(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0129505
(43) 공개일자 2010년12월09일

(51) Int. Cl.
A61K 31/715 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0048099
(22) 출원일자 2009년06월01일
심사청구일자 2009년06월01일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김세헌
서울 강남구 청담동 삼익APT 14동 1002호
김영훈
서울특별시 강동구 성내2동 209의12 31통9
오세종
서울특별시 용산구 이촌1동 동부센트레빌 104동 1102호
(74) 대리인
이문섭

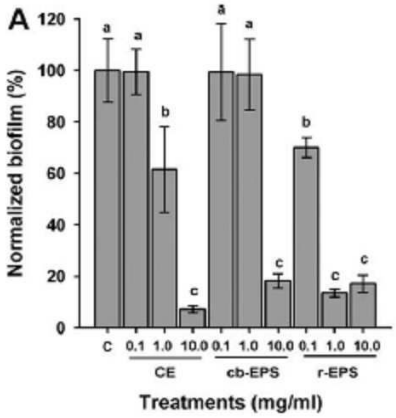
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 신규한 프로바이오틱 유산균 유래 다당류의 병원성 균주에 대한 생물막 형성 억제 용도

(57) 요 약

본 발명은 다양한 병원성 균주에 대한 생물막 형성 억제 효능을 가진 프로바이오틱스 균주의 다당류(exopolysaccharide; EPS)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신규한 프로바이오틱 유산균인 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(EPS)를 유효성분으로 함유하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다당류(EPS)는 대장균 O157:H7를 비롯한 다양한 병원성 균주에 대해 강력한 생물학 형성 억제 효능을 나태냄으로써 상기 병원성 균주의 감염증에 대한 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 미생물학적 생물막형성의 조절을 위한 식품조성물이나 동물 사료용 조성물 등에 광범위하게 사용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 200504010346980070100
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관
연구사업명 BIO그린21사업
연구과제명 제1세부:천연항균활성물질 선발
기여율
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2007년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 다당류(EPS)는 락토바실러스 애시도필러스 케이유4의 배양액을 에탄올로 침전시키고, 침전된 조 다당류(EPS) 펠렛을 증류수로 현탁시키고, 항온수조에서 정치 후 원심분리하여 얻어진 가용성 다당류(r-EPS)인 것을 특징으로 하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 병원성 균주는 대장균 O157:H7, 살모넬라 엔테리티디스(Salmonella enteritidis), 살모넬라 티피머리움(Salmonella Typhimurium), 예시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica), 슈도모나스 에어루기노사(P. aeruginosa), 리스테라아 모노사이토진(Listeria monocytogenes), 및 바실러스 시리우스(Bacillus cereus)로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 병원성 균주는 쉬가유사독소(shiga-like toxin) 1형 및 2형을 동시에 생산하는 대장균 O157:H7인 것을 특징으로 하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제.

청구항 5

락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 생물막 형성 억제활성을 갖는 식품 조성물.

청구항 6

락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 생물막 형성 억제활성을 갖는 사료 조성물.

청구항 7

락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 감염증 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다양한 병원성 균주에 대한 생물막 형성 억제 효능을 가진 프로바이오틱스 균주의 다당류(exopolysaccharide; EPS)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신규한 프로바이오틱스 유산균인 락토바실러스 애시

도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(EPS)를 유효성분으로 함유하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 장 출혈성 병원성 대장균은 식품의 오염이나 출혈성 대장염 즉, 용혈성 요독증후군를 이끌 수 있는 혈변으로 인해 장관내에 침투하는 인체 병원균이다. 최근 들어, 이들 병원균이 일반 부유상태가 아닌 표면에 부착하여 생존할 수 있다는 것이 알려지게 되었다. 따라서 잠재적인 병원균에 의해 생성되는 생물막 (biofilm)은 고질적이고 재발되는 감염의 중요한 원인으로 생각되며, 특히 의료 장비의 표면이나 인체 내부의 유치 장치에서도 biofilm을 형성하고 견디는 능력 때문이라고 생각된다. 최근에 biofilm에 관련된 조사가 엄청나게 늘어나고 있는 가운데, 대부분은 근본적인 biofilm의 예방, 조절, 근절 등을 목적으로 하고 있다 그 동안 아주 소수의 연구만이 병원성 대장균 계통을 포함하여 E. coli 등에 의해 형성되는 biofilm을 억제하는, 그러나 성장에는 영향을 미치지 않는, 천연물질을 밝히고 특성을 기술하였다. 해조류 Delisea pulchra 로부터 생성된 (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone과, 가봉의 흑단나무인 Dios pyros dendo로부터 생성되는 ursolic acid (3베타-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid), 비병원성 대장균 군에 의해 생성되는 그룹Ⅱ 캡슐모양의 다당류 등의 화합물이, E. coli의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 생물막의 형성을 유의적으로 억제하였다. 그러나 이 화합물들의 독성과, 물에 잘 녹지 않는 특성대문에 식품산업에의 이용에 한계가 있다.

[0003] 락토바실러스 균종을 포함하는 프로바이오틱스 균주는 자연적인 균총에 속하며 병원성이 없는 살아있는 미생물이다. 게다가 유산균들은 숙주세포의 건강과 웰빙에 중요한 기능을 가지고 있다. 유산균이 병원균의 과도한 성장을 조절하며 감염을 막거나 조절할 수 있는 대표적이고 효과적인 수단이라는 것은 잘 확립되어 있다. 유산균의 주요한 대사산물인 다당류 (exopolysaccharide; EPS)는 최근 몇 년 사이에 크게 주목 받기 시작했고, 건강에 좋은 영향을 주고 있다는 것이 알려졌다. 그러나 미생물의 생태에서 EPS가 어떤 기능적 역할을 가지고 있는지는 아직 잘 알려지지 않았다. 게다가 최근의 연구에서는 상업적으로 발효시킨 우유인 “villi”에서 분리한 많은 EPS가 장내 병원균의 부착을 억제할 수 있다고 보고하였다. 그러나 오늘 날 까지 프로바이오틱스 균주가 생산하는 다당류에 의한 병원성 균주의 생물막 형성 억제에 관련되서는 연구가 시작단계에 있을 뿐이다.

[0004] 본 발명자들은 신규한 프로바이오틱스 균주인 락토바실러스 애시도필러스 케이유4가 생성하는 특정 다당류 성분에 의한 병원성 대장균을 포함하는 다양한 병원성 세균의 생물막 형성 억제 효능을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 신규 프로바이오틱스 균주에서 유래한 다당류의 대장균 0157:H7를 포함한 다양한 병원성 세균에 대한 생물막 형성 억제 용도를 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 병원성 세균에 대한 생물막 형성 억제 효능을 가진 다당류를 포함하는 식품조성물 또는 동물 사료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 병원성 세균에 대한 생물막 형성 억제 효능을 가진 다당류를 포함하는 상기 병원성 세균의 감염증에 대한 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류 (exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제를 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 애시도필러스 케이유4는 돼지의 대장에서 분리된 신규한 락토바실러스 균주로서, 한국미생물보존센터에 2008년 12월 17일자로 수탁하여 수탁번호 KCCM10975P를 부여받았다. 상기 균주 (KCCM10975P)는 쉬가독소 1형과 2형을 동시에 생산하는 대장균 0157:H7 ATCC 43894 균주에 대한 장상피 세포부착억제 효능이 기존에 보고된 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) GG에 비교하였을때 유의적으로

증가된 부착 억제능이 확인되었다 (특허출원 제2009-0001172호 참조).

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 다당류(EPS)는 상기 신규 락토바실러스 균주에서 유래된 어떤 다당류도 될 수 있으나, 바람직하게는 락토바실러스 애시도필러스 케이유4의 배양액을 에탄올로 침전시키고, 침전된 조 다당류(EPS) 펠렛을 증류수로 현탁시키고, 항온수조에서 정치 후 원심분리하여 얻어진 가용성 다당류(r-EPS)인 것을 특징으로 하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 균주는 인체 또는 동물내에서 바이오필름을 형성할 수 있는 어떤 병원선 균주도 가능하나, 바람직하게는 대장균 O157:H7, 살모넬라 엔테리티디스(Salmonella enteritidis), 살모넬라 티피머리움(Salmonella Typhimurium), 예시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica), 슈도모나스 에어루기노사(P. aeruginosa), 리스테라아 모노사이토진(Listeria monocytogenes), 및 바실러스 시리우스(Bacillus cereus)로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 쉬가유사독소(shiga-like toxin) 1형 및 2형을 동시에 생산하는 대장균 O157:H7인 것을 특징으로 하는 병원성 균주의 생물막 형성 억제제를 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 생물막 형성 억제활성을 갖는 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 생물막 형성 억제활성을 갖는 사료 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(exopolysaccharide; EPS)를 유효성분으로 함유하는, 병원성 균주의 감염증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 실시예에서는 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(EPS)는 대장균 O157:H7를 비롯한 다양한 병원성 균주에 대해 강력한 생물학 형성 억제 효능을 나태냄을 실험적으로 확인하였으며, 상기 다당류(EPS) 의한 병원성 대장균 O157:H7의 유전자 발현 변화를 DNA 마이크로어레이로 확인하였다.

[0016] 본 발명에 따른 병원성 균주의 감염증 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분인 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 (KCCM10975P) 유래 다당류(EPS)은 성인기준으로 1㎍/kg/일 내지 500mg/kg/일 투여할 수 있으며, 질병의 심각정도에 따라 증감할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0019] **실시예 1: 균주의 배양조건 및 다당류 분리**

[0020] 본 발명에서 사용된 락토바실러스 애시도필러스 케이유4는 MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)를 이용하여 37℃에서 18시간 동안 배양하였다. 실험에 앞서 유산균주는 10%의 RSM 에서 37℃에서 18시간 동안 2차 계대하였다. 병원성 대장균 O157:H7을 포함하는 병원균은 37℃에서 LB와 TSB 배지에서 배양하였다.

[0021] 세포외 다당류 (released-EPS; r-EPS)의 추출은 기존에 특허출원된 방법을 이용하여 (특허출원 출원번호 10-2008-0137396 참조) 10% 환원탈지유에서 24시간 배양시킨 락토바실러스 애시도필러스 케이유4의 배양액을 에탄올로 침전시킨 조 EPS 펠렛을 멸균된 증류수로 현탁 시키고, 70℃의 항온수조에서 5시간 정치 후, 녹지 않는 부분을 제거하기 위해 원심분리 하였다(14,000 x g, 30min, 4℃). 마지막으로 가용성 r-EPS가 얻어지면 pH를 7.2로 맞추고 다시 동결 건조시켰다. 최종적으로 얻어진 다당류는 글루코스 표준곡선을 이용한 phenol-sulfuric acid 방법으로 정량하였다.

[0022] 세포-결합 EPS (cb-EPS)의 추출은 Kim et al. [Function of cellbound and released exopolysaccharides

produced by Lactobacillus rhamnosus ATCC 9595, J. Microbiol. Biotechnol. 16 (2006) 939-945]의 방법을 적용하였다. 세포 펠렛을 초음파처리한 후 상청액으로부터 cb-EPS를 침전시키고, cb-EPS의 가용성 분획을 추출하였다.

[0023] **실시예 2: 96 well 플라스틱 플레이트를 이용한 생물막 형성 능력 평가**

[0024] 생물막 형성의 실험방법에서 폴리스틸렌(polystyrene)와 피브이씨(PVC) 소재로 제조된 96-well 플레이트 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)가 생물막 형성을 위한 비생물적 표면으로 사용되었다. 전날 배양된 병원성 대장균을 PBS로 두 번 세척하고, 다른 농도의 세포 추출물과 두 종류의 EPS (0.1, 1.0, 그리고 10.0mg/ml)가 첨가된 희석하지 않은(또는 1/2 희석된) LB 배지에 10^6 CFU/ml 접종하였다. 30℃와 37℃에서 교반없이 24시간, 48시간 배양한 후, 멸균된 2차 증류수로 두 번 수세하고 0.1%의 크리스탈 바이오렛 (crystal violet) 용액으로 부착된 세포들을 염색하였다. 실온에서 20분 동안 염색 한 후, 크리스탈 바이오렛을 제거하고 멸균 2차 증류수로 세 차례 세척하고 최종적으로 생성된 생물막은 95%의 에탄올 용액에 용해시켰다. 그리고 엘라이자 리더 (ELISA plate reader; Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로써 95% 에탄올은 아무 처리되지 않은 well에 동일한 부피로 첨가하였다.

[0025] 도 1에서 보여지듯이, 폴리스틸렌(polystyrene)과 피브이씨 (PVC) 표면에서의 병원성 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 측정하였을 때 O157:H7 균주는 배지와 공기의 경계면 바로 아래에 투명한 환을 생성하였다. 본 발명을 위한 사전 조사 실험에서는 43894가 생물막을 형성하는 능력에 조금은 영향을 미쳤지만, LB나 희석된 LB배지, 30℃나 37℃, 그리고 PS나 PVC의 종류는 생물막 형성에 큰 영향을 미치지 못하는 것을 확인하였다. 따라서 최종적으로 1/2 희석된 LB 배지와 37oC에서 24시간과 48시간 배양조건을 결정하였다. 또한, 락토바실러스 애시도필러스 케이유4가 생성하는 다양한 생리활성 물질에 의한 병원성 대장균의 생물막 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시예 1에서의 방법을 이용하여 락토바실러스 애시도필러스 케이유4에서 cb-EPS와 r-EPS를 분리하였다. 생물막 형성은 48시간의 biofilm에 0.1에서 1.0 mg/ml 농도의 모든 성분이 1/2 희석된 LB배지에 첨가되었을 때 확연히 억제되었다(도 1A와 B). 흥미롭게도 1.0 mg/ml의 r-EPS를 포함한 처리구에서 폴리스틸렌 표면에서는 87%가 PVC 표면에서는 94% 수준으로 생물막 형성이 억제되었다. 이 결과들은 플라스틱 표면에서 r-EPS가 biofilm의 형성을 방해하는데 잠재적인 효과가 있다는 것을 알려주었다. 또한, PVC표면에서, 현미경 사진에서 장 출혈성 대장균이 투명한 공기-표면의 군체를 형성한 반면에 24, 48시간 후에 아주 소수의 장 출혈성 대장균 세포들만이 부착되어있는 것을 볼 수 있었다 (도 1C).

[0026] 또한, 병원성 대장균 O157:H7의 생물막 형성에 미치는 r-EPS의 억제 스펙트럼을 평가하기 위하여 일부 선발된 병원균 균주(Salmonella enteritidis, Salmonella Typhimurium KCCM 11806, Yersinia enterocolitica, P. aeruginosa KCCM 11321, Listeria monocytogenes ScottA, and Bacillus cereus)를 대상으로 한 r-EPS의 항 생물막 효능을 조사한 결과, 도 4에서 보여지듯이 락토바실러스 애시도필러스 케이유4에서 분리한 r-EPS는 PS (도 4A)와 PVC (도 4B)의 표면에서 위에서 열거한 병원성 균주들의 생물막 형성을 유의적으로 억제하였다. 이러한 결과들은 r-EPS가 그람 양성균과 그람 음성균 모두에 항 생물막 효능을 가지고 있다는 것으로 암시한다.

[0027] **실시예 3 : 자가군집형성과 세포밀도인자 (Autoinducer-2) 평가**

[0028] 자가군집형성 분석시험은 1.0 mg/ml의 r-EPS가 첨가된 1/2 희석된 LB배지에 전날 배양된 병원성 대장균를 흡광도 0.25가 되도록 균주를 접종시키고 상온에서 24시간동안 정치시키면서 시간별로 정치액의 상층부를 취해 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포밀도인자 분석은 Vibrio harveyi BB170(AI-2센서 균주)를 리포터 균주로 사용하여 1.0 mg/ml의 r-EPS이 첨가된 1:5000로 희석된 AB 배지에서 측정하였다. 발광정도는 일정 배양시간마다 luminometer(Wallac model 1420 multilabel counter; PerkinElmer, Boston, MA, USA)를 이용하여 측정하고 RLU로 나타내었다.

[0029] 도 2에서는 r-EPS가 병원성 대장균 O157:H7의 성장에 영향을 주는지 확인하였다. 도 2A에서의 결과처럼 r-EPS와 같은 양의 어떤 물질도 30℃와 37℃의 LB 배지와 1/2 희석된 LB 배지에서 O157:H7의 성장에 영향를 미치지 못했다 (도 2A). 따라서 생물막 형성 억제는 r-EPS의 항균능력에 의한 효능이 아닌 특정 성분에 의한 것으로 관찰되었다. 또한, 병원성 대장균의 자가 군체형성능력은 1.0 mg/ml의 r-EPS를 첨가했을 때 대조구의 75%로 감소하였다 (도 2B). 또한, r-EPS가 세포밀도 인식인자인 AI-2 에 영향을 주는지 조사하기 위하여 AI-2 활성을 가지고 있는 야생형 장 출혈성 대장균 43894로부터 얻은, 세포를 제거한 상등액을 V. harveyi BB170 배양에

첨가하였고, r-EPS에 의한 억제를 관찰하였다. lux S가 제거된 변이주는 음성 대조구로 사용되었다. 기존의 연구결과에 ursolic acid의 경우 항 biofilm능력을 가지고 있으면서 항 세포밀도인식 특성을 가지고 있다는 보고가 있었지만 본 발명에서는 r-EPS가 첨가되었을 때 AI-2의 활성에는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다 (도 2C). 따라서, r-EPS에 의한 생물막형성의 억제 특성은 세포밀도인식인자나 성장을 억제하는 활성이 아닌 새로운 작용기작에 의한 효능인 것으로 판단되었다.

[0030] **실시예 4: 유속 배양환경 에서 생물막 형성 능력 평가**

[0031] 유속 배양환경에서의 생물막 형성은 미세 유리 모세관을 이용하였다. 1 x 4 x 40 mm(Stovall Life Science, Greensboro, NC, USA)의 부피를 가진 각각의 채널이 있는 흐르는 배양장치 유리모세관 장치에에 1.0 mg/ml의 r-EPS가 없는 LB배지와 있는 LB배지에 각각 18시간 배양한 병원성 대장균을 접종하였다. 균은 유리관 속에 멸균된 실린지를 이용하여 주입하였다. 유리로 된 관은 위로 경사지게 고정시킨 후 흐름없이 30분 동안 상온에서 정치시켜 유리판위에 생물막형성을 위한 부착을 유도시켰다. 접종 후, 모세관을 현미경의 슬라이드 위에 올려놓았다. 그리고 30℃에서 0.2 ml/min의 유속으로 1/2 희석한 멸균된 LB배지를 배양장치로 흐르게 하는 유속 배양 시스템으로 바꾸어주었다. 흐르는 배양장치에서의 생물막 형성은 10배율의 광학렌즈가 부착된 현미경를 이용하여 관찰하였다.

[0032] 도 3에서는, 병원성 대장균의 생물막 형성 구조에 r-EPS가 끼치는 영향을 더 알아보기 위해, 그리고 96-well 플레이트의 크리스탈 바이올렛 실험결과를 검증하기 위하여, 유리 미세 모세관의 연속적으로 배지성분이 흐르는 유속 배양 시스템에서 병원성 대장균 O157:H7의 생물막 형성 능력이 평가되었다. 유리 모세관 시스템에서 r-EPS의 존재하에 병원성 대장균 O157:H7의 생물막은 대조구와 비교했을 때 현저히 감소된 것으로 관찰 되었다. r-EPS가 존재하지 않을 때에 세포들은 유리 표면에 부착하였고, 12시간 이내에 세포집단을 형성하기 시작하는 것으로 관찰되었다. 또한, 이러한 세포 집단은 24시간 이내에 미세집락으로 성숙되었고 매우 두꺼운 생물막을 형성하였다. 대조적으로 1.0mg/ml의 r-EPS가 첨가되었을 때, 같은 배양시간에 매우 적은 양의 미세집락과 군체들이 관찰되었으며 매우 작고 분산된 세포 군체들만이 관찰되었다. 본 발명을 위한 실험결과들을 종합해 보았을 때, 락토바실러스 애시도필러스 케이유4에서 분리한 r-EPS가 세포 표면의 상호작용을 감소시킴으로써 초기 점착 등의 세포표면의 변화를 통해 항 생물막 효능에 크게 기인하고 있는 것으로 판단되었다.

[0033] **실시예 5: DNA 마이크로어레이 (microarray)를 이용한 비교 전사체학 분석**

[0034] LB배지에서 전날 진탕배양한 병원성 대장균 O157:H7을 1.0 mg/ml r-EPS를 첨가한 것과 하지 않은 1/2 희석한 LB배지 (250 ml shake flask)에 접종한다. 세포들은 600 nm에서 흡광도가 2에 도달할때까지 37℃에서 교반해주면서(200rpm) 배양하였다. RNA는 RNeasy Total RNA Extraction kit(Qiagen)를 이용하여 분리, 정제하였다. 정제된 RNA는 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다. 마이크로 어레이를 위해 본발명에서는 GenePlorer TwinChip™ E.coli-6K (Digital genomics, 서울, 한국)를 전사체 분석에 사용되었다. Oligo microarray 분석을 위해 Cy3이나 Cy5 형광염료(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweded)가 결합된 cRNA를 형성시켰으며 이를 이용하여 다시 역으로 RNA의 증폭을 실시하였다. Oligo microarray chip은 형광물질이 붙어있는 cRNA와 60℃에서 16시간동안 교배하였고, 세척해내었다. 마지막으로 혼성화된 마이크로 어레이 칩은 GenePix 4000B dual-channel 레이저 스캐너(Axon Instruments, Union City, CA, USA)를 이용하여 Cy3은 532nm에서, Cy5는 635nm에서 스캔하였다. GenePix Pro 3.0(Axon Instruments)을 이용한 이미지 분석은 각각의 microarray spot의 양적인 값을 산출하였다. Spot의 강도는 per-spot과 per-chip 강도 의존성(Lowess)의 표준화 방법을 통하여 표준화 하였다. 표준화 spot 강도는 대조구와 처리군 간의 유전자 발현 비율로 계산되었다. 최종적으로 두 조건 사이의 발현비율에서의 차이가 2배 혹은 그 이상되는 유전자만을 선발하였다.

[0035] r-EPS에 의해 조절되는 병원성 대장균 O157:H7의 유전자를 결정하기 위하여, DNA 마이크로어레이를 이용하여 비교전사체 연구를 하였다. 병원성 대장균 O157:H7를 1.0 mg/ml의 r-EPS에 노출시켰을 때, 총 25개의 유전자가 두배 이상발현이 억제된 반면에 11개의 유전자는 발현이 증가하였다 (표 1). 유전자들 중에서, crl (2.0배), csgA(1.8배), 그리고 csgB(1.7배)등을 포함하는 Curli를 생산하는 유전자들, cheY(2.2배)를 포함하는 주화성 관련 유전자들은 확연히 r-EPS의 존재하에 억제되었다. Curli 유전자들은 주로 주요 subunit(CsgA)과 보조 subunit(CsgB)의 구성성분이고 병원성 대장균 O157:H7를 포함한 E. coli 균주의 점착과 생물막 형성 특성에 영향을 미친다고 보고된 바 있다. 따라서 본 발명에서는 r-EPS가 병원성 대장균 O157:H7에서 curli 생성관련 유전

자와 대장균의 주화성과 관련되는 유전자의 억제를 통해 생물막 형성을 억제한다 것으로 판단되었다.

[0036] [표 1] 락토바실러스 애시도필러스 케이유4가 생성하는 r-EPS에 의한 병원성 대장균 0157:H7의 유전자 발현 변화

Gene name	Gene number	Fold change	Description
Reduced			
acrE	Z4625	-2.22 ± 0.00	transmembrane protein affects septum formation and cell membrane permeability
proS	Z0206	-2.32 ± 0.00	proline tRNA synthetase
modE	Z0931	-2.43 ± 0.00	molybdate uptake regulatory protein
metN	Z0211	-2.17 ± 0.01	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, ATP-binding)
tesA	Z0647	-2.04 ± 0.01	acyl-CoA thioesterase I; also functions as protease I
bglX	Z3381	-2.50 ± 0.01	beta-D-glucoside glucohydrolase, periplasmic
waaL	Z5049	-2.22 ± 0.01	lipid A-core:surface polymer ligase
cheY	Z2936	-2.17 ± 0.02	chemotaxis regulator transmits chemoreceptor signals to flagelllar motor components
osmC	Z2228	-2.32 ± 0.02	osmotically inducible protein
infC	Z2747	-16.67 ± 0.03	protein chain initiation factor IF-3
crl	Z0301	-2.04 ± 0.03	transcriptional regulator of cryptic *csgA*geneforcurlisurfacefibers
purH	Z5583	-2.63 ± 0.04	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase
ycdT	Z1527	-2.70 ± 0.00	hypothetical protein
yecH	b1906	-2.70 ± 0.00	hypothetical protein
yagU	Z2962	-2.78 ± 0.01	hypothetical protein
yibF	Z5013	-2.17 ± 0.04	putative S-transferase
ymgA	(b1165)	-2.63 ± 0.03	hypothetical protein
ymgB	(b1166)	-2.27 ± 0.04	hypothetical protein
ycgZ	(b1164)	-7.14 ± 0.02	hypothetical protein
Z2779	Z2779	-2.63 ± 0.02	hypothetical protein
Z2894	Z2894	-2.08 ± 0.01	exonuclease X
Z1544	Z1544	-2.13 ± 0.01	putative holo-[acyl-carrier protein] synthase
Z1787	Z1787	-2.22 ± 0.00	hypothetical membrane protein
Z1528	Z1528	-2.56 ± 0.01	Rtn-like protein
Z1543	Z1543	-2.44 ± 0.00	hemolysin activator-related protein
Induced			
treC	Z5849	2.54 ± 0.01	trehalase 6-P hydrolase
fdnG	Z2236	2.02 ± 0.01	formate dehydrogenase-N, nitrate-inducible, alpha subunit
rpsC	Z4685	3.04 ± 0.01	30S ribosomal subunit protein S3
yjcX	(b4088)	2.52 ± 0.02	putative LACI-type transcriptional regulator
rplR	Z4674	2.16 ± 0.02	50S ribosomal subunit protein L18
rpoC	Z5561	2.23 ± 0.03	RNA polymerase, beta prime subuni
thrA	Z0002	2.25 ± 0.04	aspartokinase I; homoserine dehydrogenase I
narI	Z2004	2.25 ± 0.04	nitrate reductase 1, cytochrome b(NR), gamma subunit
panC	Z0144	2.19 ± 0.04	pantothenate synthetase
rplP	Z4684	2.89 ± 0.05	50S ribosomal subunit protein L16
lysA	Z4156	2.34 ± 0.05	diaminopimelate decarboxylase

[0037]

산업이용 가능성

[0038] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 병원성 대장균 0157:H7 세균에 대한 생물막 형성 억제 효능을 가진 프로바이오틱스 균주의 다당류 특성에 관한 것으로, 식품조성물이나 동물 사료용 조성물 등에 광범위하게 사용할 수 있는 락토바실러스 애시도필러스 케이유4에 관한 발효산물을 포함한다. 락토바실러스 애시도필러스 케이유4에서 분리된 다당류 성분은 다양한 식품 산업에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 미생물학적 생물막형성의 조절

을 위한 식품용 첨가물로도 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 유래 다당류(EPS)에 의한 병원성 대장균 0157:H7의 생물막 형성 억제 효과를 나타내는 것이다.

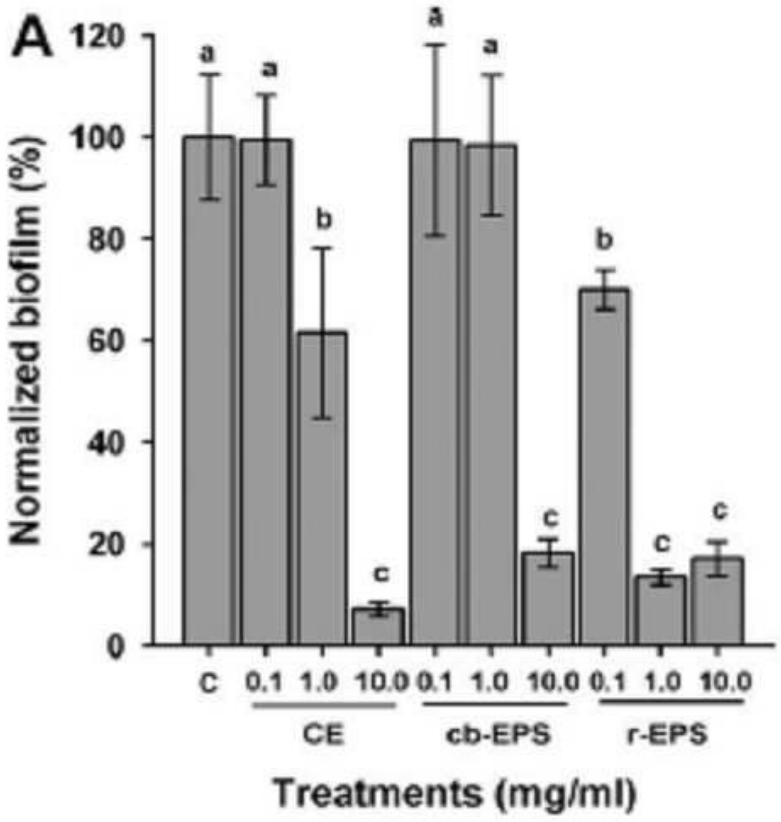
[0040] 도 2는 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 유래 다당류(EPS)에 의한 병원성 대장균 0157:H7의 자가군체형성 억제 효과를 나타내는 것이다.

[0041] 도 3은 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 유래 다당류(EPS)에 의한 병원성 대장균 0157:H7의 유속 배양환경에서 생물막 형성 억제 효과를 나타내는 것이다.

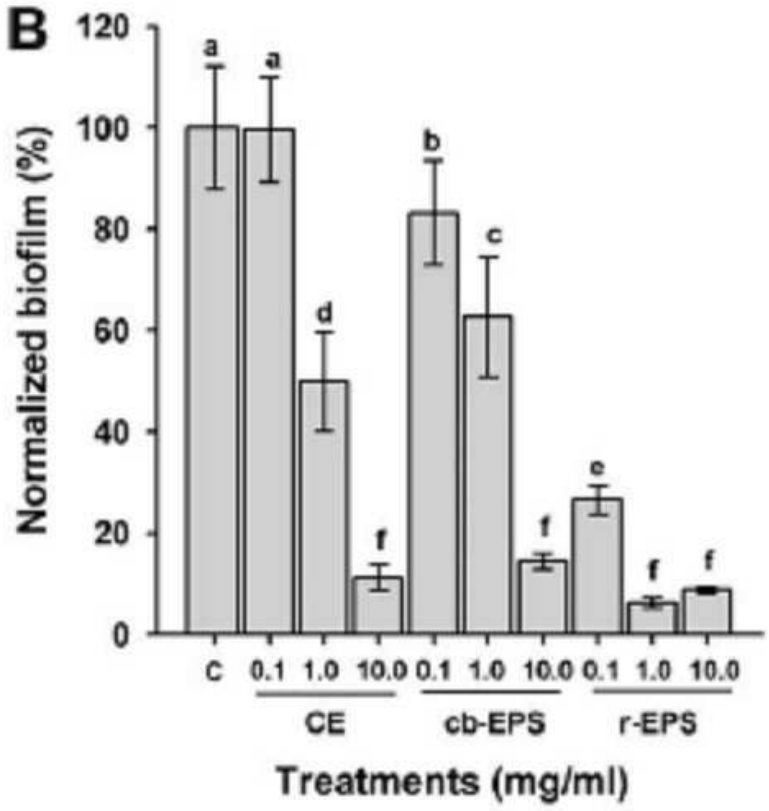
[0042] 도 4는 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 케이유4 유래 다당류(EPS)의 다양한 병원성 균주들의 생물학 형석 억제 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도면

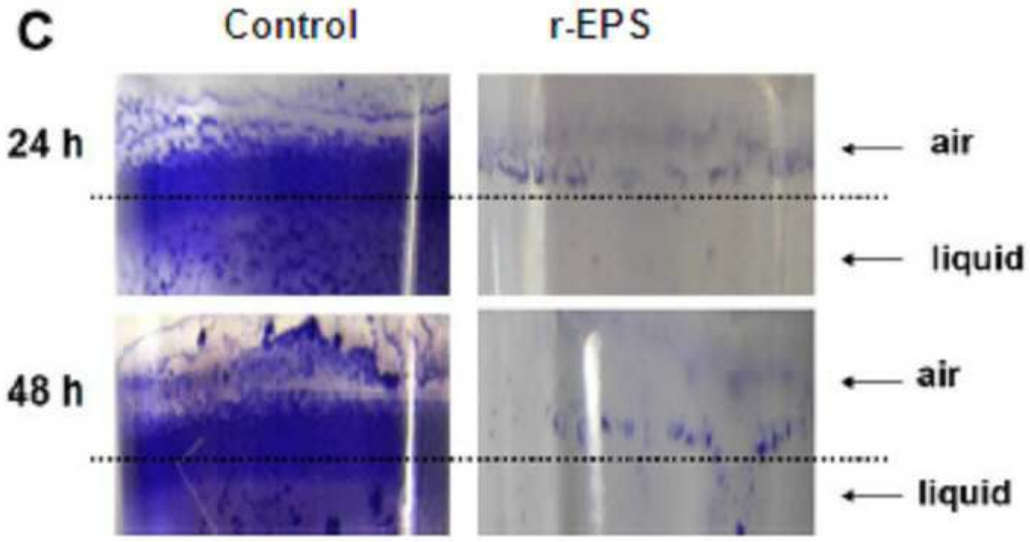
도면1a



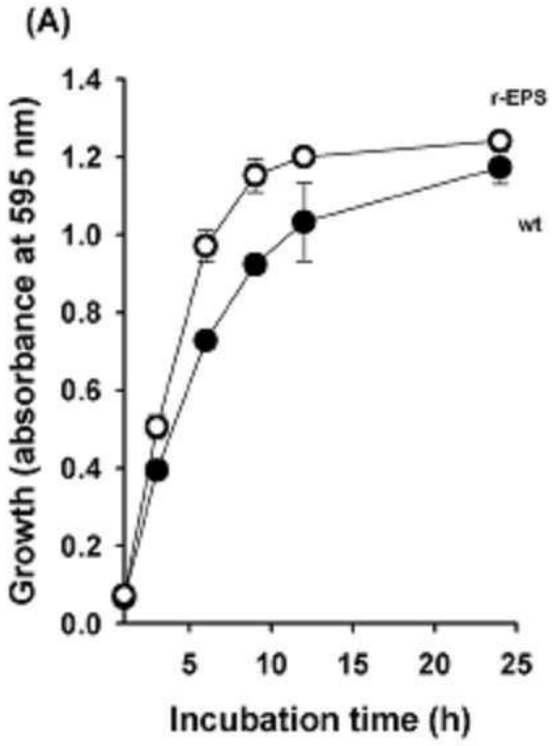
도면1b


B
Normalized biofilm (%)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
d
f
b
c
f
e
f
f
C
0.1
1.0
10.0
0.1
1.0
10.0
0.1
1.0
10.0
CE
cb-EPS
r-EPS
Treatments (mg/ml)

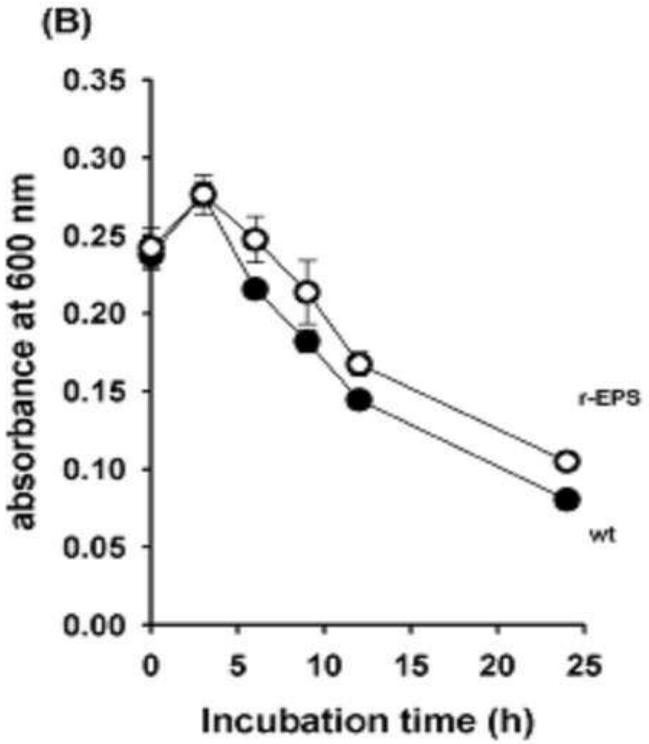
도면1c


C
Control
r-EPS
24 h
48 h
air
liquid
air
liquid

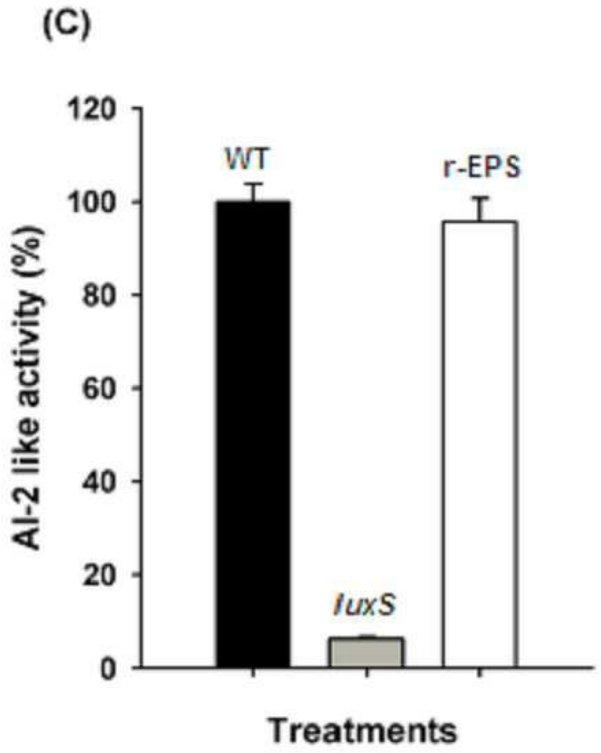
도면2a


(A)
Growth (absorbance at 595 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
5
10
15
20
25
Incubation time (h)
r-EPS
wt

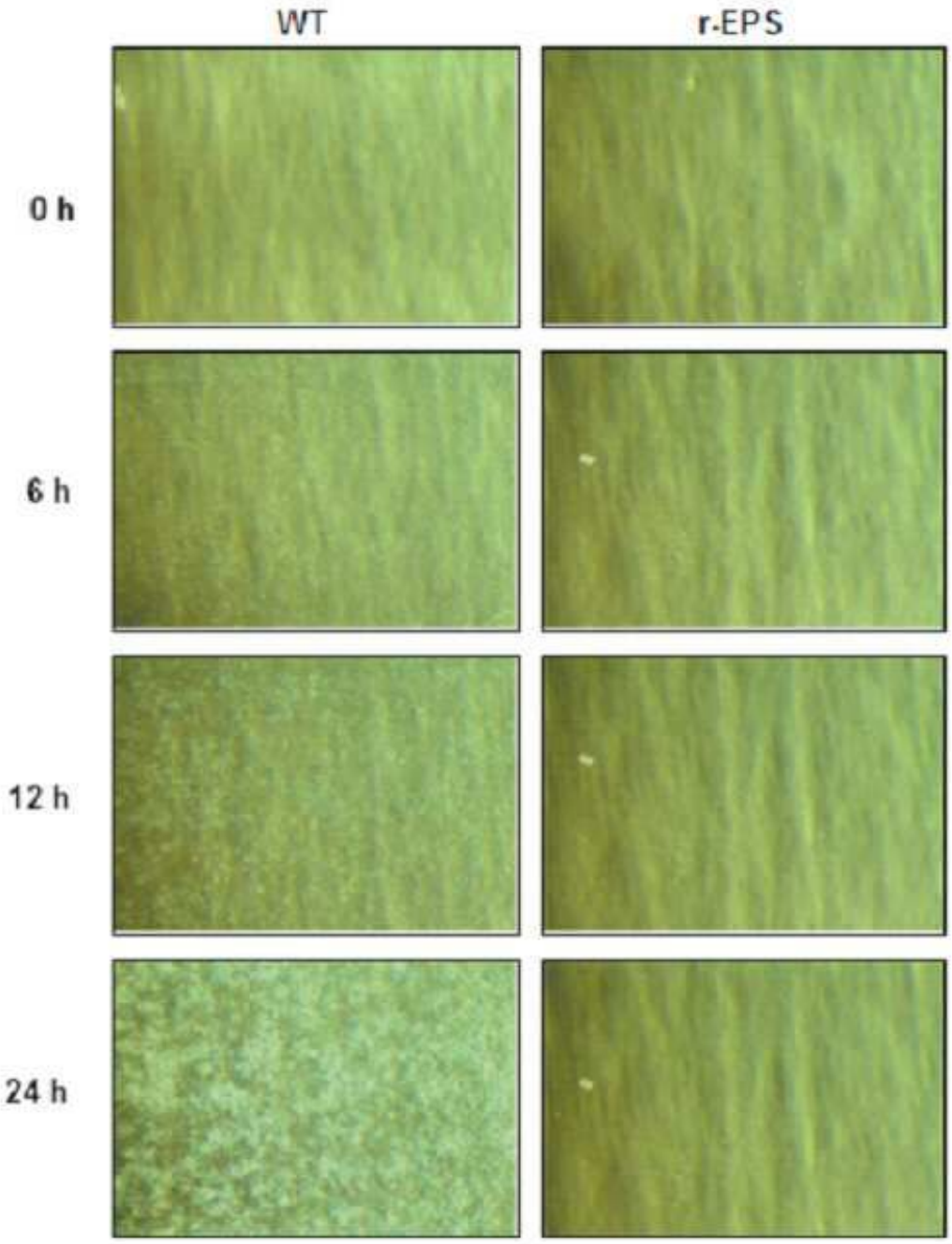
도면2b


(B)
absorbance at 600 nm
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
5
10
15
20
25
Incubation time (h)
r-EPS
wt

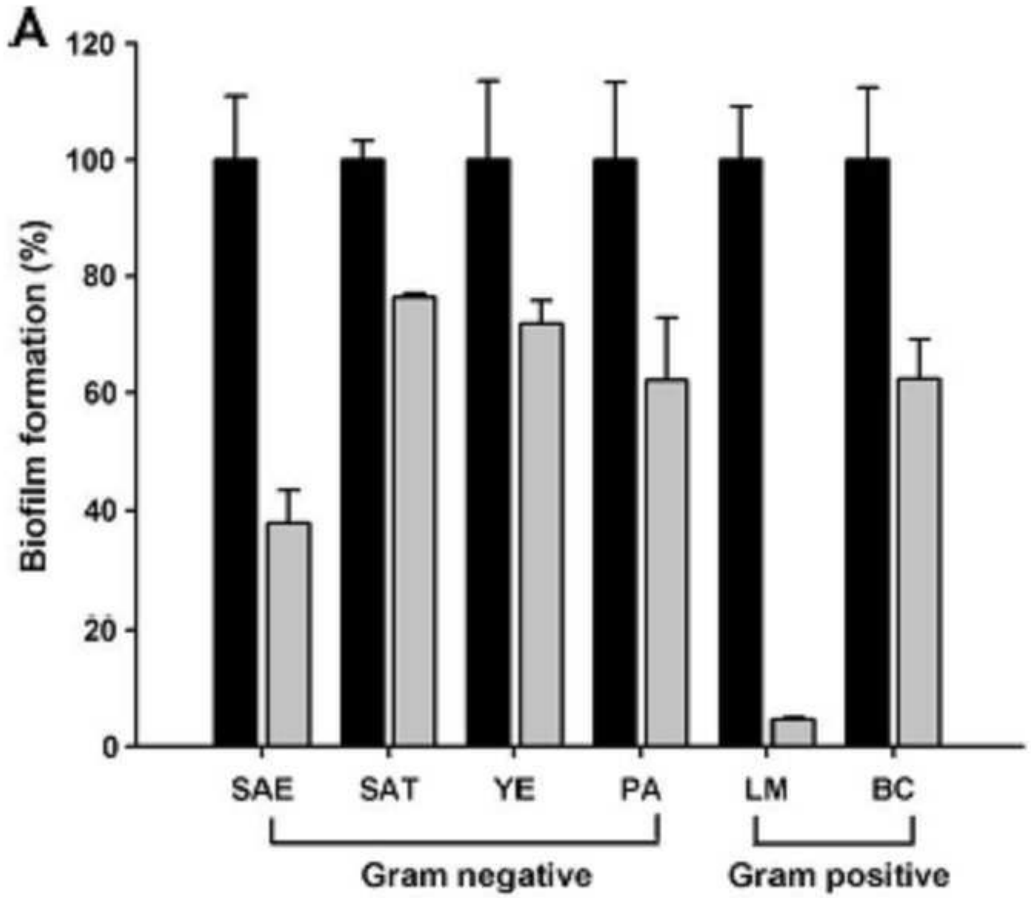
도면2c


(C)
120
100
80
60
40
20
0
AI-2 like activity (%)
WT
luxS
r-EPS
Treatments

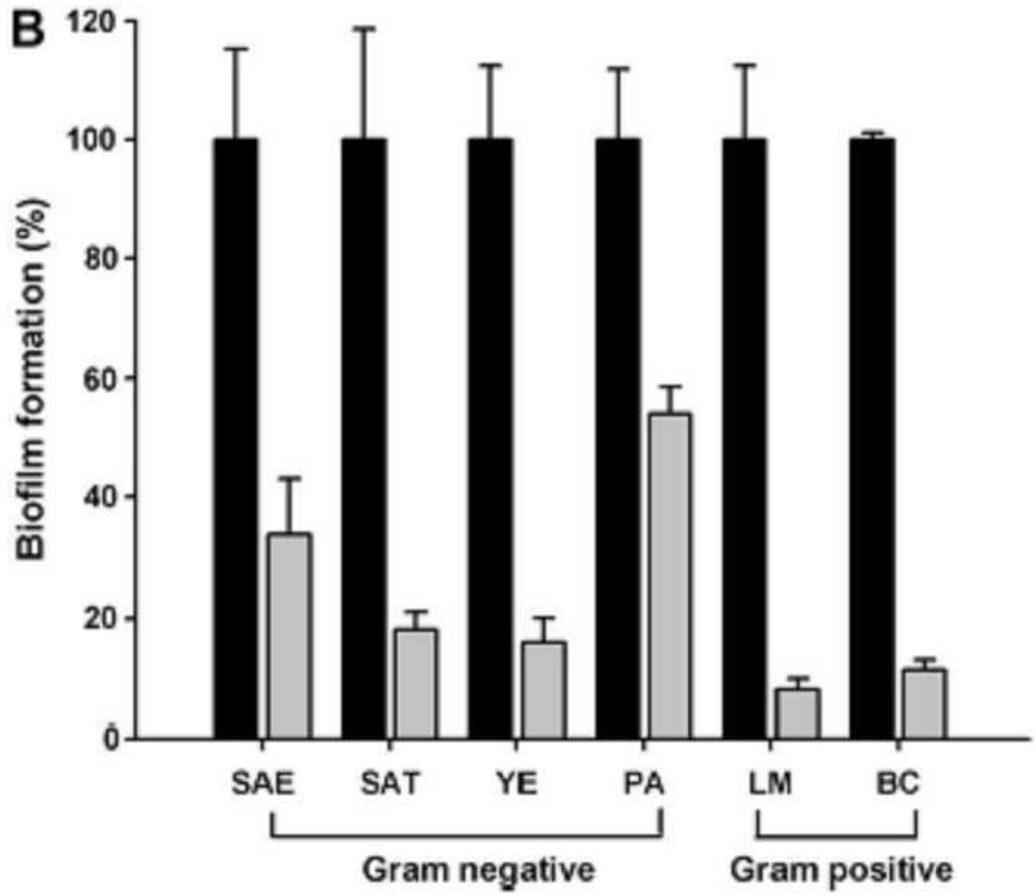
도면3



도면4a


A
Biofilm formation (%)
120
100
80
60
40
20
0
SAE
SAT
YE
PA
LM
BC
Gram negative
Gram positive

도면4b


B
120
100
80
60
40
20
0
Biofilm formation (%)
SAE
SAT
YE
PA
LM
BC
Gram negative
Gram positive