

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0030108
(43) 공개일자 2021년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C02F 1/40 (2006.01) *C02F 1/72* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C02F 1/40 (2013.01)
C02F 1/72 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0111644
(22) 출원일자 2019년09월09일
심사청구일자 2019년09월09일

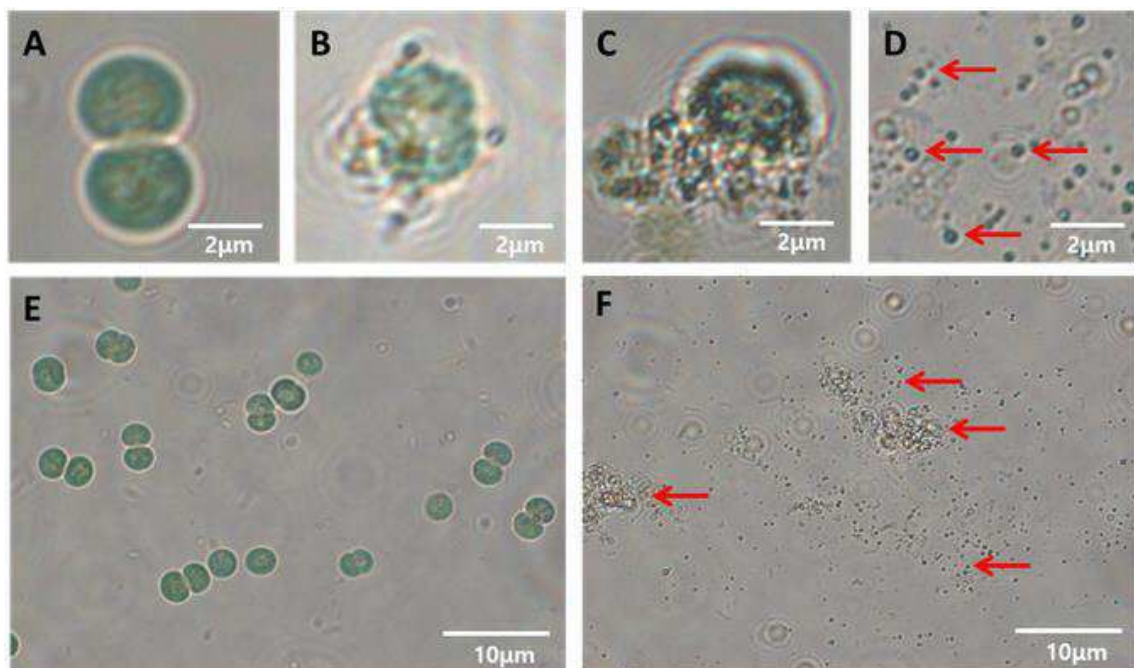
(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이재복
전라북도 전주시 완산구 새터로 119, 1동 402호 (서신동)
박우준
서울특별시 강남구 언주로 420, 101동 2105호 (역삼동, 역삼자이아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물 및 이를 이용한 녹조 제거방법**(57) 요약**

본 발명은 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물 및 이를 이용한 녹조 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 아멘토플라본(Amentoflavone)은 남조류를 직접 사멸시켜 녹조를 제거하는 메커니즘을 가짐으로 녹조의 원인 생물의 세포벽을 파괴하여 녹조현상의 근간이 되는 세포 자체를 사멸시키는 효과를 가지므로, 녹조

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3

제거를 위한 소재로 유용하게 사용될 수 있다. 한편, 본 발명의 조성물은 종래 녹조 제거제보다 녹조 제거 효율성이 뛰어나고 자연에 존재하는 식물 유래의 친환경 소재를 활성물질로 이용함으로써 2차 환경오염 문제로부터 자유로운 친환경 녹조 제거 제제이다. 또한, 본 발명의 아멘토플라본은 과산화수소와 병용할 수 있으며, 이는 과산화수소 사용에 따른 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 최소화시킬 수 있는 이점을 가진다. 또한, 본 발명의 조성물은 분말화를 통해 운송 및 장기보관이 용이하여 시간과 공간적 제약을 받지 않으며 댐, 저수지, 호수, 골프장 헤저드 등 녹조가 발생하는 곳에 즉각적인 처리가 가능하다.

(72) 발명자

신보라

서울특별시 성북구 안암로9가길 55 (안암동5가)

박철우

서울특별시 성북구 고려대로26길 45-9, 407호 (안암동5가)

김민경

충청남도 논산시 대림길 7, 105동 2103호 (부창동, 대림아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

아멘토플라본(Amentoflavone)을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아멘토플라본은 조성물에 1 내지 10000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 녹조 제거용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 남조류만을 특이적으로 사멸시키는 활성을 갖는 녹조 제거용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 과산화수소를 더 포함하는 녹조 제거용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 과산화수소는 조성물에 0.1 내지 1.0mg/L 농도로 포함되는 녹조 제거용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물 및 이를 이용한 녹조 제거방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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 심각해 지고 있는 실정이다. 남조류는 수환경에 bloom 을 일으켜 수중 탁도를 증가시켜 미관상 좋지 않을 뿐만 아니라 수층 산소를 빠르게 소비하여 타 생물의 성장을 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.

- [0003] 국내에서 녹조현상을 일으키는 주요 남조류의 종류는 마이크로시스티스 속(*Microcystis*), 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 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)는 가장 보편적으로 녹조현상을 일으키는 남조류에 속한다.
- [0004] 마이크로시스테스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)는 마이크로시스틴(Microcystin)이라는 독성 물질을 방출하는 것으로 알려져 있다. 마이크로시스틴은 70여가지 변종이 있으나 이중 마이크로시스틴-LR(Microcystin-LR)의 독성이 가장 강하며 이들은 포유류가 섭취하게 될 시 간독성 및 신경계 독성을 나타내는 것으로 알려져 있고 이러한 이유로 세계보건기구(WHO)에서는 음용수의 조류독소 농도를 1μg/L로 제한하고 있다. 조류독소의 증가는 직접적인 독소문제 이외에도 수처리비용의 증가와 친수활동 제한을 야기하는 등 우리 생활과 밀접하게 연관되어 생활의 질을 낮출 수도 있을 만큼 위협적인 실정이다.
- [0005] 오늘날 이용되고 있는 녹조제거 방법으로는 황토살포, 수차, 초음파 조류제거기, 조류제거선, 과산화수소 처리 등의 방법이 이용되고 있으며 이중 황토살포 방법은 남조류를 응집시키는 응집제로 주로 작용하는데 국내에서 녹조 발생시 주로 이용되고 있는 방법이다. 황토살포 방법은 처리비용이 저렴하다는 장점이 있지만 과도한 반복 사용으로 인해 황토를 확보하면서 발생하는 임야훼손과 2차 환경오염을 비롯하여 살포되는 담수 환경에 존재하는 생물 다양성의 파괴 가능성도 존재하고 있다.
- [0006] 또한, 황토는 남조류 발생의 근본적 원인이 되는 남조류 존재 자체의 완벽한 사멸을 유도하는 것이 아닌 응집작용을 통해 이들을 침전시켜 가시적인 효과를 나타내는 방법으로서, 저층에 응집되었던 남조류의 재용출로 인해 다음해에 더 빠른 속도와 더 심각한 남조류 대발생이 일어날 수 있게 된다.
- [0007] 해외에서는 과산화수소(Hydrogen peroxide)를 이용해 남조류를 직접적으로 파괴하는 방법이 많이 사용되고 있지만 이 방법도 환경의 2차 오염 문제를 가지고 있으며 고농도로 사용이 불가하다는 단점(담수 내 과산화수소 최대 허용가능 농도 : 2.5mg/L)과 지나친 사용으로 인한 수환경 내의 생태계 파괴 문제점이 존재한다. 따라서 2차 환경오염 문제가 발생하지 않으며 녹조 제거제가 살포되는 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 미치지 않는 저비용 고효율의 친환경 녹조제거제의 개발이 필수적으로 요구되고 있다.
- [0008] 한편, 아멘토플라본(Amentoflavone)은 다양한 식물에 존재하는 플라보노이드(Flavonoid)계 물질 중 하나로서, 식물의 2차 대사산물의 일종으로 알려져 있다. 플라보노이드는 일반적으로 두 개의 페닐고리(Phenyl ring)와 헤테로사이클릭고리(Heterocyclic ring)로 구성된 15개의 탄소 골격으로 구성되어 있으며 현재까지 5000가지가 넘는 천연 플라보노이드가 다양한 식물로부터 확인되었다. 이들은 화학 구조에 따라 안토잔틴(Anthoxanthin), 플라바논(Flavanone), 플라바노놀(Flavanonol), 플라반(Flavan), 안토시아니딘(Anthocyanidin), 이소플라본(Isoflavone)으로 나뉘어진다. 아멘토플라본은 플라보노이드 2분자가 결합한 이합체로 바이플라보노이드(Biflavonide) 중 하나이며 다른 종류의 바이플라보노이드는 아가디스플라본(Agathisflavone), 쿠프레스플라본(Cupressflavone), 히노키플라본(Hinokiflavone)등이 존재한다.
- [0009] 아멘토플라본은 인체에 대해 항노화, 항염증, 항암작용(Yen TH 등 In Vivo. 32(2):279-285, 2018)이 우수한 것으로 밝혀졌으나(Zha X 등 J Nat Med. 70(3):634-44, 2016) 녹조 제거 활성에 대해서는 밝혀진 바 없다.
- [0010] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 녹조 제거 기능성을 가진 친환경 소재를 연구하던 중 식물 유래의 플라보노이드계 물질에 해당하는 아멘토플라본 화합물이 녹조현상을 일으키는 주요한 남조류에 해당하는 마이크로시스티스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)를 효과적으로 사멸할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0007518호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 녹조를 효과적으로 제거할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 녹조를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 아멘토플라본(Amentoflavone)을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아멘토플라본은 조성물에 1 내지 10000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 남조류만을 특이적으로 사멸시키는 활성을 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 과산화수소를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 과산화수소는 조성물에 0.1 내지 1.0mg/L 농도로 포함될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 처리는 선박을 이용하여 국부적으로 살포하는 형태로 처리될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 아멘토플라본(Amentoflavone)은 남조류를 직접 사멸시켜 녹조를 제거하는 메커니즘을 가짐으로 녹조의 원인 생물의 세포벽을 파괴하여 녹조현상의 근간이 되는 세포 자체를 사멸시키는 효과를 가지므로, 녹조 제거를 위한 소재로 유용하게 사용될 수 있다. 한편, 본 발명의 조성물은 종래 녹조 제거제보다 녹조 제거 효율성이 뛰어나고 자연에 존재하는 식물 유래의 친환경 소재를 활성물질로 이용함으로써 2차환경오염 문제로부터 자유로운 친환경 녹조 제거 제제이다. 또한, 본 발명의 아멘토플라본은 과산화수소와 병용할 수 있으며, 이러한 경우 매우 낮은 과산화수소의 사용만으로도 두드러지게 높은 유해조류 사멸 효과를 이끌어낼 수 있는바, 과산화수소 사용에 따른 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 최소화시킬 수 있는 이점을 가진다. 또한, 본 발명의 조성물은 분말화를 통해 운송 및 장기보관이 용이하여 시간과 공간적 제약을 받지 않으며 댐, 저수지, 호수, 골프장 헤저드 등 녹조가 발생하는 곳에 즉각적인 처리가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 아멘토플라본의 처리 농도(4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g/ml}$) 및 처리 시간(24h, 48h, 72h)에 따른 남조류의 세포수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 1b는 아멘토플라본의 처리(32, 64, 128, 256 $\mu\text{g/ml}$) 후 7일이 경과하였을 때 남조류 제거 정도를 육안으로 확인한 사진이다.

도 2는 아멘토플라본 처리 농도 32, 64 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 시간 경과(0-144h)에 따른 남조류 생존율을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 아멘토플라본을 64 $\mu\text{g/ml}$ (B), 128 $\mu\text{g/ml}$ (C), 256 $\mu\text{g/ml}$ (D),(F)로 24시간 처리했을 때 나타난 남조류의 사멸 모습을 미분간섭 현미경(Differential Interference Contrast Microscope)으로 관찰한 것이다.

도 4a는 아멘토플라본을 처리하지 않은 남조류의 모습을 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope)으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.

도 4b는 아멘토플라본을 128 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 직후 변화된 남조류의 모습을 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope)으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.

도 5 아멘토플라본을 8 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 후 다양한 박테리아의 성장을 비교한 것이다(5a: *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 5b: *Escherichia coli* 0157 ATCC43895, 5c: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ATCC15692, 5d: *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC13429, 5e: *Pseudomonas stutzeri* KACC10290, 5f: *Microbacterium trichothecenolyticum* ATCC51475, 5g: *Sphingomonas humi* PB323, 5h: *Microbacterium flavescens* DSM20643, 5i: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC6538, 5j: *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831, 5k: *Methylobacterium dankookense* SW08-7, 5l: *Staphylococcus warneri* KCTC3340, 5m: *Acinetobacter*

tiernbergiae KACC12230, 5n: *Acinetobacter ursingii* KACC12453, 5o: *Acinetobacter tandoii* KACC12229).

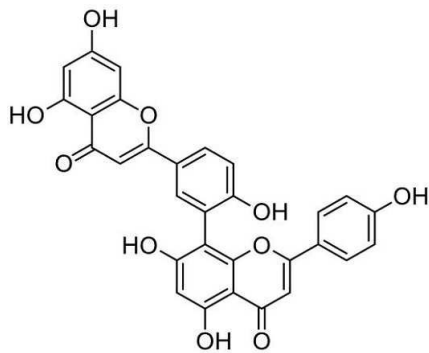
도 6은 아멘토플라본을 16 µg/ml의 농도로 처리한 후 남조류(*Microcystis aeruginosa*)와 다양한 박테리아의 세포 생존율을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 아멘토플라본은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

<화학식 1>



본 발명의 ‘아멘토플라본(Amentoflavone)’은 다양한 식물에 존재하는 플라보노이드(Flavonoid)계 물질 중 하나로써, 종래 연구에 의해 항노화, 항염증, 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있다.

본 발명자들은 녹조 제거 기능성을 가진 친환경 소재를 연구하던 중 식물 유래의 플라보노이드계 물질에 해당하는 아멘토플라본이 녹조현상을 일으키는 주요한 남조류에 해당하는 마이크로시스티스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)를 효과적으로 사멸할 수 있음을 최초로 규명하였다.

이에, 본 발명은 아멘토플라본의 신규 용도로서, 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 상기 아멘토플라본 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

본 발명에 따른 아멘토플라본 화합물은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에서 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수도 있다.

본 발명에서 ‘녹조(water-bloom, 綠藻)’는 부영양화된 호소(湖沼) 또는 유속이 느린 하천에서 남조류와 남조류가 크게 늘어나 물빛이 녹색이 되는 현상을 의미한다.

본 발명에서, 상기 조성물은 남조류, 남조류 및 규조류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조류의 증식을 억제할 수 있으며, 특히, 남조류를 사멸할 수 있다.

상기 남조류는 예를 들어 클로스테리움(*Closterium*), 페디아스트룸(*Pediastrum*) 또는 세네데스무스(*Scenedesmus*) 속 조류일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

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 에루기노사(*Microcystis Aeruginosa*)일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

상기 규조류는 예를 들어 시네드라(*Synedra*), 아스테리오넬라(*Asterionella*), 시클로텔라(*Cyclotella*), 멜로시라(*Melosira*), 스키텔레토네마 코스타툼(*Skeletonema costatum*), 카에토세로스(*Chaetoceros*), 탈라시오시라(*Thalassiosira*), 렙토실린드루스(*Leptocylindrus*), 니츠슈이아(*Nitzschia*), 실린드로세카(*Cylindrotheca*), 유

캄피아(*Eucampia*) 또는 오돈텔라(*Odontella*) 속 일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

- [0037] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 아멘토플라본은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99 중량%를 포함할 수 있으며, 조성물에 1 내지 10000 µg/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 유효성분인 아멘토플라본은 녹조현상을 일으키는 주요한 남조류에 해당하는 마이크로시스티스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)를 효과적으로 사멸할 수 있는 반면, 다양한 박테리아(*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Sphingomonas humi*, *Microbacterium flavescens*, *Staphylococcus aureus*, *Methylobacterium radiotolerans*1, *Methylobacterium dankookense*, *Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter tiernbergiae*, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter tandoii*)는 사멸시키지 못하므로, 상기 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 조류만을 특이적으로 사멸시키는 활성을 갖는다.
- [0039] 따라서, 본 발명의 조성물은 수환경 내에 다양한 수생식물이나 미생물에 영향을 미치지 않으므로 생태계의 파괴 없이 친환경적으로 녹조를 제거할 수 있는 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 유효성분으로 아멘토플라본 이외에 과산화수소(Hydrogen peroxide, H₂O₂)를 더 포함할 수 있으며, 상기 과산화수소는 조성물에 0.1 내지 1.0mg/L 농도로 포함될 수 있다.
- [0041] 종래 기술의 경우 과산화수소를 이용해 남조류를 직접적으로 파괴하는 방법은 환경의 2차 오염 문제를 가지고 있으며 고농도로 사용이 불가하다는 단점(담수 내 과산화수소 최대 허용가능 농도 : 2.5mg/L)과 지나친 사용으로 인한 수환경 내의 생태계 파괴 문제점이 존재하였다.
- [0042] 그러나 본 발명의 조성물은 유효성분으로 아멘토플라본과 함께 과산화수소를 사용하는 경우, 과산화수소 단일 소재를 사용한 경우와 대비하여 저농도의 과산화수소 사용만으로도 두드러지게 우수한 남조류 사멸 효과를 이끌어낼 수 있다(결과 미도시).
- [0043] 또한, 본 발명은 아멘토플라본을 유효성분으로 포함하는 녹조 제거용 조성물을 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 처리는 선박을 이용하여 국부적으로 살포하는 형태로 처리될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역의 온도는 20 내지 30℃인 것이 바람직하고, 22 내지 27℃인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] <실시예 1>

[0050] 아멘토플라본의 유해 남조류 사멸 효과 확인

[0051] 본 시험에서는 아멘토플라본(Amentoflavone ≥99.0% (HPLC) Sigma-Aldrich)의 농도별 녹조 제거율을 확인하기 위하여, 다양한 농도로 아멘토플라본을 마이크로시스티스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*) 배양물에 처리한 뒤 혈구계산기를 이용해 세포 사멸율을 측정하였다. 아멘토플라본은 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해한 뒤 희석하여 각각의 농도별로 동일한 Volume의 아멘토플라본 용액을 넣었으며 컨트롤로 아멘토플라본을 녹이지 않은 순수한 DMSO를 넣어주었다. 배양된 조류의 초기 세포밀도는 1×10^7 cells/ml로 맞추어 실험을 진행되었으며 조류 배양용 세포 배양 플라스크(Cell culture flask)에서 BG11 배지에 배양되던 마이크로시스티스 에루기노사는 48 웰 플레이트(well plate)로 각각 1ml 씩 분주된 다음 아멘토플라본을 각각의 농도로 넣은 후 각각의 Time point 동안 (24~144시간) 조류 배양용 배양기에 12시간 암 조건(Dark condition), 12시간 명 조건(Light condition)으로 배양하였다. 각각의 Time point 이후 48 웰(well)에서 조류 샘플을 회수하여 1.7ml EP 튜브에 담고 상온에서 13,200 rpm의 속도로 3분간 원심분리한 뒤 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5) 1 ml에 재현탁(resuspension)한 다음, 동일한 조건으로 재차 원심분리 하여 씻어냈다(wash). 이하 세척 과정을

두 번 반복한 뒤 혈구계산기(Hemocytometer)를 이용해 세포 카운팅을 실시하여 아멘토플라본의 세포 사멸 유도 효과를 조사하였다. 상기 측정은 3회 반복되었으며 평균값을 계산하여 그래프로 나타냈다.

[0052] 본 실험에서 사용한 *M. aeruginosa* KW는 한국생명공학연구원에서 분양받아 이용하였다.

[0053] 본 발명의 아멘토플라본에 의한 남조류 사멸 효과는 하기 도 1, 2 및 표 1, 2에 수치화하여 자세히 나타내었다.

[0054] 그 결과, 아멘토플라본은 4 내지 8 $\mu\text{g/ml}$ 낮은 농도에서도 남조류 세포 사멸 효과가 있는 것으로 나타났으며, 아멘토플라본을 32, 64 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 각각 처리한 경우 48시간 경과시 약 78, 90% 남조류 사멸율을 보여주었다. 특히, 아멘토플라본을 64 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 72시간(3일) 이상 처리한 경우 남조류 사멸율이 100% 가까이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0056] 아멘토플라본의 처리 농도 및 시간에 따른 남조류 세포수($\text{cell/ml}(10^6)$)

농도($\mu\text{g/ml}$)	시간		
	24h	48h	72h
0(대조군)	15.34	16.50	15.96
4	12.24	4.36	3.07
8	9.56	3.61	2.21
16	6.56	4.26	1.60
32	5.02	3.28	1.25
64	4.72	1.68	0.38
128	6.22	0.49	0.25
256	3.49	0.48	0.08

표 2

[0058] 아멘토플라본의 32 및 64 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 시간 경과에 따른 남조류 세포의 생존율(%)

농도($\mu\text{g/ml}$)	시간(h)						
	0h	24	48	72	96	120	144
32	100	36.76	22.06	7.8	2.6	1.5	0
64	100	32.20	10.83	1.93	0	0	0

[0060] <실시예 2>

[0061] 미분간섭현미경을 이용한 아멘토플라본의 조류 사멸 효과 관찰

[0062] 상기 실시예 1과 같은 조건에서 배양중이던 마이크로시스티스 에루기노사에 64~256 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 아멘토플라본을 처리하고 25℃ 배양기에서 12시간 Dark condition, 12시간 Light condition 조건으로 24시간 배양한 이후 각각의 조류 배양액 1 ml을 1.7ml EP tube에 취해 13,200 rpm의 속도로 3분간 원심분리한 뒤 실시예 1과 같은 방법으로 세척 과정을 두 번 반복하였다. 이후 미분간섭현미경(Differential Interference Contrast Microscope) 분석을 위해 슬라이드글라스에 10 μl 를 떨어뜨린 다음, 커버글라스를 덮고 1000배에서 관찰하였다(도 3 참조).

[0063] 그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 아멘토플라본을 처리한 뒤 24시간이 경과한 마이크로시스티스 에루기노사는 표면이 일그러지거나 세포가 완전히 깨져서 분해되고 있는 모습을 확인할 수 있었으며 둥근 모습의 정상적인 형태를 가진 세포를 관찰할 수 없었다(A: 대조군, B: 64 $\mu\text{g/ml}$, C: 128 $\mu\text{g/ml}$, D: 256 $\mu\text{g/ml}$, E: 대조군, F: 256 $\mu\text{g/ml}$). 참고로, 도 3에서 빨간색 화살표는 정상세포가 모두 파괴되어 남아있는 잔해물을 가리킨다.

[0065] <실시예 3>

[0066] 주사전자현미경을 이용한 아멘토플라본의 조류 사멸 효과 관찰

[0067] 상기 실시예 1과 같은 조건에서 배양중이던 마이크로시스티스 에루기노사에 128 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 아멘토플라본을 처리하고 직후의 마이크로시스티스 에루기노사 샘플 1ml을 취해 주사전자주사현미경(Scanning Electron Microscope) 분석을 위해 조류 고정 전처리 단계를 거쳤다. 구체적으로, 4℃에서 4시간 동안 카르노프스키 고정(Karnovsky's fixation: 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)을 진행하고, 상기 시료를 5,000 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. 완성된 시료는 알루미늄 스테브(stub)에 올려 4일간 먼지가 들어가지 않도록 주의하여 건조시켰으며, 전자현미경 관찰 직전에 질소 가스를 이용해 표면을 털어준 뒤 플라티늄(platinum)으로 70초 동안 코팅하여 전도도를 높였다.

[0068] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이, 아멘토플라본을 처리한 직후 마이크로시스티스 에루기노사는 세포가 분해되거나 내용물이 용출되며 사멸하는 모습이 관찰되었으며, 256 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 아멘토플라본으로 처리되었을 경우에는 정상적인 형태의 세포를 확인할 수 없었다. 참고로, 도 4의 빨간 화살표는 내부물질이 모두 용출되어 사멸하고 남은 세포사멸 잔해물을 가리킨다.

[0070] <실시예 6>

[0071] 아멘토플라본의 항균 활성

[0072] 본 실험에서는 아멘토플라본이 유해조류에만 특이적으로 사멸 효과를 갖는지를 확인하기 위하여, 아멘토플라본을 다양한 박테리아에 처리하여 세포성장 변화 및 살상효과를 관찰하였다.

[0073] 항균 활성을 확인하기 위해, 밤새 배양한 박테리아 용액을 세균별 새로운 최적배지를 이용하여 1/100로 희석하였고, 지수성장기에 도달하도록 한 후 10^6 CFU/mL cells의 세포수가 되도록 맞추어 96 웰 플레이트에 접종하였다. 아멘토플라본의 농도는 microdilution checkerboard method로 결정되었다. 동일한 부피의 DMSO는 음성 대조군으로 사용하였다. 세포 성장은 마이크로 플레이트 분광 광도계 (Spark, Germany)를 사용하여 595nm, 세균별 최적 온도에서 24시간 동안 측정되었다.

[0074] 도 5에서는 아멘토플라본(8 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도) 처리에 따른 다양한 박테리아의 성장곡선을 나타내었다(5a: *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 5b: *Escherichia coli* 0157 ATCC43895, 5c: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ATCC15692, 5d: *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC13429, 5e: *Pseudomonas stutzeri* KACC10290, 5f: *Microbacterium trichothecenolyticum* ATCC51475, 5g: *Sphingomonas humi* PB323, 5h: *Microbacterium flavescens* DSM20643, 5i: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC6538, 5j: *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831, 5k: *Methylobacterium dankookense* SW08-7, 5l: *Staphylococcus warneri* KCTC3340, 5m: *Acinetobacter tiernbergiae* KACC12230, 5n: *Acinetobacter ursingii* KACC12453, 5o: *Acinetobacter tandoii* KACC12229).

[0075] 또한, 조류를 사멸시키는 농도에서 세균의 사멸효과를 확인하기 위해 16 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 아멘토플라본을 상기 방법으로 준비된 10^7 CFU/mL cells의 세포수가 포함된 각각의 세균배양액에 2시간 동안 처리한 다음, 각각의 최적 고체 배지에 배양 원액을 10배씩 반복 희석하여 각각의 희석배양액을 접종한 뒤 최적온도의 배양기에서 하루 동안 배양하여 CFU를 측정, 세포 생존율을 확인하였다.

[0076] 세포 생존율(Survival rate) 도출에 사용된 수식은 다음과 같다.

[0077] $\text{Survival rate} = \langle B / A * 100 \rangle$, A : 초기 세포수(10^7 CFU/ml 일 때 나타나는 콜로니의 수), B : 120분 동안 처리한 박테리아의 콜로니 수

[0078] 그 결과는 도 6 및 표 3에서 자세히 나타내었다.

표 3

[0080] 아멘토플라본의 16 µg/ml의 처리 농도에서 다양한 세균의 세포 생존율(%)

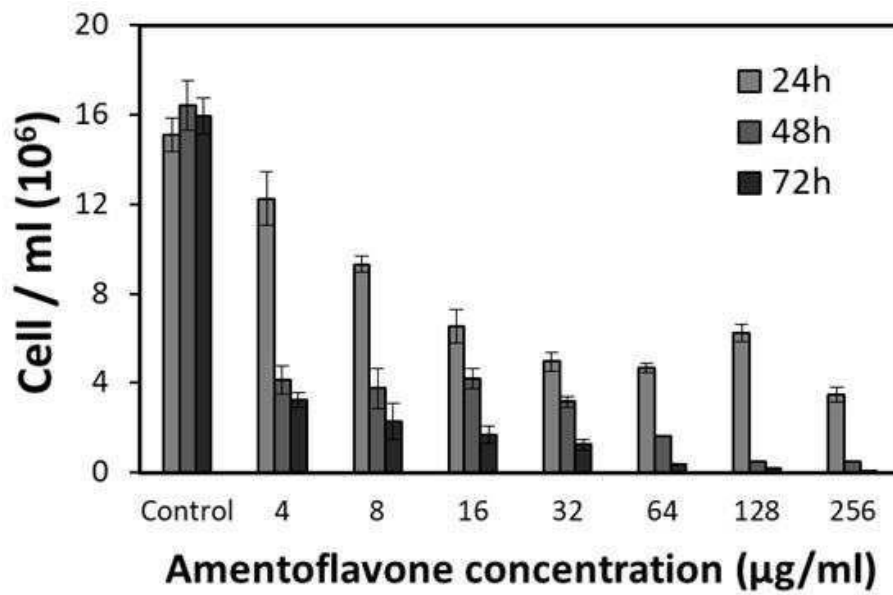
박테리아	생존율(%)
<i>Microsystis aeruginosa</i>	48.26
<i>Acinetobacter baumannii</i>	98.93
<i>Escherichia coli</i>	101.46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100.86
<i>Bacillus subtilis</i>	100.2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	101.7
<i>Sphingomonas humi</i>	100.62
<i>Microbacterium flavescens</i>	102.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	102.96
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	98.66
<i>Methylobacterium dankookense</i>	100.93
<i>Staphylococcus warneri</i>	100.96
<i>Acinetobacter tiernbergiae</i>	99.73
<i>Acinetobacter ursingii</i>	98.8
<i>Acinetobacter tandoii</i>	103.66

[0082] 아멘토플라본을 다양한 박테리아에 처리하여 세포성장 변화 및 살상효과를 관찰한 결과 아멘토플라본을 처리한 조류 배양 샘플에서 다양한 세균들의 움직임이 관찰되었다. 또한, 세균에 아멘토플라본을 단독으로 처리하였을 때 모든 세균에서 생장이 일어나는 것으로 확인되었으며(도 5 참조), 유해조류의 살상을 유도하는 농도에서도 세균은 사멸이 확인되지 않았다(도 6 참조). 이는 아멘토플라본이 마이크로시스티스 에루기노사를 선택적으로 사멸시키고 이를 제외한 주변 미생물은 사멸시키지 않는 유해조류의 선택적인 사멸 유도가 가능할 수 있음을 나타낸다.

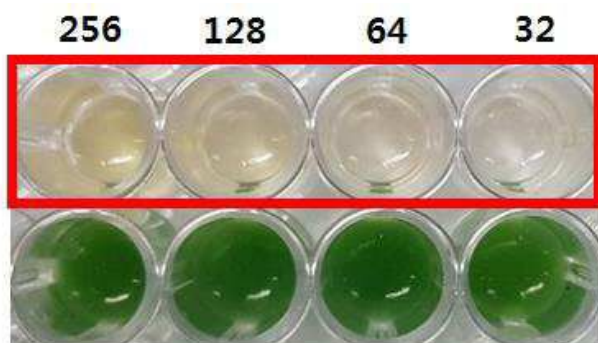
[0084] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

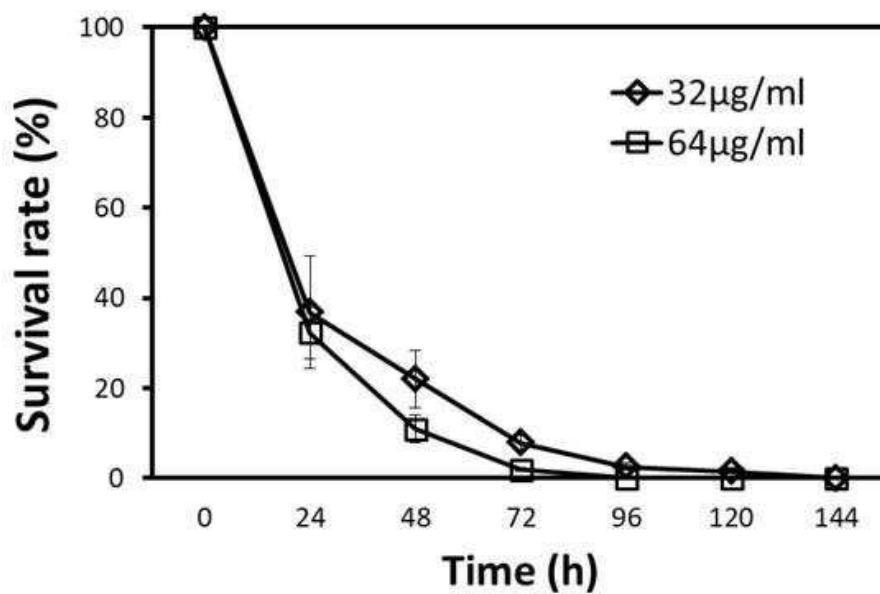
도면1a



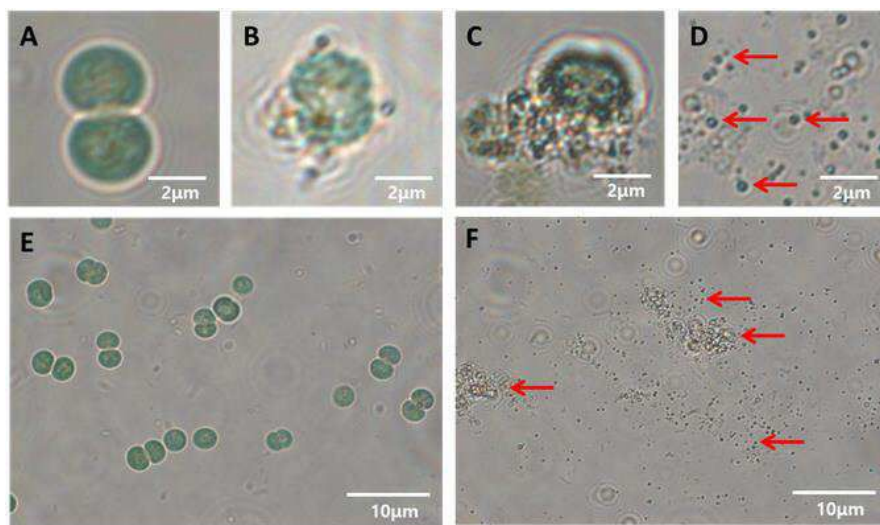
도면1b



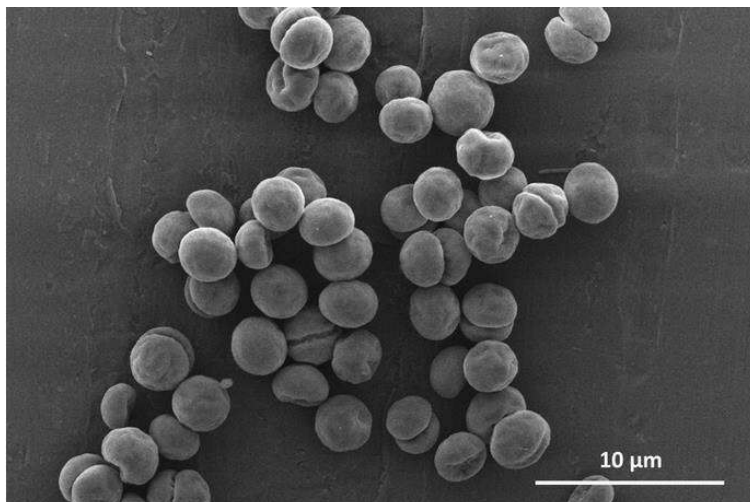
도면2



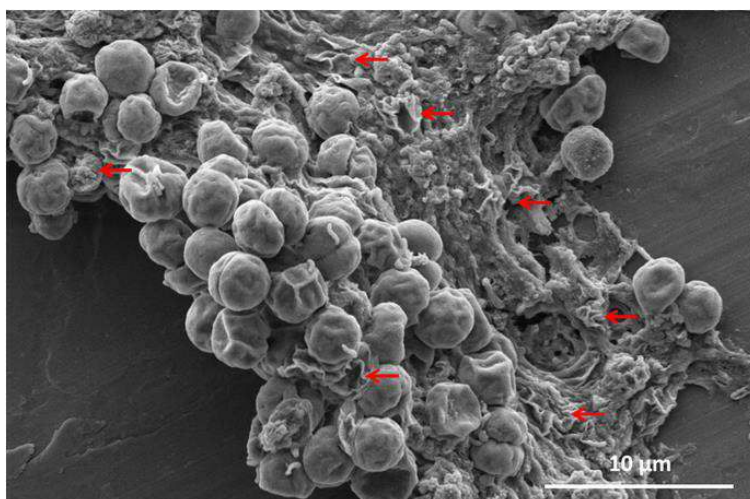
도면3



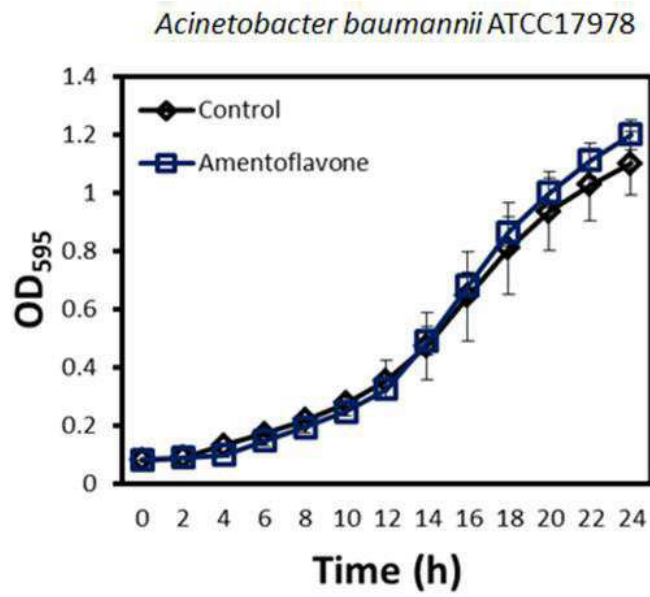
도면4a



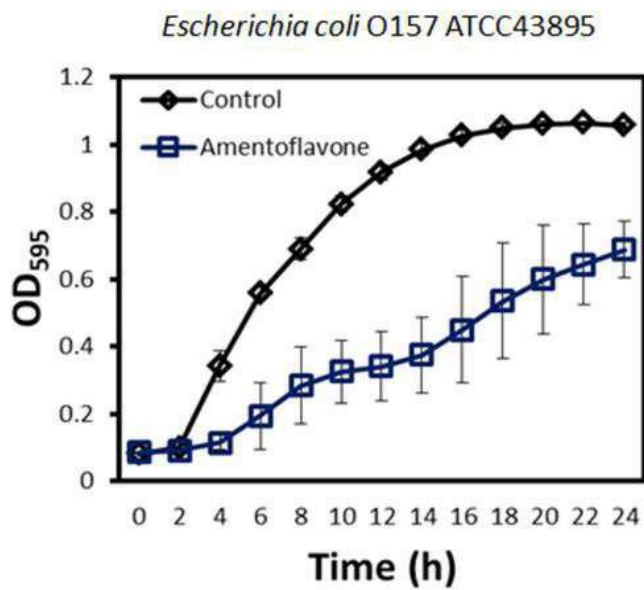
도면4b



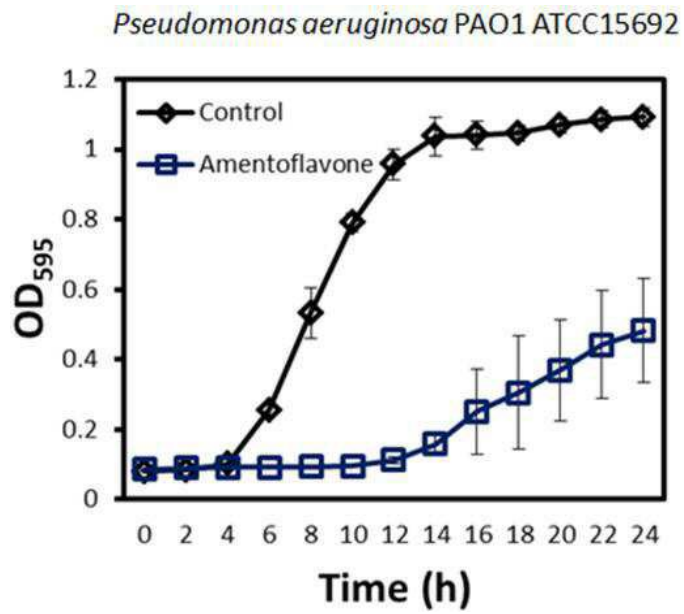
도면5a



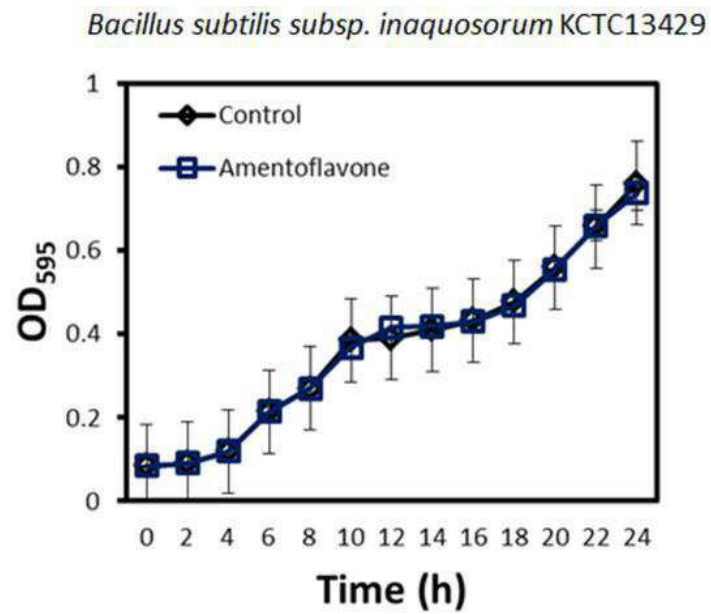
도면5b



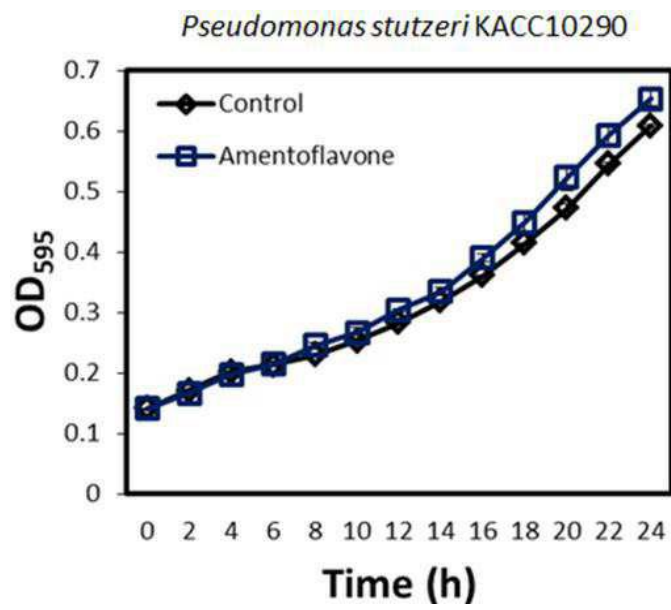
도면5c



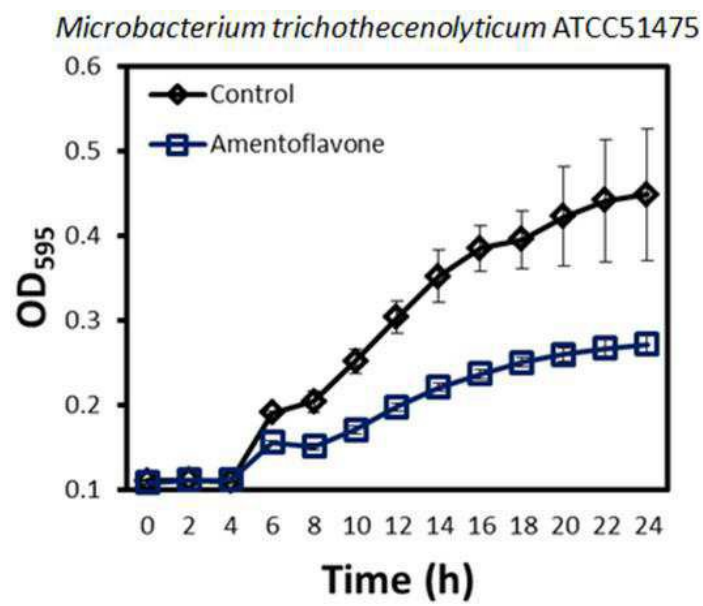
도면5d



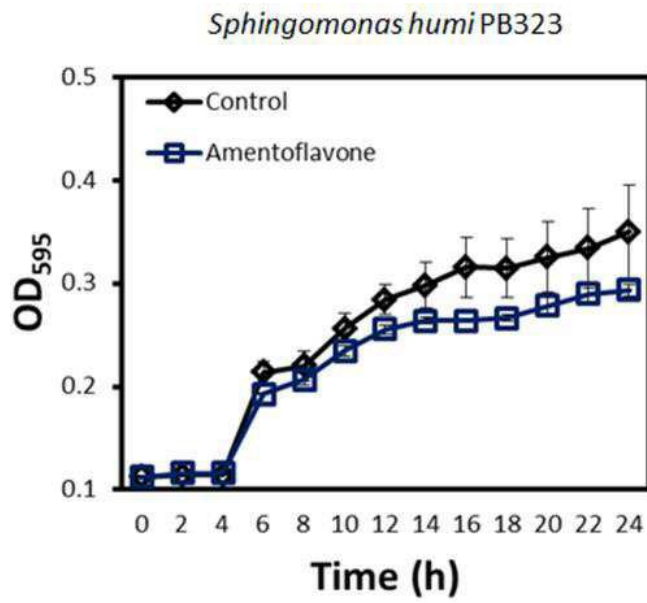
도면5e



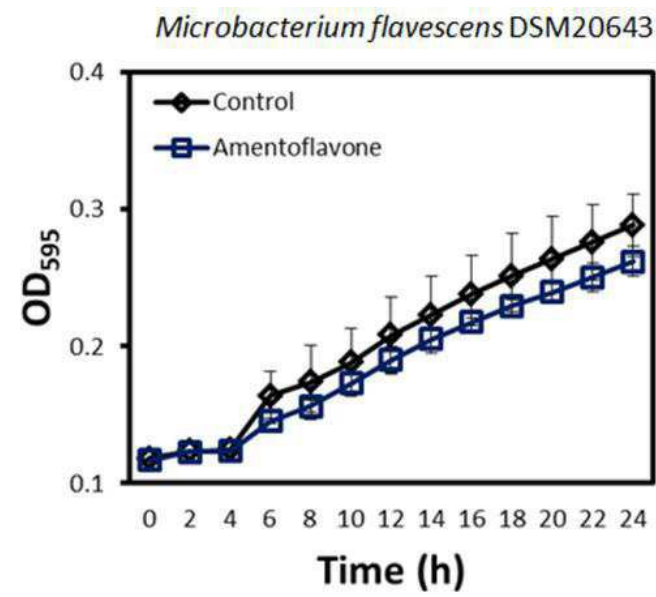
도면5f



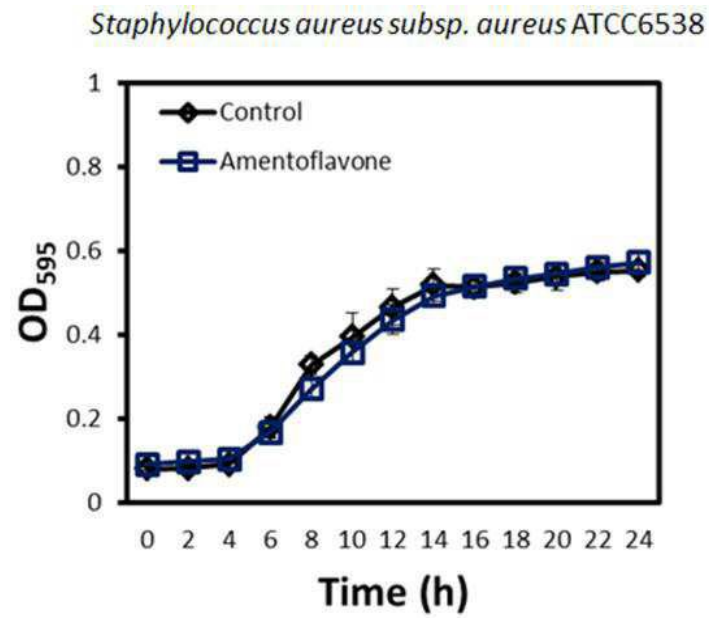
도면5g



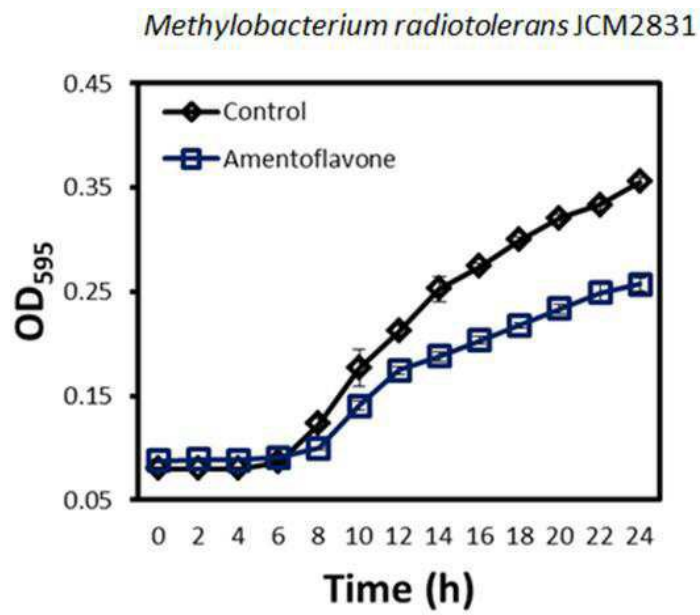
도면5h



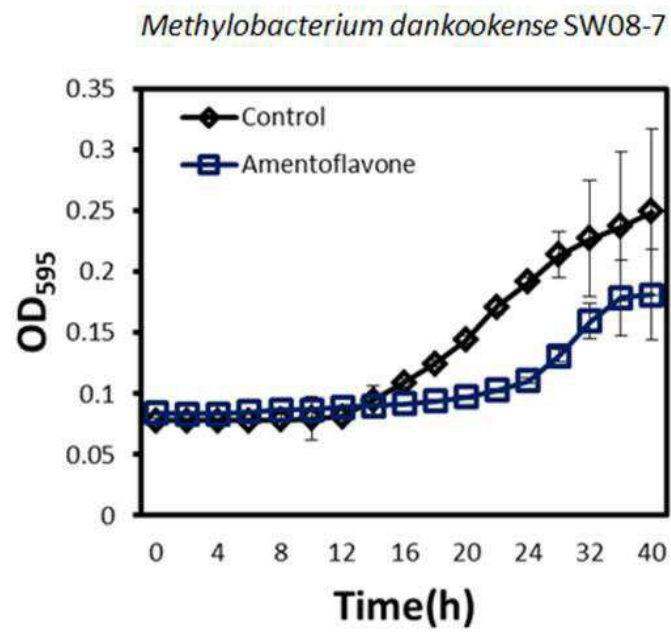
도면5i



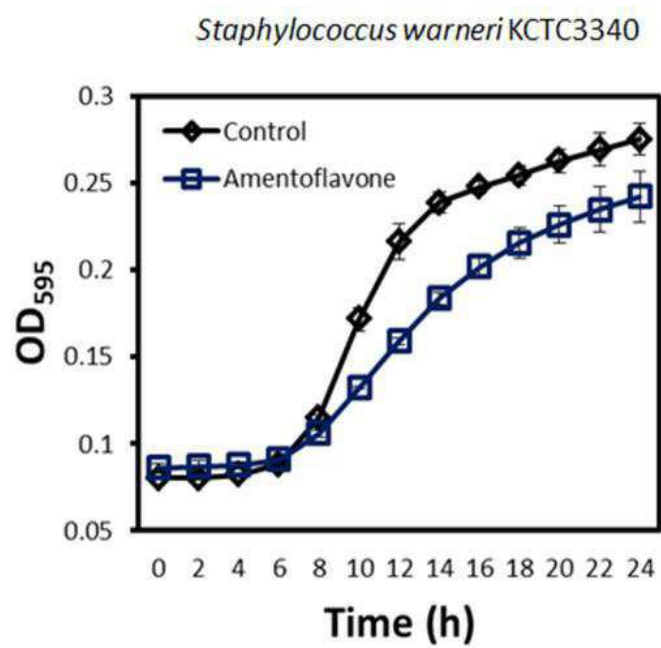
도면5j



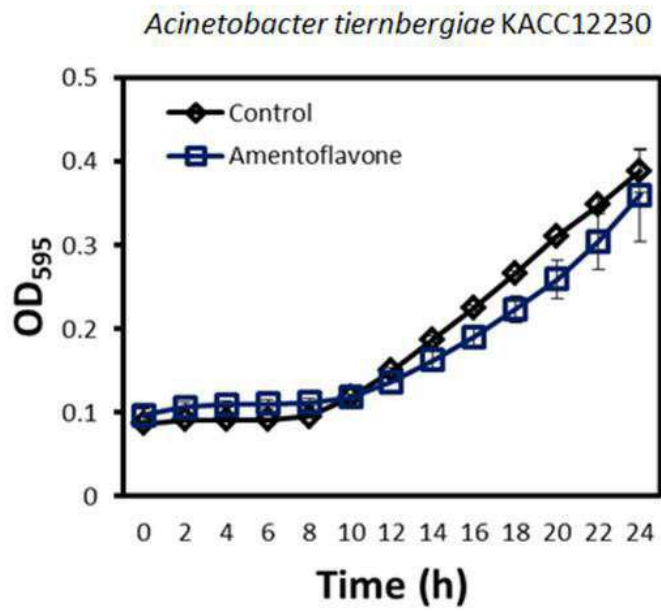
도면5k



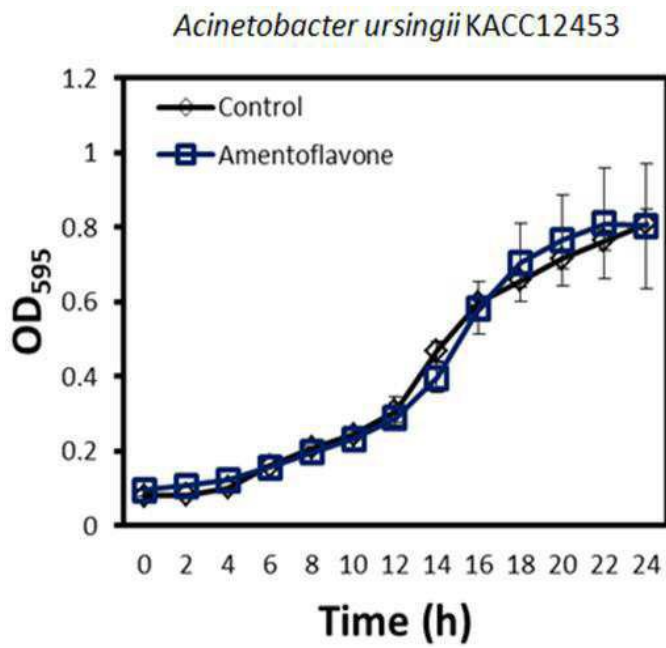
도면5l



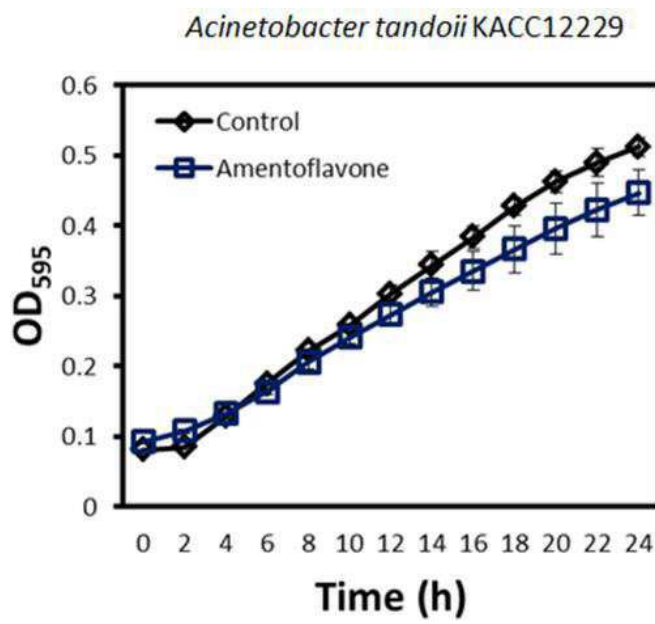
도면5m



도면5n



도면50



도면6

