(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월18일
(11) 등록번호 10-1845663
(24) 등록일자 2018년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/02* (2017.01)
C12R 1/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0053662
(22) 출원일자 2017년04월26일
심사청구일자 2017년04월26일
(56) 선행기술조사문헌
Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013, vol. 77, no. 5, pp. 923-927.
J. Microbiol. Biotechnol. 2014, vol. 24, no. 11, pp. 1574-1582.
FEMS Microbiology Reviews. 2016, vol. 40, pp. 86-116.
KR1020160011058 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박희등
경기도 성남시 분당구 정자일로 27, 1402호
함소영
경기도 성남시 분당구 미금로 177, 301동 402호
김택승
서울특별시 동대문구 무학로44길 4-9, 201호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **정족수인식 차단활성을 갖는 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 및 이의 용도**

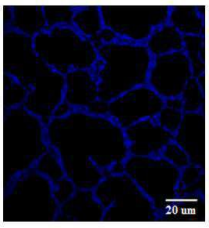
(57) 요 약

본 발명은 정족수인식 차단활성을 갖는 신규 미생물인 엔테로코커스 듀란스(*Enterococcus durans*) HEMM-1 및 이의 용도에 관한 것이다.

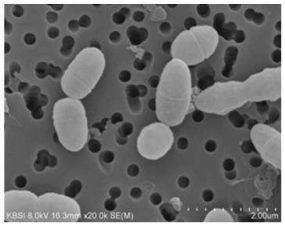
본 발명에 따른 *Enterococcus durans* HEMM-1은 정족수인식 차단 기작을 통해 생물막 형성을 억제시키기 때문에 종래 바이오파울링 저감 방법에 비해 생물막을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 분리막의 표면에 형성되는 생물막의 형성을 분자생물학적인 방법으로 억제할 수 있으므로 분리막의 투수율의 저하를 막을 수 있으며, 분리막의 세척 주기를 증가시켜 세척약품의 소모량을 줄일 수 있어 장시간 여과공정을 수행할 수 있다.

대 표 도 - 도2

(a)



(b)



(52) CPC특허분류
C12R 1/46 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016938995
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원-기본(후속)
연구과제명 [이지바로]역삼투 공정 바이오파울링 제어를 위한 생물막 억제제 리버스엔지니어링
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 아실 호모세린 락톤(AHL) 분해효소를 생산하는 것을 특징으로 하는 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주에 의해 유발되는 생물막을 저해하는 것을 특징으로 하는 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주는 크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주.

청구항 5

제1항에 따른 수탁번호 KACC 81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 배양산물은 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 파쇄물 및 이들의 분획물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 8

크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 제5항에 따른 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 생물막 형성 억제 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 정족수인식 차단활성을 갖는 신규 미생물인 엔테로코커스 듀란스(*Enterococcus durans*) HEMM-1 및 이

의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분리막을 이용한 고도의 수처리 공정, 특히, 하폐수 처리에 이용되는 분리막 생물 반응조(membrane bioreactor, MBR) 공법의 경우, 미생물을 이용하여 생물학적으로 분해한 후, 분리막을 통과시켜 부유물질 및 대장균 등을 제거한다. 이는 간편하고 처리효율이 우수하여 많은 관심과 연구의 대상이 되고 있다.

[0003] 그러나, 상기 MBR 공법은 하폐수 내에 존재하는 미생물에 의해 필연적으로 생물막이 분리막 표면에 형성되어 이로 인해 바이오파울링(biofoluling) 현상이 발생하는데, 이는 분리막의 투수도를 감소시키고, 수명 및 세정 시기를 단축시키며, 여과에 필요한 에너지 소비량이 증가하며, 분리막 성능이 저하되는 등의 문제점이 있다.

[0004] 이와 같은 생물막오염 문제를 해결하기 위하여, 화학적, 물리적 방법들이 제시되었으나, 미생물의 생장에 필요한 영양분이 항시 제공되는 수처리 공정의 환경조건과, 형성되면 외부의 물리/화학적 충격에 높은 내성을 갖는 생물막 자체의 특성으로 인해 현재까지 만족할 만한 해결책이 제시되고 있지 않으며, 제시되었다고 하더라도 하폐수가 여과 방향으로 유동한다는 점에서 일시적인 대책이라는 한계가 존재한다. 따라서, 생물막 오염 현상의 근본적인 해결을 위해서는 미생물의 특성에 대한 이해와 이를 바탕으로 한 생물학적 접근법이 절실한 실정이다.

[0005] 미생물이 적당한 표면에 정착하여 소수로 이루어진 군락을 형성한 후, 충분한 수의 미생물이 생장하게 되면 정족수 인식(quorum sensing, QS) 기작이 작용하여 점액성을 띈 고분자 다당류의 구조화된 생물막이 형성된다. 정족수 인식기작은 상기 미생물들로부터 분비되는 특정 신호물질(이하, 'AHL'이라고도 한다.)에 의해 특정한 유전자가 발현되는 과정을 의미한다.

[0006] 이에, 생물막이 형성되는 근본적인 원인인 정족수 인식 기작을 차단하기 위해, 신호전달 물질인 아실 호모세린 락톤(AHL)의 효소적 분해를 통해 신호물질을 무력화시킴으로써 세균에 의한 병독성 요소 생산과 생물막의 형성을 저해하고자 다양한 미생물들이 발견, 연구되어 왔다.

[0007] 일예로, 아실 호모세린 락톤을 분해하기 위한 효소를 갖는 미생물로는 로도코커스 속(Rhodococuss sp.) PI-33(한국공개특허 제10-2005-0038111호), 아스로박터 속(Arthrobacter sp.) KH32(한국공개특허 제10-2003-0042624호) 및 아스로박터 속(Arthrobacter sp.) IBN110(한국등록특허 제10-0578525호)이 알려져 있다. 그러나, 이들 미생물은 아실 호모세린 락톤의 아실체인 길이가 짧은 경우에만 유효하거나, 어느 한 종 또는 두 종의 호모세린 락톤만을 분해할 수 있으므로 다양한 아실 호모세린 락톤이 존재하는 수처리 공정에 사용되기에는 한계점이 존재한다.

[0008] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 수처리 공정 중에 발생하는 다양한 아실 호모세린 락톤을 분해할 수 있는 우수한 분해활성을 가진 미생물을 확보하고 이를 이용하여 효율적이고, 친환경적인 수처리 공정의 생물막 형성을 억제할 수 있는 방법을 개발하는 것이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 우수한 정족수인식 차단 활성을 갖는 신규 미생물인 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0011] 정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 균주는 아실 호모세린 락톤(AHL) 분해효소를 생산하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 균주는 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주에 의해 유발되는 생물막을 저해하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주는 크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KACC 81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 배양산물은 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 파쇄물 및 이들의 분획물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0017] 또한, 상기 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 상기 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 *Enterococcus durans* HEMM-1은 정족수인식 차단 기작을 통해 생물막 형성을 억제시키기 때문에 종래 바이오파울링 저감 방법에 비해 생물막을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 분리막의 표면에 형성되는 생물막의 형성을 분자생물학적인 방법으로 억제할 수 있으므로 분리막의 투수율의 저하를 막을 수 있으며, 분리막의 세척 주기를 증가시켜 세척약품의 소모량을 줄일 수 있어 장시간 여과공정을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 계통도이다.

도 2는 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 공초점주사현미경(CLSM) 및 주사전자현미경(SEM) 이미지이다.

도 3은 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양액의 무세포 상등액(Cell-free supernatant)과, 배양 침전물(Whole cell) 및 비교 균주들의 정족수 인식 차단 활성도를 측정한 결과 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양액의 무세포 상등액(Cell-free supernatant)의 정족수 인식 차단 기작 분석 결과를 나타낸다.

도 5는 회분식 조건에서, 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양액의 무세포 상등액(Cell-free supernatant)의 주입량에 따른 생물막 형성 억제 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 연속식 조건에서 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양액의 무세포 상등액(Cell-free supernatant)의 생물막 형성 억제 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0022] 본 발명에서 사용된 용어 “생물막”은 미생물이 스스로 분비한 다량체 기질(polymeric matrix) 속에 형성된 미생물들의 집합체로서, 고체 표면 위에 막 형태로 형성되는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0025] 본 발명은 정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주를 제공한다.

[0026] 하수처리장의 활성슬러지와 BHL을 단일 탄소원으로 하는 배지로부터 순수 분리하여 가장 활성이 우수한 단일 균주 HEMM-1를 선별·분리하였으며, 이러한, HEMM-1의 종분석을 위해 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 균주 HEMM-1은 엔테로코커스 듀란스(*Enterococcus durans*)에 속하는 것으로 확인되었다.

[0027] 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 형태학적 특성을 조사하기 위하여 DAPI를 이용하여 염색한 후, 공초점 주사 현미경(Confocal lase scanning microscopy, CLSM) 및 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 관측하였다. 측정 결과, 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주는 Chain 형태로 성장하며, 0.8 ㎛의 길이와 0.6 ㎛ 두께의 원형으로 주로 2개의 미생물이 합쳐져 존재하는 것이

확인되었다 (도 2). 이는 기존에 알려진 *Enterococcus*의 성장패턴과 유사하다.

[0028] 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주는 하수처리장의 활성슬러지로부터 유래되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주는 아실 호모세린 락톤(AHL) 분해효소를 생산할 수 있으며, 이를 통해 정족수 인식 차단 활성을 가지며, 따라서 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주에 의해 유발되는 생물막을 저해하는 효과가 있다.

[0030] 이때, 상기 AHL의 종류로는 BHL(N-butanoyl-homoserine lactone), HBHL(N-3-hyeroxybutanoylhomoserine lactone), HHL(N-3-actaoyl-homoserine lactone), OHL(N-3-oxohexanoyl-homoserine lactone), OHHL(N-3-octaoyl-homoserine lactone), OOHL(N-3-oxooxtanoyl-homoserine lactone), OdDHL(N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone), HtedDHL(N-3-hyeroxy-7-cis-tetradecenoyl-homoserine lactone) 등을 예로 들수 있다.

[0031] 이들 중 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주는 BHL, HHL, OHL, OHHL, OdDHL 등 다양한 아실 호모세린 락톤류를 효과적으로 분해할 수 있으며, 특히 BHL을 분해하는 효과가 매우 우수하다.

[0032] 또한, 상기 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주는 정족수 인식 차단 대상이 되는 미생물로서 그람양성 세균 및 그람음성 세균이 포함되며, 바람직하게는 크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주일 수 있지만, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 따른 상기 균주는 수처리 공정에 적용하여 하폐수 속에 존재하는 미생물의 신호물질 농도의 변화를 유도함으로써 효과적으로 생물막 형성을 제어할 수 있으며, 바람직하게는 본 발명에 따른 균주는 분리막에 고정화되거나, 하폐수 내에 접종하여 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 균주를 수처리 공정에 적용하기 위해서는 시판되는 세균배지에 접종하여 배양한 후, 이의 미생물 균체 또는 배양액을 수처리 공정에 적용하여 분리막에 형성되는 생물막을 억제시킬 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 세균배지는 BHL과 활성슬러지를 유일한 탄소원으로 하는 것이 균주의 생육을 촉진시킬 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KACC 81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 배양산물은 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 파쇄물 및 이들의 분획물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0037] 이때, 본 발명에 따른 상기 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 또는 그의 배양산물은 독성이 없으며, 미생물 간의 의사소통을 방해하는 정족수 인식 억제 활성이 있어, 미생물의 번식과 생물막 (biofilm)의 형성 등을 효과적으로 차단할 수 있는 것이 특징이다. 따라서, 본 발명에 따른 상기 조성물은 세균의 감염을 차단하거나 생물막의 형성을 방지할 필요가 있는 각종 생활 도구 및 의료기구 등에 다양하게 이용될 수 있다.

[0038] 또한, 상기 무세포 상등액(Cell-free supernatant)의 경우 배양 상등액을 필터링하여 상등액 내에 존재하는 세포가 제거된 것을 의미하며, 구체적으로, (a) 수탁번호 KACC 81039BP로 기탁된 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주를 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계로부터 얻은 배양액을 원심분리하여 상등액을 분리하는 단계; 및 (c) 상기 상등액을 필터링하여 무세포 상등액을 수득하는 단계;를 통해 수득할 수 있다.

[0039] 이때, 상기 (c) 단계에서는 0.1 내지 0.5 ㎛의 필터를 이용하여 상기 상등액을 필터링함으로써 무세포 상등액을 수득할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 조성물은 상기 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 또는 그의 배양산물 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크 및 마그네슘 스테아레이트 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 상기 생물막 형성 억제용 조성물은 수처리 공정 중에서 하폐수 내에 접종하거나 분리막에 고정화하여 사용될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 크로모박테리움 비오레슘(*C. violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 및 슈도모나스 애루지노사 (*P. aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 상기 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

[0044] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0046] <u>실시예 1. 균주의 분리 및 선발</u>

[0047] 정족수 인식 차단 미생물을 분리하기 위하여 실제 운영 중인 구리하수처리장의 활성슬러지 샘플을 수득한 후, 이에 탄소원으로 BHL이 포함된 증균배지에서 배양하였다. 이를 BHL이 포함된 한천배지에 도말하고 배양하여 성장속도가 빠르고 독특한 형태의 콜로니를 형성한 20 개의 균주를 선택하였다. 선택된 균주들 중 성장속도가 빠르고, 정족수 차단 인식 및 생물막 형성 억제 능력이 가장 우수한 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주를 최종 선택하였다.

[0048] 상기 증균배지[minimal medium; 300 mM NaCl, 50 mM $MgSO_4$, 0.2% vitamin-free casamino acids, 10 mM potassium phosphate, 1 mM L-arginine, pH 7.5]는 2 mM BHL을 단일 탄소원으로 첨가하여 제조된 것이다.

[0050] <u>실시예 2. 균주의 동정</u>

[0051] 상기 실시예 1에서 최종 선택된 균주의 동정은 형태학적 및 생화학적 특성 그리고 16S rDNA 유전자 염기서열분석을 이용하여 실시하였다.

[0052] (1) 형태적 특성 분석

[0053] HEMM-1의 형태를 확인하기 위해 confocal laser scanning microscope(CLSM)와 scanning electron microscope(SEM)이 사용되었다. CLSM 사진을 통해 HEMM-1은 chain 형태로 성장하는 것이 확인되었으며, SEM 사진을 통해 0.8 ㎛의 길이와 0.6 ㎛ 두께의 원형으로 주로 2개의 미생물이 합쳐져 존재하는 것이 확인되었다 (도 2). 이를 통해 본 발명에 따른 균주는 종래 알려진 *Enterococcus*의 성장패턴과 유사함을 확인하였다.

[0054] (2) 16S rDNA 염기서열 분석

[0055] 상기 실시예 1에서 분리된 균주의 동정을 위해서 통상의 16S rDNA 유전자 염기서열분석을 이용하였다. 프라이머는 제노텍(Genotech)사의 27F와 1492R 프라이머를 10 pmol 농도로 사용하였고, 변성 95 ℃, 1분 어닐링 55 ℃, 1 분, 신장 72 ℃, 2 분 조건으로 30 사이클로 PCR을 실시한 후 서열분석기(ABI Prism 3730XL DNA analyzer)로 서열을 분석하였다. 분석된 염기서열의 계통학적 분류체계는 public database인 NCBI의 Blast search tool를 통해 확인하였다.

[0056] 도 1에는 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 대략적인 계통도를 도시하였다.

[0057] 분석 결과, 본 발명에 따른 균주는 *Enterococcus durans* SC2와 99%의 유사성을 보였으며 여러 종의 *Enterococcus*를 이용한 phylogenetic tree 분석 결과 HEMM-1은 *Enterococcus durans*와 가장 높게 clustering되는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 균주를 엔테로코커스 듀란스(*Enterococcus durans*) HEMM-1으로 명명하였다. 또한, 상기 균주는 2017년 1월 2일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하였으며, 수탁번호 KACC81039BP를 부여받았다.

[0059] <u>실시예 3. 정족수 인식 차단 활성도 측정</u>

[0060] 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 정족수 인식 차단 효소가 세포 외부 혹은 내부에 존재하는지 확인하기 위해 cell-free supernatant와 whole cell을 이용되었으며, 신호물질의 분해 정도를 확인하기 위해 BHL, HHL, OHL, OHHL, OdDHL의 신호물질을 이용하였다.

[0061] Cell-free supernatant(엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양 상등액을 0.22 ㎛의 필터를 이용하여 수득)를 이용한 정족수 인식 차단 활성도 결과, 세포 외부에 효소를 보유한 정족수 인식 차단 미생물로 알려진 *Pseudomonas* sp. 1A1에 비해 OHL은 많이 분해하지 못했지만, BHL을 50% 이상 분해하였다. 하지만, whole cell (엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주 배양 및 원심분리를 통해 침전된 물질을 PBS로 세척 및 PBS를 제거하여 세포 자체만을 수득하였음)을 이용한 정족수인식 차단 활성도 결과에서는 세포 내부에 효소를 보유한 정족수 인식 차단 미생물로 알려진 *Rhodococcus* sp. BH4는 모든 신호물질을 분해시키는 반면, HEMM-1은 모든 신호물질을 분해

시키지 못했다 (도 3).

[0062] 이를 통해 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주는 세포 내부가 아닌 외부에 존재하는 효소를 통해 아실 호모세린 락톤(AHL)을 분해한다는 것을 확인하였다.

[0064] **실시예 4. 정족수 인식 차단 기작 분석**

[0065] 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주가 보유하고 있는 효소의 종류를 확인하기 위해 HPLC/MS-ESI를 수행하였다. HEMM-1이 가장 잘 분해하는 BHL에 10% cell-free supernatant를 처리하여 분해된 BHL의 분자량을 분석하였다. lactonase 효소에 의해 분해된 BHL의 분자량은 189.09이다. 10% cell-free supernatant가 처리된 BHL 분자량 또한 189.09으로 lactonase에 의해 분해된 BHL의 분자량과 일치한다 (도면 4). 따라서 HEMM-1은 lactonase 효소를 통해 아실 호모세린 락톤 중 하나인 BHL을 분해한다는 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 5. 회분식 조건에서의 생물막 형성 억제 실험**

[0068] 회분식 조건에서 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 cell-free supernatant의 주입량에 따른 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막의 양을 확인하기 위해 static biofilm formation assay를 수행하였다.

[0069] 이때, 상기 HEMM-1 균주의 cell-free supernatant는 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 배양액 대비 0 내지 10 %(v/v)로 처리하였다.

[0070] 측정 결과, 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 cell-free supernatant의 주입량이 증가할수록 생물막 형성이 현저히 감소된다는 것을 확인하였다(도 5).

[0072] **실시예 6. 연속식 조건에서의 생물막 형성 억제 실험**

[0073] 연속식 조건에서 본 발명에 따른 엔테로코커스 듀란스 HEMM-1 균주의 cell-free supernatant의 생물막 형성 억제 능력을 관찰하기 위해 drip-flow reactor를 운전하였다. 10% HEMM-1 cell-free supernatant가 처리된 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막 모양을 CLSM을 통해 분석하였다. 분석 결과, 10% HEMM-1 cell-free supernatant를 처리하지 않은 대조군에서는 mature한 버섯모양의 생물막이 관찰되었으며, 두께는 약 45 μm에 이르는 것으로 관찰된 반면, 10% HEMM-1 cell-free supernatant를 처리한 생물막은 대조군에 비해 상대적으로 평평한 모양을 나타냈으며, 두께 역시 약 10 μm로 감소되어 생물막 형성이 현저히 감소된다는 것을 확인하였다 (도 6).

수탁번호

[0074]

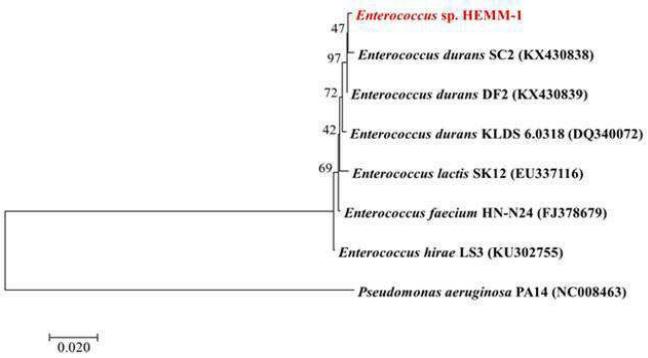
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81039BP

수탁일자 : 20170102

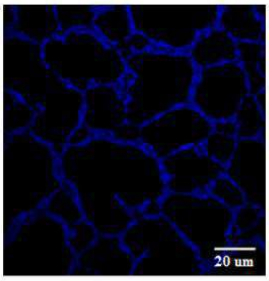
도면

도면1

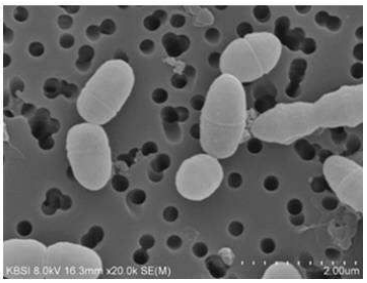

Enterococcus sp. HEMM-1
47
97
Enterococcus durans SC2 (KX430838)
72
Enterococcus durans DF2 (KX430839)
42
Enterococcus durans KLDS 6.0318 (DQ340072)
69
Enterococcus lactis SK12 (EU337116)
Enterococcus faecium HN-N24 (FJ378679)
Enterococcus hirae LS3 (KU302755)
Pseudomonas aeruginosa PA14 (NC008463)
0.020

도면2

(a)

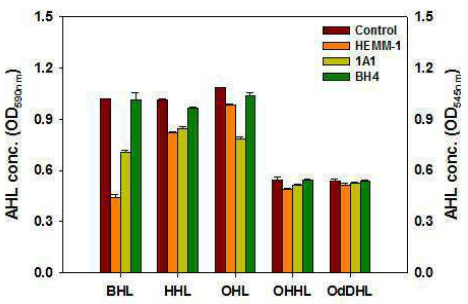

20 um

(b)

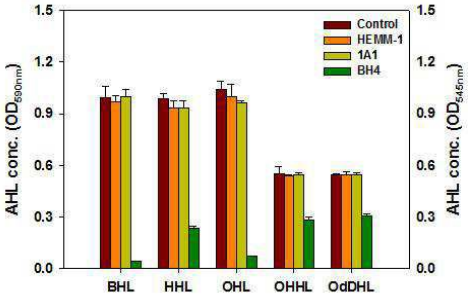


도면3

(a)

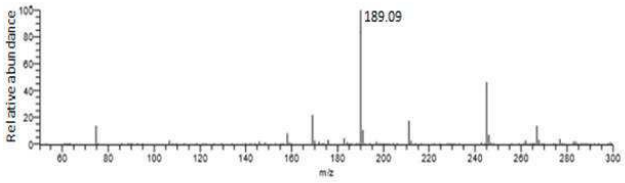

Control
HEMM-1
1A1
BH4
AHL conc. (OD600nm)
AHL conc. (OD546nm)
BHL
HHL
OHL
OHHL
OdDHL

(b)

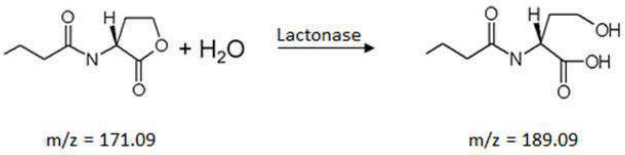

Control
HEMM-1
1A1
BH4
AHL conc. (OD600nm)
AHL conc. (OD546nm)
BHL
HHL
OHL
OHHL
OdDHL

도면4

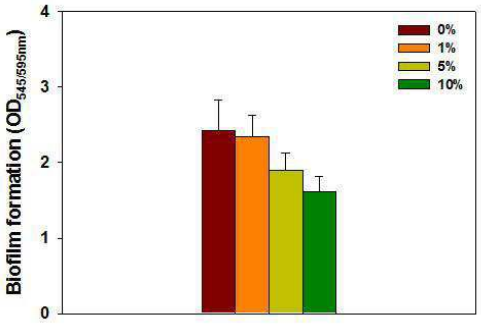
(a)


189.09
Relative abundance
m/z

(b)

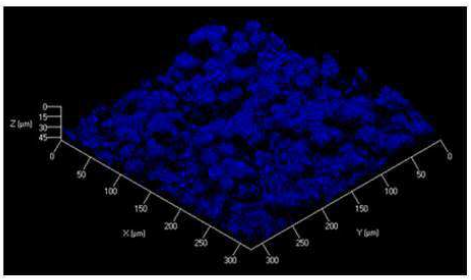

+ H2O
Lactonase
OH
OH
m/z = 171.09
m/z = 189.09

도면5

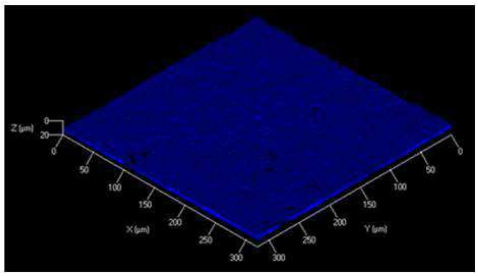


도면6

(a)



(b)



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Enterococcus durans HEMM-1 with quorum quenching activity and uses thereof

<130> JKP-0796

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1514

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Enterococcus durans HEMM-1

<400> 1

tccgctcaga cgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgtacgc ttctttttcc 60

accggagctt gctccaccgg aaaaagaaga gtggcgaacg ggtgagtaac acgtgggtaa 120

cctgcccatc agaaggggat aacacttgga aacaggtgct aataccgtat aacaatcgaa 180

accgcatggt tttgatttga aaggcgcttt cgggtgtcgc tgatggatgg acccgcggtg 240

cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggccacg atgcatagcc gacctgagag 300

ggtgatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg 360

gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt 420

cggatcgtaa aactctgttg ttagagaaga acaaggatga gagtaactgt tcatcccttg 480

acggtatcta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 540

tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt cttaagtctg 600

atgtgaaagc ccccggctca accggggagg gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag 660

aagaggagag tggaattcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aggaacacca 720

gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagcg tggggagcaa 780

acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt 840

ttccgccctt cagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca 900

aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 960

tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ttgaccactc tagagataga 1020

gcttcccctt cgggggcaaa gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga 1080

gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttattg ttagttgcca tcattcagtt 1140

gggcactcta gcaagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca 1200

tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg ggaagtacaa cgagtcgcga 1260

agtcgcgagg ctaagctaat ctcttaaagc ttctctcagt tcggattgta ggctgcaact 1320

cgcctacatg aagccggaat cgctagtaat cgcggatcag cacgccgcgg tgaatacgtt 1380

cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcggtg 1440

aggtaacctt ttggagccag ccgcctaagg tgggatagat gattggggtg aagtcgtaac 1500

agggaaaccg taaa 1514

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명
【보정세부항목】 식별번호 74
【변경전】
KACC81039
【변경후】
KACC81039BP

【직권보정 2】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 8
【변경전】
단계;
【변경후】
단계