



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월26일

(11) 등록번호 10-1522682

(24) 등록일자 2015년05월18일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <b>A61K 31/404</b> (2006.01) <b>A61K 31/40</b> (2006.01)<br/> <b>A61K 35/74</b> (2015.01) <b>A61P 31/00</b> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0051974<br/>                 (22) 출원일자 2012년05월16일<br/>                 심사청구일자 2013년05월24일<br/>                 (65) 공개번호 10-2013-0128141<br/>                 (43) 공개일자 2013년11월26일<br/>                 (56) 선행기술조사문헌<br/>                 KR100377545 B1<br/>                 US20090155873 A1<br/>                 JP2008231023 A<br/>                 JP2003527308 A</p> | <p>(73) 특허권자<br/> <b>한국생명공학연구원</b><br/>                 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>김창진</b><br/>                 대전광역시 유성구 과학로 125<br/> <b>이재찬</b><br/>                 대전광역시 유성구 과학로 125<br/>                 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>이원희</b></p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 22 항

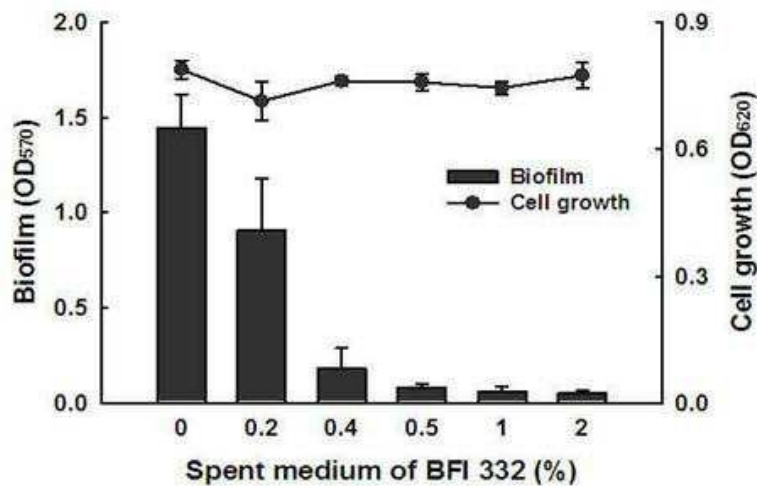
심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 **로도코커스속 BFI 332로부터 분리한 인돌-3-아세트알데하이드를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제제 및 이를 이용한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 로도코커스속 BFI 332의 배양액 및 로도코커스속 BFI 332로부터 생산된 인돌-3-아세트알데하이드를 유효성분으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명은 본 발명에 따른 제제 또는 조성물을 박테리아와의 접촉을 통해 생물막 형성을 방지 또는 억제하는 방법을 제공하고, 약학적 조성물, 소독용 조성물, 의료세정용 조성물, 환경 정화용 조성물 등으로 유용하게 이용될 수 있다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**이진태**

경북 경산시 대학로 280, 화공관 320호 (대동, 영남대학교)

**김용규**

대구 수성구 무열로11길 14, (만촌동)

**이진형**

경북 경산시 대학로 280, 화공관 303호 (대동, 영남대학교)

**조무환**

경북 경산시 대학로 280, 화공관 319호 (대동, 영남대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2006-0135
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	교육과학기술부
연구사업명	과학기술국제화사업
연구과제명	식물내성 미생물자원 탐색 및 확보
기여율	1/2
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2011.10.01 ~ 2012.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM4111241
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	기초기술연구회
연구사업명	주요사업(연구개발과제)
연구과제명	생명자원 인프라 구축 및 지원
기여율	1/2
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인돌-3-아세트알데하이드(indole-3-acetaldehyde) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성에 의해 유발되는 질환인 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인돌-3-아세트알데하이드는 로도코커스속(*Rhodococcus* sp.) BFI 332(기탁번호 KCTC 12188BP) 유래인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 박테리아는 그람 음성균 또는 그람 양성균인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스태필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis*) 이고, 상기 그람 양성균은 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) PA01 인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 대장균은 대장균 O157:H7인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

인돌-3-아세트알데하이드를 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용 조성물.

#### 청구항 7

시험관 내(*In vitro*)에서 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 박테리아와 접촉시키는 단계를 포함하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 박테리아와의 접촉은 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 표면에 처리하거나 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 표면은 의료용 물건의 표면, 배수관, 글레이즈세라믹, 포설린, 유리, 금속, 나무, 크롬, 플라스틱, 비닐 또는 폴리머로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

**청구항 10**

제 8항에 있어서, 상기 표면은 생물체 유래의 조직 또는 기관인 것을 특징으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

**청구항 11**

박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 활성을 가지는, 기탁번호 KCTC 12188BP로 기탁된 로도코커스속 BFI 332 균주(기탁번호 KCTC 12188BP).

**청구항 12**

기탁번호 KCTC 12188BP로 기탁된 로도코커스속 BFI 332 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성에 의해 유발되는 질환인 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 13**

제 12항에 있어서, 상기 박테리아는 그람 음성균 또는 그람 양성균인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 14**

제 13항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스태필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis*) 이고, 상기 그람 양성균은 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA01 인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나의 질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 15**

제 14항에 있어서, 상기 대장균은 대장균 0157:H7 인 것을 특징으로 하는 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균형증, 심내막염 및 장염으로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나의

질병 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

#### 청구항 16

기탁번호 KCTC 12188BP로 기탁된 로도코커스속 BFI 332 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용 조성물.

#### 청구항 17

시험관 내(*In vitro*)에서 기탁번호 KCTC 12188BP로 기탁된 로도코커스속 BFI 332 균주 또는 이의 배양액을 박테리아와 접촉시키는 단계를 포함하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

#### 청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 박테리아와의 접촉은 상기 로도코커스속 BFI 332 균주 또는 이의 배양액을 표면에 처리하거나 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

#### 청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 표면은 의료용 물건의 표면, 배수관, 글레이즈세라믹, 포셀린, 유리, 금속, 나무, 크롬, 플라스틱, 비닐 또는 포미카로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

#### 청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 표면은 생물체 유래의 조직 또는 기관인 것을 특징으로 하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법.

#### 청구항 21

인돌-3-아세트알데하이드를 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 의료세정용 조성물.

#### 청구항 22

기탁번호 KCTC 12188BP로 기탁된 로도코커스속 BFI 332 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 의료세정용 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술분야

[0001]

본 발명은 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제제 및 이를 표면에 처리하거나 개체에 투여하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

- [0002] 자연 상태에서, 세균은 다른 세균과 군집을 이루면서 다양한 종으로 공존하며, 자원 및 공간을 위해 경쟁한다. 많은 세균은 다당류(polysaccharides) 또는 단백질을 이용하여 표면에 부착하는 고착성 미생물 군집인 생물막(biofilm)을 형성한다. 생물막은 복잡하고 잘 조직된 군집으로 보편적인 항생제, 숙주 면역력 및 외부 스트레스에 대해서 저항성을 나타내고 만성 감염에 대한 세균의 내성에 기여한다(Costerton *et al.* 1999; Hoffman *et al.* 2005). 그러므로, 세균의 약물 내성이 발달하지 않으면서 생물막을 억제하고 분해하는 무독성 화합물을 발견하기 위해 세균이 어떻게 그들의 생물막을 통제하는지를 이해하는 것이 중요하다.
- [0003] 세균이 감염된 부분에는, 폴리머(polymer) 기질로 감싸인 세균의 집락인 점액질이 존재할 때가 있다. 이 세균에 의해 형성된 점액질의 세균 복합체를 생물막, 바이오필름 또는 생물막이라고 부른다(J Bacteriol 176: 2137-2142, 1994). 생물막에는 폴리머 기질(다당류와 폴리펩타이드가 주성분임)로 된 외막(extracellular matrix; mucosal surface)이 세균집락을 둘러싸고 있다. 즉 생물막은 고형(solid)의 생물학적 표면(biological surface)인 세균집락과 비생물학적 표면(non-biological surface)인 외막으로 구성된 복합체이다. 따라서 본 명세서의 생물막이란 이 외막과 그 속에 들어있는 세균집락을 포함한 전체를 의미한다. 생물막은 미국 몬타나 주립대학 바이오필름공학센터장인 Costerton 교수가 1970년대 후반에 제창한 개념으로, 세균 등이 분비하는 점성물질(고체 표면에 붙은 박테리아는 다당류 등의 점성물질을 분비)인 외막 안에 복수의 세균이 공존하는 환경을 말한다. 생물막은 자연계에 흔하게 발견되는데, 예컨대 바위나 연못에서 발견되는 점액질이 바로 그것이다. 생물막은 세균으로 이루어진 작은 도시라 할 수 있으며, 그 속에서 세균은 서로 의사소통을 하고, 외부세계에 대하여 방어를 한다. 이로 인하여 생물막은 항생제를 포함한 여러 환경 스트레스(environmental stress) 아래에서도 세균의 생존을 가능하게 만든다.
- [0004] 이런 생물막은 일반 자연 환경 외에 세균감염성 질환과 관련하여서도 자주 발견된다. 사람의 장기에 형성되기도 하고 치아의 플라크 형태로 나타나기도 하며, 산업용 장비나 의료용 이식 기구에 생길 수도 있다. 이런 탓에 생물막은 치주 질환(periodontal disease)이나 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)에 동반하는 폐렴, 중이(middle ear)에 생기는 이통(earache) 등을 연구하는 학자들의 관심 대상이 되어 왔다. 미국 국립보건연구소는 2002년 보고에서 박테리아군의 최대 80%가 이 같은 생물막 형성을 통해 병원균을 퍼트리고 있는 것으로 추산했다. 별개로 부유하던 세균(planktonic bacteria)에 대해 약효를 나타내던 항생제도 세균이 생물막을 형성하면 효능을 상실하는 경향이 커진다(Trends Microbiol 9: 34-39, 2001). 세균이 생물막을 형성하면 생물막에 존재하는 외막을 항체 등이 투과할 수 없어 숙주의 면역체계(host immune system)를 무력화시키고, 항생제에 대한 세균의 저항성이 약 1,000배까지 높아질 수 있다고 한다(Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003). 이런 생물막 형성에 따른 항생제에 대한 저항성의 증가 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나 다음의 3가지 정도로 설명된다.
- [0005] 첫 번째는 "미생물의 생태적 변화"이다. 생물막이 형성된 상태에서는 세균 사이의 결합력이 강화되어 결과적으로 세균집락이 잘 퍼지지 않게 되며 따라서 세균 증식도 저하되게 된다. 이렇게 되면 주위 환경과의 교환 작용에 대한 의존성이 약화되고, 대사 작용이 느려지며, 결과적으로 항생물질에 대한 감수성이 낮아지게 된다. 두 번째는 "점액성 다당류로 구성된 외막"의 물리적 특성이다. 외막을 형성하는 점액성 다당류들은 전기적 성질을 가지고 있어 항생물질과 결합하려는 경향을 갖고 있으며 이렇게 항생물질과 결합함으로써 항생물질이 퍼지는 것을 방해한다. 즉 항생물질이 개개의 세균까지 잘 전달되지 않게 되어 항생물질은 그 효능을 발휘하기 어렵게 된다. 세 번째는 일반적 항생제 내성 획득 기작과 관련 있는 추정으로 "억제 인자의 생산"이다. 항생물질의 효능을 억제하는 억제 인자로 가장 많이 알려진 물질로는 슈도모나스균에 의하여 생산되는 베타-락타메이즈( $\beta$ -lactamases)를 들 수 있다. 생물막이 형성되면 그 생물막 속에 존재하는 내성이 없던 세균들도 주위의 내성세균으로부터 수평 유전자 전이(horizontal gene transfer)를 통하여 내성인자 관련 유전자를 획득하여 내성 세균화 되는 경향이 있다. 즉, 감염부위에 생물막이 형성되게 되면 이는 항생제 내성 상태가 되었다고 볼 수 있다. 이러한 이유들로 인하여 생물막이 형성되면 감염증 치료에 널리 사용되던 항생제의 작용이 어렵게 되어 결과적으로 항생제에 의한 치료 효과가 약화된다. 이런 이유로 인하여, 생물막이 형성된다는 것은 만성적인 세균 감염 상태에 돌입한다는 것을 의미한다. 이 경우 상기에 기술했듯이 세균들의 항생제에 대한 감수성이 낮아져 항생제를 사용해도 거의 효과가 없으며 이를 극복하기 위해 단순히 항생제를 과다처방하면 세균의 항생제 내성만을 키우게 된다. 즉, 생물막이 형성된 세균 감염증은 단순히 항생제로만 치료하는 것은 더 이상 효과적인 치료가 되지 못함을 의미한다. 특히 생물막을 형성하고 있는 세균에 의한 감염은 여러 가지 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성(multi-drug resistance) 균에 의한 경우가 많아 더욱 문제가 심각해진다. 따라서 이러한 생물막의 형성으로 인한 항생제 치료의 무력화를 막기 위해서는 생물막이 형성되더라도 이 생물막을 제거할 수 있는 새로운 항생제가 개발되거나, 또는 기존 항생제가 효능을 발휘할 수 있도록 생물막에 존재하는 외막을 파괴

해 줄 수 있는 성분을 기존 항생제와 함께 사용하여야 한다.

- [0006] 장출혈성 대장균(*Enterohemorrhagic E. coli*) O157:H7은 전세계적으로 출혈성 장염을 일으키는 일으키는 가장 일반적인 인간 병원균이다. 유명한 발생으로는 1982년 및 2006년에 미국에서 발생한 것이 있고, 이것의 키메라주(chimerical strain)은 2011년 유럽에서 발생하였다. 그러나 장출혈 대장균 O157:H7 감염에 대한 효과적인 치료법이 없으며(Tarr *et al.* 2005) 이들의 혈청형은 박(leaves), 스테인리스 스틸, 유리 및 폴리스티렌과 같은 다양한 물질의 표면에 강한 생물막을 형성한다.
- [0007] 장출혈 대장균 O157:H7에 대한 몇몇 무독성 항생물막 화합물이 알려졌는데, 예를 들면 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)로 부터 분리된 세포외다당류(exopolysaccharide)(Kim *et al.* 2009), 포도로부터 분리된 리모노이드(limonoids)(Vikram *et al.* 2010a), 식물 플라보노이드(flavonoids), 나린제닌(naringenin), 캄프페롤(kaempferol), 쿠어세틴(quercetin) 및 아피제닌(apigene)(Vikram *et al.* 2010b)은 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 형성을 감소시킨다.
- [0008] 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함하는 방선균(*Actinomycetes*)은 환경에 널리 퍼져있다; 이들은 전세계적으로 흙, 바다, 유기 물질에서 분리할 수 있다(McNeil and Brown 1994). 스트렙토마이세스의 패밀리는 생물활성 화합물, 중요한 항생제, 효소, 효소 억제제, 및 약리학적 활성 물질의 풍부한 자원이다(Chun *et al.* 1997; Labeda *et al.* 1997; Xu *et al.* 2004). 장출혈 대장균 O157:H7은 방선균이 지배적인 흙 속에서 발견되기 때문에 장출혈 대장균 O157:H7은 방선균을 만날 가능성이 높다(McNeil and Brown 1994).
- [0009] 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 항생내 내성을 획득할 수 있는 중요한 인간 병원균이다. 스태필로코커스 아우레우스는 전세계적인 의인성 감염 발생의 원인균이다(Lowy 1998). 스태필로코커스 아우레우스에서의 항생제 내성의 중요한 기전 중의 하나가 생물막 형성이다. 그러므로, 박테리아가 약제 내성을 발달시키지 않으면서 생물막을 억제하고 분해하는 무독성 화합물을 발견하기 위해 어떻게 스태필로코커스 아우레우스가 생물막을 통제하는지 이해하는 것은 중요하다.
- [0010] 스태필로코커스 아우레우스는 그램 양성(Gram positive) 세균으로서 화농, 농양형성, 다양한 화농성 감염, 패혈증을 유발하는 병원성 미생물이다. 국내에서 조사된 항생제 메틸실린에 대한 내성률이 평균 73%로 세계 최고 수준인 매우 위험한 병원균이다. 이는 항생제를 써도 죽지 않는 스태필로코커스 아우레우스가 73%가 된다는 뜻으로 내성이 매우 심각한 병원균이라고 할 수 있다. 또한, 스태필로코커스 아우레우스는 생물막을 형성할 수 있는 종이 많으며 생물막이 생성되면 약물 침투가 불가능하여 고질적인 감염 양상을 나타낸다. 이러한 때문에, 스태필로코커스 아우레우스에 의한 생물막이 형성되면 만성적 감염증을 초래한다(FEMS Microbiology Letters 252: 89-96, 2005). 생물막이 형성된 스태필로코커스 아우레우스에 의해 유발된 질환의 치료는 다른 세균에 의해 형성된 생물막으로 인한 질환의 치료에 비해서도 특히 어렵다. 왜냐하면, 질환의 치료를 위해 약물을 사용해도 생물막으로 인한 약물전달의 어려움이 있을 뿐 아니라 설사 약물이 전달 되었다 할지라도 내성균주가 많은 스태필로코커스 아우레우스의 특성상 기존 항생제에 기반한 치료는 효과적이지 않다. 따라서 스태필로코커스 아우레우스에 의해 형성된 생물막 처치는 기존 항생제에 의존한 방법이 아닌 새로운 물질에 의한 접근이 필요하다. 스태필로코커스 아우레우스에 의해 형성된 생물막 처치에 관련하여 여러 가지 시도가 있었으나 뚜렷하게 효과적인 방법은 없었다. 그나마 다소 효과적인 시도는 리소스타핀(lysostaphin)을 이용하는 것으로서 리소스타핀이 스태필로코커스 아우레우스에 의해 형성된 생물막 제거에 활용될 수 있음이 보고된 적이 있다(Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003). 리소스타핀은 스태필로코커스 아우레우스에서 얻어지는 항균성 효소로서 스태필로코커스 아우레우스의 세포막을 파괴할 수 있는 효소이다. 이는 글리실글리신 엔도펩티데이즈(glycylglycine endopeptidase)로서 스태필로코커스 아우레우스의 펩티도글리칸(peptidoglycan) 구조에서 발견되는 펜타글리신 결합(pentaglycine cross bridges)을 특이적으로 자른다. 따라서 리소스타핀은 스태필로코커스 아우레우스에 대한 특이 항생제(extremely potent anti-Staphylococcal agent)로의 개발 가능성을 가지고 있다고 할 수 있다. 그러나, 비록 리소스타핀이 우수한 효능을 가지고 있기는 하지만 완벽하다고 할 수는 없다. 스태필로코커스 아우레우스 중에는 리소스타핀에 민감하지 않은 것(lysostaphin-resistant strain)이 상당히 존재한다(J Clin Microbiol 11: 724-727, 1980; Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003). 즉, 스태필로코커스 아우레우스들의 리소스타핀 감수성(lysostaphin sensitivity)이 서로 다르기 때문에 리소스타핀이 모든 스태필로코커스 아우레우스에서 효과적일 것으로 기대하기는 어렵다. 이에 더하여 또 다른 문제는 리소스타핀에 내성을 획득한 스태필로코커스 아우레우스가 생기고 있다는 것이다. 이러한 리소스타핀에 내성을

획득한 변종을 리소스타핀-저항성 스태필로코커스 아우레우스 변종(lysostaphin-resistant *Staphylococcus aureus* variants)이라 부른다(Antimicrob Agents Chemother 51: 475-482, 2007). 이들의 리소스타핀에 대한 내성 획득의 기작은 아직 정확히 밝혀져 있지는 않지만 보고된 한 가지 기작은 다음과 같은 것이 있다. FemA 유전자에 돌연변이가 생겨서 비활성의 FemA 단백질(nonfunctional FemA protein)이 발현되어 펩티도글리칸 구조에 모노글리신 결합(monoglycine cross bridges)이 생겨 리소스타핀의 작용을 무력화시킨다는 것이다(J Bacteriol 188: 6288-6297, 2006). 이러한 리소스타핀의 단점을 극복하기 위한 시도로 리소자임(lysozyme) 같은 다른 효소나, 또는 메티실린(methicillin), 옥사실린(oxacillin), 반코마이신(vancomycin) 등의 항생물질과 리소스타핀을 함께 사용하는 것에 대한 연구가 활발하다(Antimicrob Agents Chemother 21: 631-535, 1982; J Antimicrob Chemother 59: 759-762, 2007; Folia Microbiol (Praha) 51: 381-386, 2006). 그러나 이러한 물질을 함께 사용한다 할지라도 리소스타핀 감수성이 낮은 스태필로코커스 아우레우스 혹은 리소스타핀 내성을 획득한 변종으로 이루어진 생물막이라면 역시 효과적인 생물막제거가 불가능함은 마찬가지이다. 결국, 리소스타핀의 단점을 보완해 줄 수 있는 새로운 물질의 개발이 필요하다 할 것이다. 이러한 목적에 맞는 물질은 단독 사용, 또는 리소스타핀이나 기존 항생제와 함께 병용될 수 있을 것이다. 특히 리소스타핀이나 다른 항생제와는 다른 기작으로 항균 효과를 발휘할 수 있다면 더욱 바람직하다.

[0011] 스태필로코커스 아우레우스의 생물막 형성 및 분해에 관여하는 다양한 기전 및 환경적 조건은 퀴럼 센싱(quorum sensing), 프로테아제, DNase, 시스-2-디세논 산(cis-2-decenoic acid), D-아미노산, 페놀-용해성 폴리펩타이드 및 pH 변화를 포함한다(Boles and Horswill 2011). 특히, 스태필로코커스 아우레우스에서의 프로테아제는 agr 퀴럼-센싱 시스템(agr quorum sensing system)(Vuong *et al.* 2000; Boles and Horswill 2008)을 통해서 자신의 생물막 형성을 억제하고 발달된 생물막을 분해한다. 스태필로코커스 에피더미스(*S. epidermidis*)에서의 세린 프로테아제(serine protease)는 스태필로코커스 에피더미스의 생물막 형성을 억제한다(Iwawse *et al.* 2010).

[0012] 최근에는 방선균이 몇몇 병원성 세균의 생물막을 억제하는 화합물을 생산하는 것으로 보고 되었는데, 예를 들면 88 마린 방선균(88 marine *Actinomycetes*)를 스크리닝하여 확인된 스트렙토마이세스 알부스(*Streptomyces albus*)추출물이 비브리오 하비(*Vibrio harvey*)의 생물막 형성을 억제한다(You *et al.* 2007). 그러나 이들의 생물막을 감소시키는 기전 및 이들 항생물질 화합물의 정보에 대해서는 알려지지 않았으며, 박테리아에 의한 항생물질 활성을 가지는 본 발명에서의 균주는 알려지지 않았다

[0013] 이에 본 발명자들은 박테리아에 대한 무독성 생물막 억제제를 확인하기 위하여 4,104개 방선균 분리주의 라이브러리를 스크리닝하였다. 생물막 억제의 분자적 기초는 DNA 마이크로어레이(DNA microarrays), 표현형 어레이(phenotype arrays), 주사전자현미경(scanning electron microscopy)(SEM)를 이용하여 연구하였다. 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액 및 로도코커스속 BFI 332로부터 생산된 인돌-3-아세트알데하이드는 펄브리아(fimbria)의 형성을 억제함으로써 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0014] 본 발명의 목적은 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 인돌-3-아세트알데하이드를 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용 조성물, 의료세정용 조성물 또는 환경정화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 생물막 형성 방지 또는 억제제를 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 활성을 가지는 방선균류(*Actinomycetes*)에 속하는 신규한 로도코커스속 BFI 332 균주(KCTC 12188BP)를 제공하는 것이다.



- [0018] 본 발명의 다른 목적은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용, 의료세정용, 환경정화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적은 상기 생물막 형성 방지 또는 억제 조성물을 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0021] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인돌-3-아세트알데하이드가 생물막 형성에 중요한 역할을 하는 켈리를 억제하는 효과를 가져 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명은 인돌-3-아세트알데하이드를 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용 조성물, 의료세정용 조성물, 환경정화용 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 활성을 가지는 방선균류(*Actinomycetes*)에 속하는 신규한 로도코커스속 BFI 332 균주(KCTC 12188BP)를 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용, 의료세정용, 환경정화용 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 생물막 형성 방지 또는 억제 조성물을 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0028] 본 발명에 따른 로도코커스속 BFI 332의 배양액 및 이로부터 유래한 인돌-3-아세트알데하이드는 박테리아의 펴브리아(fimbria)의 형성을 억제하고 생물막 형성에 중요한 역할을 하는 켈리 생산을 감소시킴으로써 박테리아에 의한 생물막 형성을 방지 또는 억제하는 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0029] 도 1은 로도코커스속(*Rhodococcus* sp.) BFI 332 균주의 배양액이 장출혈 대장균(*E. coli*) 0157:H7 의 생물막형성을 감소시키는 것을 나타내는 그래프이다: 생물막형성은 로도코커스속 BFI 332 균주배양액이 첨가된 LB배지에서 37℃로 24시간 동안 반응시킨 후 570nm에서 측정하였고 세포의 성장은 96-웰 플레이트(well plate)에서 620nm에서 측정하였다; 최소 두 번의 실험을 실시하였으며 (총 12 웰), error bar는 표준편차를 나타낸다.
- 도 2는 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액에 대한 용매 추출물, 프로테이나제 K 및 열처리의 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 장출혈 대장균(*E. coli*)0157:H7의 생물막 형성에 대한 인돌 유도체의 효과를 나타낸 그래프이다: (A) 트립토판(Tryptophane)(Trp), 인돌(indole)(Ind), 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid)(IAA), 인돌-3-젖산(indole-3-lactic acid)(ILA), 인돌-3-피루브산(indole-3-pyruvic acid)(IPyA) 및 인돌-3-아세트알데하이드(indole-3-acetaldehyde)(IAAld)가 100 µg/ml 사용되었고, 생물막 형성은 LB배지에서 37℃로 24시간 동안 반응시킨 후 570nm에서 측정하였고, 세포의 성장은 96-웰 플레이트에서 620nm에서 측정하였다; (B) 인돌-3-아세트알데하이드(Indole-3-acetaldehyde)(IAAld) 사용량에 따른 장출혈 대장균(*E. coli*)0157:H7의 생물막 형성을 나

타내며, 인돌과 그 유도체들은 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO 를 대조군(none)으로 사용하였다.

도 4는 로도코커스속(*Rhodococcus* sp.) BFI 332 균주 배양액의 HPLC 크로마토그램이다: 검은색 선은 로도코커스속 BFI 332 균주 배양액이고 빨간색 선은 순수한 인돌-3-아세트알데하이드(indole-3-acetaldehyde)(IAAId, 100 µg/mL) 와 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid)(IAA, 25 µg/mL) 이며, 검출 시간 7.8 분에 나타난 피크는 IAAId, 47.9 분은 IAA에 해당한다.

도 5는 인돌-3-아세트알데하이드(Indole-3-acetaldehyde)(IAAId in 100 µg/mL)의 존재 유무(흰 막대;무, 검은 막대;유)에 따른 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 세포의 전사체 발현을 상대비교한 그래프이다: 유전자 발현 프로파일은 qRT-PCR로 측정하였고, 발현량에 대한 상대적인 배수는 IAAId가 없을 때의 값을 1로 비교하였다.

도 6은 로도코커스속 BFI 332 균주와 인돌-3-아세트알데하이드(IAAId)의 컬리 섬유질 생산에 대한 효과를 나타낸 주사전사현미경 사진이다: 컬리 생산은 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 세포에 로도코커스 BFI 332 (1%) 와 인돌-3-아세트알데하이드(IAAId 100 µg/mL) 처리 유무에 따라 주사전사현미경으로 관찰하였고, 생물막 세포는 96-웰 플레이트 나일론 막(nylon membrane) 위에서 37°C로 24시간 배양하였다.

도 7은 그람양성세균과 그람음성세균을 로도코커스속 BFI 332 균주배양액(1%)을 처리한 LB배지에서 37°C로 24시간 배양하였을 때의 생물막 형성능을 상대적으로 비교한 그래프이다: 스타필로코커스아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(G+), 스타필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis*)(G+), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)(G-) 및 녹농균 슈도모나스 아에루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)PAO1(G-)를 배양액의 존재 유무에 따라 시험하였고, 총 생물막형성(OD<sub>570</sub>) 및 세포성장 (OD<sub>620</sub>)을 배양액을 첨가하지 않은 것과 비교하였다.

도 8은 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액 및 인돌-3-아세트알데하이드의 존재하에서 장출혈 대장균 O157:H7의 세포성장을 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0030] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "방지" 및 "억제"는 본 발명의 조성물의 투여로 생물막의 형성을 지연키거나 생성된 생물막을 분해시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 박테리아에 의한 생물막 형성이 억제될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0036] 본 발명은 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제 활성을 가지는 방선균류(*Actinomycetes*)에 속하는 신규한 로도코커스속 BFI 332 균주(KCTC 12188BP)을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 일실시예에 있어서, 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 억제 활성을 가지는 방선균주를 찾아내기 위해 방선균 라이브러리 스크리닝을 하였다. 시험된 4,104개 방선균 배양 상등액 중에서, 4개의 배양상등액이 강한 장출혈 대장균 O157:H7에 대한 생물막 억제 활성을 나타냈으며, 그 중에서 한 개의 용량-의존적인 양상으로 가장 유의적으로 생물막 형성을 억제하는 균주를 찾았다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 있어서 가장 유의적으로 생물막 형성을 억제하는 균주를 동정하기 위해 16S rRNA 유전자

염기서열을 결정하였다. 그 결과, 거의 완전한 16S rRNA 유전자 염기서열이 결정되었고, GenBank 데이터 베이스에 대한 BLAST 검색을 하여 상기 유전자 서열이 로도코커스종의 모든 특징적인 뉴클레오타이드(signature nucleotide)를 포함하고 있으며, 로도코커스와 가장 가깝게 연관된 것은 98.44%의 염기서열 유사성(1,346개 중 21개의 뉴클레오타이드만 다름)을 가지는 로도코커스 파시안스(*Rhodococcus fascians*)임을 확인하였다. 또한 상기 균주를 16S rRNA 유전자 염기서열의 유사성에 근거하여, 로도코커스속 BFI 332로 명명하였고, 2012년 5월 2일 한국생명자원센터(KCTC)에 KCTC 12188BP로 기탁하였다.

[0039] 또한 본 발명은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 박테리아는 그람 음성균 또는 그람 양성균을 포함할 수 있다.

[0041] 상기 그람 양성균은 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만 보테텔라속(genus *Bordetella*), 슈도모나스속(genus *Pseudomonas*), 버크홀데리아속(genus *Burkholderia*), 에어로모나스속(genus *Aeromonas*), 플레시오모나스속(genus *Plesiomonas*), 비브리오속(genus *Vibrio*), 모락셀라속(genus *Moraxella*), 네이세리아속(genus *Neisseria*), 악티노바실러스속(genus *Actinobacillus*), 만하이미아속(genus *Mannheimia*), 파스테우렐라속(genus *Pasteurella*), 해모필러스속(genus *Haemophilus*), 히스토필러스속(genus *Histophilus*), 테일로렐라속(genus *Taylorella*), 브루셀라속(genus *Brucella*), 프란시셀라속(genus *Francisella*), 에스케리치아속(genus *Escherichia*), 시겔라속(genus *Shigella*), 클레비시엘라속(genus *Klebsiella*), 엔테로박터속(genus *Enterobacter*), 시트로박터속(genus *Citrobacter*), 프로테우스속(genus *Proteus*), 모가넬라속(genus *Morganella*), 에드워드시엘라속(genus *Edwardsiella*), 살모넬라속(genus *Salmonella*) 또는 예르시니아속(genus *Yersinia*)을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스태필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis*)이다.

[0042] 상기 그람 음성균은 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만 액티노마이세스속(genus *Actinomyces*), 아카노박테리움속(genus *Arcanobacterium*), 바실러스속(genus *Bacillus*), 코리니박테리움속(genus *Corynebacterium*), 더마토폴리스속(genus *Dermatophilus*), 노카디아속(genus *Nocardia*), 리스테리아속(genus *Listeria*), 에리시켈로트릭스속(genus *Erysipelothrix*), 마이코박테리움속(genus *Mycobacterium*) 또는 로도코커스속(genus *Rhodococcus*)을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) PA01 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 장출혈 대장균 O157:H7이 본 발명에 사용되었다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 있어서, 크리스탈 바이올렛 생물막 어세이에서, 로도코커스속 BFI 332 배양상등액은 그람 양성균인 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미스, 그람 음성균인 대장균, 살모넬라 티피무리움, 녹농균의 생물막 형성을 유의적으로 감소시켰다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 있어서, 대장균 O157:H7 성장에 대한 독성을 확인하기 위해 LB 배지에서 성장물을 측정된 결과, 로도코커스속 BFI 332는 대장균 O157:H7의 성장을 억제하지 않았다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 있어서, 생물막 형성에 중요한 역할을 하는 켈리 생산을 주사전자현미경을 이용하여 조사한 결과, 로도코커스속 BFI 332는 유의적으로 대장균 O157:H7에서 켈리 생산을 감소시켰다. 또한 대수기 성장 또는 정지기 성장에서는 세포외 인돌 농도에 영향을 미치지 않았으며, 이것은 로도코커스속 BFI 332 배양상등액에 의한 생물막 억제가 감소된 켈리 형성에 의한 것이지 인돌 생성과는 관련이 없다는 것을 나타낸다.

[0046] 따라서 본 발명에 따른 로도코커스속 BFI 332(KCTC 29017) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 조성물은 세포의 성장에 영향을 미치지 않아 항생제 내성이 발달할 수 있는 확률을 줄이면서, 켈리 생산 감소에 의한 생물막 형성을 억제하므로 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 상술한 바와 같이 박테리아 의해 형성된 생물막을 효과적으로 제거할 수 있으므로, 박테리아에 의한 생물막 형성으로 인해 만성화된 병원성 세균에 의한 다양한 질환, 예컨대 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균혈증, 심내막염, 및 장염 등에 대한 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0048] 이러한 목적의 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가

로 포함될 수 있다. 기존의 다른 항생제 또는 기타의 효능이 입증된 물질과 병용될 경우에는 본 발명의 조성물이 생물막을 억제하거나 분해하여 기존 항생제나 기타의 효능이 입증된 물질이 초기 목적대로 효능을 발휘할 수 있게 된다. 본 발명에서 조성물의 의료용 치료 용도에 있어, 조성물의 유효 용량은 보통으로 숙련된 의사가 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 특정 용량은 치료하고자 하는 인간을 포함한 동물의 일령 또는 연령, 체중 및 임상 증상과 투여방법에 의해 좌우된다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무, 분사 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0049] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수도 있으며, 비경구 투여의 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수도 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 본 발명의 조성물의 세균 관련한 질환의 치료에의 활용은 기존의 항생제에 기반한 치료에 비해 추가적 이점을 제공한다.

[0050] 또한 본 발명은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 소독용, 의료세정용 또는 환경정화용 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명의 로도코커스속 BFI 332 또는 이의 배양액은 박테리아에 의한 생물막 형성을 억제하므로 이를 유효성분으로 함유하는 소독용, 의료세정용 또는 환경 정화용 조성물에 유용하게 이용될 수 있다. 이러한 목적의 조성물에는 추가적 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있으며, 통상의 소독용, 의료세정용, 환경 정화용 조성물에 들어가는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 조성물을 스프레이 형태로 생물막 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생물막 형성 부위외의 도포, 분무 또는 분사하는 방법을 포함할 수도 있다.

[0052] 또한 본 발명은 로도코커스속 BFI 332(KCTC 29017) 또는 이의 배양액을 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공한다.

[0053] 거의 대부분의 박테리아는 표면에 밀착하여 증식할 수 있는데 이런 경우 단일막을 형성하거나, 응집체를 형성하거나 또는 생물막 (biofilm)을 형성한다. 생물막은 미생물이 분비한 세포외 다량체 기질(Extracellular Polymeric Matrix)과 증식한 박테리아로 구성된 입체적 구조물로서, 생체조직을 포함하는 거의 모든 종류의 고체표면에 형성될 수 있다. 이러한 생물막은 주위에서 흔히 접할 수 있는 생체, 의학 및 산업 환경에서 흔히 발견된다. 생체에서 서식할 수 있는 병원성 박테리아의 경우 숙주의 상피세포, 뼈, 치아, 및 혈관내벽 등을 포함하는 각종 조직/기관 및 각종 인공 삽입 보형물(catheter, implant), 각종 의학기구/장비/설비 등에 생물막을 형성할 수 있다. 생물막이 형성되면 박테리아는 가혹한 환경에서도 잘 견디는 것은 물론, 항생제 및 면역세포에 대하여 강한 저항력을 가지기 때문에 제거가 매우 어려우며, 만성 염증 질환의 원인이 되기도 하며, 물체의 경우 부식(microbiologically induced corrosion)을 유발한다. 따라서 박테리아에 의한 부식 방지 또는 병원성 박테리아에 의한 감염의 방지/치료에 있어, 생물막 형성의 제어는 매우 중요하다.

[0054] 따라서 본 발명의 상기 박테리아와의 접촉은 이에 한정되는 것은 아니지만 상기 생물막 형성 방지 또는 억제 조성물을 표면에 처리하거나 개체에 투여하는 것일 수 있다.

- [0055] 본 발명의 조성물을 표면에 처리하는 방법에 있어서, 상기 표면은 이에 한정되는 것은 아니지만 배수관, 글레이즈세라믹, 포설린, 유리, 금속, 나무, 크롬, 플라스틱, 비닐 또는 폼카로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 또는 그 이상의 조합을 포함할 수 있다.
- [0056] 또한 박테리아에 의한 생물막은 의료 분야에서 카테터(catheters), 심장 판막(heart valves), 단락(shunts), 보철기구(prosthetic devices) 같은 대부분의 삽입된 인공 표면(implanted artificial surfaces)에서 발견된다 (New Microbiol 22: 337-341, 1999; J Med Microbiol 50: 582-587, 2001; Infections Associated with Indwelling Medical Devices, pp. 55-88, 2000, ASM, Washington, DC). 그래서 삽입용 의료 장치(implantable medical devices)는 항-박테리아제(antibacterial agent)로 코팅하는 것이 바람직하다. 통상 인공 삽입물(implant)의 경우 생물막이 형성되면 외과적 수술로 제거하는 방법이 유일한 방법이기 때문에 생물막 형성을 막는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다.
- [0057] 따라서 본 발명의 조성물을 표면에 처리하는 방법에 있어서, 상기 표면은 이에 한정되는 것은 아니지만 바람직하게는 생물체 유래의 조직 또는 기관, 또는 의료용 물건의 표면일 수 있다.
- [0058] 본 발명은 인돌-3-아세트알데하이드(indole-3-acetaldehyde)를 유효성분으로 함유하는 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인돌-3-아세트알데하이드는 로도코커스속(*Rhodococcus* sp.) 유래일 수 있으며, 바람직하게는 로도코커스 파시안스(*R. fascians*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 로도코커스속 BFI 332(KCTC 12188BP)이다.
- [0060] 본 발명의 일실시예에 있어서, 로도코커스속 BFI 332의 대장균 생물막 감소에 영향을 미치는 성분의 성질을 알아보기 위해 용매 추출을 수행하여 활성 항생물막 성분이 소수성이라는 것을 확인하였다. 이어서, 프로테이나제 K 및 열처리를 수행하여 항생물막 활성이 유지되고 있다는 것을 확인하여 활성 항생물막 성분이 펩타이드 또는 단백질이 아니라는 것을 확인하였다.
- [0061] 본 발명의 일실시예에 있어서, 로도코커스속 BFI 332의 활성 항생물막 성분을 동정하기 위해 HPLC를 이용하였다. 그 결과 상기 성분이 인돌-3-아세트알데하이드 및 인돌-3-아세트산임을 확인하였다. 인돌-3-아세트알데하이드 및 인돌-3-아세트산과 같은 인돌 유도체들은 로도코커스 파시안스로부터 생산된 것일 수 있다 (Vandeputte *et al.* 2005).
- [0062] 상기 박테리아는 그람 음성균 또는 그람 양성균을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 그람 양성균은 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만 보테텔라속(genus *Bordetella*), 슈도모나스속(genus *Pseudomonas*), 버크홀데리아속(genus *Burkholderia*), 에어로모나스속(genus *Aeromonas*), 플레시오모나스속(genus *Plesiomonas*), 비브리오속(genus *Vibrio*), 모락셀라속(genus *Moraxella*), 네이세리아속(genus *Neisseria*), 악티노바실러스속(genus *Actinobacillus*), 만하이미아속(genus *Mannheimia*), 파스테우렐라속(genus *Pasteurella*), 해모필러스속(genus *Haemophilus*), 히스토필러스속(genus *Histophilus*), 테일로렐라속(genus *Taylorella*), 브루셀라속(genus *Brucella*), 프란시셀라속(genus *Francisella*), 에스케리치아속(genus *Escherichia*), 시겔라속(genus *Shigella*), 클레비시엘라속(genus *Klebsiella*), 엔테로박터속(genus *Enterobacter*), 시트로박터속(genus *Citrobacter*), 프로테우스속(genus *Proteus*), 모가넬라속(genus *Morganella*), 에드워드시엘라속(genus *Edwardsiella*), 살모넬라속(genus *Salmonella*) 또는 예르시니아속(genus *Yersinia*)을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스타필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis*)이다.
- [0064] 상기 그람 음성균은 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만 액티노마이세스속(genus *Actinomyces*), 아카노박테리움속(genus *Arcanobacterium*), 바실러스속(genus *Bacillus*), 코리니박테리움속(genus *Corynebacterium*), 더마토폴러스속(genus *Dermatophilus*), 노카디아속(genus *Nocardia*), 리스테리아속(genus *Listeria*), 에리시펠로트릭스속(genus *Erysipelothrix*), 마이코박테리움속(genus *Mycobacterium*) 또는 로도코커스속(genus *Rhodococcus*)을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피무리움(*Samonella typhimurium*) 또는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) PA01 이며, 더욱 바람직하게는 대장균 0157:H7이다.
- [0065] 본 발명의 일실시예에 있어서, 크리스탈 바이올렛 생물막 어세이에서, 인돌-3-아세트알데하이드는 그람 양성균인 스타필로코커스 아우레우스, 스타필로코커스 에피더미스, 그람 음성균인 대장균, 살모넬라 티피무리움, 녹농

균의 생물막 형성을 유의적으로 감소시켰다.

- [0066] 본 발명의 일실시예에 있어서, 인돌-3-아세트알데하이드는 가장 효과적으로 생물막 형성을 억제하였고, 다른 인돌 유도체의 생물막 형성 억제 활성보다 현저하였다.
- [0067] 본 발명의 일실시예에 있어서, 대장균 O157:H7 성장에 대한 독성을 확인하기 위해 LB 배지에서 성장물을 측정된 결과, 인돌-3-아세트알데하이드는 대장균 O157:H7의 성장을 억제하지 않았다.
- [0068] 본 발명의 일실시예에 있어서, 생물막 형성에 중요한 역할을 하는 켈리 생산을 주사전자현미경을 이용하여 조사한 결과, 인돌-3-아세트알데하이드는 유의적으로 대장균 O157:H7에서 켈리 생산을 감소시켰다. 또한 대수기 성장 또는 정지기 성장에서는 세포의 인돌 농도에 영향을 미치지 않았으며, 이것은 인돌-3-아세트알데하이드에 의한 생물막 억제가 감소된 켈리 형성에 의한 것이지 인돌 생성과는 관련이 없다는 것을 나타낸다.
- [0069] 따라서 본 발명에 따른 인돌-3-아세트알데하이드는 세포의 성장에 영향을 미치지 않아 항생제 내성이 발달할 수 있는 확률을 줄이면서, 켈리 생산 감소에 의한 생물막 형성을 억제하므로 박테리아에 의한 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 생물막 형성 방지 또는 억제용 약학적 조성물은 상술한 바와 같이 박테리아 의해 형성된 생물막을 효과적으로 제거할 수 있으므로, 박테리아에 의한 생물막 형성으로 인해 만성화된 병원성 세균에 의한 다양한 질환, 예컨대 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균혈증, 심내막염, 및 장염 등에 대한 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0071] 이러한 생물막 형성 방지 또는 억제 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있다. 기존의 다른 항생제 또는 기타의 효능이 입증된 물질과 병용될 경우에는 본 발명의 조성물이 생물막을 억제하거나 분해해 줌으로 기존 항생제나 기타의 효능이 입증된 물질이 초기 목적대로 효능을 발휘할 수 있게 된다. 본 발명에서 조성물의 의료용 치료 용도에 있어, 조성물의 유효 용량은 보통으로 숙련된 의사가 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 특정 용량은 치료하고자 하는 인간을 포함한 동물의 일령 또는 연령, 체중 및 임상 증상과 투여방법에 의해 좌우된다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무, 분사 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수도 있으며, 비경구 투여의 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수도 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 본 발명의 조성물의 세균 관련한 질환의 치료에의 활용은 기존의 항생제에 기반한 치료에 비해 추가적 이점을 제공한다.
- [0073] 또한 본 발명의 인돌-3-아세트알데하이드는 이를 유효성분으로 함유하는 소독용 조성물, 의료세정용 조성물 또는 환경 정화용 조성물로 제공될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 인돌-3-아세트알데하이드는 박테리아에 의한 생물막 형성을 억제하므로 이를 유효성분으로 함유하는 소독용 조성물, 의료세정용 조성물 또는 환경 정화용 조성물에 유용하게 이용될 수 있다. 이러한 목적의 조성물에는 추가적 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있으며, 통상의 소독용 조성물, 의료세정용 조성물, 환경 정화용 조성물에 들어가는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 소독용 조성물, 의료세정용 조성물 또는 환경 정화용 조성물을 스프레이 형태로 생물막 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에

뿌리는 방법을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물을 생물막 형성 부위에의 도포, 분무 또는 분사하는 방법을 포함할 수도 있다.

- [0075] 또한 본 발명은 인돌-3-아세트알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 박테리아와 접촉하는 단계를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 억제 방법을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 생물막 형성 방지 또는 억제제의 박테리아와의 접촉은 이에 한정되는 것은 아니지만 인돌-3-아세트알데하이드를 표면에 처리하거나 개체에 투여하는 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물을 표면에 처리하는 방법에 있어서, 상기 표면은 이에 한정되는 것은 아니지만 배수관, 글레이즈세라믹, 포슬린, 유리, 금속, 나무, 크롬, 플라스틱, 비닐 또는 포미카로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 또는 그 이상의 조합을 포함할 수 있다.
- [0078] 또한 박테리아에 의한 생물막은 의료 분야에서 카테터(catheters), 심장 판막(heart valves), 단락(shunts), 보철기구(prosthetic devices) 같은 대부분의 삽입된 인공 표면(implanted artificial surfaces)에서 발견된다 (New Microbiol 22: 337-341, 1999; J Med Microbiol 50: 582-587, 2001; Infections Associated with Indwelling Medical Devices, pp. 55-88, 2000, ASM, Washington, DC). 그래서 삽입용 의료 장치(implantable medical devices)는 항-박테리아제(antibacterial agent)로 코팅하는 것이 바람직하다. 통상 인공 삽입물(implant)의 경우 생물막이 형성되면 외과적 수술로 제거하는 방법이 유일한 방법이기 때문에 생물막 형성을 막는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다.
- [0079] 따라서 본 발명의 조성물을 표면에 처리하는 방법에 있어서, 상기 표면은 이에 한정되는 것은 아니지만 바람직하게는 생물체 유래의 조직 또는 기관, 또는 의료용 물건의 표면일 수 있다.
- [0080] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0081] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**인돌-3-아세트알데하이드의 생물막 억제 활성 분석**

**<실시예 1> 균주의 준비 및 배양**

모든 실험은 37°C에서 수행하였고, LB(Luria-Bertani) 배지(Sambrook et al. 1989)를 이용하여 장출혈 대장균 O157:H7, 녹농균 PA01, 포도상구균 (ATCC 25923), 포도상구균 (ATCC 6538), 스타필로코커스 에피더미스(ATCC 14990), 살모넬라 티피머리움(한국미생물보존센터 #11862)을 배양하였다. 한국생명공학연구원(대전, 대한민국) 내의 생명자원센터로부터 얻은 토양 방선균으로부터 얻어진 방선균 라이브러리(Actinomycetal library)를 생물막 억제제를 스크리닝 하는데 이용하였다. 초기에 대한민국의 토양에서 분리된 방선균주는 28°C에서 7일 동안 리터당(pH 7.0) 10g 글루코스, 1g 효모 추출물(Difco), 2g 펩톤(Difco), 1g 쇠고기 추출물(Difco) 및 15g 아가(agar)를 포함하는 베넷 아가(Bennett's agar) 플레이트에서 배양하였다. 모든 방선균주는 GSS 배지에서 배양되었다(pH 7.2에서 리터당 10g 수용성 녹말, 20g 포도당, 25g 콩분말, 1g 쇠고기 추출물, 4g 효모균 추출물, 2g 염화나트륨, 0.25g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 2g CaCO<sub>3</sub>). 방선균의 배양상등액(spent media) 배양은 이용될 때까지 4°C에서 보관되었다. 방선균 상등액은 생물막 어세이(biofilm assay)에서 이용되기 전에 모든 방선균 세포를 제거하기 위해 0.45 μm 필터에서 여과되었다. 크리스탈 바이올렛, 카사미노산(casamino acid), 숙시닌산(succinic acid), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 프로테이나제 K(proteinase K) 및 소듐 포스페이트(sodium phosphate)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich Co.)(미주리, 미국)에서 구입하였다. 세포성장 측정을 위해서 분광광도계(UV-160, 시마주, 일본)를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 최소한 두 개의 독립적인 배양에서 수행되었다.

**<실시예 2> 대장균 O157:H7 생물막 형성을 억제하는 방선균 라이브러리(library) 스크리닝**

대장균 O157:H7 생물막 억제 활성을 가지는 새로운 화합물을 동정하기 위해 4,104개의 토양 방선균주로부터의 배양상등액(spent medium)을 96 웰 플레이트를 이용하여 스크리닝하였다. 생물막 형성 어세이(assay)는 96-웰

폴리스티렌(polystyrene) 플레이트(SPL 생명과학, 대한민국)에서 수행되었다(Pratt and Kolter 1998). 간단히 설명하면, 총 300  $\mu$ l LB 배지에 있는 세포를 600nm에서 0.05의 최초 혼탁도에서 집중되었고, 방선균 상등액 및 인돌 유도체와 함께 또는 없이 24시간 동안 진탕(shaking) 없이 37°C에서 배양되었다. 크리스탈 바이올렛으로 염색된 생물막은 95% 에탄올에 용해되었고, 총 생물막 덩어리의 수량화를 위해 570nm(OD<sub>570</sub>)에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 96-웰 플레이트에 있는 세포 성장을 620nm(OD<sub>620</sub>)에서 측정하였다. 각각의 데이터 포인트는 최소한 12 복제 웰(replicate wells)로부터 평균을 내었다(각 최소한 두 개의 독립적인 배양으로부터 6개의 웰).

[0087] 그 결과, 시험된 4,104개의 방선균 배양상등액 중에서, 4개의 배양상등액이 대장균에 비해 70%이상 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 형성을 억제하였다. 특히 방선균주 #2008-332는 24시간 후의 용량-의존적인 방법에 있어서 가장 유의적으로 생물막 형성을 억제하였다(도 1). 특히 1% 배양상등액에서 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 95%까지 감소시켰다. 그러므로 생물막 형성의 기전을 연구하는데 #2008-332에 초점을 두었다.

[0088] <실시예 3> 활성형 방선균주의 동정

[0089] 상기 언급된 게놈 DNA는 Tomaoka 및 Komagata(1984)의 논문에서 사용된 방법을 이용하여 제조되었다. 16S rRNA 유전자는 포워드 프라이머(forward primer) Eubac 27F 및 리버스 프라이머(reverse primer) 1492R와 함께 PCR을 이용하여 증폭하였다(Delong, 1992). PCR-증폭 DNA의 직접적인 염기서열 결정은 자동화된 DNA 시퀀서(sequencer)(ABI 3730XL, Applied Biosystems)를 이용하여 수행되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 대략적인 계통발생학적 위치를 결정하기 위해 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 이용하여 GenBank로부터 얻은 염기서열과 비교하였다. 염기서열 유사성 값은 EzTaxon 서버(<http://www.extaxon.org/>; Chun et al. 2007)를 이용하여 계산되었다.

[0090] 그 결과, 균주 #2008-332(1,346 뉴클레오타이드)의 거의 완전한 16S rRNA 유전자 염기서열이 결정되었다(GenBank accession number JN807761)(서열번호 1). GenBank 데이터 베이스에 대한 BLAST 검색을 하여 이것이 로도코커스종의 모든 특징적인 뉴클레오타이드(signature nucleotides)를 포함하고 있는 것을 확인하였다. 로도코커스와 98.44%의 염기서열 유사성(1,346개 중 21개의 뉴클레오타이드만 다름)을 가지는 것은 로도코커스 파시안스(*Rhodococcus fascians*) DSM 20669<sup>T</sup>(Genbank accession number X79186)였다. 16S rRNA 염기서열에서의 유사도에 근거하여 #2008-332를 로도코커스속 BFI 332로 명명하였고, 2012년 5월 2일, 한국생명공학연구원 내 한국생명자원센터(KCTC)에 KCTC 12188BP로 기탁하였다.

[0091] <실시예 4> 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액에서의 활성 항생물막 성분의 동정

[0092] 로도코커스속 BFI 332의 어떠한 성분이 대장균 생물막 감소에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 배양상등액의 용매 추출을 메탄올, 헥산, 에틸 아세테이트, 에틸 에테르, 클로로폼을 이용하여 수행하였다. 용매 추출물 어떠한 것도 항생물막 활성을 보이지 않았지만 용매 추출 이후의 수용성 잔여물(aqueous residue)은 항생물막 활성(도 2)을 보였다는 것은 활성 항생물막 성분이 친수성이라는 것을 의미한다.

[0093] 배양상등액의 활성형 생물막 성분의 성질을 이해하기 위해, 이것을 프로테이나제 K(proteinase K) 및 열처리 실험을 하였다. 열처리는 100°C에서 10분 동안 수행하였고, 이어서 생물막 어세이를 수행하였다. 프로테이나제 K(시그마-알드리치, 세인트 루이스, MO, USA)를 배양의 초기에 넣고 37°C에서 배양하여 생물막 어세이는 24시간 후에 수행하였다. 각각의 데이터 포인트를 최소한 12 개 웰로부터 평균을 내었다(최소한 두 개의 독립적인 배양으로부터 6개의 웰).

[0094] 그 결과 항생물막 활성을 보유하고 있었고(도 2), 이것은 활성 항생물막 성분이 열 안정성이라는 것과 펩타이드 또는 단백질이 아니라는 것을 의미한다.

[0095] 로도코커스 파시안스(*R. fascians*)는 인돌-3-알데하이드(IAAld), 인돌-3-젓산(ILA), 인돌-3-피루브산(IPyA) 및 식물 옥신(plant auxin) 인돌-3-아세트산(IAA)(Vandeputte et al. 2005)과 같은 몇몇 인돌 유도체를 생산하는 것으로 보고되었다. 또한 세균으로부터 유래한 인돌 및 인돌 유도체 및 배추속 식물(Brassica plant)로부터 유래한 3-인돌릴아세토나이트릴(3-indolylacetonitrile) 및 인돌-3-카르복실알데하이드(indole-3-carboxylaldehyde)가 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 억제할 수 있다고 보고하였다. 그러므로, 이러한 인돌 유도체(ทริป토판, 대장균으로서 인돌, IAAld, ILA, IPyA 및 IAA)를 생물막 억제를 위해 조사하였다.



- [0096] 그 결과, 인돌은 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 유의적으로 억제하였고, 트리토판은 하지 못했다. 주목할 것은 IAA1d, ILA 및 IPyA는 현저하게 용량-의존적 양상으로 생물막 형성을 억제하였고, 반면에 구조적으로 비슷한 IAA는 생물막 형성에 큰 영향을 미치지 못했다(도 3). IAA1d(100 $\mu$ g/mL)는 가장 효과적으로 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 형성을 억제하였고(10 배), 반면에 인돌은 생물막 형성을 4배 억제하였다.
- [0097] 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액에서의 인돌-3-아세트알데하이드(IAA1d)의 존재를 확인하기 위해 HPLC를 이용하였다. 4.6 $\times$ 250-mm ZORBAX Eclipse XDB-C18 컬럼(아질런트 테크놀로지, 산타클라라, USA)을 사용한 역상 HPLC를 이용하였고, 표준 화합물 및 용출(elution)과 함께 H<sub>2</sub>O-0.1% 트리플루오로아세트산 및 메탄올을 이동상(50:50)으로 사용하였고 유동속도는 0.5ml/min이었다. 이러한 조건 하에서 인돌-3-아세트알데하이드의 검출 시간(retention time) 및 최대 흡광도는 7.9 min/280nm 이었고, 인돌-3-아세트산은 48min/290nm 이었다. 각 실험은 두 개의 독립적인 배양에서 실시하였다. HPLC 프로파일에 있어서, 순수 IAA1d의 검출 시간 및 UV 스펙트라(spectra) 및 이것에 대응되는 로도코커스속에서의 피크(peak)를 일치시켰다(도 4).
- [0098] 그 결과 시험된 조건 하에서, IAA1d 및 IAA는 각각 43 $\pm$ 4 및 7 $\pm$ 1  $\mu$ g/mL에서 발견되었고, ILA 및 IPyA는 관찰되지 않았다(도 4). 또한 IAA1d를 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액과 같이 열과 프로테아나제 K에 저항성을 가지고 있었다. 이러한 결과는 세포의 IAA1d가 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액의 주요 항생물막 성분이라는 것을 의미하고 대장균 O157:H7에 대해 효과적이라는 것을 의미한다.
- [0099] **<실시예 5> 대장균 O157:H7 세포 성장에 대한 로도코커스속 BFI 332 배양상등액 및 인돌-3-아세트알데하이드의 효과**
- [0100] 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액 및 인돌-3-아세트알데하이드(IAA1d)의 장출혈 대장균 O157:H7 성장에 대한 독성을 확인하기 위해, 이것에 특이적인 성장물을 LB 배지에서 측정하였다.
- [0101] 그 결과, 배양상등액의 부존재하에서 성장률은 1.30 $\pm$ 0.02/h 였고, 로도코커스속 BFI 332(1%)의 배양상등액의 존재하에서는 24 $\pm$ 0.04/h 였고, IAA1d(100 $\mu$ g/ml)의 존재하에서는 1.33 $\pm$ 0.01/h였다. 또한, 배양상등액 및 IAA1d의 존재하에서는 장출혈 대장균 O157:H7의 최종 세포 혼탁도(turbidity)에 영향을 미치지 않았다(도 8).
- [0102] **<실시예 6> IAA1d와 함께 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 세포의 차등적 유전자 발현(differential gene expression)**
- [0103] IAA1d에 의한 생물막 억제의 분자적 기초를 이해하기 위해, DNA 마이크로어레이 실험을 IAA1d(100 $\mu$ g/ml)의 존재 및 부존재하에서 장출혈 대장균 O157:H7 생물막 세포와 함께 수행하였다.
- [0104] DNA 마이크로어레이와 유전자 발현정도를 실시간으로 측정하는 역전사 중합연쇄반응(qRT-PCR) 실험을 위해서, 장출혈 대장균 O157:H7을 250ml 웨이크 플라스크에서 100ml LB 배지에 접종하여 하루 밤 동안 배양하였다. 생물막을 형성하기 위해서, 4g 유리솜(glass wool)(Corning Glass Works, Corning, N.Y.)을 이용하였고 세포를 인돌-3-아세트알데하이드(IAA1d; 100 $\mu$ g/ml)의 존재 및 부존재하에서 하루 밤 동안 진탕 배양한 균주를 1:100으로 희석하여 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 7시간 동안 100rpm에서 진탕(shaking)배양 하였다. RNase 억제제(RNA-later, Ambion, TX, USA)를 샘플 수집 전에 첨가하였고, 세포를 13,000g에서 2분 동안 원심분리하기 전에 드라이 아이스 및 95%에탄올로 즉시 냉각하였다(RNA 분해를 막기 위하여). 세포침전물(cell pellets)을 즉각적으로 드라이 아이스로 얼렸고 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 총 RNA는 Qiagen RNeasy mini kit(Valencia, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 장출혈 대장균 O157:H7 Genechip Genome Array(Affymetrix, P/N 90051, 산타클라라, CA, USA)를 인돌-3-아세트알데하이드(100 $\mu$ g/ml)의 첨가 후의 세포 속 유전자 발현 상태를 분석하기 위해 이용하였다. DNA 마이크로어레이 분석은 Affymetrix 시스템을 이용하여 수행하였다(Lee *et al.* 2011).
- [0105] 그 결과, 352개의 유전자를 특이적으로 조절하였다(3배 이상): 149개의 유전자는 억제되었고 203개의 유전자는 유도되었다. IAA1d의 존재하에서 유전자 발현의 가장 두드러진 변화는 2개 컬리 오페론(curl operons)(csgBAC 및 csgDEFG) 및 몇몇 전달 유전자가 가장 크게 억제되었고(3 내지 11배; 표 1), 반면에 인돌 합성 유전자(tnaAB) 및 몇몇 기능이 알려져 있지 않은 유전자가 크게 유도(4 내지 10배) 되었다는 것이다. 모든 데이터는 GEO accession 번호 GSE30424를 이용하여 분석이 가능하였다.

표 1

[0106]

인돌-3-아세트알데하이드의 첨가 후에 장출혈 대장균 O157:H7으로 부터 가장 많이 발현된 유전자

gene	fold change	Descriptions
<b>Curli genes</b>		
<i>csgF</i>	-11.5	curli assembly protein
<i>csgG</i>	-5.5	curli assembly protein
<i>csgC</i>	-5.3	curli assembly protein
<i>csgE</i>	-5.3	curli assembly protein
<i>csgD</i>	-3.3	DNA-binding transcriptional regulator
<i>csgA</i>	-3.1	cryptic curlin major subunit
<i>csgB</i>	-3.0	curlin minor subunit
<b>LEE genes</b>		
<i>ler</i>	-6.2	Ler
<i>Z1539</i>	-5.6	pathogenesis
<i>Z1538</i>	-4.4	pathogenesis
<b>transporter genes</b>		
<i>arsB</i>	-9.0	arsenical pump membrane protein
<i>cyoA</i>	-8.7	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II
<i>artQ</i>	-7.8	arginine transporter permease subunit
<i>mtr</i>	-7.1	tryptophan permease
<i>cyoA</i>	-6.8	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I
<i>dppA</i>	-5.6	periplasmic dipeptide transport protein precursor
<i>cysA</i>	-4.2	D-alanine/D-serine/glycine permease
<i>artI</i>	-4.2	arginine 3rd transport system periplasmic binding protein
<i>artM</i>	-4.4	arginine transporter permease subunit
<i>mdtE</i>	-4.1	multidrug efflux system protein
<i>znuA</i>	-4.1	high-affinity zinc transporter periplasmic component
<b>Other metabolism</b>		
<i>iscS</i>	-10.8	cysteine desulfurase
<i>proQ</i>	-10.4	DNA competence effector
<i>acnB</i>	-9.3	bifunctional aconitate hydratase 2
<i>rstA</i>	-7.6	DNA-binding transcriptional regulator
<i>menF</i>	-6.8	menaquinone-specific isochorismate synthase
<i>iscU</i>	-6.6	iron-sulfur cluster assembly scaffold protein
<i>spoT</i>	-6.0	bifunctional (p)ppGpp synthetase II
<i>rsmB</i>	-5.9	16S rRNA methyltransferase B
<i>prfA</i>	-5.9	peptide chain release factor 1
<i>sdhD</i>	-5.8	succinate dehydrogenase
<i>hflB</i>	-5.3	ATP-dependent metalloprotease
<i>arnC</i>	-5.2	undecaprenyl phosphate-L-Ara4FN transferase
<i>hflX</i>	-5.0	GTPase
<i>rpsG</i>	-4.8	30S ribosomal protein S7
<i>sdhA</i>	-4.7	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
<i>surA</i>	-4.6	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
<i>rho</i>	-4.5	transcription termination factor
<i>sfcA</i>	-4.5	malate dehydrogenase
<i>iscR</i>	-4.3	DNA-binding transcriptional regulator
<i>dcd</i>	-4.3	deoxycytidine triphosphate deaminase
<i>uvrC</i>	-4.2	excinuclease ABC subunit C

<i>rplE</i>	-4.2	50S ribosomal protein L5
<i>atpB</i>	-4.2	FOF1 ATP synthase subunit A
<i>galF</i>	-4.1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase subunit
<i>prc</i>	-4.1	carboxy-terminal protease
<i>hslU</i>	-4.1	ATP-dependent protease ATP-binding subunit
<i>aroB</i>	-4.1	3-dehydroquinate synthase
<i>lon</i>	-4.0	DNA-binding ATP-dependent proteas
<i>rseC</i>	-4.0	SoxR reducing system protein
<i>sdhC</i>	-4.0	succinate dehydrogenase
<i>tgt</i>	-4.0	queuine tRNA-ribosyltransferase
<i>rpsL</i>	-4.0	30S ribosomal protein S12
<i>nfi</i>	-4.0	endonuclease V
<b>hypothetical protein</b>		
<i>ybjX</i>	-5.8	hypothetical protein
<i>Z1922</i>	-5.8	hypothetical protein
<i>Z1923</i>	-5.4	hypothetical protein
<i>yfiB</i>	-5.1	hypothetical protein
<i>yobG</i>	-4.8	hypothetical protein
<i>ygiC</i>	-4.7	hypothetical protein
<i>Z3206</i>	-4.7	hypothetical protein
<i>ymdA</i>	-4.1	hypothetical protein
<i>yceD</i>	-4.0	hypothetical protein

[0107]

DNA 마이크로어레이 데이터를 입증하기 위하여, qRT-PCR을 이용하여 장출혈 대장균 0157:H7 내의 *csgA*, *csgB*, *csgG*, *ler* 및 *tnaA*의 유전자 발현 수준을 IAA1d 처리 및 처리 없이 조사하였다. 동일한 DNA 마이크로어레이 조건을 이용하여 두 개의 독립적인 RNA 샘플을 연구에 이용하였다. 유전자 특이적인 프라이머를 각각의 유전자를 위해 이용하였고 *rrsG*를 항상 발현되는 대조구(housekeeping control)로 이용하였다(표 2). 항상 발현되는 유전자(housekeeping gene) *rrsG*의 발현 수준을 관심 유전자의 발현 데이터를 상대적으로 정량화(normalize)하는데 이용하였다. qRT-PCR 방법을 사이버 그린 마스터 믹스(SYBR green master mix)(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 ABI StepOne Real-Time PCR systems(Applied Biosystems)를 이용하여 두 개의 독립적으로 배양한 균주의 총RNA로 수행하였다.

**표 2**

[0108]

정량적 qRT-PCR을 위한 프라이머 서열

Gene	Primer
<i>csgA</i>	Forward 5'-AGA TGT TGG TCA GGG CTC AG-3'
	Reverse 5'-CGT TGT TAC CAA AGC CAA CC-3'
<i>csgC</i>	Forward 5'-TTA CTC CTT GCG GCA CTT TC-3'
	Reverse 5'-GGG TTG ATT AGC AGG CAA TG-3'
<i>csgG</i>	Forward 5'-CCG GGT AGG GTT TAA ATT TG-3'
	Reverse 5'-GCA GCG CTT ATT TCT TTT GG-3'
<i>csgF</i>	Forward 5'-TTG AAA CAC CCT CAG CGT TA-3'
	Reverse 5'-CTG GAT GGT CGA GGT TTG TC-3'
<i>ler</i>	Forward 5'-CGA CCA GGT CTG CCC TTC T-3'
	Reverse 5'-GCG CGG AAC TCA TCG AAA-3'
<i>tnaA</i>	Forward 5'-TGA AGA AGT TGG TCC GAA TAA CGT G-3'
	Reverse 5'-CTT TGT ATT CTG CTT CAC GCT GCT T-3'
<i>rrsG</i>	Forward 5'-TAT TGC ACA ATG GGC GCA AG-3'
	Reverse 5'-ACT TAA CAA ACC GCC TGC GT-3'

[0109]

DNA 마이크로어레이 결과의 확인을 위하여 실시한 qRT-PCR의 결과는 IAA1d를 처리한 균주에서 *csgA*(qRT-PCR에서  $-3.1 \pm 1.5$  배 vs. 마이크로어레이에서  $-3.1$  배), *csgC*(qRT-PCR에서  $-8.5 \pm 4.0$  배 vs. 마이크로어레이에서  $-5.3$  배), *csgG*(qRT-PCR에서  $-3.7 \pm 1.0$  배 vs. 마이크로어레이에서  $-5.5$  배), *csgF*(qRT-PCR에서  $-5.8 \pm 2.6$  배 vs. 마이크로어레이에서  $-11.5$  배), *ler*(qRT-PCR에서  $-2.1 \pm 0.6$  배 vs. 마이크로어레이에서  $-6.2$  배) 및 *tnaA*(qRT-PCR에서  $1.5 \pm 0.2$  배 vs. 마이크로어레이에서  $5.6$  배)의 발현에 대해서 DNA 마이크로어레이 데이터와 비슷하였다(도 5 및 표 3).

**표 3**

[0110]

인들-3-아세트알데하이드 첨가 후에 장출혈 대장균 O157:H7에서 4배 이상 발현이 억제된 유전자 리스트

gene	fold change	Descriptions
<b>Curli genes</b>		
<i>csgF</i>	-11.5	curli assembly protein
<i>csgG</i>	-5.5	curli assembly protein
<i>csgC</i>	-5.3	curli assembly protein
<i>csgE</i>	-5.3	curli assembly protein
<i>csgD</i>	-3.3	DNA-binding transcriptional regulator
<i>csgA</i>	-3.1	cryptic curlin major subunit
<i>csgB</i>	-3.0	curlin minor subunit
<b>LEE genes</b>		
<i>ler</i>	-6.2	Ler
<i>Z1539</i>	-5.6	pathogenesis
<i>Z1538</i>	-4.4	pathogenesis
<b>transporter genes</b>		
<i>arsB</i>	-9.0	arsenical pump membrane protein
<i>cyoA</i>	-8.7	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II
<i>artQ</i>	-7.8	arginine transporter permease subunit
<i>mtr</i>	-7.1	tryptophan permease
<i>cyoA</i>	-6.8	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I
<i>dppA</i>	-5.6	periplasmic dipeptide transport protein precursor
<i>cysA</i>	-4.2	D-alanine/D-serine/glycine permease
<i>artI</i>	-4.2	arginine 3rd transport system periplasmic binding protein
<i>artM</i>	-4.4	arginine transporter permease subunit
<i>mdtE</i>	-4.1	multidrug efflux system protein
<i>znuA</i>	-4.1	high-affinity zinc transporter periplasmic component
<b>Other metabolism</b>		
<i>iscS</i>	-10.8	cysteine desulfurase
<i>proQ</i>	-10.4	DNA competence effector
<i>acnB</i>	-9.3	bifunctional aconitate hydratase 2
<i>rstA</i>	-7.6	DNA-binding transcriptional regulator
<i>menF</i>	-6.8	menaquinone-specific isochorismate synthase
<i>iscU</i>	-6.6	iron-sulfur cluster assembly scaffold protein
<i>spoT</i>	-6.0	bifunctional (p)ppGpp synthetase II
<i>rsmB</i>	-5.9	16S rRNA methyltransferase B
<i>prfA</i>	-5.9	peptide chain release factor 1
<i>sdhD</i>	-5.8	succinate dehydrogenase
<i>hflB</i>	-5.3	ATP-dependent metalloprotease
<i>arnC</i>	-5.2	undecaprenyl phosphate-L-Ara4FN transferase

<i>hflX</i>	-5.0	GTPase
<i>rpsG</i>	-4.8	30S ribosomal protein S7
<i>sdhA</i>	-4.7	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
<i>surA</i>	-4.6	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
<i>rho</i>	-4.5	transcription termination factor
<i>sfcA</i>	-4.5	malate dehydrogenase
<i>iscR</i>	-4.3	DNA-binding transcriptional regulator
<i>dcd</i>	-4.3	deoxycytidine triphosphate deaminase
<i>uvrC</i>	-4.2	excinuclease ABC subunit C
<i>rplE</i>	-4.2	50S ribosomal protein L5
<i>atpB</i>	-4.2	FOF1 ATP synthase subunit A
<i>galF</i>	-4.1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase subunit
<i>prc</i>	-4.1	carboxy-terminal protease
<i>hslU</i>	-4.1	ATP-dependent protease ATP-binding subunit
<i>aroB</i>	-4.1	3-dehydroquinate synthase
<i>lon</i>	-4.0	DNA-binding ATP-dependent proteas
<i>rseC</i>	-4.0	SoxR reducing system protein
<i>sdhC</i>	-4.0	succinate dehydrogenase
<i>tgt</i>	-4.0	queuine tRNA-ribosyltransferase
<i>rpsL</i>	-4.0	30S ribosomal protein S12
<i>nfi</i>	-4.0	endonuclease V
<b>hypothetical protein</b>		
<i>ybjX</i>	-5.8	hypothetical protein
<i>Z1922</i>	-5.8	hypothetical protein
<i>Z1923</i>	-5.4	hypothetical protein
<i>yfiB</i>	-5.1	hypothetical protein
<i>yobG</i>	-4.8	hypothetical protein
<i>ygiC</i>	-4.7	hypothetical protein
<i>Z3206</i>	-4.7	hypothetical protein
<i>ymdA</i>	-4.1	hypothetical protein
<i>yceD</i>	-4.0	hypothetical protein

[0111] <실시예 7>로도코커스속 BFI 및 IAA1d의 배양상등액에 의한 장출혈대장균 O157:H7에서의 컬리 형성의 감소

[0112] 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성에 있어서 컬리 형성은 중요하고(Ryu and Beuchat 2005; Uhlich et al. 2006), 3-인돌릴아세토나이트릴은 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성 및 컬리 생산을 감소시키는 것으로 알려졌다(Lee et al. 2011). DNA 마이크로어레이 및 qRT-PCR로부터 얻어진 전사체 데이터에서 두 개의 컬리 오페론, csgBAC 및 csgDEFG가 IAA1d에 의해서 가장 억제되었기 때문에(표 1), 컬리 생산을 SEM을 이용하여 조사하였다(Lee et al. 2011).

[0113] 요약하면, 나일론 필터(nylon filter)를 0.5×0.5-cm 사각형 모양으로 자르고 600nm에서 최초 혼탁도(turbidity) 0.05에서 300μl의 세포와 함께 96-웰플레이트(well-plate)에 넣었다. 생물막 세포를 형성하기 위해 세포와 나일론 필터를 37℃에서 24시간 동안 진탕(shaking)없이 배양하였다. 그 이후에 세포를 글루타알데하이드(glutaraldehyde)(2.5% 최종 농도) 및 포르말데하이드(2% 최종 농도)로 고정하였고 샘플을 4℃에서 하룻밤 동안 안정화시켰다. 나일론 필터에 성장한 생물막 필터를 15kV에서 SEM(S-4100, 히타치, 일본)에서 조사하였고 배울 범위는 ×2,000에서 ×25,000이다.

[0114] 전자현미경을 이용하여 분석한 결과, 로도코커스 BFI 332 및 IAA1d는 유의적으로 장출혈 대장균 O157:H7에서 컬리 생산을 감소시켰다(도 6). 로도코커스 BFI 332 및 IAA1d는 세포의 대수기 성장(exponential growth) 또는 정지기 성장(stationary growth)에서 세포가 생산한 인돌 농도에 영향을 미치지 않는 것이다. 그러므로 로도코커스속 BFI 332의 배양상등액 및 IAA1d에 의한 생물막 억제는 주로 감소된 컬리 형성에 의한 것이지 인돌 생성과는 관련이 없다는 것을 나타낸다.

[0115] <실시예 8> 로도코쿠스속 BFI 332의 배양상등액에 의한 다른 병원성 세균의 생물막 조절

[0116] 배양상등액의 항생물막 활성을 그람 양성균인 포도상구균 (*S. aureus*) 및 *S. 에피더미스*(*S. epidermidis*) 및 그람 음성균인 *S. 티피무리움*(*S. typhimurium*) 및

[0117] 녹농균 (*P. aeruginosa*) PA01과 같은 다른 병원성 세균에 대해 조사하였다. 배양상등액(1%)은 유의적으로 다약제 내성 세균인 포도상구균, *S. 에피더미스*, *S. 티피무리움* 및 녹농균 PA01에서 유의적으로 생물막 형성을 억제하였다(도 7).

**수탁번호**

[0118]

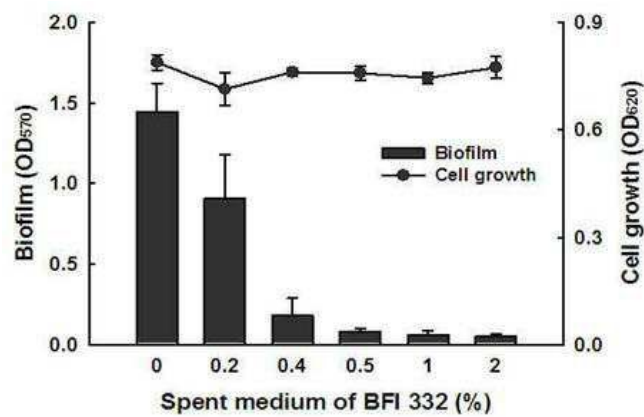
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12188BP

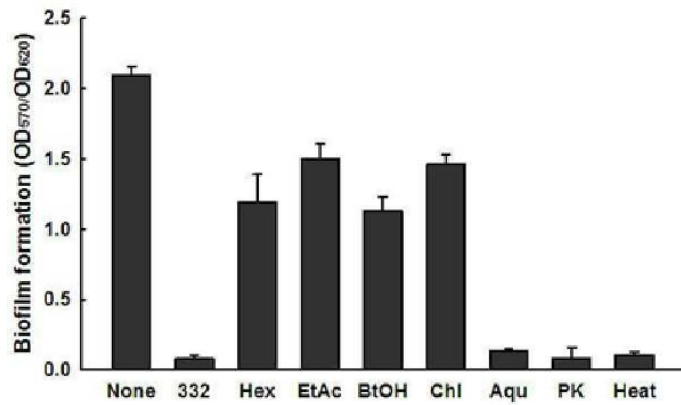
수탁일자 : 20120502

**도면**

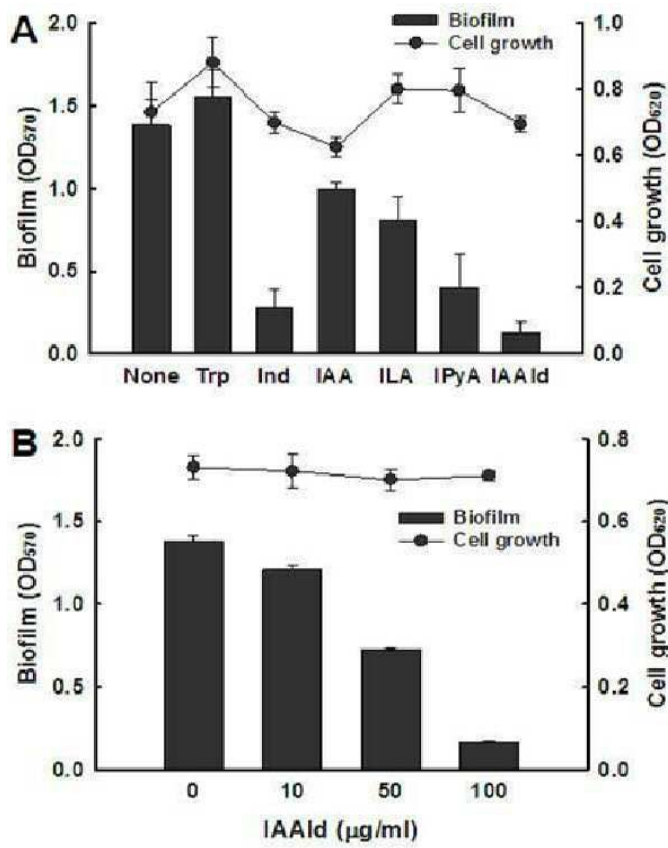
**도면1**



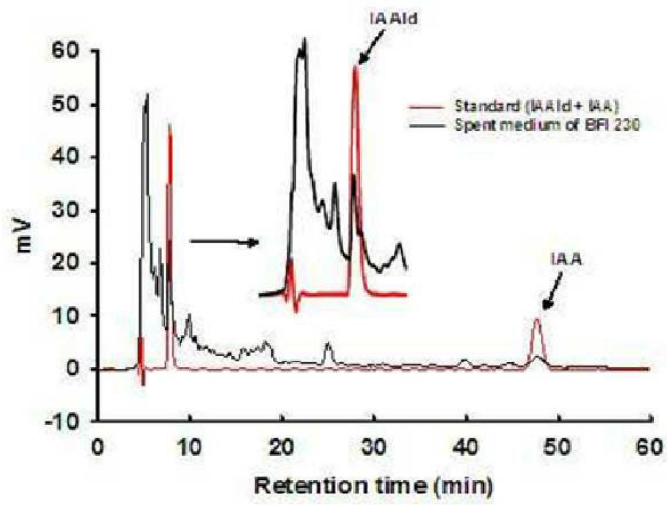
도면2



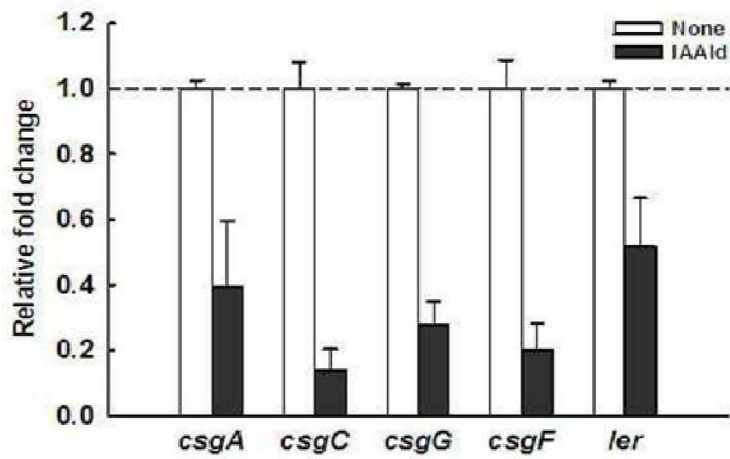
도면3



도면4

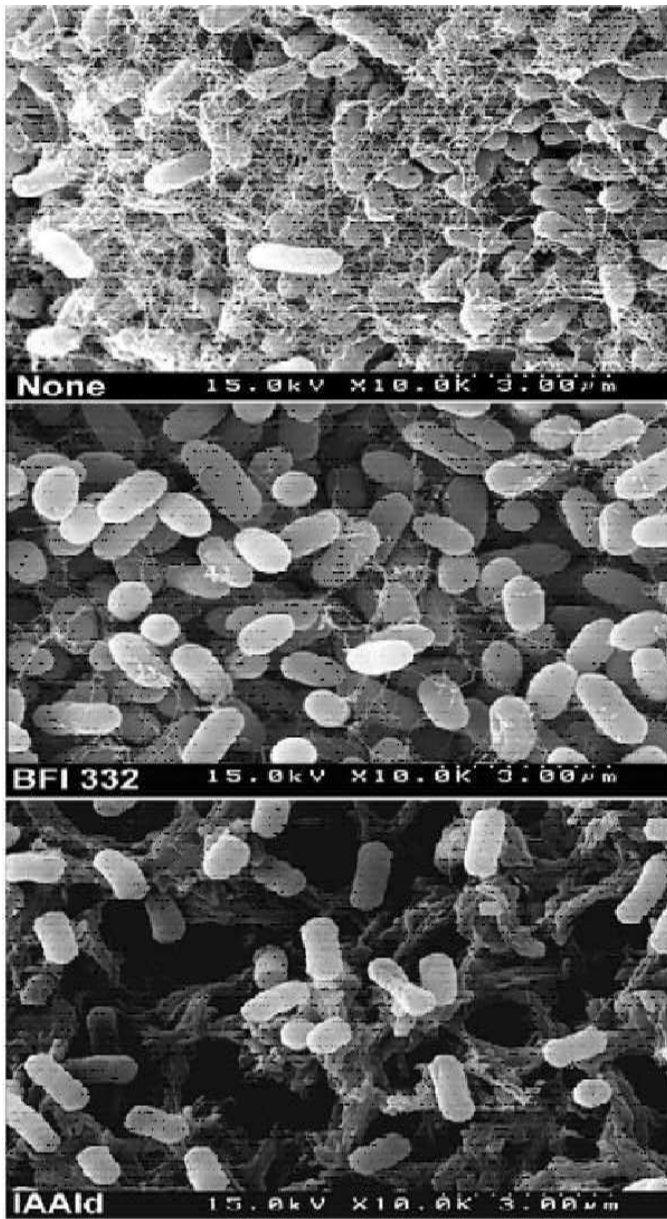


도면5

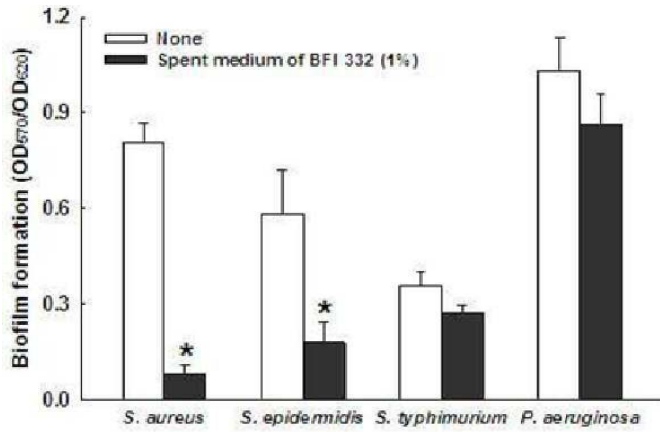




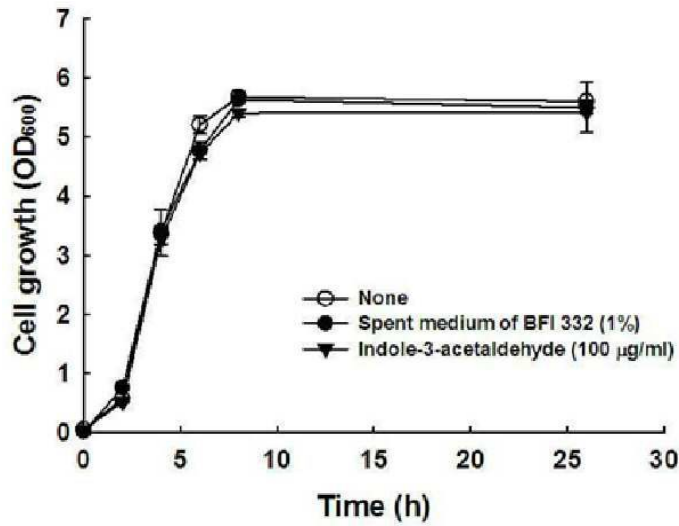
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Korea Research Institute of bioscience and biotechnology
- <120> BIOFILM FORMATION INHIBITORS COMPRISING INDOLE-3-ACETALDEHYDE DERIVED FROM RHODOCOCCLUS BFI332 AND A METHOD USING THEREOF
- <130> 12p-01-31
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1346
- <212> DNA
- <213> Rhodococcus sp. BFI332
- <400> 1

tgatcttggg gcacggtctt tcggggtaca cgaacgcga acgggtgagt aacacgtggg	60
tgatctgccc tgcactctgg gataagcttg ggaaactggg tctaataccg gatatgaccg	120
catgcccat ggtgtgtggt ggaaagattt atcgggtcag gatgggcccg cggcctatca	180
gcttgttggg ggggtaatgg cctaccaagg cgacgacggg tagccgacct gagagggtga	240
ccggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata	300
ttgcacaatg ggcggaagcc tgatgcagcg acgccgcgtg agggatgaag gccttcgggt	360
tgtaaacctc tttagcagg gacgaagcgt gagtgcaggt acctgcagaa gaagcaccgg	420
ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggggtcgc agcgttctcc ggaattactg	480
ggcgtaaaga gttcgtagcc ggtttgtcgc gtcgtttgtg aaaacccggg gctcaacttc	540
gggcttcagc gcgatacggg cagacttgag tgtttcaggg gagactggaa ttcctggtgt	600
agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa caccggtggc gaaggcgggt ctctgggaaa	660
caactgacgc tgaggaacga aagcgtgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc	720
acgccgtaaa cgggtggcgc taggtgtggg ttctttccac gggatctgtg ccgtagctaa	780
cgcattaagc gccccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg	840
ggggcccgca caagcggcgg agcatgtgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc	900
tgggtttgac atacaccgga aaaccgtaga gatacgggcc cccttgtggt cgggtgtacag	960
gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc	1020
gcaacccttg tcttatgttg ccagcacgta atggtgggga ctcgtaagag actgccgggg	1080
tcaactcggg ggaaggtggg gacgacgtca agtcatcatg cccttatgt ccagggttc	1140
acacatgcta caatggccag tacagagggc tgcgagaccg tgagggtggag cgaatccctt	1200
aaagctggtc tcagttcggg tcggggtctg caactcgacc ccgtgaagtc ggagtcgcta	1260
gtaatcgag atcagcaacg ctgcgggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg	1320
tcacgtcatg aaagtcggta actacg	1346