



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0082011
(43) 공개일자 2021년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 43/16 (2006.01) A23L 3/3463 (2017.01)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 43/16 (2013.01)

A23L 3/34635 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0174524

(22) 출원일자 2019년12월24일

심사청구일자 2019년12월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

김다슬

경기도 안산시 단원구 광덕동로 25, 107동 1301호(고잔동, 안산레이크타운푸르지오)

(74) 대리인

특허법인 하나

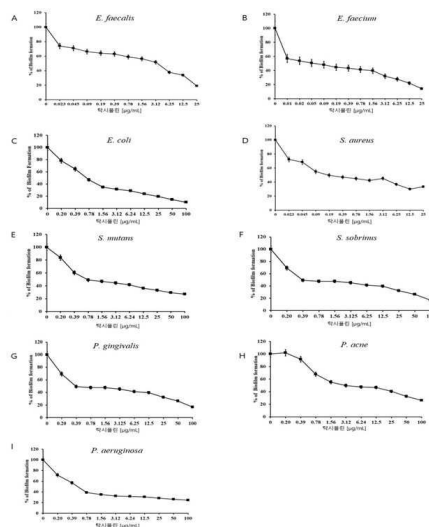
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 타시폴린을 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 타시폴린(Taxifolin)을 포함하는 미생물의 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	GRRC 경희 2018-B4 (20192227)
부처명	경기도
과제관리(전문)기관명	경기도
연구사업명	글로벌의약품소재개발연구센터
연구과제명	미토콘드리아 특이 질환 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2020.06.30

명세서

청구범위

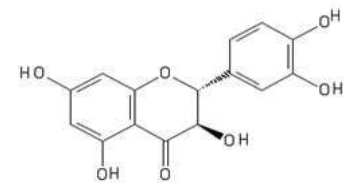
청구항 1

탁시폴린(Taxifolin)을 포함하는, 바이오필름 형성 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탁시폴린은 하기 화학식 1의 구조로 이루어진 것인, 바이오필름 형성 억제용 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이오필름은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 미생물에 의해 형성되는 것인, 바이오필름 형성 억제용 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 바이오필름이 형성되었거나 바이오필름 형성이 예상되는 표면에 처리하는 단계;를 포함하는 바이오필름 형성 억제방법.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 항균용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항균용 조성물은 항생제를 추가로 포함하는 것인, 항균용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항생제는 반코마이신, 스트렙토마이신, 암피실린 및 옥시테트라사이클린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 항균용 조성물.

청구항 8

제5항의 항균용 조성물을 포함하는, 미생물 감염에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 미생물은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 항생제를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항생제는 반코마이신, 스트렙토마이신, 암피실린 및 옥시테트라사이클린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제5항의 항균용 조성물을 포함하는, 항균용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타시폴린(Taxifolin)을 포함하는 미생물의 바이오필름 형성 억제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 세균이나 진균 등은 물체 표면에 부착하여 바이오필름이라는 집합체를 형성한다. 바이오필름의 점착성은 표면에 존재하는 고분자 매트릭스에서 유래한다. 고분자 매트릭스는 다당류와 단백질 등으로 구성되며, 다당류의 수산화기들 사이에 수소결합으로 인해 강하게 밀집되어 있다.

[0003] 바이오필름은 구강, 피부, 주방, 욕실, 배관 등 다양한 공간에 존재하며, 한번 형성된 바이오필름은 쉽게 제거되지 않기 때문에 빠른 세균 증식의 원인이 된다. 바이오필름 형성은 표면 물질의 부식, 병원균에 의한 감염 등의 원인이 되며, 구강 내에서는 충치 등과 같은 구강 질환을 유발하기도 한다.

[0004] 바이오필름은 당 성분 등에 의해 만들어지는 복합체 내에 수용된 미생물 집단으로서, 상피, 폐 및 심장과 같은 표면 뿐 아니라 중앙 정맥 및 비뇨기 카테터, 자궁 내 장치 및 보철 심장판막과 같은 이식된 의료장치에 형성될 수 있다. 바이오필름은 미생물에 많은 이점을 제공하며, 특히 항생제에 대한 내성을 증가시킨다. 이로 인해 바이오필름에 관한 감염 및 합병증의 발생이 증가하고 치료가 힘들어진다. 또한, 미생물의 바이오필름은 숙주 면역계에 영향을 미쳐 미생물의 생존이 증가하게 된다.

[0005] 기존에는 이러한 바이오필름의 형성을 억제하기 위해 바이오필름을 형성하는 균주의 성장을 저해하는 방식을 이용하였으나, 체내에는 유해한 균과 유익한 균이 동시에 존재하고 있음에 따라 무조건적인 살균 보다는 세포의 성장은 유지하면서 바이오필름의 형성만을 억제하는 기술이 필요로 되고 있다.

[0006] 또한, 기존 항생제의 오남용으로 인한 미생물의 내성 획득 등 다양한 문제가 발생함에 따라, 항생제 내성 획득 과정에 중요한 요소인 미생물의 바이오필름 형성을 억제하는 물질의 발굴에 대한 요구가 증가하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1390465호

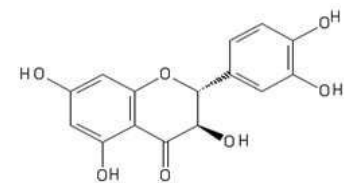
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 택시폴린을 포함하는, 바이오필름 형성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오필름 형성 억제용 조성물을 이용한 바이오필름 형성 억제방법을 제공하는 것이다
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오필름 형성 억제용 조성물을 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균용 조성물을 포함하는 미생물 감염에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균용 조성물을 포함하는 항균용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은, 택시폴린(Taxifolin)을 포함하는, 바이오필름 형성 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 “택시폴린(Taxifolin)”은 플라보노이드의 플라바놀에 속하는 폴리페놀 중 하나이다. 항산화, 당뇨 및 비만억제 효과, 알츠하이머 개선 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며, 본 발명에서는 미생물에 의해 생성된 바이오필름에 대해 우수한 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0015] 구체적으로, 상기 택시폴린은 하기 화학식 1의 구조로 이루어진 것일 수 있다.
- [0016] [화학식 1]



- [0017]
- [0018] 상기 택시폴린은 천연 추출물로부터 분리된 화합물임에 따라, 인체에 부작용이 없는 안전한 물질로서, 본 발명 일 실시예에서는 인체 유래 세포에 대해 독성이 없음을 확인하였다(도 5).
- [0019] 본 발명에서, “바이오필름(biofilm)”은 미생물에 의하여 형성된 막 모양 구조체이며, 표면에 연결된 미생물 세포층으로 이루어진 잘 구성된 미생물계로 복잡한 구조적 기능적 특징을 가지고 있다. 생체막은 미생물의 대사 과정에 영향을 주는 물리 화학적 구배를 갖는다. 바이오필름을 형성하는 세포는 부유세포보다 항생제에 대한 저항성이 1000배 이상 높으며, 바이오필름 형성은 여러 질병의 발병(pathogenesis)에 중요한 역할을 한다 (Anderson and O'Toole et al., 2008, Bacterial Biofilms 322:85-105).
- [0020] 본 발명에서, “바이오필름 형성 억제”는 상기와 같이 미생물에 의해 생성된 구조체의 형성을 감소시키거나, 형성이 불가능하게 하는 것을 말한다. 이러한 바이오필름의 형성 억제효과는 미생물의 생육, 증식을 억제하거나 사멸시키는 효과와는 무관하게 고체 표면에 들러붙는 혼합체의 형성을 저해하는 효과를 포함한다.
- [0021] 미생물이 바이오필름을 형성함으로써 항생제 내성을 획득하는 과정은 다음과 같다. 첫 번째는 항생제가 바이오필름을 투과하지 못해 항생제가 바이오필름 내의 세균에 영향을 미치지 못하기 때문인데, 이는 세포 외 기질이 가지는 전하에 의한 것으로 음전하를 띠는 바이오필름 매트릭스에 양전하를 띠는 항생제들이 결합함으로써 항생제가 바이오필름을 투과하기 어렵기 때문에 내성이 발생한다. 두 번째는 바이오필름에 의해 미생물이 충분한 영양소와 산소를 공급받지 못해 바이오필름의 성장에 영향을 미치면서 생기는 내성이다. 산소와 영양소는 미생물 성장에 큰 영향을 미치는 요소이다. 바이오필름 내의 미생물은 바이오필름에 의해 영양소와 산소 공급 등이 제한되면서 대체로 낮은 대사 활동과 낮은 성장률을 가지며 이는 약물에 대한 저항성을 높이는 역할을 한다.

- [0022] 구체적으로, 상기 바이오필름은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 미생물에 의해 형성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서, “엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)”은 엔테로코커스 속의 그람 양성, 알파 용혈 또는 비 용혈성 미생물로서, 인간과 동물의 위장관에서 공생할 수 있지만 병원성일 수도 있으며 신생아 수막염이나 심내막염과 같은 질병을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [0024] 본 발명에서, “엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*)”는 연쇄상구균계 D군의 일부로 분류된 바 있으며, 사람과 다른 포유 동물의 위장관에 서식하는 그람 양성, 공생 세균이다. 상기 엔테로코커스 페칼리스는 심내막염, 패혈증, 요로 감염(UTI), 수막염 및 기타 사람의 감염을 유발할 수 있으며, 높은 수준의 항생제 내성을 보이는 것으로 알려져 있다.
- [0025] 본 발명에서, “대장균(*E. coli*)”은 온혈동물의 창자에서 많이 볼 수 있는 미생물이다. 음식이나 물이 세균에 오염되면 고온다습한 환경에서 세균이 쉽게 번식하고 그 음식을 우리가 섭취하게 되면 대장균 감염에 걸리게 되며, 비위생적인 생활에서 대장균 감염이 발생된다.
- [0026] 본 발명에서, “스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)”는 연쇄상구균의 일종으로서, 락토바실러스와 함께 충치의 주 원인균으로서 치아를 겹게 썩게 만드는 것으로 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서, “스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*)”는 스트렙토코커스 속의 그람 양성균으로서, 상기 스트렙토코커스 뮤탄스와 함께 충치에 관련된 균으로 알려져 있다.
- [0028] 본 발명에서, “스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)”는 그람 양성균인 포도상구균의 한 종으로서, 코, 호흡계통, 피부에 존재한다. 피부 감염이나 호흡기계 감염, 부비강염, 식중독 등을 일으킬 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, “포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)”는 그람 음성 균으로서 보통 치주질환을 일으키는 균으로 알려져 있다.
- [0030] 본 발명에서, “슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)”는 녹농균으로도 알려져 있으며, 식물이나 동물, 사람을 감염시킬 수 있다. 이 균은 선천적으로 항생제에 대한 저항성을 가지고 있으며, 기회감염성을 띄고 있어 건강한 사람에겐 큰 해를 끼치지 않지만 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자나 면역력이 저하된 사람에게 매우 심각한 감염을 일으킬 수 있다. 녹농균은 최저 영양 조건에서도 성장이 가능하기 때문에 성장 범위가 매우 넓어 병원 내의 습한 환경, 기구들과 심지어 소독용 용액 등 도처에 존재하고 있다. 녹농균의 경우 호기성 세균이기 때문에 발효를 할 수 없지만 질산염이 있는 경우에는 산소 없이도 성장이 가능하다. 또한 주로 바이오필름의 형태로 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 “프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)”는 그람 양성 미생물이며, 여드름의 주요 원인균으로서 피부 상태와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 만성 안검염과 안구내염을 유발할 수 있으며, 후자는 특히 안구 내 수술 후 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0032] 본 발명 일 실시예에서는 상기 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa* 및 *P. acnes* 모두에 대하여 바이오필름 형성 억제 효과가 우수함을 확인하였는 바(도 1), 본 발명의 조성물을 이용하여 바이오필름 형성 억제 용도로 사용할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 바이오필름 병독성 인자(virulence factors) 유전자인 *Esp*, *EbrB*, *EbpA*, *EbpB*, *bps*, *Acm* 및 *Scm*와 정족수 감지 유전자(quorum sensing genes)인 *fsrB*, *fsrC* 및 *GelE*의 발현이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였는 바(도 6), 바이오필름 형성 억제제가 유전자 발현 단계부터 억제되는 것을 확인하였다.
- [0034] 본 발명의 다른 측면은 상기 바이오필름 형성 억제용 조성물을 바이오필름이 형성되었거나 바이오필름 형성이 예상되는 표면에 처리하는 단계;를 포함하는 바이오필름 형성 억제방법에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명의 조성물이 우수한 바이오필름 형성 억제 효과를 나타냄에 따라, 본 발명의 조성물을 형성된 바이오필

름에 직접 처리하여 억제시키거나, 바이오필름의 형성이 예상되는 표면 또는 바이오필름이 형성될 경우 문제가 생길 수 있는 표면에 바이오필름 형성의 예방을 위해 처리할 수 있다.

[0036] 이러한 표면은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면 뿐 아니라 필터, 수처리막, 마스크소재 등 바이오필름의 억제가 필요한 곳이면 제한없이 적용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 바이오필름 형성 억제용 조성물을 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에서, “항균(antibiotic)”은 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제 또는 제거하는 것을 말하며, “항균용 조성물”은 세균과 같은 미생물의 생육을 저해하는 활성을 가진 조성물로서, 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 모든 형태가 포함될 수 있으며, 예를 들어, 의약품, 의약외품, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제 등의 형태일 수 있다.

[0039] 구체적으로, 상기 항균용 조성물은 항생제를 추가로 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 항생제는 반코마이신, 스트렙토마이신, 암피실린 및 옥시테트라사이클린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명 일 실시예에서는 반코마이신, 스트렙토마이신, 암피실린 또는 옥시테트라사이클린을 각각 탁시폴린과 함께 처리한 경우, 탁시폴린을 단독 처리한 경우에 비해 바이오필름 형성 억제 효과가 증가하고, 항균 효과가 우수한 것을 확인하였는 바(도 2), 항생제와 복합 또는 병용하여 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항균용 조성물을 포함하는 미생물 감염에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0042] 본 발명 일 실시예에서는 탁시폴린을 처리한 경우에 미생물의 부착을 억제하여 감염을 억제하며(도 3), 대식세포의 활성을 농도 의존적으로 촉진(도 4)하는 것을 확인하였는 바, 본 발명의 조성물은 미생물에 의한 감염증에 대한 예방 또는 치료 용도로 적용될 수 있다.

[0043] 구체적으로, 상기 미생물은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.

[0044] 더욱 구체적으로, 상기 미생물 감염에 의해 발생된 감염증은 심내막염, 패혈증, 요로 감염(UTI), 수막염, 대장균 감염, 충치, 치주질환, 피부감염, 호흡기계 감염, 부비강염, 식중독, 여드름, 만성 안감염, 안구내염 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 상기 미생물들에 의해 발생하는 모든 감염증을 포함한다.

[0045] 또한 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 항생제를 추가로 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 항생제는 반코마이신, 스트렙토마이신, 암피실린 및 옥시테트라사이클린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 탁시폴린 외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 구체적으로 경구용 제형 또는 비경구형 제형으로 적용될 수 있다. 경구형 제형으로 액제, 정제 형태를 적용할 수 있으며, 비경구형 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이 형일 수 있다. 더욱 구체적으로는 주사제 형태일 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 적용될 수 있으며, "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은

환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0049] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 또 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 다른 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 필요에 따라 용이하게 결정될 수 있다.

[0050] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항균용 조성물을 포함하는, 항균용 식품 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 항균용 식품 조성물은 미생물 감염에 대한 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명에서 식품이라 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의도이다. 구체적으로, 건강기능식품일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가 가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0053] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 타시폴린 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 바이오필름 형성 억제용 조성물은 의료 및 기타 산업 분야에서 바이오필름 형성을 억제하기 위한 용도로서 다양하게 사용될 수 있다.

[0055] 구체적으로, 의료 분야에서는, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는데 사용될 수 있으며, 역삼투막 등과 같은 다양한 수처리막의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 데에도 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로는, 진찰 및 진단기기, 임상검사기기, 방사선기기, IUD, 기관 튜브, 각종 카테터, 정형외과 기기 등과 같은 수술관련기기, 병원설비 및 응급장비, 비만 및 건강관련기기, 콘택트 렌즈, 스텐트, 밸브, 성형 보형물 등과 같은 다양한 의료 분야에 형성된 바이오필름의 형성 억제에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 이에 제한되지 않고 다양한 식품 및 세탁기, 가습기, 식기 세척기 등과 같은 다양한 생활용품의 표면에 형성되는 바이오필름의 형성을 억제하는 데에도 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에 따르면, 본 발명의 타시폴린을 포함하는 바이오필름 형성 억제용 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 수처리막의 표면 등에 형성되는 바이오필름의 형성 억제에 활용될 수 있다. 또한, 상기 타시폴린은 천연물에서 유래한 성분을 포함하므로 인체에 독성이 낮은 물질로 유용하게 활용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 바이오필름 형성 억제용 조성물은 바이오필름의 형성을 억제함으로써, 항생제 내성을 억제하면서 미생물 감염을 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0058] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 액체 배지에서 타시폴린의 바이오필름 형성 저해 효과를 평가한 결과를 나타낸 것이다(A: *E. faecalis*, B: *E. faecium*, C: *E. coli*, D: *S. aureus*, E: *S. mutans*, F: *S. sobrinus*, G: *P. gingivalis*, H: *P. acne*, I: *P. aeruginosa*).

도 2는 본 발명의 실시예에 따라 항생제와 타시폴린을 *E. faecium* 및 *E. faecalis*에 처리한 경우의 복합 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: *E. faecium*, B: *E. faecalis*).

도 3은 타시폴린이 농도 의존적으로 T24 세포에 대한 미생물 부착을 감소시키는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: *E. faecium*, B: *E. faecalis*).

도 4는 바이오필름이 형성된 경우에도 타시폴린이 농도 의존적으로 대식세포의 식균작용을 촉진하는 결과를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: *E. faecium*, B: *E. faecalis*).

도 5는 타시폴린이 T24 세포와 대식세포에 대하여 독성이 있는지 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: T24세포, B: RAW 246.7 대식세포).

도 6은 타시폴린에 의한 *E. faecalis* 와 *E. faecium*의 바이오필름 병독성 인자와 정족수 감지 유전자의 저해효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: *E. faecalis*의 *fsrB*, *fsrC*, *GelE*, *EbpB*, *Esp* 확인 결과, B: *E. faecium*의 *fsrB*, *fsrC*, *GelE*, *Acm*, *Scm*, *EbpA*, *Bps*, *EbrB*, *Esp* 확인 결과).

도 7은 타시폴린에 의한 미생물 성장 억제 효과를 나타낸 것이다(A: *E. faecalis*, B: *E. faecium*).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0061] 실시예 1. 바이오필름 형성 억제 효과 확인

[0062] 타시폴린(ChemFace; CFN98734)이 미생물의 바이오필름 형성을 저해하는지 확인하기 위하여, 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 및 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)에 대하여 타시폴린을 농도에 따라 처리하여 바이오필름 형성 분석(formation assay)을 수행하였다.

[0063] 구체적으로, 96 웰 플레이트에 OD₆₀₀=0.1의 상기 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa* 및 *P. acnes*를 각각 넣어준 후 각 화합물을 최대 100 µg/mL로부터 2 배씩 희석하여 처리하였다. 각 플레이트는 37 °C에서 24시간 배양한 다음, 바이오필름 형성을 크리스탈 바이올렛(Crystal violet) 염색법을 사용하여 확인하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였다.

[0064] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 타시폴린은 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa* 및 *P. acnes* 모두에 대하여 바이오필름 형성을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 특히 타시폴린은 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 바이오필름 형성 억제에 매우 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0065] 실시예 2. 타시폴린과 항생제의 복합 효능 확인

[0066] 상기 실시예 1에서 확인한 바와 같이 바이오필름 형성을 저해하는 타시폴린이 미생물에 대한 기존의 항생제에 대한 감수성에 변화를 줄 수 있는지 확인하고자 *E. faecium* 및 *E. faecalis*에 기존의 항생제와 혼합 처리하여 항균 활성을 확인하였다.

[0067] 구체적으로, 24시간 동안 형성시킨 바이오필름에 0.01, 0.195, 0.39 및 1.56ug/mL 농도의 타시폴린(TAX)을 기존 항생제인 100ug/mL, 0.78ug/mL농도의 반코마이신(Vancomycin, VAN), 100ug/mL, 0.39ug/mL 농도의 스트렙토마이신(Streptomycin, STR), 6.25ug/mL 농도의 암피실린(Ampicilline, AMP) 그리고 3.125ug/mL농도의 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline, OXY)를 동시에 처리하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다.

[0068] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, TAX+VAN, TAX+AMP, TAX+STR 및 TAX+OXY 등 항생제와 타시폴린을 함께 처리하여 바이오필름 형성을 억제한 경우의 미생물 수가 단독 처리시 보다 현저히 감소한 것을 확인하였다. 특히, TAX+OXY 및 TAX+STR로 처리한 것이 TAX+VAN으로 처리된 것보다 항균 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0069] 실시예 3. T24 세포에 대한 미생물 부착 실험

- [0070] *E. faecium* (*E. faecium*) 및 *E. faecalis* (*E. faecalis*) 등은 감염을 일으키기 위하여 우선 숙주 세포에 부착을 하게 되고, 상기 부착과정은 바이오필름에 의하여 영향을 받는다. 따라서 *E. faecium* 과 *E. faecalis*를 T24 세포에 감염을 시켰을 때 타키폴린이 숙주세포의 부착 과정에 영향을 주는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [0071] 구체적으로, T24 세포를 1×10^6 의 세포로 24-웰 플레이트 상에서 배양하였다. *E. faecalis* 와 *E. faecium*을 24시간 동안 대두카제인소화액 배지(Tryptic Soy Broth, TSB)에서 성장시켜 바이오필름 형성을 유도시켰다. 타키폴린을 T24 세포에 한 시간 동안 처리한 뒤에 *E. faecalis* 와 *E. faecium*을 MOI(multiplicity of infection) 100으로 5% CO₂, 37℃에서 24시간 동안 감염시켰다. 24시간 후, T24 세포를 PBS로 씻어주고 크리스탈 바이올렛(Crystal violet)을 1분 동안 염색한 다음 PBS로 씻어준 후 건조하였다. 이후, 요오드를 이용하여 1분 동안 염색한 뒤에 요오드를 제거하고 비 특이적 결정 바이올렛 염색을 제거하기 위해서 탈색제를 플레이트에 30초 동안 넣어준 뒤 제거한 뒤 PBS로 씻어주었다. 이후, 사프린을 30초 동안 염색한 뒤에 현미경으로 확인하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0072] 도 3에 나타난 바와 같이, 타키폴린이 *E. faecalis* 와 *E. faecium*의 감염을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.
- [0073] **실시예 4. 대식세포(RAW 264.7)에 의한 미생물 생존력 확인**
- [0074] 대식세포(Macrophage)는 미생물 감염 시에 미생물을 제거하는 면역 작용을 한다. 바이오필름은 대식세포에 의한 미생물 제거를 어렵게 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 마우스 유래의 대식세포인 RAW 264.7에 의한 *E. faecium* 과 *E. faecalis* 미생물 제거 기능이 타키폴린에 의하여 영향을 받는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0075] 바이오필름 형성을 유도한 *E. faecalis* 와 *E. faecium*을 RAW 264.7와 같이 배양한 다음 타키폴린을 처리한 군과 그렇지 않은 군의 미생물 생존 정도를 관찰하였다.
- [0076] 구체적으로, *E. faecalis* 와 *E. faecium*을 24시간 동안 1% 글루코스를 함유하는 TSB 배지에서 배양하여 바이오필름 형성을 유도하고, MOI가 10일때 *E. faecalis* 와 *E. faecium*을 RAW 264.7에 24시간 동안 배양한 후 현미경으로 관찰한 결과를 도 4에 나타내었다. 모든 실험은 3회 실시하였다.
- [0077] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은(control) 상태의 대식세포(RAW 264.7)와 바이오필름을 형성하지 못한 경우 비슷한 형태를 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 대식세포에 의해 미생물이 제거되었음을 의미한다.
- [0078] 반면, 미생물이 바이오필름을 형성한 경우엔 대조군 및 바이오필름이 없는 경우와 비교하였을 때 RAW 264.7 세포의 형태 및 살아있는 미생물의 수에서 현저하게 차이가 존재하였으며, 타키폴린을 처리한 경우에는 농도 의존적으로 점점 대조군과 비슷한 형태를 나타내는 것을 확인하였다. 이로부터 타키폴린이 바이오필름을 형성한 미생물에 대한 식균작용을 촉진함을 확인하였다.
- [0079] **실시예 5. 타키폴린의 인체 유래 세포에 대한 독성 확인**
- [0080] 타키폴린이 인체 유래 세포에 대하여 독성을 나타내는지 확인하기 위한 독성 확인 실험을 수행하였다.
- [0081] 구체적으로, T24 세포 및 대식세포에 대한 타키폴린의 세포 독성을 MTT 분석법으로 확인하였다. 지시된 농도의 타키폴린(0-100 µg/mL)을 함유하는 RPMI 1640배지, DMEM 배지에서 웰당 10⁴ 개의 T24 세포 와 대식세포를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. PBS 중의 MTT를 최종 농도 0.5mg/mL로 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 100% DMSO에 현탁시켰다. 세포 생존력은 마이크로 플레이트 리더(BioTek Instruments, Korea)를 사용하여 측정된 광학 밀도 (OD₅₄₀) 값에 의해 계산되었고 표준 편차를 포함하는 대조군의 백분율을 도 5에 나타내었다. 모든 실험은 3회 실시하였다.
- [0082] 도 5에 나타난 바와 같이, 타키폴린을 T24 세포와 RAW 264.7에 처리하였을 때 두 세포 모두에 독성이 나타나지 않은 것을 확인하였다.
- [0083] **실시예 6. 타키폴린에 의한 바이오필름 병독성 인자 및 정족수 감지 유전자의 발현 억제 효과 확인**
- [0084] 타키폴린이 *E. faecalis* 및 *E. faecium*에 대한 바이오필름 병독성 인자(virulence factors) 및 정족수 감지 유전자(Quorum sensing genes)의 발현을 저해시키는지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[0085] RT-PCR 수행에 사용한 프라이머는 하기 표 1에 정리한 바와 같다. RT-PCR 프라이머 수행 조건으로는 40 사이클로 95℃에서 15초, 40℃에서 60초, 72℃에서 30초로 수행하였다.

표 1

[0086]

유전자		프라이머 종류	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
biofilm virulence factors	<i>Esp</i>	forward	CCACGAGTTAGAGGGAACAG	1
		reverse	TTGGAGCCCCATCTTTTCA	2
	<i>EbrB</i>	forward	TGAGGGATTCTGGGATTGTTT	3
		reverse	GCCGATGAATTGAACGACAGA	4
	<i>EbpA</i>	forward	ACCAAGCCAGACGAAATAGAAGAAG	5
		reverse	ATTGTTTTGGTCAGGTGCATCATAGA	6
	<i>EbpB</i>	forward	CGTACAGGAGGCAAGTCTTT	7
		reverse	AGGTATTCCCCGCTTGATTT	8
	<i>bps</i>	forward	TATCAGCAACAAGCGGTCA	9
		reverse	AATCCTGCCCTTTTTCGATT	10
	<i>Acm</i>	forward	TCAGCAGTAATGTCACCTCGTTG	11
		reverse	GAATAGGCTGTTTCATCTGCTCG	12
Quorum sensing genes	<i>Scm</i>	forward	CTAACTGGTAACTATGGCTGT	13
		reverse	GTCCGTGCTGTCACTTGT	14
	<i>fsrB</i>	forward	TGCTCAAAAAGCAAAGCCTTATAA	15
		reverse	GATGACGAGACCGTAGAGTATTACTGAA	16
	<i>fsrC</i>	forward	GCTTATTTGGAAGAACAACGTATCAA	17
		reverse	CGAAACATCGCTAGCTCTTCGT	18
	<i>GelE</i>	forward	CGGAACATACTGCCGGTTTAGA	19
		reverse	GGATTAGATGCCACCCGAAAT	20

[0087] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 타ksi폴린이 *E. faecalis* 와 *E. faecium*의 바이오필름 병독성 인자(virulence factors) 유전자인 *Esp*, *EbrB*, *EbpA*, *EbpB*, *bps*, *Acm* 및 *Scm*와 정족수 감지 유전자(quorum sensing genes)인 *fsrB*, *fsrC* 및 *GelE*의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 이러한 결과는 타ksi폴린이 정족수 감지 유전자의 발현을 억제하며, 결과적으로 바이오필름의 형성을 억제함을 의미한다.

[0088] 실시예 7. 타ksi폴린에 의한 미생물 성장 억제 여부 확인

[0089] 상기 실험결과에서 확인한 타ksi폴린의 바이오필름 형성 저해 효과가 균의 성장을 억제하기 때문에 당연히 수반되는 효과인지, 또는 직접적으로 바이오필름 자체의 형성을 억제하는 효과를 나타내는 것인지 확인하기 위하여, 타ksi폴린에 의한 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 생존을 확인하였다.

[0090] 구체적으로, *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 생존을 확인하기 위해 타ksi폴린의 농도를 100ug/ml로 처리하여 미생물의 성장을 관찰하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다.

[0091] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 타ksi폴린의 처리여부는 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 생존에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 이에 따라, 타ksi폴린이 특히 바이오필름 형성을 억제함으로써 항균 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0092] 즉, 본 발명의 타ksi폴린은 타ksi폴린은 미생물의 성장과 무관하게 바이오필름의 형성만을 억제하는 것을 특징으로 하는 바, 이는 무차별적인 살균 보다는 병원성만을 억제할 수 있도록 함으로써 일반 항생제보다 저항성이 적게 유발이 된다.

[0093] 본 발명의 조성물은 항생제의 내성이 점차 큰 문제가 되고 있는 현 시점에서 감염성 세균의 성장에는 별다른 영향을 미치지 않아 항생제 내성 문제가 발생되지 않으면서, 동시에 병원성을 나타내는 바이오필름 및/또는 단백질의 생성을 억제하여 감염성 질환 등에 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

[0094] 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 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로

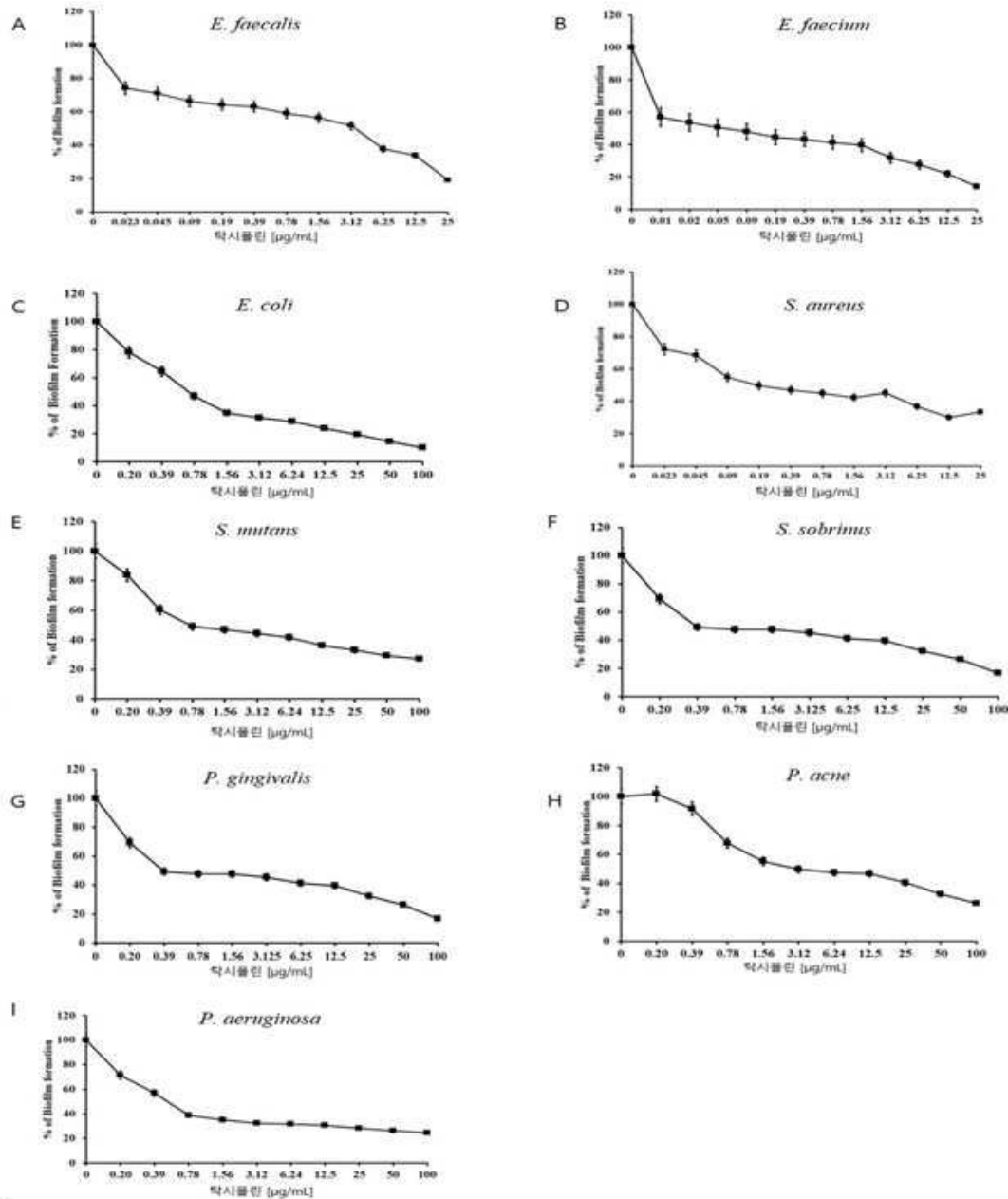
지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0095]

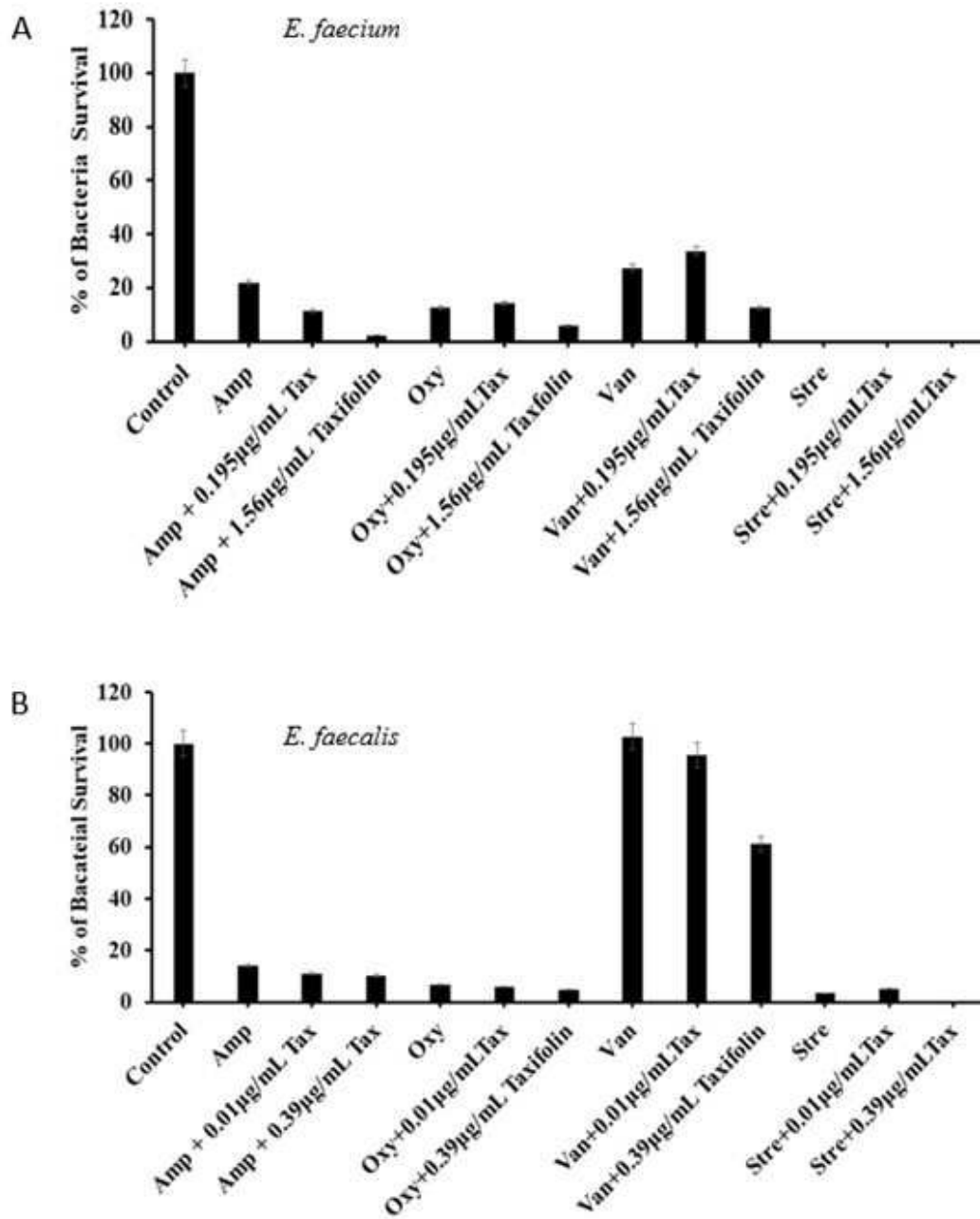
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

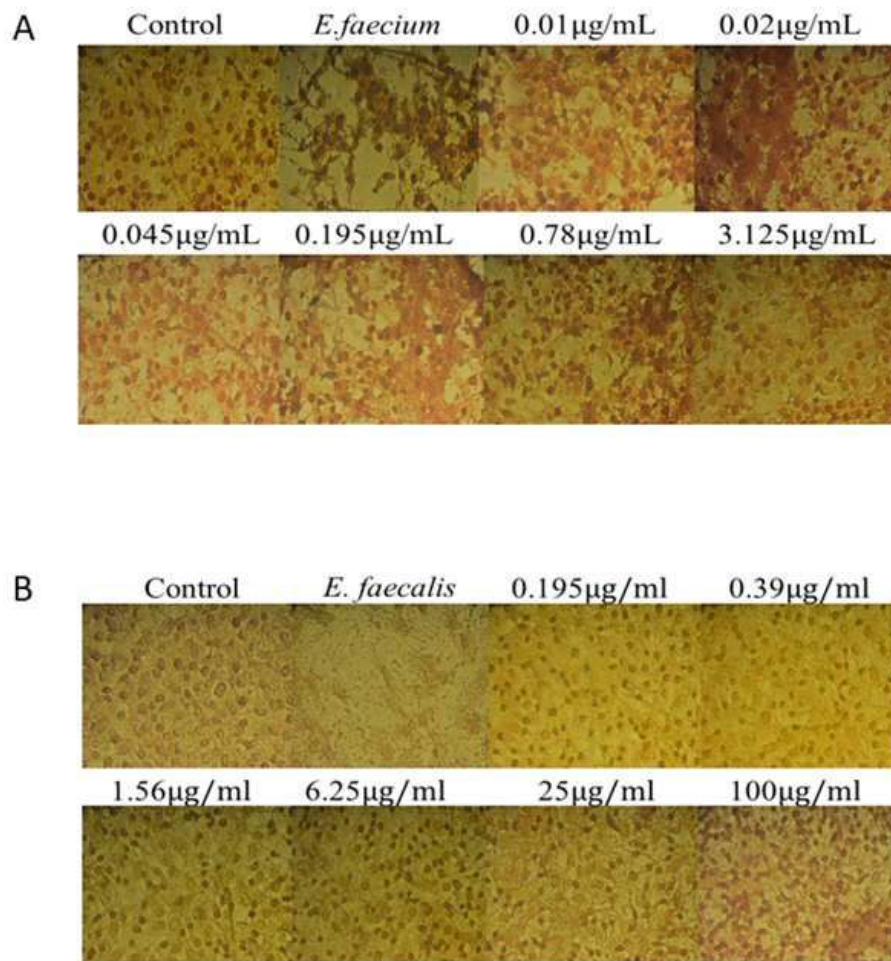
도면1



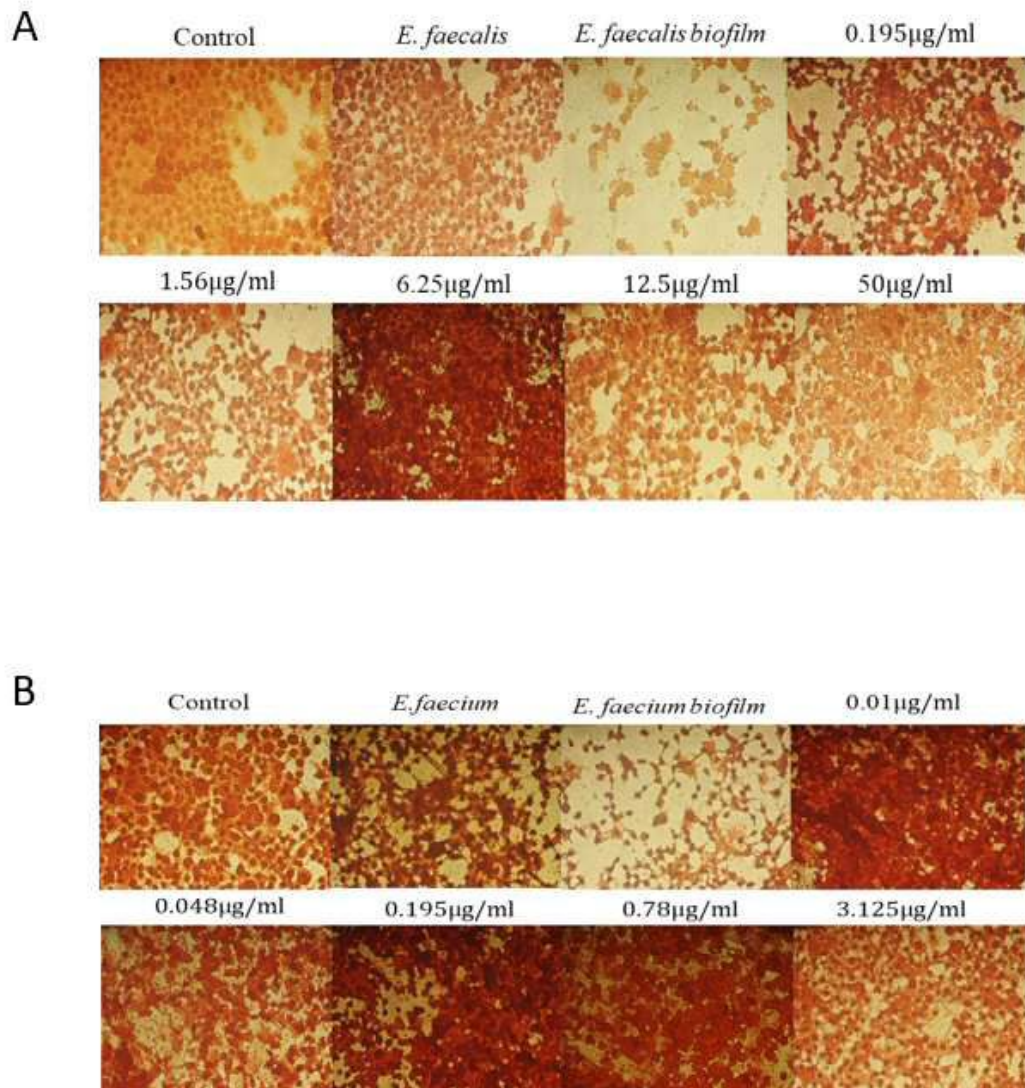
도면2



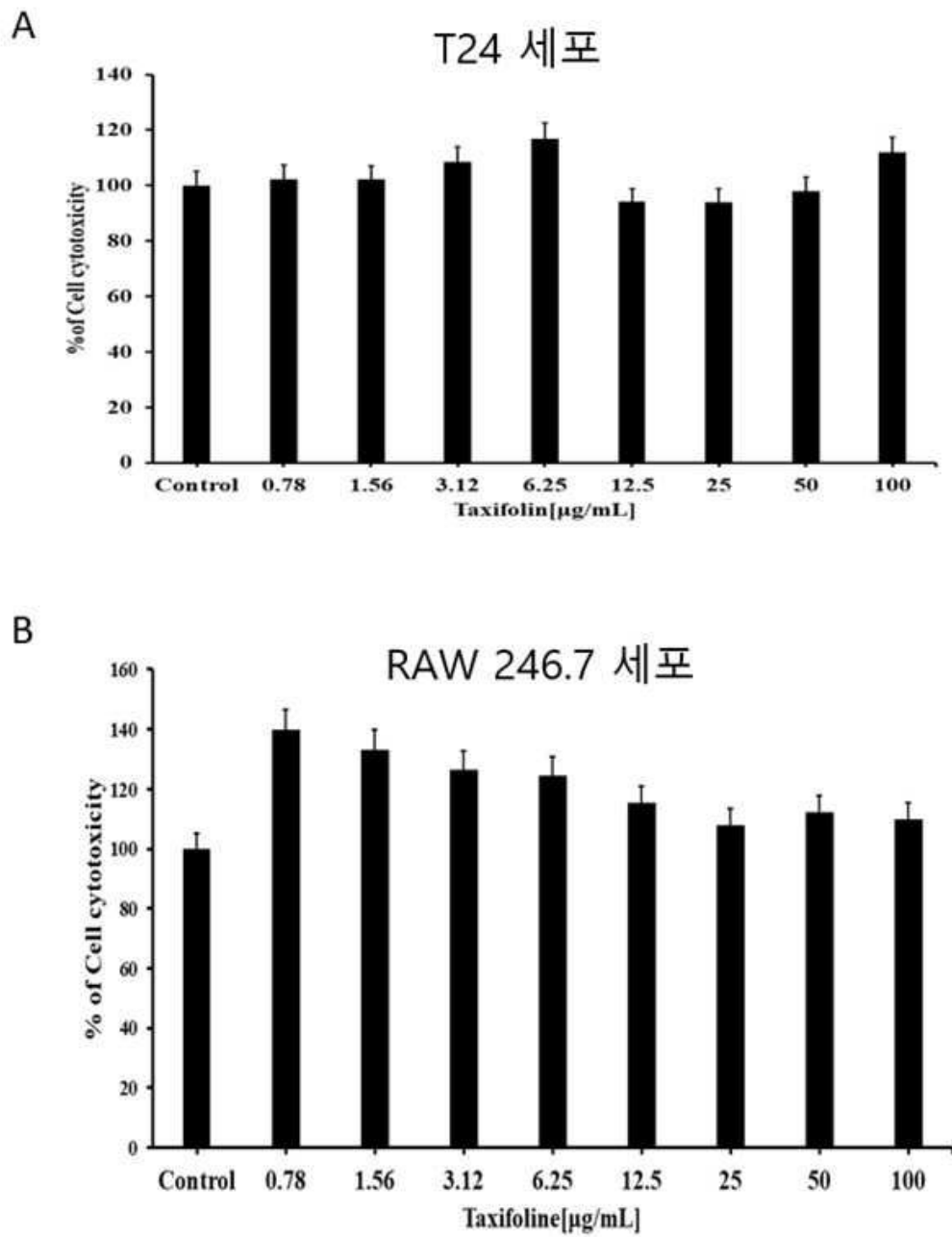
도면3



도면4

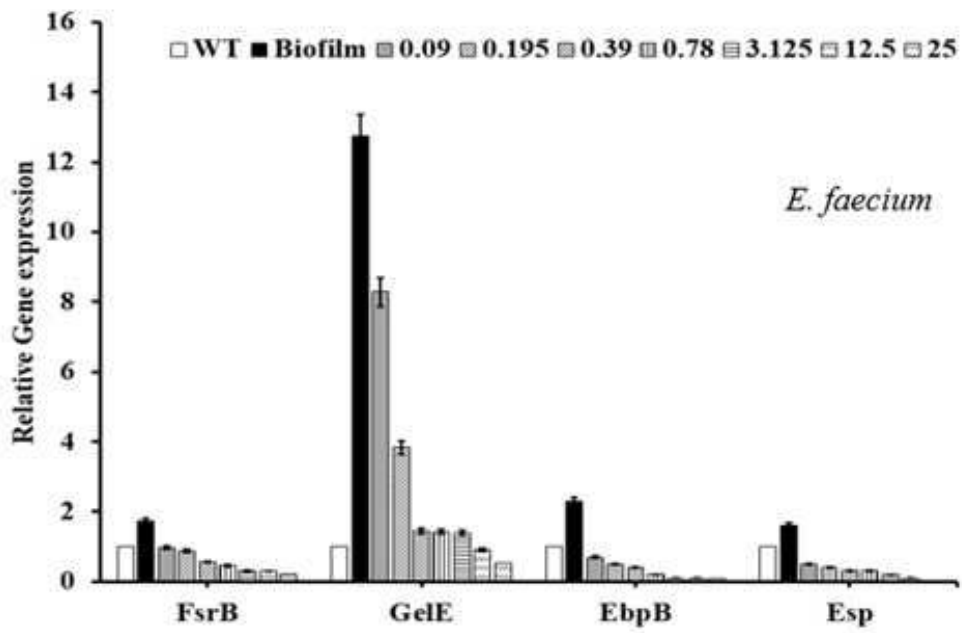


도면5

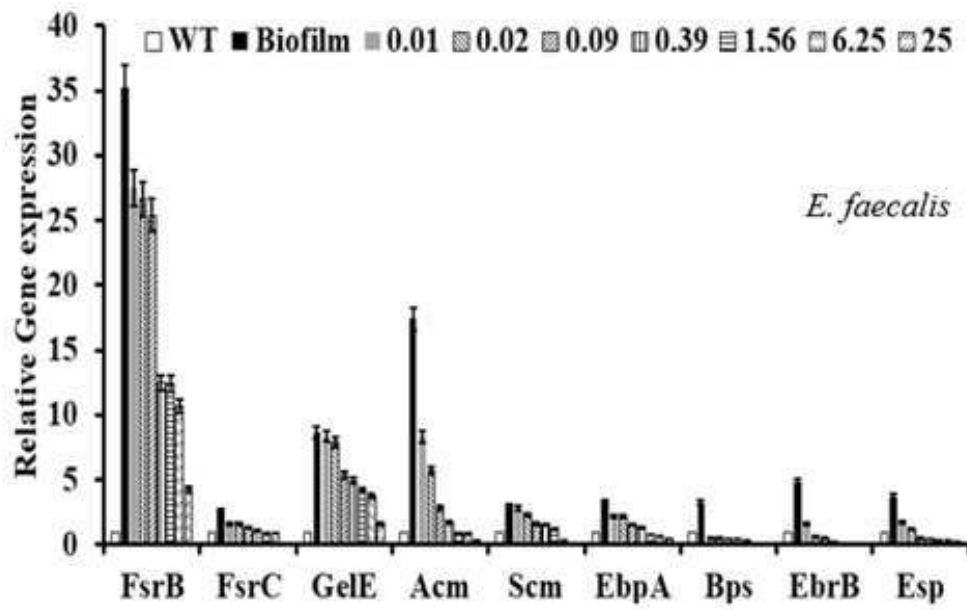


도면6

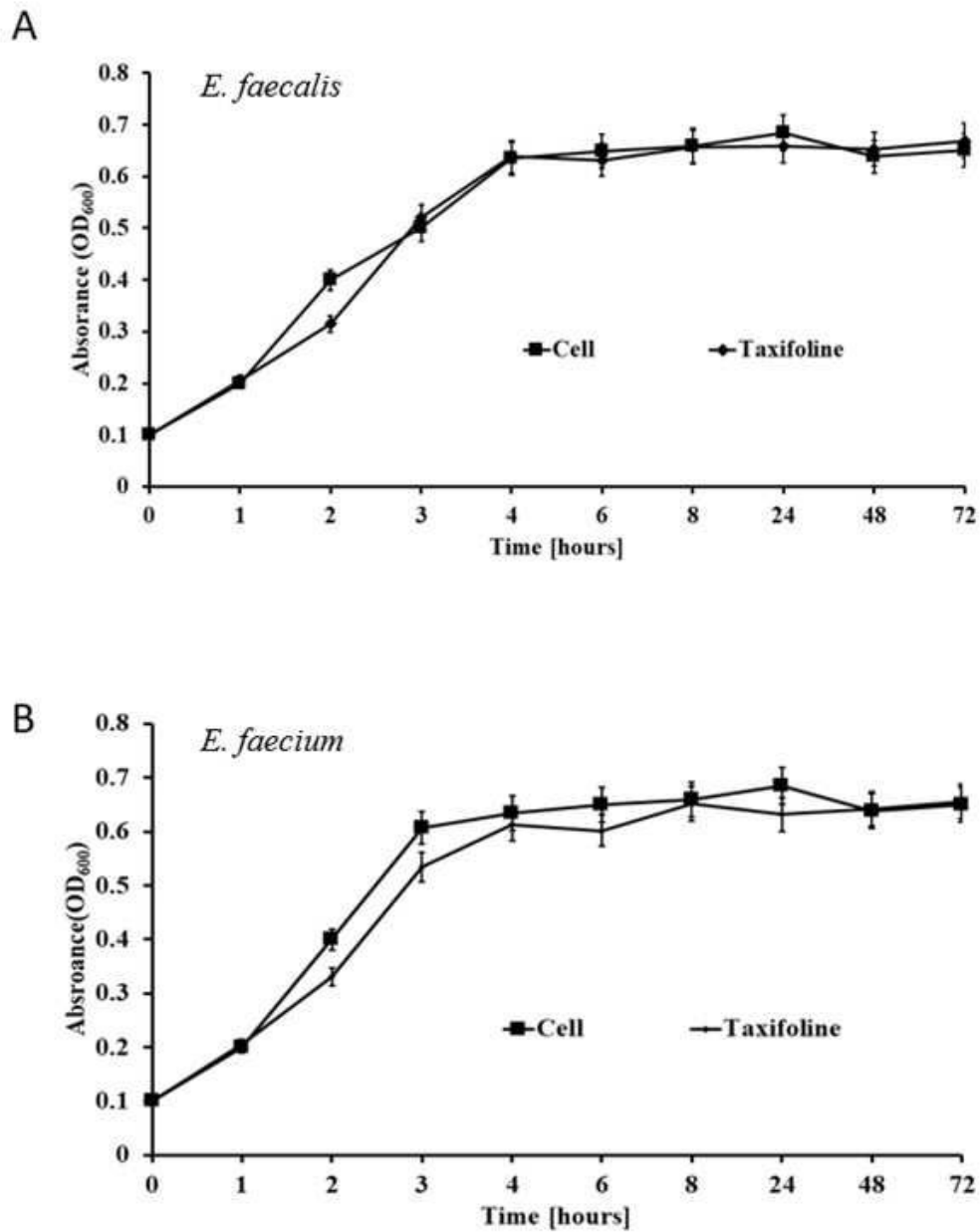
A



B



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> COMPOSITION COMPRISING TAXIFOLIN FOR INHIBITING THE FORMATION OF BIOFILM
- <130> 19PP31040
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Esp_F
 <400> 1
 ccacgagtta gaggaacag 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Esp_R
 <400>
 > 2
 ttggagcccc atcttttca 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbrB_F
 <400> 3
 tgagggattc tgggattgtt t 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbrB_R
 <400> 4
 gccgatgaat tgaacgacag a 21
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbpA_F
 <400> 5
 accaagccag acgaaataga agaag 25

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbpA_R
 <400> 6
 attgttttgg tcaggtgcat cataga 26
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbpB_F
 <400> 7
 cgtacaggag gcaagtcttt 20
 <210> 8
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EbpB_R
 <400> 8
 aggtattccc cgcttgattt 20
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bps_F
 <400> 9
 tatcagcaac aagcgtca 19
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bps_R
 <400> 10

aatcctgccc ttttctgatt	20
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Acm_F	
<400> 11	
tcagcagtaa tgcacttcg ttg	23
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Acm_R	
<400> 12	
gaataggctg ttcactctgct cg	22
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Scm_F	
<400> 13	
ctaactggta actatggctt gt	22
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Scm_R	
<400> 14	
gtccgtgctg tcacttgt	18
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> fsrB_F

<400> 15

tgctcaaaaa gcaaagcctt ataa 24

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fsrB_R

<400> 16

gatgacgaga ccgtagagta ttactgaa 28

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fsrC_F

<400> 17

gcttatttgg aagaacaacg tatcaa 26

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fsrC_R

<400> 18

cgaacatcg ctagctcttc gt 22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GelE_F

<400> 19

cggaacatac tgccggttta ga 22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GelE_R

<400> 20

ggattagatg ccacccgaaa t

21