

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0110044

(43) 공개일자 2021년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/33 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)

C12M 23/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0025460

(22) 출원일자 2020년02월28일

심사청구일자 2020년02월28일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

윤성식

경기도 성남시 분당구 양현로166번길 20, 906동  
1502호(이매동, 이매촌동신9단지아파트)

이진선

서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 105동 309  
호(잠원동, 신반포2지구아파트)

(74) 대리인

김보정

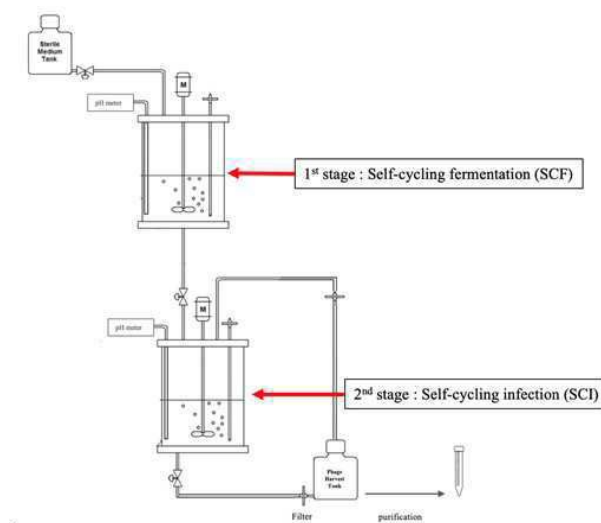
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 크로노박터 사카자키 박테리오파지의 대량 생산 방법

## (57) 요약

본 발명은 박테리오파지, 구체적으로 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 박테리오파지의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명은 2단계 자체순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정으로 구성되어 공정 초기에 크로노박터 사카자키의 배양에 있어 필요한 영양 배지를 첨가하고, 배양 배지의 pH 변화를 측정하는 것을 통해 최적의 박테리오파지의 접종 시점 및 수확 시점을 설정할 수 있는 바 기존 공정과 비교해 보았을 때 고농도의 박테리오파지를 단순하면서도 지속적으로 대량 생산하는 것이 가능하다.

## 대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

*C12M 41/26* (2013.01)

*C12M 45/02* (2013.01)

*C12M 47/10* (2013.01)

*C12M 47/12* (2013.01)

*C12N 2795/00051* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

1) 박테리아를 배양하여 박테리아 배양액을 수득하는 자가 순환 발효(self-cycling fermentation, SCF) 단계; 및

2) 상기 단계 1)에서 수득된 박테리아 배양액의 박테리아에 박테리오파지를 감염시킨 후 감염된 박테리아를 배양 및 수거하여 박테리오파지를 수득하는 자가 순환 감염(self-cycling infection, SCI) 단계;를 포함하는 박테리오파지의 대량 생산 방법으로서,

상기 자가 순환 발효(SCF) 단계는

i) 숙주 박테리아 균주의 단일 콜로니를 배지에 재현탁 후 배양하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 배양액을 제1 생물반응기에서 계대 배양하면서 pH를 모니터링하는 단계;

iii) pH가 5.5 내지 6.0일 때, 상기 단계 ii)의 배양액 중 일부를 수득하여 제2 생물반응기로 옮기는 단계; 및

iv) 상기 단계 ii)의 배양액 중 제1 생물반응기에 남은 배양액에 배지를 보충하는 단계;를 세부 단계로서 포함하고,

상기 자가 순환 감염(SCI) 단계는

A) pH 모니터링 하에서, 제2 생물반응기 내 박테리아 배양액 내 박테리아에 박테리오파지를 투입한 후 배양하면서 박테리오파지를 증식시키는 단계;

B) pH가 4.5 내지 5.5일 때, 상기 단계 A)의 증식된 박테리오파지를 수거 및 여과하여 여과액을 수득하는 단계;

C) 상기 단계 B)의 수득된 여과액의 일부를 제2 생물반응기에 재첨가하는 단계; 및

D) 상기 단계 B)의 남은 여과액을 정제하여 박테리오파지를 생산하는 단계;를 세부 단계로서 포함하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 박테리아는 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 제1 생물반응기 및 제2 생물반응기는 항아리(jar) 타입 발효기인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 i)의 배지는 액체 배지인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 ii)의 배양 온도는 20 내지 35℃인 것을 특징으로 하는, 박테리오파

지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 배양 시간은 2 내지 6시간인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 ii)의 계대 배양은 박테리아 성장곡선상 초기 대수기(early exponential phase)에 도달할 때인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 pH는 5.8인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 배양액 중 일부와 세부 단계 iv)의 제1 생물반응기에 남은 배양액의 부피비는 9:1인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 세부 단계 iv)의 제1 생물반응기에 남은 배양액과 보충되는 배지의 부피비는 1:9인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 박테리오파지는  $\Phi$  CS01인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 세부 단계 A)의 박테리오파지는 0.01 내지 0.5 감염다중도(Multiplicity of Infection, MOI)를 갖도록 투입되는 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 세부 단계 B)의 pH는 5.0인 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 세부 단계 B)의 여과는 0.2 내지 0.7  $\mu\text{m}$  기공 크기의 필터로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 세부 단계 C)의 정제는 클로로포름(chloroform), 염화나트륨(NaCl) 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG) 중에서 선택된 하나 이상으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 상기 SCI단계는 2 내지 5회 연속으로 반복되는 것을 특징으로 하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법.

#### 청구항 17

제1항의 방법을 수행하기 위한 장치.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 장치는 두 개 이상의 생물반응기를 포함하는 것을 특징으로 하는, 장치.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 상기 장치는 박테리오파지에 감염시킬 박테리아 및 박테리오파지에 감염된 박테리아의 배양 공간이 독립적인 것을 특징으로 하는, 장치.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 박테리오파지의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 10년 전 엔테로박터 사카자키(*Enterobacter sakazakii*)로 명명되었던 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)는 하나의 종으로 정의되었다. 크로노박터 사카자키는 조제 분유(powdered infant formula, PIF)와 같이 매우 건조한 곳에서도 살 수 있는 기회 감염성 그람 음성, 간상, 병원성 박테리아이다. 이러한 종은 음식, 물, 토양, 유제품류를 포함한 가공식품과 같은 환경에서 분리할 수 있다. 또한, 크로노박터 사카자키는 수막염 및 괴사성 장염을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. PIF는 부적절한 보관 과정에서 크로노박터 사카자키에 의해 쉽게 오염되기 때문에 성인에 비하여 면역 체계가 약한 신생아 감염의 주요 원인으로 꼽힌다.

[0005] 한편, 항생제 내성은 항생제가 더 이상 병원성 박테리아를 효과적으로 억제할 수 없게 한다. 다시 말해, 박테리아가 의약품의 화학 물질에 대한 내성을 갖도록 변하는 것이다. 이러한 경우 일반적인 감염이나 질병은 더 이상 일반적인 항생제로 치료할 수 없게 되고, 효과가 적어진 항생제로 인하여 내성이 있는 박테리아는 계속해서 살아남아 증식하여 치명적인 피해를 유발한다. 항생제 내성은 이제 세계 건강에 가장 큰 위협 중 하나로 간주되고 있지만, 항생제를 사용하는 한 내성 박테리아의 발생을 막을 방법은 없기 때문에 내성 박테리아의 성장을 늦추기 위해서는 항생제를 사용하지 않거나, 필요한 경우에도 가장 효과적인 방법으로만 사용해야 한다. 이러한 이

유로 최근 몇 년 동안 새로 개발되는 항생제의 수 또한 급격하게 줄어들고 있으며, 따라서 항생제 내성의 문제 없이 병원성 박테리아를 제어할 수 있는 생체 제어제가 필요한 실정으로 이러한 대안 중 하나로 박테리오파지가 주목받고 있다.

[0007] 박테리오파지(파지)는 감염된 박테리아를 죽이고 용해시킬 수 있는 박테리아의 바이러스이다. 박테리오파지는 20세기 초에 발견된 이후 사람과 동물의 다양한 박테리아 질병을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 박테리오파지의 가장 중요한 특성은 다양한 병원체에 보편적으로 작용하는 항생제와 달리 특정 박테리아 군주에 매우 특이적이라는 것이다. 이러한 특성 덕분에 박테리오파지는 우리 몸에서 유익한 박테리아를 죽이지 않고, 병원성 박테리아만을 선택적으로 죽일 수 있어 결과적으로 박테리오파지의 항균성은 항생제에 대한 대안으로서 박테리오파지를 적용하는데 적합하다. 2006년 미국 식품의약국(FOOD and Drug Administration, FDA)은 정제된 박테리오파지를 식품 첨가물로 사용하는 것을 허용했고, 이에 따라 식품 산업을 포함한 의료, 나노 물질 등 많은 분야에서 박테리오파지의 활용이 증가하고 있다. 따라서 박테리오파지에 대한 수요가 증가하고 있는 만큼 박테리오파지를 효율적으로 생산하기 위한 추가적인 연구들이 필요하다.

[0009] 이에 본 발명자들은 박테리오파지에 대한 높은 수요를 감당할 새로운 대량 생산 방법을 개발하기 위하여 노력한 결과, 2단계 자체 순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정을 도입하며 숙주 박테리아인 크로노박터 사카자키 배양 및 박테리오파지 번식에 따른 파라미터(pH, 광학 밀도, 생존 세포 수, 콜로니 형성 수) 측정으로 박테리오파지의 최적 접종 시점 및 수확 시점을 확인하여 생산의 연속성 및 효율성을 높이고, 공정 초기 단계에 영양 배지 보충만으로 고농도의 박테리오파지 용액을 연속적으로 수득할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 크로노박터 사카자키 박테리오파지 대량 생산 방법은 안정적이고 지속적으로 고농도의 박테리오파지 용액을 수득하는 방법으로 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 박테리오파지의 대량 생산 방법을 제공하기 위한 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 박테리아를 배양하여 박테리아 배양액을 수득하는 자가 순환 발효(self-cycling fermentation, SCF) 단계; 및 2) 상기 단계 1)에서 수득된 박테리아 배양액의 박테리아에 박테리오파지를 감염시킨 후 감염된 박테리아를 배양 및 수거하여 박테리오파지를 수득하는 자가 순환 감염(self-cycling infection, SCI) 단계;를 포함하는 박테리오파지의 대량 생산 방법으로서, 상기 자가 순환 발효(SCF) 단계는 i) 숙주 박테리아 군주의 단일 콜로니를 배지에 재현탁 후 배양하는 단계; ii) 상기 단계 i)의 배양액을 제1 생물반응기에서 계대 배양하면서 pH를 모니터링하는 단계; iii) pH가 5.5 내지 6.0일 때, 상기 단계 ii)의 배양액 중 일부를 수득하여 제2 생물반응기로 옮기는 단계; 및 iv) 상기 단계 ii)의 배양액 중 제1 생물반응기에 남은 배양액에 배지를 보충하는 단계;를 세부 단계로서 포함하고, 상기 자가 순환 감염(SCI) 단계는 A) pH 모니터링 하에서, 제2 생물반응기 내 박테리아 배양액 내 박테리아에 박테리오파지를 투입한 후 배양하면서 박테리오파지를 증식시키는 단계; B) pH가 4.5 내지 5.5일 때, 상기 단계 A)의 증식된 박테리오파지를 수거 및 여과하여 여과액을 수득하는 단계; C) 상기 단계 B)의 수득된 여과액의 일부를 제2 생물반응기에 재첨가하는 단계; 및 D) 상기 단계 B)의 남은 여과액을 정제하여 박테리오파지를 생산하는 단계;를 세부 단계로서 포함하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다.

## 발명의 효과

[0016] 본 발명의 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 박테리오파지의 대량 생산 방법은 2단계 자체 순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정으로 구성되어 있으며, 공정 초기에 크로노박터 사카자키의 배양에 있어 필요한 영양 배지를 첨가하고, 배양 배지의 pH 변화를 측정하는 것을 통해 최적의 박테리오파지 접종 시점 및 수확 시점을 설정할 수 있어 기존 공정과 비교해 보았을 때 고농도의 박테리오파지를 단순하고 지속적으로 대량 생산할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 방법을 크로노박터 사카자키 박테리오파지 대량 생산에 유용하게 이용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)의 체외 생장곡선을 나타낸 도이다.  
 도 2는 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 1단계 증식 곡선(one-step growth curve)을 나타낸 도이다.  
 도 3은 본 발명의 수정된 2단계 자가 순환(two-stage self-cycling) 공정을 단순화한 개략도이다.  
 도 4는 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 형태를 보여주는 도이다.  
 도 5는 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 생산을 위한 최적의 초기 감염 조건을 나타낸 도이다.  
 도 6은 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 열 안정성 테스트의 결과를 나타낸 도이다.  
 도 7은 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 pH 안정성 테스트의 결과를 나타낸 도이다.  
 도 8은 *E. coli* ER2738의 블루-화이트 셀렉션(Blue-white selection) 결과를 나타낸 도이다.  
 도 9는 제한효소로 절단된  $\Phi$  CS01 파지 DNA의 아가로스 겔 전기영동의 결과를 나타낸 도이다.  
 도 10은 테이프 메저 단백질(tape measure protein) 서열에 기초한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 인접 결합 계통수(Neighbor-joining phylogenetic tree)를 나타낸 도이다.  
 도 11은 테일 피버 단백질(tail fiber protein) 서열에 기초한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 인접 결합 계통수(Neighbor-joining phylogenetic tree)를 나타낸 도이다.  
 도 12는 크로노박터 사카자키 배양 배지에서 pH, 생존 세포 수 및 OD 사이의 상관 관계를 나타낸 도이다.  
 도 13은 크로노박터 사카자키를 사용한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 박테리아 유발 검사의 결과를 나타낸 도이다.  
 도 14는 리소자임 완충액(lysozyme buffer) 및 초음파 처리(sonication)로 전처리된 크로노박터 사카자키 배양 배지의 pH 및 생존 세포 수의 상관 관계를 나타낸 도이다.  
 도 15는 크로노박터 사카자키가 유발한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 특성을 나타낸 도이다.  
 도 16은 TSSC 공정을 반복하여 수득한 고역가 파지 용액의 역가를 나타낸 도이다.  
 도 17은 동결건조한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 시간에 따른 감염률을 나타낸 도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 1) 박테리아를 배양하여 박테리아 배양액을 수득하는 자가 순환 발효(self-cycling fermentation, SCF) 단계; 및 2) 상기 단계 1)에서 수득된 박테리아 배양액의 박테리아에 박테리오파지를 감염시킨 후 감염된 박테리아를 배양 및 수거하여 박테리오파지를 수득하는 자가 순환 감염(self-cycling infection, SCI) 단계;를 포함하는 박테리오파지의 대량 생산 방법으로서, 상기 자가 순환 발효(SCF) 단계는 i) 숙주 박테리아 균주의 단일 콜로니를 배지에 재현탁 후 배양하는 단계; ii) 상기 단계 i)의 배양액을 제1 생물반응기에서 계대 배양하면서 pH를 모니터링하는 단계; iii) pH가 5.5 내지 6.0일 때, 상기 단계 ii)의 배양액 중 일부를 수득하여 제2 생물반응기로 옮기는 단계; 및 iv) 상기 단계 ii)의 배양액 중 제1 생물반응기에 남은 배양액에 배지를 보충하

는 단계;를 세부 단계로서 포함하고, 상기 자가 순환 감염(SCI) 단계는 A) pH 모니터링 하에서, 제2 생물반응기 내 박테리아 배양액 내 박테리아에 박테리오파지를 투입한 후 배양하면서 박테리오파지를 증식시키는 단계; B) pH가 4.5 내지 5.5일 때, 상기 단계 A)의 증식된 박테리오파지를 수거 및 여과하여 여과액을 수득하는 단계; C) 상기 단계 B)의 수득된 여과액의 일부를 제2 생물반응기에 재첨가하는 단계; 및 D) 상기 단계 B)의 남은 여과액을 정제하여 박테리오파지를 생산하는 단계;를 세부 단계로서 포함하는, 박테리오파지의 대량 생산 방법을 제공한다.

- [0022] 상기 박테리아는 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 또한, 상기 제1 생물반응기 및 제2 생물반응기는 항아리(jar) 타입 발효기일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 i)의 배지는 액체 배지일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 ii)의 배양 온도는 20 내지 35℃일 수 있고, 구체적으로 21 내지 30℃로 설정될 수 있으며, 보다 구체적으로 22내지 26℃로 설정될 수 있고, 가장 바람직하게 24℃로 설정될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 온도에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 배양 시간은 2 내지 6시간일 수 있고, 구체적으로 3시간 내지 5시간일 수 있으며, 가장 바람직하게 4시간일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 시간에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 ii)의 계대 배양은 박테리아 성장 곡선상 초기 대수기(early exponential phase)에 도달할 때일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 대수기(exponential phase)는 로그기(logarithmic phase, log phase, logarithmic period, log period), 증식기 및 대수증식기와 같을 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 pH는 4 내지 9일 수 있고, 구체적으로 pH 4.5 내지 6일 수 있으며, 가장 바람직하게는 pH 5.8일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 pH에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 iii)의 배양액 중 일부와 세부 단계 iv)의 제1 생물반응기에 남은 배양액의 부피비는 9:1일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 또한, 상기 단계 1)의 세부 단계 iv)의 제1 생물반응기에 남은 배양액과 보충되는 배지의 부피비는 1:9일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 또한, 상기 단계 2)의 박테리오파지는  $\Phi$  CS01일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 또한, 상기 단계 2)의 세부 단계 A)의 박테리오파지는 0.01 내지 0.5 감염다중도(Multiplicity of Infection, MOI)를 갖도록 투입될 수 있고, 구체적으로 0.05 내지 0.3 MOI를 갖도록 투입될 수 있으며, 가장 바람직하게 0.1 MOI를 갖도록 투입될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 MOI에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 단계 2)의 세부 단계 B)의 pH는 4 내지 9일 수 있고, 구체적으로 pH 4.5 내지 6일 수 있으며, 가장 바람직하게는 pH 5.0일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 pH에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 단계 2)의 세부 단계 B)의 여과는 0.2 내지 0.7  $\mu\text{m}$  기공 크기의 필터로 이루어질 수 있고, 구체적으로 0.3 내지 0.5  $\mu\text{m}$  기공 크기의 필터일 수 있으며, 가장 바람직하게 0.45  $\mu\text{m}$  기공 크기의 필터일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 필터의 기공 크기에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 단계 2)의 세부 단계 C)의 정제는 클로로포름(chloroform), 염화나트륨(NaCl) 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG) 중에서 선택된 하나 이상으로 수행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 SCI단계는 2 내지 5회 연속으로 반복될 수 있고, 구체적으로 3 내지 4회 연속으로 반복될 수 있으며, 가장 바람직하게는 3회 반복될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 반복 횟수에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다.



- [0039] 본 발명은 상기 박테리오파지의 대량 생산 방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다.
- [0040] 상기 장치는 두 개 이상의 생물반응기를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 또한, 상기 장치는 박테리오파지에 감염시킬 박테리아 및 박테리오파지에 감염된 박테리아의 배양 공간이 독립적일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 2단계 자가 순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정을 구성하고, 추가적인 생산 효율성을 높이기 위해 숙주 박테리아인 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)의 배양 과정에서 배양액의 다양한 파라미터(pH, 광학 밀도, 생존 세포 수)의 변화를 측정하였으며, 박테리오파지의 번식에 따른 파라미터(pH, 광학 밀도, 콜로니 형성 수) 또한 측정하였다.
- [0044] 그 결과, 박테리오파지의 최적 접종 시점 및 수확 시점을 계산하여 생산의 연속성 및 효율성을 높일 수 있었고, 기존의 공정과 비교하여 안정적이고 지속적으로 높은 농도의 박테리오파지 용액을 수득할 수 있었다.
- [0046] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0047] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0049] <실험예 1> 크로노박터 사카자키의 체외 생장곡선(growth curve) 확인
- [0050] 크로노박터 사카자키의 시간에 따른 생장을 분석하기 위하여 생장곡선을 확인하였다. 먼저, 본 발명에서 사용된 박테리아인 크로노박터 사카자키 NCTC 11467(*C. sakazakii* NCTC 11467)은 내셔널 컬렉션 오브 타입 컬처(National Collection of Type Cultures, NCTC)에서 입수하였다. 생장곡선을 확인하기 위하여 박테리아 배양액을 마이크로플레이트 리더(Multiskan FC, Thermo, USA)를 사용하여 540 nm(OD<sub>540</sub>)에서 0.1의 광학 밀도로 조정하고, 20  $\mu$ l/ml의 숙주 박테리아를 접종한 후, 37℃에서 3시간 동안 진탕 배양기(shaking incubator)에서 미호기성 조건(microaerophilic conditions)하에 TSB 액체 배지(TSB broth, BD Bacto, USA)에 성장시켰다. 배양된 세포 내의 콜로니 형성 수(colony forming units, CFU) 값은 10분마다 측정되었다.
- [0051] 그 결과, 확인된 크로노박터 사카자키의 생장곡선에서 유도기(lag phase)는 약 30분 동안 유지되었고, 지수함수적 증식(exponential growth)이 이루어지는 대수기(exponential phase)를 완료하기 위해서는 140분이 걸리는 것으로 밝혀졌으며, 이후 정지기(stationary phase)에 들어가는 것으로 관찰되었다(도 1).
- [0053] <실험예 2> 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 1단계 증식 곡선(one-step growth curve) 확인
- [0054] 박테리오파지에 감염된 후 시간의 경과에 따른 박테리오파지의 증식을 확인하기 위하여 1단계 증식 곡선을 확인하였다. 1단계 증식 곡선의 분석을 위하여, OD<sub>540</sub> 값이 0.3인 대수기(logarithmic phase)에서 박테리아 배양액 5 ml를 4,000×g으로 10분 동안 원심 분리하고, 펠렛을 1 ml의 TSB 액체 배지에 재현탁시켰다. 그 다음, 박테리오파지 용액을 0.1 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)의 현탁액에 첨가하고, 이 혼합물을 37℃에서 30분 동안 배양한 다음, 11,000×g으로 10분 동안 원심 분리하고, 펠렛을 10 ml의 TSB 액체 배지에 재현탁시켰다. 박테리오파지의 역가(titer), 박테리오파지 용액 ml당 플라크 형성 수(plaque forming unit, PFU)를 이중층 플라크 측정법(double layer plaque assay)을 사용하여 120분 동안 10분 간격으로 측정하였다.
- [0055] 그 결과, 확인된  $\Phi$  CS01의 1단계 증식 곡선에서 잠재기(latent period)는 약 60분 동안 유지되었고, 대수기(exponential phase)는 60분 내지 80분인 것으로 관찰되었다. 숙주 세포(PFU/감염 세포)당 9.8개의 바이러스 입자(viral particles) 방출 크기(burst size)로 초기 감염 후 방출을 완료하기까지 80분이 걸리는 것으로 확인되었다(도 2).
- [0057] <실시예 1> 박테리오파지의 증폭 과정

[0058] 숙주 박테리아 균주인 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*)의 단일 콜로니를 TSB 액체 배지 5 ml에 재현탁(resuspend)시키고, 37℃의 진탕 배양기에서 100 rpm으로 배양하였다. 배양액이 OD<sub>540</sub>값이 0.3인 초기 대수기(early exponential phase)에 도달하였을 때, 용액 1 ml를 100 ml의 TSB 액체 배지로 계대 배양(sub-culture)한 다음, 계대 배양한 배양액이 OD<sub>540</sub>값이 0.3인 초기 대수기(early exponential phase)에 도달할 때까지 37℃의 진탕 배양기에서 100 rpm으로 배양하였다. 배양 후, 박테리오파지를 MOI가 0.1이 되도록 접종하고, 37℃에서 20분 동안 진탕 배양기에서 배양하였다.

[0060] <실시예 2> 박테리오파지의 정제(purification) 과정

[0061] 박테리오파지 증폭 후, 1 % (w/v) 농도인 클로로포름(chloroform) 1 ml 및 염화나트륨(NaCl) 1 mole 농도를 첨가하고, 진탕 배양기에서 200 rpm으로 37℃에서 30분 동안 추가로 배양하였다. 그 다음, 배양액을 30분 동안 4℃에서 11,000×g으로 원심 분리하고, 0.45 μm 기공 크기의 실린지 필터(syringe filter, vantec, USA)를 사용하여 상청액(supernatant)을 여과하였으며, 고체 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG 8000, Aldrich)을 현탁액(suspension)에 20 % (w/v)의 최종 농도(final concentration)로 첨가하고, 이 혼합물을 얼음에서 밤새 냉각시켰다. 그 다음, 용해물(lysate)을 11,000×g으로 100분 동안 원심 분리하고, 상청액을 버렸다. 펠렛을 SM 완충액(SM buffer) 5 ml로 재현탁시키고, 클로로포름 부피의 반을 첨가한 다음 부드럽게 혼합하였다. 혼합한 혼합물을 3,000×g으로 4℃에서 15분 동안 원심 분리하고, 0.45μm 기공 크기의 실린지 필터(syringe filter, Advantec, USA)를 사용하여 상청액을 회수하고 여과한 다음 냉장고에서 4℃에 보관하였다.

[0063] <실시예 3> 2단계 자가 순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정

[0064] 사용되는 생물반응기의 형태는 최적 박테리오파지 역가(titer)로 이어지는 감염 및 작용 조건을 확립하는데 중요한 역할을 한다. 그동안 박테리오파지 생산에 이용된 일반적인 생물반응기의 형태는 회분식(batch), 연속식(continuous), 2단계 연속식(two-stage continuous) 및 2단계 자가 순환(two-stage self-cycling)이며, 본 발명에서는 2단계 자가 순환(two-stage self-cycling, TSSC) 공정을 이용하였다. 상기 공정은 자가 순환 발효(self-cycling fermentation, SCF) 단계 및 자가 순환 감염(self-cycling infection, SCI) 단계로 구성되며, 본 발명의 TSSC 공정은 기존의 공정을 수정하여 수행되었다(도 3).

[0066] <3-1> 자가 순환 발효(self-cycling fermentation, SCF) 단계

[0067] SCF 단계에서, 숙주 박테리아 균주인 크로노박터 사카자키의 단일 콜로니를 10 ml의 TSB 액체 배지에 재현탁시킨 후, OD<sub>540</sub>값이 0.3이고, pH가 5.8인 초기 대수기(early exponential phase)에 도달할 때까지 37℃에서 배양하였다. 배양 후, 배양 용액 1 ml를 숙주 배양의 배양액 1000 ml 중에 10 ml인 1 % v/v 농도로 제1 생물반응기에 계대 배양(sub-culture)하였다. 그 다음, 계대 배양한 박테리아 배양 용액을 OD<sub>540</sub>값이 0.3이고, pH가 5.8인 초기 대수기(exponential phase)에 도달할 때까지 24℃에서 4시간 동안 배양하였다. 숙주 박테리아의 증식 후, 900 ml의 배양 배지를 제2 생물반응기로 옮기고 100 ml의 용액이 남겨진 제1 생물반응기에 900 ml의 신선한 TSB 액체 배지(broth)를 보충하였다.

[0069] <3-2> 자가 순환 감염(self-cycling infection, SCI) 단계

[0070] SCI 단계에서는, 박테리오파지를 MOI가 0.1이 되도록 접종 후 제2 생물반응기에서 4시간 동안 37℃에서 배양하였다. 용해물(lysate)의 pH가 5.0에 도달하였을 때, 이를 수거하여 0.45 μm 기공 크기의 보틀 탑 바큘럼 필터(bottle-top vacuum filter, Jet Biofil, USA)로 여과하였다. 여과 후, 여과된 용액 900 ml를 상기 <실시예 2>의 방법으로 정제하여 고역가(high titer) 박테리오파지 용액을 만들고, 여과된 용액 100 ml를 반복 감염을 위하여 제2 생물반응기에 첨가하였다.

[0071] 상기 과정을 3회 연속으로 반복하였다.

- [0073] 상기 TSSC 공정에서, 1단계인 SCF 단계 및 2단계인 SCI 단계를 고르게 회전시키기 위해서는 숙주 박테리아가 SCF 단계에서 대수기에 도달할 때까지 2단계에서 박테리오파지의 증식이 완료되어야하기 때문에 크로노박터 사카자키의 성장 속도를 늦추어야 할 필요가 있었다. 이에, 본 발명은 상기 <실시예 1>의 계대 배양한 배양액의 배양 방법과 다르게 제1 생물반응기의 온도를 24℃로 조정하여 4시간 후 숙주 박테리아가 초기 대수기에 도달하도록 하였다. 추가 실험에서는 숙주 박테리아가 24℃에서 배양될 때, 성장률을 제외하고 37℃에서 배양된 숙주 박테리아와 차이가 없음을 확인하였다(데이터는 나타내지 않음). 이러한 제어를 통하여, 상기 TSSC 공정의 1단계 및 2단계 사이의 순환이 균일하게 이루어질 수 있었고, 이를 기초로 하여 최대 3차례까지 높은 농도의 박테리오파지 용액이 수득될 수 있었다.
- [0075] <실험예 3> 투과 전자 현미경(Transmission electron microscopy, TEM)을 이용한 박테리오파지 Φ CS01의 형태 확인
- [0076] 200 kV에서 투과 전자 현미경(JEOLJEM-2100F FE-TEM, KBSI, Korea)을 이용하여 박테리오파지 Φ CS01의 구조를 관찰하였다. 먼저 108 PFU를 포함하는 고역가의 파지 용액을 2 % w/v 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색하였다. 파지 입자를 탄소 코팅된 그리드(grid) 상에 놓고, 2 % w/v 농도의 우라닐 아세테이트 한 방울을 포함하는 증류수에 침지시켰다. 그 다음, 200-메시 그리드(200-mesh grids, Gatan, USA)를 아밀 아세테이트(amy acetate) 중 2 % 콜로디온(collodion)으로 제조된 콜로디온 필름으로 코팅하고, 파지 입자로 탄소 필름 조각(carbon film fragments)을 흡수(absorb)하는데 사용하였다. 10분 동안 공기 건조(air drying) 후, 그리드에 TEM을 적용하였다. 음성 염색(negative stain)된 파지 입자의 이미지는 100,000× 및 150,000× 배율로 원뷰카메라(one-view camera, Gatan, USA)를 사용하여 촬영되었다.
- [0077] 그 결과, 박테리오파지 Φ CS01의 정이십면체대칭(icosahedral symmetry)을 갖는 구형 머리(Spherical head)는 65.74 nm이고, 단단한 꼬리(rigid tail)의 길이는 89.75 nm였다. 또한, Φ CS01은 비수축(non-contracted) 꼬리 및 수축 꼬리를 가지며, 꼬리에 시스형 구조(sheath-like structure)를 갖는 것으로 관찰되었다(도 4). 형태학적 특성으로 인하여, 파지 CS01은 미오비리데(Myoviridae)과에 속하는 것으로 추정되었다.
- [0079] <실험예 4> 박테리오파지 Φ CS01에 대한 최적의 감염 조건 확인
- [0080] 감염 조건에 따른 박테리오파지 용액의 생산성을 확인하였다. 일반적인 감염 범위의 경우 감염 부하(infection loads)에 대하여 0.4의 OD<sub>540</sub>값(약 5.0×10<sup>8</sup> CFU/ml의 세포 농도)에서 숙주 배양액이 1 내지 5 % v/v의 농도(10 ml 배양액에서 0.1 내지 0.5ml)이고, 초기 MOI에 대하여 1.0×10<sup>-4</sup> 내지 1.0×10<sup>-1</sup>의 범위를 가진다. 박테리오파지의 역가(titer)는 박테리오파지 용액 ml당 PFU를 이중층 플라크 측정법을 이용하여 측정하였다.
- [0081] 그 결과, 주어진 처리 조건 하에서 박테리오파지 Φ CS01의 최적 역가는 1 %의 감염 부하(infection load) 및 1.0×10<sup>-1</sup> 내지 1.0×10<sup>-2</sup> 사이에 초기 MOI로부터 수득되었다(도 5). 세포 용해 후, 세포 잔해를 최소화하기 위하여 1.0×10<sup>-1</sup> 초기 MOI로 1 %의 감염 부하를 선택하였다. 이러한 초기 감염 조건은 최적의 박테리오파지의 생산을 위한 생물반응기 작동에 사용되었다.
- [0083] <실험예 5> 박테리오파지 Φ CS01의 열 안정성 확인
- [0084] 온도 조건에 따른 박테리오파지 용액의 열 안정성을 확인하였다. 박테리오파지 Φ CS01의 열 안정성은 1시간 동안 다양한 온도 범위에 노출되며 평가되었다.
- [0085] 그 결과, 박테리오파지 Φ CS01은 4℃ 내지 37℃에서 배양한 경우 감염 활성도(infection activity)가 거의 유지되었고, 50℃ 내지 60℃에서 배양한 경우에는 감염성(infectivity)이 약간 감소되었다. 그러나, 70℃에서는 단일 플라크(single plaque)가 부족한 것으로 확인되었다(도 6).
- [0087] <실험예 6> 박테리오파지 Φ CS01의 pH 안정성 확인
- [0088] pH 변화에 따른 박테리오파지 용액의 pH 안정성 및 최적 pH를 확인하였다. 박테리오파지 Φ CS01의 pH 안정성은

1시간 동안 다양한 범위의 pH에 노출되며 평가되었다.

[0089] 그 결과, pH 4 내지 9에서 1시간 동안 배양한 후에는 감염성 파지에서 감소가 거의 관찰되지 않았다. 박테리오파지의 수는 pH 10 내지 11에서 감소된 것으로 나타났지만, pH 3 및 12에서는 검출된 활성 감염성 파지(active infectious phages)가 없었다. 결과적으로, pH 범위 4 내지 9는 박테리오파지 안정성에 최적인 것으로 확인되었다(도 7).

[0091] <실험예 7> 바이오패닝(bio-panning) 방법을 통한 스크리닝

[0092] 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 숙주 범위를 넓히기 위하여 바이오패닝 방법으로 박테리오파지 라이브러리로부터 친화성이 높은 펩타이드 서열 확인을 위한 스크리닝을 수행하였다.

[0094] <7-1> 대상 병원균 크로노박터 사카자키의 고정

[0095] 1시간 동안 65℃에서 배양한 열비활성화된 크로노박터 사카자키 현탁액을 탄산염 완충제(carbonate buffer)(탄산수소나트륨( $\text{NaHCO}_3$ ) 35 mM, 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 15 mM(pH=9.80))에서 제조하고, ml당 약 109 CFU에 상응하는 540 nm에서 0.5의 광학 밀도(optical density)로 조정하였다. 60 mm  $\times$  15 mm 세포 배양 접시(Cell Culture Dishes, Falcon®, USA)에 박테리아 현탁액 1.5 ml를 채우고, 37℃의 박테리아 배양기에서 밤새 배양하였다. 세포 배양 접시를 블로킹 완충액(blocking buffer)으로 4℃에서 1시간동안 차단하고, 코팅된 플레이트를 제조하기 위하여 TBST 완충액(buffer)로 6회 세척하여 대상 병원균(target pathogen)인 크로노박터 사카자키를 고정(immobilization)하였다.

[0097] <7-2> 바이오 패닝 방법을 이용한 파지 디스플레이 펩타이드(phage displayed peptides)의 선택

[0098] 전체 박테리오파지 라이브러리(library)를 TBS 완충액 1 ml에 100 배 희석하고, 박테리아가 코팅된 플레이트 상에 피펫으로 옮긴 후, 실온에서 1시간 동안 부드럽게 흔들었다. 그 다음, 깨끗한 종이 타월에 플레이트를 쏟아 비 결합 파지(Non-binding phages)를 버리고, TBST 완충액으로 플레이트를 10 회 세척하였다. 용출 완충액(elution buffer)(글리신-염화수소(Glycine-HCl) 0.2M(pH=2.2)) 1 ml로 결합된 파지(bound phage)를 용출(elute)하고 실온에서 20분 동안 부드럽게 혼합하였다. 혼합한 용출액(eluate)을 미세 원심 분리기 튜브(microcentrifuge tube, Axygen, USA)에 피펫으로 옮기고, 중화 버퍼(neutralize buffer) 150  $\mu$ l로 중화(neutralize)하고, 4℃에서 보관하였다.

[0100] <7-3> 선택된 파지의 증폭

[0101] 보관된 상기 파지 용출액을 이용하여 *E. coli* ER2738 숙주 박테리아를 감염시킴으로써 증폭시켰다. 격렬한 진탕으로 37℃에서 4.5시간 동안 성장시킨 후, 원심 분리로 박테리아 세포 잔해물(debris)을 제거하고, 1/6 부피의 용액(20 % w/v 폴리에틸렌 글리콜-8,000(polyethylene glycol-8,000) 및 2.5 M 염화나트륨( $\text{NaCl}$ ))을 첨가함으로써 상청액(supernatant) 중의 파지를 4℃에서 밤새 침전시켰다. 이어서 침전물을 원심 분리하고, 펠릿(pellet)을 TSB 완충액 1 ml에 재현탁한 후 증폭된 파지 용출액 100  $\mu$ l을 적정하여 파지 농도(concentration)를 측정하였다.

[0102] 상기 용출액의 나머지는 LB 배지에서 배양된 *E. coli* ER2738로 증폭시켰다. *E. coli* ER2738가 있는 250 ml 삼각 플라스크에 LB 배지 20 ml를 접종하였다. 37℃에서 격렬히 진탕시키며 배양하고, 20 ml 배양액을 조심스럽게 모니터링하여 OD<sub>620</sub> 값이 0.01 내지 0.05인 초기 대수기를 넘지 않도록 하였다. *E. coli* ER2738의 20 ml 배양액에 용출액을 추가하여 나머지 용출액을 증폭시켰다. 37℃에서 격렬히 진탕시키며 4.5시간 동안 배양한 후, 12,000  $\times$  g으로 10분 동안 원심 분리하여 박테리아 세포 잔해물을 제거하고, 1/6 부피의 PEG 용액을 첨가함으로써 상청액에 파지를 침전시키고 4℃에서 밤새 보관하였다.

[0103] 상기 침전된 PEG를 4℃에서 15분 동안 12,000  $\times$  g으로 회전시키고, 상청액을 버린 다음, 튜브를 잠시 회전시키고 피펫으로 잔류 상청액을 제거하였다. TBS 1 ml에 펠릿을 현탁시키고, 현탁액을 마이크로 원심 분리 튜브로 옮긴 후, 4℃에서 5분 동안 12,000  $\times$  g으로 회전시켜 잔류 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 멸균된 미세 원심 분리 튜브

브에 옮기고, 1/6 부피의 PEG 용액을 첨가하여 침전시켰다.

[0104] 상기 침전된 PEG를 얼음에서 15 내지 60분동안 배양하고 4℃에서 10분 동안 12,000×g으로 원심 분리하였다. 상청액을 버리고 마이크로 피펫으로 잔류 상청액을 제거한 후, 펠렛화를 위하여 TBS 원심 분리기에서 12,000×g으로 1분 동안 원심 분리하여 200 μL 펠렛을 현탁하고, 상청액을 새로운 튜브로 옮겼다.

[0106] <7-4> 블루-화이트 셀렉션(Blue-white selection) 수행

[0107] 파지 적정(titration)을 위하여, *E. coli* ER2738의 단일 콜로니를 LB 액체 배지 10 mL에 접종하고, OD<sub>620</sub> 값이 0.5인 중기 대수기까지 37℃의 진탕 배양기에서 250 rpm으로 배양하였다. 3 mL의 평형화된 아가로스 탑을 멸균 배양 튜브에 분배하고 45℃의 수조에 넣은 뒤, 파지 용액을 LB 액체 배지에 10 배 희석액으로 연속 희석하였다. *E. coli* ER2738의 배양이 중기 대수기에 도달하였을 때, 배양액 200 μL를 희석된 파지 용액을 함유하는 각각의 미세 원심 분리 튜브에 분배하였다. 각 희석액의 10 μL를 별도의 튜브에 분주(aliquot)하고, 실온에서 5분 동안 혼합 및 배양하였다.

[0108] 한 번에 하나씩, 감염된 세포를 45℃로 데워진 아가로스를 함유하는 배양 튜브로 옮긴 즉시 예열된 LB/IPTG/X-gal 플레이트에 부었다. 플레이트를 기울임으로써 상부 아가로스 겔이 균일하게 펼쳐졌다. 5분 동안 냉각 후, 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하였다. 다음날, 플레이트상의 플라크(plaques)를 계수하고, 10 μL당 PFU로 전환시켰다. 라이브러리 클로닝 벡터 M13KE는 lacZ α 유전자를 운반하기 때문에, α-상보성(alpha complementation)으로 인하여 X-gal 및 IPTG를 함유한 배지에 박테리오파지 플라크가 파랗게 나타나는 것을 확인하였다(그림 8).

[0110] <실험예 8> 박테리오파지 Φ CS01의 숙주 범위(host range) 확인

[0111] 상이한 박테리아 균주들을 이용하여 박테리오파지의 숙주 범위 스펙트럼을 확인하였다(표 1). 프로토콜에 따라 스폿 용해 분석(spot lysis assay)을 수행하였다. 10개의 상이한 숙주 박테리아 각각을 부드러운 0.75 %의 한천(agar) 5 mL에 접종하고, 고형화된 1.5 % 한천 플레이트에 부었다. 부드러운 한천이 경화되기 전, 파지 용액 20 μL를 상단 한천 플레이트(top agar plate)에 흘 뿌리고, 12시간 동안 37℃에서 배양하였다. 박테리오파지 Φ CS01에 대한 민감성(susceptibility)은 접종 후 용해 구역의 출현 및 플라크(plaque) 형성의 측정으로 확인되었다. 선명도의 정도에 따라, 관찰된 결과는 두 가지로 분류되었다: (+)또렷한 플라크(plaques) 및 (-)플라크 없음. 엔테로박터(*Enterobacter*) 및 기타 변종은 숙주 범위 검사(host-range test)를 위하여 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC) 또는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 획득되었다.

[0112] 그 결과, 10개의 상이한 숙주 박테리아 중 크로노박터 사카자키만이 Φ CS01에 대한 민감성을 가지는 것으로 확인되었다.



표 1

Bacteria	Strain No. <sup>a</sup>	Susceptibility <sup>b</sup>
<i>Cronobacter sakazakii</i> (formerly <i>Enterobacter sakazakii</i> )	ATCC 29544	+
<i>Enterobacter sp.</i>	ATCC 21754	-
<i>Enterobacter pyrinus</i>	KCTC 2590	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	ATCC 35956	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 14917	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-

[0113]

[0115] <실험예 9> 박테리오파지 Φ CS01 DNA를 분해하는 제한효소(restriction enzyme)의 확인

[0116] 박테리오파지의 분자 특성 분석을 위하여 박테리오파지 DNA를 절단하는 제한효소를 확인하였다. 박테리오파지의 DNA 샘플을 제한효소 EcoR I, EcoRV, HindIII, BamH I, xho I 및 Sal I 로 절단시켰다.

[0117] 그 결과, 크로노박터 사카자키 박테리오파지 Φ CS01은 제한효소 EcoR I, EcoRV, HindIII, BamH I 및 Sal I 에 민감하지만, Xho I 에는 민감하지 않다는 것을 확인할 수 있었다(도 9).

[0119] <실험예 10> 박테리오파지 Φ CS01의 진화계보(evolutionary tree) 확인

[0120] 크로노박터 박테리오파지의 인접 결합 계통수(Neighbor-joining phylogenetic tree)를 분석하여 근접한 박테리오파지의 분류를 확인하였다. 박테리오파지의 진화 이력은 단리된 파지의 테이프 메저 단백질(tape measure protein, TMP) 서열(도 10), 테일 피버 단백질(tail fiber protein) 서열(도 11) 및 상이한 병원체에 감염된 19개의 추가적인 파지를 기초로 인접 결합 방법(neighbor-joining method)을 사용하여 추론되었다. 1000회 이상의 부트스트랩 시험(bootstrap test)에서 함께 분류된 연관 분류군(taxa)인 복제 트리(replicate trees)의 백분율은 분과 옆에 표시된다. 트리는 계통수를 추론하는데 사용되는 진화론적인 거리와 동일한 단위의 가지 길이를 가지며 크기대로 그려졌다. NCBI BLAST 인접 결합 클러스터 방법(neighbor joining clustering method) 및 Mega X 소프트웨어(<http://www.megasoftware.net>)를 사용하여 진화적 분석을 수행하였다.

[0121] 그 결과, 최대 시퀀스 차이(sequence difference)는 0.75였다. 계통 발생적 분류는 박테리오파지 Φ CS01의 TMP 및 tail fiber protein이 크로노박터(*Cronobacter*) 파지의 분류에 가장 근접한 것으로 드러났고, 이어 대장균속(*Escherichia*) 파지의 분류와 가장 유사한 것으로 확인되었다.

[0123] <실험예 11> 크로노박터 사카자키 배양 배지에서 pH, 생존 세포 수(viable cell counts) 및 OD의 변화에 따른 관계 확인

[0124] 크로노박터 사카자키의 성장에 따른 가변 매개 변수(pH, 생존 세포 수 및 OD)의 변화를 측정하여 pH 변화에 따른 생산성을 확인하였다. 숙주 박테리아인 크로노박터 사카자키를 540 nm(OD<sub>540</sub>)에서 0.1 흡광도로 조정하고, 3 시간 동안 37℃의 진탕 배양기의 TSB 액체배지에서 성장시켰다.

[0125] 박테리아 배양의 생존 세포 수 및 OD 변화를 관찰한 결과, 일반적으로 생존 세포 수 및 OD 사이는

정비례하였고, pH 및 OD 사이는 반비례하는 것으로 나타났다(도 12(A), 12(B)). 배양하는 동안, 배양 배지의 pH는 6.4에서 4.5로, OD는 0.05에서 0.62로 증가하였다. 이 결과를 통하여, 배양 배지의 pH가 약 5.8일 때 박테리아 군주가 대수기에 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 뒷받침하기 위하여, 배양균의 pH 및 생존 세포 수 사이의 상관 관계도를 관찰한 결과, 배양균의 pH 및 생존 세포 수 사이는 반비례하였다. 또한, 배양 배지의 pH가 약 5.8일 때 크로노박터 사카자키 배양균이 대수기에 있음을 확인하였다(도 12(C)).

[0127] <실험예 12> 크로노박터 사카자키를 사용한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 박테리아 유발 검사(challenge test)에서 pH, 생존 세포 수(viable cell counts) 및 OD의 변화에 따른 관계 확인

[0128]  $\Phi$  CS01의 증식에 따른 가변 매개 변수(pH, 생존 세포 수 및 OD)의 변화를 측정하여 pH 변화의 이유를 확인하였다. 크로노박터 사카자키의 성장에 파지  $\Phi$  CS01의 효과를 관찰하기 위하여 37℃에서 180분 동안 배양하였다.

[0129] 그 결과, 실험군(파지  $\Phi$  CS01 감염 배양균) 및 대조군(비-파지  $\Phi$  CS01 감염 배양균) 사이의 차이가 확인되었다. 실험군 및 대조군의 생존 세포 수 및 OD<sub>540</sub> 사이의 차이는 대수기 후기에 나타났다(도 13(A), 13(B)). 또한, 실험군 및 대조군의 pH 사이의 차이 역시 대수기 후기에 뚜렷하게 관찰되었다(도 13(C)). 이 결과 통하여 파지의 용해 활성(lysis activity)이 배양 배지의 pH 반등(rebound) 이유 중 하나임을 확인하였다.

[0131] <실험예 13> 리소자임 완충액(lysozyme buffer) 및 초음파 처리(sonication)로 전처리된 크로노박터 사카자키 배양 배지의 pH 및 생존 세포 수 변화에 따른 관계 확인

[0132] 크로노박터 사카자키의 성장에 따른 가변 매개 변수(pH 및 생존 세포 수)의 변화를 측정하여 pH 변화의 이유를 확인하였다. 크로노박터 사카자키를 진탕 배양기에서 250 rpm으로 대수기 후기에 도달할 때까지 37℃에서 50 ml의 코니칼 튜브(conical tube) 내 BHI 배지에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음, 샘플을 원심 분리하고 STET 완충액(트리스-염화수소(Tris-HCl) 10 mM, pH=8.0, 염화나트륨(NaCl) 0.1 M, EDTA 1 mM, 및 트리톤 X-100(TRITON X-100) 5% w/v)에 펠렛을 재현탁시키고, 제조된 리소자임(lysozyme) 용액(트리스-염화수소(Tris-HCl) 10 mM 중 10 mg/mL, pH=8.0)을 첨가하였다. 이후 용액의 pH를 상기 STET 완충액 및 리소자임 용액 첨가 전의 pH로 염화수소(HCl) 용액을 첨가하여 조정한 뒤, 상기 용액을 30분 동안 초음파 처리하고, 50 ml의 코니칼 튜브로 옮겨 37℃에서 30분 동안 배양한 뒤, Ag/AgCl 전극(Beckman Coulter Inc., Sharon Hill PA)을 사용하여 10분마다 측정하였다.

[0133] 그 결과, 일반적으로 생존 세포 수와 pH 사이는 반비례하였다(도 14). 한편, 리소자임 용액 및 STET 완충액으로 처리한 후 초음파를 처리하는 경우에는 용액의 pH가 반등(rebound)되는 것으로 밝혀졌다. 이 결과를 통하여, 박테리아 세포 용해가 배양 배지의 pH 반등에 대한 이유 중 하나임을 확인하였다.

[0135] <실험예 14> 크로노박터 사카자키가 유발한 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 특성 확인

[0136]  $\Phi$  CS01의 증식에 따른 파라미터(pH, 생존 세포 수 및 OD)의 변화를 측정하여 pH 변화의 이유를 확인하였다. 숙주 박테리아인 크로노박터 사카자키를 540 nm(OD<sub>540</sub>)에서 0.1 흡광도로 조정하고, 37℃의 진탕 배양기 속 TSB 배지에서 90분 동안 성장시켰으며 박테리오파지  $\Phi$  CS01은 OD<sub>540</sub>이 0.3일 때 박테리아 배양을 유발하였다.

[0137] 그 결과, 파지는 배양균의 세포내 물질을 방출하게 하는 박테리아 세포 용해를 유발하고, 배양액에서 완충용액으로 작용하여 pH가 반등하도록 유발하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과들을 뒷받침하기 위하여, 배양액의 pH 및 생존 세포 수 사이의 상관 관계를 관찰하였다(도 15). 박테리아 배양 유발 후 60분까지 배양 배지의 pH는 5.61에서 4.65로 감소되고, 이후 천천히 5.08로 반등하였다. 한편, 파지의 역가는 30분까지 약간 증가하다가 이후 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 15(A)). 한편, 배양균이 파지  $\Phi$  CS01을 유발한 후, pH가 반등될 때 pH와 생존 세포 수 사이가 반비례하는 것을 확인하였다(도 15(B)). 파지 용해 효과로 생존 세포 수가 감소함에 따라 배양균의 pH가 반등하는 것을 관찰할 수 있었고, 이러한 결과를 뒷받침하기 위하여 크로노박터 사카자키의 생존 세포 수와 파지  $\Phi$  CS01의 역가 사이의 상관관계가 파지  $\Phi$  CS01의 농도가 증가함에 따라, 배양 배지의 생존 세포 수는 역으로 감소하는 것을 확인하였다(도 15(C)). 또한, 6시간까지 추가로 배양하였지만, 4시간 후에는 역가 및 pH의 유의한 변화가 측정되지 않아, 본 발명의 최적 배양시간은 4시간으로 확인되었다.

[0139] <실험예 15> TSSC 공정으로 수득한 고역가 파지 용액의 확인

[0140] 상기 <실험예 11> 내지 <실험예 14>의 생존 세포 수(CFU/ml), 박테리오파지 역가(PFU/ml) 및 배양액의 pH에 대한 상관 그래프 및 데이터를 통하여, 박테리오파지의 생산 효율성을 높일 수 있는 박테리오파지의 접종 및 수확 시점을 시간의 경과 대신 pH의 변화로 확인할 수 있었다.

[0141] 그 결과, 안정적이고 지속적인 공정으로 종래의 방법에 비하여 박테리오파지 용액의 농도가 높아졌고, 상기 <실시예 3>의 공정에 따라 수득한  $\Phi$  CS01의 수율이 종래의 플라스크 배양 방법보다 약 24배 높은 것을 확인하였다(도 16). 파지 용액 또는 박테리아 배양액의 추가없이 단순히 공정 초기에 영양 배지를 첨가함으로써, 박테리오파지에 감염시킬 박테리아 및 박테리오파지에 감염된 박테리아가 독립적인 배양 환경을 가지는 본 발명의 크로노박터 사카자키 박테리오파지의 대량 생산 방법으로 지속적으로 높은 역가의 파지 용해물을 안정적으로 얻을 수 있는 것이 확인되었다.

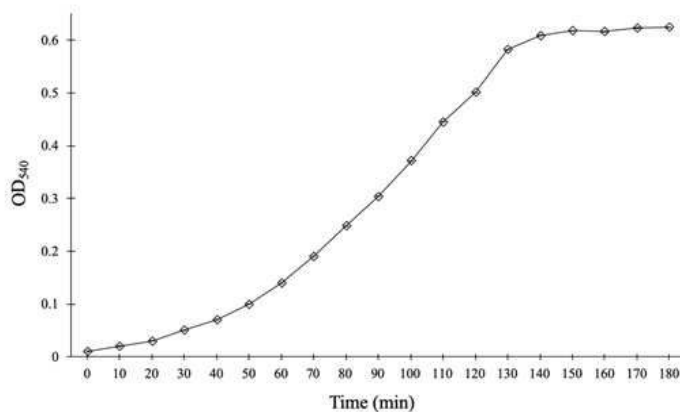
[0143] <실험예 16> 동결건조(lyophilization) 후 박테리오파지  $\Phi$  CS01의 안정성 확인

[0144] 건조한 환경에서도 살아남는 크로노박터 사카자키로 인한 감염 예방을 위하여 박테리오파지  $\Phi$  CS01를 동결건조한 후 그 감염력을 확인하였다. 많은 동결보호제(cryoprotectants) 중 가장 많이 사용되는 것은 설탕으로, 특히 0.5 M의 수크로스(sucrose)가 가장 효과적인 안정제로 알려져있다. 이에, 안정제(0.5 M의 수크로스)에 파지  $\Phi$  CS01를 동결건조 시키고 4℃에서 보관한 다음, 멸균 증류수에 동결건조 전과 동일한 부피로 현탁시키고, 감염성 부유 용액(infectivity suspended solutions)을 측정하기 위하여 이중층 플라크 검사(Double layer plaque assay)를 수행하였다.

[0145] 그 결과, 동결건조 직후에 약 1 로그 스케일(log scale)의 감염력 감소가 관찰되었지만, 그 후 감소 없이 9주 동안 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 17).

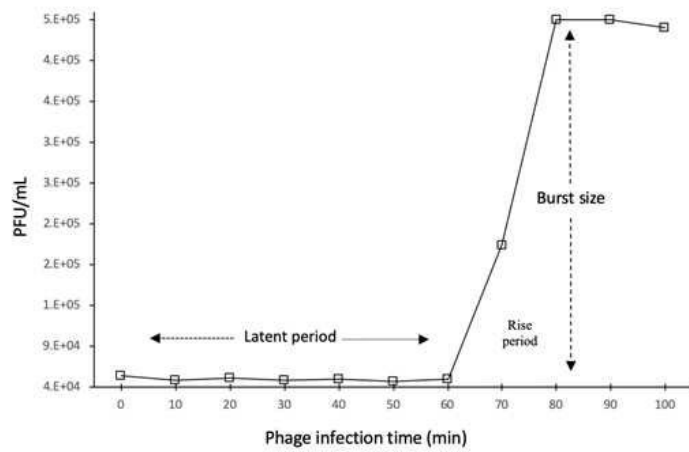
## 도면

### 도면1

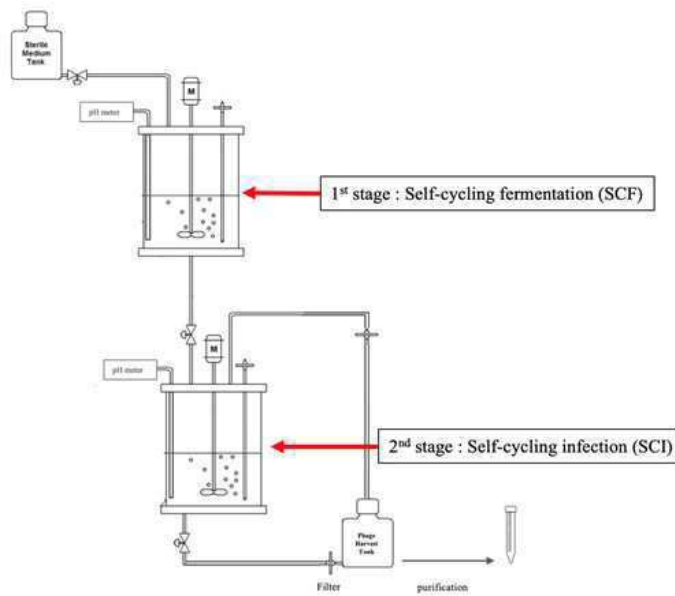




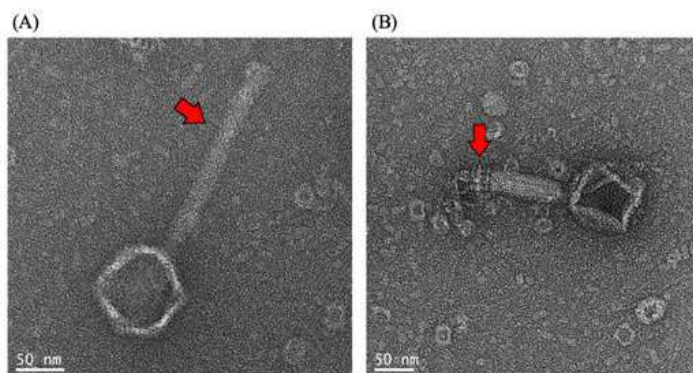
도면2



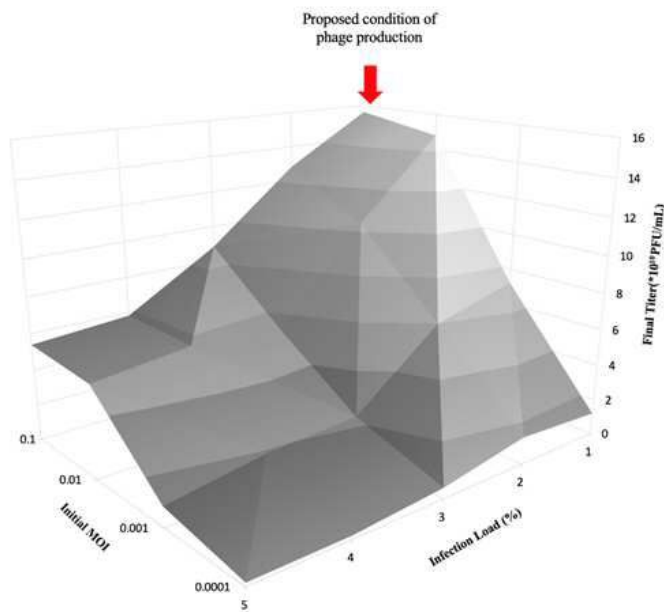
도면3



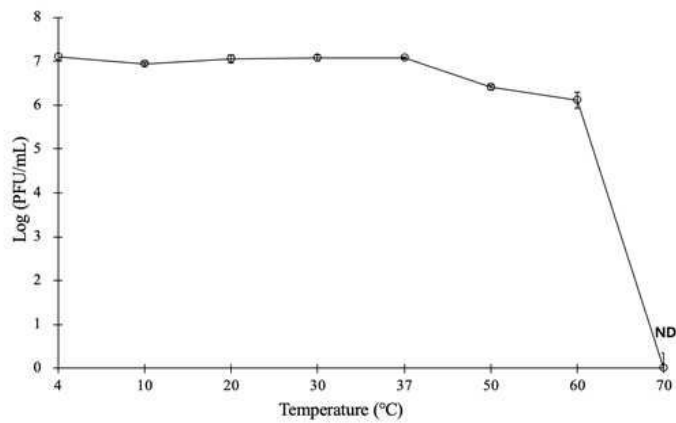
도면4



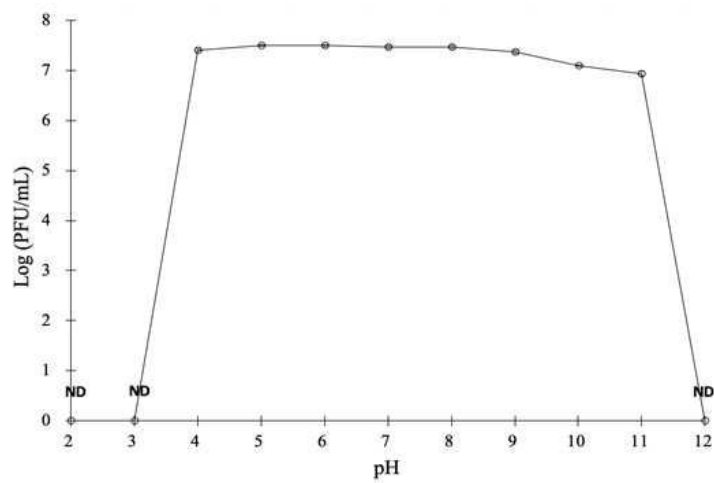
도면5



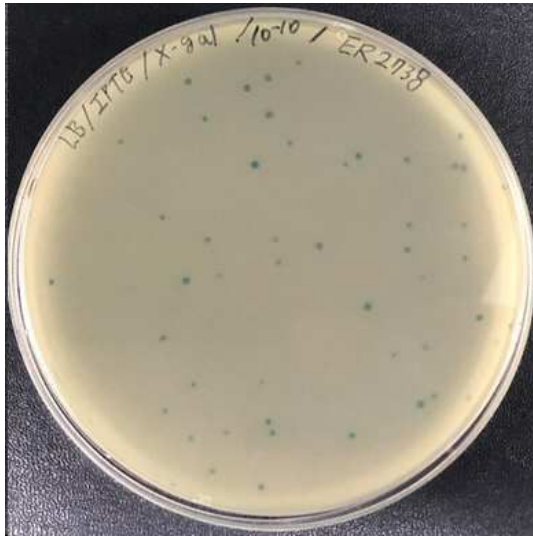
도면6



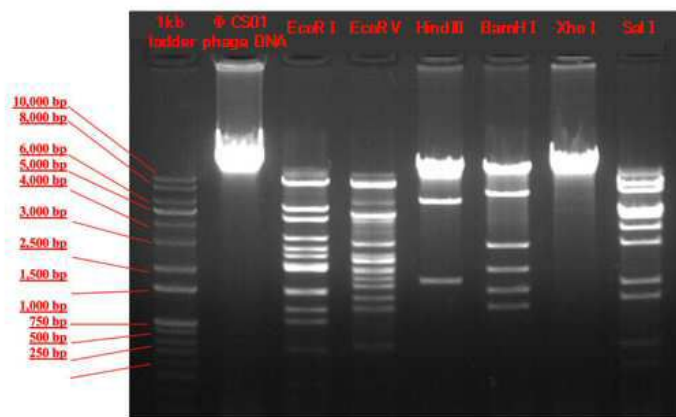
도면7



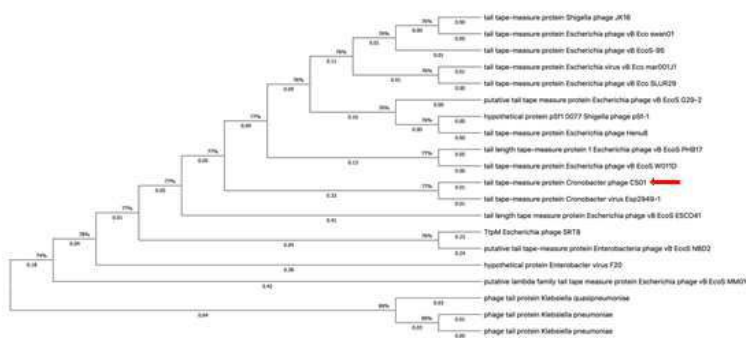
도면8



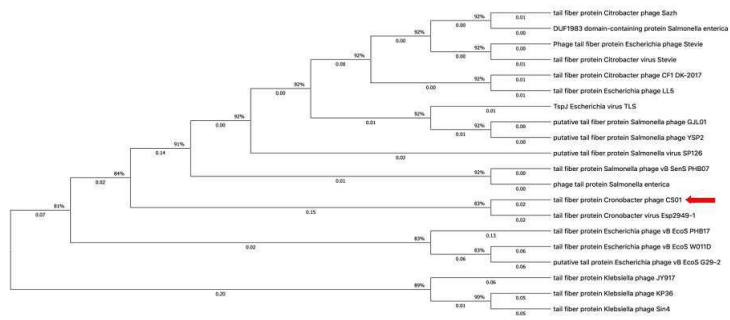
도면9



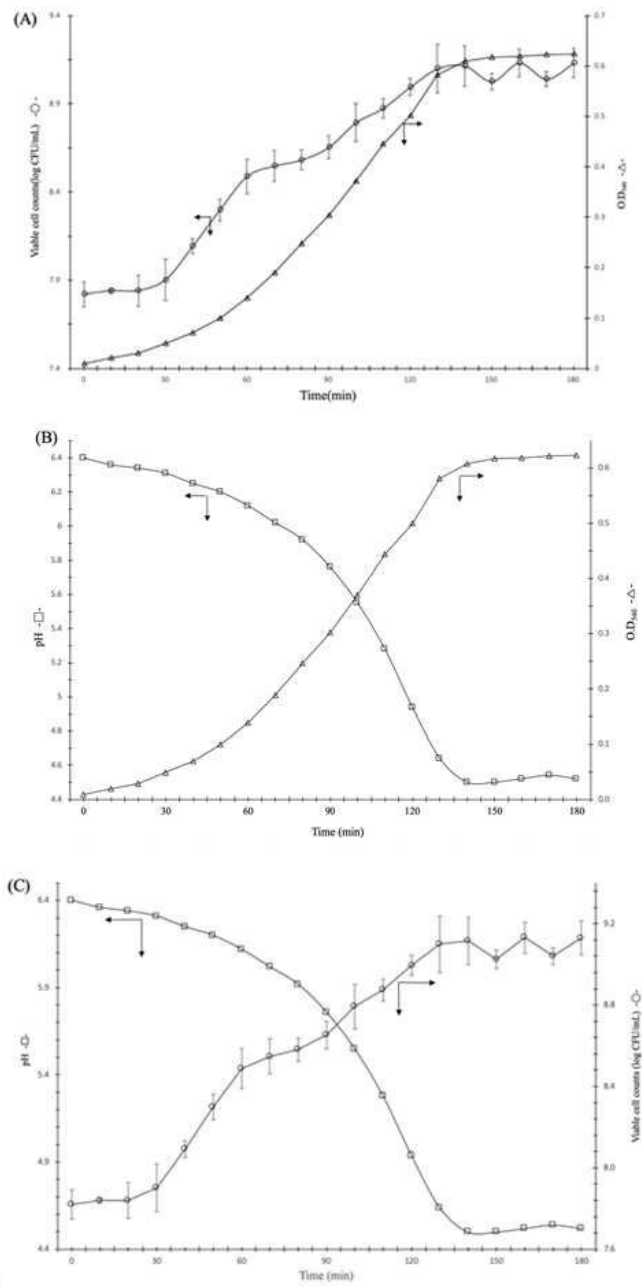
도면10



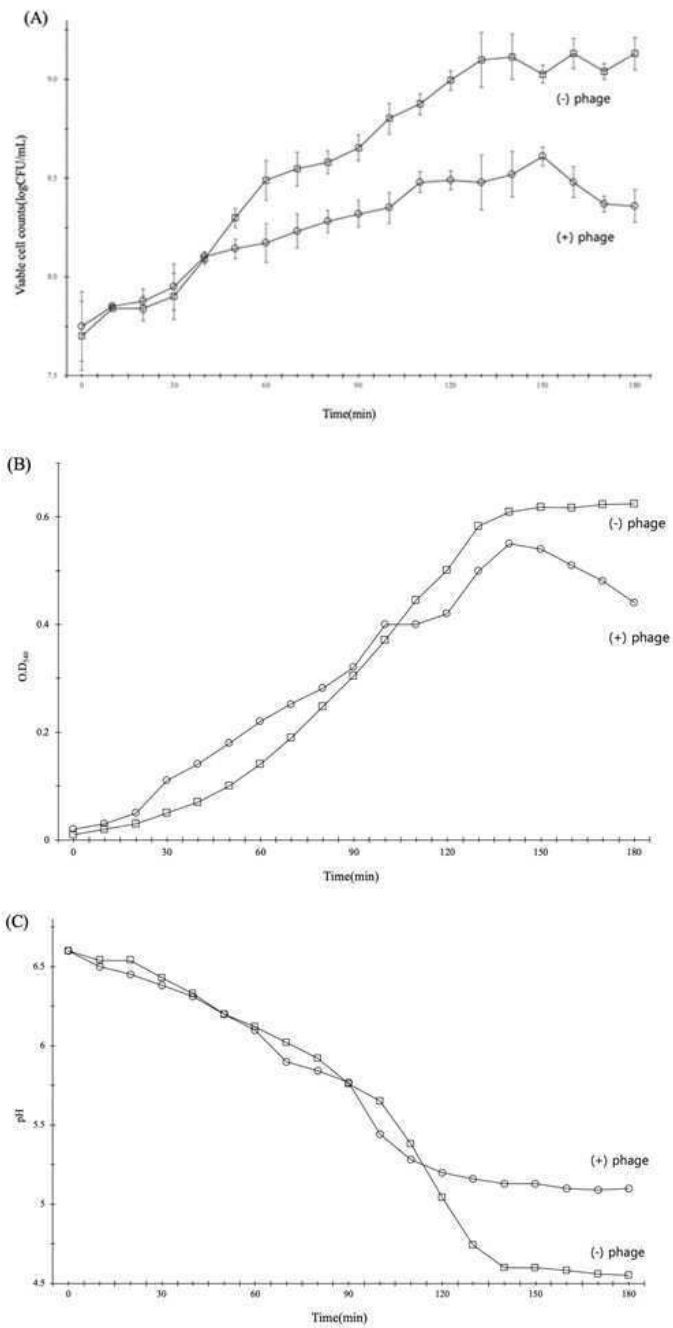
도면11



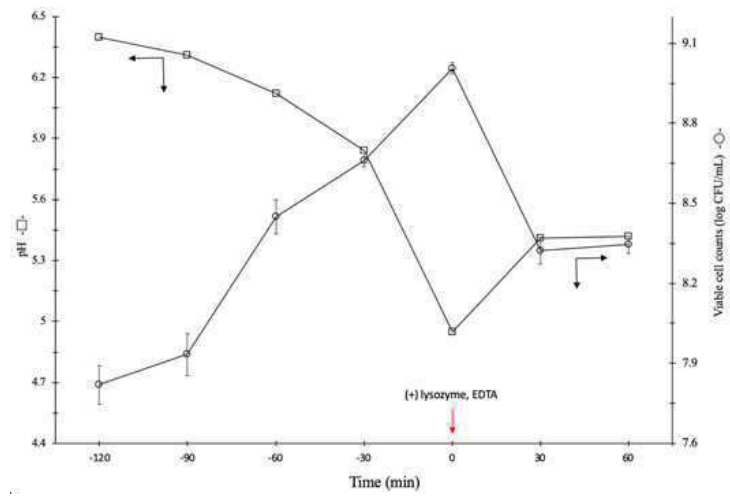
도면12



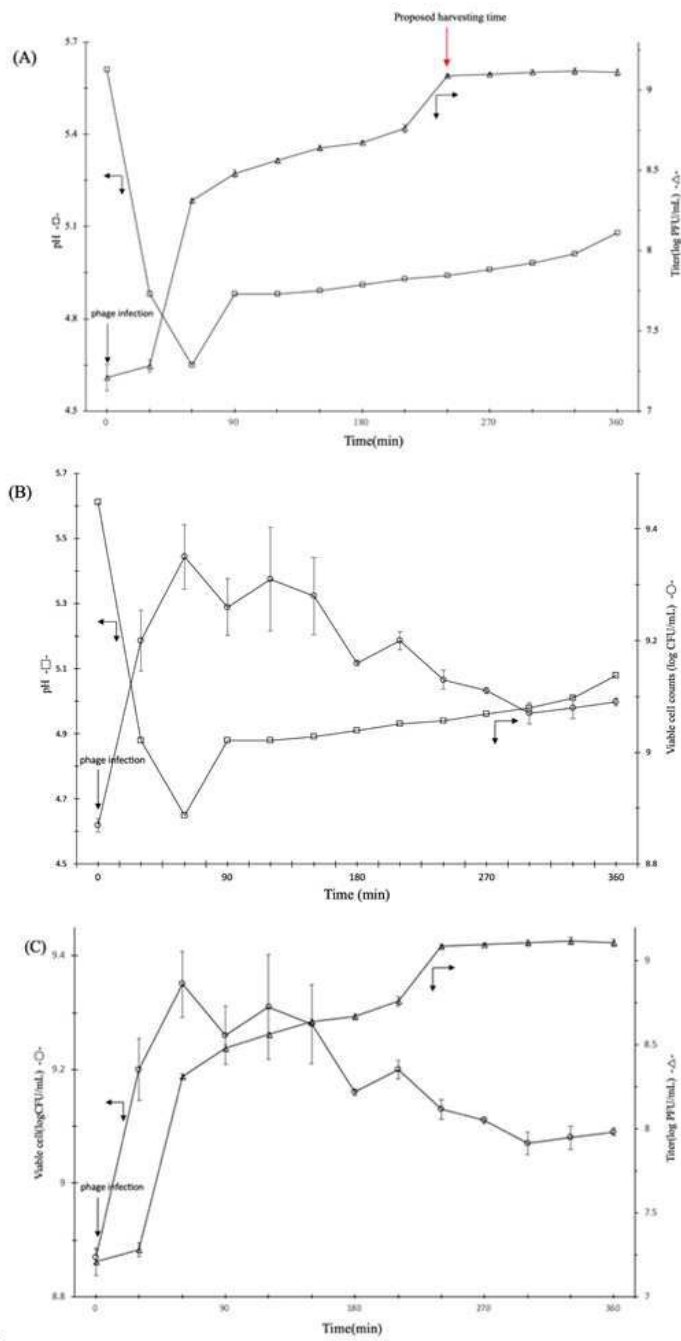
도면13



도면14

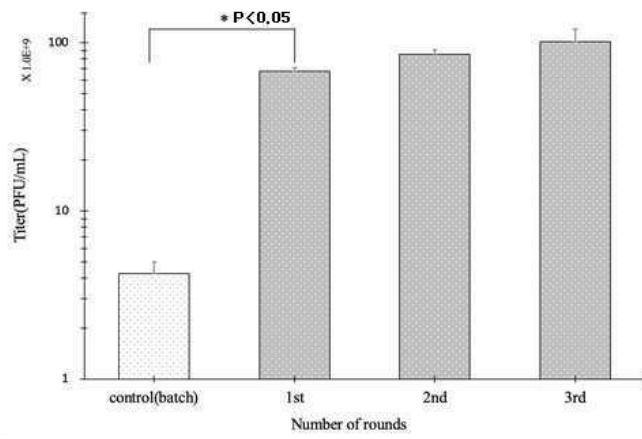


도면15





도면16



도면17

