

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0030105
(43) 공개일자 2024년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A01N 43/16* (2006.01)
C05F 11/00 (2006.01) *C08L 5/04* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)
A01N 43/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0108712

(22) 출원일자 2022년08월29일

심사청구일자 2022년08월29일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

김정완

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 2801호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 23-1BL)

김지민

인천광역시 부평구 원적로269번길 15, 103동 204호(산곡동, 현대아파트)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

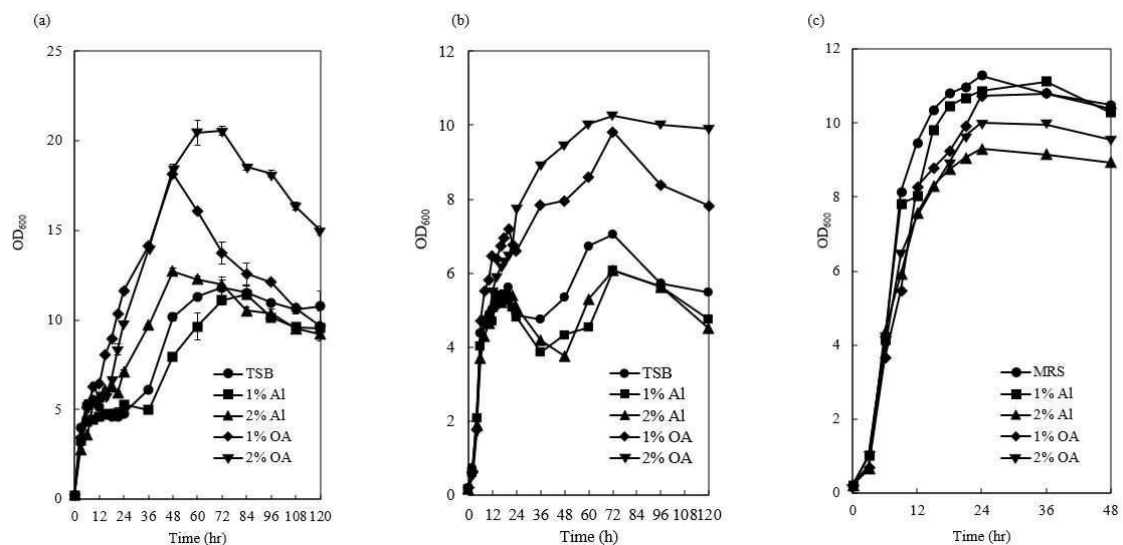
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 알지네이트를 분해하여 얻은 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물에 관한 기술로, 구체적으로는 솔루션 플라즈마 공정을 이용하여 해중합된 올리고알지네이트가 항산화활성이 뛰어나고, 특정 바실러스 균주의 성장을 촉진하는 효과가 있어, 다양한 산업분야에서 이용 가능하다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C05F 11/00 (2013.01)

C08L 5/04 (2013.01)

C12N 1/38 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167345
과제번호	2020R1A2C110169011
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	유체 플라즈마 공정을 이용한 생체적합성 기능성 식품산업 소재 개발 및 작용 기작
등 특성 규명	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1.5 내지 2.5 μ s 및 주파수 30kHz 내지 40kHz로 700 내지 850V에서 수행되는 것인 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 10분 내지 120분 수행되는 것인 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바실러스 균주는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포르미스 (*Bacillus licheniformis*), 바실러스 아밀로리퀘팩시엔스 (*Bacillus Amyloliquefacience*), 바실러스 벨렌젠시스 (*Bacillus Velenzensis*) 및 바실러스 메가테리움 (*Bacillus Megaterium*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 올리고알지네이트의 점도는 점도 1.0 내지 5.0 cps인 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 바실러스 균주의 포자 형성을 촉진시키는, 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 바실러스 균주 생장 촉진 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 퇴비 부속제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 곰팡이 살균제.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 비료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알지네이트를 분해하여 얻은 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물에 관한 기술이다.

배경 기술

[0003] 알지네이트는 갈조류의 세포벽에서 분리된 천연 음이온성 다당류이다. 선형 비반복 공중합체 계열에 속하는 산성 다당류이며 각 당 고리에 카르복실기를 포함하는 유일한 천연 해양 바이오 다당류이다. 1,4-β-d-만누론산(mannuronic acid, M)과 이의 C-5 에피머인 α-l-글루론산(guluronic acid, G)가 GG, MM 또는 MG로 반복되어 배열되어 있는 형태이다. 알지네이트는 가장 풍부한 해양 바이오매스이다. 또한 생체 적합성, 낮은 독성, 비교적 저렴한 비용 및 Ca^{2+} 와 같은 2가 양이온이 있는 엄격하지 않은 조건에서 젤을 형성할 수 있는 능력으로 인해, 식품 및 생물 의학 산업상 적용에서 널리 사용되어 계속 연구되고 있다.

[0004] 알지네이트는 효소 분해, 산 가수분해 및 산화 분해, 열처리, 초음파, 자외선 및 γ선 조사를 포함한 다양한 분해 방법에 의해 해중합될 수 있다. 올리고알지네이트의 기능은 항종양 활성, 산화 방지, 면역 반응 조절, 염증 감소, 신경 보호 활성, 항균 활성 및 지질 수치 감소, 고혈압 감소, 혈당 수치 감소로 알려져 있다.

[0005] SPP(Solution Plasma Process)는 Takai(2008)가 제안한 액체 플라즈마로 나노물질 합성, 표면 개질, 수처리, 유기화합물의 살균 및 해중합에 사용되는 친환경 공정이다. Takai(2008)는 유체에서 생성된 플라즈마가 기체층으로 둘러싸여 있으며 중심에 위치한 플라즈마에 의해 형성된 전자, 라디칼 및 이온이 기체층을 통해 액체상으로 이동하여 유체 내의 분자와 반응한다고 밝혔다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 유해한 화학물질이나 고가의 효소를 사용하지 않고서도 알지네이트를 분해하여 산업상 이용가능한 형태의 올리고알지네이트를 합성하고, 이의 미생물에서의 효능을 평가하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 퇴비 부속제, 곰팡이 살균제 및 비료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속 하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0013] 본 발명의은 박테리아 배양에서 항산화 활성 및 성장 촉진을 위하여 솔루션 플라즈마 공정(Solution Plasma Process, 'SPP') 기술을 사용하여 해중합된 알지네이트 형태인 올리고알지네이트(Oligo-alginate, 'OA')을 이용하는 것이다. 용액 중의 알지네이트는 다양한 시간(15-90분) 동안 35kHz로 800V에서 플라즈마를 방전하여 해중합되었다. 올리고알지네이트로의 해중합은 DNS, FT-IR, GPC 및 DLS 분석에 의해 입증되었으며 점도 감소를 유발했다. GPC 분석 결과, 플라즈마 처리에서 알지네이트의 분자량이 100-200 kDa에서 6.90 kDa로 감소한 것으로 나타났다. DLS 분석 및 제타 전위 연구는 알지네이트 나노 응집체의 형성을 확인했다. 90분 동안 플라즈마를 방전하여 제조한 올리고알지네이트(OA)의 항산화 활성은 DPPH 라디칼, 하이드록실 라디칼, 슈퍼옥사이드 라디칼 및 과산화수소 소거 활성에 대해 각각 95.9%, 65.1%, 30.1% 및 12.75%로 향상되었다. 60분 동안 플라즈마를 방출하여 준비한 OA는 *Bacillus licheniformis* DSM 13의 성장과 그 포자 형성을 상당한 수준으로 촉진했다. 전사체 분석 결과 4,350개 유전자 중 904개 유전자가 OA에 의해 2배 이상 발현되는 것으로 나타났다. 가장 영향을 받은 유전자는 대사과정(270개) 유전자였으며, 비오틴 합성 관련 유전자는 139.5배 더 높게 발현되었다. 한편, 자가용해소의 하나인 N-아세틸무라모일-L-알라닌 아미다제의 발현은 19.5배 감소하였다. 대부분의 포자형성 유전자(55/58)는 2배 이상으로 발현되어 OA에 의한 포자형성 자극을 뒷받침한다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 바실러스 균주 성장 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 명세서에 있어 '솔루션 플라즈마(Solution Plasma Process, 'SPP') 공정 방법'이란 '용액 플라즈마 공정'과 동일한 의미로 사용되며, 수중에서 플라즈마 방전에 의해 생성된 다양한 이온과 라디칼로 짧은 반응 시간에 매우 효율적으로 용액 내 분자의 화학적 변화를 촉진한다. 본 방법은 화학 물질의 개입 없이 생체 적합성 화합물의 합성 및 분해를 위한 손쉬운 원판 공정으로 생물학적 안전성을 보장한다.
- [0016] 본 명세서에 있어서 '해중합'은 다당류 형태인 알지네이트를 올리고알지네이트로 생성하기 위한 과정을 의미한다.
- [0017] 본 발명에서 이용하는 상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1.5 내지 2.5 μ s 및 주파수 30kHz 내지 40kHz로 700 내지 850V에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 펄스 폭 1.8 내지 2.3 μ s 및 주파수 32kHz 내지 38kHz로 750 내지 830V에서 수행될 수 있으며, 본발명의 일실시예에서는 펄스 폭 2 μ s 및 주파수 35kHz로 800V에서 수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트의 해중합이 효율적으로 일어나지 않을 수 있다. 또한, 상기 솔루션 플라즈마 공정은 10분 내지 120분 수행될 수 있으며, 바람직하게는 15분 내지 100분 수행될 수 있고, 가장 바람직하게는 60분동안 수행된 것일 수 있다.
- [0018] 단극성 전원장치를 사용했을 때에는 양극성 전원장치를 사용할 때와는 달리 반응이 빠르게 진행되어 본 발명에서는 단극성 전원장치로 60 분간 혹은 그 이상 처리했을 때 알지네이트 분자량이 10 kDa 이하로 감소되는 반면 양극성 전원장치로 60분간 처리했을 때는 분자량이 200 kDa 정도로 감소될 수 있음을 확인하였다. 즉, 단극성 전원장치를 이용하는 경우가 더욱 우수하게 해중합 될 수 있음을 확인하여, 본 발명에서는 단극성 전원장치를 이용하였다.
- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 올리고알지네이트는 점도 1.0 내지 5.0 cps 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본원발명의 실시예2에서는 고분자의 알지네이트를 해중합하여 생산한 올리고알지네이트의 점도가 상기 범위인 것을 확인하여, 용이하게 이용가능한 점도임을 확인하였다.

- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 바실러스 속에 속하는 균주를 의미하나, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포르미스 (*Bacillus licheniformis*), 바실러스 아밀로리퀘팩시언스(*Bacillus Amyloliquefacience*), 바실러스 벨렌젠시스(*Bacillus Velenzensis*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus Megaterium*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포르미스 (*Bacillus licheniformis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 바실러스 속에 속하는 균주라면 이용가능하다.
- [0021] 본 발명의 일 실시양태에 있어서, 상기 조성물은 바실러스 균주의 포자 형성을 촉진시킬 수 있다. 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는 올리고알지네이트를 포함하는 조성물을 첨가한 용액에서 배양되는 경우, 포자 형성을 이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [0022] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 바실러스 균주 생장 촉진용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 바실러스 균주 생장 촉진 방법을 제공한다. 바실러스 균주 생장 촉진 방법은 본원발명에 속하는 통상의 기술자가 균주 배양시 이용하는 방법, 시기, 농도에 의해 적합하게 수행될 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 조성물을 포함하는 퇴비 부숙제를 제공한다.
- [0024] '부숙 퇴비'란 완전히 발효되어 썩은 퇴비를 의미하는 것으로, 완전히 부숙된 퇴비를 사용하여야 식물의 생장에 유용하게 이용될 수 있으며, 미부숙 퇴비를 사용하는 경우 오히려 작물에 병이 될 수 있고, 토양병 발생 원인이 된다. 이에, 미부숙 퇴비를 완전히 부숙시키는 방법으로 퇴비 부숙제를 이용할 수 있으며, 본원발명의 조성물이 바실러스 균주의 생장을 촉진시키는 바 퇴비 부숙제에 효과적으로 이용될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 조성물을 포함하는 곰팡이 살균제를 제공한다.
- [0026] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 조성물을 포함하는 비료 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 명세서의 용어 '비료'는 식물이 정상적으로 생육하기 위하여 필요한 원소의 하나 혹은 그 이상을 공급하는 모든 물질을 의미하며, 유기비료(분해되는 식물/동물 물질로 이루어짐)와 무기비료(화학 물질 및 무기 물질로 이루어짐) 등으로 구분될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 비료 조성물은 일반적인 제형기를 사용하여 적당한 크기의 액상, 분말, 펠렛 또는 과립 등의 다양한 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기에서 제형화된 본 발명의 비료 조성물은 그대로 사용되거나 또는 실온에서 풍건하거나 동결 건조 또는 고온 건조 방법으로 건조시켜 사용할 수 있다. 액상 형태의 비료 조성물을 농가에서 적절히 사용하기 위해서는 작물에 사용 가능한 pH 범위로서 침전이 되지 않아야만 한다. 이는 사용하는 원료의 pH, 용해도를 고려하여 배합비를 선정하여야만 한다.
- [0029] 상기 퇴비부숙제, 곰팡이 살균제 및 비료 조성물에는 통상의 담체 또는 부형제를 사용할 수 있다. 상기 담체 또는 부형제로서 바람직하게는 벤토나이트, 계면활성제, 탈크, 제오라이트 등을 사용할 수 있다.
- [0030] 이는, 예시적으로, 바실러스 리케니포르미스가 살곰팡이 제제에 큰 효과를 나타내며, 잣빛 곰팡이병, 잎바름병, 시들음병, 갈록병 등 병원성 미생물들의 균사성장을 효과적으로 억제할 수 있기에, 상기 제제로 이용되는 경우 효과적이다. 또한, 바실러스 균주의 생장 촉진이 식물면역 활성화 또한 촉진하는 바, 상기 퇴비 부숙제, 곰팡이 살균제 및 비료 조성물에서 효과적일 유효성분으로 작용할 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 공정을 사용하여 얻은 올리고알지네이트는 항산화제, 산업용 미생물 및 동물 세포의 성장 촉진제로서의 이용 가능하며, 특히나 바실러스 균주의 생장을 촉진하는 것을 확인하였다. 본 발명에서 얻은 결과는 다양한 산업 분야에서 안전하고 효과적인 재료로서 광범위한 응용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 OA의 UV-Vis 분광 광도계 및 FT-IR 결과이다. (a) UV-vis 분광광도법에서 올리고알지네이트 용액의 피크는 260-270 nm의 파장에서 관찰되었다. (b) FT-IR에서 알지네이트는 $1,043\text{ cm}^{-1}$, $1,123\text{ cm}^{-1}$, $1,409\text{ cm}^{-1}$, $1,600\text{ cm}^{-1}$, $2,925\text{ cm}^{-1}$ 및 $3,270\text{ cm}^{-1}$ 에서 피크를 가졌다. 0.75%(w/v) 알지네이트는 0-90 동안 플라즈마 방전에 의해 해중합되었다(0분 : 선, 15분 : 점선, 30분 : 대쉬(dash)선, 60분 : 이중선, 90분 : 대쉬-닷(dash-dotted)선).
- 도 2는 (a) DPPH, (b) 슈퍼옥사이드, (c) 하이드록실 또는 (d) 과산화수소 라디칼 소거 활성에 관한 OA의 항산화 포텐셜 측정 결과이다. 방전 시간 및 농도 변화에 따른 0.75%(w/v) 알지네이트의 항산화 효과를 비교하였다. 0.75%(w/v) 알지네이트는 0-90 동안 플라즈마 방전에 의해 해중합되었다(0분 : 원형, 15분 : 정사각형, 30분 : 마름모, 60분 : 삼각형, 90분 : 역삼각형).
- 도 3은 (a) *B. licheniformis* (b) *B. subtilis* 및 (c) *L. plantarum*의 성장에 대한 알지네이트를 사용하여 생성된 OA의 영향을 나타낸 결과이다. 단순 배지(원형), 1.0%(w/v; 사각형) 알지네이트 또는 2.0%(w/v; 삼각형) 알지네이트 알지네이트가 있는 배지, 1.0% OA60이 있는 배지(w/v; 마름모) 또는 2.0% OA60이 있는 배지 (w/v; 역삼각형)를 나타낸다.
- 도 4는 *B. licheniformis*의 SEM 이미지이다. (a), (b), (c) 및 (d)는 TSB 배지에서 배양된 *B. licheniformis*를 나타내며, (e), (f), (g) 및 (h)는 2%(w/v) OA60이 보충된 TSB 배지에서 배양된 결과이다. 10,000X의 배율로 세포를 관찰하였다.
- 도 5는 전사체 분석 결과이다. (a) 4,350개 유전자 중 904개 유전자의 발현이 2배 이상(20.8%) 변화하였다. 2배 이상 증가한 유전자 수는 540개, 절반 미만 감소한 유전자 수는 364개였다. 대조군으로는 TSB에서 배양된 *B. licheniformis*, 실험군으로는 2.0%(w/v; Experiment., Exp) OA60이 있는 배지에서 배양된 *B. licheniformis* 군이다. (b) 유전자의 유전자 온톨로지(GO) 범주에서 OA의 영향을 받는 유전자 중 33.2%가 생물학적 과정과 관련이 있었다. 세포 성분 관련 유전자는 12.56%, 분자 기능 관련 유전자는 37.43%였다. (c) 분자 기능에 관한 유전자의 유전자 온톨로지(GO) 범주에서 다양한 유전자가 영향을 받았고, 가장 큰 영향을 받은 것은 대사 과정과 관련된 유전자였고, 그 다음이 세포 과정과 관련된 유전자였다.
- 도 6은 비오틴 대사의 일부를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0037] [준비에]
- [0038] 시약, 미생물의 준비
- [0039] 갈조류에서 분리한 알지네이트 나트륨염(Mw: 100~200 kDa, 71238; Sigma-Aldrich, 미국)은 알지네이트의 해중합에 사용하였다. *Bacillus licheniformis* DSM 13 및 *B. subtilis* 168의 배양에는 Tryptic soy broth(TSB)이 사용되었다. *Lactobacillus plantarum* subsp.의 배양에는 De Man, Rogosa and Sharpe(MRS)을 사용하였다. *plantarum* KCCP 11226 및 Yeast Peptone Dextrose(YPD)는 *Saccharomyces cerevisiae* NK 28의 배양에 사용되었다. 이것들은 BD Biosciences Advanced Bioprocessing(미국)에서 구입했다.
- [0040] DNS 용액은 3,5-디니트로살리실산(DNS; Sigma-Aldrich, 미국), NaOH, 포타슘 소듐 타트레이트 테트라하이드레이트(Rochelle salt; Sigma-Aldrich, 미국), 황산나트륨(Na_2SO_4 ; Sigma-Aldrich, 미국) 및 페놀 용액(Sigma-Aldrich, 미국)으로 제작되었다. 2,2-디페닐-1-피크릴-히드라질(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)(DPPH) (Santa Cruz Biotech. Inc., 미국) 및 99% 에탄올(Sigma-Aldrich, 미국)을 DPPH 소거 활성 분석에 사용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH; Santa Cruz Biotech. Inc., 미국) 및 무수 에탄올(99%, Sigma Aldrich Co., 미국)을 DPPH 소거 활성 분석에 사용하였다. 시안화나트륨(NaCN ; Sigma-Aldrich, 미국), 니트로테트라졸륨 블루 클로라이드(NBT; Sigma-Aldrich, 미국) 및 에틸렌디아민테트라아세트산 사나트륨염 이수화물(EDTA; Sigma-Aldrich, 미국) 및 리보플라빈(Junsei Chemical Co., Ltd., 일본) 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성 분석에 사용하였다. FeSO_4 (1.5mM), 0.7ml의 H_2O_2 (6mM), 0.3ml의 살리실산나트륨(20mM). 3-N-모르폴리노-프로판설폰산(MOPS), 포르말린, SDS(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) bromophenol blue, xylene cyanol, 에티듐

브로마이드, 포름아미드를 RNA의 아가로스 겔 전기영동에 사용했다.

실시예 1

SPP에 의한 알지네이트의 해중합

SPP에 의한 OA 분해

OA 합성을 위해 알지네이트(0.75%)를 dH₂O에 용해시켰다. 테플론 반응기에 알지네이트 용액(300 mL)을 첨가한 반응기를 사용하였다. 직경 2mm의 텅스텐 전극(Alfa Aesar., 일본)을 반응기 내부에 1mm의 거리를 두고 나란히 배열하고, alginic acid sodium salt를 녹여 준비하였다. 단극(unipolar) 펄스 전원 공급 장치(EnerPulse 10HV., 한국)를 사용하여 고전압에서 플라즈마를 생성하였다. 물 냉각기(TRC-2000, Yescool, 한국)를 사용하여 공정 중 발생하는 열로 인한 용액 손실을 방지하였다. 농도 0.75%(w/v)의 알지네이트는 수성 환경에서 800V의 전압, 2 μ s의 펄스 폭 및 35kHz의 주파수에서 15, 30, 60 또는 90분 동안 플라즈마 방전되었다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 알지네이트 용액은 플라즈마 방전 전에 무색이었고 방전 시간이 증가함에 따라 열은 노란색에서 밝은 갈색으로 변했다.

UV-Vis 분광광도법

알지네이트의 분해는 UV-Vis 분광기(UV-1280, Shimadzu, Japan)를 사용하여 주기적으로 모니터링하였다. 해중합된 알지네이트 용액의 UV-Vis 스펙트럼은 200~900 nm의 실온에서 얻어졌다.

γ 선 조사의 길이와 선량은 각각 0~2,400분 및 20~500kGy 동안 알지네이트의 효율적인 분해를 위해 결정되었다. 분해를 위한 최적의 선량은 100kGy였고, 60분 동안 조사에 의해 알지네이트는 갈색으로 변하였다. γ 선 조사에 의해 알지네이트 분자가 절단될 때 카르보닐기의 형성이 확인되었으며, 이는 UV-Vis 분광법에서 265 nm에서 피크로 검출될 것이다. SPP에 적용된 알지네이트 용액의 변화를 확인하기 위해 UV-Vis 분광법을 200~900 nm 사이의 흡광도를 주사하여 수행하였다.

플라즈마를 처리하지 않은 알지네이트 용액에서는 피크가 관찰되지 않았으나, 플라즈마 방전된 용액은 265 nm에서 독특한 피크를 보였으며 방전 시간이 증가함에 따라 피크의 높이가 증가하였다(도 1a).

푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR) 분석

OA 용액에서 알지네이트의 화학 구조 변화를 FT-IR을 사용하여 조사했다.

플라즈마 처리된 알지네이트와 처리되지 않은 알지네이트의 순도와 기능적 연관성을 FT-IR 분광기(VERTEX 80V, Bruker, 미국)를 사용하여 800 ~ 4000 cm^{-1} 사이의 파수에서 조사하였다. FTIR 분석은 인천대학교 INU 연구시설 센터에서 동결건조된 알지네이트 또는 OA를 이용하여 수행하였다.

0, 15, 30, 60 또는 90분 동안 플라즈마를 방전하여 알지네이트(0.75%, w/v)에서 파생된 OA를 800~4,000 cm^{-1} 범위에서 분석했다. 알지네이트(0분)는 1,043 cm^{-1} , 1,123 cm^{-1} , 1,409 cm^{-1} , 1,600 cm^{-1} , 2,925 cm^{-1} 및 3,270 cm^{-1} 에서 피크를 가졌다. 3,270 cm^{-1} 의 피크는 O-H 스트레치를 나타내고, 2,925 cm^{-1} , C-H 스트레칭; 1,409 및 1,600 cm^{-1} COO-스트레치; 및 1,043~1,123 cm^{-1} , C-O 스트레치를 나타낸다. (도 1b). 그 결과, 0.5%(w/v) OA에 대해 이전에 보고된 것과 일치하였다.

실시예 2

알지네이트 해중합 확인

- [0059] 폴리머의 점도는 일반적으로 Mw 및 농도에 비례한다. 알지네이트 용액의 점도는 용액 내 알지네이트의 농도 및 복잡성에 따라 달라질 수 있다. SPP를 사용하여 처리된 OA 용액(0.75%, w/v)의 점도를 조사하였다.
- [0061] 점도 측정
- [0062] OA 용액의 점도는 상온에서 점도계(LVDV-I Prime; Brookfield., 미국)를 사용하여 측정하였다. 샘플 용액을 50ml 원뿔형 튜브에 넣고 5-100rpm으로 조정된 S61 스피ن들을 사용하여 30분 동안 점도(cPs)를 측정하였다.
- [0063] 그 결과, 처리되지 않은 알지네이트 용액은 74.3 cPs의 높은 점도를 나타내었다. 플라즈마 방전 15분에 OA의 점도가 급격히 감소하여 장비의 최소 한계에 도달했다. 그리고 나서 점도는 SPP의 45분 안에 평평해질 때까지 점차적으로 감소했다.
- [0065] 알지네이트 분해 확인
- [0066] 용액 내 플라즈마 방전에 의한 알지네이트의 분해는 3,5-디니트로살리실산 (DNS) 분석, 겔 투과 크로마토그래피 (Gel permeation chromatography, GPC), 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS) 분석으로 확인하였다.
- [0068] DNS 분석
- [0069] 플라즈마 방전에 의한 알지네이트로부터 환원당의 생성은 DNS 분석을 이용하여 확인하였다. 이 방법은 다양한 공급원에서 유래한 환원당의 추정에 널리 사용되어 왔으며 탄수화물에서 방출되는 환원당의 양을 정량화하는 비특이적 방법이다.
- [0070] DNS 용액은 2%(w/v) DNS, 4%(w/v) NaOH, 30%(w/v) Rochelle 염, 0.5%(w/v) Na₂SO₄ 및 1.9%(v/v)페놀 용액을 dH₂O에 용해하여 만들었다. SPP로 처리된 알지네이트 용액에서 방출된 환원당을 검출하기 위해 DNS 용액 900 μl 와 각 시료 250 μl를 혼합하고 끓는 물에서 10분간 가열하였다. 그 다음, 혼합물을 실온에서 냉각시키고 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- [0071] 그 결과, 알지네이트(0.75%, w/v)를 이용하여 0, 15, 30, 60, 90분 동안 플라즈마를 방출하여 제조한 OA 용액은 각각 0.010, 0.360, 0.633, 0.803, 0.953 mg/ml의 환원당을 함유하는 것으로 분석되었다. 15, 30, 60, 90분 동안 방출된 OA 용액의 환원당은 플라즈마 방전에 의해 처리되지 않은 알지네이트 양의 35.6, 63.3, 79.5, 94.4배 증가하였다. 환원당은 30분 동안 급격히 증가하였고, 증가율은 60분 후에 점차 감소하였다. 알지네이트의 해중합이 진행되어 환원당이 지속적으로 방출됨을 알 수 있었다.
- [0073] 겔 투과 크로마토그래피(Gel permeation chromatography, GPC)
- [0074] SPP를 통해 합성된 OA의 분자량은 GPC(GPC system Ultimate 3000; Dionex, 미국)를 사용하여 결정되었다. GPC는 서울대학교 농업생명과학대학 NICEM에서 수행하였다.
- [0075] 플라즈마 처리된 알지네이트의 평균 Mw는 0, 15, 30, 60 및 90분 동안 플라즈마 방전에 의해 각각 100-200 kDa 에서 28.29, 11.49, 7.30 및 6.90 Da로 감소했다. 또한 초기 다분산도는 방전이 진행됨에 따라 감소하였다.
- [0077] 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS) 분석
- [0078] SPP에 의해 생성된 OA의 입자 크기는 DLS를 사용하여 분석하였다. OA 샘플의 평균 입자 크기 및 제타 전위는 Zetasizer(Zetasizer Pro, Malvern Panalytical, 영국)를 사용하여 분석하였다. 측정 전 샘플을 15분간 초음파 처리(Powersonic 405, Hwashin Tech Co, 한국)하고 0.45 μm 필터(RephiLe Bioscience Ltd, 미국)로 여과하였다.
- [0079] 0.75%(w/v) 알지네이트의 입자 크기는 125.6 ± 0 nm였다. 15, 30, 60, 90분 동안 플라즈마 방전에 의해 각각 88.55 ± 7.51 nm, 69.32 ± 10.11 nm, 51.18 ± 7.70 nm, 25.36 ± 4.18 nm로 감소하였다.

[0080] 또한, 알지네이트(0.75%, w/v)의 제타 전위는 -94.52 mV였다. 15, 30, 60 및 90분 동안 방전된 OA의 제타 전위의 절대값은 48.8, 45.83, 34.02 및 37.67mV로 감소했다. 이러한 결과에 따라, OA는 솔루션에서 응집 없이 충분히 안정적일 수 있음을 확인하였다.

실시예 3

[0082] **올리고-알지네이트의 항산화 포텐셜 확인**

[0083] 항산화제는 세포를 손상시킬 수 있는 산화 반응 및 연쇄 반응과 같은 산화 스트레스를 억제하는 화합물이다. 일반적으로 탄수화물에서는 전자 이동이 일어나지 않지만 수소 원자 이동은 발생한다. 이에, 다양한 라디칼에 대한 항산화 효과를 알기 위해 다양한 항산화 시험을 수행하였다. 먼저 항산화 효과를 DPPH assay로 측정하였다.

[0085] DPPH 소거 활성 분석

[0086] 알지네이트와 올리고알지네이트의 항산화 활성은 수정된 DPPH 방법을 사용하여 평가하였다. DPPH(0.5mM) 용액을 동일한 부피의 샘플과 혼합하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. DPPH의 탈색은 마이크로플레이트 리더(SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 517nm에서 측정하였다.

$$\text{억제율 \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{식 (1),}$$

[0090] 여기서 A_c 는 DPPH 용액 대조군의 흡광도이고 A_s 는 샘플의 흡광도이다.

[0092] SPP를 통해 0.1-0.5%(w/v) 알지네이트 용액을 사용하여 제조된 OA의 DPPH 라디칼 소거 활성은 최고일 때, 53%였다.

[0093] 0.75%(w/v) 알지네이트 용액에서 플라즈마를 15분간 방전하여 얻은 OA의 항산화 활성은 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml 농도에서 27.2, 58.6, 93.9, 96.4%였다. 30분간 방전하여 얻은 OA의 농도는 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml에서 각각 34.4, 69.1, 97.0, 97.9%였다. 60분간 방전하여 얻은 OA의 항산화 활성은 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml 농도에서 각각 37.7, 75.4, 96.7, 95.3%였다. 90분간 방전하여 얻은 방출된 OA의 항산화 활성은 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml 농도에서 각각 44.9, 84.3, 95.9, 93.1%였다(도 2a). OA의 항산화 활성은 농도가 낮을수록 방전시간이 증가할수록 증가하였으나 5 mg/ml 이상 농도에서는 포화된 것으로 나타났다.

[0095] 슈퍼옥사이드(superoxide) 라디칼 소거 활성 분석

[0096] 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(O_2^-)은 광환원법으로 분석하였다. 반응 혼합물은 EDTA(0.1M), 시안화나트륨(0.0015%; w/v), 리보플라빈(0.12mM), NBT(1.5mM), 인산 완충액(67mM, pH 7.8), 모두 1.5ml 용량이었다. 혼합물을 15분 동안 백색광의 유무에 관계없이 530 nm의 빛에 노출시킨 후 흡광도를 기록하였다. NBT의 변색은 UV-Vis 분광법(UV-1280, Shimadzu, Japan)을 사용하여 530 nm에서 측정하였다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거율은 상기 식 (1)을 이용하여 측정하였다.

[0097] 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성 분석에서, 시험된 모든 농도에서 플라즈마 방전을 받지 않은 알지네이트 용액에서 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성이 검출되지 않았다(도 2b). 0.75% (w/v) 알지네이트 용액으로부터 유래된 OA의 항산화 활성은 300 μ g/ml의 농도에서 최대였으며 15, 30, 60 및 90분에 대해 방출된 OA 용액의 18.4, 25.4, 27.7 및 30.1%였다(도 2b).

[0099] 수산기 라디칼 소거 활성 분석

[0100] OH- 라디칼 소거 효율은 하이드록실화 살리실산을 형성하는 능력에 의해 감지되었다. 다양한 농도에서 1ml의 FeSO_4 (1.5mM), 0.7ml의 H_2O_2 (6mM), 0.3ml의 살리실산나트륨(20mM) 및 1ml의 OA를 사용하여 반응 혼합물(3ml)을 제조했다. 그 다음, 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 하이드록실화 살리실레이트 복합체의 흡광도를 샘플에 대해 562 nm에서 측정하고, % 억제를 식 (1)을 사용하여 계산하였다.

[0101] 그 결과, 0, 15, 30, 60 및 90분 동안 0.75%(w/v) 알지네이트 용액에서 플라즈마를 방출하여 얻은 OA의 하이드록실 라디칼 소거 활성은 각각 17.7, 52.4, 59.4, 62.4 및 65.1%였다(도 2c). 방전시간이 증가하고 알지네이트의 해중합이 진행됨에 따라 항산화 효과가 증가하였다.

[0102] 0, 15, 30, 60 및 90분 동안 0.75%(w/v) 알지네이트 용액에서 플라즈마를 방전하여 얻은 OA의 과산화수소 소거 활성은 각각 0, 3.55, 6.96, 8.98 및 12.75%였다(도 2d). 또한 방전시간이 증가할수록 항산화 효과가 증가하였다.

실시예 4

[0104] 박테리아의 성장에 대한 OA의 영향

[0105] 본 발명에서는 SPP를 사용하여 제조한 OA가 3가지 박테리아(*B. licheniformis*, *B. subtilis* 및 *L. plantarum*)와 효모(*S. cerevisiae*)의 미생물 성장에 미치는 영향을 조사했다.

[0107] 미생물 성장의 시간 경과 분석

[0108] OA가 미생물의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 미생물을 다음과 같이 배양하였다.

[0109] *B. licheniformis* 또는 *B. subtilis* 를 TSB에서 72시간 동안 37°C에서 진탕하면서(220rpm) 배양하였다. TSB에는 60분 동안 플라즈마가 방출된 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) OA(OA60) 또는 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) 알지네이트를 보충하였다. 600 nm에서의 흡광도는 24시간까지 3시간마다 측정한 다음 120시간까지 12시간마다 측정하였다.

[0110] *L. plantarum*은 진탕(200rpm)하면서 16시간 동안 30°C에서 MRS에서 배양하였다. MRS는 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) OA60, 또는 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) 알지네이트를 보충하였다. 600 nm에서의 흡광도는 24시간까지 3시간마다 측정한 다음 48시간까지 12시간마다 측정하였다.

[0111] *S. cerevisiae* NK28을 YPD에서 30°C 및 200rpm에서 배양한 경우 YPD에 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) OA60, 또는 0, 1.0 또는 2.0%(w/v) 알지네이트를 보충하였다. 흡광도는 600에서 24시간까지 3시간마다 측정한 다음 168시간까지 12시간마다 측정하였다.

[0113] 그 결과로, 도 3은 (a) *B. licheniformis* (b) *B. subtilis* 및 (c) *L. plantarum*의 성장에 대한 알지네이트를 사용하여 생성된 OA의 영향을 나타낸 결과이다.

[0114] *B. licheniformis*의 성장은 두 농도 모두에서 알지네이트에 의해 크게 영향을 받지 않았다(도 3a). 그러나 60분 동안 플라즈마 처리된, 1.0 또는 2.0%(w/v) OA가 포함된 YSB에서 배양한 경우 *B. licheniformis*의 성장이 TSB 단독에서 성장한 것보다 훨씬 더 많이 관찰되었다. OA를 첨가하지 않은 TSB에서 배양한 배양물의 OD₆₀₀은 배양 72시간에서 11.8에 도달했다. 1%(w/v) OA60이 있는 배양의 경우 48시간에 18.15, 2%(w/v) OA60이 있는 배양의 경우 72시간에 20.56에 도달했다(도 3a).

[0115] 또한 *B. subtilis*의 성장은 두 농도 모두에서 올리고알지네이트에 의해 영향을 받았다(도 3b). 그러나 YPD 브로쓰에서 배양한 *S. cerevisiae* 또는 OA 또는 알지네이트를 첨가하거나 첨가하지 않은 MRS 배지에서 배양한 *L. plantarum*은 성장이 향상되지 않았다(도 3c).

[0117] 포자형성 분석

[0118] *B. licheniformis*의 배양에서 내생포자의 형성을 조사하기 위해, 12시간, 18시간 및 24시간에 상기 기술된 배양물을 채취하였다. 샘플을 80° C에서 30분 동안 가열하고 10%(v/v) 클로로포름(Sigma-Aldrich, 미국)으로 실온에서 10분 동안 볼텍싱 처리했다. 열처리된 샘플을 TSB를 사용하여 100~107배 연속 희석하고 TSB 한천 플레이트에 펴고 37° C에서 밤새 인큐베이션했다. 내생포자를 나타내는 생존 세포의 비율은 콜로니 형성 단위(CFU)를 계산하고 하기 식 (2)를 통해 결정하였다.

[0120] 포자형성율(%) = $CFU_s / CFU_v \times 100 \%$ 식 (2),

[0122] 여기서 CFU_s 는 *B. licheniformis*의 내생포자에 의해 형성된 CFU/ml이고 CFU_v 는 그 영양 세포(vegetative cells)에 의해 형성된 CFU/ml이다.

[0124] OA가 *B. licheniformis*의 포자 형성을 자극하는지 확인하기 위해 OA를 첨가하거나 첨가하지 않은 배양물의 포자 형성 효율을 평가하였다. 하기 [표 1]은 *B. licheniformis*의 성장과 포자 형성에 미치는 OA의 영향을 나타낸다.

표 1

[0125]

Time (hr)	Culture Medium	OD ₆₀₀	Vegetative cell (CFU/ml)	Endospores	Sporulation Rate (%)
12	TSB	5.36	5.83 X 10 ⁸	1.51 X 10 ³	0.00
	TSB + 2% OA	5.50	7.22 X 10 ⁸	7.99 X 10 ⁴	0.01
18	TSB	4.90	6.44 X 10 ⁸	1.52 X 10 ⁴	0.00
	TSB + 2% OA	7.36	1.07 X 10 ⁹	1.57 X 10 ⁶	0.15
24	TSB	3.81	4.60 X 10 ⁸	1.96 X 10 ⁵	0.04
	TSB + 2% OA	10.43	1.16 X 10 ⁹	8.00 X 10 ⁷	6.92
36	TSB	7.29	6.23 X 10 ⁷	1.68 X 10 ⁷	26.95
	TSB + 2% OA	13.14	6.00 X 10 ⁸	3.20 X 10 ⁸	53.33
48	TSB	8.27	8.33 X 10 ⁷	2.08 X 10 ⁷	25.00
	TSB + 2% OA	14.14	7.37 X 10 ⁸	3.90 X 10 ⁸	52.94
60	TSB	7.33	7.33 X 10 ⁷	1.90 X 10 ⁷	25.95
	TSB + 2% OA	13.94	7.37 X 10 ⁸	4.67 X 10 ⁸	63.35

[0126] [표 1]에 나타난 바와 같이, 2%(w/v) OA60을 함유하는 TSB에서 배양된 *B. licheniformis*는 12시간 내에 TSB에서 배양된 것과 유사한 수준으로 성장했다. 그러나, 2%(w/v) OA를 함유하는 TSB에서 배양물의 포자 형성 효율은 기간에 TSB에서보다 37배 더 높았다. 18시간 후, 2%(w/v) OA를 포함하는 TSB에서 배양물의 OD₆₀₀은 TSB에서보다 약 1.5배 더 크고 포자형성 효율은 대조군보다 61.3배 더 높았다. 24시간 후, 2%(w/v) OA를 포함하는 TSB에서 배양물의 OD₆₀₀은 TSB에서보다 약 3배 더 크고 포자형성 효율은 대조군보다 162.3배 더 높았다. 36시간째에, 2%(w/v) OA를 포함하는 TSB에서 배양물의 OD₆₀₀은 TSB에서보다 약 2배 높았고 포자 형성 효율은 was 또한 대조군

보다 2배 더 높았다. 결과는 *B. licheniformis*의 포자 형성 속도가 OA60의 존재 하에 배양 진행을 증가시키고 크게 향상되었음을 나타낸다. 따라서 OA60은 영양 세포(vegetative cells)의 성장과 포자 형성을 모두 촉진하는 것으로 확인하였다.

[0128] 주사전자현미경(SEM)

[0129] SEM을 이용하여 *B. licheniformis*의 형태를 관찰하였다.

[0130] 500 마이크로리터의 배양물을 수집하고 원심분리했다. 세포를 실온에서 1시간 동안 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4) 중 4%(v/v) 파라포름알데하이드에 침지시켰다. 그런 다음 PBS(phosphate-buffered saline)로 두 번 세척했다. 샘플을 30, 50, 70, 80, 95 또는 100%(v/v) 알코올에서 15분 동안 순차적으로 탈수시켰다. 각 단계를 2회 반복하고 100%(v/v) 알코올을 사용하는 단계를 3회 반복하였다. 탈수된 시료는 동결건조기(TFD8503; ilshin BioBase., 한국)를 이용하여 건조하였고, INU 연구시설센터(인천대학교, 한국.)에서 전계방사형 주사전자현미경(7800F; JEOL, 일본)을 이용하여 *B. licheniformis* 세포의 형태를 관찰하였다.

[0131] 그 결과, 도 4는 *B. licheniformis*의 SEM 이미지이다. (a), (b), (c) 및 (d)는 TSB 배지에서 배양된 *B. licheniformis*를 나타내며, (e), (f), (g) 및 (h)는 2%(w/v) OA60이 보충된 TSB 배지에서 배양된 결과이다.

[0132] 12시간째에는 두 배양물의 세포에 대해 유의한 차이가 관찰되지 않았다(도 4a, e). 18시간째 배양에서 얻은 박테리아는 세포의 길이에 차이를 보였으며, 대조군 배양물의 세포는 OA를 첨가한 배양물의 세포보다 더 길었다(도 4b, f). 그러나 TSB의 배양에서는 24시간과 36시간에 많은 세포 파편이 관찰되었으며(도 4c, d), 이는 그들이 사멸 단계에 진입했음을 시사하였다. 한편, 24시간 및 36시간에 OA60(2.0%; w/v)이 포함된 TSB의 배양 샘플에서 세포 파편이 관찰되지 않았다(도 4g, h). 또한, OA60(2.0%; w/v)으로 처리한 *B. licheniformis*는 36시간째에 많은 내세포자의 방출을 보였다(도 4h).

실시예 5

[0134] 전사체의 변화 확인

[0135] 올리고-알지네이트에 의한 *B. licheniformis*의 전체적인 변화를 조사하기 위해 2% OA가 첨가되었거나 첨가되지 않은 TSB에서 배양시킨 *B. licheniformis* 세포를 채취하고 전사체를 스크리닝했다.

[0137] 전사체 분석

[0138] RNA 추출을 위해, 2.0%(w/v) OA가 첨가되었거나 첨가되지 않은 TSB에서 배양된 *B. licheniformis* 세포를 전술한 바와 같이 배양 중 15시간째에 채취하였다. RNA 샘플은 RNeasy 미니킷(Qiagen, Hilden, 독일)을 사용하여 정제되었다. RNA-Seq 분석은 MacroGen(서울, 한국)에서 수행했다. Total RNA, RNA는 Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit(Illumina, 미국)를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA는 짧은 읽기 시퀀싱(short read sequencing)을 위해 무작위로 단편화되었고 역전사 과정을 통해 cDNA로 전환되었다. Illumina 기기에서 생성된 paired-end sequencing read(101bp)는 FastQC(버전 0.11.7; Babraham Institute., 영국)로 시퀀스 품질을 확인했다. 어댑터 시퀀스는 Trimmomatic 프로그램을 사용하여 제거하였다. 트리밍된 관독값은 *B. licheniformis* DSM 13 참조 게놈에 대해 정렬하였다. Bowtie 프로그램(Bowtie 1.1.2; Johns Hopkins University., 미국)을 사용하여 참조 게놈에 매핑한 후 정렬된 리드가 생성되었다. 차등 발현 분석은 reference-based aligned reads information 및 HTseq 프로그램을 통해 계산하였다.

[0139] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 15시간 동안 배양한 후, 다른 배지에서 성장한 박테리아는 mRNA 발현에 차이를 보였다. 4,350개 유전자 중 904개 유전자의 발현이 2배 이상(20.8%) 변화했다. 2배 이상 증가한 유전자의 수는 540개, 절반 미만으로 감소한 유전자의 수는 364개였다. 유전자 온톨로지(GO) 분석 결과 골관절염의 영향을 받는 유전자 중 분자 기능 관련 유전자가 37.43%, 생물학적 과정과 관련된 유전자가 33.2%, 세포 성분 관련 유전자가 12.56%였다(도 5b). 생물학적 과정의 유전자 중 대사과정과 관련된 유전자가 가장 많이 영향을 받았고 세포과정과 관련된 유전자가 그 뒤를 이었다(도 5c). 유전자 발현이 2배 이상 증가한 상위 20개 유전자 중 비오틴(비타민 B7) 합성에 관여하는 유전자가 6개 발견됐다. 유전자는 2%(w/v) OA가 포함된 배지에서 배양된 박테리

아에서 25~140배 더 많이 발현되었다(표 2).

표 2

[0140]

Gene_ID	Gene_Symbol	Protein_ID	Exp/Con ^a
BLI_RS03810	<i>bioW</i>	WP_003179683.1	139
BLI_RS03825	<i>bioD</i>	WP_003179691.1	38
BLI_RS03830	<i>bioB</i>	WP_003179696.1	32
BLI_RS03820	<i>bioF</i>	WP_003179689.1	30
BLI_RS03815	<i>bioA</i>	WP_011197638.1	28
BLI_RS00875	<i>pdaB</i>	WP_003178409.1	26
BLI_RS03835	<i>bioI</i>	WP_011197639.1	24
BLI_RS06915	<i>dppA</i>	WP_009328702.1	14
BLI_RS08655	<i>sigE</i>	WP_003181573.1	9
BLI_RS00620	<i>rplL</i>	WP_003178305.1	8
BLI_RS05110	<i>cwlC</i>	WP_003180151.1	-19
BLI_RS10055	<i>yneA</i>	WP_003182225.1	-6
BLI_RS09210	<i>cheB</i>	WP_003181813.1	-5
BLI_RS09215	<i>cheA</i>	WP_009328508.1	-3
BLI_RS19865	<i>qoxB</i>	WP_003186199.1	-3
BLI_RS19860	<i>qoxC</i>	WP_003186197.1	-3
BLI_RS19855	<i>qoxD</i>	WP_003186195.1	-2
BLI_RS19870	<i>qoxA</i>	WP_003186201.1	-2
BLI_RS05110	<i>cwlC</i>	WP_003180151.1	-19
BLI_RS10055	<i>yneA</i>	WP_003182225.1	-6
BLI_RS09210	<i>cheB</i>	WP_003181813.1	-5
BLI_RS09215	<i>cheA</i>	WP_009328508.1	-3
BLI_RS19865	<i>qoxB</i>	WP_003186199.1	-3
BLI_RS19860	<i>qoxC</i>	WP_003186197.1	-3
BLI_RS19855	<i>qoxD</i>	WP_003186195.1	-2
BLI_RS19870	<i>qoxA</i>	WP_003186201.1	-2

[0141]

비오틴은 탄수화물 소화, 지방산 합성 및 포도당 신생합성에 관여하는 카르복실라제 효소의 조효소이다. 이들 유전자는 장쇄 acyl-[acyl carrier protein] 또는 pimelate에서 biotin으로의 생합성에 관여하였다(도 6). 또한, autolysin 유전자 중 하나인 clwC 유전자의 발현이 감소하였고, SOS 반응에서 세포분열을 억제하는 유전자(yneA)와 주화성을 조절하는 유전자(cheA, B)의 발현도 감소하였다. 메나퀴논(비타민 K) 합성 유전자(qoxA, B, C, D)도 발현이 감소했다(표 2).

[0142]

또한, 2배 이상 변화된 포자형성 관련 유전자 중 55개 유전자가 2배 이상 상향조절된 반면, 3개만이 하향조절되었다(표 3).

표 3

[0143]

Gene_ID	Gene_Symbol	Protein_ID	Exp/Con
BLI_RS12920	<i>spoIIIAG</i>	WP_009327917.1	28
BLI_RS00875	<i>pdaB</i>	WP_003178409.1	26
BLI_RS12945	<i>spoIIIB</i>	WP_003183410.1	23
BLI_RS13710	<i>sigK</i>	WP_003183729.1	18
BLI_RS12925	<i>spoIIIAF</i>	WP_003183393.1	17
BLI_RS12935	<i>spoIIID</i>	WP_026080803.1	15
BLI_RS10135	<i>sspN</i>	WP_003182261.1	13
BLI_RS04850	<i>cotF</i>	WP_003180057.1	11

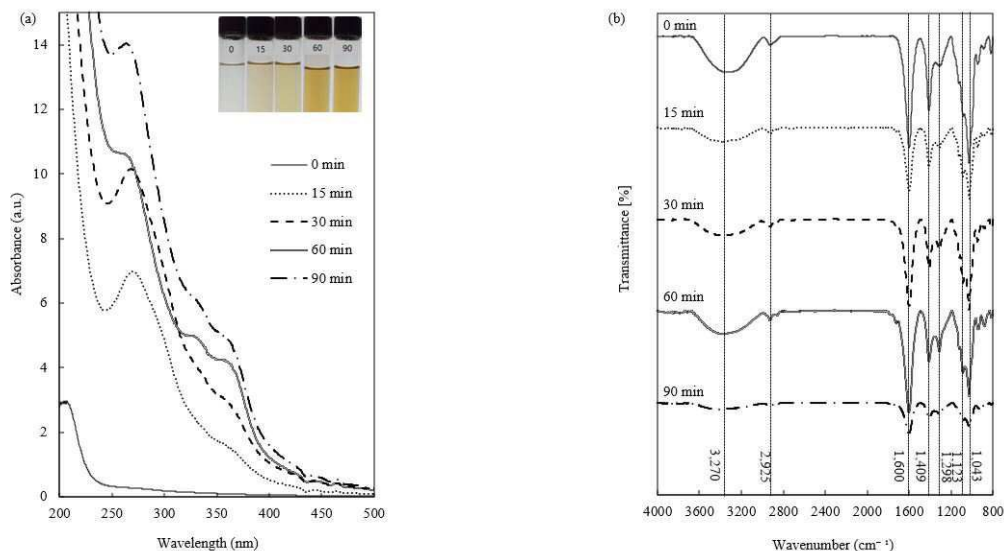
BLI_RS11990	<i>spoIVA</i>	WP_003183009.1	11
BLI_RS12400	<i>spoIIM</i>	WP_003183180.1	10
BLI_RS12950	<i>spoIIIAA</i>	WP_003183411.1	10
BLI_RS10045	<i>sigE</i>	WP_170865381.1	9
B14_RS12165	.	WP_170865381.1	-3
B14_RS11420	.	WP_003182509.1	-3
B14_RS13555	.	WP_011197962.1	-5
BLI_RS02290	<i>yclQ</i>	WP_003178942.1	10
BLI_RS05505	<i>fecD</i>	WP_009328924.1	8
BLI_RS17990	<i>fhuD</i>	WP_011198331.1	5
BLI_RS13175	<i>feuA</i>	WP_003183490.1	4
BLI_RS02280	<i>yclO</i>	WP_003178939.1	4
BLI_RS17115	<i>feuD</i>	WP_009329556.1	2
BLI_RS13305	<i>zinC</i>	WP_009327880.1	-2
BLI_RS17455	<i>mntB</i>	WP_003185226.1	-111
BLI_RS17460	<i>mntD</i>	WP_003185227.1	-160
BLI_RS17465	<i>mntA</i>	WP_003185228.1	-198

[0144] [표 3]에 나타난 바와 같이, 철 ABC 트랜스포터 및 사이드로포어와 관련된 모든 유전자는 상향 조절되었지만 금속 ABC 트랜스포터와 관련된 모든 유전자는 감소했음을 확인하였다. Grandchamp et al. (2017)은 siderophores가 박테리아에 미네랄 영양소 철분을 공급할 수 있을 뿐만 아니라 박테리아 종간 신호 전달에 역할을 하여 포자형성에 대한 신호를 제공할 수 있다고 제안했다. Siderophores는 *B. licheniformis*에서 포자형성 유전자 발현을 촉진할 수 있다.

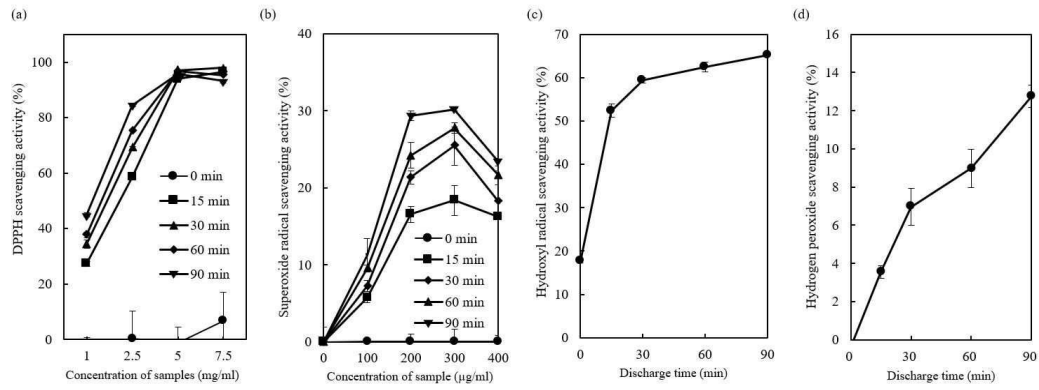
[0146] 이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였지만, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

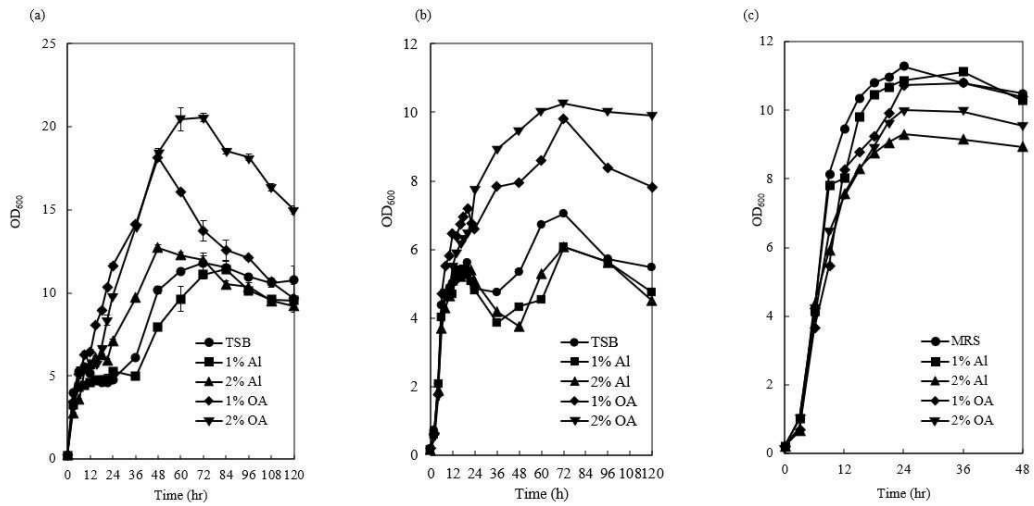
도면1



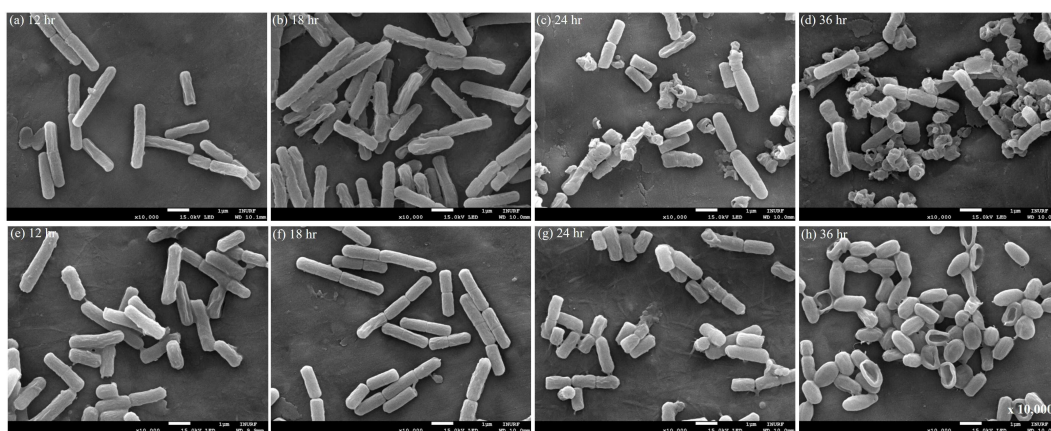
도면2



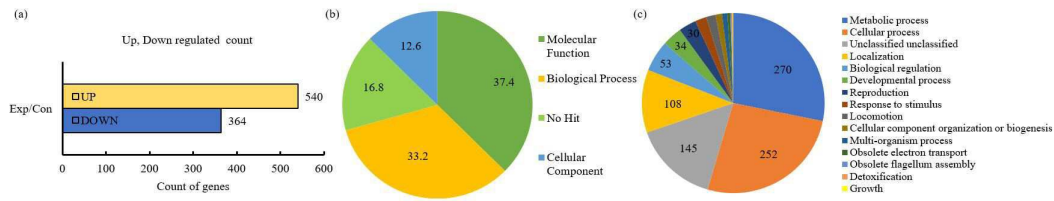
도면3



도면4



도면5



도면6

