



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0002946
(43) 공개일자 2013년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0068391
(22) 출원일자 2012년06월26일
심사청구일자 2012년06월26일
(30) 우선권주장
1020110064072 2011년06월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
군산대학교산학협력단
전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동,
군산대학교)
(72) 발명자
이원호
대전광역시 서구 둔산동 가람아파트 13-1003호
김형섭
전라북도 군산시 회현면 학당리 1027번지
박종우
전라북도 전주시 완산구 효자동1가 태하아파트 F
동 202호
(74) 대리인
김종관, 권오식, 박창희

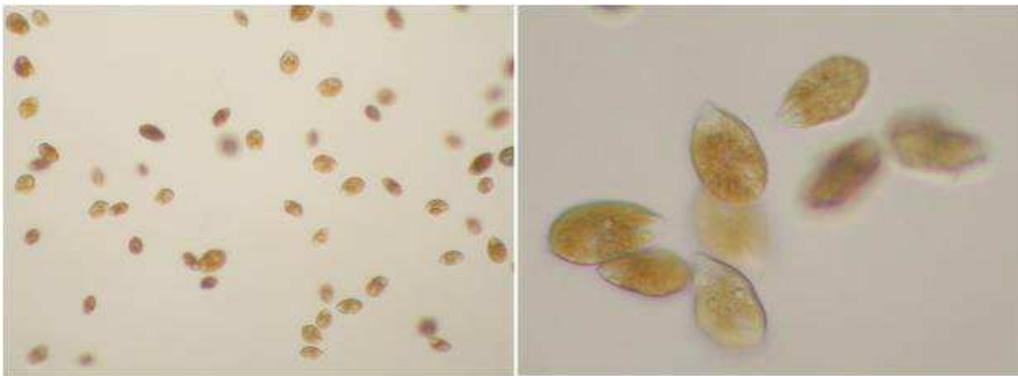
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해양 저서성 와편모류, 특히 오스트레옵시스(Ostreopsis spp.) 속 와편모류의 세포변형 방지를 위해 배양액을 제조하는 방법에 관한 것으로, 저서성 와편모류는 배양시 세포가 변형되어 본래의 특징을 알아볼 수 없기 때문에 이를 방지하기 위해 새로이 제조된 배양액으로 교환해줌으로써 본래의 세포 형태를 유지할 수 있고, 기존의 배양액에 비해 성장이 우수하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D10807910H320000110

부처명 해양수산부

연구사업명 해양생명공학기술개발

연구과제명 해양독성생물자원 기탁등록 보존기관

주관기관 군산대학교

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

질산염류 화합물(A); 인산염류 화합물(B); 금속염류 화합물 및 착화합물(C); 비타민류 화합물(D); 및 해수(E)를 포함하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 저서성 와편모류는 오스트레옵시스속(*Ostreopsis* spp.)와편모류인 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 질산염류 화합물(A)은 질산나트륨, 질산칼륨, 질산철, 질산칼슘 및 질산암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 인산염류 화합물(B)은 인산수소나트륨, 인산수소칼륨, 인산수소칼슘 및 글리세로인산나트륨으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 금속염류 화합물(C)은 몰리브덴산나트륨, 황산아연, 염화코발트, 염화망간 및 황산구리로 이루어진 군이고; 착화합물(C)은 에틸렌디아민테트라아세트산나트륨 및 에틸렌디아민테트라아세트산철인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 비타민류 화합물(D)은 티아민염산염, 비오틴 및 비타민B12로 이루어진 군인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 질산염류 화합물(A)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 28 내지 42×10^{-6} M의 함량으로 포함되고;

상기 인산염류 화합물(B)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 1.4 내지 2.2×10^{-6} M의 함량으로 포함

되며;

상기 금속염류 화합물(C)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 폴리브덴산나트륨의 함량이 2 내지 3×10^{-7} M, 황산아연의 함량이 2.8 내지 4.2×10^{-7} M, 염화코발트의 함량이 1.6 내지 2.6×10^{-8} M, 염화망간의 함량이 3.6 내지 5.6×10^{-8} M, 황산구리의 함량이 1.3 내지 2.2×10^{-8} M, 에틸렌디아민테트라아세트산나트륨의 함량이 1.6 내지 2.4×10^{-5} M, 에틸렌디아민테트라아세트산철의 함량이 5.2 내지 8.0×10^{-6} M로 포함되고;

상기 비타민류 화합물(D)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 티아민염산염의 함량이 4.7 내지 7.2×10^{-7} M, 비오틴의 함량이 3.5 내지 5.4×10^{-9} M, 비타민B12의 함량이 5.9 내지 9.0×10^{-10} M로 포함되는 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물.

청구항 8

하기 모배양액의 제조방법으로부터 수득된 질산염류모배양액(I) : 인산염류모배양액(II) : 금속염류모배양액(III) : 비타민류모배양액(IV) : 해수(V)를 1:1:1:1:1,000의 부피비로 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액의 제조방법.

[상기 질산염류모배양액(I)은 3 내지 5 중량%의 질산염류 화합물 수용액이고;

상기 인산염류모배양액(II)은 0.1 내지 0.3 중량%의 인산염류 화합물 수용액이며;

상기 금속염류모배양액(III)은

4.5 내지 7.5 중량%의 폴리브덴산나트륨수용액, 4.5 내지 7.5 중량%의 황산아연수용액, 0.4 내지 0.6 중량%의 염화코발트수용액, 0.7 내지 1.1 중량%의 염화망간수용액, 0.2 내지 0.4 중량%의 황산구리수용액을 각각 동량의 부피비로 혼합하여 제조된 혼합액(a) 0.003 내지 0.005 중량%, 에틸렌디아민테트라아세트산나트륨(b) 0.5 내지 1.0 중량%, 에틸렌디아민테트라아세트산철(c) 0.2 내지 0.35 중량% 및 증류수(d)를 혼합하여 제조되고;

상기 비타민류모배양액(IV)은 증류수 100중량부를 기준으로 티아민염산염 0.015 내지 0.025중량부, 비오틴 0.00008 내지 0.00012 중량부 및 비타민B12 0.00008 내지 0.00012 중량부를 첨가하여 제조된다.]

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 저서성 와편모류는 오스트레옵시스속(*Ostreopsis* spp.)와편모류인 저서성 와편모류세포 배양액의 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 질산염류 화합물은 질산나트륨, 질산칼륨, 질산철, 질산칼슘 및 질산암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액의 제조방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 인산염류 화합물은 인산수소나트륨, 인산수소칼륨, 인산수소칼슘 및 글리세로인산나트륨으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액의 제조방법.

청구항 12

제 8항 내지 제 11항에서 선택되는 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 저서성 와편모류세포 배양액.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미세조류 배양에 일반적으로 사용되고 있는 배양액 이외에 저서성 와편모류, 특히 오스트레옵시스(Ostreopsis) 속 와편모류 전용 배지를 제조함으로써, 이들 와편모류의 세포원형을 그대로 유지시켜 세포학적 연구에 필요한 재료로 공급하기 위한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 열대 및 아열대에 서식하면서 시쿠아테라어류독을 유발하는 해양 저서성 와편모류의 출현 및 대량발생이 전 세계적으로 꾸준히 보고되고 있다. 우리나라 제주도 해역에서도 시쿠아테라어류독성 해양 와편모류들의 출현이 보고된 바 있어, 이들 와편모류는 지구온난화가 우리나라 해역에도 큰 영향을 미치고 있음을 입증하는 지시생물로서 중요한 의미가 있다. 따라서 제주도 해역에 서식하고 있는 것으로 확인된 이들 와편모류에 대해 기초적인 생리, 생태, 유전 등 다양한 분야의 연구와 더불어 국민 건강 유지를 위한 시쿠아테라어류독의 모니터링도 필요하다. 이러한 연구를 위해서는 기본적으로 세포 배양 및 유지가 선결조건이며, 세포가 건강한 상태로 성장을 유도해야 한다.

[0003] 이미 오래전부터 저서성 와편모류와 같은 광합성 미세조류를 배양하기 위해 질소, 인, 미량금속, 비타민 등의 각 성분이 적절히 조합된 배양액을 사용하여 왔고, 각 분류군 또는 각 종에 따라 최적 성장을 위한 특정 성분이 포함된 배양액을 제조하여 사용함으로써 종 특유의 성질을 활용한 연구에 이용되어 왔다. 일반적으로 연안성 미세조류는 f/2 배지 또는 ES 배지를, 저서성, 착생성, 외양성 종은 L2 또는 K 배지를 사용하였고, 특히 저서성 와편모류 중 감비어디스쿠스(Gambierdiscus) 속은 T1 배지를 사용하기도 한다.

[0004] 그러나, 제주도 연안에서 분리한 저서성 와편모류는 이들 배지에서는 성장이 더디거나 세포가 변형되고, 심한 경우 시스트(cyst)를 형성함으로써, 세포원형을 알아볼 수 없거나 세포가 매우 약해져 광학현미경 및 전자현미경 촬영과 같이 내외부 형태를 관찰하는 세포학적 연구에 배양시료로 사용할 수 없다는 문제점이 발견되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 한계를 극복하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 질산염류 화합물(A); 인산염류 화합물(B); 금속염류 화합물 및 착화합물(C); 비타민류 화합물(D); 및 해수(E)를 포함하는 저서성 와편모류세포 배양액 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 저서성 와편모류세포 배양액 조성물은 질산염류 화합물(A); 인산염류 화합물(B); 금속염류 화합물 및 착화합물(C); 비타민류 화합물(D); 및 해수(E)를 포함한다.

[0007] 상기 질산염류 화합물(A)은 배양액 내에서 세포단백질 및 DNA 구성성분 등의 역할을 함으로써 포함되는 것인데, 구체적인 예로 질산나트륨, 질산칼륨, 질산철, 질산칼슘 및 질산암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 사용할 수 있고, 가장 바람직하게는 질산나트륨을 사용하는 것이 배양액의 제조 관리 편의성 면에 있어서 가장 바람직하다. 질산염류 화합물(A)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 28 내지 42×10^{-6} M의 함량으로 포함되는 것이 세포의 정상성장에 가장 좋다. 산염류화합물의 함량이 너무 낮으면 적정 성장 속도의 실현 측면에 있어서 좋지 않고, 함량이 너무 높으면 세포 성장을 저해하는 스트레스 측면에 있어서 단점을 수반한다.

[0008] 상기 인산염류 화합물(B)은 배양액에 포함됨으로써 DNA 생성의 재료 성분 공급 및 생물에너지 운반 분자 생성 촉진 효과를 나타낸다. 인산염류 화합물은 무기인산염류로 인산수소나트륨, 인산수소칼륨 및 인산수소칼슘으로 이루어진 군이나 유기인산염류로 글리세로인산나트륨 등에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 사용할 수 있고, 가장 바람직하게는 유기인산염류인 글리세로인산나트륨을 사용하는 것이 배양액의 제조 관리 편의성 면에

있어서 가장 바람직하다.

- [0009] 인산염류 화합물(B)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 1.4 내지 2.2×10^{-6} M의 함량으로 포함되는 것이 세포의 정상성장에 가장 좋다. 산염류화합물의 함량이 너무 낮으면 적정 성장속도의 실현 측면에 있어서 좋지 않고, 함량이 너무 높으면 세포 성장을 저해하는 스트레스 측면에 있어서 단점을 수반한다.
- [0010] 본 발명에 따른 금속염류 화합물(C)은 배양액 내에서 세포성장에 필수적인 효소의 cofactor로서 각종 효소의 반응 특성을 좌우하는 작용을 한다. 상기 금속염류 화합물(C)은 몰리브덴산나트륨, 황산아연, 염화코발트, 염화망간 및 황산구리로 이루어진 군이며, 착화합물(C)은 배양액 속 금속이온 농도의 조절에 사용된다. 본 발명에 따르는 착화합물은 에틸렌디아민테트라아세트이산나트륨 및 에틸렌디아민테트라아세트산철인 것을 특징으로 한다.
- [0011] 상기 금속염류 화합물 및 착화합물(C)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 몰리브덴산나트륨의 함량이 2 내지 3×10^{-7} M, 황산아연의 함량이 2.8 내지 4.2×10^{-7} M, 염화코발트의 함량이 1.6 내지 2.6×10^{-8} M, 염화망간의 함량이 3.6 내지 5.6×10^{-8} M, 황산구리의 함량이 1.3 내지 2.2×10^{-8} M, 에틸렌디아민테트라아세트이산나트륨의 함량이 1.6 내지 2.4×10^{-5} M, 에틸렌디아민테트라아세트산철의 함량이 5.2 내지 8.0×10^{-6} M로 포함되는 것이 세포의 정상성장에 가장 좋다. 금속염류화합물의 함량이 너무 낮으면 적정 성장속도의 실현 측면에 있어서 좋지 않고, 함량이 너무 높으면 중금속 독성에 의한 세포성장 저해 측면에 있어서 단점을 수반한다.
- [0012] 본 발명에 따른 비타민류 화합물(D)은 티아민염산염, 비오틴 및 비타민B12로 이루어진 군인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 비타민류 화합물은 배양액 내에서 성장 촉진 작용을 함으로써 저서성 와편모류 세포의 성장에 영향을 미친다.
- [0014] 본 발명에서 비타민류 화합물(D)은 상기 저서성 와편모류세포 배양액 조성물 내에 티아민염산염의 함량이 4.7 내지 7.2×10^{-7} M, 비오틴의 함량이 3.5 내지 5.4×10^{-9} M, 비타민B12의 함량이 5.9 내지 9.0×10^{-10} M로 포함되는 것이 세포의 정상성장 실현 측면에 있어서 가장 바람직한 첨가량이다. 비타민류 화합물의 함량이 너무 낮으면 적정 성장속도의 실현 측면에 있어서 좋지 않고, 함량이 너무 높으면 배양액의 제조 관리의 경제성 면에 있어서 단점을 수반한다.
- [0015] 본래 열대 및 아열대에 서식하는 어둑 유발성 해양 와편모류는 아열대의 수중 동식물 표면에 부착하여 생활하는 종류이므로, 대부분의 영양염류 농도가 극히 낮은 환경에 적응해 왔다. 따라서 발명의 배양액에 포함되는 질산염류 화합물, 인산염류 화합물, 금속염류 화합물들의 배양액 내 농도를 상기 함량의 범위와 같이 일반 와편모류를 배양하기 위한 배양액 내 농도보다 현저하게 낮게 조절하는 것이 저서성 와편모류의 성장에 가장 바람직하다. 다만, 다른 생물체 표면에 부착하여 생활하는 과정에서, 이들이 숙주생물로부터 공급받았을 비타민류의 농도는 상기 함량의 범위와 같이 일반 배양액 내 농도보다 현저하게 높게 조절하는 것이 저서성 와편모류의 성장에 가장 바람직하다.
- [0016] 본 발명에 기재된 저서성 와편모류는 특히 오스트레옵시스속(*Ostreopsis* spp.)와편모류인 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은
- [0018] 하기 모배양액의 제조방법으로부터 수득된 질산염류모배양액(I) : 인산염류모배양액(II) : 금속염류모배양액(III) : 비타민류모배양액(IV) : 해수(V)를 1:1:1:1,000의 부피비로 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 하는 저서성 와편모류세포 배양액의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 상기 질산염류모배양액(I)은 3 내지 5 중량%의 질산염류 화합물 수용액이고;
- [0020] 상기 인산염류모배양액(II)은 0.1 내지 0.3 중량%의 인산염류 화합물 수용액이며;
- [0021] 상기 금속염류모배양액(III)은
- [0022] 4.5 내지 7.5 중량%의 몰리브덴산나트륨수용액, 4.5 내지 7.5 중량%의 황산아연수용액, 0.4 내지 0.6 중량%의 염화코발트수용액, 0.7 내지 1.1 중량%의 염화망간수용액, 0.2 내지 0.4 중량%의 황산구리수용액을 각각 동량의 부피비로 혼합하여 제조된 혼합액(a) 0.003 내지 0.005 중량%, 에틸렌디아민테트라아세트이산나트륨(b) 0.5 내지 1.0 중량%, 에틸렌디아민테트라아세트산철(c) 0.2 내지 0.35 중량% 및 증류수(d)를 혼합하여 제조되고;
- [0023] 상기 비타민류모배양액(IV)은 증류수 100중량부를 기준으로 티아민염산염 0.015 내지 0.025중량부, 비오틴

0.00008 내지 0.00012 중량부 및 비타민B12 0.00008 내지 0.00012 중량부를 첨가하여 제조된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 미세조류 배양액은 저서성 와편모류, 특히 오스트레옵시스(Ostreopsis) 속 와편모류 전용 배지 로써, 이들 저서성 와편모류의 세포원형을 그대로 유지시켜 세포학적 연구에 필요한 재료로 공급할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 저서성 와편모류 배양액에서 성장한 정상세포의 현미경 사진이다.
 도 2는 일반배양액인 f/2 배지에서 성장시킨 세포의 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 이는 발명의 구성 및 효과를 이해시키기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0027] 하기 실시예에서 사용되는 해수는 서해연안에서 채수한 해수를 고압멸균 방식으로 살균처리하여 사용하였고, 세포성장을 측정하는 현미경 관찰은 올림푸스 BX-51의 200배율에서 혈구계수판을 이용하여 계수하고 디지털 사진 영상으로 관찰, 분석 하였다.

[0028] [실시예 1] 저서성 와편모류 배양액의 제조

[0029] 증류수 0.9리터에 질산나트륨(NaNO_3) 39.8g을 완전히 녹인 다음 증류수로 1리터를 채워 질산염류모배양액을 제조한다.

[0030] 증류수 0.9리터에 글리세로인산나트륨($\text{Na}_2\text{-glycerophosphate}$) 3.9g을 완전히 녹인 다음 증류수로 1리터를 채워 인산염류모배양액을 제조한다.

[0031] 몰리브덴산나트륨 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 60.5g, 황산아연($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 10g, 염화코발트($\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5g, 염화망간($\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 9g, 황산구리($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 3g을 각각 1리터의 증류수에 녹인 후, 각각의 수용액을 1ml씩 취하고, 에틸렌디아민테트라아세트산이나트륨(Na-EDTA) 7.5g 및 에틸렌디아민테트라아세트산철(Fe-EDTA) 2.6g을 넣고 증류수로 최종적으로 1리터로 맞춰 금속염류모배양액을 제조한다.

[0032] 티아민염산염($\text{Thiamine}\cdot\text{HCl}$) 0.2g, 비오틴(Biotin, Vitamin H) 0.001g, 비타민 비12($\text{Vitamin B12, Cyanocobalamin}$) 0.001g을 각각 증류수 1리터에 녹여 비타민류모배양액을 제조한다.

[0033] 질산염류모배양액, 인산염류모배양액, 금속염류모배양액, 비타민류모배양액을 각각 1mL씩 취하여 해수 1L와 혼합하여, 배양에 사용하기 전까지는 섭씨 4도 온도의 냉장압소에 보관한다.

[0034] 상기 실시예에 따라 제조된 저서성 와편모류 배양액에서 각 성분의 최종 몰 농도는 하기 표 1에 나타난 것과 같다.

표 1

| 모배양액 | 화합물 | 배양액에서 최종 몰농도 |
|-----------|---|----------------------------|
| 질산염류 모배양액 | NaNO ₃ | 35 × 10 ⁻⁶ M |
| 인산염류 모배양액 | Na ₂ -glycerophosphate | 1.8 × 10 ⁻⁶ M |
| 금속염류 모배양액 | Na-EDTA | 2.0 × 10 ⁻⁵ M |
| | Fe-EDTA | 6.6 × 10 ⁻⁶ M |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 2.5 × 10 ⁻⁷ M |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 3.5 × 10 ⁻⁷ M |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 2.1 × 10 ⁻⁸ M |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 4.6 × 10 ⁻⁸ M |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 1.7 × 10 ⁻⁸ M |
| 비타민류 모배양액 | Thiamine-HCl | 5.93 × 10 ⁻⁷ M |
| | Biotin | 4.46 × 10 ⁻⁹ M |
| | Vitamin B12 | 7.49 × 10 ⁻¹⁰ M |

[0035]

[0036]

[실시예 2] 저서성 와편모류 세포의 성장

[0037]

상기 실시예 1에 따라 제조된 배양액 400 mL을 500 mL 용량의 polycarbonate 배양병에 넣어, 와편모류 세포를 100~120 cells/ml의 농도로 접종하여 주고, 수온 25°C 및 광도 50uE/m²/s의 배양실에서 성장시켜, 접종 후 15일에는 15000~18000cells/ml 수준의 배양체가 되었다.

[0038]

실시예 2에 따른 세포성장 결과를 도 1에 나타내었다.

[0039]

도 1에 따르면 본 발명에 따른 저서성 와편모류 배양액에서 성장한 저서성편모류 세포들은 규칙적인 모양의 정상세포로 자라는 것을 볼 수 있다.

[0040]

[비교예 1]

[0041]

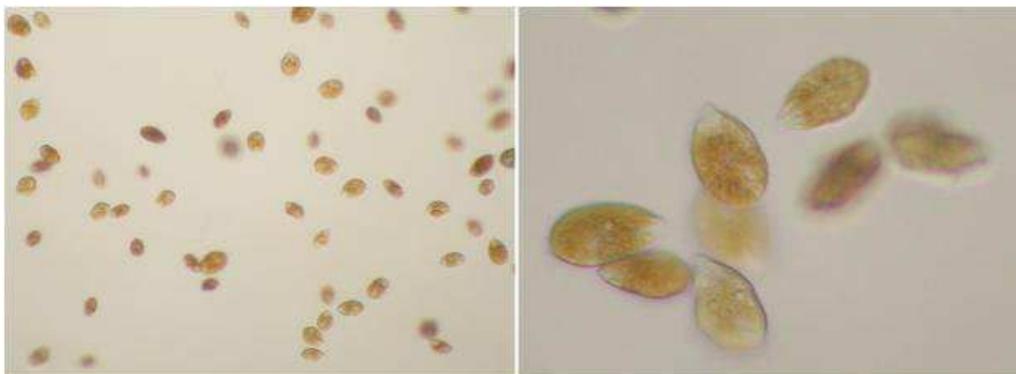
일반배양액인 f/2 배지에서 세포를 성장시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였다. 그에 따른 세포성장 결과를 도 2에 나타내었다.

[0042]

도 2에 따르면 일반배지에서 성장한 저서성 와편모류의 세포모양이 불규칙하고 기형으로 자라는 것이 많다.

도면

도면1



도면2

