(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월02일
(11) 등록번호 10-2151345
(24) 등록일자 2020년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 31/445 (2006.01) *A61K 35/742* (2014.01)
A61P 1/02 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0041542
(22) 출원일자 2019년04월09일
심사청구일자 2019년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
Applied Microbiology and Biotechnology (2019) 103:3669-3682(2019. 3. 25.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
서명지
경기도 용인시 수지구 용구대로2801번길 16 블루밍벽산3단지아파트 301동 501호
유예솔
인천광역시 서구 건지로318번길 55 동남아파트 B동 510호
이현진
인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 100 송도더샵그린워크3차 1804동 703호
(74) 대리인
차준용

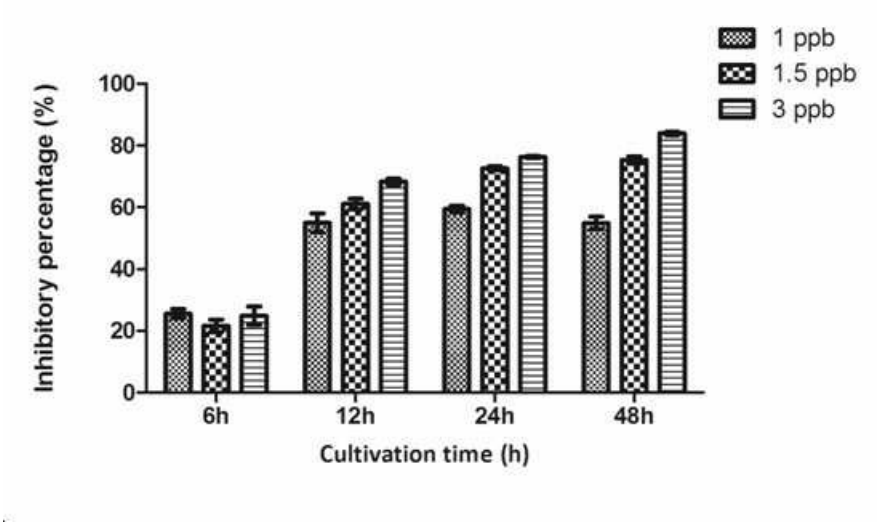
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **충치 유발균의 생물막 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스 균주 및 이를 포함하는 충치 예방 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 충치 유발균(*Streptococcus mutans*)의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 *Bacillus velezensis* 균주에 의한 *S. mutans* 구강 생물막의 억제에 초점을 둔다. *B. velezensis* K68은 전통적인 발효 식품으로부터 분리되었으며 *S. mutans* 생물막에 대한 저해 활성을 분석하였다. 또한 *S. mutans* 세포 표면의 소수성, 부착성 및 병원성 유전자 발현의 조절에 대한 *B. velezensis* 배양 상등액의 처리 효과를 확인하였다. 본 발명자는 *B. velezensis*가 *S. mutans*에 의해 생산된 생물막의 억제를 통해 치아우식증을 예방할 수 있음을 입증했다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 31/445 (2013.01)
A61K 35/742 (2013.01)
A61P 1/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/312 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A1002980
부처명 미래창조과학부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구자원사업
연구과제명 전통 장류 유래 미생물을 통한 항당뇨 고기능성 식품소재 및 발효식품 개발
기 여 율 0.7/1
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1D1A1B03931582
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명 저염 내성 극호염성 고균 유래 카로티노이드 항산화 소재 개발
기 여 율 0.3/1
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 하는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P).

청구항 4

충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 균주는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 것을 특징으로 하는 충치 예방용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 하는 충치 예방용 약학적 조성물.

청구항 7

충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 균주는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 것을 특징으로 하는 충치 예방용 건강기능식품.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 하는 충치 예방용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 충치 유발균(*Streptococcus mutans*)의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 치아우식증(Dental caries)은 아동 및 성인의 60-90%에서 나타나는 세계 주요 질환 중 하나이며 포도당, 과당 및 자당과 같은 다양한 식이성 단당류를 사용하는 미생물에 의해 발생한다(Metwalli et al., 2013). 특히 정족수 감지(quorum-sensing) 시스템에 의해 유발되는 구강 내 Streptococci의 내산성, 생물막(biofilm) 형성 및 병원성 유전자 발현 등과 같은 생리학적 특성은 구강 건강에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Al-Sohaibani 및 Murugan, 2012). *Streptococcus mutans*는 그람 양성균의 진균성 세균이며 충치의 주요 원인균이다(Wang 및 Ren, 2017). *S. mutans*는 치아 표면에 부착하여 세포 외 다당류를 생산하는 글루코실전이효소(GTFs, glucosyltransferases)에 의해 생물막(biofilm)을 형성하게 되는데(Bowen and Koo, 2011), GtfB는 α-1,3-결합 불용성 글루칸을 합성하고 GtfC는 불용성 및 가용성 글루칸 모두를 합성하며, GtfD는 α-1,6-결합 가용성 글루칸을 합성한다(Argimon et al., 2013; Wen et al., 2010; Yousefi et al., 2012). *S. mutans*에 의해 생성된 경구 생물막은 치아 표면의 법랑질 층(enamel layer)에 부착된 미생물 군집에 의해 형성되며 쉽게 제거되지 못하기 때문에 생물막 형성의 초기 단계에 이를 억제하는 것이 중요하다(Marsh, 2006; Zijnge et al., 2010; Islamet al., 2008). 지금까지 젖산균의 배양 산물 및 *Bacillus* spp. 유래의 항생제 또는 용균 효소(lytic enzyme)를 이용하여 *S. mutans*의 생장을 억제하는 미생물의 항우식 효과(anti-caries effect)에 대한 다양한 연구가 수행되었다(Baca-Castaρon et al., 2015; Cagetti et al., 2013; Chuang et al., 2011; Kim et al., 1999; Sumathi et al., 2017; Wu et al., 2015).

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1921309호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 충치 유발균인 *Streptococcus mutans*의 구강 생물막 형성 억제를 통하여 충치 예방 효능이 상승하고, 초기 충치의 진행을 억제하는 균주 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P)를 제공하며, 상기 균주는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)을 생산하는 것을 특징으로 하고, 상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 다른 실시 예에서, 충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 약학적 조성물을 제공하고, 상기 균주는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 것을 특징으로 하며, 상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 한다.

[0010] 상기 조성물은 본 발명에 따른 균주의 파쇄된 세포벽 분획, 생균, 사균, 건조균 또는 이의 배양물을 유효성분으로 함유할 수 있으며, 상기 배양물은 본 발명에 따른 균주를 적합한 액체 배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(여과액 또는 원심분리한 상등액), 상기 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 용해효소(lysozyme)를 처리하여 수득한 세포 파쇄액 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0011] 본 발명에 따른 상기 조성물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 상기 바실러스 벨레젠시스 K68 균주 또는 이의 배양물을 약제학적 분야에서 통상적으로 사용하는 담체 및 향로와 혼합하여 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭실, 시럽, 산제, 현탁제 또는 과립제 등의 형태로 제조 및 투여될 수 있다. 상기 담체로는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제 등을 사용할 수 있다. 투여 방식은 경구, 비경구 또는 도포법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 경구 투여하는 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시 예에서, 충치 유발균의 생물막(biofilm) 형성 억제 활성을 나타내는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) K68 균주(기탁번호: KCCM12460P) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 충치 예방용 건강기능식품을 제공하며, 상기 균주는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 것을 특징으로 하며, 상기 충치 유발균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 건강기능식품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 드링크제, 카라멜, 다이어트바 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 건강식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.

[0014] 본 발명은 식품이나 발효제품으로 활용될 수 있으며, 발효제품의 제조를 위한 종균으로 사용될 수 있다. 상기 발효제품은 햄 및 소시지와 같은 발효육제품, 발효생식제품, 발효유제품, 김치 등을 포함한다. 본 발명의 균주를 이용한 발효제품은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대 상기 발효생식제품은 현미와 율무 등의 곡류 분말, 과채류 분말, 버섯류 분말에 본 발명에 따른 균주 원말을 혼합하여 제조될 수도 있다. 또한 상기 곡류 분말은 본 발명에 따른 균주 또는 이를 포함하는 2-3종의 혼합 균주로 적정 온도에서 발효시킨 후 과채류, 버섯류 분말을 영양적인 균형과 기호성이 우수하도록 적절히 배합하여 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 *Bacillus velezensis* 균주에 의한 *S. mutans* 유래 구강 생물막 억제에 초점을 둔다. *B. velezensis* K68 균주(기탁번호: KCCM12460P)는 전통적인 발효 식품으로부터 분리되었으며 *S. mutans* 생물막에 대한 저해 활성을 분석하였다. 또한 *S. mutans* 세포 표면의 소수성 및 부착성, 그리고 이의 병원성 유전자 발현 조절에 대한 *B. velezensis* K68 균주 배양 상등액의 처리 효과를 조사하였다. 본 발명자는 *B. velezensis* K68 균주가 *S. mutans*에 의해 생산되는 생물막을 억제하고 이를 통해 치아우식증을 예방할 수 있음을 입증했다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1. K68 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 기초로 한 NJ(Neighbor-joining) 계통수. *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667T는 외집단(outgroup)으로 사용되었다. Bar, 뉴클레오타이드 위치 당 0.01 치환.

도 2. *B. velezensis* K68 배양 상등액을 이용한 생물막 형성 저해.

도 3. 양이온 모드에서의 UPLC-QTOF-MS 기반 표준 1-DNJ (A) 및 *B. velezensis* K68에 의해 생성된 1-DNJ (B)의 MS/MS 스캐닝. 다중 반응 모니터링 모드에서 HILIC Plus 컬럼을 사용하여 표준 1-DNJ (a)와 K68 배양액의 1-DNJ의 크로마토그래피 분석을 수행하였다.

도 4. *S. mutans*의 세포 표면 소수성 (A) 및 부착력 (B)에 대한 *B. velezensis* K68 배양 상등액 효과.

도 5. *S. mutans* 생물막의 주사 전자 현미경 사진. (A) *S. mutans*(미처리 대조군), (B) *B. velezensis* K68 배양 상등액으로 처리한 *S. mutans*, (C) *B. subtilis* 배양 상등액으로 처리된 *S. mutans*(음성 대조군).

도 6. *B. velezensis* K68 배양 상등액 처리 후 qPCR 분석을 통한 *S. mutans* 글루코실전이효소 유전자(*gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD*)의 발현 정도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0020] **실시예**

[0021] **1. 박테리아 균주 및 배양 조건**

[0022] *Streptococcus mutans* KCTC 3065는 대한민국의 생물자원센터(대전, 대한민국)에서 구입하였다. *Bacillus velezensis* K68은 전통적인 한국의 발효 식품에서 분리되었다. *S. mutans* KCTC 3065는 BHI(brain-heart infusion) 배지(MB Cell, Los Angeles, CA, USA)에서 일상적으로 배양되었고, *B. velezensis* K68은 TSB(tryptic soy broth, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 연속적으로 3일 동안 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양 후, 이들 배지를 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하고, 상등액을 0.2㎛ 필터로 여과하여 세포 찌꺼기를 제거 하였다.

[0024] **2. *B. velezensis* K68 및 그의 1-DNJ 생합성 유전자 클러스터의 동정**

[0025] *B. velezensis* K68의 게놈 DNA 추출은 이전 Olson 및 Morrow, 2012에 기술된 것과 같이 페놀-클로로포름 이소아밀알코올을 사용하여 수행하였다. *B. velezensis* K68의 16S rRNA와 1-DNJ 생합성 유전자는 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭되었다. 유전자 증폭을 위한 PCR 프라이머 세트는 16S RNA 유전자의 경우 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), *gabT1*의 경우 MJS-23 (5'-ATGGGAACGAAGGAAATCACGAATCCA-3') 및 MJS-24 (5′ -TCACTTGATTTCCTCCAATAGCTTGCG-3′ '), *yktc1*의 경우 MJS-19 (5′ - GTGAGAGACTATATCATYGRGCTTGGA-3′) 및 MJS-20 (5′ - TTAGGAGTCCAGACCAACGCCTTCATA-3′), 그리고 *gutB1*의 경우 MJS-21 (5′ -ATGAAGGCGTTGGTCTGGACTCCTAAT-3′ ') 및 MJS-22 (5′ -TTATAAAAGTTYCGGATCAGACACRAG-3′)를 사용하였다. PCR은 95℃에서 5분간 수행한 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초, 마지막으로 72℃에서 7분간 30 사이클을 수행하였다. PCR 산물의 서열을 해독하여 계통수(phylogenetic tree)의 구조를 분석하였다. 16S rRNA 유전자 서열은 SeqMan 소프트웨어(DNAStar, Madison, WI, USA)를 사용하여 정렬하였다. K68 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 관련 종의 16S rRNA 유전자 서열과 비교 분석하기 위해 SILVA(http://www.arb-silva.de/aligner)가 사용되었다(Pruesse et al., 2012). 관련 16S rRNA 유전자 서열은 EzBioCloud 서버(http://www.ezbiocloud.net/)(Yoon et al., 2017)에서 얻었으며, 진화적 거리는 Kimura 두-매개 변수 모델(Kimura, 1983)을 사용하여 계산하였다. 계통수는 MEGA6 프로그램(Tamura et al., 2013)을 사용하여 구축되었으며, 관련성(relatedness)은 1000 반복에서 나온 부트스트랩 값(bootstrap value)을 사용하여 NJ(Neighbor-joining) 알고리즘(Sitou 및 Nei, 1987)에 의해 계산되었다.

[0027] **3. 생물막 실험(Biofilm formation assay)**

[0028] 평평한 바닥의 폴리스티렌 재질의 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 사용하여 바이오 필름 형성 정도를 평가하였다. *S. mutans* KCTC 3065를 BHI broth에서 밤새 배양하고, 생성된 세포 현탁액을 600nm에서 0.8-1.0 광학 밀도(OD)로 희석하였다. 50㎕의 *S. mutans* KCTC 3065 세포 현탁액, 1% 글루코스를 함유한 150㎕의 BHI broth 및 50㎕의 *B. velezensis* K68 배양 상등액으로 구성된 총 250㎕의 혼합 시료를 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 주입 후 혼합하고 37℃에서 6시간, 12시간, 24시간 및 48시간 동안 각각 배양하고, 부유상태의 세포(planktonic cell)를 멸균 수로 부드럽게 제거하였다. 본 실험의 음성 대조군으로는 *B. subtilis*의 배양 상등액을 사용하였다. 상기 웰에 부착된 세포를 2% 소디움 아세테이트를 함유하는 포르말린(37%, 1:10 희석)으로 1시간 동안 고정했다. 각 웰은 25℃에서 15분 동안 0.1% 크리스탈 바이올렛 250㎕로 염색하고 멸균수로 세척하였다. 바운드 염료(Bound dye)는 150㎕의 95% 에탄올로 제거하였다. 이후 Microplate 판독기(Multiskan FC plate reader; Thermo Fisher Scientific, Waltham,MA, USA)(Hasan et al., 2014)를 활용하여 595nm에서의 흡광도 측정을 통해 생물막 형성을 관찰하였다. 억제 백분율(Inhibition percentage)은 다음과 같이 계산하였다: 억제 백분율

=(처리되지 않은 샘플 OD_{595} - 시험 샘플 OD_{595})/처리되지 않은 샘플 OD_{595} X 100.

[0030] **4. UPLC-QTOF-MS 분석**

[0031] UPLC-QTOF-MS를 사용하여 *B. velezensis* K68에 의한 1-DNJ 생성을 확인하였다. 액체 크로마토그래피-질량 분광법 기반의 1-DNJ 생산을 확인하기 위하여 *B. velezensis* K68 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심 분리(1580R, Labogene, Seoul, Korea) 한 후 상층 액을 0.2μm 필터로 여과하고 동결 건조(TFD8503, Ilshinbiobase, Seoul)하였다. 이후 상기 샘플을 메탄올(LC/MS-grade, Thermo Fisher Scientific)에 용해시켰다. Positive mode에서 Exion UPLC(AB Sciex, Framingham, MA, USA)와 결합된 ESI-QTOF-MS(AB Sciex, USA)를 사용하여 샘플 내 1-DNJ를 확인하고 정량화하였다. QTOF-MS의 소스 파라미터는 다음과 같다: 소스 온도, 500℃; 양이온 분무 전압, 5500V; 커튼 가스, 25mL/min; 분무 가스, 50psi; 히터 가스, 50psi. MS/MS 분석에서 충돌 에너지(collision energy; CE)는 평균 22 ± 5V로 설정되었으며 각 분석물의 축적 시간은 100ms였다. 1-DNJ의 정량 분석은 MRM-HR(multiple reaction monitoring high-resolution) 방법을 통해 진행하였다 검체 농도는 표준 1-DNJ의 보정으로부터 계산되었다. LC 분리는 Agilent ZORBOX HILIC Plus 컬럼(2.1 X 100mm, 3.5μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 이루어졌다. UPLC 분석의 이원 이동상(binary mobile phase)은 0.1% 포름산을 포함하는 아세토니트릴(A) 및 0.1% 포름산(B)을 사용하여, 다음의 용출 용매(gradient elution)로 구성되었다: 0-2분/20-60% B, 2-4.7분/60-80% B, 4.7-5분/80-20% B 및 5-7분/20-20% B. 유속은 0.35 ㎕/min, 컬럼 오븐 온도는 35℃, 주입 부피는 2㎕로 고정하였다.

[0033] **5. 주사 전자 현미경(Scanning electron microscopy)**

[0034] 1%(w/v) 포도당이 함유된 BHI에서 24시간 동안 37℃에서 배양한 *S. mutans* KCTC 3065를 세포 배양 플레이트(60mm X 15mm)의 유리 커버 슬립에 둔 후 부드럽게 1X 인산 버퍼 식염수(PBS)로 두 번 씻었다. 부착 세포를 2.5% 글루타르알데하이드를 함유하는 PBS로 1시간 동안 고정하고 25, 50, 75, 90 및 100% 에탄올을 통해 점진적으로 탈수시켰다. 이렇게 준비된 세포를 오븐에서 1시간 동안 완전히 건조한 후 JSM-7001F 전계 방출 주사 전자 현미경(JEOL Korea, Seoul, Korea)(Bedran et al., 2014)을 이용하여 형태를 관찰 하였다.

[0036] **6. 세포 표면 소수성(Cell-surface hydrophobicity)**

[0037] *S. mutans* KCTC 3065 세포 표면의 소수성은 톨루엔에 대한 세포의 결합 친화력의 백분율을 비교하여 측정하였다. BHI 배지에서 배양한 세포를 0.85%(w/v) NaCl 용액으로 2회 세척하고 OD_{600}에서의 흡광도 값이 약 0.3이 되도록 희석하였다. 이후 톨루엔 250㎕에 준비된 세포 현탁액 3mL를 첨가하고 2분 동안 충분히 혼합한 후 상 분리를 위해 25℃에서 반응을 유도하였다. 톨루엔층을 분리한 후, 분광 광도계(Kim and Kwon, 2017)를 사용하여 600nm에서 수성상(aqueous phase)의 OD를 기록하고 다음의 수식을 통해 소수성 백분율을 계산하였다:($OD_{초기}$ - $OD_{최종}$)/$OD_{초기}$ X 100.

[0039] **7. 세균 부착력 분석(Bacterial adherence assay)**

[0040] *S. mutans* KCTC 3065가 유리 표면에 접착하는 능력은 Limsong et al., 2004에 언급된 방법으로 다음과 같이 분석하였다. 세포를 1%(w/v) 포도당을 함유한 BHI broth와 함께 30° 각도로 유리 시험관에서 37℃에서 24시간 동안 성장시켰다. 배양 후, 상기 튜브를 부드럽게 회전시킨 다음, 부유상태의 세포를 제거하였다. 부착된 세포를 볼텍싱(vortexing)하여 0.5M NaOH에 현탁시키고 OD600에서 정량하였다. 접착성 백분율은 다음과 같이 계산되었다:($OD_{부착\ 세포}$/$OD_{전체\ 세포}$) X 100.

[0042] **8. Quantitative real-time PCR(polymerase chain reaction)**

[0043] *S. mutans* KCTC 3065의 총 RNA 추출은 proteinase K(Qiagen)을 포함하는 RNeasy 미니-컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 진행하였다. 또한 cDNA 합성은 DiaStar RT kit(Solgent, Daejeon, Korea)를 활용하였다. 또한 2x Real-Time PCR mix(SYBR green 포함)를 사용하여 StepOnePlus Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 정량적 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 수행하였다. qRT-PCR 조건으로 95℃에서 5분, 이어서 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분간 40 사이클을 수행하고 이후 60℃에서 5분 동안 신장(extension) 단계를 수행하였다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: *gtfB*에 대해 5′-AGCAATGCAGCCARTCTACAAAT-3′ 및 5′-ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA-3′, *gtfC*에 대해 5′-YCTCAACCAACCGCCACTGTT-3′ 및 5′-TTAACGTCAAAATTACGACATAATC-3′, *gtfD*에 대해 5′-CACAGGCAAAAGCTGAATTAACA-3′ 및 5′-AATGGCCGCTAAGTCAACAG-3′, 16S rRNA 유전자에 대해 5′-CCTACGGGAGGCAGCAGTAG-3′ 및 5′-

CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA-3′ . 상대적인 정량은 *S. mutans* KCTC 3065의 참조 유전자(16S rRNA 유전자)를 이용한 2-△△Ct 방법을 활용하여 수행하였다(Kim and Lee, 2016; Tahmourespour et al., 2011a).

[0045] **실험결과**

[0046] **1. 발효 식품으로부터 분리된 *B. velezensis* K68에 의한 *S. mutans* 생물막 억제**

[0047] 1-DNJ는 α-글루코시다아제(glucosidase)에 대한 억제 효과를 가지며, 1-DNJ 생성 미생물은 α-글루코시다아제 저해 작용(AGI)을 이용하여 스크리닝될 수 있다(Lee et al., 2018). 본 발명자는 TSB 아가(agar) 플레이트를 사용하여 전통적인 발효 식품(된장, 발효 된장)에서 AGI 활성이 있는 *B. velezensis* K68을 분리하였다. 다른 분리 균주에 비해 높은 AGI 활성을 보이는 *B. velezensis* K68을 *S. mutans*에 의한 생물막 형성 억제 균주로 기대하여 선별하였다(데이터 미도시). 분리된 K68 균주의 16S rRNA 유전자 서열(GenBank accession no. MG589484)은 기존에 보고된 *B. velezensis* CR-502^{T}와 99.4%, *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610^{T}와는 99.3%의 상동성을 보였다(도 1). *S. mutans* KCTC 3065에 의한 생물막 형성의 억제를 조사한 결과 배양 12시간 후 *B. velezensis* K68 배양 상등액의 생물막 억제 효과가 유의적으로 나타났다(도 2). 초기시간(6시간)에서 나타난 약한 저해 결과는 해당 시간에서 생물막이 불충분하게 생성되었기 때문으로 판단된다. 또한, 상기 억제 효과는 *B. velezensis* K68 배양 상등액(culture medium supernatant)에 농도 의존적으로 증가하였다. *Bacillus spp.*에 의해 생산된 용균 효소(Lytic enzyme) 및 항생제는 *S. mutans*의 성장을 억제하여 생물막의 형성을 방지한다고 알려져 있다(Kim et al., 1999; Sumathi et al., 2017). 흥미롭게도 *B. velezensis* K68 배양액(culture medium)은 *S. mutans*의 성장에 유의미한 억제 효과를 보이지 않았다(데이터 미도시). 이전의 연구에 따르면 뽕나무(Morus alba)의 1-DNJ가 *S. mutans*의 생물막 형성과 부착을 방지한다고 알려져 있으며(Islam et al., 2008), 일부 *Streptomyces*와 *Bacillus spp.*가 1-DNJ를 생산하는 것으로 알려져 있다(Hardick et al., 1992; Zhu et al., 2010). 따라서, *B. velezensis* K68 역시 1-DNJ를 생산함으로써 *S. mutans*의 생물막 형성을 억제할 것으로 추정된다.

[0049] **2. *B. velezensis* K68에 의한 1-DNJ 생산**

[0050] 일부 *Bacillus spp.*는 1-DNJ를 생산하고 이의 필수 생합성 유전자로 GabT1(putative aminotransferase), Yktc1(putative phosphatase), GutB1(putative oxidoreductase)이 있다(Kang et al., 2011). 따라서 *B. velezensis* K68의 1-DNJ 생합성 여부를 확인하기 위해 우선 PCR 기반의 생합성 유전자 존재 유무를 확인하였다. 그 결과 *gabT1*(1.2kb), *yktc1*(0.9kb) 및 *gutB1*(1.0kb)의 단편이 성공적으로 증폭되었음을 확인하였다. 확보한 1-DNJ 생합성 유전자의 염기 서열을 기반으로 추론된 아미노산 서열 분석 결과 *B. velezensis* K68의 GabT1, Yktc1 및 GutB1이 *B. velezensis* FZB42의 동일한 단백질과 높은 상동성을 보였다(표 1).

표 1

[0051] *B. velezensis* K68 유래 1-DNJ 생합성 유전자의 아미노산 서열 비교

B. velezensis K68 (Nucleotide 등록번호, nucleotide 사이즈, 아미노산 사이즈)	*B. velezensis* FZB42 (아미노산 등록번호, K68 균주와의 아미노산 서열 유사성)	예측된 기능
gabT1 (MH142719, 1269, 422)	ABS72608 (425, 99.1%)	4-aminobutyrate aminotransferase
yktc1 (MH142720, 951, 316)	ABS72609 (316, 99.4%)	fructose-1,6 biphosphate/inositol monophosphatase
gutB1 (MH142721, 1047, 348)	ABS72610 (348, 99.7%)	zinc-binding dehydrogenase

[0053] 또한, *B. velezensis* K68의 1-DNJ 생합성 유전자는 1-DNJ를 생산한다고 기존에 보고된 *B. amyloliquefaciens* 140N의 1-DNJ 생합성 유전자와 각각 99.7%(GabT1), 97.4%(Yktc1), 99.7%(GutB1)의 아미노산 상동성을 보였다(Seo et al. , 2013). 따라서 1-DNJ 생합성 유전자를 가지고 있는 *B. velezensis* K68은 1-DNJ를 직접 생산할 수 있을 것으로 판단되었으며, *B. velezensis* K68 유래 1-DNJ의 필수 생합성 유전자(*gabT1*, *yktc1* 및 *gutB1*) 조립된 추정 1-DNJ 생합성 유전자 클러스터 서열은 GenBank에 등록하였다(수탁 번호 MH142722).

[0054] *B. velezensis* K68이 1-DNJ를 생산하는지 직접 확인하기 위해 UPLC-QTOF-MS 분석을 수행하였다. 그 결과 *m/z* 164.0909에서 pseudomolecular $[M+H]^+$ 이온을 나타내는 표준 1-DNJ의 경우, 모 이온(parent ion)의 MS/MS 단편은 146.0805 $[M+H-H_2O]^+$, 128.0699$[M+H-2H_2O]^+$ 및 110.0593$[M+H-3H_2O]$으로 나타났다(도 3A). 또한 *B.*

velezensis K68 배양 상등액의 경우 표준 1-DNJ의 크로마토그램과 유사한 결과를 보였으며 표준 1-DNJ와 비교하여 전구 이온 및 단편 이온에 대해 매우 유사한 값으로 유사한 체류 시간에서 하나의 피크를 보였다(도 3a, 3b). 또한 해당 피크에서의 MS/MS 패턴 분석 결과 *B. velezensis* K68 시료 역시 표준 1-DNJ 결과와 유사한 결과를 나타냈다(도 3B). 해당 *B. velezensis* K68 배양 상등액 시료에 존재한 1-DNJ의 농도는 475.0 ± 23.8ng/mL이었다.

[0056] **3. *S. mutans*의 세포 표면 소수성 및 부착력에 대한 *B. velezensis* K68의 억제 효과**

[0057] 세포 표면 소수성은 세균과 상피 세포 사이의 상호 작용과 관련이 있으며 치아 표면에 대한 초기 세균의 부착(adherence)에 있어서 중요한 지표이다(Tahmourespour et al., 2008; Westergren and Olsson, 1983). *B. velezensis* K68 유래 3ppb의 1-DNJ를 처리한 결과 *S. mutans* 세포 표면 소수성은 79.0 ± 0.8%(무처리)에서 8.1 ± 2.1%(처리)로 급격히 감소했다(도 4A). 대조적으로, 1-DNJ를 생산하지 않는 *B. subtilis*는 모든 농도에서 세포 표면 소수성을 감소시키지 않았다.

[0058] *S. mutans*의 부착력은 당-의존적 및 당-비의존적 메커니즘에 의해 일어난다. 당-의존적 부착은 당으로부터 글루코실전이효소(glucosyltransferase)를 통해 생성된 글루칸(glucan)에 의해 매개되는 반면 당-비의존적 부착은 정전기력, 소수성 상호 작용 및 타액 성분과의 수소 결합과 같은 물리 화학적 힘에 의해 매개된다(Staat et al., 1980). 본 발명에서 포도당을 첨가한 경우 *S. mutans*의 부착력은 향상되었으나, 3ppb의 1-DNJ를 함유한 *B. velezensis* K68의 배양 상등액을 처리한 결과, 이를 처리하지 않은 대조군 및 *B. subtilis* 배양 상등액 군과는 달리 당-의존적 및 당-비의존적 조건하에서 각각 99.97% 및 98.83%의 부착력의 감소를 유도 하였다(도 4B).

[0059] 따라서, 본 발명자는 *B. velezensis* K68이 1-DNJ를 생성하고, 이것이 *S. mutans*의 세포 표면 단백질에 결합하여 경쟁적 글루코실전이효소(glucosyltransferase) 억제제로 작용하여 *S. mutans*의 소수성 및 부착성을 감소시키는 것을 발견하였다.

[0061] **4. *B. velezensis* K68에 의한 세포외 다당체 합성의 억제**

[0062] *B. velezensis* K68의 배양 상등액이 처리된 *S. mutans* 시료의 경우 세포의 현저한 분산을 나타내었으며 이는, 세포외 다당체 합성의 감소를 시사 하였다(도 5B). 대조적으로, 미처리 및 음성 대조군 샘플(도 5A, 5C)은 세포외 다당체 풀에 고정화된 세포의 명확한 응집을 나타냈다. 이를 통해 *B. velezensis* K68에 의해 생산되는 1-DNJ가 *S. mutans*의 글루칸 합성 및 부착, 그리고 생물막 형성의 억제에 효과가 있다고 생각된다.

[0064] **5. *S. mutans*의 글루코실전이효소 발현에 미치는 *B. velezensis* K68의 억제 효과**

[0065] *S. mutans*는 다양한 글루코실전이효소(glucosyltransferase)를 사용하여 당으로부터 덱스트란(dextran)과 같은 수용성 글루칸, 그리고 뮤탄(mutan)과 같은 불용성 글루칸을 생산한다(Germaine et al., 1977; Wenham et al., 1981).그리고 이러한 수용성 및 불용성 글루칸의 합성에 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD*의 세 가지 글루코실전이효소 유전자가 관여한다(Lynch et al., 2007). 본 발명에서는 *B. velezensis* K68이 이러한 글루코실전이효소의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였고, 그 결과 이들 유전자들의 mRNA 발현이 *B. velezensis* K68 배양 상등액으로 처리한 경우에 미처리군 및 음성 대조군에 비해 유의하게 감소함을 보였다(도 6).

[0067] **결과 검토**

[0068] 치아우식증(Dental carie)은 전 세계적으로 가장 흔한 전염병 중 하나로서, *S. mutans*에 의한 생물막 형성 및 글루코실전이효소 생산 등과 밀접하게 관련되어 있다. 생물막에 서식하는 미생물은 세포외 다당체(exopolysaccharide) 매트릭스를 만들기 때문에 한번 생물막이 형성되면 제거하기 어렵다. 따라서 충치 예방을 위한 연구로서 관련된 생물막 형성을 억제하는 연구가 현재 주를 이루고 있다. 본 발명은 전통 발효 식품에서 분리한 *B. velezensis* K68의 *S. mutans*에 의한 생물막 형성 억제 능력을 확인하기 위한 것이다. *B. velezensis* K68의 1-DNJ 생합성 유전자들은 PCR을 통해 성공적으로 증폭되었고, 1-DNJ 생성은 UPLC-QTOF-MS 분석에 의해 확인되었다. *B. velezensis* K68에 의해 생산된 1-DNJ는 *S. mutans*에서 생물막 형성을 담당하는 GTF 유전자의 발현을 억제하였다. 또한, 물리 화학적 분석 결과, 1-DNJ를 함유한 배양 배지가 *S. mutans*에 의한 생물막 형성을 억제한다는 것을 보여 주었다. 이러한 결과는 *B. velezensis* K68 발효 제품이 발효 식품 제조 및 치과 건강 증진을 위한 치약 첨가제 제조에 사용될 수 있음을 나타낸다.

수탁번호

[0070]

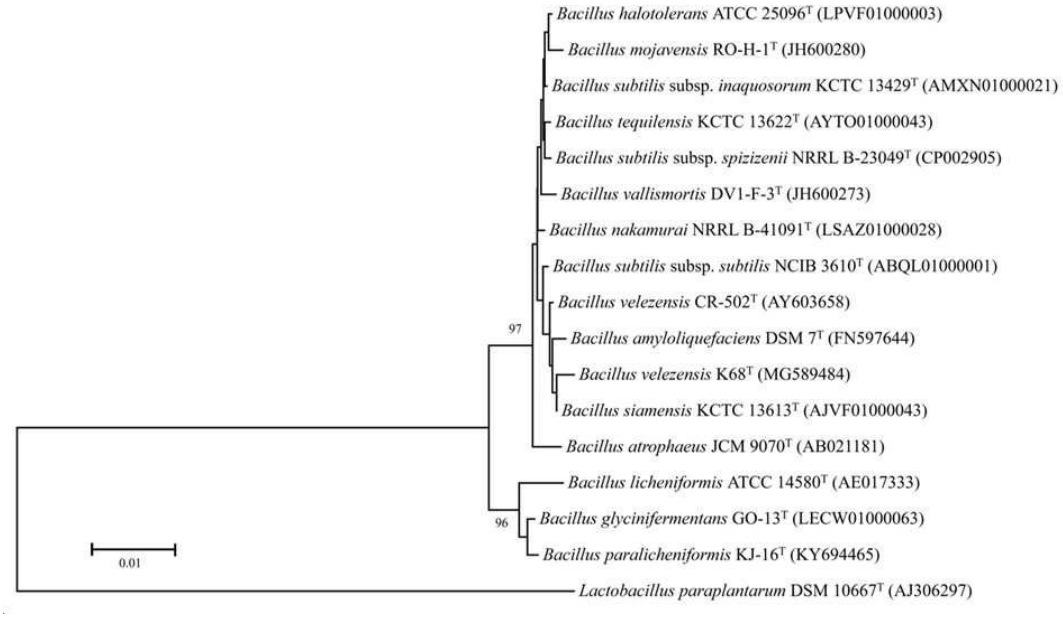
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12460P

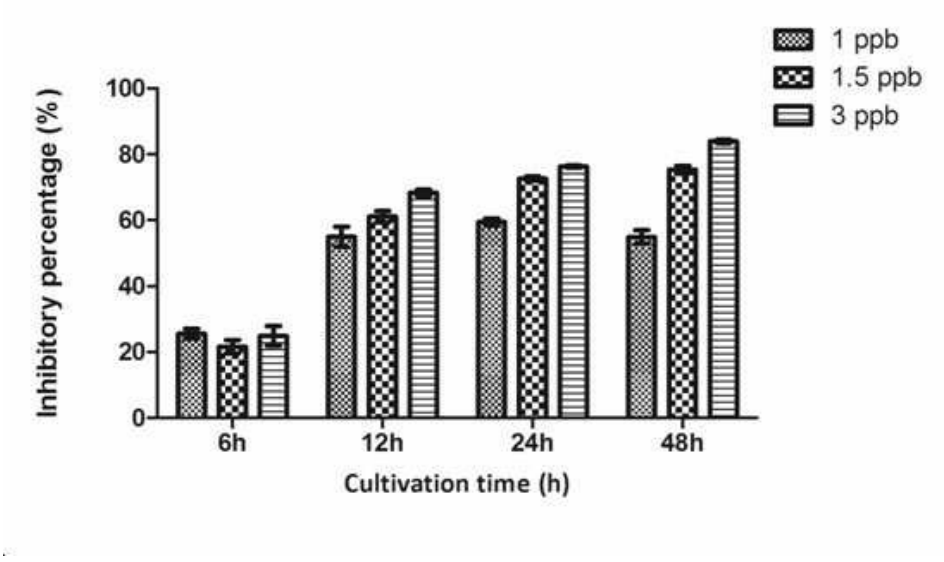
수탁일자 : 20190319

도면

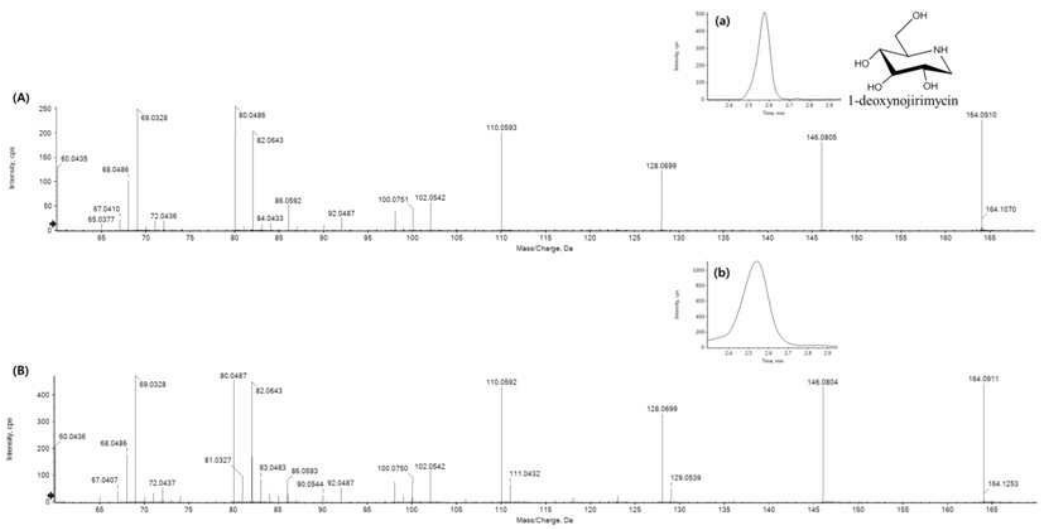
도면1



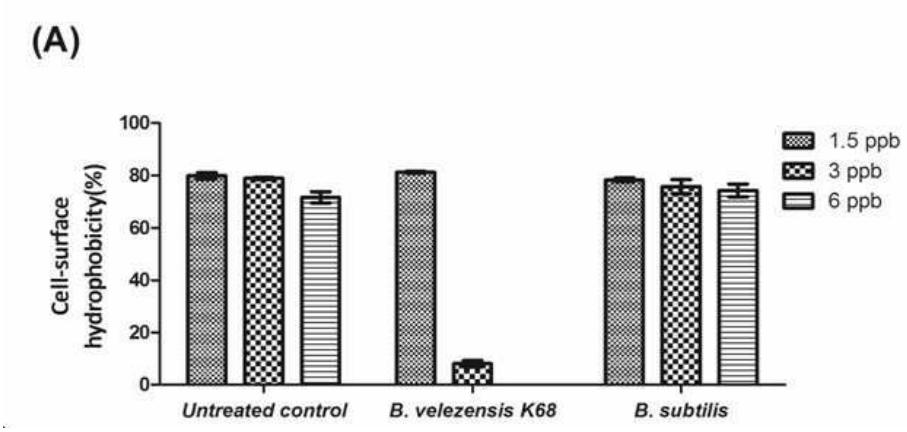
도면2



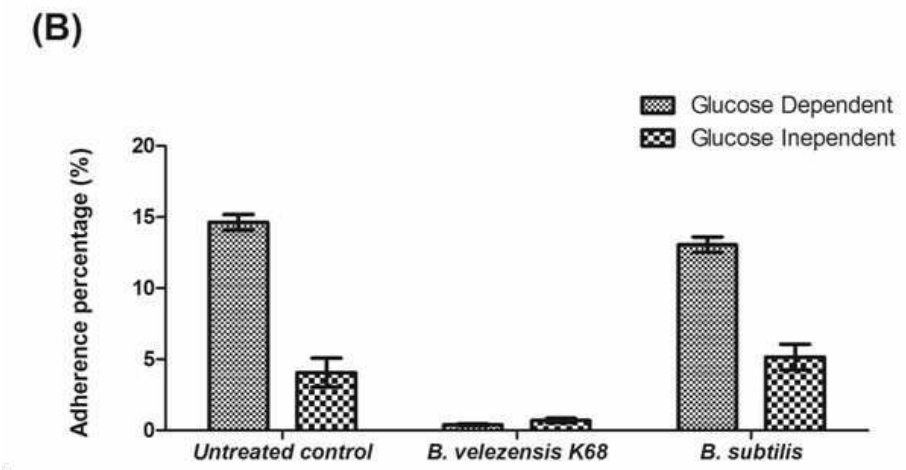
도면3



도면4a



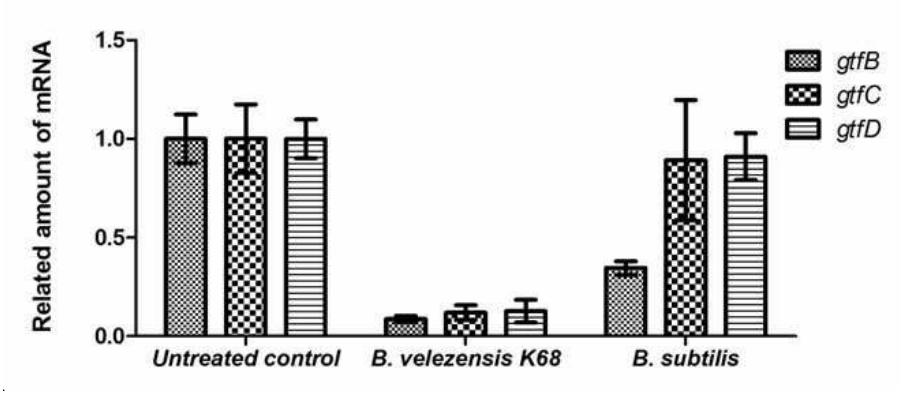
도면4b



도면5


(A)
(B)
(C)

도면6


Related amount of mRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
gtfB
gtfC
gtfD
Untreated control
B. velezensis K68
B. subtilis