(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월23일
(11) 등록번호 10-2058800
(24) 등록일자 2019년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12P 19/26* (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
*C12R 1/07* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12P 19/26* (2013.01)
*C12N 1/20* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0127113
(22) 출원일자 2018년10월24일
심사청구일자 2018년10월24일
(56) 선행기술조사문헌
"전통발효식품 유래 미생물 특성 규명 및 발효공정 개발을 통한 종균의 산업적 활용", 한국식품연구원 (2013.12.)*
*(뒷면에 계속)*
전체 청구항 수 : 총 5 항

(73) 특허권자
**인천대학교 산학협력단**
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
**서명지**
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 1301호
**이현진**
인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 100, 1804동 703호
(74) 대리인
**차준용**

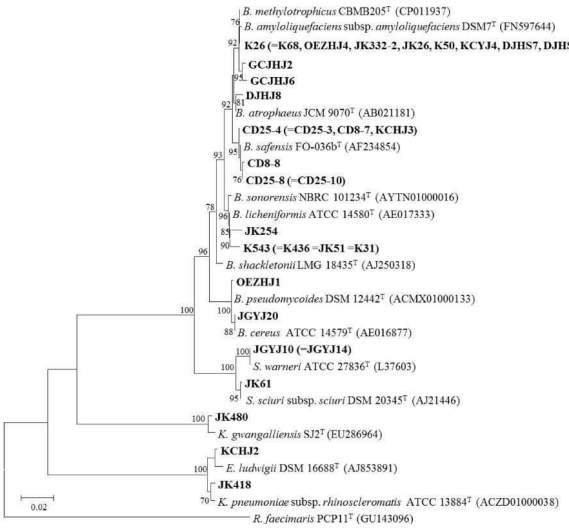
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **바실러스 벨레젠시스를 이용한 1-데옥시노지리마이신 생산 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 균주 *Bacillus velezensis*를 제공하며, 상기 균주의 최적의 배양 조건을 제공하는 것으로, 본 발명에 따른 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 *Bacillus velezensis* K26 균주는 종래에 발견된 바실러스 균주에 비하여 많은 양의 DNJ를 생산하며, *Bacillus velezensis* K26는 수크로스 4.61%, 효모 추출물 7.03%, 배양 온도 34℃의 조건에서 AGI 활성이 가장 높은 것으로 나타난 결과, 최적의 배양 조건을 확인하였다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12R 1/07* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 66, pp. 1212-1217 (2016.)*
The Journal of Microbiology, Vol. 49, pp. 431-440 (2011.)
Nature Biotechnology, Vol. 25, pp. 1007-1014 (2007.)
Korean J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 39, pp. 49-55 (2011.)
Food Chemistry, Vol. 138, pp. 516-523 (2013.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A1A1002980
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자원사업
연구과제명 전통 장류 유래 미생물을 통한 항당뇨 고기능성 식품소재 및 발효식품 개발
기 여 율 8/10
주관기관 인천대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016R1D1A1B03931582
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명 저염 내성 극호염성 고균 유래 카로티노이드 항산화 소재 개발
기 여 율 2/10
주관기관 인천대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31
공지예외적용 : 있음

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

기탁번호 KCCM12329P로 기탁된 *Bacillus velezensis* K26을 탄소원은 수크로스, 질소원은 효모 추출물을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양 온도는 34℃ 조건인 것을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배지에 수크로스는 4.61%의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배지에 효모 추출물은 7.03%의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배지에 수크로스는 4.61%, 효모 추출물은 7.03%의 농도로 첨가되며 배양 온도는 34℃인 조건에서 α-글루코시다아제 억제(α-glucosidase inhibition) 활성은 89.3%인 것을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 방법.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

**청구항 10**

삭제

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 균주 *Bacillus velezensis*를 제공하며, 상기 균주의 최적의 배양 조건을 제공하는 것이다.

### 배 경 기 술

[0003] 당뇨병 환자의 90%를 차지하는 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성 또는 췌장 베타 세포에서의 인슐린 분비 부족으로 인한 인슐린 결핍에 의해 유발되어 고혈당을 유발한다. 이것은 설포닐유레아(Sulfonylurea), 비-설포닐 유레아(non-sulfonylurea), 비구아니드(biguanide), 티아졸리딘디온(thiaxolinedione) 및 α-글루코시다아제 억제제를 포함하는 경구 혈당 강하제에 의해 조절될 수 있다. 후자는 소장에서 탄수화물을 포도당으로 가수 분해하여 탄수화물 분해 속도를 줄여 식후 저혈당으로 이어진다. 따라서, 아카보즈(acarbose), 미그리톨(Miglitol), 보글리보스(voglibose)와 같은 α-글루코시다아제 억제제가 경구용 당뇨병 치료제로 개발되었다. 그러나, 이들은 복부 팽만화 및 구토와 같은 부작용을 가지며, 따라서 최근에 새로운 α-글루코시다아제 억제제를 개발하기 위한 많은 노력이 있었다.

[0004] 공지된 α-글루코시다아제 억제제 중 하나인 1-데옥시노지리마이신(1-Deoxynojirimycin; 1-DNJ)은 포도당 구조 내의 산소가 질소로 치환된 폴리하이드록실 알칼로이드이다. 1-DNJ는 항당뇨 효과가 있으며 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus) 감염과 임질(gonorrhea) 치료에도 사용된다.

[0005] 1-DNJ는 뽕으로부터 화학적으로 합성되거나 추출될 수 있다. 그러나 이러한 방법은 생산 수율이 낮고 일관성이 없기 때문에 비용 측면에서 효과적이지 못하다. 바실러스(*Bacillus*)와 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)와 같은 미생물은 GabT1, Yktc1 및 GutB1 유전자에 의한 아미노화(amination), 탈인산화(dephos-phorylation)및 산화(oxidation)를 통해 포도당에서 1-DNJ를 생합성하기 위한 공장으로 제안되었다.

[0006] 또한, 1-DNJ는 중국 전통 발효 비지(okara)로부터 유래된 *Bacillus subtilis* 균주 DSM704, B2 및 토양으로부터 유래된 S10 및 토양으로부터 유래된 유래 *B. amyloliquefaciens* 균주 HZ-12 및 한국 발효 식품으로부터 유래된 140N에 의해 생산된다.

[0007] 한 번에 하나의 요인(One-Factor-at-a Time: OFAT) 배양 최적화 방법은 반응 표면 방법론(response surface methodology, RSM)과 함께 미생물에 의한 1-DNJ 생산을 증가시키는 데 사용되어 왔으며, 이는 *Streptomyces lawendulae* 에 의한 1-DNJ 생산이 19%까지 증가한다. 실제로 1-DNJ를 생산하는 *Bacillus subtilis* B2의 α-글루코시다아제 저해(AGI) 활성은 RSM 방법에 의해 증가되었다.

[0008] 본 발명자는 한국 발효 된장에서 α-글루코시다아제를 억제하는 *Bacillus velezensis* K26을 분리 하였다. PCR을 사용하여 1-DNJ 생합성 유전자 군을 분석 확인하였으며, 1-DNJ 생산은 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석에 의해 확인되었다. OFAT와 RSM 방법을 사용하여 *Bacillus velezensis* K26에 의한 1-DNJ 생산을 최적화 하였다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1474301호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 PCR 스크리닝에 기초하여 한국 발효 된장으로부터 분리한 *Bacillus velezensis* K26을 개시하며, 또한 1-DNJ의 생산을 위한 최적의 배양 조건을 제공한다.

## 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, *Bacillus velezensis*를 이용한 최적의 DNJ 생산조건을 탐색하기 위하여 5가지 한국 전통 발효 식품에서 73% 이상의 AGI 활성을 나타내는 미생물을 분리하였다.

[0014] 상기 미생물을 대상으로 DNJ 생합성 유전자 군을 분석한 후, UPLC-ESI-Q-TOF-MS를 이용하여 1-DNJ의 생산을 확인하였고 최적의 배양 조건을 조사하였다.

[0015] DNJ 생합성 유전자 군을 분리하기 위하여 종래의 연구 결과에 기초한 DNJ 생합성 유전자 중의 하나인 *yktc1*의 내부 유전자를 탐침으로 사용하였으며, PCR 스크리닝을 통해 *gabT1*, *yktc1*, 및 *gutB1* 유전자를 각각 분리하고 추 후 이들의 염기서열을 취합하여 하나의 DNJ 생합성 유전자 군의 염기서열을 분석하였다.

[0016] α-글루코시다아제 저해활성을 최적화하기 위하여 *Bacillus velezensis* K26의 배양시 탄소원 및 질소원의 최적화를 수행하였다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, *Bacillus velezensis* K26의 1-데옥시노지리마이신 생산 균주를 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 상기 균주를 2018년 10월 08일자로 한국종균협회에 수탁번호 KCCM12329P으로 기탁하였다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 솔비톨, 프룩토오스, 수크로스 및 글루코스로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 탄소원을 포함하는 배양액에서 배양하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 효모 추출물(yeast extract), 트립톤 및 폴리펩톤으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 질소원을 포함한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서 *Bacillus velezensis* K26의 최적의 배양 조건은 탄소원으로 수크로스, 질소원으로 효모 추출물을 사용하고 배양 온도는 34℃가 최적의 온도이며, 상기 조건에서 배양하는 경우 α-글루코시다아제 억제(α-glucosidase inhibition) 활성은 89.3%인 것을 특징으로 한다.

## 발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 1-데옥시노지리마이신을 생산하는 *Bacillus velezensis* K26 균주는 종래에 발견된 바실러스 균주에 비하여 많은 양의 DNJ를 생산하며, *Bacillus velezensis* K26는 수크로스 4.61%, 효모 추출물 7.03%, 배양 온도 34℃의 조건에서 AGI 활성이 가장 높은 것으로 나타난 결과, 최적의 배양 조건을 확인하였다.

## 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 한국의 발효 식품뿐만 아니라 다른 관련 분류군으로부터 분리된 균주의 16S rRNA 유전자 서열의 이웃결합 계통수(phylogenetic tree)이다.

도 2는 1-DNJ 표준(A, C) 및 *Bacillus velezensis* K26(B, D) 배양 상등액의 UPLC-ESI-Q-TOF-MS을 통한 분석 결과이다.

도 3은 OFAT 접근법을 이용한 탄소(A) 및 질소(B) 공급원에 따른 *Bacillus velezensis* K26의 AGI 활성 분석 결과이다.

도 4는 수크로스 농도($X_1$,%), 효모 추출물 농도($X_2$,%) 및 배양 온도($X_3$,℃)에 대한 예상 AGI 활성(Y,%)의 3차원 반응 표면 도표이다; (A) AGI 활성(Y)에 대한 스쿠로스($X_1$)과 효모 추출물($X_2$)의 영향을 나타내는 반응 표면 플롯, (B) AGI 활성(Y)에 대한 수크로스(X1) 및 배양 온도(X3)의 영향을 나타내는 반응 표면 플롯, (C) 효모 추출물($X_2$) 및 배양 온도($X_3$)가 AGI 활성(Y)에 미치는 영향을 나타내는 반응 표면 플롯.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 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.

[0027] **실시예**

[0028] **1. 균주의 분리 및 동정**

[0029] 균주는 김치, 된장, 고추장, 소금에 절인 새우, 절인 오이를 포함하는 5가지 한국 전통 발효 식품에서 분리되었다. 상기 식품 샘플을 37℃에서 24시간 동안 TSB(tryptic soy broth), 영양 배지(NB)(BD Biosciences,

Franklin Lakes, NJ, USA) 한천 플레이트에 0.85 % NaCl 용액으로 희석시켰다.

[0030] 분리된 균주의 16S rRNA 유전자는 범용 프라이머(27F, 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3 '및 1492R, 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT TC-3')를 사용하여 콜로니 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0031] 상기 단편을 Cosmo Genetech Co.(Seoul, Korea)에 의해 서열 분석하고 서열 정렬 및 동정은 Basic Local Alignment Search Tool 및 Ezbiocloud에 의하여 수행되었다. 계통수(phylogenetic tree)는 MEGA6 소프트웨어를 사용하여 구축되었다.

[0033] **2. AGI 활성 측정**

[0034] AGI 활성을 측정하기 위해, 분리된 균주를 1% 포도당, 1% 효모 추출물, 0.05% $KH_2PO_4$ 및 0.05%$(NH_4)_2SO_4$로 구성된 YG 브로스에서 180rpm으로 교반해 주면서 37℃에서 배양 하였다. 5일 후, 배양물을 100℃에서 10분간 가열한 후, 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액 중의 AGI 활성은 α-글루코시다아제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 p-니트로페닐 α-글루코피라노사이드(pNPG; 시그마-알드리치) 사이의 반응에 기초하여 결정되었다. 96 웰 플레이트에 상등액 147㎕를 분주하고, 0.1M 인산 완충액(pH 7.2) 30㎕, pNPG(10mM) 30㎕ 및 α-글루코시다아제(100 U/ml)를 첨가하였다. 혼합물의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기(Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 405nm에서 측정 하였다.

[0036] **3. 1-DNJ 생합성 유전자 군 분석**

[0037] 1-DNJ 생합성 유전자 클러스터를 확인하기 위해 HiYield Genomic DNA Mini 키트(RBC Bioscience Corp., New Taipei City, Taiwan)를 사용하여 추출한 게놈 DNA를 GabT1(MJS-23, 5'-ATG GGA ACG AAG GAA ATC ACG AAT CCA-3' 및 MJS-24, 5'-TCA CTT GAT TTC CTC CAA TAG CTT GCG-3'); Yktc1(MJS-19, 5'-GTG AGA GAC TAT ATC ATY GRG CTT GGA-3' 및 MJS- 20, 5'-TTA GGA GTC CAG ACC AAC GCC TTC ATA-3'); 및 GutB1(MJS-21, 5'-ATG AAG GCG TTG GTC TGG ACT CCT AAT-3' 및 MJS-22, 5'-TTA TAA AAG TTY CGG ATC AGA CAC RAG-3')의 ORF 전체를 PCR 증폭하기 위해 사용하였다. PCR은 94℃에서 5분 동안 가열한 후, 94℃에서 30초, 56℃에서 1분 및 72℃에서 1분을 35회 반복하고, 최종적으로 72℃에서 10분간 수행하였다.

[0039] **4. UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석**

[0040] 1-DNJ 생산은 Agilent 1290 Infinity UPLC 시스템 및 Agilent 6520 Q-TOF 질량 분광 광도계(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 UPLC-ESI-Q-TOF-MS로 측정했다. 배양물을 10,000rpm에서 10분간 원심 분리하고, 상등액을 메탄올(1:1, v/v)로 추출하고 0.22㎛ 폴리비닐리덴 디플루오라이드 필터를 통과시켰다. 크로마토그래피 분리는 HILIC 컬럼(ZORBAX HILIC Plus, 2.1 X 100mm, 3.5㎛, Agilent Technologies)을 사용하여 수행하였다. 유속은 0.3ml/min이고 주입 부피는 1μl 이고, 이동상은 용매 A(물 중 5mM 암모늄 아세테이트)와 용매 B(아세토니트릴 중 0.1% 포름산)로 구성되었다. 하기 용출 구배를 사용 하였다: 0분에서 90% B, 0.1분에서 90% B, 9.9분에서 60% B, 1분에서 100% B, 2분에서 100% B, 1분에서 90% B 및 6분에 90% B. 용출액은 325℃의 온도와 8 /min의 가스 유속에서 $N_2$ 가스로 검출되었다. 단편 전압은 70V이고, 모세관 전압은 4000V였다. 상업용 1-DNJ(Sigma-Aldrich)를 표준 물질로 사용 하였다.

[0042] **5. OFAT 기반 탄소 및 질소 공급원 최적화**

[0043] 탄소 및 질소 공급원은 OFAT 방식으로 선택되었다. 탄소 및 질소 공급원을 이용한 1-DNJ 생산 증진을 위해 1% 탄소원(포도당, 갈락토오스, 수크로스, 말토오스, 과당, 옥수수 전분, 감자 전분, 가용성 전분, 솔비톨, 락토오스 및 자일 로스)과 1% 질소원(효모 추출물, 맥아 추출물, 카사미노산, 대두분, 콩, 트립톤, 폴리펩톤, 쇠고기 추출물, 옥수수 침지액)을 포도당 및 효모 추출물 대신에 YG 배지 80ml가 들어있는 200ml 삼각 플라스크에 첨가하였으며, AGI 활성을 측정하여 확인하였다.

[0045] **6. RSM**

[0046] *B. velezensis* K26에 의한 1-DNJ 생산에 대한 다양한 변수의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자는 3가지 변수(수크로즈(1%, 3%, 5%), 효모 추출물(3%, 6%, 9%), 그리고 배양 온도(30℃, 35℃, 40℃)를 갖는 중앙 복합 디자인 모델을 사용하여 RSM 최적화를 수행했다. 배양 최적화를 위한 파라미터는 OFAT 최적화를 기반으로 선택되었다. 이들은 중요한 변수이며 $X_1$, $X_2$ 및 $X_3$으로 지정되었다(표 1). SAS 소프트웨어(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 분산 분석(ANOVA)에 의해 데이터를 평가 하였다. 각 실험은 통계 분석을 위해 3배수로 수행되었다.

[0048] [표 1]

| No. | Coded variable levels and range | | | $Y_i$ AGI activity[a] (%) |
|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ (sucrose conc., %) | $X_2$ (yeast extract conc., %) | $X_3$ (culture temperature, °C) | |
| 1 | 0 (5) | 1 (9) | 1 (40) | 76.9% |
| 2 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 88.0% |
| 3 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 87.2% |
| 4 | -1 (1) | -1 (3) | -1 (30) | 76.8% |
| 5 | -1 (1) | 1 (9) | 1 (40) | 41.8% |
| 6 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 81.8% |
| 7 | 0 (3) | 0 (6) | 1 (40) | 80.9% |
| 8 | 0 (3) | -1 (3) | 0 (35) | 75.0% |
| 9 | -1 (1) | -1 (3) | 1 (40) | 58.2% |
| 10 | 1 (5) | 1 (9) | -1 (30) | 88.6% |
| 11 | -1 (1) | 0 (6) | 0 (35) | 77.9% |
| 12 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 90.1% |
| 13 | 1 (5) | -1 (3) | -1 (30) | 70.2% |
| 14 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 89.8% |
| 15 | 1 (5) | -1 (3) | 1 (40) | 82.0% |
| 16 | 0 (3) | 0 (6) | 0 (35) | 88.8% |
| 17 | -1 (1) | 1 (9) | -1 (30) | 70.3% |
| 18 | 0 (3) | 0 (6) | -1 (30) | 86.7% |
| 19 | 1 (5) | 0 (6) | 0 (35) | 89.0% |
| 20 | 0 (3) | 1 (9) | 0 (35) | 88.4% |

[0049]

[0051] **실험결과**

[0052] **1. 1-DNJ 생산균의 분리 및 동정**

[0053] 전통적인 한국의 발효 식품을 TSB, NB 한천 접시에 도말하고 다른 모양의 372 개의 콜로니를 선택하여 YG 배지에 5일간 접종하여 AGI 활성을 스크리닝 하였다. 372개의 균주 중 35개가 73% 이상의 AGI 활성을 보였다(데이터는 표시되지 않음). 이들은 16S rRNA 유전자 서열에 기초하여 *Bacillus*(n = 29), *Staphylococcus*(n = 3), *Enterobacter*(n = 1), *Kocuria*(n = 1) 및 *Klebsiella*(n = 1)(도 1). 그 중에서 본 발명자는 발효 식품에 직접 적용할 수 있는 *B. subtilis*와 *B. velezensis*를 포함한 *Bacillus* 속에 초점을 두었다.

[0054] 또한, *B. subtilis* 및 *B. amyloliquefaciens*를 포함한 *Bacillus* 종은 α-글루코시다아제 억제제 중 하나인 1-DNJ를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이후 1-DNJ 생합성 유전자 군집 보유 균주를 스크리닝하기 위해 1-DNJ 생합성에 필수적인 *gabT1*, *yktc1* 및 *gutB1* 유전자를 PCR 증폭하여 7종의 균주를 선별 하였다. 추정 아미노산 서열에 기초하여, *gabT1*, *yktC1* 및 *gutB1*은 각각 오르니틴 아미노전이효소(ornithine aminotransferase), 이노시톨-1-모노 포스파타제(inositol-1-monophosphatase) 및 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)로 동정되었다.

[0055] 6개의 균주(K26, K50, K68, JGYJ1, OEZHJ4 및 JK332)는 *B. amyloliquefaciens* FZB42에 대해 96% ~ 100%의 상동성을 보인 반면, 하나의 균주(DJHJ8)는 *B. atrophaeus* 1942와 98%의 상동성을 나타내었다(표 2), 그 중 *B. velezensis* K26은 1-DNJ 생합성에 필요한 3가지 유전자를 보유하고, 동일한 배양 조건에서 기보고된 1-DNJ 생산자인 *B. amyloliquefaciens* 140N 보다 AGI 활성이 높게 나타났다(86.7 %).

[0057] [표 2]

| Strains (Proteins) | | *B. amyloliquefaciens* FZB42[a] (% identity/similarity) | *B. atrophaeus* 1942[b] (% identity/similarity) | AGI activity[c] (%) |
|---|---|---|---|---|
| DJHJ8 | GabT1 | 92.1/96.6 | 98.8/99.5 | 73.8 |
| | Yktc1 | 88.6/94.3 | 98.7/99.3 | |
| | GutB1 | 85.9/94.2 | 98.8/99.4 | |
| K26 | GabT1 | 99.2/99.7 | 92.4/96.9 | 86.7 |
| | Yktc1 | 98.7/99.0 | 87.9/93.9 | |
| | GutB1 | 99.1/99.7 | 85.6/94.2 | |
| K68 | GabT1 | 99.5/99.7 | 92.8/96.9 | 75.5 |
| | Yktc1 | 99.3/99.6 | 88.6/94.6 | |
| | GutB1 | 99.1/99.7 | 85.6/94.2 | |
| JGYJ1 | GabT1 | 99.0/99.7 | 92.1/96.9 | 79.0 |
| | Yktc1 | 99.0/99.3 | 88.2/94.3 | |
| | GutB1 | 100/100 | 86.2/94.5 | |
| OEZHJ4 | GabT1 | 99.2/100 | 92.4/97.1 | 73.7 |
| | Yktc1 | 96.8/98.4 | 87.3/93.3 | |
| | GutB1 | 99.4/100 | 85.6/94.5 | |
| JK332 | GabT1 | 99.2/100 | 92.4/97.1 | 79.0 |
| | Yktc1 | 98.7/99.0 | 87.9/93.9 | |
| | GutB1 | 99.7/100 | 85.9/94.5 | |
| K50 | GabT1 | 99.0/99.5 | 92.1/96.6 | 75.3 |
| | Yktc1 | 99.0/99.6 | 88.9/94.6 | |
| | GutB1 | 99.4/99.7 | 85.9/94.2 | |

[0058]

[0060] *B. velezensis* K26에 의한 1-DNJ 생산은 UPLC-ESI-Q-TOF-MS에 의해 양이온 모드로 분석되었다. 질량 스펙트럼은 1-DNJ($C_6H_{13}NO_4$, M.W. 163.08)에 사용된 표준에 상응하는 5.9분의 체류 시간에서 164.09의 $[M+H]^+$에 대한 피크를 보였다. 이것은 1-DNJ가 K26 균주에 의해 생성되었음을 확인시켜 주었다(도 2).

[0062] **2. OFAT 접근법에 의한 1-DNJ 생산 *B. velezensis* K26의 배양 최적화**

[0063] 배양 조건은 OFAT 방법으로 *B. velezensis* K26에 의한 1-DNJ 생산을 증가 시키도록 최적화되었다; 11 탄소 및 9 질소원은 1-DNJ 수준을 측정하여 결정된 AGI 활성을 자극하는 능력에 대해 평가되었다.

[0064] 1-DNJ 생산은 HPLC, HILIC-MS/MS 및 다른 방법으로도 확인될 수 있지만, 이들은 더 복잡하고 시간 소모적이기 때문에, 본 발명자는 신속하고 쉽게 확인할 수 있는 AGI 활성을 사용하였다.

[0066] 가장 높은 AGI 활성을 나타내는 탄소원은 수크로스(78.25 %)이고, 그 다음은 글루코스(71.4 %), 솔비톨(65.07 %)이다. 따라서 수크로스(sucrose)는 기본 배지의 구성 성분인 포도당보다 높은 AGI 활성과 관련이 있기 때문에 최적의 탄소원으로 결정되었다(도 3A). 기본 배지의 질소원인 효모 추출물(Yeast extract)은 가장 높은 AGI 활성을 유발하였으며, 그 다음은 폴리펩톤(58.5 %)이며, 나머지 7개의 질소원은 AGI 활성이 50% 미만이었다(도 3B)

[0067] 다른 바실러스 균주에 대한 최적의 탄소 및 질소 공급원은 *B. subtilis* DSM 704에 대한 솔비톨; *B. subtilis* S10에 대한 갈락토오스 및 폴리펩톤; *B. amyloliquefaciens* 140N에 대한 가용성 전분(soluble starch) 및 트립톤을 포함한다.

[0068] 본 발명에서 OFAT 방법(각각 수크로스와 효모 추출물)에 의해 확인된 최적의 탄소 및 질소 공급원을 RSM의 독립 변수로 설정했다.

[0070] **3. RSM에 의한 배양 최적화**

[0071] RSM은 *B. velezensis* K26에 의한 1-DNJ 생산을 최대화하기 위해 수행되었다.

[0072] 1-DNJ 생산에 영향을 미치는 요소는 수크로스($X_1$), 효모 추출물($X_2$) 및 배양 온도($X_3$)로 OFAT 방법에 의해 선택된 독립 변수이다. 1-DNJ 생산과의 관계는 다음과 같이 [수학식 1]로 표현된다.

[0074] [수학식 1]

[0075] $$Y = 153.58 - 13.14X_1 + 17.00X_2 + 12.7X_3 - 1.32\ X_1^2 - 0.78\ X_2^2 + 0.19\ X_3^2 + 0.75X_1X_2 + 0.59X_1X_3 - 0.27X_2X_3$$

[0077] [수학식 1]의 통계적 유의성은 ANOVA에 의해 평가되었다(표 3).

[0078] [표 3]

| Factors | Sum of squares | DF | Mean square | *F* value | Prob > *F* |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 2,631.907 | 9 | 292.434 | 14.26 | 0.0001 |
| $X_1$ | 1,187.021 | 4 | 296.755 | 14.47 | 0.0004 |
| $X_2$ | 441.375 | 4 | 110.343 | 5.38 | 0.0142 |
| $X_3$ | 764.090 | 4 | 191.022 | 9.32 | 0.0021 |
| Lack of fit | 158.536 | 5 | 31.707 | 3.41 | 0.102 |
| Pure error | 46.488 | 5 | 9.297 | | |
| Correlation total | 205.025 | 10 | 20.502 | | |

[0079]

[0080] 측정 계수($R^2$)는 0.927로 실험값과 예측값 사이의 높은 상관 관계를 나타내었다. 5.7%의 변동 계수(coefficient of variation)는 변수들 사이의 높은 상호 작용과 독립성을 나타낸다.

[0081] 34℃의 고정 배양 온도에서 AGI 활성은 수크로스(탄소)와 효모 추출물(질소) 농도에 따라 증가했다(도 4A). 수크로스 농도와 배양 온도 및 효모 추출물 농도와 배양 온도 사이의 상호 작용은 AGI 활성에 영향을 주었으며, 이는 세 변수 모두의 함수로 증가 하였다(도 4B, C).

[0082] 최대 AGI 활성은 RSM에 의해 수크로스와 효모 추출물의 농도가 각각 4.61%, 7.03% 일 때, 34℃의 온도에서 91.9%으로 예측되었다.

[0084] *B. velezensis* K26을 RSM에 의해 결정된 최적의 배양 조건 하에서 *B. velezensis* K26의 AGI 활성을 평가하였다. 실험적으로 측정된 AGI 활성은 89.3%로 RSM에서 예측한 91.9%에 가까웠으며 실험 설계 방법의 신뢰성을 확인했다.

[0086] **결과 검토**

[0087] *B. velezensis* K26은 한국 전통 발효 된장에서 분리되었으며, 1-DNJ 생합성과 관련된 유전자 군은 다른 균주와 98% ~ 99%의 상동성을 나타내었다.

[0088] 1-DNJ 생산은 *B. velezensis* K26의 AGI 활성을 통해 UPLC-ESI-QTOF-MS 분석에 의해 확인되었다. 본 발명자는 OFAT 및 RSM 접근법을 사용하여 1-DNJ 생산을 최대화하기 위해 배양 조건을 최적화했다. 수크로스와 효모 추출물(yeast extract)은 각각 최적의 탄소와 질소 공급원으로 확인되었다.

[0089] 수크로스 4.61%, 효모 추출물 7.03%, 배양 온도 34℃의 조건에서 AGI 활성의 실험값은 89.3%로 예측치 91.9%에 가까웠다. 이러한 결과는 RSM이 1-DNJ 수율을 증가시킬 최적의 *B. velezensis* K26 배양 조건을 결정하는데 사용될 수 있음을 입증하였다.

## 수탁번호

[0091]

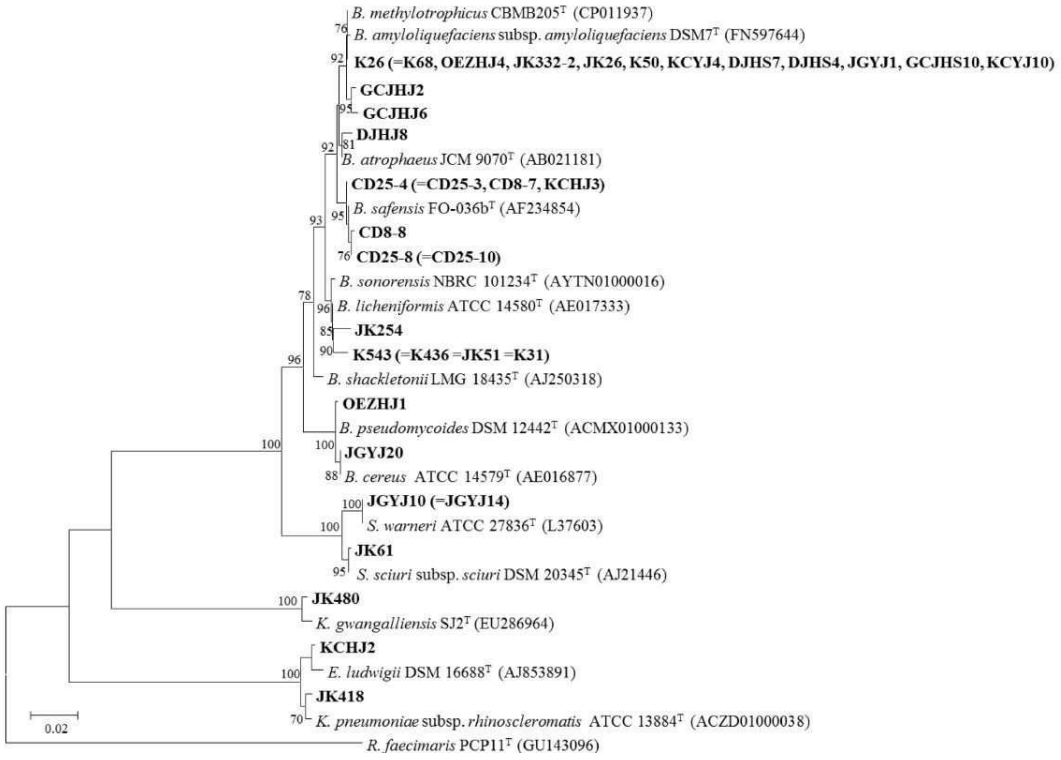
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12329P

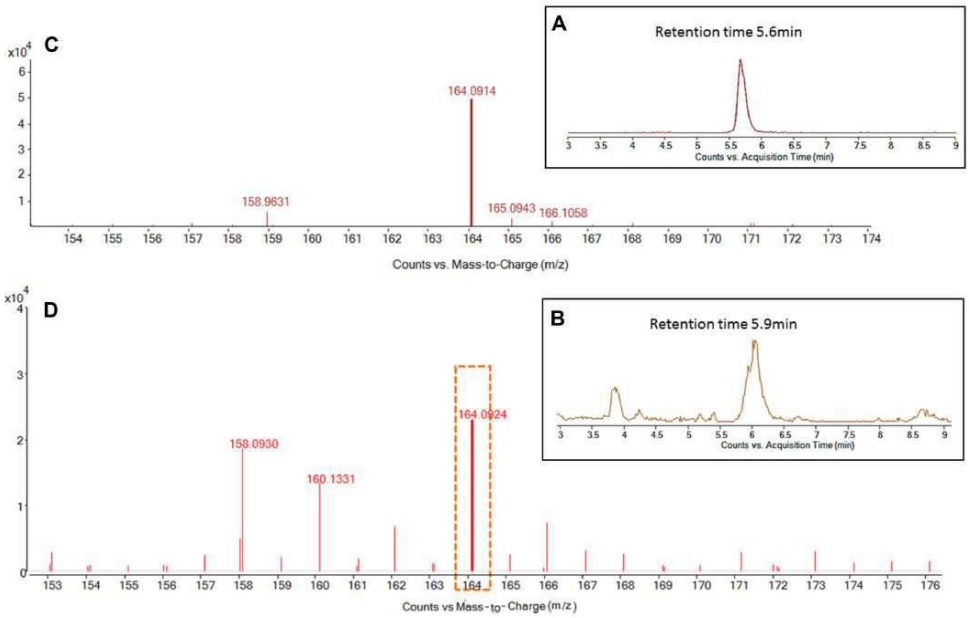
수탁일자 : 20181008

## 도면

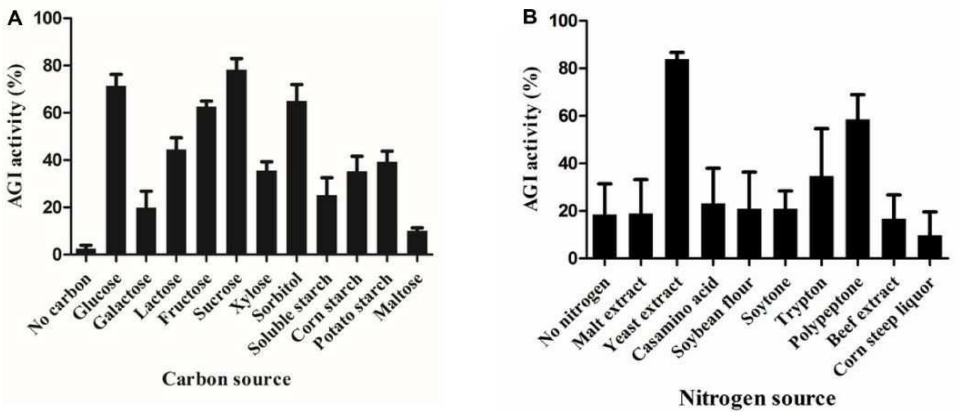
### 도면1


B. methylotrophicus CBMB205T (CP011937)
B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens DSM7T (FN597644)
K26 (=K68, OEZHJ4, JK332-2, JK26, K50, KCYJ4, DJHS7, DJHS4, JGYJ1, GCJHS10, KCYJ10)
GCJHJ2
GCJHJ6
DJHJ8
B. atrophaeus JCM 9070T (AB021181)
CD25-4 (=CD25-3, CD8-7, KCHJ3)
B. safensis FO-036bT (AF234854)
CD8-8
CD25-8 (=CD25-10)
B. sonorensis NBRC 101234T (AYTN01000016)
B. licheniformis ATCC 14580T (AE017333)
JK254
K543 (=K436 =JK51 =K31)
B. shackletonii LMG 18435T (AJ250318)
OEZHJ1
B. pseudomycoides DSM 12442T (ACMX01000133)
JGYJ20
B. cereus ATCC 14579T (AE016877)
JGYJ10 (=JGYJ14)
S. warneri ATCC 27836T (L37603)
JK61
S. sciuri subsp. sciuri DSM 20345T (AJ21446)
JK480
K. gwangalliensis SJ2T (EU286964)
KCHJ2
E. ludwigii DSM 16688T (AJ853891)
JK418
K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884T (ACZD01000038)
R. faecimaris PCP11T (GU143096)
0.02

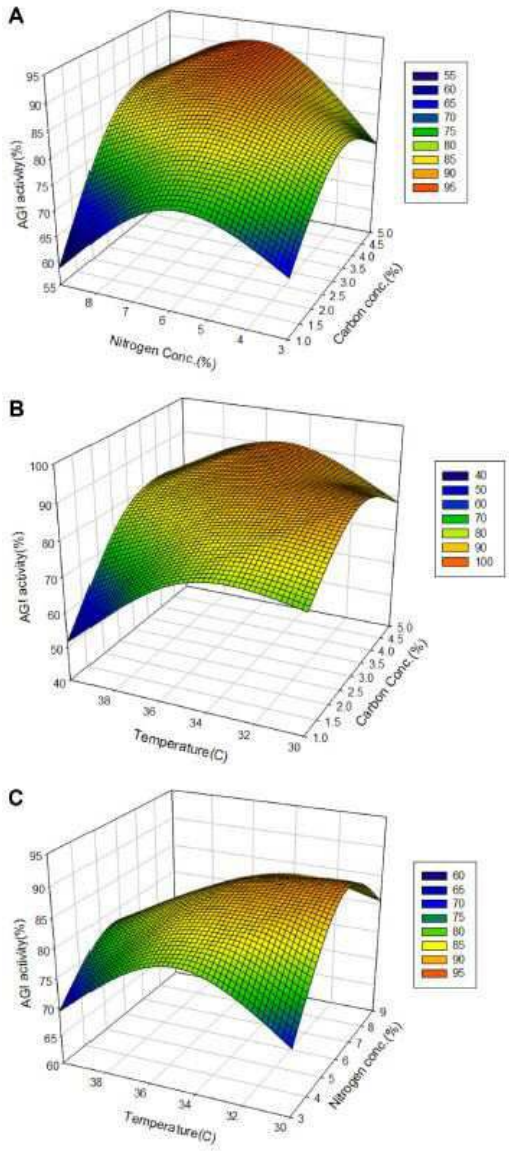
### 도면2


A
Retention time 5.6min
Counts vs. Acquisition Time (min)
C
x10^4
164.0914
158.9631
165.0943
166.1058
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)
B
Retention time 5.9min
Counts vs. Acquisition Time (min)
D
x10^4
164.0924
158.0930
160.1331
Counts vs Mass-to-Charge (m/z)

도면3


A
AGI activity (%)
100
80
60
40
20
0
No carbon
Glucose
Galactose
Lactose
Fructose
Sucrose
Xylose
Sorbitol
Soluble starch
Corn starch
Potato starch
Maltose
Carbon source
B
AGI activity (%)
100
80
60
40
20
0
No nitrogen
Malt extract
Yeast extract
Casamino acid
Soybean flour
Soytone
Trypton
Polypeptone
Beef extract
Corn steep liquor
Nitrogen source

도면4


A
AGI activity(%)
Nitrogen Conc.(%)
Carbon conc.(%)
B
AGI activity(%)
Temperature(C)
Carbon Conc.(%)
C
AGI activity(%)
Temperature(C)
Nitrogen conc.(%)