(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0014645
(43) 공개일자 2024년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 37/46 (2006.01) *A01N 65/04* (2009.01)
A01P 13/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 37/46 (2013.01)
A01N 65/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0091610
(22) 출원일자 2022년07월25일
심사청구일자 2023년06월30일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)
(72) 발명자
박우준
서울 강남구 언주로 420(역삼동, 역삼자이아파트) 101동 2105호
김원재
서울특별시 구로구 천왕로 56 (천왕동 천왕 이펜하우스 3단지) 303동 706호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

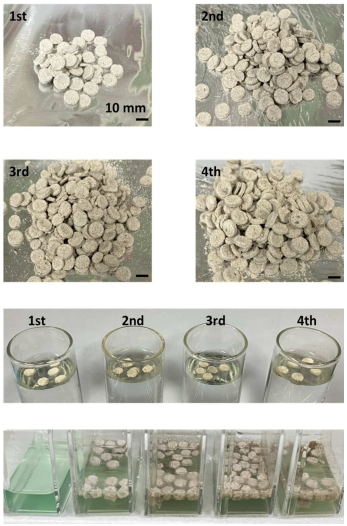
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **라이신 및 바위손을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 라이신 및 바위손을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 녹조 제거용 조성물은 라이신과 바위손을 혼합하여 남세균 성장 억제 및 사멸 효과가 현저히 상승되는 효과가 있어 적은 양으로도 수환경 내에 다양한 수생식물이나 미생물에 영향을 미치지 않으므로서 생태계의 피괴 없이 친환경적으로 녹조를 제거할 수 있는 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A01P 13/00 (2021.08)
(72) 발명자
허준미
경기도 고양시 일산 서구 대산로 161 501-703
정은희
인천광역시 서구 청라에메랄드로 76번길 14 157-1703
박혜윤
경기도 안양시 동안구 경수대로 610번길 36(더샾아이파크) 111동 1102호
윤혁준
인천광역시 서구 청라한내로100번길 8-16, 9층 102-907호 (청라동, 현대썬앤빌더테라스레이크)
허문석
인천광역시 서구 완정로34번길 20, 104동 203호 (마전동, 동아아파트)
이병희
서울특별시 양천구 목동동로 189 삼성쉐르빌 A-407
차예지
서울특별시 동대문구 고산자로 534 (제기동, 한신아파트) 103-2102
김민경
충청남도 논산시 대림길 7 (부창동 대림아파트) 105동 2103호
박예림
경기도 의왕시 내손순환로 7 (내손동 래미안에버하임아파트) 304동 1403호

명 세 서

청구범위

청구항 1

라이신(lysine) 또는 이의 농화학적으로 허용 가능한 염; 및 바위손(*Selaginella tamariscina*);을 유효성분으로 포함하는, 녹조 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 라이신은 50 내지 1000 μM 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 녹조 제거용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바위손은 200 μm 이하의 입자크기를 가지는 바위손 분쇄물인 것을 특징으로 하는, 녹조 제거용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바위손은 0.05 내지 0.5 %(w/v) 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 녹조 제거용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 녹조류, 남조류 또는 규조류의 생장을 억제하는 것인, 녹조 제거용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 남조류는 마이크로시스티스(*Microcystis*), 아나베나(*Anabaena*), 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 및 오실라토리아(*Oscillatoria*) 속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 남조류인 것을 특징으로 하는, 녹조 제거용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 녹조 제거용 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생 징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 처리는 선박을 이용하여 국부적으로 살포하는 형태로 처리되는 것을 특징으로 하는, 녹조 제거 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 라이신 및 바위손을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 녹조(綠潮, algal bloom)란 강 또는 호수 등 담수환경에서 남조류(Cyanobacteria)의 이상번식으로 인해 물의 색깔이 짙은 녹색으로 변하는 현상을 이야기한다. 최근 지구온난화에 따른 평균기온의 상승과 더불어 담수환경 주변에 위치한 각종 오염원에서의 오염물질 유입으로 인해 녹조현상의 정도와 빈도가 현저하게 증가하고 있으며 그 피해 정도는 해가 거듭될수록 심각해지고 있는 실정이다. 남조류는 수환경에 bloom 을 일으켜 수중 탁도를 증가시켜 미관상 좋지 않을 뿐만 아니라 수층 산소를 빠르게 소비하여 타 생물의 생장을 방해하고 악취와 독소를 유발하는 등 환경생태학적인 문제점을 야기한다. 현재 이런 녹조현상은 국내에만 국한되어 있는 것이 아닌 전 세계적인 이슈로서 주목받고 있으며 이에 따른 해결책이 다방면으로 연구되고 있다. 국내에서 녹조현상을 일으키는 주요 남조류의 종류는 마이크로시스티스 속(*Microsystis*), 아나베나 속(*Anabaena*), 아파니조메논 속(*Aphanizomenon*) 및 오실라토리아 속(*Oscillatoria*) 으로서 위 4종은 독성물질을 배출하여 환경에 유해한 영향을 줄 수 있기 때문에 환경부에서 유해남조류로 지정되어 관리되고 있다. 이들은 통상적으로 수온 22℃ 이상에서 매우 활발하게 증식하며 위 4가지 종류 중 특히 마이크로시스티스 에루지노사(*Microsystis aeruginosa*)는 가장 보편적으로 녹조현상을 일으키는 남조류에 속한다.

[0003] 라이신(lysine)이란 20개의 아미노산 중 양전하(positive charge)를 갖고 있는 염기성 아미노산에 해당하고 생물체 내에서 단백질의 합성 및 대사물질로 사용되며, 세균에서 대부분의 그람 음성균(gram-negative bacteria)과 바실러스 속(*Bacillus*) 및 마이코박테리움 속(*Mycobacterium*)에서 세포벽의 구성성분인 펩티도글리칸(peptidoglycan)을 합성하는데 사용되는 물질이다. 인간을 비롯한 동물에서는 합성을 할 수 없는 필수아미노산으로서 가축의 사료에 주로 사용되는 물질이다. 라이신을 활용한 남세균 대발생 유도세균인 마이크로시스티스 에루지노사 사멸법에 관해서는 이전에 연구된 바가 있지만, 세포에 산화적 스트레스를 유도하여 사멸한다는 사실 이외에는 뚜렷한 기작이 밝혀지지 않았다.

[0004] 또한, 마이크로시스티스 에루지노사 사멸방법에 대해서는 과산화수소나 황토같은 물리적 화학적인 방법이 사용되어왔으나, 과산화수소는 화학적인 반응성이 높고 황토는 어류의 폐사 등 주변 수생태계에 큰 영향을 줄 수 있다는 문제점이 있다.

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 녹조 제거 기능을 가진 친환경 식물소재를 혼합하여 남세균 대발생을 억제하는 제재 및 처리방법을 연구하던 중, 라이신이 녹조유발 남세균인 마이크로시스티스 에루지노사의 세포벽 합성을 방해하여 사멸을 유도함을 밝히고 라이신을 바위손(*Selaginella tamariscina*) 분말과 혼합 처리하여 마이크로시스티스 에루지노사의 현저한 사멸 유도를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2176159호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 라이신(lysine) 및 바위손(Selaginella tamariscina)을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 녹조 제거용 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생 징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는 녹조 제거 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 라이신(lysine) 및 바위손(Selaginella tamariscina)을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 제공한다.

[0010] 이어서, 본 발명은 상기 녹조 제거용 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생 징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는 녹조 제거 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 녹조 제거용 조성물은 영양소(아미노산) 중 하나에 속하는 라이신은 남세균 대발생을 유발하는 마이크로시스티스 에루지노사의 세포벽 합성단계 중 펩티도글리칸 가교형성을 막을 수 있으며, 이를 남세균 사멸 활성을 갖는 바위손 분말과 혼합하는 경우 남세균 성장 억제 및 사멸 효과가 현저히 상승되는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 녹조 제거용 조성물은 적은 양으로도 수환경 내에 다양한 수생식물이나 미생물에 영향을 미치지 않으므로서 생태계의 피괴 없이 친환경적으로 녹조를 제거할 수 있는 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 일실시예에 있어서, 라이신 처리농도(0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μM)에 따른 마이크로시스티스 에루지노사(*M. aeruginosa*)의 생존율을 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2a는 본 발명의 일실시예에 있어서, 마이크로시스티스 아레지노사(*M. aeruginosa*)를 라이신(50 μM)이 포함된 배지에서 배양한 후 형광현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 2b는 본 발명의 일실시예에 있어서, 라이신 처리에 따른 남조류의 모습을 투과전자현미경(transmission electron microscope)으로 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 있어서, 바위손 분말 처리농도(0.05, 0.10, 0.50%(w/v))에 따른 마이크로시스티스 에루지노사(*M. aeruginosa*)의 생존율을 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 있어서, 라이신(50μM) 및 바위손 분말(0.1%(w/v))을 함께 처리하였을 때 처리시간(1, 2일)에 따른 마이크로시스티스 아레지노사의 세포 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 있어서, 바위손을 유효성분으로 포함하는 4종의 알약 제제 및 상기 알약 제제를 물에 처리했을 때 부유하는 모습을 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0014] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0015] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0018] 본 발명자들은 녹조 제거 기능성을 가진 친환경 소재를 연구하던 중 필수 아미노산 중 하나인 라이신이 녹조현상을 일으키는 주요한 남조류에 해당하는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microsystis aeruginosa*)의 세포벽 합성

을 억제하여 효과적으로 사멸할 수 있음을 최초로 규명하였다.

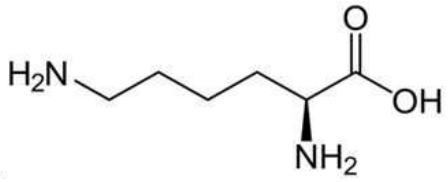
[0020] 따라서, 본 발명은 라이신(lysine) 또는 이의 농화학적으로 허용 가능한 염 및 바위손(*Selaginella tamariscina*)을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "녹조(water-bloom , 綠藻)"는 부영양화된 호소(湖沼) 또는 유속이 느린 하천에서 녹조류, 남조류, 규조류 등이 크게 늘어나 물빛이 녹색이 되는 현상을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "라이신(lysine)"은 생물체가 단백질 합성에 필요로 하는 아미노산(amino acid)중 하나로서, 알부민, 젤라틴, 히스톤 따위에 많이 함유되어 있다. 화학식은 $H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)COOH$이다.

[0023] 또한, 상기 라이신(lysin)은 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있다.

화학식 1

[0024] 

[0025] 또한, 상기 라이신(lysin)은 그 자체로서 또는 염(염산 및 황산과 같은 무기산, 또는 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산과의 농화학적으로 허용가능한 염)의 형태로 사용될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 바위손은 200 μm 이하의 입자크기를 가지는 바위손 분쇄물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 또한, 상기 조성물은 녹조류, 남조류 또는 규조류의 생장을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 상기 녹조류는 예를 들어 클로스테리움(*Closterium*), 페디아스트룸(*Pediastrum*) 또는 세네데스무스(*Scenedesmus*) 속 조류일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 또한, 상기 남조류는 예를 들어 마이크로시스티스(*Microcystis*), 아나베나(*Anabaena*), 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 또는 오실라토리아(*Oscillatoria*) 속 조류일 수 있고, 보다 구체적으로 마이크로시스티스 속일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis Aeruginosa*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 상기 규조류는 예를 들어 시네드라(*Synedra*), 아스테리오넬라(*Asterionella*), 시클로텔라(*Cyclotella*), 멜로시라(*Melosira*), 스켈레토네마 코스타튬(*Skeletonema costatum*), 카에토세로스 (*Chaetoceros*), 탈라시오시라(*Thalassiosira*), 렙토실린드루스(*Leptocylindrus*), 니츠쉬이아(*Nitzschia*), 실린드로세카(*Cylindrotheca*), 유캄피아(*Eucampia*) 또는 오돈텔라(*Odontella*) 속 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 녹조 제거용 조성물은 처리 최종농도를 기준으로 라이신(lysine)은 50 내지 1000 μM의 농도, 거북손은 0.05 내지 0.5 %(w/v)의 농도가 되도록 조류가 발생한 수중 또는 토양에 처리하는 것이 바람직하며, 이는 유해조류(녹조류, 남조류 또는 규조류)의 종류, 발생밀도, 생육 정도, 수질 환경 등을 고려하여 적절하게 조절할 수 있다. 다만, 라이신을 과다 사용하는 경우 부영양화와 같은 환경 내 2차 오염 문제를 가지고 있으므로 지나친 사용으로 인한 수환경 내의 생태계 파괴 문제점이 존재할 수 있으므로, 본 발명에서 제시한 농도로 처리하는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명의 녹조 제거용 조성물은 라이신 및 바위손 혼합물의 효과를 저해하지 않는 범위 내에서 효과의 안정적 발현, 적용 대상 생물로의 부착 증진, 운반 및 처리의 간편화를 위해 제제학적으로 허용 가능한 고체 담체, 액체 담체, 액체 희석제, 액화된 기체 희석제, 고체 희석제, 또는 기타 적당한 보조제, 예를 들면 유화제, 분산제 또는 기포제 등의 계면활성제를 더욱 포함할 수 있다. 또한, 통상적으로 이용되는 다른 살조제를 혼합하여 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 녹조 제거용 조성물은 바람직하게는 유제, 수화제, 입제, 분제, 캅셀형 및 젤상의 제형으로 제제화될 수 있고, 제제의 부력을 위해 도넛형과 같은 제형을 통한 접촉제로서 제공되는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 상기 녹조 제거용 조성물은 녹조를 유발하는 유해조류가 발생한 수중 또는 토양에 처리하여 녹조를 제거할 수 있다. 이때, 상기 조성물을 녹조가 발생되는 초기에 처리함으로써 유해조류의 대량증식을 사전에 차단하는 것이 바람직하다.

[0036] 이어서, 본 발명은 상기 녹조 제거용 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생 징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는 녹조 제거 방법을 제공한다.

[0037] 또한, 상기 처리는 선박을 이용하여 국부적으로 살포하는 형태로 처리되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 녹조 발생 수역 또는 발생 징후가 관찰된 수역의 온도는 20 내지 30℃인 것이 바람직하고, 22 내지 27℃인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 일반적으로 대부분의 유해조류는 20℃ 이상의 온도에서 가장 활발하게 증식하므로, 상기 온도가 20℃ 미만인 경우 녹조 제거용 조성물의 현장 적용이 어려울 수 있고, 유해조류의 제거율이 낮아질 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0042] **<실시예 1> 라이신을 사용한 남조류 사멸 효과 확인**

[0043] 라이신(lysine)의 농도별 녹조 제거율을 확인하기 위하여, 다양한 농도로 라이신(Sigma, L0071, cas# 657-27-2)을 마이크로시스티스 에루지노사(*Microsystis aeruginosa*) 배양물에 처리한 뒤 분광광도계를 이용해 마이크로시스티스 에루기노사의 엽록체 클로로필 흡광도 파장인 680nm(OD_{680})를 이용해 세포 사멸율을 측정하였다. 본 실험에서 사용한 마이크로시스티스 에루지노사(*Microsystis aeruginosa*)는 *M. aeruginosa* PCC7806은 파스퇴르 컬쳐 컬렉션(The Pasteur Clture Collection)에서 분양받아 이용하였다.

[0044] BG11(blue-green) 배지에 마이크로시스티스 에루지노사를 배양하였고, 광주기와 암주기는 25 μmol photons m^{-2} s^{-1}의 광도에서 각각 12시간 씩 번갈아가며 진행되었으며 온도는 25℃로 유지되었다. 라이신은 3차 증류수(deionized water)에 용해한 뒤 희석하여 각각의 농도별로 동일한 부피의 라이신 용액을 넣었으며, 대조군으로 3차 증류수를 넣어주었다. 배양된 조류의 초기 세포밀도는 OD_{680}값을 0.21(5×10^5 cells/ml)로 맞추어 실험을 진행되었으며 조류 배양용 세포 배양 플라스크(cell culture flask)에서 BG11 배지에 배양되던 마이크로시스티스 에루지노사에 대하여 농도별 라이신 처리군을 1 일 마다 수확하여 96 웰 플레이트(96-well plate)에 분주한 뒤 분광광도계를 통해 OD_{680}을 측정하여 세포 사멸 효과를 확인하였다. 상기 측정은 3회 반복되었으며 평균값을 계산하여 그래프로 나타냈다.

[0045] 본 발명의 라이신에 의한 남조류 사멸 효과는 하기 도 1 및 표 1에 수치화하여 자세히 나타내었다.

[0046] 그 결과, 라이신은 50 μM(7.31 μg/mL)의 낮은 농도에서도 남조류 세포 사멸 효과가 있는 것으로 나타났으며, 3일 경과 후 남조류가 70% 이상 사멸한 모습을 보여주었다. 특히, 5 일 경과 후 남조류가 90 %이상 사멸하여 배지가 투명해진 모습을 육안으로 확인할 수 있었으며 재생장 하지 않는 것을 확인하였다.

표 1

[0048]

라이신 처리 농도(μM)	시간			
	0 day	1 day	3 day	5 day
0(대조군)	0.2124	0.2400	0.3539	0.4547
12.5(1.83 μg/ml)	0.2190	0.2350	0.3375	0.4633

25(3.65㎍/ml)	0.2054	0.2277	0.3676	0.3200
50(7.31㎍/ml)	0.2110	0.2452	0.2025	0.1334
100(14.62㎍/ml)	0.2124	0.2421	0.1947	0.1310
250(36.55㎍/ml)	0.2132	0.2417	0.1901	0.1285
500(73.10㎍/ml)	0.2144	0.2378	0.1848	0.1288
1000(146.19㎍/ml)	0.2131	0.2427	0.1801	0.1226

[0050] **<실시예 2> 형광현미경과 전자현미경을 통한 라이신에 의한 남조류 세포벽 합성확인**

[0051] 남조류 세포벽 합성 저해를 확인하기 위해 상기 실시예 1과 같은 조건에서 배양중이던 마이크로시스티스 에루지노사 배양물에 라이신을 처리하여 형광현미경(fluorescent microscope)과 투과전자현미경(transmission electron microscope)을 활용하였다. 먼저, 형광현미경으로 세포벽을 관찰하기 위해 1 mL의 마이크로시스티스 에루기노사 배양물에 라이신을 50 ㎛M의 농도로 처리한 뒤 DMSO에 용해시킨 HADA[3-(7-hydroxycoumarin)-carboxamide-D-Alanine]를 150 ㎛M로 처리하였다. HADA는 형광 D-아미노산(fluorescent D-amino acid) 중 하나로, 펩티도글리칸 합성 시 필요한 기질 중 하나인 D-알라닌(D-alanine)이 형광을 띄는 화합물이다. 구체적으로, 샘플을 4℃ 에서 12시간동안 파라포르말데하이드 고정(4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)을 진행하고, 상기 시료를 6,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 고정 전처리를 수행하였다. 고정된 시료를 0.01 M phosphate buffer(pH 7.2)로 상온에서 세척한 뒤 6,000 rpm으로 5분동안 원심분리 하여 세척을 진행하였다. 위 방법으로 세척을 2 회 진행한 뒤 공초점 레이저 현미경(confocal laser microscope)을 사용하여 시료를 관찰하였다. 라이신을 처리하지 않은 대조군과는 달리, 라이신이 처리된 마이크로시스티스 에루지노사의 경우 펩티도글리칸의 가교형성이 진행되지 않아 푸른색 형광이 검출되지 않은 것이 확인됐다.

[0052] 본 발명의 라이신에 의한 남조류 펩티도글리칸 가교 형성 저해 효과는 하기 도 2a에 이미지로 나타나있으며, 붉은색의 형광이미지는 클로로필을 나타내고, 광합성을 하는 남조류 세포의 전 부위에 존재하여 형광현미경 이미지에서 마이크로시스티스 에루지노사 세포의 형태를 나타내준다. 푸른색의 형광이미지는 HADA를 나타내고, 가교형성 효소인 트렌스펩티데이즈(transpeptidase)의 활성이 나타난 부위를 나타내준다.

[0053] 그 결과, 라이신 처리된 마이크로시스티스 에루지노사 세포는 형태는 유지됐지만, 푸른색 형광이 보이지 않았다. 세포의 형태는 타원형을 보여 분해가 정상적으로 진행되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 펩티도글리칸 가교형성이 라이신에 의해 저해되었다는 것을 의미한다.

[0054] 상기 실시예 1과 같은 조건에서 배양 중이던 마이크로시스티스 에루지노사에 50 ㎛M의 농도로 라이신을 처리하고 직후의 마이크로시스티스 에루지노사 샘플 1ml을 취해 투과전자현미경 분석을 위해 조류 고정 전처리 단계를 거쳤다. 구체적으로, 4℃ 에서 12 시간 동안 카르노프스키 고정(Karnovsky's fixation: 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)을 진행하고, 상기 시료를 6,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 1차 고정 전처리를 수행하였다. 고정된 미생물 시료를 두 차례 0.01 M potassium phosphate (pH 7.8)로 상온에서 씻어 주었으며, 오스미움 테트라옥사이드 솔루션 (2% osmium tetroxide)을 이용해 2차 시료 고정단계를 4℃에서 2 시간 동안 수행하였다. 두 차례에 걸쳐 고정된 미생물을 3차 증류수로 두 번 씻었으며, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 및 100% 의 에탄올 용액에 재현탁(resuspension)하여 각각 10분 동안 탈수시켰다. 이후 시료를 3% 아가로스(agarose)를 샘플과 1:1로 희석하여 굳힌 뒤 초 박편기를 통해 60-70nm로 잘라서 200-mesh grid에 올려 80kV 전압을 통해 투과전자현미경으로 관찰하였다.

[0055] 그 결과 도 2b에서 나타낸 바와 같이, 전자현미경 사진 내에서 라이신이 처리된 마이크로시스티스 에루지노사의 세포벽이 낮은 전자밀도를 띄었고 세포분열하지 못한 채로 사멸한 모습을 보여주었다. 이는 라이신에 의해 뮤로펩타이드(muropeptide)간에 가교형성이 일어나지 않아 펩티도글리칸 층의 생성이 온전치 않아 사멸했다는 것을 의미한다.

[0057] **<실시예 3> 바위손 분말의 남조류 사멸효과 확인**

[0058] 바위손(*Selaginella tamariscina*)은 전라북도 부안군 변산면 변산 (35 ° 40'26 .71 "N,126 ° 35'56"E ")에서 직접 채집하여 실험에 사용하였다. 먼저, 바위손에 묻어있는 흙을 수돗물로 세척한 뒤 50도의 드라이 오븐에서 2일 간 건조시켰다. 이후 믹서기를 사용하여 분말화한 뒤 200 ㎛m의 격자크기(mesh size)를 가진 철제 채반에

통과시켜 건조된 상태를 유지하여 사용하였다.

[0059] 이어서, 바위손 분말의 남조류 사멸효과를 확인하기 위해 상기 실시예 1과 같은 조건에서 배양중이던 마이크로시스티스 에루지노사 배양물(20ml)에 0.5%(w/v), 0.1%(w/v), 0.05%(w/v)의 농도로 바위손 분말을 처리하고 1일에 한 번씩 총 3일 동안 마이크로시스티스 에루지노사 샘플 0.1ml을 취해 세포의 사멸여부를 확인했다. 바위손 분말의 특성 상 흡광도를 측정할 수 없어 광학현미경과 혈구계수기(hemocytometer)를 활용하여 세포수를 측정하였다.

[0060] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 0.5 %(w/v) 농도의 바위손 분말을 처리한 경우에는 1일 만에 마이크로시스티스 에루지노사의 세포수가 95% 이상 사멸하였고 0.1 %(w/v) 농도의 바위손 분말에 의해서는 50% 이상 사멸하였으며 3일 이후에도 세포 수가 증가하지 않으며 배양물이 맑아지는 모습을 보였다. 이는 바위손 분말이 남조류의 생장을 저해한다는 것을 보여준다. 0.05 %(w/v) 농도로 바위손 분말을 처리했을 때는 마이크로시스티스 에루지노사의 사멸이 유의미 하지 않지만 생장하지 않은 모습을 보였다.

[0062] **<실시예 4> 라이신과 바위손 혼합물의 남조류 사멸효과 확인**

[0063] 라이신과 바위손 분말이 유해조류를 사멸하는 데 시너지효과(synergy effect)를 보이는지 확인하기 위하여, 라이신과 바위손 분말을 상시 실시예 1과 같은 조건에서 배양 중이던 마이크로시스티스 에루지노사 배양물(20ml)을 1일에 한 번씩 0.1ml 만큼 채취하여 혈구계수기와 광학현미경을 통해 총 2일 동안 세포생장 변화 및 살상효과를 관찰하였다.

[0064] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 마이크로시스티스 에루지노사를 사멸시키지 않을 농도의 라이신(50 μM)은 남조류를 사멸시키지 않았으며, 0.10 %(w/v)의 바위손 분말(Selaginella tamariscina powder; STP)만 처리된 경우는 도 3에서 나타난 바와 동일하게 2일에 걸쳐 50% 이상의 사멸효과를 보이며 남조류의 재생장을 저해했다. 특히, 라이신과 바위손 분말이 함께 처리된 경우에는 1일 만에 약 90%의 사멸율을 나타내었다. 이를 통해 라이신 및 바위손 분말을 혼합하는 경우 각각을 단독으로 사용하는 경우와 비교하여 남조류 사멸효과가 현저히 상승된다는 것을 확인하였다.

[0066] **<실시예 5> 바위손 분말을 포함하는 알약 형 녹조 제거제의 제작**

[0067] 남세균 대발생이 일어난 지역의 국소적인 부분을 대상으로 효율적인 라이신 및 바위손 분말 처리 방법을 위해 알약 형태로 유효물질을 제작하였다. 바위손 분말을 알약 형태로 만들기 위해 4가지의 조합법을 직접타정법을 활용하였고 사용된 재료와 비율은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0069]

	조합비율(%)			
	1	2	3	4
Microcrystaline cellulose	42	32	42	37
Methylcellulose	4	4	4	4
Silicon dioxide	40	40	30	35
Magnesium stearate	4	4	4	4
Selaginella tamariscina powder	10	20	20	20

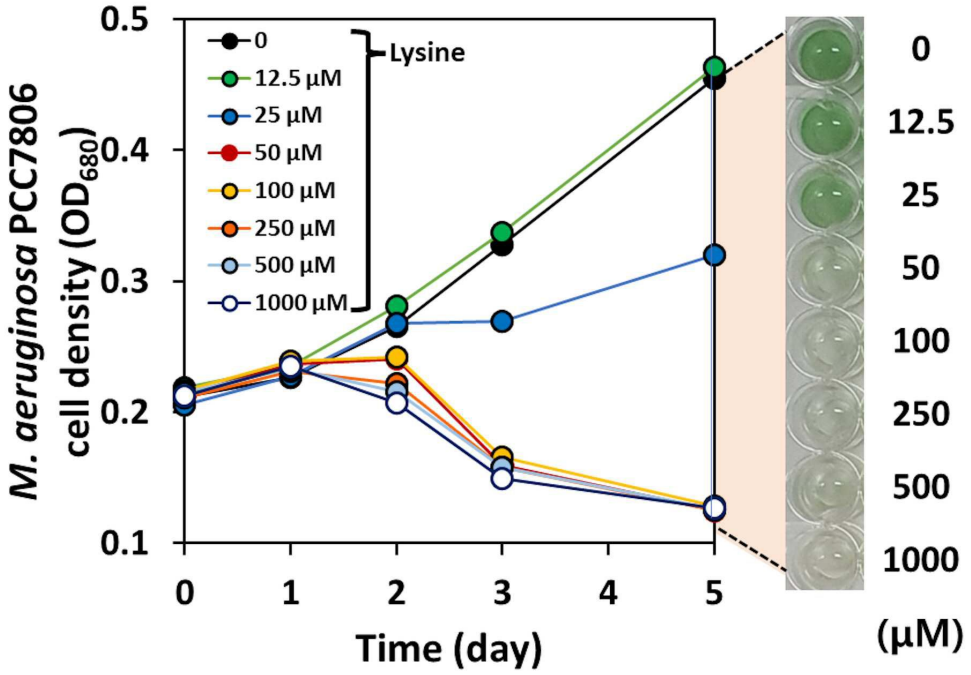
[0071] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 알약이 물에 뜬 상태로 곧바로 풀어지지 않는 효과가 있음을 보여주었다. 남세균 배양액(BG11 배지)에 첨가했을 때도 정상적으로 부유하는 모습도 확인되었다.

[0073] 본 발명의 라이신은 마이크로시스티스 아레지노사의 펩티도글리칸의 단위체인 뮤로펩타이드 합성에 사용된다. 라이신이 포함된 뮤로펩타이드는 세포벽 합성 시 필요한 뮤로펩타이드간의 가교형성에 사용되지 못하게 하여 세

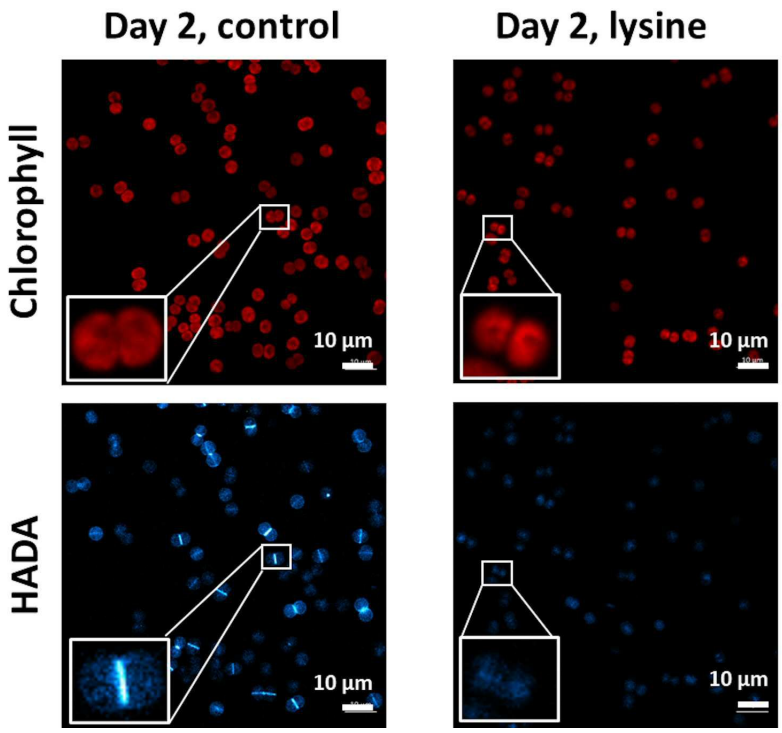
포 분열을 방해하고 세포 자체를 사멸시키는 효과를 가지므로, 녹조제거 기능을 위한 소재로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 위와 같이 기존에 밝혀지지 않았던 라이신의 남세균 사멸 기작을 기반으로 녹조류 제거 기능을 제시했고 바위손 분말을 유효성분으로 함께 포함하여 단일 소재에 비해 적은 양으로도 두드러지게 높은 남세균 사멸 효과를 이끌어낼 수 있는 이점을 갖고있는 바, 환경오염 문제로부터 자유로운 친환경 녹조 제거 제제로 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 분말화를 통해 운송 및 장기보관이 용이하여 시간과 공간적 제약을 받지 않는다는 장점이 있다.

도면

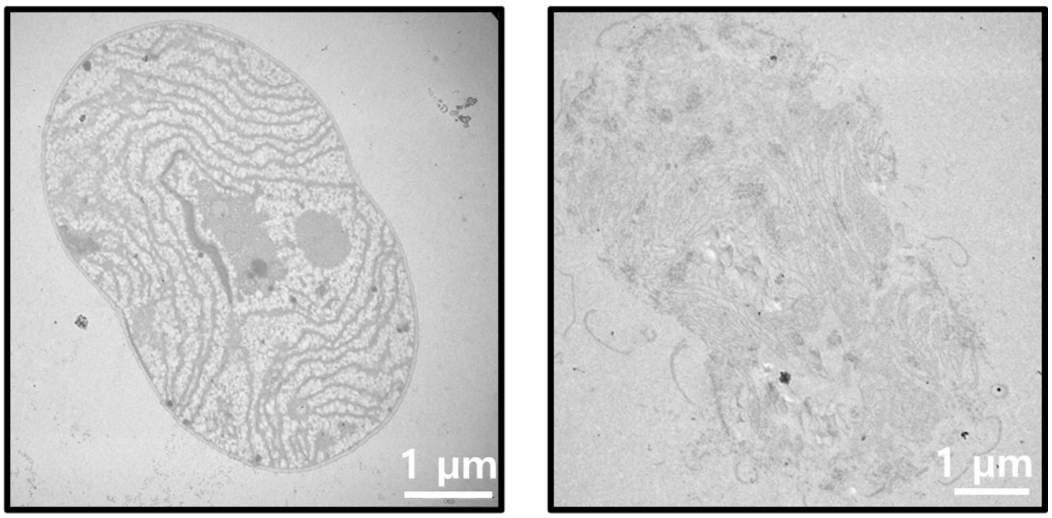
도면1



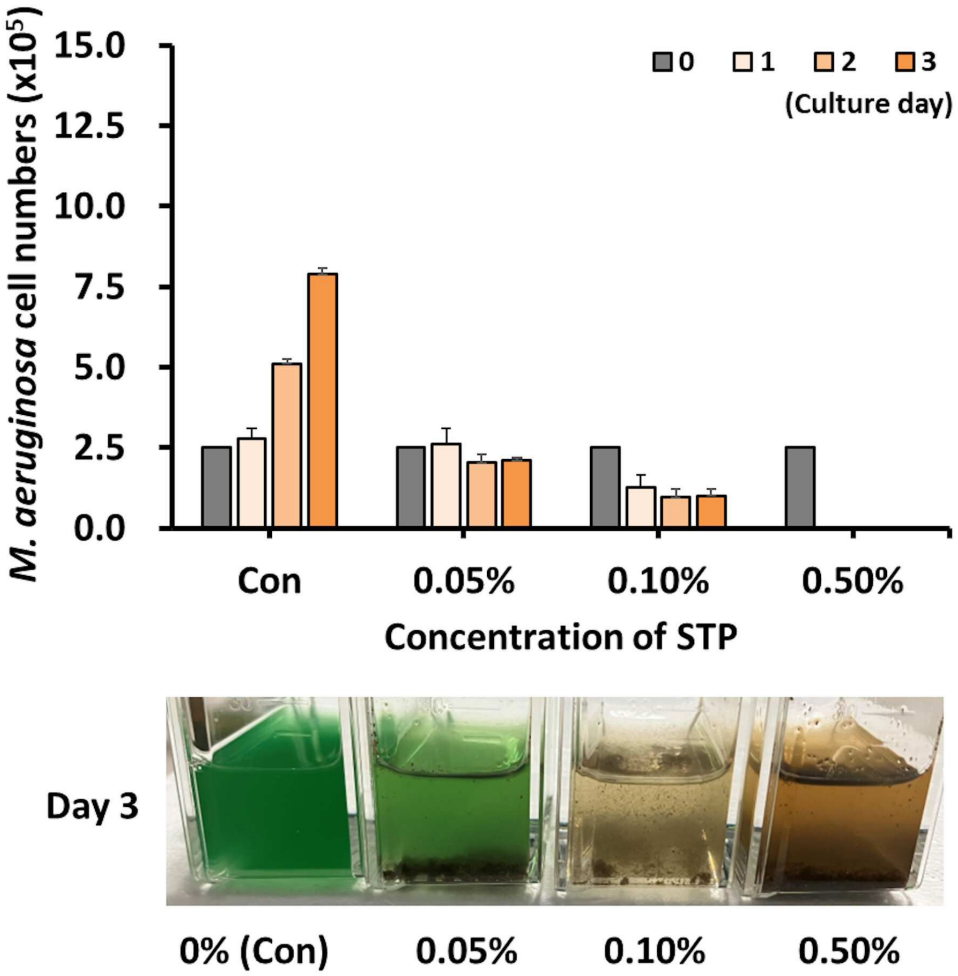
도면2a


Day 2, control
Day 2, lysine
Chlorophyll
HADA
10 μm
10 μm
10 μm
10 μm

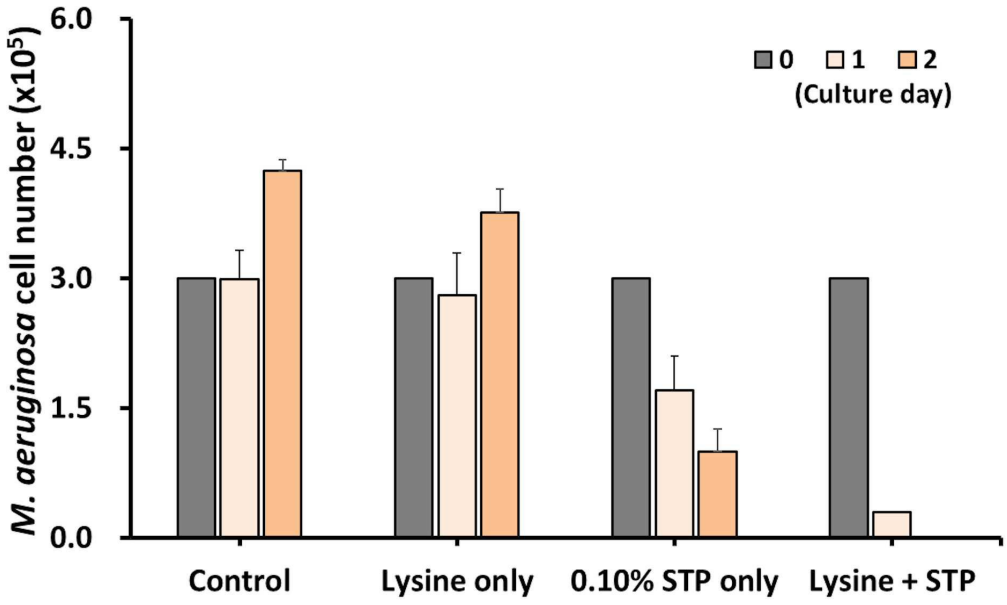
도면2b


1 μm
1 μm

도면3


M. aeruginosa cell numbers (x10^5)
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
1
2
3
(Culture day)
Con
0.05%
0.10%
0.50%
Concentration of STP
Day 3
0% (Con)
0.05%
0.10%
0.50%

도면4



*STP: *Selaginella tamariscina* Powder (바위손 가루)

도면5

