



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0014264  
 (43) 공개일자 2009년02월09일

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7026183

(22) 출원일자 2008년10월27일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년10월27일

(86) 국제출원번호 PCT/SE2007/050382

국제출원일자 2007년05월30일

(87) 국제공개번호 WO 2007/142597

국제공개일자 2007년12월13일

(30) 우선권주장

11/446,648 2006년06월05일 미국(US)

(71) 출원인

바이오가이아 에이비

스웨덴, 에스아-103 64 스톡홀름, 우편사서함  
3242

(72) 발명자

콘놀리, 에아몬

스웨덴, 리딘고 에스-181 30 모션스바겐 3

(74) 대리인

강명구

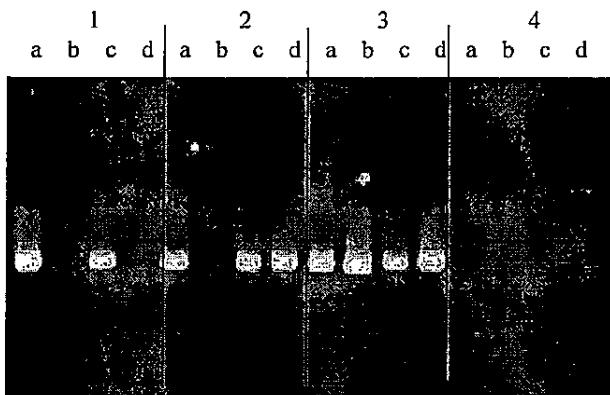
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 증가된 내산성을 갖는 유산균의 방법과 용도

### (57) 요 약

본 발명에서는 더욱 우수한 내산성(acid tolerance) 능력을 위하여 변형된 유산균(lactic acid bacteria)의 특정의 플라스미드 큐어링(curing)된 균주, 이들 균주를 변형하는 방법 및 이들 균주를 포함하는 산물을 제시한다.

**대 표 도** - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938의 생물학적으로 순수한 배양액.

### 청구항 2

락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938의 생물학적으로 순수한 배양액을 포함하는 조성물.

### 청구항 3

젖산균(*Lactobacillus*) 균주의 내산성(acid tolerance)을 증가시키는 방법에 있어서, 젖산균(*Lactobacillus*) 균주로부터 플라스미드를 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 젖산균(*Lactobacillus*) 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

인간 위(stomach)에서 균체를 더욱 효과적으로 형성할 수 있는 젖산균(*Lactobacillus*) 균주를 제공하는 방법에 있어서, 젖산균(*Lactobacillus*) 균주로부터 플라스미드(plasmid)를 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 젖산균(*Lactobacillus*) 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

플라스미드가 제거된 젖산균(*Lactobacillus*) 균주를 포함하는 생균성 산물.

### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 모든 플라스미드가 제거되는 것을 특징으로 하는 생균성 산물.

### 청구항 9

청구항 7에 있어서, 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 균주인 것을 특징으로 하는 생균성 산물.

### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938인 것을 특징으로 하는 생균성 산물.

## 명세서

### 기술분야

&lt;1&gt;

본 발명은 더욱 우수한 내산성(acid tolerance) 능력을 위하여 변형된 유산균(lactic acid bacteria)의 특정의 플라스미드 큐어링(curing)된 균주, 이를 균주를 변형하는 방법 및 이를 균주를 포함하는 산물에 관계한다.

&lt;2&gt;

1908년에, 러시아 생물학자 Eli Metchnikoff는 특정 불가리아인과 러시아인의 긴 수명의 원인으로, 발현된 유제품의 대량 소비를 지목하였다. 이를 식품에서 핵심 미생물을 이후에, 젖산(lactic acid)-생산 균인 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)로 확인되었다. 상기 젖산-생산 균은 젖산염(lactate)을 생산하는

능력으로 널리 알려져 있다. 하지만, 젖산균 생산은 이러한 세균 집단으로부터 유래되는 많은 혜택 중에서 한 가지일 뿐이다.

- <3> Metchnikoff 등의 연구에 기초하여, 과학자들은 동물의 건강과 능력을 향상시키기 위하여 동물에 살아있는 젖산-생산균과 효모를 직접적으로 사양하는 생균성 미생물(probiotic microorganism)의 개념을 개발하였다. 이들 관찰된 혜택은 1) 소화관(digestive tract) 내에서 부착 부위에 대한 경쟁, 2) 필수 영양소(essential nutrient)에 대한 경쟁, 3) 항균 물질의 생산, 4) 유익균(beneficial bacteria)의 성장 증진 및 5) 면역계(immune system) 촉진에 기인할 수 있다.
- <4> 일부 질병-유발균(disease-causing bacteria)은 소장(small intestine)의 내막을 파괴함으로써, 영양소를 흡수하는 동물의 능력을 감소시킨다. 여러 연구에서, 젖산-생산균은 소장에 부착하고, 질병-유발생물체가 장 벽에 결합하는 것을 예방하는 물질을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 이에 더하여, 유익균의 부착은 소장의 흡수 표면적(absorptive surface area)을 증가시키고, 동물에 의한 더욱 많은 영양 흡수(nutrient absorption)를 위한 효소 활성을 강화시킨다.
- <5> 건강-촉진균과 질병-유발균 둘 모두, 성장을 위하여 특정 영양소를 필요로 한다. 젖산-생산균은 유해균(harmful bacteria)의 성장을 뒷받침할 수도 있는 비타민, 아미노산 또는 다른 영양소를 이용할 수 있다.
- <6> 질병-유발생물체를 저해하는 물질을 생산하는 직접-사양 미생물 배양액(direct-fed microbial culture)의 능력에 많은 연구가 집중되고 있다. 젖산, 아세트산(acetic acid)과 포름산(formic acid)은 장내 pH를 낮춤으로써 유해생물체에 부적합한 환경을 발생시킨다. 젖산-생산균은 또한, 과산화수소(hydrogen peroxide)를 분비하고, 산소-요구 미생물(oxygen-requiring microorganism)에 부적합한 환경을 발생시킨다.
- <7> 2가지 군의 항균 물질(antimicrobial substance)이 확인되었다: 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)에 의해 생산되는 저분자량(low molecular weight) 항균물질, 예를 들면, 루테린(reuterin); 및 박테리오신(bacteriocin). 박테리오신은 종종, 유전적으로 관련된 세균의 성장을 저해하는 미생물-생산된 물질이다. 박테리오신은 폴리펩티드(polypeptide)이고 이들의 저해 특성은 프로테아제(protease)에 의해 파괴되는 반면, 넓은-스펙트럼 항균물질인 루테린은 폴리펩티드가 아니고 이의 항균 활성((antimicrobial activity))은 프로테아제에 의한 영향을 받지 않는다.
- <8> 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)를 비롯한 다양한 젖산균(*Lactobacillus*) 종의 군주가 생균성 제제(probiotic formulation)에 이용되고 있다. 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)는 동물의 위장관(gastrointestinal tract)의 자연 발생 거주체 중의 하나이고, 인간을 비롯한 건강한 동물의 장에서 일상적으로 발견된다. 이는 항균 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(참조: U.S. Patent No. 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238, 5,849,289). 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 세포가 글리세롤(glycerol)의 존재에서 협기성 조건(anaerobic condition) 하에 성장되는 경우에, 이들은  $\beta$ -하이드록시-프로피온알데히드( $\beta$ -hydroxy-propionaldehyde, 3-HPA)로 알려져 있는 항균 물질(antimicrobial substance)을 생산한다.
- <9> 연구를 통하여, 대장균(*E. coli*), 살모넬라(*Salmonella typhimurium*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 클로스트리듐 퍼프링겐스(*Clostridium perfringens*)를 저해하는 젖산-생산균의 능력이 상세하게 보고되었다. 설사-유발생물체의 감소는 신생아와 어린 동물에서 특히 중요하다.
- <10> 젖산균(*Lactobacillus*) 군주에 유전자 변형(genetic modification)은 일반적으로, 특정한 군주 특성, 예를 들면, 통상의 식품 병원균(food pathogen)에 길항하는 화합물의 생산, 콜레스테롤(cholesterol)을 물질대사하거나 산이나 담즙(bile)을 내성하는 능력 및 면역 반응(immune response)-강화 능력의 향상 또는 증폭을 지향한다(Kullen, M. J. and T. R. Klaenhammer. 1999. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria, p. 65-83. In G. Tannock (ed.), Probiotics: A Critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.). 이상적인 조건 하에, 이를 변형된 군주는 숙주에 혜택을 줄 것이다. 하지만, 자연 조건 하에, 이를 변형된 젖산균(*Lactobacillus*) 군주의 능력은 특히, 이러한 조작이 플라스미드-매개되는 경우에 빈번하게, 고유(indigenous) 플라스미드에 의한 영향을 받는다. 고유 플라스미드와 도입된 플라스미드 사이에 불화합성(incompatibility)은 숙주 내에서 플라스미드 불안정성의 원인이 되는 핵심 요인 중의 하나이다(Posno, M., RJ. Leer, N. van Luijk, M. J.f. van Giezen, P.T.H.M. B. C. Lokman, and P. H. Pouwels. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1822-1828).

- <11> 대부분의 젖산균(*Lactobacillus*) 균주는 그들의 출처(식물, 고기, 사일리지(silage), 효모(sourdough) 또는 위장관)에 상관없이, 최소한 하나의 고유 플라스미드를 보유한다(Pouwels, P. H. and R. J. Leer. 1993. Genetics of lactobacilli: Plasmids and gene expression. Antonie van Leeuwenhoek 64, 85-107). 이들 플라스미드는 재조합 플라스미드의 안정성을 간섭할 뿐만 아니라 바람직하지 않은 특성, 예를 들면, 항생제 내성(antibiotic resistance)을 보유하고(Posno et al, 1991), 따라서 이런 고유 플라스미드를 제거하는 것이 유익하거나 필요할 수도 있다.
- <12> 많은 항생제와 항균 물질은 수백만 년 동안 자연적으로 존재해왔고, 인간은 인간, 다른 동물과 조직 배양액에서 세균이나 다른 미생물의 성장을 저해하고 세균이나 미생물 감염을 치료하기 위하여 항생제와 항균제를 이용해왔다. 하지만, 항생제 또는 항균제의 이용은 투여되거나 적용된 이들 항생제 또는 항균제에 내성을 보이는 세균 또는 다른 미생물을 선택하는 원치않는 효과를 나타낸다. 결과적으로, 치료 섭생(treatment regimen)이 부정적인 영향을 받거나, 또는 일부 경우에, 무효화될 수 있다.
- <13> 최근에, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730은 린코마이신(lincomycin)에 대한 내성을 나타내고 내성 유전자 *InuA*를 보유하는 것으로 보고되었다(Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. & Meile, L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. Syst Appl Microbiol. 29(2): 145-155). 상기 균주의 계놈에서 이 유전자를 조사하였는데, 이는 플라스미드 pLR585 상에서 개방해독틀(open reading frame) lr2105로서 확인되었다. 상기 플라스미드는 또한, 다체 내성 단백질(multidrug resistance protein)(lr2089)과 폴리케타이드 항생제 이출인자(polyketide antibiotics exporter)(lr2096과 lr2097)를 인코딩하는 유전자를 보유한다. 상기 플라스미드 상에서 이들 유전자 중에 어떤 유전자도 상기 균주의 공지된 생균성 특성 또는 내산성(acid tolerance)에 대한 명백한 연관 또는 중요한 의의를 갖지 않는다.
- <14> 특히, 생균제 업계에서는 다양한 제제에 담긴 이들 배양액이 위의 산성 환경을 통하여 충분한 숫자로 장의 나머지 부분에 도달할 뿐만 아니라, 위에서 성장하고 균체를 형성하여 위장관 전체에서 그들의 생균 효과를 발휘할 수 있도록 하기 위하여 산을 충분히 내성하는 젖산균(*Lactobacillus*)을 이용하는 것이 필요하다. 산에 대한 내성이 불량한 균주가 이용되면, 더욱 많은 수의 세균이 섭취되어야 하고, 이는 더욱 많은 비용을 유발한다. 게다가, 다양한 수단으로 이들 배양액을 산성 pH로부터 보호하기 위하여 많은 노력이 요구되는데, 이 역시 비용을 증가시킨다. 이런 이유로, 생균제 업계에서는 산을 충분히 내성하는 균주 및 결과적으로, 기존 균주의 내산성(acid tolerance)을 향상시키는 방법이 주목을 받고 있다. 유산균(lactic acid bacteria)의 내산성(acid tolerance)을 향상시키는 방법의 한 가지 실례는 특히 출원 US20050158423 A1에 제시되는데, 여기서 소형 열 충격 단백질(small heat shock protein)을 인코딩하는 플라스미드를 보유하는 균주가 이용되고, 이들 플라스미드를 유산균(lactic acid bacteria) 내로 이전하기 위한 방법 역시 제시된다. 하지만, 이는 상기 균주의 내산성(acid tolerance)을 증가시키기 위하여 플라스미드가 제거되는 본 발명과는 대비된다.
- <15> 본 발명의 다른 목적과 이점은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백할 것이다.
- ### 발명의 상세한 설명
- <19> 본 발명의 요약
- <20> 2가지 플라스미드 pLR581과 pLR585를 큐어링(curing)함으로써 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730으로부터 유래된 균주가 획득되었다. 상기 균주는 부모 균주보다 테트라사이클린(tetracycline)과 린코마이신(lincomycin)에 훨씬 민감하다. 이러한 이중 큐어링된 균주는 DSMZ에 기탁되었고 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938로 명명되었다. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938은 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730과 동일한 반복-PCR(repetitive PCR) 프로필, 발효 패턴(fermentation pattern), 루테린(reuterin) 생산, 형태(morphology), 성장 속도(growth rate), 점막 부착 및 내담즙성(bile tolerance)을 나타낸다. 하지만, 이러한 이중 큐어링된 균주는 더욱 높은 밀도로 성장하고 산성 조건에서 더욱 효과적으로 생존한다. 이들 균주가 공동-배양될 때에도, DSM 17938은 더욱 높은 경쟁력을 갖는다.
- <21> 따라서, 본 발명에서는 이러한 새로운 균주의 특성을 이용하고, 더욱 우수한 내산성(acid tolerance)을 나타내도록 변형된 유산균(lactic acid bacteria)의 특정의 플라스미드 큐어링된 균주, 이들 균주를 변형하는 방법 및 이들 균주를 포함하는 산물을 제시한다. 본 발명의 다른 목적과 특징은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백할 것이다.

## &lt;22&gt; 본 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구체예

<23> 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 DSM 17938(Budapest Treaty 하에 2006년 2월 6일자로 DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig에 기탁됨)은 2가지 플라스미드 pLR581과 pLR585를 큐어링(curing)함으로써 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730으로부터 유래된다. 이는 ATCC 55730과 동일한 반복-PCR 프로필, 발효 패턴, 루테린 생산, 형태, 성장 속도, 점막 부착 및 내담즙성(bile tolerance)을 나타내지만 상기 부모 균주보다 테트라사이클린과 린코마이신에 훨씬 민감하다. 놀랍게도, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938과 DSM 17686은 큐어링(curing)을 통한 플라스미드 제거로 인하여 내산성(acid tolerance)이 증가하는 것으로 밝혀졌다. 이는 공동-배양(co-culture) 실험에서 더욱 높은 경쟁력을 갖는데, 이는 산성 pH에서 더욱 높은 생존으로 설명될 수 있다.

<24> 본 발명의 한 가지 목적은 유산균(lactic acid bacteria)으로부터 플라스미드를 제거하여 산에 대한 더욱 강한 내성을 균주에 부여하고, 따라서 상기 균주가 장 내에서 더욱 효과적으로 생존하고, 결과적으로, 인간 건강에 더욱 유익할 수 있도록 하는 것이다. 이는 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 DSM 17686 및 새로운 균주 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 DSM 17938에서 확인되었다. 이는 내산성(acid tolerance)에 관련된 것을 코딩하지 않는 제거된 플라스미드가 산에 더욱 안정한 새로운 균주를 제공하는, 젖산균(*Lactobacillus*) 내에서 일반적인지만 기준에 알려지지 않았던 현상인 것으로 보인다. 이러한 효과는 본 발명에서, 더욱 강한 내산성을 나타내는 젖산균(*Lactobacillus*)을 산출하는데 이용된다.

<25> 본 발명의 다른 목적과 특징은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백할 것이다.

**실시 예**

## &lt;26&gt; 실시예 1

## &lt;27&gt; DSM 17686으로부터 pLR585의 큐어링(curing)

<28> 원형질체(protoplast) 형성과 재생에 의한 플라스미드 큐어링(curing)은 본질적으로, Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P. S., and Bottazzi, V. 1984. Protoplast formation, regeneration and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiol Lett 23:333-334)에 기술된 바와 같이 수행되었다. 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17686의 하룻밤 배양액은 10 ml MRS 배양액(Oxoid, Lenexa, KS, USA) 내에서 OD<sub>600</sub>=0.1로 희석하고, OD<sub>600</sub>=0.7-0.8까지 37°C에서 성장시켰다. 세포는 3000xg에서 10분 동안 원심분리(centrifugation)로 회수하고 10 ml 나노순수 물(Nanopure water)에서 세척하였다. 세포는 원심분리로 다시 회수하고, 2 ml의 원형질체 완충액(protoplast buffer)(0.2 M 인산염 완충액, 0.5 M 수크로오스, 20 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.0)에서 재현탁시켰다. 이들 세포는 원형질체 완충액 내에서 동등 부피의 10 mg/ml-1 라이소자임(lysozyme)과 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 원형질체는 3000xg에서 15분 동안 원심분리로 회수하고 20 ml 원형질체 완충액으로 세척하였다. 원형질체는 원심분리로 다시 회수하고 1 ml의 원형질체 완충액에 재현탁시키고, 이후 현미경 관찰을 수행하였다.

<29> 원형질체 완충액에서 희석액은 재생을 위한 0.5 M 수크로오스와 함께 MRS 아가 상에 도말하였다. 나노순수 물(Nanopure water)에서 희석액은 남아있는 전체 세포의 수를 평가하기 위하여 MRS 아가 상에 도말하였다. cfu의 숫자는 37°C에서 하룻밤 혼기성 배양후 측정하고, 추가로 하룻밤 배양후 다시 측정하였다. 재생된 군집(colony)은 8 µg/ml<sup>-1</sup> 린코마이신을 포함하거나 포함하지 않는 MRS 아가로 이전하였다. 플라스미드 큐어링된 후보는 린코마이신을 포함하는 MRS 평판 상에서 성장-없음으로 확인하였다.

## &lt;30&gt; 결과:

## &lt;31&gt; pLR585의 큐어링(curing)의 확인

<32> DSM 17938의 이들 플라스미드는 PCR로 분석하였다(도 1). pLR585와 pLR581은 부재하는 반면, 다른 2가지 플라스미드는 여전히 관찰되었다. 따라서, DSM 17938은 tetW-플라스미드 pLR581과 InuA-플라스미드 pLR585 둘 모두로부터 큐어링된다. DSM 17938 내에서 InuA의 부재 역시 PCR에 의해 탐지되었다(도 2).

## &lt;33&gt; 실시예 2

## &lt;34&gt; 린코마이신의 최소 저해 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)의 결정

<35> 이들 세균은 37°C에서 16시간 동안 MRS 액체배지(broth) 내에서 성장시켰다.  $10^5$  cfu  $\text{mL}^{-1}$ 로 희석후, 1  $\mu\text{l}$ 의 각 세균 균주는 린코마이신 또는 클린다마이신(clindamycin)(농도 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8과 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ <sup>1)</sup>)을 포함하는 MRS 평판 상에 반점으로 떨어뜨렸다. 이들 방울의 흡수후, 평판은 37°C에서 24시간 동안 협기성 대기(anaerobic atmosphere)에서 배양하였다. MIC는 가시적인 세균 성장이 관찰되지 않는 최저 항생제 농도로서 정의되었다. 테트라사이클린에 대한 MIC는 제조업체의 사용설명서에 따라, MRS 아가(Oxoid) 평판 상에서 성장하는 세균에서 E-test(AB Biodisk)로 조사하였다.

<36> 결과:

<37> pLR585의 큐어링(curing)은 MIC를  $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$  린코마이신에서 음성 대조(negative control) DSM 20016의 수준에 근접하는 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  린코마이신으로 감소시켰다. 클린다마이신에 대한 이미 극히 낮은 MIC 값은 변화가 없었다. 테트라사이클린에 대한 MIC 역시 E-test로 조사하였는데, DSM 17938과 DSM 17686의 경우에 12-16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ <sup>1</sup> 및 ATCC 55730의 경우에  $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$ 인 것으로 밝혀졌다.

표 1

균주	DSM 17938	DSM 17686	ATCC 55730	DSM 20016	1063
MIC 린코마이신 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.5	$>16$	$>16$	0.25	$>16$
MIC 클린다마이신 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$<0.125$	$<0.125$	$<0.125$	$<0.125$	$>16$

<38> 실시예 3

<40> 발효 패턴과 루테린 생산

<41> 발효 패턴은 제조업체의 사용설명서에 따라, api 50 CHL(bio-Merieux)을 이용하여 결정하였다. 루테린 생산을 탐지하기 위하여, 이들 세균은 먼저, MRS 평판(스트리크(streak)로서 접종됨) 상에서 48시간 동안 성장시켰다. 이들 평판은 이후, 500 mM 글리세롤 아가(1% 아가)로 덮고 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 루테린은 5 mL 2,4-디니트로페닐하이드라진(dinitrophenylhydrazine)(2 M HCl에서 0.1%)의 추가로 탐지하였다. 3분 배양후, 상기 용액을 부어넣고 5 mL 5 M KOH를 추가하였다. 균체 주변에 적색 구역은 루테린이 생산되었음을 증명한다.

<42> 결과:

<43> DSM 17938의 발현 패턴은 API 50 CHL을 이용하여 DSM 17686과 ATCC 55730과 비교하였는데, 어떤 차이도 탐지되지 않았다. 모든 균주는 L-아라비노스(L-arabinose), 리보오스(ribose), 갈락토오스(galactose), 글루코오스(glucose), 말토오스(maltose), 락토오스(lactose), 멜리비오스(melibiose), 사카로오스(saccharose), 라피노오스(raffinose)와 글루콘산염(gluconate)을 발효시키고 나머지 검사에서 음성이었다. 또한, 루테린 생산량은 이들 3 균주에서 동일하였다.

<44> 실시예 4

<45> 성장과 공동-배양

<46> 성장은 37°C로 미리 데워진 튜브 내에 MRS 액체배지에서, 하룻밤 배양액의 OD 0.1로 접종으로 탐지하였다. 이들 튜브는 37°C에서 배양하고, OD600 nm를 측정하기 위한 샘플은 8시간 동안 채취하였다. 각 세균은 삼중으로 분석하였다. 이들 세균의 공동-배양은 미리 데워진 MRS 액체배지 튜브 내에서 ATCC 5730, DSM 17686과 DSM 17938의 하룻밤 배양액의 동등량을 혼합함으로써 수행하였다. 혼합물은 37°C에서 하룻밤동안 배양하고, 이후 새로운 MRS 튜브로 재접종하였다. 이러한 절차는 3회 반복하였다. 시작 시점 및 각 큐어링 이후, 샘플은 MRS 평판 상에 상기 배양액의 상이한 희석액을 도말하고, 이후 군집을 3가지 MRS 평판; 항생제를 포함하지 않는 평판, 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  린코마이신을 포함하는 평판 및 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  테트라사이클린을 포함하는 평판으로 이전함으로써 분석하였다. MRS에서만 성장하는 군집은 DSM 17938인 것으로 간주되었고, 린코마이신을 포함하는 MRS에서 성장하는 군집은 DSM

17686인 것으로 간주되었고, 3가지 평판 모두에서 성장하는 균집은 ATCC 55730인 것으로 간주되었다.

<47> 결과:

<48> 균주 DSM 17938과 DSM 17686의 성장은 ATCC 55730과 비교하였다. 생성 시간에서 차이는 탐지되지 않았지만, 이 중 큐어링된 균주는 ATCC 55730보다 훨씬 높은 밀도로 성장하였다. 최종 OD는 ATCC 55730의 경우에  $4.78 \pm 0.13$ ; DSM 17686의 경우에,  $5.89 \pm 0.28$ ; DSM 17938의 경우에,  $6.00 \pm 0.26$ 이었다. 이들 3가지 균주는 또한, 대략 30 세대(3회 재접종) 동안 MRS 액체배지에서 공동-배양하였다. 이의 결과는 큐어링된 균주가 시험관내 성장에서 이점을 갖는다는 것을 명확하게 증명한다. 동등 수의 균주를 함께 접종하여도, 실험의 종결 시점에서 혼합물은 56% DSM 17938, 38% DSM 17686과 6% ATCC 55730으로 구성되었다. 이는 아마도, 큐어링된 균주가 더욱 높은 OD로 성장하거나, 또는 정체기(stationary phase)에서 더욱 효과적으로 생존하기 때문이다. 두 플라스미드의 상실은 또한, 감소된 부담(복제하는 DNA의 감소) 및 결과적으로, 더욱 높은 경쟁력을 이끌어낼 수도 있다.

<49> 실시예 5

<50> 점막에 결합

<51> 돼지 소장으로부터 점막을 이용하였다. 점막 물질과 BSA는 분리하고, PBS에서 희석하고, 천천히 회전시키면서 실온에서 3시간 동안  $100 \mu\text{l}$  용액의 접종으로 마이크로역가(microtiter) 웰(Greiner)에서 고정시켰다. 점막 물질과 BSA에 대한 최종 농도는 각각, OD<sub>280</sub> 0.1과  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 이었다. 웰은 1% Tween 20으로 보충된 0.2 ml PBS로 1시간 동안 차단하고, 이후 0.05% Tween 20(PBST)을 포함하는 PBS로 세척하였다. 이들 세균은 MRS 액체배지에서 37°C에서 16시간 동안 성장시키고, PBST에서 1회 세척하고, 동일한 완충액에서 OD<sub>600</sub> 0.5로 희석하였다. 이후, 웰은 PBST로 세척하고, 도립 현미경(inverted microscope)으로 결합 정도를 조사하였다. 모든 세균은 삼중으로 분석하였다.

<52> 결과:

<53> 균주 DSM 17938과 DSM 17686의 점막 결합 능력(mucus binding capacity)은 ATCC 55730과 비교하였다. 결합에서 차이는 탐지되지 않았다.

<54> 실시예 6

<55> 내산성(acid tolerance)

<56> 낮은 pH에서 생존을 조사하기 위하여, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주 ATCC 55730, DSM 17686과 DSM 17938은 MRS에서 37°C에서 하룻밤동안 성장시켰다. 5  $\mu\text{l}$ 의 이들 세균을 10 ml 미리-네워진 MRS에 추가하고, 1.0의 OD<sub>600</sub>에 도달할 때까지 37°C에서 배양하였다. 효소가 부재하는 Cotter 등(Cotter, P. D., Gahan, C. G. & Hill, C. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol Microbiol* 40: 465-475)으로부터 변형인 8 ml 합성 위액(stomach juice)( $8.3 \text{ g l}^{-1}$  프로테오스 펩톤(proteose peptone)(Oxoid),  $3.5 \text{ g l}^{-1}$  글루코오스,  $2.05 \text{ g l}^{-1}$  NaCl,  $0.6 \text{ g l}^{-1}$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  $0.11 \text{ g l}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub>,  $0.37 \text{ g l}^{-1}$  KCl, HCl로 pH 2.0으로 조정됨)에 800  $\mu\text{l}$  OD 1.0 배양액의 추가후, 이들 투브는 37°C에서 배양하고, 샘플은 1분, 20분, 50분과 90분후 채취하였다. 이들 샘플은 PBS에서 희석하고, MRS 평판 상에 도말하고, 37°C에서 24시간 동안 혐기성으로 배양하였다. 실험은 2회 반복하고, 매번 이중 샘플을 분석하였다. 이들 균주 사이에 차이는 스튜던트 t-검증(Student's t-test)으로 통계적으로 조사하였다.

<57> 결과:

<58> 이들 3 균주는 OD<sub>600</sub> 1.0(중기 내지 후기 대수증식기)으로 성장되고, 이후 산성 pH로 공격되었다. DSM 17938과 DSM 17686은 pH 2.0에서 50분 배양후 ATCC 55730보다 더욱 효과적으로 생존하였는데, 이들의 생존율은 각각, 41%, 28%와 20%이었다(도 3). 이들 차이는 p-값  $0.0006$ (DSM 17938 vs. ATCC 55730) 및  $0.04$ (DSM 17686 vs. ATCC 55730)로 유의하였다. 이러한 결과의 정확한 이유는 알 수 없다. 산성 pH에서 더욱 효과적인 생존은 아마도, 큐어링된 균주가 공동-배양 실험에서 더욱 경쟁적인 이유를 설명할 수 있다.

<59> 실시예 7

<60> 내담즙성(Bile tolerance)

<61> 이들 균주는 MRS 액체배지에서 37°C에서 16시간 동안 성장시켰다. 세균 혼탁액은 PBS에서 대략  $10^3 - 10^6 \text{ cfu}$

$\text{ml}^{-1}$ 로 희석하였다. 10  $\mu\text{l}$ 의 각 희석액은 상이한 농도의 소 담즙(0, 0.5, 1, 2, 4와 6%; Sigma B3883)을 포함하는 MRS 평판에 떨어뜨렸다. 각 세균은 이중으로 분석하였다. 이들 평판은 협기성 대기에서 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 군체는 계산하고, 내담즙성(bile tolerance)은 담즙 평판 상에 군집의 총수를 담즙을 포함하지 않는 MRS 평판과 비교함으로써 평가하였다. 대수 증식기(OD 0.5)에서 세균 역시 동일한 방식으로 조사하였다.

&lt;62&gt;

### 결과:

&lt;63&gt;

소 담즙에 대한 큐어링된 균주 DSM 17938과 DSM 17686의 내성은 ATCC 55730과 비교하였다. 이들 세균은 정체기와 대수 증식기(OD600 0.5) 모두에서 조사하였다. 이들은 정체기에서 담즙을 충분히 내성하지만, 생존과 성장이 대수 증식기에서 훨씬 낮았다. 하지만, 이들 균주 사이에 내성에서 차이는 탐지되지 않았다.

&lt;64&gt;

본 발명은 특정 구체예에 관하여 기술되긴 했지만, 본 발명의 기술적 사상 또는 범위를 벗어나지 않은 다양한 개변이 가능하고, 따라서 이런 개변은 본 발명의 범위 내에 속한다.

## 도면의 간단한 설명

&lt;16&gt;

도 1에서는 PCR로 플라스미드의 탐지를 도시한다. 번호는 아래와 같다: 1, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938; 2, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17686; 3, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730; 4, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 20016(음성 대조). 분석된 플라스미드는 아래와 같다: a, pLR580; b, pLR581; c, pLR584; d, pLR585.

&lt;17&gt;

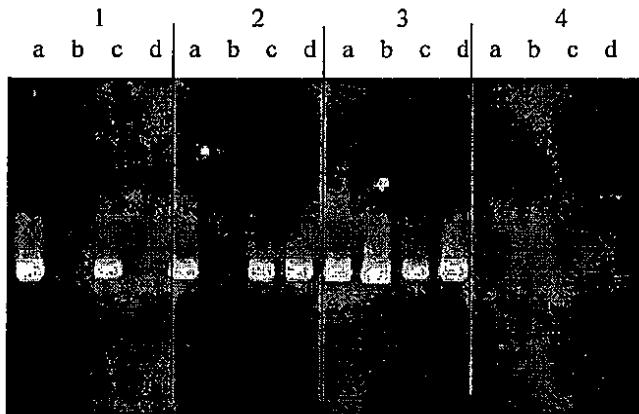
도 2에서는 내성 유전자(resistance gene) *InuA*의 탐지를 도시한다. 1, DSM 17938; 2, DSM 17686; 3, ATCC 55730; 4, DSM 20016.

&lt;18&gt;

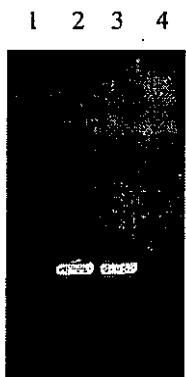
도 3에서는 막대그래프 형태로 ATCC 55730(왼쪽), DSM 17686(중간)과 DSM 17938(오른쪽)의 내산성(acid tolerance)을 도시한다. 이를 칼럼에서는 생존 세균의 비율(4회 반복의 평균)을 보여준다. 오차 막대(error bar)는 표준 편차(standard deviation)를 지시한다(\*:  $p$ -값 < 0.05; \*\*\*:  $p$ -값 < 0.001).

## 도면

### 도면1



도면2



도면3

