(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0101099
(43) 공개일자 2015년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 43/08 (2006.01) *A01N 65/00* (2009.01)
A01P 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0022345
(22) 출원일자 2014년02월26일
심사청구일자 2014년02월26일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
주식회사 삼천리
서울특별시 영등포구 국제금융로6길 42 (여의도동)
(72) 발명자
최성찬
경기도 성남시 분당구 내정로 186 파크타운대림아파트 106동 1404호
오영숙
경기도 성남시 분당구 내정로 186 파크타운대림아파트 106동 1404호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

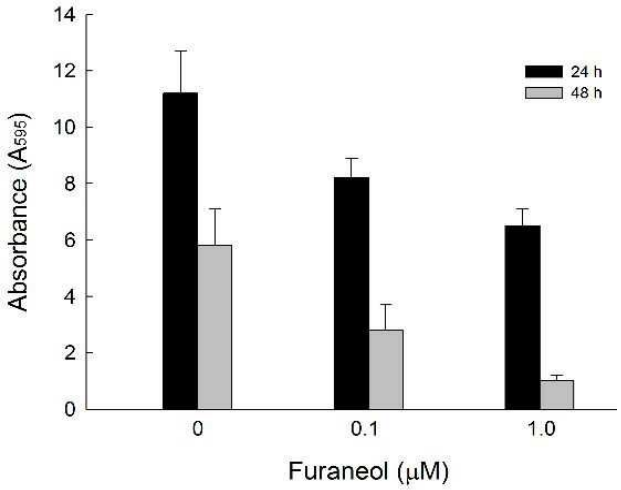
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **퓨라니올을 함유하는 생물막 형성 저해제**

(57) 요 약

무독성 식품 첨가물인 퓨라니올은 항균활성을 보유하고 있음이 입증되었다. 그러나, 병원성 세균에서 QS (quorum sensing) 시스템에 대한 저해효과는 알려져 있지 않았다. 본 발명에서는 1.0 μM의 퓨라니올이 슈도모나스 애루기노사 PAO1의 QS-제어 생물막 형성을 83%까지 저해할 수 있음을 밝혔다. 퓨라니올은 또한 영양부족 조건 하에서 기형성되어 있는 생물막으로부터 세포 분리를 가속화하였다. 두 개의 서로 다른 AHL (acyl-homoserine lactone) 바이오센서를 이용한 바이오분석 시스템은 OdDHL과 BHL 생산이 퓨라니올 농도 의존적으로 감소함을 보여주었고, 이는 퓨라니올과 OdDHL 또는 BHL 간의 경쟁적 저해를 암시한다. 이러한 결과들에 따르면, 독성이 없는 퓨라니올은 선행 연구들과 비교하여 훨씬 낮은 농도에서도 QS에 대해 분명한 저해효과를 나타내기 때문에 슈도모나스 애루기노사의 생물막 형성을 저해하는데 이용할 수 있는 것으로 보인다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김영관

강원 춘천시 후석로 325, 105동 1303호 (후평동, 춘천더샵아파트)

서정철

서울특별시 용산구 이촌로 347 신동아아파트 13동 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GT-11-G-02-001-3

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 차세대 에코이노베이션 기술개발사업

연구과제명 종합적 상수관망 이상관리시스템 및 최적 수질관리기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)삼천리

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

퓨라니올 (furaneol)을 함유하는 생물막 형성 저해제.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 퓨라니올은 0.01 ~ 100 μM임을 특징으로 하는 생물막 형성 저해제.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 퓨라니올은 식물 유래이거나 또는 합성에 의해 생성된 것임을 특징으로 하는 생물막 형성 저해제.

청구항 4

퓨라니올 (furaneol)을 함유하는 정족수 감지 (quorum sensing) 저해제.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 퓨라니올은 0.01 ~ 100 μM임을 특징으로 하는 정족수 감지 저해제.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 퓨라니올은 식물 유래이거나 또는 합성에 의해 생성된 것임을 특징으로 하는 정족수 감지 저해제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 무독성 식품 첨가물인 퓨라니올을 함유하는 생물막 형성 저해제 및 퓨라니올을 함유하는 정족수 감지 저해제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 정족수 감지 (Quorum sensing; QS)는 세균이 주위의 세균 수의 밀도를 감지하게 해주고 다양한 유전자를 조절함으로써 이 정보에 대하여 조화롭게 반응할 수 있도록 해주는 기작이다 [5, 15]. 예컨대 슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)와 같은 그람 음성균에서, QS 시스템은 통상 AHL (acyl-homoserine lactone)을 신호로 생산하는 것을 포함한다. 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis), 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease) 또는 사망률과 치사율 고위험성 중화상 (severe burns leading to a high risk of morbidity and mortality)을 겪는 면역력이 저하된 개인들을 감염시키는 것은 면역체계가 약해졌을 때에만 발생하는 사람 병원균 (opportunistic human pathogen)이다 [6]. *P.* 애루기노사에 감염된 환자를 치료하는 최근의 방법은 β-락탐 항생제와 아미노글라이코사이드이다 [9]. 그러나, *P.* 애루기노사는 항생제와 숙주 면역 방어활

성에 저항성을 나타낸다. 가장 중요한 원인은 LasA 프로테이즈, LasB 엘라스테이즈, 피요버딘 (pyoverdin), 피요사이아닌 (pyocyanin), 알지네이트와 같은 QS-제어된 독성 인자 (virulence factors)의 발현 및 세포에 저항성을 부여하고 항생제로부터 분리되는 처리가 어려운 생물막이다 [2]. 따라서, QS 시스템의 억제는 *P.* 애루기노사에 의해 야기되는 질병을 예방하고 치료하는데 있어 최근 연구 중인 방법이다.

[0003] 델리세아 풀크라 (*Delisea pulchra*)에 의해 생성되는 할로겐화 퓨라논 (Halogenated furanones)은 AHL과 구조적으로 유사하여 LuxR 단백질로부터 AHL의 대체를 통하여 QS 시스템에 저해효과를 나타낸다 [10]. 세라티아 피카리아 (*Serratia ficaria*), 비브리오 피셰리 (*Vibrio fischeri*), 비브리오 하베이 (*Vibrio harveyi*) 및 *P.* 애루기노사에서 퓨라논을 이용하여 QS 시스템을 저해하려는 시도들이 있었다 [7, 11, 13].

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) 1. Adonizio A, Kong KF, Mathee K. 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa by south Florida plant extracts. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 198-203.

(비특허문헌 0002) 2. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. 1994. Biofilms, the customized microniche. J. Bacteriol. 176: 2137-2142.

(비특허문헌 0003) 3. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280: 295-298.

(비특허문헌 0004) 4. Defoirdt T, Miyamoto CM, Wood TK, Meighen EA, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2007. The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in Vibrio harveyi by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. Environ. Microbiol. 9: 2486-2495.

(비특허문헌 0005) 5. De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski BH. 2001. Quorum-sensing genes in Pseudomonas aeruginosa biofilms: their role and expression patterns. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1865-1873.

(비특허문헌 0006) 6. Dubin PJ, Kolls JK. 2007. Pseudomonas aeruginosa and the host pulmonary immune response. Expert Rev. Respir. Med. 1: 121-137.

(비특허문헌 0007) 7. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, et al. 2002. Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology 148: 87-102.

(비특허문헌 0008) 8. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, et al. 2003. Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J. 22: 3803-3815.

(비특허문헌 0009) 9. Hoiby N. 1993. Antibiotic therapy for chronic infection of Pseudomonas in the lung. Annu. Rev. Med. 44: 1-10.

(비특허문헌 0010) 10. Manefield M, De Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, et al. 1999. Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiology 145: 283-291.

(비특허문헌 0011) 11. Manefield M, Harris L, Rice SA, De Nys R, Kjelleberg S. 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the Black Tiger Prawn (Penaeus monodon) pathogen Vibrio harveyi by intercellular signal antagonists. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2079-2084.

(비특허문헌 0012) 12. Ponnusamy K, Paul D, Kim YS, Kweon JH. 2010. 2(5H)-furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. Br. J.

Microbiol. 41: 227-234.

(비특허문헌 0013) 13. Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, et al. 2000. How Delisea pulchra furanones affect quorum sensing and swarming motility in Serratia liquefaciens MG1. Microbiology 146: 3237-3244.

(비특허문헌 0014) 14. Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS, Greenberg EP. 2004. The Pseudomonas aeruginosa RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. Mol. Microbiol. 51: 973-985.

(비특허문헌 0015) 15. Smith RS, Iglewski BH. 2003. P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. Curr. Opin. Microbiol. 6: 56-60.

(비특허문헌 0016) 16. Steindler L, Venturi V. 2007. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiol. Lett. 266: 1-9.

(비특허문헌 0017) 17. Wang Y, Juliani HR, Simon JE, Ho CT. 2009. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. Food Chem. 115: 233-237.

(비특허문헌 0018) 18. Woo SS, Jung HJ, Park K, Kim HS, Lee IS, Lee DG. 2007. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF); antimicrobial compound with cell cycle arrest in nosocomial pathogens. Life Sci. 80: 586-591.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기 문제점들을 해결하고 좀 더 효과적이고 경제적인 생물막 저해제 및 정족수 감지 저해제를 제공하려는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 퓨라니올 (furaneol)을 함유하는 생물막 형성 저해제에 관한 것이다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 퓨라니올이 0.01 ~ 100 μM임을 특징으로 하는 생물막 형성 저해제에 관한 것이다. 퓨라니올이 0.01 μM 미만일 때에는 생물막 형성 저해효과가 미미하며, 100 μM을 초과하는 경우에는 경제성이 저하된다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 퓨라니올이 식물 유래이거나 또는 합성에 의해 생성된 것임을 특징으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 퓨라니올 (furaneol)을 함유하는 정족수 감지 (quorum sensing) 저해제에 관한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 퓨라니올이 0.01 ~ 100 μM임을 특징으로 하는 정족수 감지 저해제에 관한 것이다. 퓨라니올이 0.01 μM 미만일 때에는 정족수 감지 저해효과가 미미하며, 100 μM을 초과하는 경우에는 경제성이 저하된다.

[0011] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 퓨라니올이 식물 유래이거나 또는 합성에 의해 생성된 것임을 특징으로 하는 정족수 감지 저해제에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 실시예에서는 0.1 μM, 1.0 μM 및 10 μM의 퓨라니올에 대하여 실험을 실시하였으나, 그 결과로부터 유추할 때 0.1 μM 미만인 경우와 10 μM를 초과한 경우에도 생물막 형성 저해효과 및 정족수 감지 저해효과가 발휘될 수 있음을 당업자가 충분히 예상할 수 있으므로, 상기 생물막 형성 저해제로서의 용도 및 정족수 감지 저해제로서의 용도로 퓨라니올을 이용할 때 가능한 농도 범위를 0.01 ~ 100 μM로 잡았다.

[0013] 본 발명자들은 항-QS제로서 퓨라니올 {furaneol; 4-Hydroxy-2,5-dimethyl--3(2H)-furanone}을 선택하였는데, 이것은 딸기, 망고, 파인애플, 라즈베리 및 다양한 가공식품에 존재하는 방향성 화합물 (aroma compound)의 일종이다 (도 1). 이것은 FEMA (Federal Emergency Management Agency, 등록번호 3174) 및 COE (Council of

Europe, 참고번호 536)에 의해서 허가된 음료, 아이스크림 및 담배에 안전한 식품 첨가제로서 널리 이용되어 왔다. 선행 연구들은 퓨라니올이 항미생물 활성을 나타내며, 또한 동물 식이에서 이용되어 일시적 백내장에 걸린 랫트에 대해 항-백내장 효과 및 항암 활성을 가짐을 밝혔다 [18]. 그러나, 이러한 항미생물 활성은 QS 제어 측면과 관련해서는 밝혀진바 없었다.

[0014] 본 발명에서, *P.* 애루기노사에서 퓨라니올의 항-QS 효과는 생물막 형성 저해로 설명되었다. 본 발명에 따르면, 수 분배 시스템을 포함하는 파이프에서 분리막 생물오염 (membrane biofouling)과 생물막 형성을 제어하기 위한 무독성의 적용 가능한 처리방법으로서 퓨라니올이 유용할 것으로 예상된다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 의하면 퓨라니올은 10.0 μM에서 슈도모나스 애루기노사의 성장을 저해하였으며, 0.1 ~ 10 μM에서 슈도모나스 애루기노사의 생물막 형성을 저해하였다. 또한, 본 발명에 의하면 퓨라니올은 농도 의존적으로 생물막의 탈리 (detachment)를 촉진하였다.

[0016] 즉, 본 발명의 퓨라니올은 생물막에의 세포 부착을 저해할 뿐만 아니라, 영양이 부족할 때 기층으로부터 세포의 탈락을 증가시켰다.

[0017] 따라서, 본 발명에 의하면 퓨라니올은 효과적인 생물막 형성 저해제로 이용할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 의하면 퓨라니올은 효과적인 정족수 감지 저해제로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 퓨라니올의 화학구조를 나타낸다.

도 2는 슈도모나스 애루기노사의 성장에 미치는 퓨라니올의 영향을 나타낸다. ●: 퓨라니올을 가하지 않음; △: 0.1 μM; □: 1.0 μM; ○: 10.0 μM 퓨라니올을 가함.

도 3은 크리스탈 바이올렛 분석에 기초하여 슈도모나스 애루기노사에 의해 형성되는 생물막에 대해 퓨라니올 (0, 0.1 및 1.0 μM)을 가했을 때의 저해효과를 나타낸다.

도 4는 다양한 농도의 퓨라니올로 처리하였을 때 폴리스티렌 표면 상에 형성된 슈도모나스 애루기노사 생물막의 주사전자현미경 사진이다 (A: 퓨라니올을 가하지 않음; B: 0.1 μM 퓨라니올 처리; C: 1.0 μM 퓨라니올 처리).

도 5는 OdDHL 및 BHL에 대한 바이오센서로서 각각 아그로박테리움 투메파시엔스 NTL4 (pZLR4) (위쪽 패널) 및 크로모박테리움 비올라세움 CV026 (아래쪽 패널)을 이용한 웰-확산 분석법을 수행한 결과이다. 퓨라니올의 효과는 발색 범위의 직경을 측정하여 평가하였다 (좌측, 무첨가; 중앙, 0.1 μM 퓨라니올 처리; 우측: 1.0 μM 퓨라니올 처리).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0021] **세균 균주**

[0022] 슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1은 ATCC (American Type Culture Collection)에서 입수하였다 (ATCC BAA-47). BHL (N-butyryl-L-homoserine lactone)과 OdDHL {N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone} 수준을 탐지하기 위하여 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*) CV026 및 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4 (pZLR4)가 바이오센서로 이용되었다.

[0023] **배양배지와 배양조건**

[0024] 균주 PAO1은 LB (Luria Bertani) 배지에 접종하고 150 rpm으로 교반하면서 30 ℃에서 오버나잇 배양하였다. 성장 저해 분석 및 배양액으로부터 AHL 추출을 위해 세포는 신선한 LB 배지로 600 ㎚ 흡광도가 0.2가 되도록 희석했다. 이어 퓨라니올 (furaneol)을 세포 현탁액에 가하여 최종 농도가 0.1, 1.0 및 10.0 μM이 되도록 가하고, 교반하며 30 ℃에서 배양하였다. 성장 저해는 시간 간격을 두고 A_{600}을 측정하여 결정하였다. 퓨라니올을 가하지 않고 성장한 PAO1 세포를 접종한 배지를 대조군으로 이용하였다.

[0025] 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*) CV026과 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4 (pZLR4)는 각각 TY 배지와 아그로박테리움 만니톨 배지에서 유지하였다. 필요한 경우 50 ㎍/㎖의 X-Gal과 항생제 (500 ㎍/㎖의 카베니실린 및 100 ㎍/㎖의 카나마이신)를 아그로박테리움 만니톨 배지에 가하였다.

[0026] **BHL과 OdDHL 결정**

[0027] 24시간 동안 성장시킨 PAO1 배지 (5.5 ㎖)를 10분간 10,000 × g로 원심분리하고, 5 ㎖의 상청액을 동량의 에틸 아세테이트 (0.01% (v/v)의 차가운 초산으로 보충하여 미리 산성화한 것)로 세 번 추출하고, 질소 기류 하에서 증발시켰다. 저장 용액으로, 제조한 것을 2 ㎖의 산성화한 에틸 아세테이트 내에 복원하여 0.2 ㎛ 공극크기의 막 필터로 여과하였다. BHL 탐지를 위하여, TY 배양액에서 배양한 크로모박테리움 CV026은 다음과 같이 제조하였다. 오버나잇 배양한 CV026 (200 ㎕)은 0.8%의 녹인 한천을 함유한 10 ㎖의 신선한 TY 배지에 50 ℃에서 가하였다. 한천 현탁액은 페트리 배양접시에 부었다. 한천 현탁액이 굳어진 후 소독한 코르크 천공기를 이용하여 4 ㎜ 직경의 웰을 만들었다. AHL 추출물 (300 ㎕)은 필터로 여과된 질소 기류 하에서 증발시켰고, 신선한 TY 배지 30 ㎕로 복원한 후 웰에 피펫팅하였다. 플레이트는 24시간 동안 배양하고, 자색 원의 직경을 측정하였다. OdDHL 탐지는 BHL 바이오분석을 약간 변형하여 진행하였다. 아그로박테리움 NTL4(pZLR4)를 바이오센서로 이용하여 50 ㎍/㎖의 X-Gal이 함유된 아그로박테리움 만니톨 한천 플레이트에서 배양하였다. BHL 또는 OdDHL의 상대량은 다음과 같은 회귀 방정식, BHL (pmol) = $e^{(d+14.78)/8.717}$ (r^2=0.993) 및 OdDHL (pmol) = $\sqrt[0.094]{d/20}$ (r^2=0.998) (여기에서 'd'는 착색 부위의 직경 (㎜)을 나타낸다)을 이용하여 계산되었다.

[0028] **생물막 형성 정량분석**

[0029] 생물막 형성은 3중 48-웰 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에서 평가하였다. PAO1의 세포는 A_{600}=0.2가 되도록 신선한 LB 배지로 희석하였다. 퓨라니올을 최종 농도 0.1 및 1.0 μM가 되도록 가한 후, 배양액 1 ㎖씩을 웰에 넣고 30 ℃에서 각각 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 배지를 조심스럽게 제거하고 크리스탈 바이올렛 수용액 (1% w/v) 1 ㎖를 가하였다. 상온에서 20분간 염색한 후 염색 수용액을 제거하고 웰은 증류수로 충분히 헹구었다. 부착된 세포를 정량하기 위해 크리스탈 바이올렛을 95% 에탄올에 용해시켰고, 595 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[0030] **주사전자현미경으로 생물막 관찰**

[0031] PAO1의 세포는 A_{600}=0.2가 되도록 신선한 LB 배지로 희석하고, 48-웰 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트에서 배양하였다. 각 웰에는 미리 세척한 유리 커버슬립 (9 × 9 ㎜)과, 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올을 넣었다. 그런 다음, 플레이트는 30 ℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 유리 커버슬립은 회수하여 소독한 PBS (phosphate-buffered saline)로 30초씩 두 번 헹구어 느슨하게 부착된 세포를 제거하였다. 고정 단계는 다음과 같이 수행하였다: 2.5% 글루타르알데하이드 함유 PBS (한 시간), 0.175 M 인산 완충액 (15분씩 세 번), 50% 에탄올 (15분), 70% 에탄올 (15분), 90% 에탄올 (15분) 및 100% 에탄올 (15분씩 세 번). 유리 커버슬립은 소독된 공기로 오버나잇 건조하고 스터드 (stud) 위에 올려놓고, 금 플라스마로 코팅한 후 Hitachi S-3500 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0032] **결과**

[0033] 슈도모나스 애루기노사는 독성 인자 발현능 및 생물막 형성능에 기초하여 항-QS제 스크리닝에서 모델 미생물로

알려져 있다. 스크린된 변이체의 수와 예측 오페론의 삽입에 기초하여 235개 이상의 유전자가 슈도모나스의 QS 시스템에 의해 제어되는 것으로 예상되었다 [14]. 슈도모나스 애루기노사의 병원성은 주로 약제가 타겟 조직으로 이송되는 것을 차단하는 생물막 형성과 같은 인자에 의존적이다 [15]. 본 발명은 *P.* 애루기노사에서 생물막 형성에 대한 퓨라니올의 저해효과에 촛점을 맞추었고, 수도 분배 시스템을 포함하는 파이프에서의 생물막 형성 제어를 관찰하고자 하였다.

[0034] 슈도모나스 애루기노사 PAO1의 성장에 미치는 저해효과는 10.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 관찰되었다 (도 2). 이 농도는 슈도모나스 애루기노사 MRPA1의 성장을 300 μM와 같이 높은 농도에서 저해하였다는 Woo 등 [18]의 농도보다 훨씬 낮았다. 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 PAO1의 성장은 24시간 이후 세포 밀도가 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다. 대조군 (퓨라니올 가하지 않음)과 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 처리군들 간에는 성장에서 근소한 차이만 나타난 것으로 보아 이들 농도에서의 퓨라니올의 생물막 형성 저해효과 및 항-QS 효과는 세포 성장 저해로 인한 것이 아님을 알 수 있었다.

[0035] 매우 적은 수의 세균만이 생물막을 형성할 수 있고, 많은 연구자들은 생물막 형성을 저해하는 독성 없고 응용 가능한 제제를 찾고 있다. 슈도모나스에서 QS 시스템과 생물막 형성 간의 관계를 시험하기 위한 시도에서, OdDHL 생산능이 결여된 균주들은 야생형 균주에서 관찰되는 3차원 구조가 결여된 아주 얇은 생물막을 형성하였다. 뿐만 아니라, SDS (sodium dodesyl sulfate)로 수행한 민감성 시험은 *rhl* 시스템이 아닌 *las* 시스템이 슈도모나스의 생물막 형성에 중요함을 보여주었다 [3]. 본 발명에서, 퓨라니올은 도 3과 같이 24시간 배양 후 PAO1 균주의 생물막 형성을 효과적으로 저해하였다. 대조군과 비교할 때 저해율은 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 각각 28% 및 43%였다. 48시간 후, 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 저해율은 각각 66% 및 85%까지 증가하였다. 이와 비교하여 Adonizio *et al.* [1]은 부시다 부세라스 (*Bucida buceras*) (Combretaceae) 추출물을 이용하여 78% 감소 효과를 얻었다. 퓨라니올에 의한 생물막의 탈착 (detachment) 정도 또한 농도 의존적으로 증가하였다 (도 3). 24시간부터 48시간까지 생물막을 형성하는 바이오매스의 약 50%가 대조군 배양액의 기층 (substratum)으로부터 탈락하였다. 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 분리는 각각 66% 및 85%까지 증가하여, 퓨라니올이 단지 세포 부착을 저해할 뿐만 아니라 영양이 부족할 때 폴리스티렌 기층으로부터 세포의 탈락을 증가시킴을 보여주었다.

[0036] 퓨라니올 농도가 증가할 때 형성된 생물막의 두께와 구조는 명확히 저해효과를 보여주었다 (도 4). 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 세포는 3차원 구조가 덜 형성되었고, 대부분의 세포들은 성숙하고 다층으로 밀도 높게 쌓인 대조군과 비교하여 기층 상에 얇은 단층으로 분산되어 있었다. 마늘 및 델리세아 풀크라 (*Delisea pulchra*) 퓨라논으로 처리한 선행 연구 결과는 생물막 형상에서의 질적 변화와 두께의 감소를 보여주었다 [7, 8]. 그러나, 본 발명과는 달리 이러한 분석들은 정량화되지 않았다.

[0037] 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*) CV026 및 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) NTL4 (pZLR4)를 AHL 바이오센서로 이용하였다 (도 5). CV026 균주를 C4 내지 C8 길이의 아실 사슬을 가진 외생 AHL에 노출시키면 시각적으로 깨끗한 자색이 빠르게 형성되는 것을 볼 수 있다. 따라서, CV026은 OdDHL (C12-호모세린 락톤)이 아닌 BHL (C4-호모세린 락톤)에 민감하다. 그러나, 아그로박테리움 NTL4 (pZLR4)는 C4 내지 C12의 아실 사슬 길이를 가진 3-옥소-치환된 AHL 유도체뿐만 아니라, BHL을 제외하고 3-치환되지 않은 AHL도 탐지할 수 있었다 [16]. 따라서, BHL과 OdDHL 수준은 이들 두 바이오센서를 이용하여 간접적으로 탐지할 수 있었다. 웰-확산 분석법은 AHL 농도와 유도된 발색 범위의 직경 간의 관계에 기초하여 정량적 수단을 제공하였다. 이 결과는 BHL과 OdDHL 농도가 퓨라니올에 의해 농도 의존적으로 감소하며, 감소율은 0.1 및 1.0 μM 퓨라니올 존재 하에서 각각 약 85.9%와 92.8%로 나타났다 (표 1).

[0038] 선행 연구결과들은 항-QS 활성을 지닌 할로겐화한 퓨라논이 수용체에 대하여 AHL과 경쟁하기 때문인 것으로 보인다고 제안하였다 [10]. 퓨라니올의 저해 메카니즘은 각각 *lasR* 또는 *rhlR*에 대한 OdDHL 또는 BHL과의 경쟁을 통한 할로겐화된 퓨라논의 저해와 유사한 것으로 보이는데, 이는 본 발명에서 관찰된 것과 유사한 현상이 관찰되기 때문이다 (표 1). 비브리오 피셔리 (*Vibrio fischeri*)에 대한 연구 결과는 퓨라논-조합된 *luxR* 구조의 변화를 보여주며, 그 분해를 가속화시킴을 보여주었고, *luxL* 프로모터의 활성이 낮아지고 AHL의 농도가 축적되는 결과를 초래하였다. 이러한 저해효과들은 먼저 또는 동시에 AHL을 가해주면 회복되었다 [4, 10, 11].

[0039] 이러한 결과들은 슈도모나스 애루기노사에 의해 야기되는 생물막 형성 제어에 퓨라논 제제 (furanone agent)를 이용할 수 있음을 제시하는데, 퓨라니올은 무독성이고 다른 연구 결과 예컨대 300 μM의 브로모퓨라논 및 500 μM의 2(5H)-퓨라논과 비교 [4, 12]할 때 아주 낮은 농도에서도 QS에 대해 분명한 저해효과를 나타내기 때문이다. 따라서, 퓨라니올 처리는 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 또는 에르위니아 카

로토보라 (*Erwinia carotovora*)와 같은 병원균에서 항-QS에 대한 전략을 제공할 수 있다. 퓨라니올은 자연에 널리 분포하는 식물에서 용이하게 추출할 수 있으며, 또는 환원당과 아미노산 간의 메일라드 (Maillard) 반응을 포함하는 화학적 방법에 의해서도 합성할 수 있다 [17].

[0040] 아래 표 1은 슈도모나스 애루기노사 배양액에서 BHL 또는 OdDHL에 의해 유도되는 범위에 대한 퓨라니올의 효과를 나타낸다.

표 1

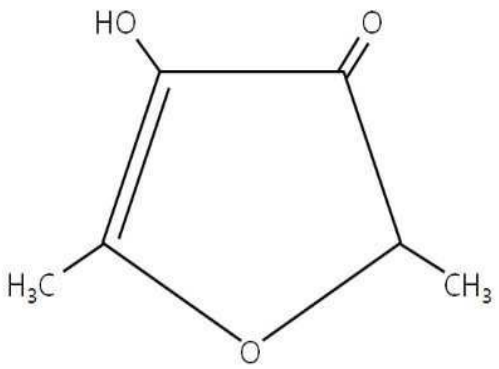
	BHL[a]			OdDHL[b]		
Furaneol (μM)	0.0	0.1	1.0	0.0	0.1	1.0
Induced zone (dia., mm)	39.0±1.0	32.0±0.5	22.0±0.5	41.0±1.0	38.0±0.5	32.0±0.5
Estimated conc. (μM)	0.64	0.29	0.09	2.76	1.23	0.20

[a,b] *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 were used as biosensors for BHL and OdDHL, respectively.

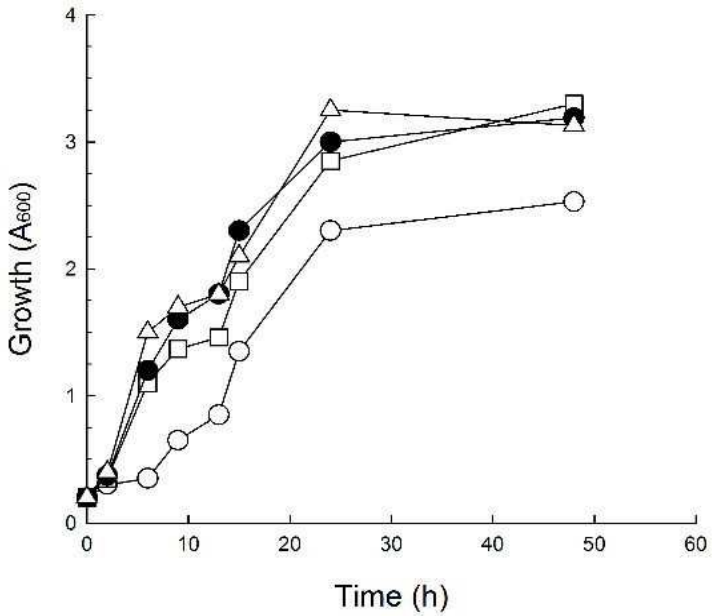
[0041]

도면

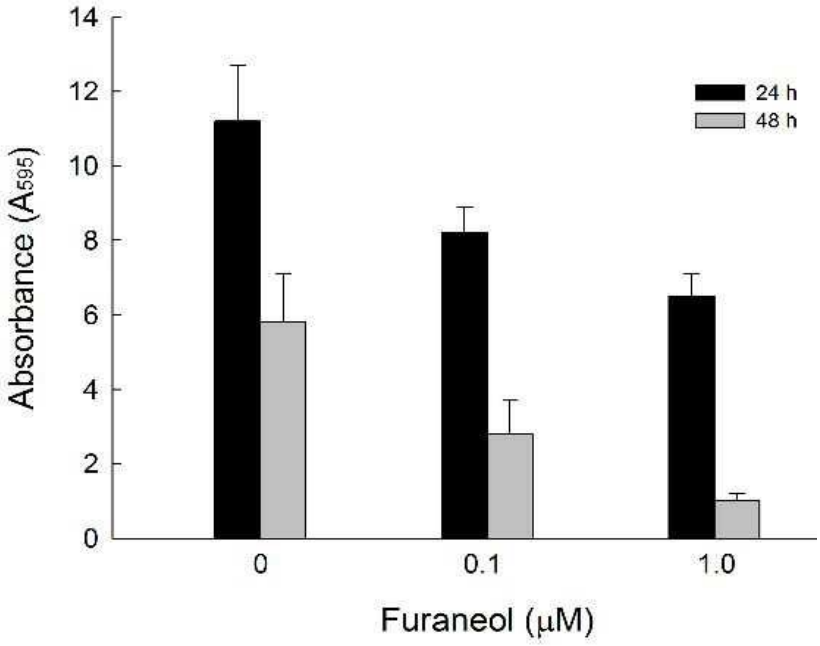
도면1



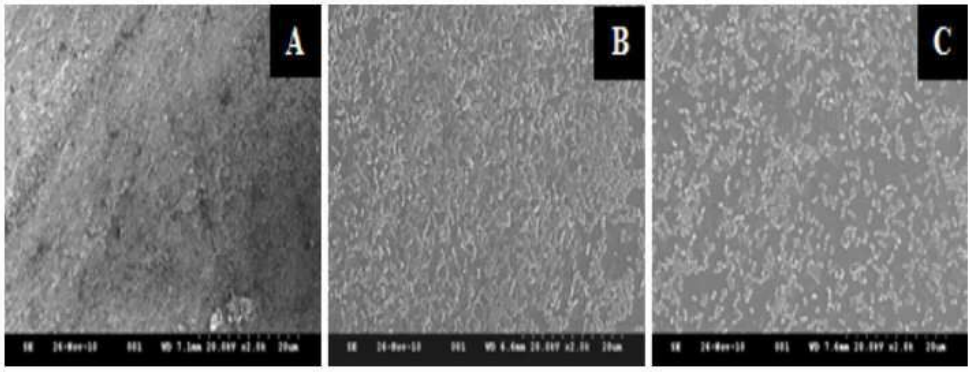
도면2


Growth (A600)
Time (h)
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
60

도면3


Absorbance (A595)
Furaneol (μM)
24 h
48 h
0
2
4
6
8
10
12
14
0
0.1
1.0

도면4



도면5

