

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0065679
(43) 공개일자 2022년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/20* (2020.01)
C02F 3/34 (2017.01) *C12R 1/01* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A01N 63/20 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0149754
 (22) 출원일자 2021년11월03일
 심사청구일자 2021년11월03일
- (30) 우선권주장
 1020200151841 2020년11월13일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
 박희등
 경기도 성남시 분당구 정자일로 27, 1402호
 함소영
 서울특별시 성북구 안암로9가길 85, 305호
 장용선
 서울특별시 성북구 고려대로7나길 14, 101호
- (74) 대리인
 정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

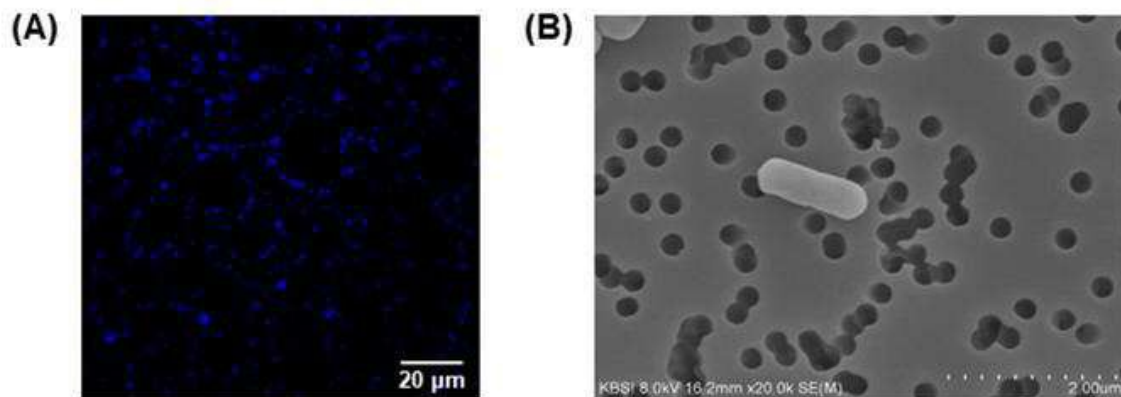
(54) 발명의 명칭 정족수인식 차단활성을 갖는 리스테리아 그레이 HEMM-2 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 정족수인식 차단활성을 갖는 신규 미생물인 리스테리아 그레이(*Listeria grayi*) HEMM-2 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 *Listeria grayi* HEMM-2는 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 분리막 공정의 투수율 및 세척 주기를 증가시켜 공정 효율을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C02F 3/34 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485016734

과제번호 ARQ201901177002

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 지중환경오염위해관리기술개발사업(R&D)

연구과제명 분리막 혐기성 독립영양 생물막 시스템을 이용한 지하수 내 복합 무기오염물 정화기

술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 아실 호모세린 락톤(AHL) 분해효소를 생산하는 것을 특징으로 하는 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주에 의해 유발되는 생물막을 저해하는 것을 특징으로 하는 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 아실 호모세린 락톤을 신호물질로 하는 균주는 크로모박테리움 비오레슘(*Chromobacterium violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주.

청구항 5

제1항에 따른 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 배양산물은 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 과채물 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(*Chromobacterium violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 제5항에 따른 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 생물막 형성 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 정족수인식 차단활성을 갖는 신규 미생물인 리스테리아 그레이(*Listeria grayi*) HEMM-2 및 이의 용도

에 관한 것이다.

배경 기술

- [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(biofouling) 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 바이오파울링 발생 문제를 해결하기 위하여, 화학적, 물리적 방법들이 제시되었으나, 미생물의 생장에 필요한 영양분이 항상 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 성장하게 되면 정족수 인식(quorum sensing, QS) 기작이 작용하여 점액성을 띤 고분자 다당류의 구조화된 생물막이 형성된다. 정족수 인식기작은 상기 미생물들로부터 분비되는 특정 신호물질인 아실 호모세린 락톤(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] 일례로, 아실 호모세린 락톤을 분해하기 위한 효소를 갖는 미생물로는 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 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0011] 정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC 81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 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 비오레썸(*Chromobacterium violaceum*), 예시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주일 수 있다.

- [0015] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에 따르면, 상기 배양산물은 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 과채물 및 이들의 분획물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따르면, 상기 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 크로모박테리움 비오레썸(*Chromobacterium violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 제5항에 따른 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 *Listeria grayi* HEMM-2는 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 분리막 공정의 투수율 및 세척 주기를 증가시켜 공정 효율을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 공초점주사현미경(CLSM)(A) 및 주사전자현미경(SEM)(B) 이미지이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 계통도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 배양액의 무세포 상등액(Cell-free supernatant, CFS)(A)과, 배양 침전물(Whole cell)(B)의 정족수 인식 차단 활성도를 측정한 결과 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 정족수 인식 차단 기작을 분석한 것으로서, (A)는 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 배양액의 무세포 상등액의 정족수인식 차단 활성도 실험을 통한 정족수인식 차단 효소의 종류를 분석한 결과를 나타내고, (B)는 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 배양액의 무세포 상등액을 처리한 *Pseudomonas aeruginosa* PA14의 정족수인식 관련 유전자 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 회분식 조건에서, 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 배양액의 무세포 상등액의 주입량에 따른 생물막 형성 억제 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 연속식 조건에서 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 배양액의 무세포 상등액의 생물막 형성 억제 실험 결과를 나타낸 그래프이다((A)는 drip-flow reactor를 이용한 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막, (B)는 CDC biofilm reactor를 이용한 활성슬러지 생물막).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 “조성물”은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0026] 본 발명은 정족수인식 차단활성을 가지며, 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주를 제공한다.
- [0027] 본 발명에서는 하수처리장의 활성슬러지와 AHL을 단일 탄소원으로 첨가하여 증균배양을 진행하여, 가장 활성이

우수한 단일 균주 HEMM-2를 선별·분리하였으며, HEMM-2의 종분석을 위해 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 균주 HEMM-2는 리스테리아 그레이(*Listeria grayi*)에 속하는 것으로 확인되었다.

- [0028] 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주는 하수처리장의 활성슬러지로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 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-hydroxybutanoyl-homoserine lactone), HHL(N-3-actoyl-homoserine lactone), OHL(N-3-oxohexanoyl-homoserine lactone), OHHL(N-3-octanoyl-homoserine lactone), OOHHL(N-3-oxooctanoyl-homoserine lactone), OdDHL(N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone), HtedDHL(N-3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl-homoserine lactone) 등을 예로 들 수 있다.
- [0031] 이들 중 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주는 BHL, HHL, OHL, OHHL, OdDHL 등 다양한 아실 호모세린 락톤류를 효과적으로 분해할 수 있으며, 특히 HHL을 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 비올레썸(*Chromobacterium violaceum*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas 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 AHL과 활성슬러지를 유일한 탄소원으로 하는 것이 균주의 생육을 촉진시킬 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주 또는 그의 배양산물을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0036] 상기 배양산물은 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 배양물, 배양상등액, 무세포 상등액(Cell-free supernatant), 과쇄물 및 이들의 분획물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0037] 이때, 본 발명에 따른 상기 리스테리아 그레이 HEMM-2 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 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 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 μm 의 필터를 이용하여 상기 상등액을 필터링함으로써 무세포 상등액을 수득할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 조성물은 상기 수탁번호 KACC81040BP로 기탁된 리스테리아 그레이 HEMM-2 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, 텍스트로오스, 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 비오레썸(*Chromobacterium violaceum*), 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중에서 선택된 1종 이상의 균주에 상기 생물막 형성 억제용 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

[0044] [실시예]

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0047] 실시예 1. 균주의 분리 및 선발

[0048] 정족수인식 차단 미생물을 분리막 공정에 적용시키기 위해 실제 운영 중인 구리하수처리장의 활성슬러지 샘플을 수득한 후, 탄소원으로 AHL이 포함된 증균배지에서 배양하였다. 이를 AHL이 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 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주를 최종 선택하였다.

[0050] 실시예 2. 균주의 동정

[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] 먼저, HEMM-2의 형태를 확인하기 위해 confocal laser scanning microscope(CLSM)와 scanning electron microscope(SEM)을 사용하였다. HEMM-2는 chain 형태로 성장하였으며 (도 1A), 8 μ M의 길이와 2 μ M 두께의 막대기모양인 간균의 형태를 지닌 것으로 확인되었다 (도 1B). 이를 통해 본 발명에 따른 균주는 종래 알려진 *Listeria*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 $^{\circ}$ C, 1분 어닐링 55 $^{\circ}$ C, 1분, 신장 72 $^{\circ}$ C, 2분 조건으로 30 사이클로 PCR을 실시한 후 서열분석기(ABI Prism 3730XL DNA analyzer)로 서열을 분석하였다(서열번호 1 참조). 분석된 염기서열의 계통학적 분류체계는 public database인 NCBI의 Blast search tool를 통해 확인하였다.

[0056] 도 2에는 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 대략적인 계통도를 도시하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 여러 종의 리스테리아 속 균주를 이용한 phylogenetic 분석 결과, 본 발명에 따른 균주는 리스테리아, 특히 리스테리아 그레이와 가장 높이 clustering되는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 균주를 리스테리아 그레이(*Listeria grayi*) HEMM-2로 명명하였다. 또한, 상기 균주는 2017년 1월 2일자로 국립농업과학원 농업 유전자원센터에 기탁하였으며, 수탁번호 KACC 81040BP를 부여받았다.

[0058] 실시예 3. 정족수인식 차단 활성도 측정

[0059] 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 정족수인식 차단 효소가 세포 외부 혹은 내부에 존재하는지 및 신호물질의 분해 정도를 확인하기 위해 무세포 상등액(cell-free supernatant, CFS)와 배양 침전물(whole cell, WC)을 이용하여 정족수 인식 차다 실험을 수행하였다. 이때, 신호물질로는 BHL, HHL, OHL, OHHL, OdDHL을 이용하였다.

[0060] 실험 결과, HEMM-2의 CFS는 다양한 신호물질을 효과적으로 분해하였으며, 특히 신호물질 중 HHL을 가장 많이 분

해하는 것으로 나타난 반면(도 3A), WC는 모든 신호물질을 분해하지 못했다(도 3B). 이를 통해 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주는 세포 내부가 아닌 외부에 존재하는 효소를 통해 아실 호모세린 락톤(AHL)을 분해한다는 것을 확인하였다.

[0062] 실시예 4. 정족수인식 차단 기작 분석

[0063] 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주가 외부로 분비하는 효소의 종류를 확인하기 위해 CFS에 HCl을 처리하는 방법을 통해 정족수인식 차단 실험을 수행하였다.

[0064] 정족수인식 차단 효소 중 락토네이즈(lactonase) 효소에 의해 분해된 신호물질은 HCl에 의해 원래의 상태로 되돌아오는데, 실험 결과, HEMM-2에 의해 가장 잘 분해되는 HHL에 10% CFS를 처리하면 기존 실험결과와 동일하게 HHL이 분해되었지만, HCl을 처리하면 분해된 HHL이 원래 상태로 되돌아오는 것으로 확인되었다(도 4A). 이를 통해, HEMM-2는 락토네이즈 효소를 통해 신호물질을 분해한다는 것을 확인하였다.

[0065] 다음으로, HEMM-2의 CFS가 생물막 형성 대표 균주인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 전사과정에 미치는 영향을 확인하기 위해, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막에 HEMM-2 CFS (0-10%)를 처리한 후 정족수 인식 관련 유전자의 발현량을 real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 통해 분석하였다. 분석 결과, HEMM-2의 CFS를 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막에 처리할 경우, 정족수 인식 관련 유전자의 발현량이 대조군에 비해 22-84% 감소하는 것을 확인하였다(도 4B).

[0067] 실시예 5. 회분식 조건에서의 생물막 형성 억제 실험

[0068] 회분식 조건에서 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 CFS의 주입량에 따른 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막의 양을 확인하기 위해 static biofilm formation assay를 수행하였다.

[0069] 이때, 상기 HEMM-2 균주의 CFS는 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 배양액 대비 0 내지 10 %(v/v)로 처리하였다.

[0070] 측정 결과, 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 CFS의 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 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주의 CFS의 생물막 형성 억제 능력을 관찰하기 위해 drip-flow reactor와 CDC biofilm reactor를 운전하였다. 10% HEMM-2 CFS가 처리된 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 생물막 모양을 CLSM을 통해 분석한 결과, CFS를 처리하지 않은 대조군에서는 mature한 버섯 모양의 생물막이 관찰된 반면, CFS를 처리한 생물막은 대조군에 비해 상대적으로 평평한 모양을 나타내었다(도 6A). 또한, 활성슬러지를 이용한 CDC biofilm reactor 운전 결과에서도 drip-flow reactor와 비슷한 생물막 형성 억제 패턴이 나타났다(도 6B). 이를 통해, 본 발명에 따른 리스테리아 그레이 HEMM-2 균주는 생물막 형성을 현저하게 감소시키는 능력이 있음을 확인하였다.

[0075] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 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.

수탁번호

[0076]

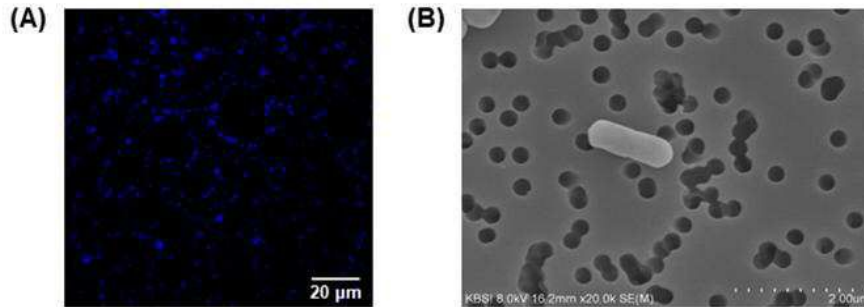
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81040

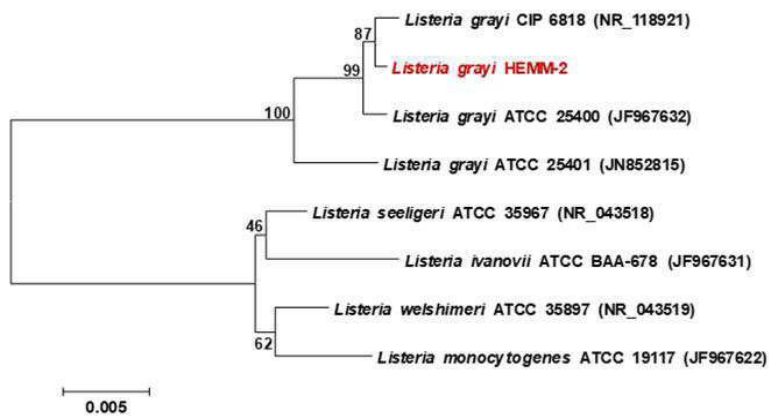
수탁일자 : 20170102

도면

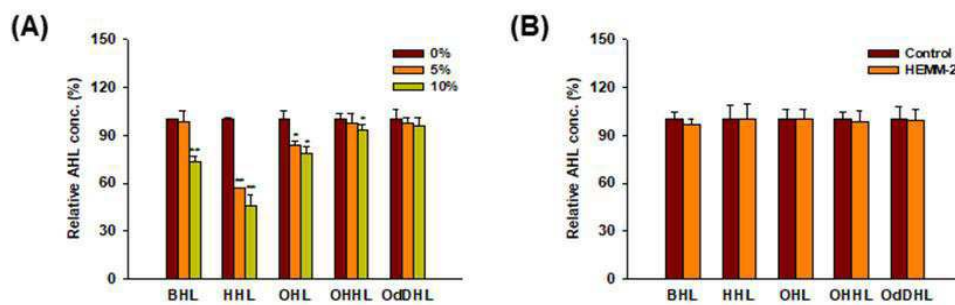
도면1



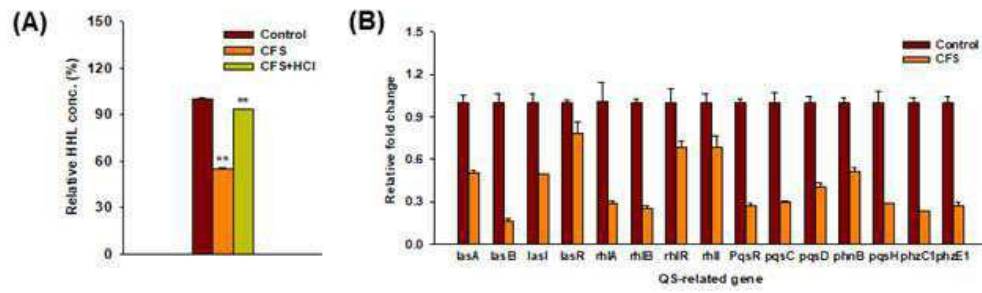
도면2



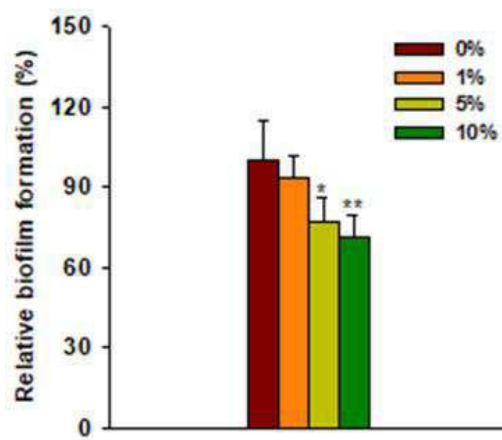
도면3



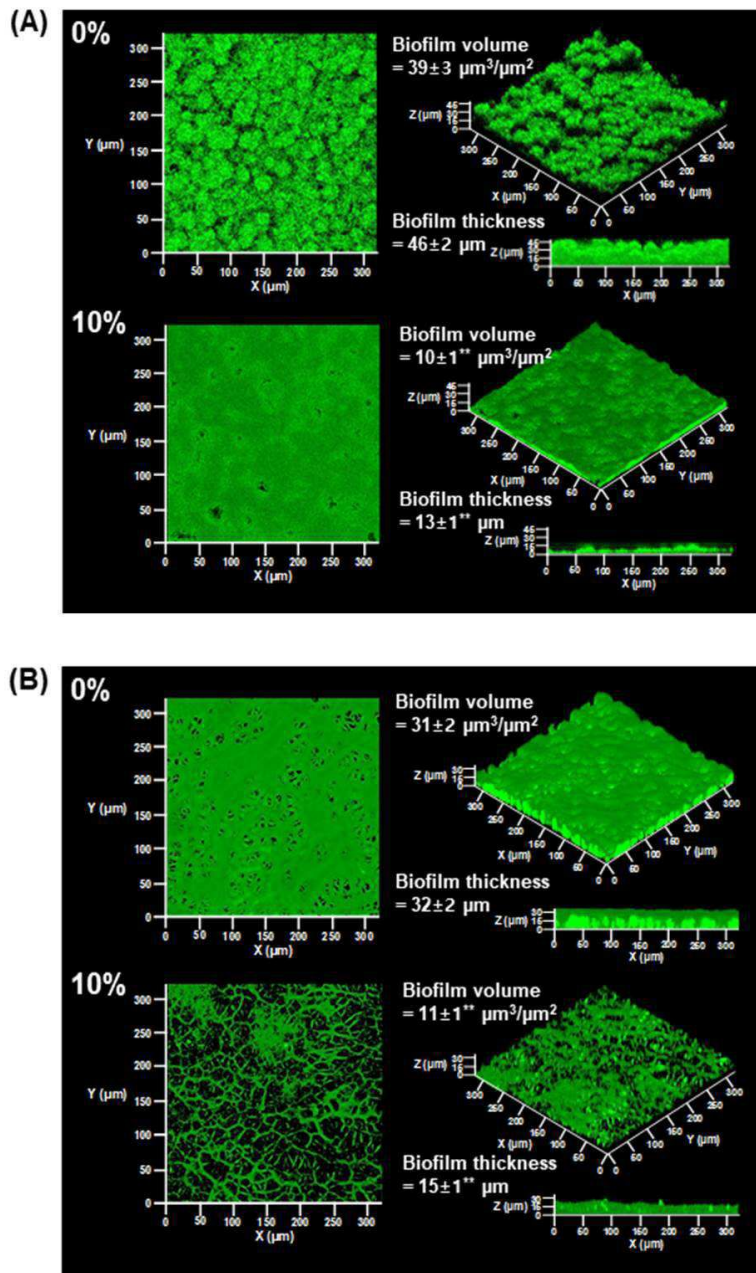
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> *Listeria grayi* HEMM-2 with quorum quenching activity and uses thereof
- <130> JKP1570-R1
- <150> KR 10-2020-0151841
- <151> 2020-11-13
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Listeria grayi HEMM-2

<400> 1

aggacgaacg ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga acgaatgacc ttaggagctt 60

gctccttttg tcgttagtgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaacctg cctgtaagat 120

tgggataact ccgggaaacc ggagctaata ccgaataata atcagctccg catggagcag 180

gtttgaaagg cggttcgcgc gtgcacttac agatgggccc gcggtgcatt agctagttag 240

tggggtaaag gcctaccaag gcgacgatgc atagccgacc tgagagggtg atcgccacaca 300

ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat 360

ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gtgtgaagaa ggttttcgga tcgtaaagca 420

ctgttgttag agaagaacaa ggataagagt aactgcttgt cccttgacgg tatctaacca 480

gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggtggc aagcgttgtc 540

cggaattatt gggcgtaaag gcgcgcgagg cggtttctta agtctgatgt gaaagccccc 600

ggcttaaccg gggagggtca ttggaaactg ggagacttag agtgcagaag aggagagtgg 660

aattccatgt gtagcggiga aatgcgtaga tatatggagg aacaccagtg gcgaaggcga 720

ctctctggtc tgtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780

ccctggtagt ccacgccgta aacgatgagt gctaagtgtt aggggggttc cggcccttag 840

tgctgcagct aacgcattaa gcaactccgc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca 900

aaggaattga cggggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg 960

aagaacctta ccaggtcttg acatcctttg accactctgg agacagagct ttcccttcgg 1020

ggacaaagtg acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080

gtcccgaac gagcgaacc cttgatttta gttgccagca tttagttagg cactctaaag 1140

tgactgccgg tgcaagccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aatcatcat gccccttatg 1200

acctgggcta cacacgtgct acaatggatg atacaaaggg tcgcgaagcc gcgaggtgaa 1260

gctaattcca taaaatcatt ctgatttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagc 1320

cggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag 1380

acaccgcccg tcacaccacg agagtttgta acaccgaag tcggtagggt aacctttatg 1440

gagccagccg ccgaaggtgg gacagataat tggggtgaag tcgtaacagg ga 1492