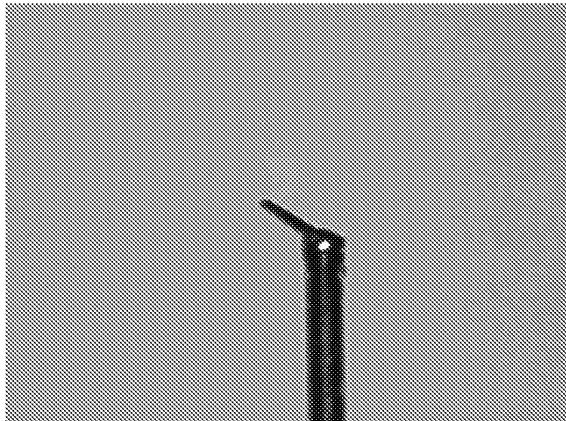
도 6f

도면6g



도 6g

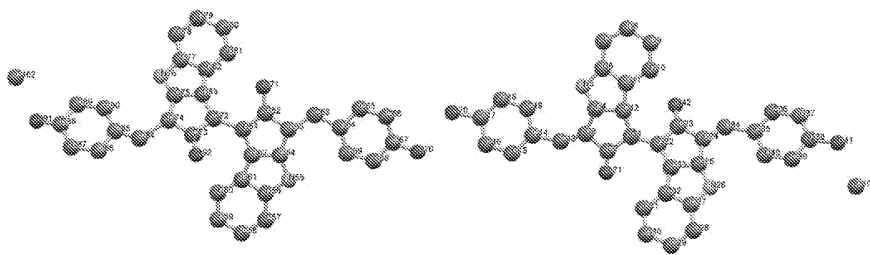
도면7a



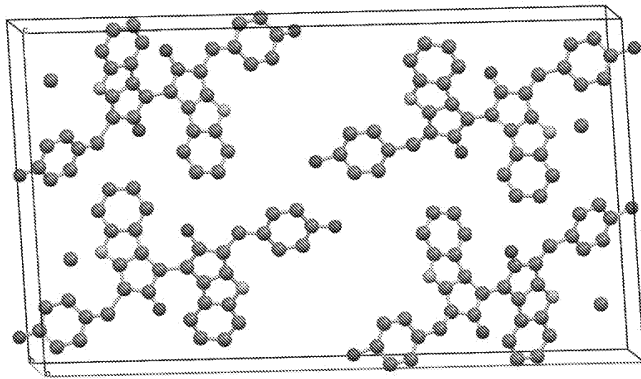
도면7b



도면8a

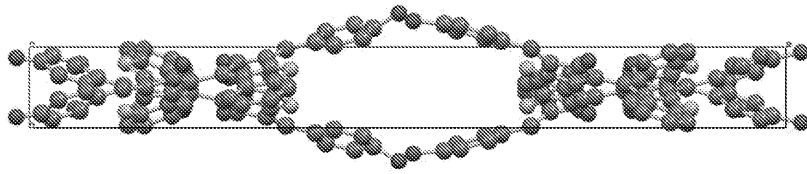


도 8a

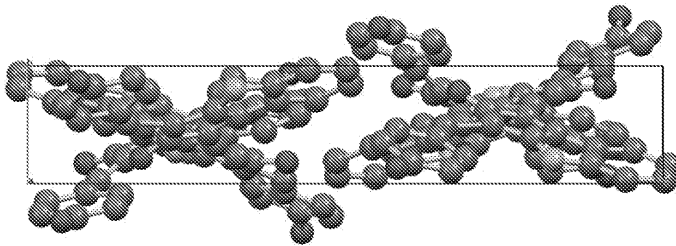


도 8b

도면8cd



도 8c



도 8d