



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월20일
 (11) 등록번호 10-1343893
 (24) 등록일자 2013년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 1/20 (2006.01) C02F 3/34 (2006.01)
 C12R 1/265 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0061919
 (22) 출원일자 2011년06월24일
 심사청구일자 2012년06월29일
 (65) 공개번호 10-2013-0001045
 (43) 공개일자 2013년01월03일
 (56) 선행기술조사문헌
 Water Research, Vol.41, pp.4685-4695(2007.)
 Natural Toxins, Vol.2, pp.228-235(1994.)
 Environ. Toxicol., Vol.16, pp.337-343(2001.)
 FEMS Microbiol. Lett., Vol.184,
 pp.241-246(2000.)

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 오희목
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 안치용
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (74) 대리인
 특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김지연

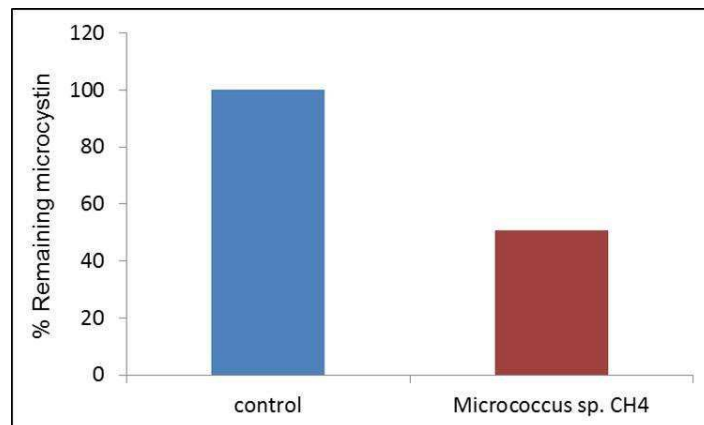
(54) 발명의 명칭 **마이크로시스틴 분해능을 갖는 마이크로코코스 속 CH4**

(57) 요약

본 발명은 마이크로시스틴 분해능이 우수한 미생물 분리 및 분해능에 관한 것으로, 미생물 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC 11910BP로 기탁된 미생물의 성질을 갖는 마이크로코코스 속 CH4에 관한 것으로서, 이를 이용한 독성 분해 및 녹조제어용 생물제제가 제공된다. 본 발명의 신균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]는 마이크로시스틴스 에루지노사가 생산하는 간독소 마이크로시스틴 분해 활성이 우수하여 우리나라의 부영양화된 호수에서 효과적으로 마이크로시스틴으로 인한 환경문제를 해결할 수 있고 녹조 발생에 의한 수질관리 문제를 해결할 수 있다.

이와 같이 부영양화 수계에 존재하는 조류 공존 미생물을 이용함으로써 기존의 화학적, 생물학적 방법과 달리 수계에 2차 환경오염이나 생태계교란 등 2차적인 피해를 주지 않아 녹조 제어에 매우 효과적이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자
김희식
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
고소라
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이영기
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100600100531-00-0-000-0-1-1001
부처명	환경부
연구사업명	수생태복원사업
연구과제명	바이오마커를 이용한 수계 독성측정실용화 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

마이크로시스틴 분해능을 갖는 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4) KCTC11910BP.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 마이크로시스틴은 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)가 생성하는 독소인 것을 특징으로 하는, 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4) KCTC11910BP.

청구항 3

마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4) KCTC11910BP 균주 또는 그 배양물을 유효성분으로 포함하는, 마이크로시스틴 분해용 생물제제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 탁월한 마이크로시스틴 분해능을 갖는 마이크로코코스 속 CH4 균주 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 우리나라를 비롯한 전 세계에서 하천과 호수에서 심한 부영양화로 조류가 대량으로 증식하여 상수 뿐 아니라 산업용수의 수원으로도 위협을 받고 있으며, 이에 따른 피해도 점차 증가하는 추세이다. 특히, 여름철에 빈번히 발생하는 시아노박테리아의 녹조현상은 수질관리의 측면에서 매우 중요하다. 수화가 발생하는 호수에서 가장 흔히 출현하는 시아노박테리아는 마이크로시스티스(*Microcystis*), 아나베나(*Anabaena*), 오실레이토리아(*Oscillatoria*) 등이 알려져 있고, 국내 대부분의 부영양호에서는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)가 우점하고 있다(김 등 1999, 이 등 2002, 이 등 2003). 시아노박테리아는 여러 종류의 이차대사산물을 생산하는데, 그 중 일부는 고등생물에게 독성물질로 작용하기도 한다. 특히, 마이크로시스티스 등과 같은 시아노박테리아들은 식수의 위생안전성을 위협하는 마이크로시스틴(microcystin)을 생산한다. 마이크로시스틴은 7개의 아미노산이 고리를 형성하고 있는 구조로 되어 있고, 현재까지 약 60여종 이상의 변종이 알려져 있다(kaya 1999, water research 9-11). 마이크로시스틴은 간출혈과 간기능 부전 등의 급성독성을 일으킬 뿐만 아니라 프로테인 포스파타아제 1과 2A 패밀리의 활동을 저해하여 간암을 유발시키는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 쥐의 DNA에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Kackintosh et al, 1990, Tsuji et al. 1996. Lakshmana Rao and Bhattacharya, 1996). 지금까지 분리된 마이크로시스틴 중 가장 흔히 생성되는 독소는 마이크로시스틴-LR과 -YR 그리고 -RR이며 이 중 마이크로시스틴-LR의 LD50(Lethal death 50)은 50ug/kg으로서 독성이 가장 강한 것으로 알려져 있다(Carmichael et al. 1988, Krishnamurthy et al. 1989). 그러나 이런 마이크로시스틴은 현재의 수처리 방법으로 제거되지 않아 전 세계적으로 많은 문제가 발생하고 있다. 최근 국내의 상수원인 댐 저수지나 하천에서 부영양화에 의한 녹조 발생을 방지 및/또는 제어하기 위한 여러 가지 방법들이 제기되고 시행되고 있으나, 이러한 방법들은 기술적, 경제적 측면에서 상당한 제약이 있고 2차적인 환경오염을 유발할 가능성이 있으며, 수생태계의 생물 다양성 감소와 미생물 군집 변화와 같은 생태계교란이 발생할 소지가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 마이크로시스틴을 분해능을 갖는 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]를 제공하고자 한다.

[0004] 또한, 본 발명은 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP] 또는 그 배양물을 포함하는 마이

크로시스틴 분해용 생물제제를 제공하고자 한다.

[0005] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 마이크로시스틴을 분해능을 갖는 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]를 제공한다. 본 발명의 일 구현예로, 상기 마이크로시스틴은 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)가 생성한다.

[0007] 또한, 본 발명은 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP] 또는 그 배양물을 포함하는 마이크로시스틴 분해용 생물제제를 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]는 마이크로시스틴을 효과적으로 분해할 수 있으므로, 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)에 의한 높은 농도의 마이크로시스틴을 빠른 시간 내에 감소시키는데 유용하리라 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]의 마이크로시스틴이 포함된 R2A배지에서 균주의 성장율을 나타낸 그래프이다.

도 2는 균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]의 마이크로시스틴이 포함된 R2A배지에서 마이크로시스틴의 분해능을 나타낸 그래프이다.

도 3은 균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]의 마이크로시스틴이 포함된 M9배지에서 균주의 성장율을 나타낸 그래프이다.

도 4는 균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]이 마이크로시스틴을 유일 탄소원으로 이용한 분해능을 나타낸 HPLC 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명자 등은 부영양화를 일으키는 대표 시아노박테리아인 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)와 공생하고 있는 균주를 이용하여 마이크로시스틴의 분해능을 확인하였고, 본 발명은 이에 기초하여 완성되었다.

[0011] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명은 부영양화 수계에서 분리한 마이크로시스틴 분해능이 높은 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)에 관한 것이다.

[0013] 상기 마이크로시스틴은 마이크로시스티스(*Microcystis*), 아나배나(*Anabaena*) 또는 오실레이토리아(*Oscillatoria*)가 생성할 수 있고, 바람직하게 상기 마이크로시스티스(*Microcystis*)는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)일 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 신규주 분리 동정하는 과정을 일 구현예로서 설명하면 다음과 같다.

[0015] 마이크로시스티스에 의해 녹조가 발생한 현장으로부터 12-15시 사이에 호소 표층(0-30cm)으로부터 시료를 채취하여 실험에 사용하였다. 수질 분석기를 이용하여 수온, pH, 투명도, DO, 광도, 탁도 등을 측정하였다. 수온 및 pH는 채수 즉시 현장에서 YSI meter (63/100 FT, YSI Inc, Yellow Springs, USA)를 사용하여 측정하였으며 채취한 시료를 냉장상태로 운반하였다. 부영양화가 발생한 수계에서 상기 방법으로 채취한 시료로부터 녹조발생 원인종인 마이크로시스티스를 BG11 (pH 7.5) 배지를 사용하여 120 μ E/m²/s로 연속 조사하면서 배양한다. 배양된 마이크로시스티스와 공존 존재하는 미생물을 다양한 영양배지(LB, R2A, NA, 1/5 혹은 1/20 희석된 LB)를

사용하여 MPN법을 사용하여 미생물을 분리한 후 서너 차례 계대를 통하여 순수 분리한다. 순수 분리된 미생물에 추출한 마이크로시스틴을 첨가하여 분해능이 우수한 미생물을 최종 선별한다.

- [0016] 최종적으로 선별된 미생물을 분자 생물학적 방법인 16s rDNA 염기서열 동정방법으로 동정한 결과, 마이크로코코스 속으로 동정되었으며 이를 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)로 명명하였다. 상기 신균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 2011년 3월 31일자로 기탁하였으며, 수탁번호는 KCTC 11910BP로 부여받았다.
- [0017] 상기 신균주의 분해능을 확인하기 위하여, 균주 배양액에 추출한 마이크로시스틴을 첨가 배양하여 마이크로시스틴이 분해되는 것을 확인하였다.
- [0018] 본 발명에 따른 신균주는 부영양화 수계에서 녹조 발생원인종과 공존하는 박테리아이며 활성이 우수하여 마이크로시스틴스 에루지노사가 생산하는 마이크로시스틴을 빠른 시간 안에 효과적으로 분해할 수 있다.
- [0019] 따라서 상기 신균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4)[KCTC11910BP]는 유독성 남조류 마이크로시스틴스 에루지노사가 생산하는 마이크로시스틴을 효과적이고 빠르게 분해함으로써 독소로 인해 발생하는 2차 환경오염을 줄일 수 있다고 기대된다. 또한, 본 발명에 따른 신균주 마이크로코코스 속 CH4는 마이크로시스틴 분해능이 우수하므로 녹조 발생 지역의 독소 제어제제 및 수계의 오염 환경 정화용 생물소재로서 사용 가능하다. 이에 본 발명은 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* sp. CH4) KCTC11910BP 균주 또는 그 배양물을 유효성분으로 포함하는 마이크로시스틴 분해용 생물제제를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0021] **[실시예]**

[0022] **실시예 1. 미생물의 분리**

[0023] 녹조가 발생한 지역으로부터 상층부(수표면 30 cm)의 시료를 채취하여 녹조 발생 우점종인 남조류(마이크로시스틴스 대상)를 분리한 후, BG11 (pH 7.5) 배지를 사용하여 120 μ E/m²/s로 연속 조사하면서 서너 차례 계대를 통하여 미생물 군집이 안정된 남조류 마이크로시스틴스를 분리, 배양하였다. 미생물 군집이 안정된 남조류, 마이크로시스틴스 배양액 혹은 마이크로시스틴스를 둘러싸고 있는 점액질(mucilage, 뮤신질)에 존재하는 미생물을 분리하기 위하여 남조류 배양액을 30분간 강하게 볼텍스를 한 후, 다양한 영양배지(LB, R2A, NA 그리고 1/5 혹은 1/20 희석된 LB)에 희석, 도말하여 37℃에서 24-48시간 배양하였다. 생성된 콜로니들을 서너 차례 동일 배지로 계대를 한 후 마이크로시스틴 분해능이 우수한 균주를 분리하였다.

[0024] **실시예 2. 분리 균주의 동정**

[0025] 상기 실시예 1에서 분리한 분리 균주의 동정은 동일한 배지를 사용하여 배양한 후, genomic DNA isolation kit(Quiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 16S rDNA 내의 가변부위를 PCR로 증폭하기 위하여 16s rDNA에서 일반적으로 사용하는 두 universal primers(27F, 1492R)를 사용하였다.

[0026] 27F 프라이머: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (서열번호 1)

[0027] 1492R 프라이머: GGTTACCTGTTACGACTT (서열번호 2)

[0028] PCR 조건은 95℃에서 5분간 변성하고, 95℃에서 1분, 56℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 30번 반복하여 DNA를 증폭시키고 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하여 PCR반응을 종결시켰다.

[0029] 전기영동 결과에서 약 1460bp의 증폭된 DNA를 분리한 뒤 이를 클로닝 벡터인 pGEM T-easy vector(Quiagen,

Hilden, Germany)를 사용하여 형질전환하였다.

[0030] 16S rDNA 내의 가변 부위의 서열은 BLAST Search Program(NCBI)을 사용하여 비교 분석하였고(서열번호 3 참조), 16S rDNA의 염기서열 분석을 수행한 결과, 본 발명의 균주는 "The BLAST search"를 통해 마이크로코코스 속과 높은 상동성을 가지는 것을 확인하였다(표 1 참조). 이에 상기 분리된 균주를 마이크로코코스 속 CH4 (*Micrococcus* sp. CH4)라 명하고 미생물 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2011년 3월 31일자로 기탁하여 수탁번호 KCTC 11910BP를 부여받았다.

표 1

16S rDNA 염기서열분석 결과

[0031]

균주	유사성(%)	근접 미생물명	엑세스 번호
CH4	1011/1015(99%)	<i>Micrococcus</i> sp.	gb FJ626629.1

[0032]

실시예 3. 마이크로시스틴 분석

[0033]

환경시료에서 분리한 마이크로시스틴스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)를 BG11배지 100ml에 배양하였다. 배양 조건은 조류 배양 조건인 28℃, 120 μ E/m²/s로 배양하였다. 조체를 모은 후 동결건조 하였다. 세포내 마이크로시스틴은 Harada(1996) 방법에 따라 추출, 분석하였다. 추출한 마이크로시스틴은 HPLC로 분석하였다. Shimadzu CLASS-LC10A system model (일본)을 사용하였다. C₁₈ column (5μm, 150× 4.6mm)으로 injection volumn은 20μl, 이동상은 메탄올과 0.05% TFA를 포함하는 물을 52:48(V/V)로 하여 flow rate는 1.0ml/min로 사용하였고, UV detector로 238nm에서 측정하였다(Oh et al. 2001, Lawton et al. 1994-AEM). 일반적으로 많이 생성하는 마이크로시스틴-LR, -RR, -YR만을 검출하였고, 시료의 흡수 peak면적을 표준용액의 peak면적과 비교하여 정량하였다. 또 다른 분석법으로는 protein phosphatase inhibition assay를 사용하였다. 이는 마이크로시스틴이 protein phosphatase의 활성을 저해하는 작용을 이용한 방법으로서 para-nitrophenylphosphate를 이용하여 마이크로시스틴을 정량하는 방법이다. 추출한 마이크로시스틴과 효소반응을 시킨 후, 405nm에서 흡광도를 측정하였다(An and Carmichael, 1994, Ward et al. 1997).

[0034]

실시예 4. 균주의 마이크로시스틴 분해능 조사

[0035]

본 발명에 따른 균주 마이크로코코스 속 CH4(*Micrococcus* CH4)가 마이크로시스틴의 분해능을 알아보기 위하여, 10ml R2A 배지에 전배양하였다. 24시간 배양한 상기 균주를 10ml R2A에 0.D 595nm에서 0.3값 이상을 갖도록 집중한 후, 마이크로시스틴을 10% 첨가하였다. 배양 조건은 30℃, 110rpm으로 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 본 발명 균주의 성장정도를 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 대조구에 비해 마이크로시스틴을 처리한 실험구의 생장이 3배 증가한 것을 확인 할 수 있었다.

[0036]

또한, 마이크로시스틴 분해 정도를 protein phosphatase inhibition assay 및 HPLC 방법으로 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸바와 같이, 마이크로시스틴이 50% 분해되는 것을 확인 할 수 있었다.

[0037]

추가적으로, 본 발명의 균주가 마이크로시스틴을 유일 탄소원으로 이용하여 분해하는 것인지를 조사하였다. 10ml R2A에 전배양 한 후, 배양액을 4000rpm 15분 원심 분리하여 모은 후, PBS buffer를 사용하여 두 번 세척한 후, 탄소원을 모두 제거하기 위하여 24시간동안 상기 조건으로 PBS buffer에 배양하였다. 배양액을 4000rpm 15분 원심분리하여 모은 후, M9배지 10ml에 상기 균주를 모두 첨가하고, 추출한 마이크로시스틴을 10% 첨가하여 48시간 동안 마이크로시스틴이 분해되는 정도를 확인하였다. 상기 균주의 배양액을 흡광도를 측정하여 시간에 따른 성장을 조사하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조구에 비해 마이크로시스틴을 처리한 실험구의 생장이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 마이크로시스틴 분해 정도를 HPLC 방법으로 확인하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 마이크로시스틴이 분해된 것을 확인할 수 있었다.

[0038]

전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

수탁번호

[0039]

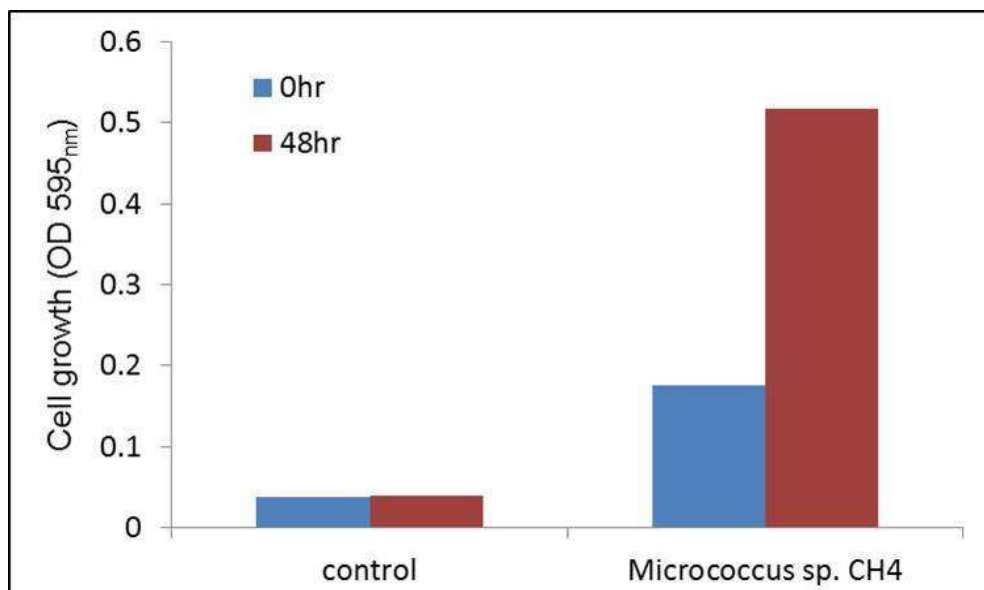
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11910BP

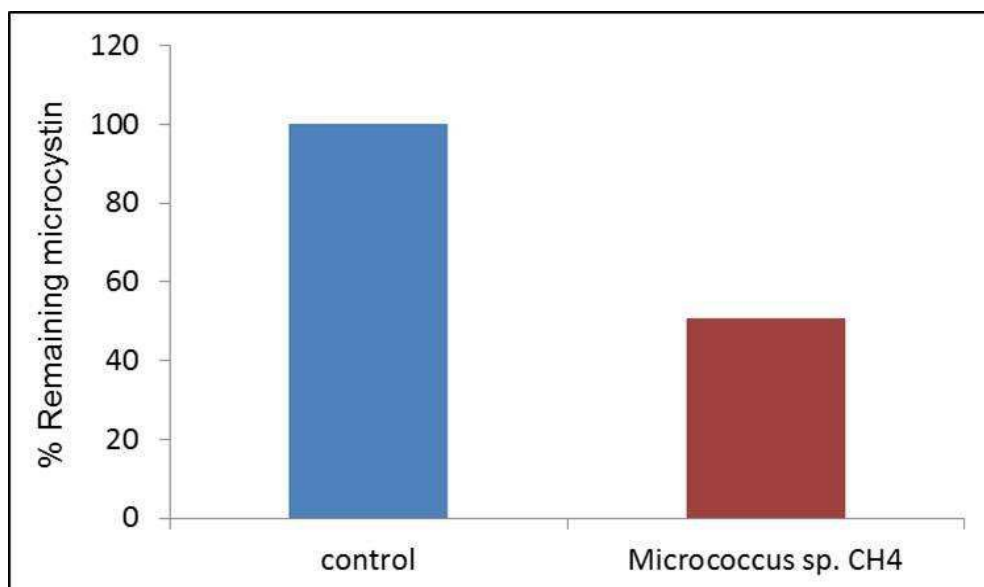
수탁일자 : 20110331

도면

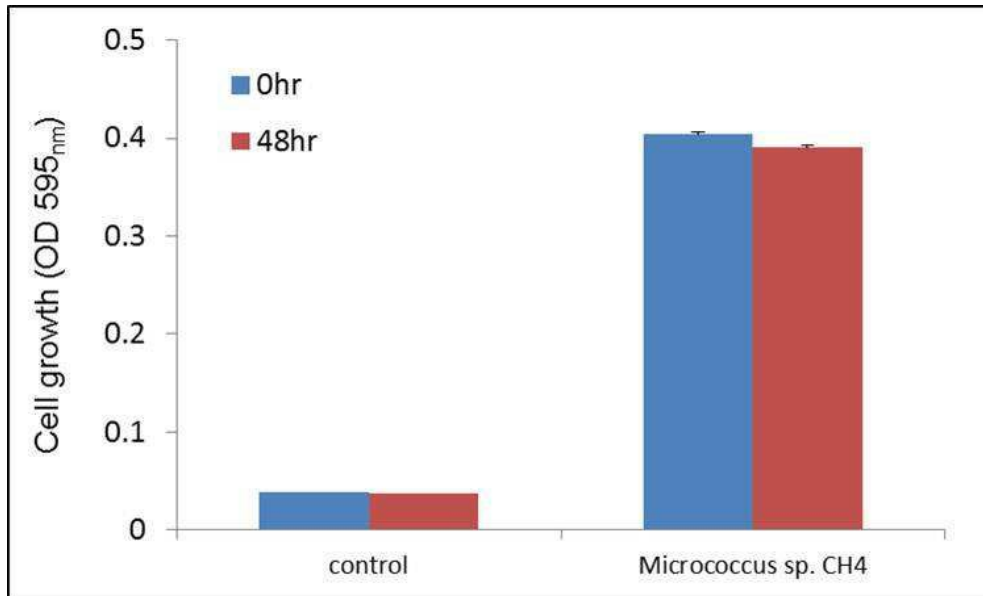
도면1



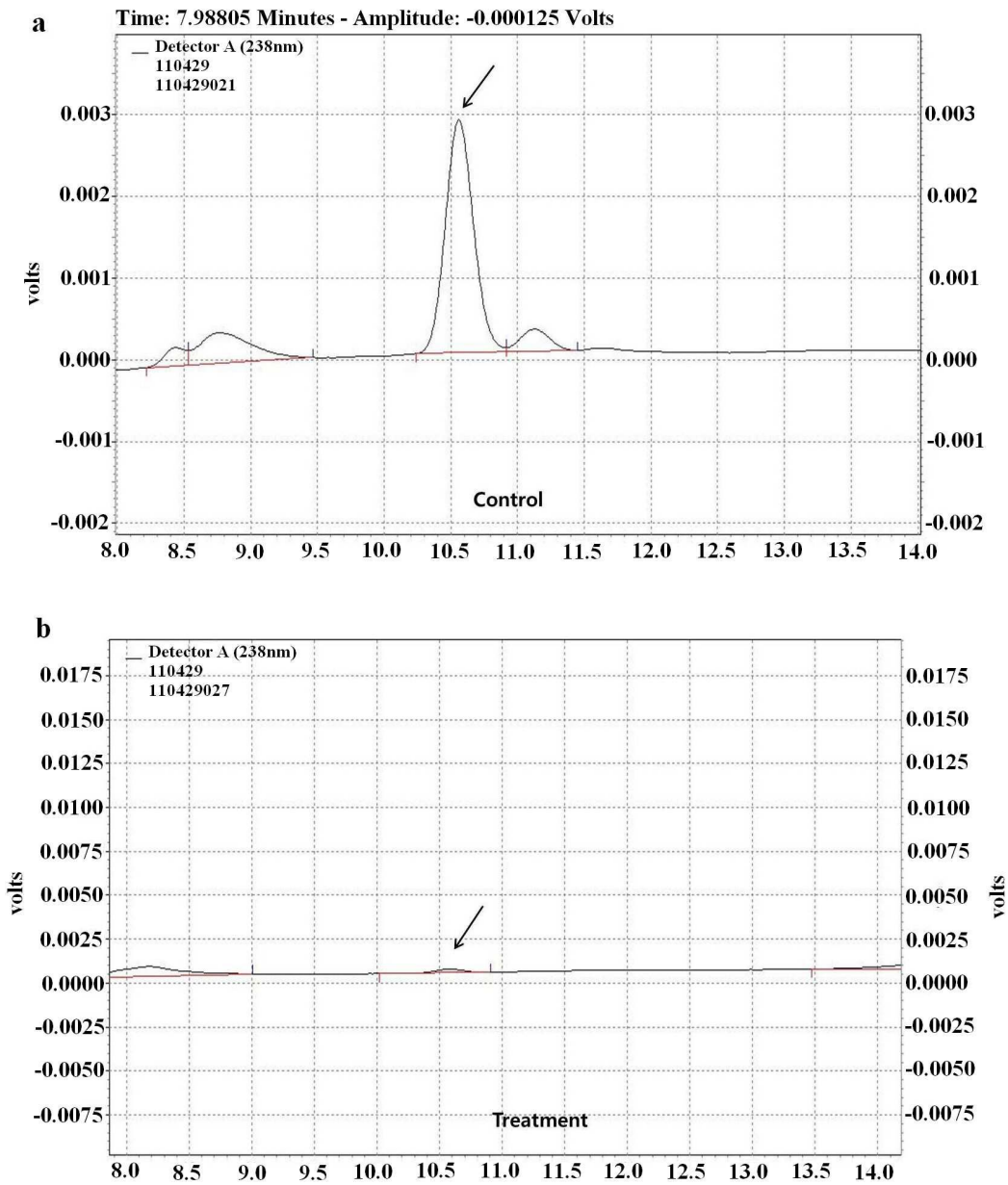
도면2



도면3



도면4



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)