

발간등록번호

11-1541000-000711-01

호

100117-02-1-00010

Bacteriophage와 유산균을 이용한  
*Enterobacter sakazakii* 종합 제어법  
개발과 안전한 영유아 식품용 첨가물 생산  
(Biocontrol of *Enterobacter sakazakii* by using  
bacteriophage and lactic acid bacteria and  
development of food additive for baby foods)

경원대학교

농림수산물자료실



0000689

농림수산물부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Bacteriophage와 유산균을 이용한 *Enterobacter sakazakii* 종합 제어법 개발과 안전한 영유아 식품용 첨가물 생산” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 강원대학교

주관연구책임자 : 박 중 현

세부연구책임자 : 지 근 익

연 구 원 : 박 명 수

연 구 원 : 이 영 덕

연 구 원 : 박 언 호

연 구 원 : 김 은 진

연 구 원 : 류 태 화

연 구 원 : 김 자 영

연 구 원 : 이 승 욱

연 구 원 : 박 민 수

연 구 원 : 남 윤 우

## 요 약 문

Bacteriophage와 유산균을 이용한 *Enterobacter sakazakii* 종합 제어법 개발과 안전한 영유아 식품용 첨가물 생산하고자 본 연구를 수행하였다. *E. sakazakii*(*Cronobacter* spp.)는 자연계에 존재하는 세균으로 뇌수막염, 패혈증, 괴사성 대장염을 유발하는 newly emerging pathogen으로 최근에 조제분유, 이유식에 오염되어 위해성이 높은 병원성 세균이다. 이를 제어하여 안전한 영유아 식품을 생산하기 위하여 *C. sakazakii*의 용균성 파지와 영유아 장내로부터 *C. sakazakii*에의 항균 유산균 선발하고 선발된 유산균과 용균성 파지의 복합처리에 의한 *C. sakazakii*의 최적의 제어법을 개발하여 안전성이 제고된 영유아 식품을 생산하도록 한다.

조제분유, 이유식, 선식, 생식, 농수산물, 샐러드등에 오염되어 있는 *C. sakazakii*를 분리하기 위하여 일차적인 132개의 분리균주 중 생화학 특성, Vitek, PCR등으로 최종적으로 112종의 *C. sakazakii*를 동정하고 확보하였다. 분리된 *C. sakazakii*들은 ampicillin, tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 대체적으로 감수성이 큰 것으로 나타났으나, streptomycin의 경우에는 내성이 매우 높았다. 건조에 대하여는 식품에서 분리된 90% 이상의 *C. sakazakii* 균주는 건조에 강한 저항성을 나타내는 것으로 사료된다. 건조에 강한 균주는 biofilm의 형성능이 높은 것으로 나타났다.

박테리오파지는 돼지 분변시료로부터 7주, 김치 시료로부터 3주, 오수 시료로부터 2주를 분리하여 총 12 용균성 파지들을 분리하였고 다른 식중독 세균에 대해서는 plaque를 형성하지 않았다. Host inhibition spectrum은 112개의 *Cronobacter* spp. 분리주들에 19%~58% 숙주 생육 저해 특성을 나타냈다. 분리된 용균성 파지 대부분은 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 확인되었으나, ESSI-3 phage등 일부는 *Siphoviridae* family에 속함을 알 수 있었다. 티-파지 등 주요한 6개의 파지에 대한 *C. sakazakii*에 대한 생육 저해 특성을 MOI에 따라 확인한 결과는 0.1일 경우 6시간 이후에는 *C. sakazakii*가 검출되지 않았다. 이들 용균성 파지 6주를 섞어서 조제분유에 오염된 *C. sakazakii*에 처리한 경우 대체적으로 초기 균수들을 유지하거나 감소 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 23종의 biofilm 다분비 *Cronobacter* spp.의 저해 효과를 분리 파지 cocktail을 사용하여 이 균들을 12시간 후에 현저히 사멸시키는 효과도 확인하였다. *Cronobacter* spp. 길항성 실험결과 총 18 분리 유산균중 *Bifidobacterium animalis* BF-8가 가장 저해력이 큰 균으로 screening되었으며 분리된 4개의 용균성 파지들을 배양배지에 혼합하여 확인했을 경우 모두 *C. sakazakii*가 검출되지 않았다. 또한 우유에 *C. sakazakii*를 접종하여 *Bifidobacterium* BF-8과 용균성 파지 혼합액에 의한 생육 저해 정도를 확인했을 때도 이

와 유사한 결과를 확인하였다. 한편 열충격에 의해 *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperate phage가 유도되어 나오는 것을 관찰하였으며, 이러한 현상은 열처리로 *Cronobacter* spp.를 제어할 수 있는 흥미로운 정보가 되겠다.

분리된 용균성 파지 cocktail을 이용해 Phage amplification assay를 통한 *Cronobacter* spp.의 검출을 수행하였다. 실험 결과 적은 수의 *C. sakazakii*가 오염되어 있을 경우 용균성 파지 cocktail을 이용해 *Cronobacter* spp.를 검출하기 위해서는 3시간 이상의 배양 시간이 필요할 것으로 사료되었다. 조제분유, 채소쥬스, 양상추에 배양된 *C. sakazakii* ATCC29544를 접종한 후 파지cocktail을 처리한 후 파지가 검출되었다. 분리된 용균성 파지 cocktail을 이용하여 phage amplification assay를 수행하여 *Cronobacter* spp.의 검출할 때는 초기 균수의 영향과 식품 자체가 가지고 있는 성분, pH, inhibitor의 존재 유무 등 물성에 대한 특성을 고려하여 검출을 해야 할 것으로 판단된다. 분리된 야생형 균주 *Cronobacter* spp.를 통해 용균성 파지 cocktail을 적용한 결과 약 2 log CFU/mL 수준까지 검출이 가능하였으며, 전체적으로 실험이 수행되는 데 걸리는 시간은 약 20 시간 미만으로 예상되며 용균성 파지의 가장 큰 장점이자 단점인 높은 숙주 특이성 때문에 매우 효과적인 검출 방법이 될 것으로 사료된다.

*Cronobacter* spp.에 길항성을 보이는 유산균 16 bifidobacteria를 분리하여 동정하였고 그 중에서 *B. animalis* BF8이 가장 우수한 균으로 분리되었다. *B. animalis* BF8는 bacteriocin-like substance를 분비하고 있었으며 이 물질이 첨가된 조제분유에서의 *C.sakazakii*의 생육저해 현상을 확인하였다. 이 분리균주의 산업적 활용을 위하여 cytotoxicity를 본 결과 Hep-2 cell의 MTT 분석의 결과 특별히 독성현상은 관찰되지 않았다. *B.animalis* BF8의 산업적 생산을 위한 pilot 생산의 경우 배양 초기의 유도기를 거쳐 약 3시간 후부터는 대수기에 접어들어 13시간 만에 정제기에 도달하였다. 또한 이를 회수하여 동결 건조하여 생균수  $1.5 \times 10^{11}$  CFU/g 수준의 시제품을 생산할 수 있었으며 이는 상업적 생산 균주와 같은 yield를 보이고 있어 제품화에 문제가 없는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 발효생산물을 분말화하여 시제품을 생산할 수가 있었다.

그러므로 본 연구를 통하여 *C. sakazakii* collection을 완성하였고 *C.sakazakii*에 특이적으로 작용하는 bacteriophage를 12주 분리하였으며 이를 이용한 *C.sakazakii*의 sanitizer로의 개발, *C.sakazakii*의 신속검출법으로의 활용이 가능하겠다. 그리고 *C.sakazakii*에 길항적으로 작용하는 *B.animalis* BF8를 분리하였고 bacteriocin-like substance를 확인하였으며 이를 조제분유등의 첨가물로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

## SUMMARY

We researched for development of complex control of *Enterobacter sakazakii* and produce of safety food additives for baby foods such as infant formula. *E. sakazakii*(*Cronobacter* spp.) is a widespread bacteria newly emerging high hazard pathogen, which causes encephalomeningitis, hematosepsis and necrotic colitis in infant formula and baby food. As a study of method to control and produce of safe infant formula, we selected *C. sakazakii* virulent bacteriophage and lactic acid bacteria and developed the optimum condition of controlling *C. sakazakii* and produce safety infant formula using complex handling of lactic acid bacteria and bacteriophage.

To identify *C. sakazakii* from infant formula, baby food, grain powder, raw food, crops and salad, we primary isolated 132 strains from it and final identification of 112 *C. sakazakii* by checking the biochemical characteristics, Vitek, PCR etc.. General *Cronobacter* spp. isolates showed high sensitivity at ampicillin, tetracycline, chloramphenicol but it has high resistance at streptomycin. 90% of *C. sakazakii* isolates had strong resistance at drying and does were also having high biofilm formation ability. We isolated 12 virulent phages which doesn't formate plaques in other food-borne pathogens, 7 from swine feces sample, 3 from Kimchi, 2 from sewages. Host inhibition spectrum was 19%~58% of 112 *Cronobacter* spp. isolates and appeared growth impeding characteristic. Most isolated virulent phages belongs to *Myoviridae* family, but some of these belongs to *Siphoviridae* family such as ESSI-3 phage. We checked the MOI by effections of EI-I and other major phages about *C. sakazakii* growth impeding characteristic, when MOI is 0.1, *C. sakazakii* was not detected after 6hours. We treated 6 mixed major virulent phages in *C. sakazakii* contaminated infant formula, initial total bacterial count has remained or decreased in principle. When use of phage cocktail at 23 high secretion biofilm *C. sakazakii*, we checked the markedly decrease after 12hour treatment. *Bifidobacterium animalis* BF-8 and lactic acid bacteria had the most powerful antimicrobial effects to *Cronobacter* spp., in 18 lactic acid bacteria isolates and when mixed with 4 virulent phages, *C. sakazakii* was not detected. Also we checked similar results at application of infant formula. Meanwhile we confirmed the inducement of temperate phage from *C. sakazakii* KYU90 by heatshock, such being the case we could get interesting information controlling *Cronobacter* spp. using heat treatment.

We performed detection of *Cronobacter* spp. by Phage amplification assay using isolated virulent bacteriophage cocktail. We need more than 3 hours of incubating time if it has low dose of *C. sakazakii* in contaminated food. Bacteriophage was shown after treating phage cocktail in infant formula, vegetable juice, cabbage contaminated by *C. sakazakii* ATCC29544. When detecting *Cronobacter* spp. using phage amplification assay, we should remind effects of initial bacteria count and food ingredients, pH, inhibitors, food properties. For detection of wild type *Cronobacter* spp. isolates using phage amplification assay, about 2 log CFU/mL level of *C. sakazakii* was able to detect and detection time was not more than 20 hours, because of merits and demerits of high host specificities, we think it could be a very effective detection assay.

We identified 16 bifidobacteria which has antimicrobial effects at *Cronobacter* spp. and *Bifidobacterium animalis* BF-8 lactic acid bacteria was the most outstanding strain of the others. *B. animalis* BF8 secretes bacteriocin-like substance and we confirmed the growth impeding characteristic of *C. sakazakii* when added in infant formula. For the use of it in commercial, we checked cytotoxicity by analysing MTT of Hep-2 cell, there was no toxicity phenomenon. For the produce of commercial *B. animalis* BF8 pilot, it took 3 hours of lag phase, 10 hours of log phase and finally epoch to the stationary phase after 13 hours. Also we produce prototype of lyophilization solution which cover  $1.5 \times 10^{11}$  CFU/g and this is up proportionately to other commercial lactic acid bacteria, so it has no probs to make it into products. Therefore these micro ferment products could be conflicated and produce it to manufactured goods.

We have completed *Cronobacter* spp. collection by this research, and isolated 12 host specific bacteriophages, development uses of it as a sanitizer agent, and use of rapid detection method of *C. sakazakii*. Also we isolated *B. animalis* BF8 effects antimicrobial to *C. sakazakii* and confirmed bacteriocin-like substance, so we could use as an additive in modified milk powder.

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	9
1. 연구 개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성 .....	9
가. Bacteriophage를 이용한 <i>E. sakazakii</i> 의 효율적인 제어법 개발 .....	9
나. 유산균과 bacteriophage 복합처리를 통한 <i>C. sakazakii</i> 제어 기술 개발 .....	12
제 2 절 연구개발 목표 및 범위 .....	15
1. 연구개발의 최종목표 및 주요 범위 .....	15
2. 과제별(세부) 연구개발의 목표 및 내용 .....	16
3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용 .....	17
4. 연구 추진 일정 .....	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	20
제 1 절 국외 관련 연구 현황 .....	20
제 2 절 국내 관련 연구 현황 .....	21
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	22
제 1 절 <i>Enterobacter sakazakii</i> ( <i>Cronobacter</i> spp.) 분리 및 동정 .....	22
1. 재료 및 방법 .....	22
가. 사용 균주 .....	22
나. MPN 법에 따른 정량적 검출 방법 .....	22
다. VITEK을 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 동정 .....	24
라. Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 동정 .....	24
마. 16s rRNA sequence를 통한 homology .....	25
바. 건조 특성에 따른 <i>C. sakazakii</i> 의 생리 특성 .....	26
사. 건조 분말 식품 내에서의 생육 특성 .....	26
아. 건조 특성에 따른 biofilm 형성 특성 .....	26
자. 분리된 <i>Cronobacter</i> spp.의 열감수성 특성 .....	27
차. Sanitizer를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 제어농도 측정 .....	27
카. 분리된 <i>Cronobacter</i> spp.의 세포 독성 시험 .....	30
2. 결과 및 고찰 .....	31
가. 다양한 식품 중에 일반 세균 오염도 .....	31
나. VITEK과 PCR에 의한 <i>C. sakazakii</i> 의 분리, 동정 .....	33
다. 분리된 <i>Cronobacter</i> spp.의 항생제 감수성 특성 .....	42
라. 건조에 따른 <i>C. sakazakii</i> 의 특성 .....	44
마. 건조 분말 식품 내에서 <i>C. sakazakii</i> 의 생육 특성 .....	46
바. <i>C. sakazakii</i> 의 biofilm 특성 분석 .....	48
사. 분리된 <i>Cronobacter</i> spp.의 열감수성 특성 .....	53
아. Sanitizer를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 제어농도 측정 .....	55

자. 분리된 <i>Cronobacter</i> spp.의 세포 독성 시험	58
제 2절 <i>E. sakazakii</i> ( <i>Conobacter</i> spp.) 용균성 파지의 분리	60
1. 재료 및 방법	60
가. 분리원 및 용균성 파지의 분리	60
나. 숙주저해범위 분석	60
다. 분리 파지의 형태학적 특성	61
라. 파지 DNA 추출	61
마. 분리된 용균성 파지에 대한 genome sequence 분석	61
2. 결과 및 고찰	63
가. <i>C. sakazakii</i> 의 용균성 파지의 분리 및 숙주 저해 특성	63
나. 분리 파지의 형태학적 특성	70
다. 파지 DNA 추출	73
라. 분리된 용균성 파지에 대한 genome sequence 분석	75
제 3 절. <i>E. sakazakii</i> ( <i>Cronobacter</i> spp.) 용균성 파지를 이용한 식품 적용	81
1. 재료 및 방법	81
가. 분리된 파지를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 생육 억제	81
나. Bacteriophage를 이용한 식품 중 <i>C. sakazakii</i> 의 저감화	81
다. 분리된 용균성 파지를 이용한 biofilm의 제어	81
라. <i>Bifidobacterium</i> , 유산균과 용균성 파지를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 제어	82
마. <i>C. sakazakii</i> KYU90으로부터 temperae phage의 분리 및 특성 분석	82
2. 결과 및 고찰	85
가. 분리된 파지를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 생육 억제	85
나. Bacteriophage를 이용한 식품 중 <i>C. sakazakii</i> 의 저감화	89
다. Bacteriophage를 이용한 biofilm의 제거 효과	94
라. <i>Bifidobacterium</i> spp., 유산균, 용균성 파지를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 의 제어	101
마. <i>C. sakazakii</i> KYU90으로부터 temperate phage의 분리 및 특성 분석	107
제 4 절. <i>Cronobacter</i> spp.의 검출을 위한 용균성 파지의 이용	117
1. 재료 및 방법	117
가. 분리된 용균성 파지들의 ferrous ammonium sulfate에 의한 제거	117
나. Phage amplification assay에 의한 <i>C. sakazakii</i> 의 검출	117
다. 식품에 오염된 <i>Cronobacter</i> spp.의 검출	118
라. <i>Cronobacter</i> spp. 분리주를 대상으로한 식품 적용	118
2. 결과 및 고찰	119
가. 분리된 용균성 파지들의 ferrous ammonium sulfate에 의한 제거	119
나. Phage amplification assay에 의한 <i>C. sakazakii</i> 의 검출	122
다. 식품에 오염된 <i>Cronobacter</i> spp.의 검출	125
라. <i>Cronobacter</i> spp. 분리주를 대상으로한 식품 적용	127
제 5 절 <i>C. sakazakii</i> 길항성 유산균 및 <i>Bifidobacterium</i> 분리	129
1. 재료 및 방법	129
가. 발효식품으로부터 유산균의 분리	129
나. 발효 식품으로부터 <i>Bifidobacterium</i> 의 분리	129
다. 분리된 유산균 및 <i>Bifidobacterium</i> 에 의한 <i>C. sakazakii</i> 의 길항 작용	130
라. 선발균주의 생육특성 분석	130



마. <i>Bifidobacterium</i> BF-8의 bacteriocin의 정제 .....	134
바. <i>Bifidobacterium</i> BF-8의 cell cytotoxicity .....	134
사. Pilot 생산 .....	135
2. 결과 및 고찰 .....	136
가. 발효식품으로부터 유산균의 분리 .....	136
나. 발효 식품으로부터 <i>Bifidobacterium</i> 의 분리 .....	139
다. 유산균과 <i>Bifidobacterium</i> 의 <i>C. sakazkaii</i> 에 대한 저해 효과 .....	149
라. 선발균주의 생육특성 분석 .....	159
마. <i>Bifidobacterium</i> BF-8의 bacteriocin like substance의 분리 .....	174
바. <i>Bifidobacterium</i> BF-8에 대한 cell cytotoxicity .....	176
사. Pilot 생산 배양 .....	178
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>181</b>
제 1 절    목표 달성도 .....	181
<b>제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>183</b>
제 1 절    실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....	183
제 2 절    교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....	183
제 3 절    특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 .....	183
제 4 절    추가연구, 타연구에 활용 계획 등 .....	184
<b>제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>185</b>
제 1절    본 연구관련 국내외 기술수준 비교 .....	185
제 2절    논문, 특허 및 시장 분석 .....	186
1. 논문 .....	186
2. 특허 .....	187
3. 시장 현황 .....	187
가. 국내 제품생산 및 시장 현황 :없음. ....	187
나. 국외 제품생산 및 시장 현황 .....	187
<b>제 7 장    참고문헌 .....</b>	<b>189</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구 개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

#### 가. Bacteriophage를 이용한 *E. sakazakii*의 효율적인 제어법 개발

(1) *Enterobacter* spp.가 병원에서 많이 검출되어 그 중요성이 조명받게 되었고, Sander등에 의해 새로운 병원성균으로 보고되었다. 이 세균은 원래 항균물질에 대한 저항성이 크고 새로운 이들 물질에 쉽게 저항성을 획득하는 것으로 알려져 있다. 이 속의 세균 중에서 *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *E. sakazakii*가 주로 병원성을 유발하는데, 그 중에서도 특히 *E. sakazakii*는 신생아에게 치명적인 질병을 유발시키는 균이며, 1980년에 새로 분류되었다. 최근에는 *E. sakazakii*를 새롭게 *Cronobacter* spp.로 분류하고 *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. dublinesis*로 나뉘어지고 있다. 이 세균은 치즈, 육류, 야채, 곡물, 허브, 향신료를 포함한 식품에 널리 분포되어 있으나, 영·유아식품에 관련한 이 세균 제어연구는 현재 국내에서는 거의 이루어진 바 없고 전 세계적으로도 매우 적은 실정이다.

(2) 우리나라의 모유 수유율은 직장여성의 증가와 여성들의 몸매 관리 열풍으로 매년 큰 폭으로 감소하여 2002년 6.5%로, 유럽 75%, 미국 52%, 일본 45% 등 선진국 모유 수유율의 절반에도 미치지 못한다. 90%가 넘는 영아(Infant)들이 오로지 영아식품 (Infant formula)에 의존해 영양분을 섭취하게 되므로 영아식품에 대한 주의 깊은 품질관리 및 안전성 관리가 요구되고 있다. 최근 국내에 시판 중인 조제분유를 대상으로 *Cronobacter sakazakii*의 스크리닝 및 특성을 분석한 실험 결과에 따르면 조제분유 내에 *Cronobacter sakazakii*가 존재하는 것으로 밝혀져 문제가 되고 있다.

(3) 이 세균은 자연계에 분포하여 농축산식품소재에도 오염되는데 *C. sakazakii*의 뇌수막염은 뇌수종, 전신마비, 신경계 미발달 등 심한 신경학적 후유증 보이고 있으며 사망률이 40~80%라고 알려져 있다. 괴사성 소장결장염을 가진 신생아들에 대한 연구에 따르면, 환자의 29%에서 공통적으로 *C. sakazakii*가 발견되었다. 괴사성 소장 결장염은 모유를 먹는 유아보다 조제분유를

먹는 유아들에게서 약 10배정도 높게 나타났다. *C. sakazakii* 감염은 성인에서도 확인되는데, 발염증 환자와 요로성 패혈증환자 등에서 발견되었다.

(4) 1차 생산 농축산식품소재에 오염된 *C. sakazakii*는, 특히 비열처리되는 식품의 경우나 식품 제조 과정 중 교차오염된 식품의 경우에, 면역력이 떨어진 영·유아 혹은 노약자를 감염시킬 수 있다. 따라서 이러한 식품의 미생물 안전성에 대한 세심한 노력이 기울어져야 한다. 조제분유나 이유식은 비살균공정을 거치는 대표적인 식품으로 이 세균에 의해 오염되기 쉬우며 실제로 한국의 영·유아식품에의 오염도가 약20%에 접근하는 것으로 나타났다.

(5) 자연계에 많이 존재하는 Bacteriophage는 20세기 초반에 발견된 virus로써 특정 세균을 용균시켜 사멸 시키는 특징을 갖고 있어 관련 연구가 활발히 진행되었다. 하지만 항생제의 발견으로 인해 연구가 지지부진해 오다가 항생제 내성 세균의 출현 등의 문제로 인해 **항생제 대체 수단으로 다시금 활발한 연구가 진행** 중에 있다. Virus의 일종인 bacteriophage는 일반적으로 용균성 생활환(virulent phage)과 용원성 생활환(temperate phage)을 거치면서 증식하게 된다. 각각의 bacteriophage는 그 특성에 따라 최근 다양한 연구 분야에 응용되어 사용되고 있다. 대표적으로 병원성 미생물의 치료제로 이용되는 **phage therapy**, 특정 protein 또는 antibody를 만들어내는 **phage display**, 병원성 미생물의 **typing과 검출, vaccine 관련 연구, bacteriophage 유전자를 이용한 유용 효소의 생산** 등이다. 하지만, bacteriophage의 host immune system과의 관계, lysis된 병원성 미생물의 endotoxin, gene transfer 등에 대한 문제가 남아 있으므로 안전성에 관련된 추가적인 연구 또한 진행 중에 있다. 국외의 경우 이렇듯 다양한 분야에 적용을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

(6) 최근 국외에서는 bacteriophage의 특정 균주를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 특징을 이용하여 여러 병원성 미생물들의 예방과 치료에 적극적으로 이용하고 있다. 특히 미국의 경우 양계장에서 *Salmonella* 또는 *E. coli* O157:H7의 bacteriophage를 분무시켜 가금류들이 섭취하게 하여 이것들을 제거하는 효과가 나타났으며, 도계장에서도 rinsing 등의 처리로 저감화를 확인하였다[32~34]. 그리고 사람의 화상 부위에 감염된 *Pseudomonas aeruginosa*를 치료하기 위해 환부에 직접 bacteriophage를 처리 하여 상처가 낫게 하는 보고도 있으며, mouse를 이용한 in vivo test에서도 경구 또는 복강 투여를 통한 다양한 병원성 미생물의 제거를 통한 치료 효과를 나타냈다. 또한 미국 FDA에서는 *L. monocytogenes*와 *E. coli* O157:H7의 **bacteriophage를 식품 첨가물로 승인하였다**. 이러한 연구 결과들을 볼 때 국내에서도 bacteriophage를 이용해 *E. sakazakii*의 제어에 대한 연구를 수행할 필요가 있다.

(7) *C. sakazakii*는 자연계에 널리 오염되어 있어 다양한 유기농 원료를 이용하는 영유아용 식품에 오염되어 있을 가능성이 높으며, 현재 영유아용 조제분유 등의 식품 제조 공정 중에 정확한 오염원을 확인하지 못하고 있다. 따라서 농축산물 등의 원료에 bacteriophage의 처리 또는 제조 공정 중에 식품 가공 기계 등에 *C. sakazakii*의 bacteriophage를 분무 또는 도포 등을 통해 이들을 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

(8) *C. sakazakii* 분리방법으로 FDA, Muytjens, Nazarowec- White등의 방법 그리고 Iversen등의 방법이 알려져 있다. 이들 방법은 기본적으로 장내세균을 선택배지에서 증균한 후에 생화학적인 방법으로 동정하는 재래적인 방법이다. 이 방법은 *C. sakazakii*로 의심되는 yellow pigment 생산 집락을 선택하여 API20E kit와 ID32E kit(bioMerioe, France)를 이용하여 *C. sakazakii*로 동정하는데 이때  $\alpha$ -glucosidase의 존재유무와 D-sorbitol의 자화능이 주요 동정인자중의 하나이다. 그러나 이러한 동정방법은 시간이 적어도 7~10일간의 시간이 필요하며, 아울러 API20E와 ID32E의 동정결과가 서로 일치하지 않는 것이 커다란 문제이다. 또한 이 방법으로도 분리가 되지 않는 *C. sakazakii*가 본 연구진에 의해 확인하였다.

(9) Bacteriophage를 이용한 병원성 미생물의 검출은 짧은 시간(~4hr)과 특이적 검출이 가능하기 때문에 해외에서 많은 연구가 진행 중에 있다. 현재 bacteriophage를 이용하여 폐, 혈액, 기타 조직 sample에서 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 검출하는 kit가 상용화되어 시판 중에 있다. 그리고, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* 등의 병원성 미생물 검출과 항생제 내성균 확인에도 이용되고 있다[30, 40~41]. 따라서 본 연구를 수행하였을 때 *C. sakazakii*의 bacteriophage를 이용하여 다양한 환경 sample로부터 보다 저비용으로 신속하고 정확하게 정량 검출에 응용할 수 있게 될 것이며, 더 나가서는 진단 kit의 개발을 통한 경제적 효과도 창출할 수 있을 것이다.

(10) 2002년 국제미생물규격위원회(ICMSF)는 이 세균이 한정된 사람들에게 매우 위험하며, 급성 혹은 장기간까지 생명을 위협한다고 보고하였고 많은 전문가들의 의견을 수렴하기 위하여 FAO/WHO는 영·유아용 분말식품에 대한 위해에 대한 조사를 수행하도록 권고하고 있다[13]. *C. sakazakii*가 식품안전측면에서 사회의 큰 관심대상으로 부각된 것은 2004년 CODEX 식품안전 분과위원회에서의 영·유아식품의 병원성세균에 대한 자료수집으로 부터 시작된 것으로 보인다. 이러한 노력들은, 주로 모유대신 영·유아에게 공급되는 조제분유등이 보다 더 위생적으로 제조되도록 하는데 주안점을 두고 있다. 그러나 FAO/WHO도 이 세균에 대한 심각성은 인정하지만

아직까지 현실적인 대안이 없기 때문에 영·유아 식품에서의 *C. sakazakii*의 권장 기준규격을 만들지 못하고 있는 실정이다. 그러나 Nestle 등의 산업체와 미국의 NFPA생산자 단체 등에서 집중적으로 *C. sakazakii*의 제거 연구를 하고 있으므로 우리도 영·유아에게 완전한 식품을 공급하고 우리 농식품 산업을 지키기 위하여 이 세균에 대한 연구가 시급히 이루어져야 하겠다.

(11) 본 연구를 통해 분리된 다양한 *C. sakazakii* bacteriophage는 국외의 연구에 발맞추어 갈수 있는 기초적인 학술 자료로도 이용이 가능할 것이며, 또한 이것들은 sanitizing agent 이외에 *C. sakazakii*의 검출, phage therapy 등 여러 분야에 응용이 가능할 것이다.

## 나. 유산균과 bacteriophage 복합처리를 통한 *C. sakazakii* 제어 기술 개발

(1) *C. sakazakii*에 감염되면 치사율이 아주 높아 급사가 이루어지지만 감염이 오랫동안 유지되는 경우는 이 세균을 치료할 수 있는 항생제가 제한되어 있다. 전통적으로 이 세균을 치료하기 위하여 ampicillin, gentamycin, chloramphenicol의 복합적인 치료로 수행하고 있으나 많은 *C. sakazakii*가 이 같은 항생제에 내성이 있음이 확인 되고 있다[22]. 따라서 감염된 이들 세균을 치료하기 위한 새로운 항생제와 치료법이 요구되고 있다. 아울러 *C. sakazakii* 세균의 생육을 저해시키는 유산균을 개발하여 *C. sakazakii*의 생육을 저해시킬 수가 있을 것이며, 아주 적은 숫자가 감염되더라도 이들 세균의 증식을 저해하므로 infective dose에 이루지 못하게 할 수 있다.

(2) 박테리오신은 미생물이 생산하는 항균성 단백질(antimicrobial polypeptide)로서 단백질이므로 인체내의 단백가수분해효소에 의해 분해되어 인체내에 축적되지 않으며 또한 인체에 매우 안전하고, 항균범주가 다양하여 응용목적에 따른 조합적용(combinatorial application)이 가능하다. 또한 단백질이므로 그 유전자의 조작에 의해 산업적 수요에 합당한 분자특성 및 생산특성으로의 전환이 매우 용이 할 뿐만 아니라 그 생산균이 주로 젖산균 등 기존 식품의 주요 발효균으로서 균자체도 인체에 안전한 GRAS(Generally Regarded As Safe)균으로 분류되어 인간 환경에의 적용이 용이하다. 그러나 이러한 박테리오신이 *C. sakazakii*를 제어할 수 있다는 것에 대한 가능성에 대해서는 그 가능성만 논의되었을 뿐 현재까지 구체적인 성과가 보고된 연구결과가 없다.

(3) *Bifidobacterium*의 경구투여시 병원성 미생물에 의한 감염성 질환의 강도와 기간

을 줄여 주는 연구가 많이 보고되고 있다. 인간의 장에는 1 kg의 세균이 상존하고 있는데 출생 직후에는 비피더스균이 최우세 균총을 차지하고 있지만 이유기를 지나면서 비피더스가 줄고 유해균들이 증가하게 되면서 외부감염에 대한 저항이 약해지고 질병이 발병한다. 비피더스는 로타바이러스와 기타 장질환을 일으키는 병원성 세균의 감염 장소인 장에서 주요 균총을 형성하고 있으며 다양한 생리활성을 가지는 것으로 밝혀졌다.

(4) 이러한 생리활성 유산균은 인체에 자연적으로 존재하므로 항생제나 백신보다 안전하고 효과적인 대안이 될 수 있다. 현재까지 밝혀진 항균기작은 /병원균과의 장표면에 부착에 대한 경쟁/병원균에 대한 항균물질 생산/ 기주의 면역능 증진/ 기주의 장관침투성 감소 등인 것으로 알려지고 있다. 항균활성이나 생리활성은 균주 개체의 특성인 것으로 알려져 있으므로 우수한 균주의 선발이 필수적이다.

(5) 영유아 장내에서 screening 된 신균주 및 박테리옌 신물질은 우선적으로는 영유아 식품에 첨가물로 사용가능하고, 타 식품의 원료로 사용될 수도 있을 것이다. 또한 bacteriophage와 복합 처리를 통해 *C. sakazakii*의 제어를 위한 최적에 방법을 개발하여 식품 제조 공정 등에 적용하여 보다 안전한 식품을 만들 수 있을 것이다.

(6) 본 연구팀은 다년간의 장내 유산균 연구를 통하여 300여종의 인체유래 비피더스 균주에 대한 라이브러리를 확보하였고 이미 2002-2003년도 [보건의료기술연구개발사업]을 통하여 항로타바이러스 활성이 우수한 균주를 선발하여 활성 단백질을 찾아내고 이 비피더스균을 적용한 유아용 정장제품을 성공적으로 개발하여 상용화하였다. 아울러 절대혐기성세균인 비피더스의 발현시스템에 대한 기반기술도 확보한 상태이다(미국 특허등록).

(7) 박테리옌 활성이 우수한 균주와 박테리옌 생산 및 제품화를 위해서 많은 연구가 수행된다. 본 세부과제의 최종연구개발 목표는 박테리옌 발효의 fermentor 배양적성 규명, 발효액의 틴달화 공법 도입, 박테리옌의 농축 및 분리, 분체화 공정의 조합에 의하여 신규 기능성 정장제품을 개발하고 대량생산 체제를 구축하는 것에 있으며, 이를 위해서는 광범위한 항균 영역 및 강력한 항균 활성을 보유한 항균물질을 생산하는 다양한 유산균주의 개발, 개발 균주의 발효공정 확보, 발효산물인 박테리옌의 분리농축 및 건조 분체화 공정 개발이 요구된다.

- (8) 따라서 본 연구를 통해 분리된 유산균과 박테리오파지를 이용하여 bacteriophage와의 복합 처리 조건 개발을 위해서 유산균의 배양 환경, 배지 조성, 박테리오파지의 농도, bacteriophage의 처리량, 시간 등을 최적화하여 *C. sakazakii*의 제어하며, 또한 식품 공장의 생산 라인에 적용하여 이 세균들의 오염을 최소화할 수 있을 것으로 예상된다.
- (9) 유산균은 다양한 유기산과 향균 물질 등을 생산하고, 과거부터 현재까지 식품 발효, sanitizing agent 등 다양한 분야에 응용되어 사용되고 있다. 본 연구진이 보유하고 있는 독보적인 유산균 응용 기술을 이용하여 생산된 보다 좋은 유산균들과 향균 물질들을 최근 해외에서 활발하게 연구 중인 bacteriophage와 복합 처리에 따른 확실한 synergy 효과가 입증될 경우 여러 식품 산업에 응용될 수 있을 것으로 보이며, 보다 안전한 식품 생산에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 절 연구개발 목표 및 범위

### 1. 연구개발의 최종목표 및 주요 범위

*Cronobacter sakazakii*는 자연계에 존재하는 세균으로 뇌수막염, 패혈증, 괴사성 대장염을 유발하는 newly emerging pathogen으로 최근에 많은 관심이 집중되고 있는 관심세균이다. 감염 치사율이 매우 높은 이 세균은 주로 영·유아에게 일어나며 치료가 되더라도 신경계통의 발달이 저해되는 심각한 휴유증을 보인다. 주 전염원은 조제분유, 이유식이기 때문에 이들의 관리가 필수적이나 이 식품으로부터 *C. sakazakii*를 생물학적, 화학적으로 제어할 수 있는 기술과 제품은 개발되어 있지 않다. 이를 위하여 아래와 같은 세부 목적을 달성하고자 한다.

- *C. sakazakii*의 bacteriophage를 분리 및 특성 분석
- 영유아 장내 유산균으로부터 *C. sakazakii*에의 항균 유산균과 항균물질 선발
- 선발된 유산균, 항균물질과 bacteriophage의 복합처리를 통한 *C. sakazakii*의 제어
- Sanitizing agent와 신속 편이 검출에의 bacteriophage의 이용
- *C. sakazakii*의 bacteriophage를 이용한 고감도 신속 분석법 개발
- 길항유산균의 고농도 균체 생산과 항균물질 발효
- 영유아식품용 첨가물 생산과 식품생산 환경등에 활용



## 2. 과제별(세부) 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2008	<i>C. sakazakii</i> 에 유효한 Bacteriophage와 유산균 선발	○ <i>C. sakazakii</i> 의 생리특성과 bacteriophage 분리/특성 분석(세부) ○항균물질 생산 영유아 유산균 균주의 선발 (협동)
2차년도	2009	선발 Bacteriophage와 유산균의 특성분석, 산업적 생산	○분리된 <i>C. sakazakii</i> phage를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 신속검출법 확립과 sanitizing agent로의 효능평가(세부) ○선발된 유산균과 항균물질의 대량 생산 및 식품첨가물로의 활용(협동)

### 3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부과 제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	(세부)	<i>C. sakazakii</i> 의 생리 특성과 bacteriophage 분리 및 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양법에 의한 <i>C. sakazakii</i>의 분리, 동정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>-glucosidase (+) 균과 sucrose 당자화성을 이용하고 yellow pigment 특성, 장내세균 선택배지와 API kit를 사용하여 분리, 동정.</li> </ul> </li> <li>○ 분리균주의 molecular genotyping               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C.sakazakii</i>와의 생리적인 특성분석을 위하여 RAPD-PCR, RFLP등의 기법을 이용</li> </ul> </li> <li>○ <i>C. sakazakii</i> phage 분리               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물 분변, 장내용물, 폐수, 토양 등의 다양한 환경 샘플 이용</li> </ul> </li> <li>○ 분리된 bacteriophage의 형태학적, 분자생물학적 특성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- TEM, Restriction pattern, sequencing</li> <li>- MOI, EOP, 다양한 조건에서의 생존능 확인</li> </ul> </li> <li>○ 분리된 bacteriophage의 생리적 특성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 외부 환경 조건 등에 의한 특성</li> </ul> </li> <li>○ 분리균주의 생리특성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리균주와 균Library로 건조내성, 열안정성, 항생제 내성 특성 등 파악</li> </ul> </li> <li>○ Biofilm생성특성과 환경스트레스의 관련성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료전처리, 식품공장 작업표면 오염환경에서 biofilm형성에 대한 영향평가</li> </ul> </li> </ul>
	(협동)	항생물질 생산 장내 유산균 균주의 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. sakazakii</i>에 대한 항균 활성을 가지는 장내 유산균, 비피더스균 개발</li> <li>○ 영유아 장내로부터 유산균 분리               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 영유아 장내 유래의 비피더스, 락토바실러스 유산균의 분리와 균 library 구축</li> </ul> </li> <li>○ <i>C.sakazakii</i>에 대한 길항성과 항균 spectrum 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C.sakazakii</i>에 대한 길항성을 agar diffusion법으로 일차 선발하고 장내세균 항균 spectrum분석</li> </ul> </li> <li>○ 선발균주에 대한 미생물학적 특성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항균물질 분비 선발 유산균의 균 동정, 배양학적 분비능 분석</li> </ul> </li> <li>○ 항균활성 물질(bacteriocin)에 대한 생화학적 특성 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질성 박테리옌 생산 확인 및 특성조사</li> </ul> </li> </ul>

2차년도	(세부)	<p>분리된 <i>C. sakazakii</i> phage를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 신속 검출법 확립 및 sanitizing agent로의 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분리된 여러 종류의 bacteriophage의 virucidal agent에 의한 효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ammonium compound 등의 화학처리제를 이용한 bacteriophage의 제거 효과 확인</li> </ul> </li> <li>○ <i>C. sakazakii</i>의 신속 검출을 위한 bacteriophage 이용 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 식품에서 분리된 여러 종류의 <i>C. sakazakii</i>의 bacteriophage 특이성 확인</li> </ul> </li> <li>○ 신속 검출법 이용을 위한 실제 식품에 적용 <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR, 생화학 검사 등의 기존 검출 방법들과의 비교</li> <li>- 주요한 오염 식품인 조제 분유 등에 적용하여 검출 한계 및 특이성 확인</li> </ul> </li> <li>○ 분리한 bacteriophage의 sanitizing agent로서의 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조 등의 내성이 큰 <i>C. sakazakii</i>와 biofilm형성능이 큰 <i>C. sakazakii</i>의 bacteriophage 처리를 통한 저감화</li> </ul> </li> <li>○ 유산균과 향균물질, bacteriophage의 복합처리를 통한 최적의 <i>C. sakazakii</i>의 제어법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유산균의 배양 조건, 향균 물질의 농도, bacteriophage의 처리량 등의 조건 확립</li> </ul> </li> </ul>
	(협동)	<p>선발된 유산균과 향균 물질의 대량 생산</p>	<p>향균활성 물질을 대량으로 생산할 수 있는 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발균주의 고농도 배양 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 박테리오신 생산 유산균의 발효공정 최적화</li> <li>- 박테리오신 생산 유산균 및 박테리오신의 회수 공정 개발</li> </ul> </li> <li>○ 향균물질 고생산 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 균종별 동결보호제 및 회수조건 개발</li> <li>- 박테리오신의 분리, 농축 공정 개발</li> <li>- 발효액의 건조분체화 공정 개발</li> <li>- 제품화 공정 및 제품의 formulation 개발</li> </ul> </li> <li>○ <i>in vitro</i> 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 장내 유래의 cell line을 통하여 개발된 유산균과 향균물질의 독성검사</li> </ul> </li> </ul>

#### 4. 연구 추진 일정

세부과제 및 주요내용	연도 2008년 (1차년도)	2009년 (2차년도)	년 (3차년도)	비 고
<p>○ <i>C.sakazakii</i> virulent bacteriophage 선발과 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C. sakazakii</i>의 생리특성 분석과 bacteriophage 분리</li> <li>- Bacteriophage 특성분석</li> <li>- <i>C.sakazakii</i>의 건조내성 특성 분석과 biofilm 형성 분석</li> <li>- Bacteriophage sanitizing agent 개발</li> <li>- Bacteriophage에 의한 신속 편이 검출법 개발</li> </ul> <p>○ <i>C.sakazakii</i> 길항성 유산균 분리 및 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 길항성 유산균 분리 및 특성분석</li> <li>- 향균물질 생산 균 분리</li> <li>- 고농도 균체 생산기술 개발</li> <li>- 선발 균주의 <i>In vitro</i> cell line toxicity 분석</li> <li>- 유산균첨가물 생산 식품 소재화</li> </ul>	<p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p>	<p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p> <p>→</p>		

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 관련 연구 현황

구분	연구항목	연구내용
선행연구	<i>C. sakazakii</i> 역학조사	1961년 최초로 보고된 후 현재까지 전 세계적으로 약 68편의 논문이 보고되어 있는데 대부분 이 세균은 뇌수막염, 패혈증, 괴사성장염을 유발한다는 것들임. 특히 영·유아에게는 치명적인 증상으로 나타나고 있음.
	<i>C.sakazakii</i> 분리·동정 방법	이 균의 특성을 연구하기 위한 분리·동정은 미국 FDA, Muytjens et al.(1988), Nazarowec-White (1997), Carol Iversen et al. (2003)등의 방법이 있음. 그러나 이들 방법은 주로 선택배양후 생화학적 방법에 의한 동정임. 따라서 분리·동정하는 시간이 많이 소요되고 false-negative, 혹은 false-positive 동정이 이루어지는 경우가 많음. RAPD 분석에 의한 분리동정 연구가 발표되어 있으나 종간의 differential identification은 아직 문제가 있음.
	<i>C. sakazakii</i> 병원성	매우 한정된 연구만이 있음. 캐나다의 Farber 그룹과 영국의 Forsythe그룹이 연구를 하고 있으나 현재까지는 enterotoxin이 관여하며 motility 와 capsule이 중요하다고 알려져 있음.
	<i>E. sakazakii</i> 오염현황	영국, 덴마크, 미국, 캐나다등의 조제분유와 이유식등에대한 연구가 있으나, 이들 식품에 사용되는 소재농산물에 대한 연구는 아주 적은 숫자에 지나지 않음.
	<i>C. sakazakii</i> 안전성 확보연구	균제거 연구는 현재 이루어지고 있으며 영·유아식품의 경우 환원시킬 때의 물의 온도에 따른 연구가 거의 유일함. 현재 세계 각국에서 이 세균을 영·유아식품에서 저감화시키고자 하는 연구를 집중적으로 하고 있음.
	Bcateriophage 분리 및 특성	현재 서구 선진국을 중심으로 많은 종류의 bacteriophage 분리와 특성에 대한 연구가 진행 되어왔고, 진행 중에 있음. 또한 bacteriophage만을 전문적으로 연구하는 기관이 따로 있음. 그리고 여러 유전자의 기능과 특성에 대한 연구도 활발하게 진행 중임.
	Bcateriophage의 위생처리제로 의 이용	양계 또는 도계장에서 닭에 섭취시키거나, 표면 수세, 침지 등으로 병원성 미생물을 저감화시키는 효과를 확인하였음. 그리고 식품 생산 라인에 적용하고자 함. 또한 미국 FDA에서는 <i>L. monocytogene</i> , <i>E. coli</i> O157:H7의 bacteriophage를 식품 첨가물로 승인하였음.

## 제 2절 국내 관련 연구 현황

구분	연구항목	연구내용
국내 연구실적	<i>C. sakazakii</i> 역학조사	<i>C.sakazakii</i> 에 의한 국내에서의 감염 확인은 아직까지 보고된 바가 없음.
	<i>C. sakazakii</i> 분리·동정 방법	광안리 오수처리장에서 분리된 Extended-spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) klebsiella와 enterobacter의 유형, 색소환원법에 의한 시유의 2차오염 검출을 위한 그람음성세균 선택성 배지, 식수에서 분리한 대장균군의 생화학적 성상에 의한 균종별 분포등이 보고되어 있으나 <i>E.sakazakii</i> 만을 대상으로 하는 분리·동정연구는 거의 없음.
	<i>C sakazakii</i> 병원성	한국 이유식에서 분리한 <i>C. sakazakii</i> 가 compliment-mediated cytotoxicity에 생존하고 CaCO <sub>2</sub> cell에 부착하였고, 이때 motility가 중요한 virulence factor임을 확인함.
	<i>C. sakazakii</i> 오염현황	국내의 농수식품소재와 영·유아식품의 268개의 시료로부터 20균주의 <i>E.sakazakii</i> 를 분리하였음.
	<i>C. sakazakii</i> 안전성 확보연구	<i>C sakazakii</i> 를 불활성화 시키고자 하는 연구로 표준균주의 열안정성 분석과 분리균주의 D-value 비교분석과 환원유아식의 안전성 분석등이 있음.
	Bcateriophage 분리 및 특성	과거에는 Lactic acid bacteria의 bacteriophage, temperate bacteriophage와 관련된 연구였으며, virulent bacteriophage의 분리 및 특성 분석에 대한 연구가 진행 중.
	Bcateriophage의 위생처리제로의 이용	국내의 bacteriophage를 이용한 식품 등의 위생처리제에 대한 연구는 없음.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 *Enterobacter sakazakii*(*Cronobacter* spp.) 분리 및 동정

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 사용 균주

전국 유통 중인 조제분유, 이유식, 생식, 선식, 샐러드 등 비가열 섭취 식품 시료를 온, 오프라인 상에서 구입하여 일반 세균수와 *Cronobacter* spp.의 오염을 분석하였다. 사용된 조제분유 102종과 이유식 9종 생식 86종, 선식 86종 샐러드 15종, cereal 50종, 과일 41종, 해조류 24종 이다. 생화학적, 생리학적 특성을 비교하기 위해 공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329 와 *C. sakazakii* ATCC 29544를 사용하였다.

##### 나. MPN 법에 따른 정량적 검출 방법

US FDA에서 권고한 조제분유에서의 *C. sakazakii* MPN 정량 검출법에 준하여 실험하였으며 각 3개씩의 1, 10, 100g의 검체에 9, 90, 900mL의 BPW (buffered pepton water, Difco Lab , MI, USA)를 가하여 균질화 하고 37℃ 24시간 배양한 후 각 10 mL의 검액에 90 mL의 EE(*Enterobacter sakazakii* enrichment broth mossel, Difco Lab , MI, USA) broth를 가하여 37℃ 24시간 배양한 후 5장의 violet red bile glucose agar(VRBGA, Oxoid Ltd., Hampshire, England)에 도말하여 자주색 환을 띄는 집락을 선별하여 tryptic soy agar(TSA)에서 25℃ 48 시간 배양했을 때 황색의 집락을 띄며 chromogenic *Enterobacter sakazakii* agar (DFI, Oxoid Ltd., Hampshire, England)에서 37℃ 24시간 배양했을 때 청록색의 환을 띄는 집락을 계수하여 Index2 의 MPN 법으로 *C. sakazakii*를 정량하였고 API 20E kit(bioMerieux SA, Etoile, France), ID32 kit (bioMerieux SA, Etoile, France) 를 수행하였다. *C. sakazakii* ATCC 29544를 positive control organism으로 사용하였다.

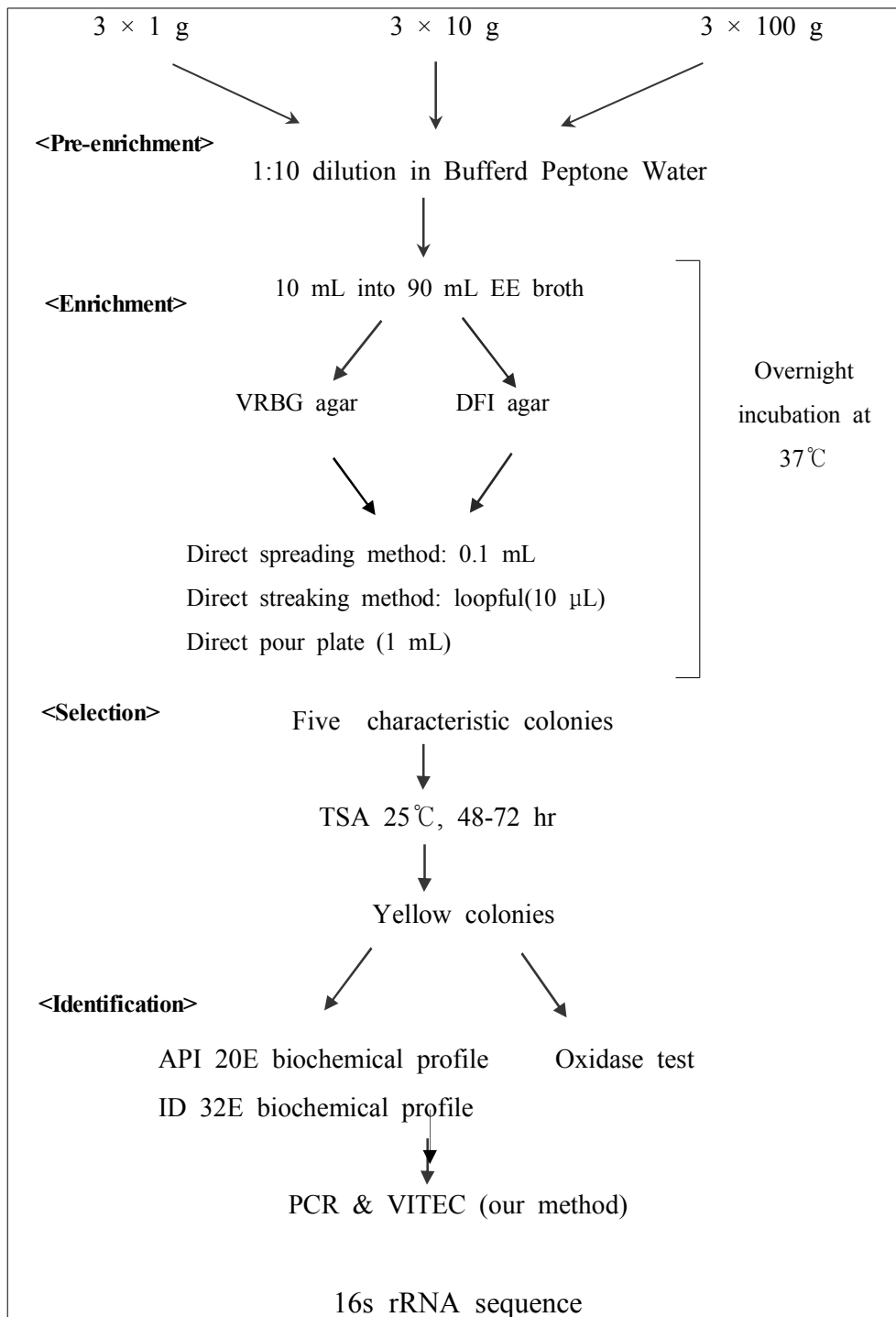


Fig. 1 . Isolation and Identification of *C. sakazkai* (FDA method and Carol Iversen *et al.*, 2003)



#### 다. VITEK을 이용한 *C. sakazkaii*의 동정

최종 생화학적 확인은 자동 미생물 동정기 (Automatic Microbial Identification system, VITEC) (bioMerieux SA, Etoile, France)를 이용하여 측정하였다. 분리된 야생 균주를 두 개의 *C. sakazkaii* 표준 균주와 비교하면서 Murray 등의 저서 Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> edition,에 수록되어있는 "Biochemical reaction of the named species, biogroups, and enteric groups of the family Enterobacteriaceae"와 그 생리적 특성을 비교하였다(49). 생리 특성을 비교하기 위해 VITEC을 수행하였는데 37°C 배양기에서 TSA에 배양시킨 *C. sakazkaii* young cell을 멸균생리식염수에(0.85% NaCl saline) 현탁시켜 MacFaland 2(bioMerieux SA, Etoile, France)로 맞춘 후 GNI+ card(bioMerieux SA, Etoile, France)에 접종시켜 VITEC 기계에 setting시켜 동정이 빠른 순서대로 결과를 얻었다. VITEC 수행으로 얻을 수 있는 glucose fermentation in 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether, D-glucose in acid, 35% growth, acetate utilization, esculin hydrolysis,  $\beta$ -D-glucoside, urea hydrolysis, citrate, indol production, growth in polymyxin B, lactose fermentation, maltose fermentation, D-mannitol fermentation, D-xylose fermentation, raffinose fermentation, D-sorbitol fermentation, sucrose fermentation, myo-inositol fermentation, adonitol fermentation, glucose fermentation in p-coumaric, hydrogen sulfide, ONPG test, L-rhamnose fermentation, L-arabinose fermentation, D-glucose gas formation, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, oxidase test 결과로 30가지 생화학적 특성 이외에 TSA상에서 *C. sakazkaii*의 DNA-DNA hybridization의 여부를 판단하는 yellow pigment 형성 여부와  $\alpha$ -glucosidase activity를 측정하기 위해 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 D-glucopyranoside가 함유된 DFI 상에서의 색 형성을 확인하였다.

#### 라. Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 *C. sakazkaii*의 동정

*C. sakazkaii*의 분자생물학적 동정을 위해 세 쌍의 primer 이용하여 표준균주와 동일한 위치의 amplicon을 형성하는지 확인하였다. TSA (Difco, Bercon, Dickinson and Company, Sparks, USA)에 희석 도말한 *C. sakazkaii*를 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 *C. sakazkaii*를 일 백금이 취하여 1 mL의 멸균증류수에 현탁한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심침전하고 멸균증류수로 2회 세척한 다음, Accuprep<sup>®</sup> genomic DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 genomic DNA를 정제하였다. 정제된 DNA 중 2  $\mu$ L를 취하여 template

DNA로 사용하였다. 2.5 U Tag DNA polymerase, 250  $\mu$ M의 dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>에 template DNA를 첨가하였으며 total reaction volume 20  $\mu$ L로 하여 Gene cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 사용한 primer는 *ompA* gene을 target으로 하는 primer ompA-1(5 ‘-GGATTTAACCGTTTCC-3’), ompA-2 (5 ‘-CGCCAGCGATGT TAGAAGA-3’ )와 16S rRNA gene을 target으로 하는 Saka-1 (5 ‘-ACAGGGAGCCAGCTTGCTGC-3’), Saka-2a(5 ‘-TGCTGCGGTTATT AACAC-3’ )와 tRNA-Glu와 23S rRNA의 intergenic spacer 를 target으로 하는 F S F o r ( 5 ‘ - A T C T C A A A A M T G A C T G T A A A G T C A C G T T - 3 ‘ ), EsRevB(5’ -CCGAARAAGTMTTCGKGCTGC-3’)를 이용하였다. Primer set의 amplicon size는 각각 469, 406, 158 bp 였다. PCR cycle로 *ompA* gene target은 94 $^{\circ}$ C, 2분간 predenaturation하고 94 $^{\circ}$ C 15초 denaturation, 60 $^{\circ}$ C 15초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 30초 extension을 30회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C, 5분 동안 cooling 시켰다. 16S rRNA gene target은 95 $^{\circ}$ C, 4분간 predenaturation하고 95 $^{\circ}$ C 50초, 52 $^{\circ}$ C 50초, 72 $^{\circ}$ C 50초를 30회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C, 4분 동안 cooling 시켰다. tRNA-Glu and 23S rRNA의 intergenic spacer target은 95 $^{\circ}$ C, 10분간 predenaturation하고 95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 15초를 46회 반복한 후 40 $^{\circ}$ C, 30초 동안 cooling 시켰다(Table 2). PCR amplicon은 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide를 포함하는 1% agarose를 0.5 $\times$ TAE (Tris-acetate EDTAm, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 완충용액에서 100 V/cm로 전기영동한 후, UV transilluminator (Seolinbiotech, Suwon, Korea)에서 결과를 확인하였다.

#### 마. 16s rRNA sequence를 통한 homology

*C. sakazkai*의 16S rRNA를 PCR을 수행하여 Amplification 한 후 PCR Purification Kit(biobeer, taejon, Korea)으로 정제한 후 16S rRNA sequencing에 사용하였다. Sequencing 은 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Biosystems, CA, USA)와 ABI 3700 sequencer (Biosystems, CA, USA)에 의해 수행하였다. 16S rRNA sequence의 homologus의 분석은 national Center for Biotechnology Information (ftp://ncbi.nlm.nih.gov) 의 BLAST search program을 이용하여 DNA database와 비교하였으며 phylogenic tree를 이용해 각각의 유사성을 확인하였다.

## 바. 건조 특성에 따른 *C. sakazkaii*의 생리 특성

공시균주인 *C. mytjensii* ATCC 51329과 *C. sakazkaii* ATCC 2949를 포함하여 119개의 건조분말 식품유래 야생 균주를 대상 시험균주로 정하였다. 배양액은 각 균주를 10 mL의 TSB에서 37°C 24시간동안 전 배양시켜 각 균주를 7 log CFU/mL의 수준으로 초기균수를 조정하였다. 7x7 cm<sup>2</sup>의 stainless steel에 20 µl를 떨어뜨린 후 25°C, 상대습도 75%의 항온항습 인큐베이터(Daehan scientific, Korea)에서 건조시킨 후 0, 4, 8, 24, 48시간째에 50 µl 멸균 D.W로 20회씩 2회 pipetting 하여 건조된 bacteria를 회수하여 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다.

Stainless steel 상에서 8시간째에 1 log CFU/mL 이하의 생균수를 보인 균주를 dry sensitive group, 3 log CFU/mL 이상의 생균수를 보인 균주를 dry tolerant group, 그 사이의 균주를 intermediate로 정하여 대표적 3균주씩 선정하였다. 10 mL의 TSB에서 37°C 24시간동안 전 배양시킨 균주를 7 log CFU/mL로 조정하여 12-well culture plate의 각 well에 200 µl씩 접종하여 상온에서 방치하면서 건조시켰다. 건조시간은 0, 6, 12, 24시간과 그 후 15일까지 건조시켰으며 각 시간별로 각각의 well에 200 µl의 멸균 D.W로 pipetting하여 회수된 bacteria액에서 100 µl를 취해 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수 하여 각 그룹 간 평균과 표준편차를 계산하여 표기하였다.

## 사. 건조 분말 식품 내에서의 생육 특성

*C. mytjensii* ATCC 51329와 *C. sakazkaii* ATCC 2949를 포함한 112개의 야생 균주를 대상으로 *C. sakazkaii*가 검출되지 않은 조제분유 10 g에 시료에 spiking 하여 30일 동안 저장하였다. 사용된 균주는 10 mL의 TSB에서 37°C 24시간동안 전 배양시킨 균주를 최종 생균수가 5-6 log CFU/mL의 수준이 되도록 희석한 후 100 µl를 조제분유에 분주하여 멍치지 않게 고루 섞은 후 실온에서 저장하여 초기 생균수와 30일 후의 생균수 변화를 측정하였다.

## 아. 건조 특성에 따른 biofilm 형성 특성

대상 균주로는 건조 특성에 따른 *C. sakazkaii*의 분류에서 분류된 tolerant group과 sensitive group의 대표적 세 균주씩을 시험 균주로 하였다. Biofilm 측정 방법으로는 5. 2. 의 crystal violet의 OD를 측정하는 12-well plastic plate법을 이용하여 측정하였고 각 그룹 간 평균과

표준편차를 계산하여 표기하였다.

## 자. 분리된 *Cronobacter* spp.의 열감수성 특성

공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329과 *C. sakazakii* ATCC 29544와 *Cronobacter* spp. 분리주를 대상으로 해서,  $7 \times 7$  cm<sup>2</sup>의 스텐인레스 스틸에 20  $\mu$ L를 떨어뜨린 후 25°C, 상대습도 75%의 항온 항습 인큐베이터에서 건조시킨 후 0, 4, 8, 24, 48시간째에 50  $\mu$ L D.W.로 20회씩 2회 pipetting 하여 건조된 균체를 회수하여 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다. 사멸정도에 따라 건조민감, 건조내성, 중간그룹으로 분류하였다. 공시균주를 포함한 112개의 *Cronobacter* spp.를 건조 특성에 따라 세 그룹으로 나누어 10 mL의 TSB에서 37°C 24시간동안 전 배양 시킨 균주를 최종 생균수가 7 log CFU/mL의 수준이 되도록 희석 하였다. 각각 1 mL씩 1.5 mL tube에 나누어 담은 후 60°C 항온수조에서 5분간 incubation시킨 후 4°C ice bath로 냉각시킨 후 100  $\mu$ L를 취해 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였으며 초기 균수와 의 차이를 log로 표기하였으며 각 그룹 간 평균과 표준편차를 계산하여 표기하였다.

## 차. Sanitizer를 이용한 *C. sakazakii* 제어농도 측정

건조내성에 대한 분류에 따라 시험 균주로 dry tolerant, sensitive *C. sakzakii*를 대표적으로 3균주씩 선별하여 TSB에서 37°C, 24시간동안 전배양한 후 2차 계대하여 사용하였다. 살균소독력 시험에 사용된 sanitizer로 살균소독제 유효성분 중 실제 제품수와 사용량이 가장 많은 것으로 알려진 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite)과 염화벤잘코늄(Benzalkonium chloride)를 이용하였다. 살균 소독력 시험법에 대한 간략한 모식도는 Fig. 2와 같다. 사용된 희석액은 Trypton, pancreatic digest of casein(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 1 g과 8.5 g NaCl을 증류수 1 L에 녹인 후 멸균하여 사용하였다. 중화제는 polysorbate 80(Fulka chemie, Swizerland) 30 g과 lecithin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)를 희석액에 가하여 1L로 만든 용액을 사용하였으며 경수로 A용액(MgCl<sub>2</sub>, 18.84 g과 CaCl<sub>2</sub> 46.24 g을 증류수 1 L에 용해) 3 mL과 B용액(NaHCO<sub>3</sub> 35.02 g을 증류수 1 L에 용해) 8 mL을 989 mL의 증류수와 혼합한 뒤 pore size 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 사용하였다. 간섭물질로 albumin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)용액(청정조건: 3 g/L, 오염조건 30 g/L)을 여과 멸균하여 사용하였다. 시험 중 모든 시약, 시험균, 시험액은 항온수조에

서  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 살균 소독력 시험은 간섭물질 1 mL를 멸균 시험관에 넣고 시험균 현탁액 1 mL를 첨가하여 혼합하고  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서  $2\text{ min}\pm 10\text{ sec}$ 동안 방치한 후 8 mL의 시험 용액을 첨가하여  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서  $5\text{ min}\pm 10\text{ sec}$  동안 반응시켰다. 이 액 1 mL를 중화제 8 mL와 물 1 mL가 들어있는 멸균 시험관에 첨가하고  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서  $5\text{ min}\pm 10\text{ sec}$  동안 중화시켰다. 이 중화반응 혼합액 1 mL씩을 2개의 petridish(SPL, Korea)에 각각 넣고 TSA를 12~13 mL씩 분주하여 잘 섞은 후  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 발생한 집락수로부터 살균 소독력을 계산하였다. 시험 검증법으로 시험조건 검증시험, 중화제독성검증시험, 희석중화검증시험은 Fig. 2와 같은 방법으로 수행하였다. 또한 살균소독력 평가를 위한 시험균주로 Gram(-)와 Gram(+ )를 대표하는 *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 1949와 *Staphylococcus aureus* ATCC 12103을 사용하였다.

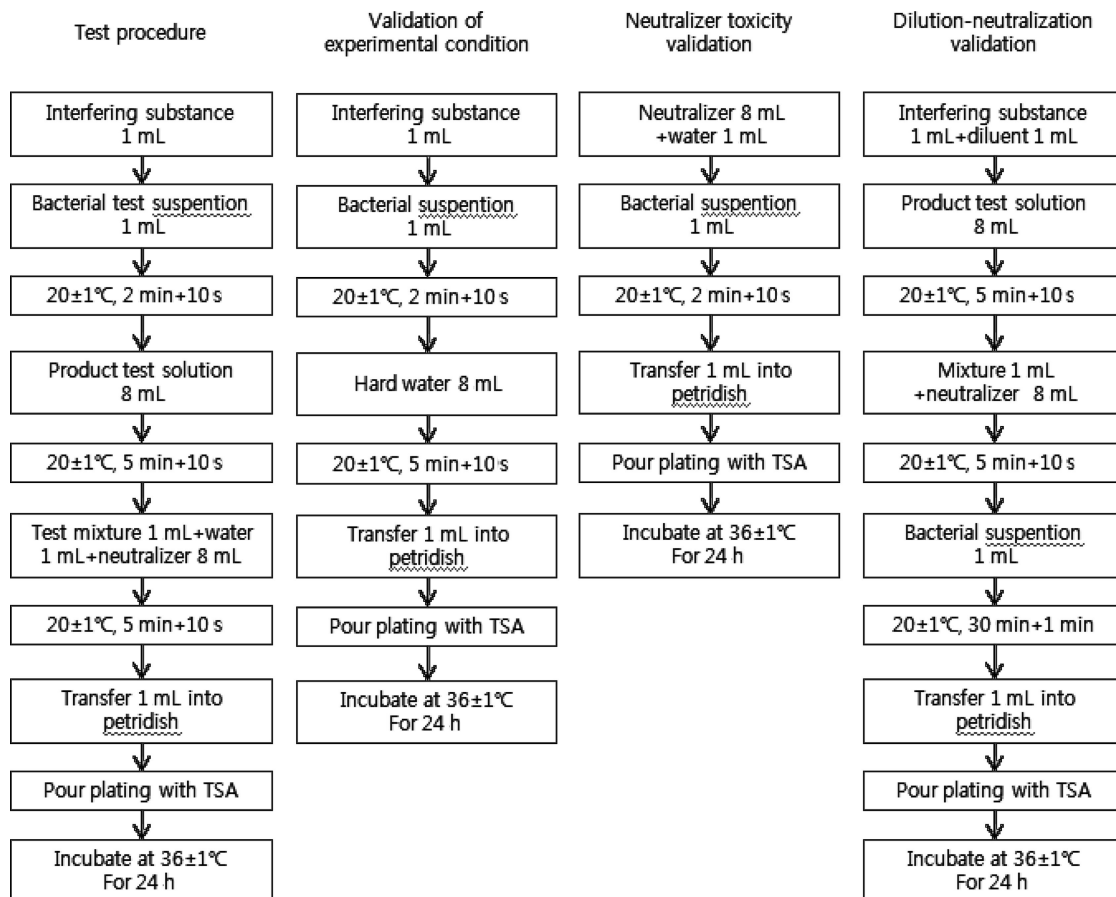


Fig. 2. Test and validation procedure for bactericidal suspension test

## 카. 분리된 *Cronobacter* spp.의 세포 독성 시험

분리된 *Cronobacter* spp.에 대한 세포 독성 실험을 수행하기 위해 Hep-2 cell line을 사용하여 수행하였다. 분리된 *Cronobacter* spp. 들을 TSB에서 37°C에서 18시간 배양한 후 PBS buffer를 이용 3회 수세한 후 다시 PBS buffer에 현탁하여 약  $10^4$  Hep-2 cell/well에 약 6 log CFU/mL 수준으로 접종하였다. 그리고 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하면서 1시간과 3시간 이후에 Hep-2 cell 에 대한 viability를 trypan blue 염색을 수행한 후 개수하여 비교하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 다양한 식품 중에 일반 세균 오염도

본 연구를 위해 사용된 조제 분유, 이유식, 선식, 생식, 농수산물, 샐러드 등에 오염되어 있는 일반 세균수를 수행한 결과 조제 분유의 경우는 약 3 log CFU/g 미만이었으며, 이유식은 약 3 log CFU/g, 선식과 생식은 약 4 log CFU/g, 과일, 곡류, 해조류, 야채류 등은 약 5~6 log CFU/g, 샐러드는 약 5 log CFU/g 수준으로 오염되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 원재료의 특성이나 특정 제품을 생산하는데 있어서 가공 공정에 차이에 따라 상이하게 나타나는 것으로 판단된다. 조제 분유와 이유식의 경우 3 log CFU/g 미만으로 낮은 수준으로 오염되어 있었으나, 다른 원재료 들인 농수산물은 오염도가 높은 것으로 나타나 원재료에 대한 보다 GAP 등을 통한 철저한 관리가 필요할 것으로 보인다. 또한 생식과 선식의 미생물을 제어할 수 있는 열처리 등의 가공 공정이 없거나 적기 때문에 원재료의 미생물학적 관리를 통해 최종 산물이 미생물학적으로 보다 안전한 제품이 생산될 수 있을 것으로 사료된다.



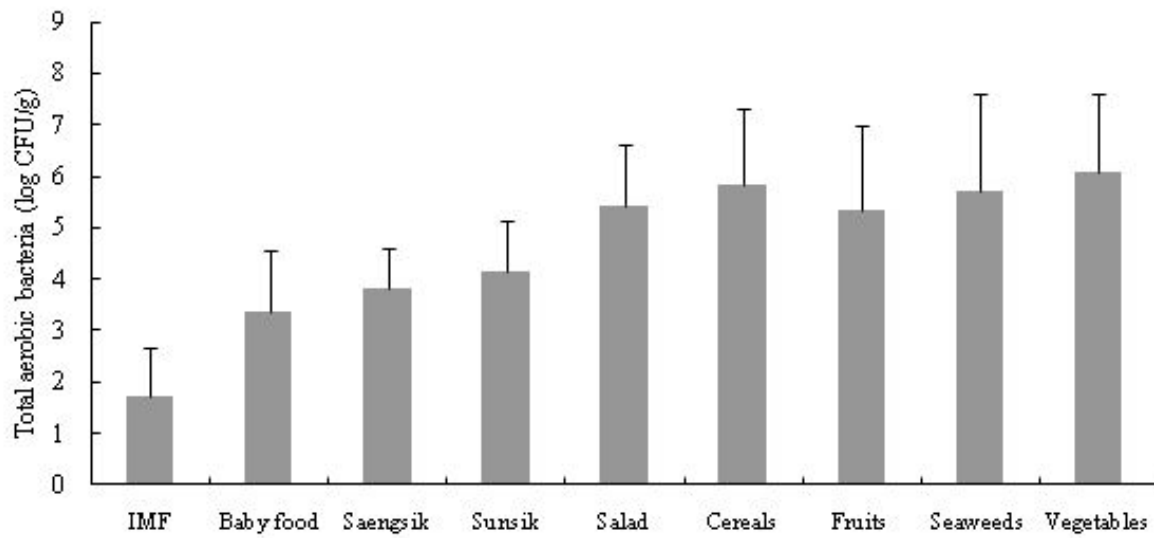


Fig. 3. Total aerobic bacteria in various foods.

## 나. VITEK과 PCR에 의한 *C. sakazakii*의 분리, 동정

*C. sakazakii* ATCC 29544, *C. muytjensii* ATCC 51329 두 표준균주를 대조균으로 다양한 식품에서 *Cronobacter* spp.를 분리하였다. 분리법은 U.S. FDA에서 규정한 *C. sakazakii* isolation법에 준하여 *C. sakazakii* 야생균주를 분리하였으며 PCR로 *C. sakazakii* specific gene을 갖고 있음을 확인하였다. 보유 균주를 포함한 132개의 *C. sakazakii* 확정 또는 의심 bacteria를 최종적으로 생화학 특성을 알아보기 위해 자동 미생물 동정기, VITEC을 수행하였다. 그 결과 총 124개의 *C. sakazakii*중 99% 유사성 70균주 98% 유사성 27균주, 97% 유사성 5균주, 96% 유사성 17균주로 나타났다. 유사성 99%의 분리 균이 약 56%로 가장 많이 분리되었고 유사성 95% 미만의 다섯 균주와 *Klebsiella pneumoniae*, 2균주, *Shigella dysenteriae* 2균주, *Enterobacter cloacae* 4균주가 확인되었다. 또한 124개 분리균 중 *C. sakazakii*와 유사성 95%이상의 균주 119개임을 확인하였다(Table 1).

Table 1. VITEK (Automatic Microbial Identification System) result of *C. sakazakii*-like isolates

Organism	Isolates number
<i>C. sakazakii</i> 99%	70
<i>C. sakazakii</i> 98%	27
<i>C. sakazakii</i> 97%	5
<i>C. sakazakii</i> 96%	17
<i>C. sakazakii</i> under 95%(66%, 82%)	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
Others <i>Shigella dysenteria</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<b>Total <i>C. sakazakii</i> over 95% similarity isolates</b>	<b>119 of 132</b>

Compared with 2 type strains, *C. sakazakii* ATCC 2949 and *C. mytjensii* ATCC 51329.

VITEK 결과와 Murray PR 등의 저서 Manual of Clinical Microbiology의 "Biochemical reaction of the named species, biogroups, and enteric groups of the family Enterobacteriaceae"의 *C. sakazkaii* 항목과 공시균주, 야생균주의 biochemical characterist를 비교하였다. 비교할 수 있는 항목은 총 25가지 항목 이었으며 그 중 11가지 항목에서 다른 점을 보였다. 상이한 항목을 보면 urea hydrolysis, malonate utilization, indole production의 세 가지 생화학 특성에 대해서는 음성에 가까운 결과를 나타내었는데 그 중 malonate utilization의 결과, 97%에서는 99%와 96%의 음성판정과는 달리 50% 전후의 양성 결과를 나타내어 뚜렷한 특이추이가 없음을 나타내었다. 하지만 *myo*-inositol fermentation의 경우 유사성이 떨어질수록 결과가 음성에 가까운 것으로 확인되어 유사성 결정과 깊은 연관이 있음을 알 수 있었다. 나머지 lactose fermentation, arginine dihydrilase, ornithine decarboxylase, citrate는 일정한 경향 없이 조금씩 상이한 결과를 보였으며 raffinose fermentation, D-glucose, gas, yellow pigment 는 분리 균은 100% 양성으로 동일한 결과를 보였으나 biochemical characterist에 명기된 수치와는 조금씩 다른 결과를 보였다. 25항목 중 D-glucose-acid, esculin hydrolysis와 maltose fermentation, D-mannitol fermentation, D-xylose fermentation, sucrose fermentation, L-ramnose fermentation, L-arabinose fermentation, ONPG test의 9개 항목은 모두 100% 양성 반응을 나타내었다. D-sorbitol fermentation, hydrogen sulfide, adonitol fermentation, lysine decarboxylase, oxidase의 5가지 항목은 모두 음성 반응을 나타내어 총 14가지 항목에서 동일한 결과를 나타내어 국내외 분리 균의 동일한 특성이 있음을 나타내었다. "Biochemical reaction of the named species, biogroups, and enteric groups of the family Enterobacteriaceae" 에 표기되지 않은 VITEC의 7가지 항목 중 35°C growth,  $\alpha$ -glucosidase는 100% 양성으로 acetate utilization, growth in polymyxin B, glucose fermentation in p-coumaric는 음성으로 type strain과 동일한 결과를 얻었다. 하지만 glucose fermentation in 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether,  $\beta$ -D-glucoside의 경우 유사성 99%의 분리 균주와도 상이한 경향을 나타내어 외래분리균주라고 할 수 있는 표준균주와 Korea isolates의 차이점을 확인할 수 있었다.

또한 분자생물학적 확인을 위한 PCR을 수행한 결과로 positive control로 *C. sakazkaii* ATCC 29544를, negative control로 *C. sakazkaii*와 가장 유사한 *E. cloacae* NCTC 1949 를 선정하여 각 분리균과 비교하였다. *ompA* gene을 target으로 하는 primer쌍은 469 bp에서 16S rRNA gene target primer 쌍은 406 bp에서, tRNA-Glu와 23S rRNA의 intergenic spacer 를 target으로 하는 primer 쌍은 158 bp에서 전기 영동을 수행한 후 각각의 DNA 증폭 산물을 확인하였으며, *E. cloacae* 를 제외한 모든 lane에서 amplicon이 확인되어 *C.*

*sakazkai*임을 확인하였다. (Fig. 4-6).

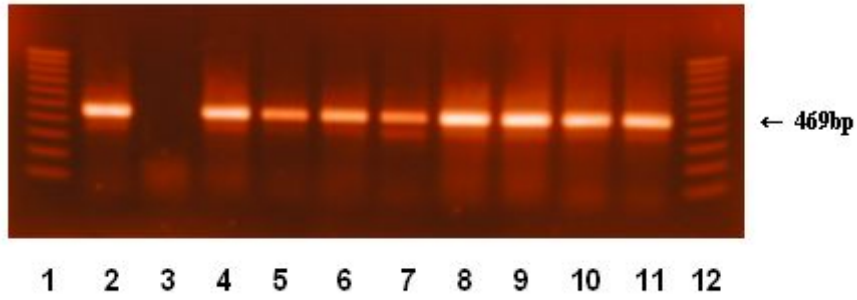


Fig. 4. Detection of *C. sakazkaii* by amplification of *ompA* gene. Lane; 1,12 : 100 bp ladder, 1: *C. sakazkaii* ATCC 29544(positive control), 2: *E. cloacea* KCTC 1949(negative control) 3-11: *C. sakazkaii* wild strains

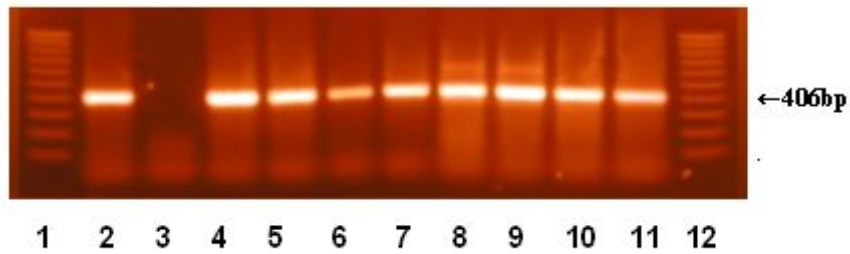


Fig. 5. Detection of *C. sakazkaii* by amplification of 16S rRNA. Lane; 1,12 : 100 bp ladder, 1: *C. sakazkaii* ATCC 29544(positive control), 2: *E. cloacea* KCTC 1949(negative control) 3-11: *C. sakazkaii* wild strains

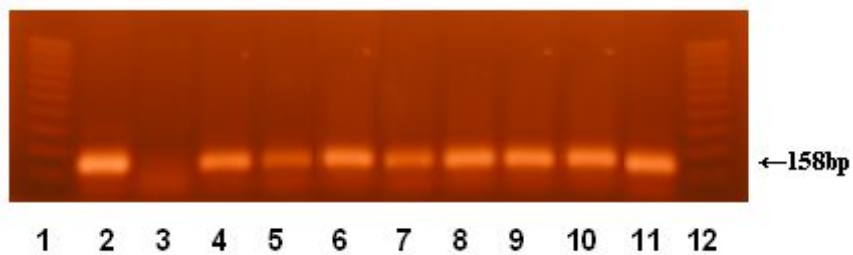


Fig. 6. Detection of *C. sakazkaii* by amplification of tRNA-Glu and 23S rRNA의 intergenic space. Lane; 1,12 : 100 bp ladder, 1: *C. sakazkaii* ATCC 29544(positive control), 2: *E. cloacea* KCTC 1949(negative control) 3-11: *C. sakazkaii* wild strains

또한 분리된 *C. sakazakii* strains을 16s rRNA sequence 분석을 하여 최종적으로 *C. sakazakii*로 동정하였다. 분리균들을 16s rRNA sequence를 NCBI에서 BLAST로 확인한 결과 모두 *C. sakazakii*와 가장 높은 homology를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 16s rRNA sequence 결과를 phylogenetic tree를 통해 유사성을 확인한 결과는 Fig. 7, 8과 Table 2와 같다.

다양한 식품으로부터 분리한 *Cronobacter* spp.를 phylogenetic tree를 통해 확인한 결과, 분리된 *Cronobacter* spp. 대부분은 *C. sakazakii*로 총 100주로 확인되었으며 (87.7%), 2주의 *C. muytjensii* (1.7%), 12 주의 *C. dublinesis* (10.6%)로 분류되었다. 식품의 종류에 따른 *Cronobacter* spp.의 분리율은 선식과 생식이 가장 높은 비율을 나타내고 있었다. 생식과 선식은 야채, 곡류 등의 농산물을 가공적이면 최소한에 가공 공정만으로 생산해서 미생물에 대한 오염 위험이 매우 높을 것으로 판단되며, 특히 생식과 선식은 섭취하는 계층이 건강한 성인부터 노약자 등이 건강 보조식 또는 아침 대용식 등으로 다양하게 섭취하고 있기 때문에 노약자에게서 *Cronobacter* spp.에 대한 위험도는 클 것으로 사료된다. 영유아식인 105개의 조제 분유와 9개 이유식의 경우도 8주의 *C. sakazakii*가 분리되었으며, 이는 기존에 국내외에서 보고된 분리율과 유사한 것으로 확인되었다. 하지만 *Cronobacter* spp.는 주로 영유아에게 감염되어 뇌수막염 등을 유발하여 매우 치명적인 질병을 유발하거나 사망까지 이르게 된다. 따라서 영유아식인 조제 분유 등에 오염되었을 경우 그 위험을 매우 치명적이기 때문에 *Cronobacter* spp.의 원재료의 관리, 가공 공정 관리 등의 제어가 반드시 필요할 것이다.



Fig. 7. Neighbor-joining tree of *Cronobacter* spp. and related organisms based on partial 16S rDNA sequences (bootstraps=1000)





Fig. 8. Neighbor-joining tree of *Cronobacter* spp. and related organisms based on partial 16S rDNA sequences (bootstraps=1000)

**Table 2.** Type and number of *Cronobacter* spp. samples analyzed

Type		Number of Isolates		
		<i>C. sakazakii</i>	<i>C. muytjensii</i>	<i>C. dublinensis</i>
Dry-powdered food	Dried baby food (n=9)	1	- <sup>a</sup>	-
	IMF (n=105)	7		
	<i>Sunsik</i> (n=86)	23	2	6
	<i>Saesik</i> (n=86)	35		6
Agricultural product	Cereal (n=50)	8	-	-
	Fruit (n=41)	3	-	-
	Vegetable (n=128)	19	-	-
	Seaweed (n=24)	3	-	-
Fresh-cut food	Salad (n=15)	1	-	-
Total (n=353)		100	2	12

-<sup>a</sup>: not detected

#### 다. 분리된 *Cronobacter* spp.의 항생제 감수성 특성

분리된 *Cronobacter* spp.의 ampicillin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol의 항생제에 대한 감수성을 확인한 결과는 Table 3.과 같다. 본 연구에 사용된 항생제는 주로 *Cronobacter* spp.의 치료에 많이 사용되어지고 있는 것들이다. 분리된 *C. sakazakii* 들은 ampicillin, tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 96% 이상이 감수성이 있는 것으로 나타났으나, streptomycin의 경우 약 17%가 내성이 있는 것으로 나타났고, 중간 정도에 내성을 나타내는 것은 약 75%로 매우 높았다. *C. dublinesis*와 *C. muytjensii*의 경우도 ampicillin, tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 감수성이 높은 것으로 나타났으며, *C. sakazakii*와 마찬가지로 *C. dublinesis*는 streptomycin의 경우는 중간 내성을 갖는 분리주는 11 주로 확인되었다. 이는 streptomycin에 대한 항생제에 대한 내성이 있는 *Cronobacter* spp.가 증가될 수 있을 것으로 보인다. 또한 ampicillin, tetracycline, chloramphenicol에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났으나, 계속되는 항생제의 사용 및 항생제 내성 유전자의 전이 등을 통해 항생제에 대한 내성을 획득하게 될 가능성이 높을 것으로 판단된다.

Table 3. Antibiotics susceptibility of *Cronobacter* spp. from various foods by agar disc diffusion method

<i>C. sakazakii</i> isolates(n=100)			
	Resistance (%)	Intermediate (%)	Susceptibility (%)
Ampicillin	0	1	99
Streptomycin	17	75	8
Tetracycline	1	1	98
Chloramphenico	2	2	96
<hr/> <hr/> <i>C. muytjensii</i> isolates(n=2)			
	Resistance (%)	Intermediate (%)	Susceptible (%)
Ampicillin	0	0	2
Streptomycin	0	0	2
Tetracycline	0	0	2
Chloramphenico	0	0	2
<hr/> <hr/> <i>C. dublinensis</i> isolates(n=12)			
	Resistance (%)	Intermediate (%)	Susceptible (%)
Ampicillin	0	0	12
Streptomycin	0	11	1
Tetracycline	0	0	12
Chloramphenico	0	0	12

## 라. 건조에 따른 *C. sakazkaii*의 특성

25℃, 상대습도 75%에서의 금속표면에서 *C. sakazkaii* ATCC 29544, *C. mytjensii* ATCC 51329 두 표준균주를 대조균으로 하여 건조실험을 수행하였다. 그 결과 사용한 120 개 균주 중 7개 균주는 8시간째에 1 log CFU/mL 수준으로 사멸하는 건조에 약한 감수성 균주 그룹 (Dry sensitive group, sensitive group)으로, 8시간 건조 후 4 log CFU/mL 정도의 생존을 보이는 37균주 건조 내성 그룹 (Dry tolerant group, tolerant group)으로, 그 중간의 수치를 나타내는 76개 균주를 중간 그룹(Dry intermediate group, intermediate group)으로 구분할 수 있었다. 각 그룹별로 공시 균주를 포함한 대표적 3균주를 지정하여 12-well microtittleplate에서 표면상에서의 상온 방치 시 건조시간에 따른 생균수의 변화를 측정하였을 때, 건조 1시간 후부터는 세 그룹 모두 감소 경향을 보이거나 sensitive group 은 tolerant group에 비해 3 log CFU/mL이상 사멸하였으며 시간이 지날수록 감소 추세를 이어갔다. 하지만 tolerant group과 intermediate group은 2일 건조 후 생균수가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 건조에 민감한 10% 미만의 균주에서만 균의 감소를 보였고 식품에서 분리된 90% 이상의 *C. sakazkaii* 균주는 건조에 강한 저항성을 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 9).

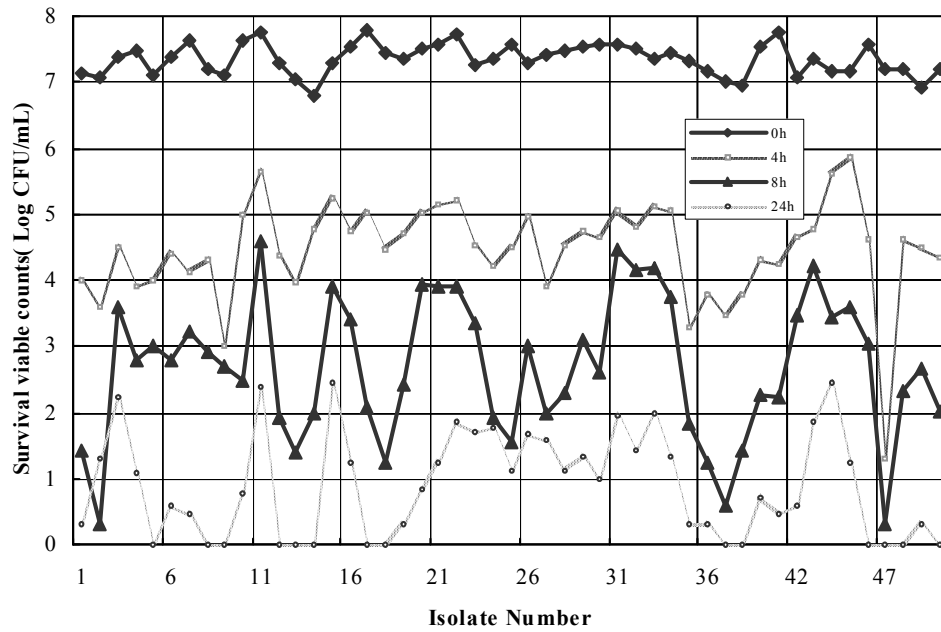


Fig. 9. Dry pattern of *C. sakazkai* at 25°C, 75% relative humidity.

#### 마. 건조 분말 식품 내에서 *C. sakazkaii*의 생육 특성

*C. sakazkaii*가 검출되지 않은 조제분유 시료에 5-6 log CFU/mL의 수준이 되도록 *C. mytjensii* ATCC 51329와 *C. sakazkaii* ATCC 29544를 포함한 112개의 야생 균주를 spiking 하여 고루 섞은 후 실온에서 저장하여 30일 후의 생균수 변화를 측정한 결과 건조특성에 따른 분류와 마찬가지로 *C. sakazkaii* dry tolerant group과 intermediate group은 30일 이후에도 3 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었다(Fig. 10). Barron 과 Forsythe는 건조상태의 조제분유에 *C. sakazkaii* 야생 균주 10가지를 7 log CFU/mL 수준으로 spiking하여 30개월간 저장실험을 한 결과, 열 균주 중 한 균주는 1년 안에 모두 사멸하였으나 두 균주는 30개월까지 2 log CFU/mL이상의 생균을 유지하고 있었으며 나머지 일곱 균주는 20개월에서 30개월 내에 사멸하여 건조내성이 크다고 보고하였다. 30개월에서 생존을 보이는 두 내성 균주의 사멸 패턴으로는 4개월까지 급속한 사멸곡선을 그리다가 6개월 이후에 안정적으로 2~3 log CFU/mL 수준을 유지한 것으로 나타났다. 또한 Edelson-Mammel 등은 조제분유의 높은 영양 성분으로 인해 700일 이상 bacterial cell의 생존이 가능하다고 보고였다. 또한 Gurtler와 Beuchat가 *C. sakazkaii* 건조 시  $A_w$ 가 감소할수록 생존률이 높다고 보고하였으며 분유의  $A_w$ 는 0.2로 나타나 조제분유에 오염된 *C. sakazkaii*가 균 자체의 건조내성 특성과 분유의 낮은 수분활성도와 고 영양적 특성이 복합적으로 작용하여 높은 생존률을 보인 것으로 사료된다.

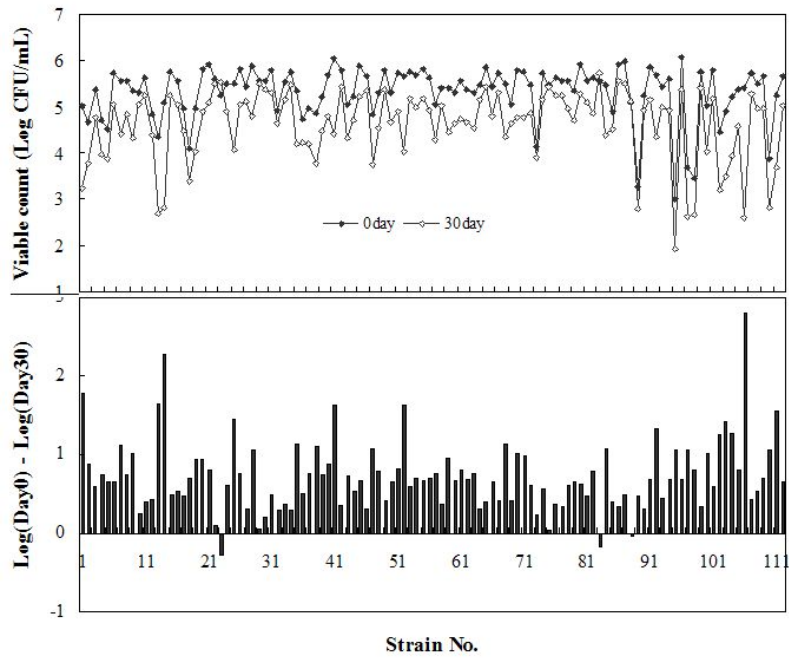


Fig. 10. Death of *C. sakazkaii* spiked in IMF after a month.



#### 바. *C. sakazkaii*의 biofilm 특성 분석

12-well plastic plate 법에 따른 biofilm 형성을 건조 특성에 따른 분류에서 tolerant group 과 sensitive group의 대표적 세 균주 씩 측정한 결과 tolerant group의 경우 초기 12시간에 급속한 증가를 보였으며 그 후 일주일까지는 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보이다가 15일까지는 다시 증가하는 pattern을 보였다. Sensitive group의 경우 초기 24시간까지는 감소하는 추세를 보이다가 그 이후로 2일까지는 급격한 증가추세를, 15일까지는 완만한 증가 추세를 보였다(Fig. 11).

Loewen와 Hengg-Aronis에 의하면 *L. monocytogens*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 등의 병원성 세균은 외부 스트레스에 적응하여 인간에게 질병을 일으키는 특수한 작용을 가지고 있으며 스트레스 관련 sigma factor  $\sigma^S$ 와  $\sigma^B$ 는 스트레스로부터 세균이 살아남는데 밀접한 관련이 있는 삼투보호물질(osmoprotectant)을 생산하는 유전자에 의한 것이라고 보고하였다. 또한 스트레스 관련 sigma  $\sigma^S$  (*RpoS*)는 특히 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Y. enterocolitica* 등 그람 음성 세균에서 발견되고 있으며 외부의 스트레스에 적응하여 병원균을 생존시키고 독성을 발현하는데 중요한 역할을 한다. *C. sakazkaii* 균체의 건조에 따른 생균수 측정과 비교하여 보았을 때 tolerant group의 경우는 초기 증식한 균에 의해 biofilm양이 증가한 것으로 나타났고 sensitive group의 경우에는 건조 영향에 따라 균체의 사멸에 의해 biofilm 전체의 양이 줄어들었고 그 중 건조에 살아남은 소수의 균체가 강하게 biofilm을 생성한 것으로 사료된다. 건조 15일에 가까워질수록 biofilm 양이 같아지는 것을 볼 때에도 이와 같은 결과를 유추할 수 있다.

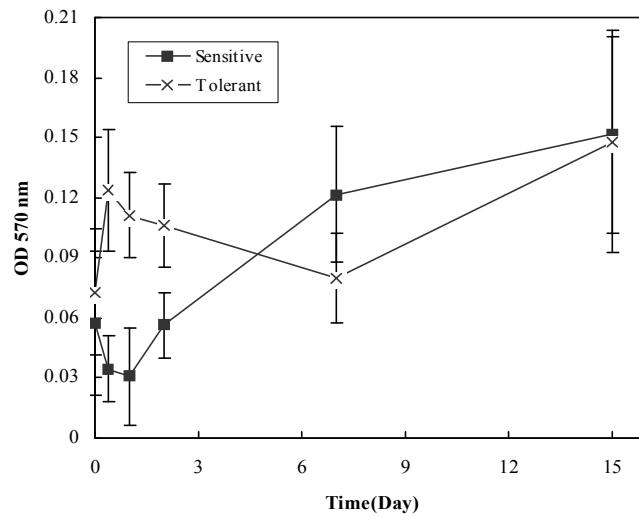


Fig. 11. Comparison biofilm formation capability with dry-sensitive/tolerant strains of *C. sakazkaii* by microtiter plate method. Average of 3 representative strains each.

특히 조제 분유로부터 분리된 *C. sakazkai*들의 16s rRNA sequence 결과를 이용한 genogroup과 Farmer 등에 의한 biogroup에 따른 건조에 대한 특성을 확인한 결과는 Table 4와 같다. 조제 분유로부터 분리된 *C. sakazkai*의 건조 특성을 확인한 결과 약 31%가 건조에 대한 내성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 분리된 *C. sakazkai*를 기존에 biogroup 구분에 따라 분석한 결과 새로운 biogroup 17로 확인되었으며, 16s rRNA에 따른 genotype을 수행한 결과 Cluster I에 속하는 것으로 나타났다. 또한 이들 new biogroup 17과 같은 cluster I에 속하는 biogroup 1들의 건조 내성 특성과 biofilm 생성능을 확인한 결과는 Fig. 12와 같다. 새롭게 확인된 new biogroup 17은 기존의 biogroup 1에 비해 건조에 대한 내성이 크고, biofilm 생성능이 좋은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 일반적으로 미생물이 환경 스트레스를 받게 될 경우 adaptation, mutation 등 다양한 방법으로 생존 또는 생육할 수 있게 되는 것과 유사한 결과로 보여지며, new biogroup 17인 *C. sakazkai*가 건조한 조건에서 생육하기 위한 생화학적 특성 변화 혹은 adaptation 등을 통해 건조에 대한 내성이 높아진 것으로 사료되며, 특히 이러한 특성은 조제 분유를 섭취하는 영유아들에게 보다 높은 위해 가능성이 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Dry sensitive and resistance strain by genogroup and biogroup

		Genotype (total %)	Strains
Dry Sensitive <i>C. sakazakii</i>	Cluster I: 28 strains (59%)		KYU1, KYU2, KYU6, KYU17, KYU18, KYU19, KYU21, KYU25, KYU27, KYU39, KYU40, KYU43, KYU44, KYU45, KYU47, KYU48, KYU51, KYU53, KYU58, KYU59, KYU60(including biogroup 1-5, 7-9, 11, 13 and 14)  New biogroup 17: KYU56, KYU62, KYU64, KYU65, KYU66, KYU68, KYU76
	Cluster IV: 5 strains (10%)		KYU8, KYU35, KYU37, KYU38, KYU50
Dry Resistant <i>C. sakazakii</i>	Cluster I: 15 strains (31%)		KYU22, KYU23, KYU24, KYU30, KYU31, KYU34, KYU41, KYU42, KYU46, KYU49, KYU52(including biogroup 1-5, 7-9, 11, 13 and 14)  New biogroup 17: KYU57, KYU63, KYU69, KYU70
	Cluster IV: not detected		-

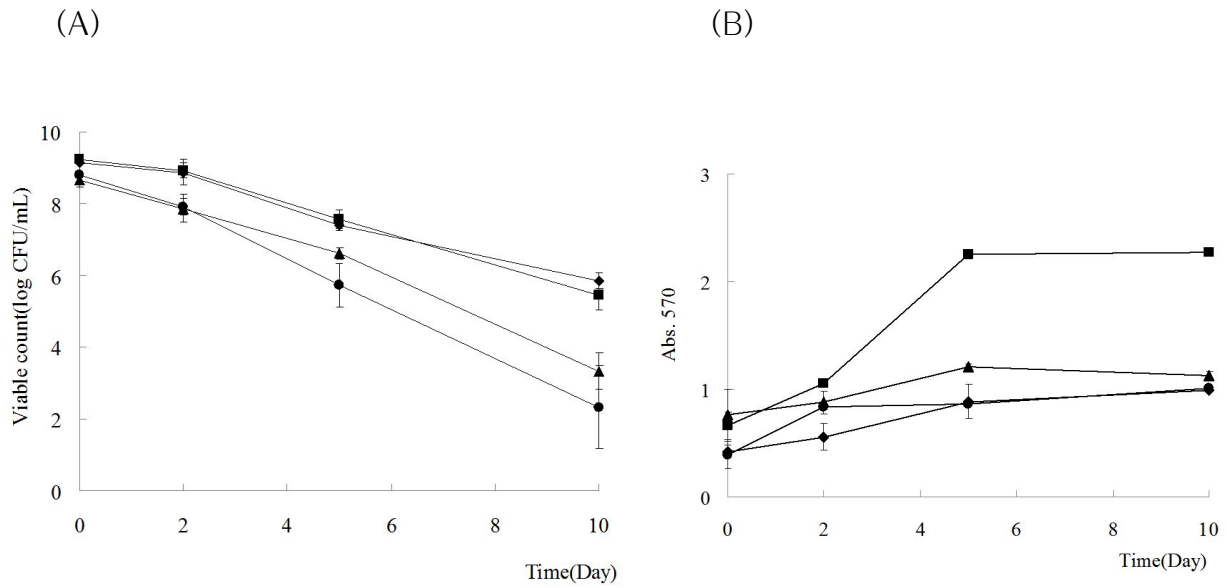


Fig. 12(A). Viability of new biogroup 17 and biogroup 1 on dried plastic surfaces. (B) Biofilms formation of new biogroup 17 and biogroup 1 on dried plastic surfaces. ●: dry sensitive biogroup 1, ◆: dry sensitive new biogroup 17, ▲: dry resistant biogroup 1, ■: dry resistant new biogroup 17

## 사. 분리된 *Cronobacter* spp.의 열감수성 특성

국내에서 분리한 112개의 *Cronobacter* spp.를 건조내성에 따라 건조저항, 중간그룹으로, 세 그룹으로 나누었다. 이들 각각의 균을 60℃ 항온수조에서 사멸정도를 측정하였다. 전 배양한 초기균주는 7 Log CFU/mL 수준이었으며 사멸정도를 보았을 때 건조민감 그룹은 평균 5 Log scale이 사멸되었으며 평균 3 Log scale이 사멸한 건조저항 그룹보다 높은 사멸을 보였다. 중간그룹의 경우 위의 건조실험에서 건조저항 그룹에 가까운 것으로 나타는 데 평균 2 log scale의 낮은 사멸을 보여주었다. 오차범위가 넓었지만 저항 특성이 열저항성 그룹과 비슷한 것으로 사료된다(Fig. 13). 그러므로 건조저항을 가지고 있는 *Cronobacter* spp.는 열에 대해서도 저항성이 큰 것으로 보인다. 여러 연구자들에 의한 연구에 의하며 *Cronobacter* spp.의 열저항성은 매우 다양한 것으로 보고되어 있다. 항생제와 biocide에 대한 교차저항성(cross-resistance)의 특성과 같이 건조저항성도 열저항성과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나 무엇보다도 조제분유등의 건조식품에서 살아 있는 *Cronobacter* spp.는 건조저항성이 클 것으로 보인다. 현재 WHO에서는 70℃에서 조제분유를 환원시키라고 권하고 있지만 조제분유상태에서의 *Cronobacter* spp.는 열저항성도 크기 때문에 이에 대한 심도있는 연구가 더 따라야 할 것으로 보인다. 열처리로부터 살아남은 세균이거나 식품중의 산, 염, 온도 등 자연적으로 가해진 스트레스를 견디어 낸 세균들은 다른 스트레스를 가해도 일부 균주는 교차보호(cross protection) 특성으로 인해 식품 속에서 더 독성이 강해진다고 보고하였다. 따라서 조제분유등의 건조 스트레스에 노출되었고 살아남은 *Cronobacter* spp.는 교차보호로 인해 여러 가지 스트레스에서도 높은 내성을 보일 수 있을 것으로 사료된다.

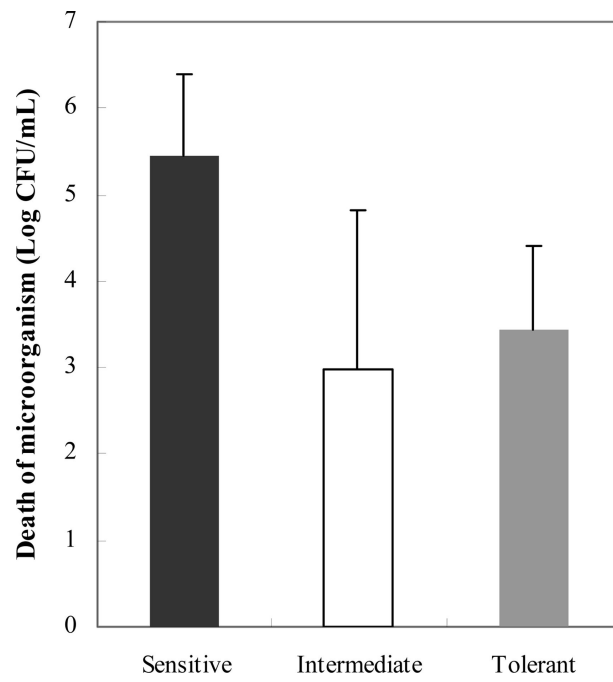


Fig. 13. Death profiles of dry-sensitive, dry-intermediate, and dry-tolerant *Cronobacter* spp. by heat at 60°C from the 7 log scale inoculum.

## 아. Sanitizer를 이용한 *C. sakazkaii*의 제어농도 측정

Polyvinyl chloride(PVC), teflon, plexigals, wool, rubber와 stainless steel에서 *S. aureus*, *E. coli*, *Sal. enteritidis*와 *L. monocytogens*는 부착하지 않은 cell에 비해 quaternary ammonium compound(QAC) sanitizer에 저항력을 가지고 있다. Biofilm 형성 능력이 높은 tolerant group과 상대적으로 초기 biofilm 형성이 적은 sensitive group과의 염소계 sanitizer 인 차아염소산나트륨 용액(sodium hypochlorite solution)과 4급암모늄계 (QACs)인 염화벤질 코늄(benzalkonium chloride)에 대한 살균력을 측정하였다(Fig. 14). Sodium hypochlorite와 benzalkonium chloride은 살균소독제 유효성분 중 실제 제품수와 사용량이 가장 많은 것으로 알려져 있다. 살균 농도는 *C. sakazkaii*가 5 log CFU/mL이나 99.999%의 사멸을 보이는 최소 농도로 설정하였다. Sodium hypochlorite는 두 그룹 대부분 15~25ppm의 범주에 속하였고 각 그룹간의 큰 구별성은 없었으며 청정조건과 오염조건에서 5ppm 가량의 차이를 보이는 것을 확인하였으나 오염정도가 살균력에 크게 반영되지는 않는 것으로 보인다(Fig. 15). 반면 QACs 인 benzalkonium chloride는 살균 농도가 5~15 ppm으로 sodium hypochlorite 보다 낮은 농도에서 저해됨을 나타냈으며 각 그룹에 따라 5ppm의 차이를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 14). 청정조건과 오염조건에 따라서는 tolerant group 중 한 균주만 차이를 보여 오염조건과 살균력의 상관관계는 크지 않은 것으로 보인다. 따라서 실험 결과로 볼 때 sanitizer를 이용한 *C. sakazkaii*의 제어 시에는 sodium hypochlorite 보다 benzalkonium chloride가 저 농도에서 효과적으로 적용할 것으로 사료된다.



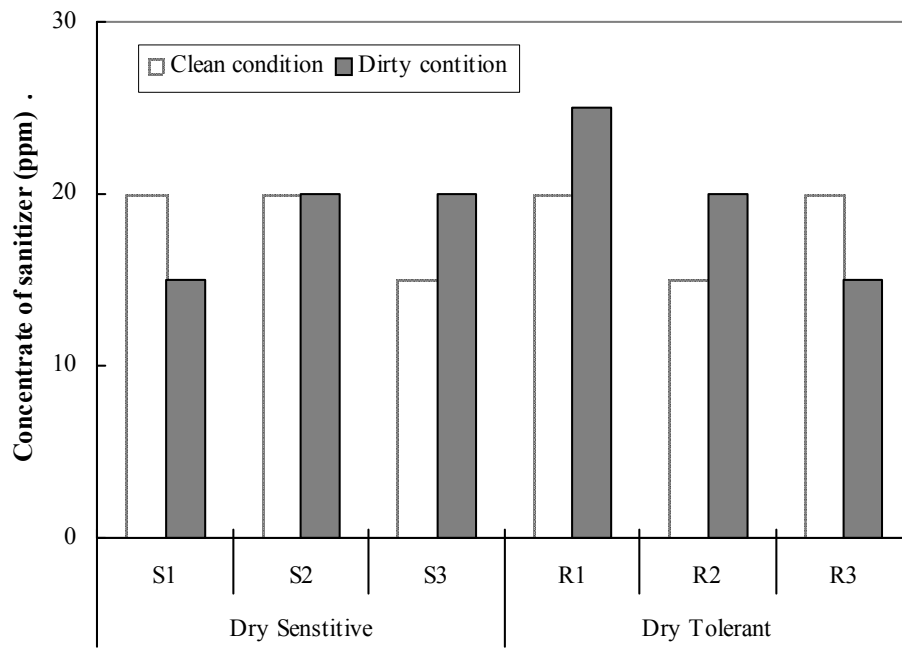


Fig. 14. Concentrate of sodium hypochlorite solution for reduce *C. sakazkai*.

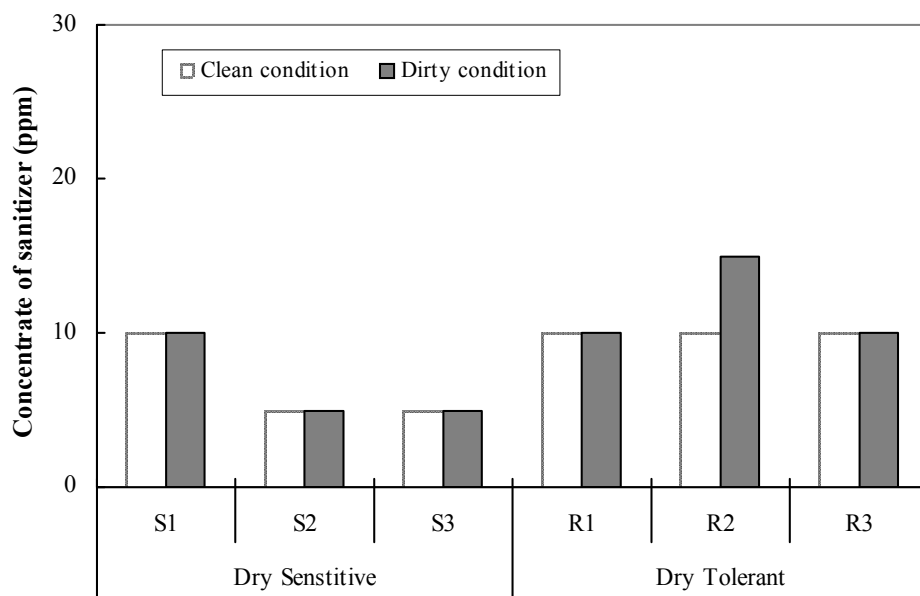


Fig. 15. Concentrate of benzalkonium chloride for reduce *C. sakazkaii*.

## 자. 분리된 *Cronobacter* spp.의 세포 독성 시험

분리된 *Cronobacter* spp.에 대한 Hep-2 cell에서의 세포 독성을 확인한 결과는 Fig. 16로 KYU6, KYU36, KYU10, KYU52, KYU106, KYU38의 경우 1시간 이후부터 Hep-2 cell 모두 사멸되었으나, KYU37, KYU12, KYU2, KYU9, KYU89, KYU35, KYU8은 3시간 이후에도 Hep-2 cell이 약 3~4 log Hep-2 cell이 생존하고 있었으며, KYU88, KYU87, KYU50은 3시간 이후에는 모두 사멸되는 것을 확인하였다. 분리된 *C. sakazakii*와 *C. dublinensis* 사이에 세포 독성의 차이를 명확히 규명할 수 없었으며, 단지 분리된 *Cronobacter* spp. 분리주 간에 생리특성 또는 독성 등에 기인하는 것으로 판단된다.

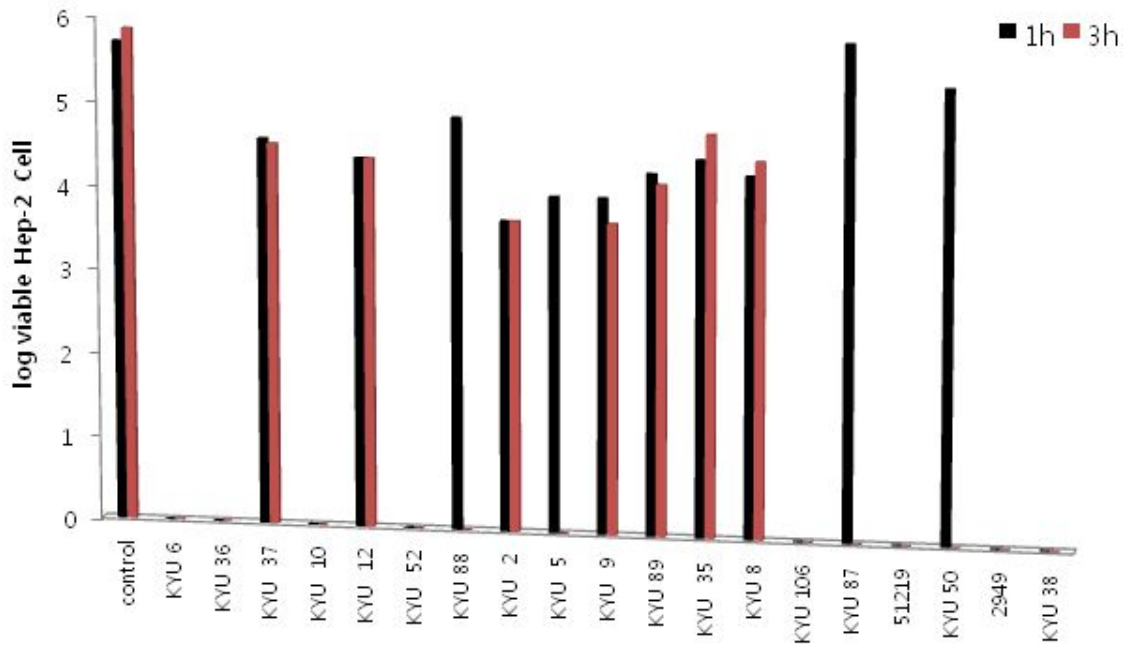


Fig. 16. Viability of Hep-2 cell by *C.dublinensis* and *C.sakazakii* isolates

*C. sakazakii*: KYU2, KYU5, KYU6, KYU10, KYU12, 2949

*C. dublinensis*: KYU8, KYU9, KYU35, KYU36, KYU37, KYU38, KYU50, KYU52, KYU87, KYU88, KYU89, KYU106

*C. mytjensii*: 51329

## 제 2절 *E. sakazakii*(*Conobacter* spp.) 용균성 파지의 분리

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 분리원 및 용균성 파지의 분리

*C. sakazakii*의 용균성 파지 분리를 위해 사용된 분리원으로는 돼지 분변 sample, 김치, 오수 등을 이용하였다. *C. sakazakii* ATCC 29544를 Tryptic Soy Agar(TSA) 상에 37°C에서 24시간 배양한 후 단일 집락을 선택하여 Tryptic Soy Broth(TSB)에서 재배양하였다. 그리고 10mM CaCl<sub>2</sub>가 첨가된 Luria-Bertani(LBC) broth에 접종하여 37°C, 200rpm으로 early stationary phase까지 배양 후 배양액에 sample을 첨가하고 동일한 조건으로 18시간 배양하였다. Sample이 첨가된 배양액을 8,000rpm으로 원심분리 하고 상등액을 0.2um filter를 이용하여 제균하여 이것을 bacteriophage 분리에 사용하였다. 제균액을 *C. sakazakii* 배양액과 혼합하고 이를 LBC soft agar에 접종하여 vortex 한 후 LBC agar에 lawn으로 분주하고 37°C에서 24~48시간 동안 배양하면서 plaque 형성을 확인하였다. 형성된 plaque의 형태, size, 혼탁정도 등을 비교하여 서로 다른 plaque morphology를 분리하였다. Plaque를 tooth-picking 하고 SM buffer에 현탁한 후 현탁액을 SM buffer를 이용하여 10진 희석하여 plaque assay를 수행하고 single plaque를 분리하였다. 순수 분리된 용균성 파지의 증식과 농축은 Sambrook 등에 의한 방법에 준하여 수행하였다.

#### 나. 숙주저해범위 분석

순수 분리된 *C. sakazakii*의 용균성 파지를 대상으로 하여 *B. cereus*, *E. coli*O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. cloacae* 등의 식중독 세균과 본 연구팀에서 분리, 동정하여 보유하고 있는 *C. sakazakii*들을 대상으로 host spectrum을 spot assay를 수행하여 확인하였다. 다양한 식중독 세균들은 Tryptic soy broth에서 3회 이상 계대 배양한 후 LBC broth에 접종한 후 0.1mL을 취해 LBC soft agar에 분주하고 LBC agar 위에 증충하였다. 그리고 용균성 파지 용액 10uL를 분주한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 plaque의 형성 여부를 확인하였다.

## 다. 분리 파지의 형태학적 특성

분리된 *C. sakazakii*의 용균성 파지의 형태학적 특성을 분석하기 위해 투과전자현미경을 사용하여 검경하였다. 약 10~11 log PFU/mL 수준으로 농축된 분리된 파지를 2% uranyl acetate를 이용하여 negative stain을 수행한 후 80kV 하에서 투과 전자 현미경을 통해 형태학적 특성을 확인하였다.

## 라. 파지 DNA 추출

농축된 파지용액을 20ug/mL의 DNase와 RNase(Sigma Aldrich, St. Louis, USA)를 처리한 후 약 15분 동안 37°C에서 배양하고 10mg/mL proteinase K(Sigma)와 150ul Lysis buffer(0.5M EDTA, 10% SDS, 1M Tris(pH8.0))을 첨가하였다. 그 후 65°C에서 30분 동안 반응하고 700ul phenol:chloroform:isoamy alcohol(Sigma)을 첨가한 후 10분 동안 17,000g에서 원심분리를 수행하였다. 그리고 상등액을 취해 chloroform:isoamyl alcohol을 첨가하고 동일하게 원심분리를 수행한 후 상등액을 취해 ethanol로 침전하고 수세한 후 증류수로 현탁하고 -80°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 제한 효소의 절단 패턴은 제한효소에 특성에 맞게 실험을 수행하였으며, 실험 후 절단된 DNA의 패턴은 agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였다.

## 마. 분리된 용균성 파지에 대한 genome sequence 분석

분리된 용균성 파지를 대상으로 하여 파지 DNA를 추출한 후 GS-FLX sequencing을 통해 수행하였다. 파지 DNA를 추출한 후 NanoDrop을 통해 OD<sub>260/280</sub>의 비율이 약 1.9, 샘플의 양은 GS FLX Rapid library 제작에 필요한 양(0.5ug)임을 확인하고, 각 tube에서 Library제작에 필요한 양을 취하여 ice-cold Nebulization Buffer를 첨가한 후 혼합하였다. 준비된 DNA 샘플을 Nitrogen Gas와 Aeromist Nebulizer (Roche, Mannheim, GE)를 이용해 물리적인 방법으로 무작위로 절단하였다. 절단된 DNA는 Min-elute PCR purification column (Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 정제하였다. Nebulization에 의해서 형성된 DNA의 End repair를 T4 DNA polymerase, *E.coli* DNA polymerase\_(Klenow fragment) 그리고 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 Phosphorylation 되어진 Blunt End로 만들었다. 반응이 완료된 DNA는 다시 Min-elute PCR purification column(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 정제하였다. Blunt

End로 repair된 DNA에 다음 공정에 필요한 어댑터(Adaptor A, Adaptor B)를 Ligation 시켰다. 반응에 사용되지 않은 Adaptor dimer 및 small fragment 를 제거하기 위해 AMPure Bead를 이용하여 정제한다. 실제로 adaptor A, B가 붙은 fragment만을 detection하기 위해 GS FLX Rapid Library kit에 포함된 standard 시약을 이용하여 Quantitation curve를 그린 후 정량하여 총 양이  $10^9$  molecules 이상이 되는지 확인하고, 1ul의 라이브러리를 BioAnalyzer High Sensitivity chip을 이용하여 라이브러리의 average size 가 600~900bp 인지, 350bp이하의 fragment가 10%미만인지를 확인한다. 구축된 sstDNA Library 동량의 molecule을 섞어 DNA Capture Bead에 1:1로 annealing 시킨 후 Amplification Mix와 혼합하여 Clonally Amplification 을 수행하였다. DNA-carrying Bead와 PCR mixture를 Water-in-oil microreactor에 Emulsify 한 다음 PCR을 수행하여 Template을 Expansion 시켰다. PCR이 완료된 Bead는 Iso-propanol 및 Wash buffer로 Washing하여 Emulsion 상태를 깨 주었고, Centrifuge를 통하여 DNA beads만을 수거한 다음 Enrichment Bead를 이용하여 DNA-carrying Beads만을 골라 내었다. 회수된 DNA beads는 Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter, Florida, USA) 에 의해 정량 하였으며, 한 Region 당 약 2000,000개 Beads를 DNA polymerase와 함께 incubation 시켰다. 그리고 PicoTiterPlate의 well 에 희석된 Enzyme Beads로 1<sup>st</sup>layer를 loading하고 incubation된 DNA bead와 Packing Beads를 함께 혼합하여 2<sup>nd</sup>layerloading을 진행한다. 이후 Enzyme Bead를 한번 더 loading하여 3<sup>rd</sup>layer를 형성시키고 마지막으로 PPIase bead를 loading하여 4<sup>th</sup>layer를 만들어 주어 bead loading을 완료한다. DNA Beads가 Loading 된 PicoTiterPlate를 GS FLX에 장착 시켜 수십만 개의 Picoliter-size Wells에서 전체 Genome에 대한 연속적인 sequencing을 수행하였다.

확인된 phage genome sequence의 분석을 위해 nucleotide sequence는 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), ORF분석은 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>), pl/Mw는 ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)), rho-independent terminators는 (<http://nbc3.biologie.uni-kl.de>), tRNA는 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)를 통해 분석하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. *C. sakazakii*의 용균성 파지의 분리 및 숙주 저해 특성

본 연구를 통해 오수, 김치, 돼지 분변 시료로부터 *C. sakazakii*의 용균성 파지를 분리한 결과 총 12개의 용균성 파지를 분리하였으며, 분리원에 따른 용균성 파지의 plaque morphology는 Table. 5와 같다. Plaque의 형태로는 크게 두가지의 형태로 지름이 약 5mm 정도 크기의 clear한 형태를 나타내는 용균성 파지와 지름이 약 2mm 정도의 작은 크기에 형태를 갖는 파지로 나뉘어 질수 있었으며, 돼지 분변 시료로부터 7주, 김치 시료로부터 3주, 오수 시료로부터 2주를 분리할 수 있었다. 또한 분리한 용균성 파지 12 주들에 대한 숙주 저해 범위를 다양한 *E. coli*, *Salmonell enterica*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. cloacae* 등의 식중독 세균들과 *Cronobacter* spp. 분리주들을 대상으로 하여 수행한 결과는 Table 6과 같다. 그 결과 분리된 용균성 파지들은 다른 식중독 세균에 대해서는 plaque를 형성하지 않았으며, 분리된 *Cronobacter* spp.들에 대한 다양한 숙주 저해 특성을 나타내고 있었으며, 특히 *C. sakazakii*와 유사한 phenotype과 genotype을 갖는 *E. cloacae*에서는 감염이 되지 않았다. EI-I phage는 약 50.4%, ES-I phage는 약 40.3%, ES-II phage는 약 40.3%, ES-III phage는 33.3%, ES2 phage는 약 57.3%, ESS1-2 phage는 약 44.9%, ESS1-3 phage는 약 39.5%, KCES-2 phage는 26.3%, KCES-3 phage는 21.7%, KCES-4 phage는 20.1%, ESP2949-1 phage는 18.6%, ESP2949-2 phage는 19.3%에 *Cronobacter* spp. 분리주들에 대한 숙주 저해 특성을 나타냈다. 또한 분리된 용균성 파지들은 서로 다른 *Cronobacter* spp. 분리주들에 대해 lysis를 유발하는 것으로 확인되었으며, 이러한 특성을 이용하여 용균성 파지들을 cocktail 형식으로 혼합하여 사용하면 *Cronobacter* spp. 분리주들 대부분이 감염이 가능할 것이며, 이러한 특성을 이용하여 *Cronobacter* spp.의 제어에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.



Table. 5. Plaque morphology and sample origin of virulent phage isolates

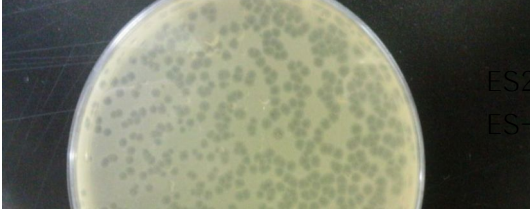
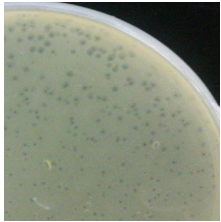
Plaque morphology	Origin		
	Swine feces	Kimchi	sewage
	ES2, ES-I, ESII	ESSI-2, KCES2	ESP 2949-1, ESP 2949-2
	EI-I, ESSI-3	ES-III, KCES3, KCES4	

Table. 6. Host spectrum of virulent *C. sakazakii* phages in *Cronobacter* spp. isolates

	EI-I	ES-I	ES-II	ES-III	ES-2	ESSI-2	ESSI-3	KCES-2	KCES-3	KCES-4	ESP 2949-1	ESP 2949-2
KYU1	X	X	X	X	O	X	X	X	X	X		
KYU2	X	X			O							
KYU3	O				O							
KYU4					O							
KYU5					O			O				
KYU6					O							
KYU7					O							
KYU8												O
KYU9					O			O				
KYU10											O	O
KYU11					O			O				
KYU12											O	O
KYU13	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O		
KYU14					O	O		O	O			O
KYU15	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O		
KYU16	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O		
KTU18											O	
KTU19											O	
KTU20	O				O							
KTU21					O							
KTU22					O							
KTU23											O	
KTU24	O	O	O	O	O	O	O		O	O		

(continued)

	EI-I	ES-I	ES-II	ES-III	ES-2	ESSI-2	ESSI-3	KCES-2	KCES-3	KCES-4	ESP 2949-1	ESP 2949-2
KYU26											0	
KYU27	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
KYU28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU31	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
KYU32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU34	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
KYU35											0	
KYU36												0
KYU37												0
KYU38											0	0
KYU39	0				0	0					0	
KYU40	0				0							
KYU41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU42	0				0			0				
KYU43					0			0				
KYU44					0							
KYU46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU47					0	0		0				
KYU48					0							
KYU49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU50												

(continued)

	EI-I	ES-I	ES-II	ES-III	ES-2	ESSI-2	ESSI-3	KCES-2	KCES-3	KCES-4	ESP 2949-1	ESP 2949-2
KYU51	0		0		0	0						
KYU52												0
KYU53											0	0
KYU54	0				0							
KYU55												
KYU56	0	0	0	0	0	0	0	0				
KYU57											0	0
KYU58	0	0	0	0	0	0	0					
KYU59	0				0		0					
KYU60	0	0	0	0		0	0					
KYU61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU62					0							
KYU64											0	0
KYU66					0							
KYU67					0							
KYU68	0				0							
KYU69	0				0							
KYU70											0	0
KYU71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU72					0							
KYU73	0	0	0	0	0	0	0			0		
KYU74	0	0	0	0	0	0	0			0		
KYU75	0	0	0	0	0	0	0					
KYU76	0	0	0	0	0	0	0					
KYU77	0	0	0	0	0	0	0					

(continued)

	EI-I	ES-I	ES-II	ES-III	ES-2	ESSI-2	ESSI-3	KCES-2	KCES-3	KCES-4	ESP 2949-1	ESP 2949-2
KYU78	0	0	0	0	0	0	0			0		
KYU79											0	0
KYU80											0	0
KYU81											0	0
KYU82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU85					0							
KYU86	0	0	0	0	0	0	0					
KYU88												0
KYU89											0	
KYU90											0	0
KYU91	0				0	0	0				0	
KYU92												0
KYU93	0	0	0	0	0	0	0					
KYU94	0	0	0	0	0	0	0					
KYU95	0	0	0	0	0	0						
KYU96											0	0
KYU97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU98	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
KYU99		0	0	0	0	0	0	0	0			
KYU10	0	0	0	0	0	0	0			0		
2 KYU10												
3												

(continued)

	EI-I	ES-I	ES-II	ES-III	ES-2	ESSI-2	ESSI-3	KCES-2	KCES-3	KCES-4	ESP 2949-1	ESP 2949-2
KYU105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU106											0	0
KYU107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KYU111											0	
KYU112	0	0	0	0		0						0
KYU113	0	0	0	0		0	0					
KYU114											0	0
KYU115											0	0
KYU116											0	0
KYU117											0	0
KYU119	0	0	0	0		0	0					
KYU120	0	0	0	0		0	0					
KYU121	0	0	0	0		0	0					
KYU122	0	0	0	0		0	0					
KYU123											0	0
KYU124	0	0	0	0		0	0					
KYU125	0	0	0	0		0	0					
KYU126	0	0	0	0		0						
KYU127	0				0	0	0					
KYU128	0	0			0	0	0					
KYU129	0	0	0	0	0	0	0					

## 나. 분리 파지의 형태학적 특성

분리된 *C. sakazakii*의 용균성 파지들에 대한 형태학적 특성을 투과 전자현미경을 이용하여 확인한 결과는 Fig. 17과 같다. 분리된 용균성 파지 대부분은 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 확인되었으나, ESSI-3 phage는 *Siphoviridae* family에 속함을 알 수 있었다.



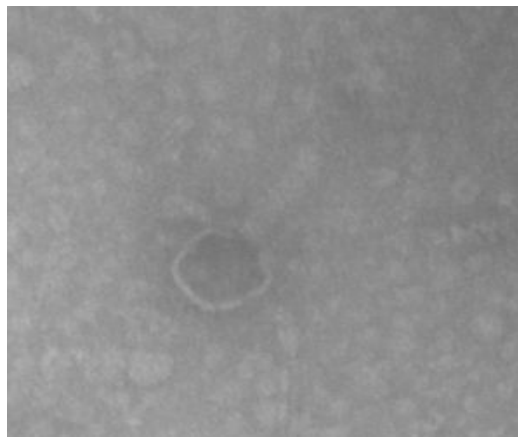
2949-2 phage



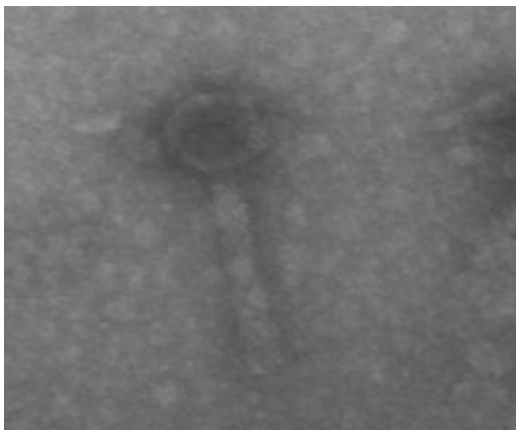
KCES2 phage



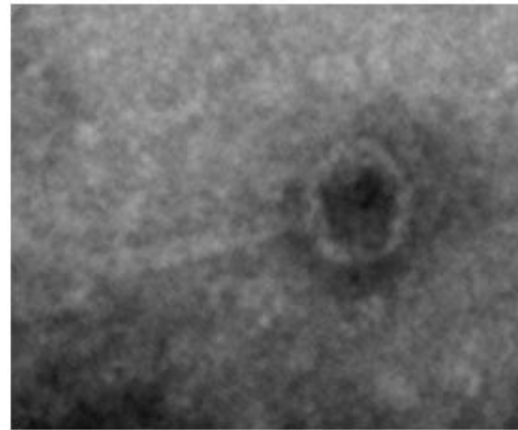
KCES3 phage



KCES4 phage



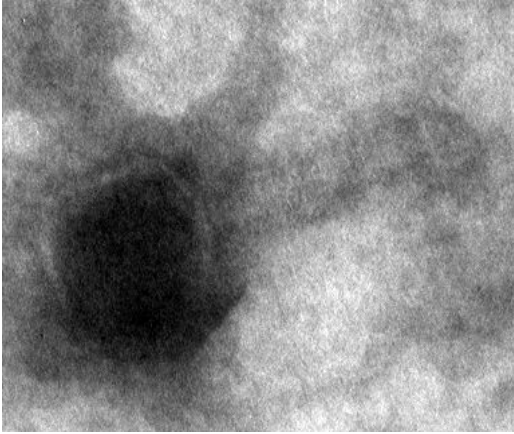
EI-1 phage



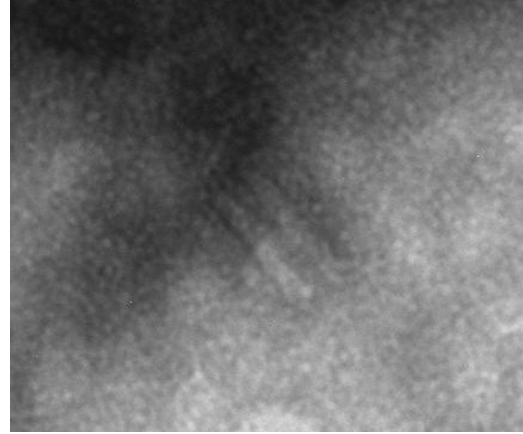
ES2 phage

Fig. 17. Morphology of virulent *C. sakazakii* phages by transmission electron microscopy.





2949-1 phage



ES-I phage



ESS1-3 phage

Fig. 17. Morphology of virulent *C. sakazakii* phages by transmission electron microscopy.

## 다. 파지 DNA 추출

분리한 용균성 파지 들 중 *Cronobacter* spp. 분리주들을 모두 제어가 가능한 숙주 저해 범위를 갖는 용균성 파지인 ES2 phage, EI-I phage, ES-I phage, ESP 2949-1, ESP2949-2, KCES2를 대상으로 하여 DNA를 추출하고 분석하였다(Fig. 18). 용균성 파지의 genomic DNA를 추출하여 전기 영동을 수행한 결과 유사한 크기의 genomic DNA를 가지고 있음을 확인하였다. 하지만 이들은 서로 다른 숙주 저해 특성을 나타내고 있었으며, 분리원들 또한 김치, 오수, 돼지 분변으로 달랐으므로 서로 다른 용균성 파지로 판단된다.

M1 1 2 3 4 5 6 M2

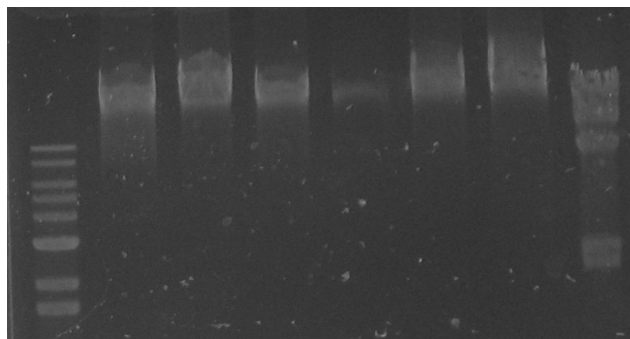


Fig. 18. Agarose gel electrophoresis of DNA isolated from virulent *C. sakazakii* phages.(Lane 1:EI-I phage, Lane 2: ES-I phage, Lane 3: ES2 phage, Lane 4: KCES2 phage, Lane 5: ESP2949-1, Lane 6: ESP2949-2

## 라. 분리된 용균성 파지에 대한 genome sequence 분석

분리된 용균성 파지인 ES2 phage와 ESS1-2 phage의 genomic DNA에 대한 sequence 분석을 수행한 결과, ES2 phage는 22,162 bp의 크기를 갖고 있었으며, 약 50.8%의 G+C contents임을 확인하였으며, 30개의 open reading frame(ORFs)를 보유하고 있었다. 그리고 ESS1-2 phage는 28,765 bp의 크기였으며, 약 55.17% G+C contents 값을 나타내고 있었으며, 36개의 ORFs를 보유하고 있었으며, tRNA는 확인되지 않았다. ES2 phage와 ESS1-2 phage의 ORF의 기능과 genomic map은 Fig. 19, Table 7, 8과 같다. Genomic DNA sequence에 대한 분석한 결과 파지가 가져야 하는 replication/regulation, DNA packaging, structure/morphogenesis, lysis module을 포함하고 있었다. 특히 ESS1-2 phage의 경우는 lysogenic module이 일부 포함되고 있었다. 용균성 파지와 용원성 파지의 중요한 차이점은 lytic cycle만을 갖느냐 lysogenic cycle을 보유하고 있느냐가 가장 큰 차이점이다. 하지만 최근 다양한 연구 보고를 통해 유산균이나 Mycobacteria의 용균성 파지에서 lysogenic module이 포함되고 있다는 보고가 있으며, 이 부분은 용원성 파지와 용균성 파지들 간에 genetic evolution과 연관되어 연구가 진행 중에 있다. 따라서 본 연구에서 확인된 ESS1-2의 genome sequence에 대한 내용을 바탕으로 *C. sakazakii*의 용원성 파지와 용균성 파지에 대한 유전학적 연관 관계에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

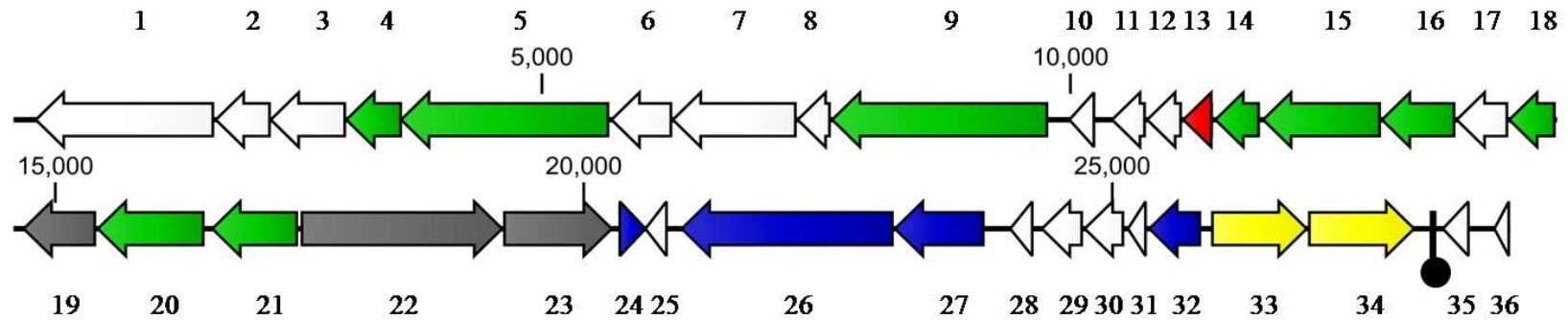


Fig. 19. Schematic representation of the dsDNA genome of the virulent phage ESSI-2. Putative 36 ORFs are presented as arrows, with predicted functions where available. Proposed modules are based on predicted functions.

Green: Structure/Morphogenesis, Red: Lysis, Gray: DNA packaging, Blue: Replication/Regulation, Yellow: Lysogeny, White: hypothetical protein, : rho-independent terminator

Table. 7. Database matches of the predicted ORFs of phage ESSI-2

ORF (strand)	Genome Position	Predicted protein					E-value
		Size (aa)	pI/Mw	Putative function	(Matched Database)	Function in phage	
1 (-)	199 - 1899	567	5.69/61474.61	hypothetical protein	(YP_002411749)		0.0E0
2 (-)	1902 - 2435	182	9.64/19093.09	hypothetical protein	(ZP_06661539)		4e-73
3 (-)		242	6.91/25142.46	hypothetical protein	(ZP_02834466)		5e-82
4 (-)		180	4.34/20049.28	tail fiber assembly	protein (ZP_06123849)	Structure/Morphogenesis	8e-31
5 (-)		661	7.07/70532.59	tail fiber protein	(YP_003613324)	Structure/Morphogenesis	3e-174
6 (-)	5646 - 6233	196	5.29/22324.17	hypothetical protein	(YP_002411744)		1e-91
7 (-)	6226 - 7410	395	5.11/43124.53	hypothetical protein	(YP_002411743)		0.0E0
8 (-)	7407 - 7733	109	4.21/12103.23	hypothetical protein	(YP_151787)		5e-39
9 (-)	7733 - 9790	686	9.15/73158.64	phage tail tape	measure protein (ZP_03213490)	Structure/Morphogenesis	0.0E0
10 (-)		86	5.13/9591.69	hypothetical protein	(YP_151789)		5e-35
11 (-)		111	7.89/11964.22	hypothetical protein	(YP_002041917)		1e-38
12 (-)		114	6.91/12939.09	hypothetical protein	(YP_002411738)		3e-58
13 (-)		98	9.22/10267.93	phage holin	(YP_002147582)	Lysis	2e-32
14 (-)	11359 - 11793	145	4.58/15853.51	tail tube protein	(ZP_06661562)	Structure/Morphogenesis	2e-56
15 (-)	11811 - 12938	376	5.04/40506.58	tail sheath protein	(ZP_02684782)	Structure/Morphogenesis	0.0E0
16 (-)	12935 - 13642	236	11.30/26435.53	phage virion	morphogenesis protein (ZP_05971834)	Structure/Morphogenesis	8e-82
17 (-)	13642 - 14142	167	4.20/18943.99	hypothetical protein	(ZP_06661523)		2e-68
18 (-)	14139 - 14591	151	6.29/16302.26	phage head completion	protein (ZP_06661522)	Structure/Morphogenesis	2e-68
19 (-)	14688 - 15386	233	5.79/26338.61	terminase endonuclease	subunit (YP_002411731)	DNA packaging	3e-93
20 (-)	15390 - 16412	342	5.08/37825.28	phage major capsid	protein (YP_002411730)	Structure/Morphogenesis	3e-167
21 (-)	16473 - 17297	275	5.26/31490.87	capsid scaffolding	protein (YP_002411729)	Structure/Morphogenesis	7e-83
22 (+)	17321 - 19240	640	9.06/73480.78	terminase ATPase subunit	(YP_002411728)	DNA packaging	0.0E0
23 (+)	19237 - 20277	347	5.77/38648.28	phage portal protein	(YP_002411727)	DNA packaging	4e-164
24 (+)	20328 - 20597	90	8.93/9861.19	transcription regulator	(YP_002411726)	Replication/regulation/modification	2E-38
25 (-)	20571 - 20795	75	6.04/8751.42	conserved domain protein	(ZP_03215536)		5e-11

ORF (strand)	Genome Position	Predicted protein					E-value
		Size (aa)	pI/Mw	Putative function	(Matched Database)	Function in phage	
26 (-)	20914 - 22932	673	9.24/76360.92	replication protein A	(YP_003613345)	Replication/regulation/modification	0.0E0
27 (-)	22929 - 23792	288	9.24/31920.14	DNA adenine methylase	(YP_003613347)	Replication/regulation/modification	2e-148
28 (-)		78	5.28/8215.08	hypothetical protein	(ZP_06661512)		1e-26
29 (-)		134	6.18/15006.03	hypothetical protein	(YP_002411720)		2e-48
30 (-)		129	10.36/14407.23	hypothetical protein	(ZP_006641167)		1.1E-32
31 (-)	25136 - 25327	64	11.80/7524.28	hypothetical protein	(ZP_06661509)		4e-13
32 (-)	25338 - 25841	168	6.36/18101.25	regulatory protein CII	(ZP_03215363)	Replication/regulation	2e-65
33 (+)	25935 - 26852	306	8.40/34157.99	CI repressor	(YP_003036979)	Lysogeny	1e-33
34 (+)	26852 - 27868	338	9.33/38396.06	phage integrase	(ZP_03214662)	Lysogeny	3e-178
35 (-)		89	8.79/10705.80	hypothetical protein	(ZP_07380282)		0.15
36 (-)		54	11.10/6670.59	hypothetical protein	(ZP_02347295)		2e-08

Table. 8. Database matches of the predicted ORFs of ES2 phage DNA

ORF <sup>+</sup>	Start <sup>+</sup>	End <sup>+</sup>	Length <sup>+</sup>	BLAST protein <sup>+</sup>		pI/MW <sup>+</sup>	Link <sup>+</sup>	
				Identity <sup>+</sup>	Positives <sup>+</sup>			
1(+)*	156 <sup>+</sup>	440 <sup>+</sup>	285 <sup>+</sup>	45/96 (47%)	59/96 (62%) <sup>+</sup>	4.57 / 10777.06 <sup>+</sup>	emb CBX44566.1	hypothetical protein P88_00550 [ <i>Erwinia</i> phage phiEt88] <sup>+</sup>
2(+)	515 <sup>+</sup>	847 <sup>+</sup>	333 <sup>+</sup>	16/41 (40%)	25/41 (61%) <sup>+</sup>	8.86 / 12842.10 <sup>+</sup>	ref ZP_02036906.1	hypothetical protein BACCAP_02517 [ <i>Bacteroides capillosus</i> ] <sup>+</sup>
3(+)	840 <sup>+</sup>	1451 <sup>+</sup>	612 <sup>+</sup>	179/203 (89%)	190/203 (94%) <sup>+</sup>	9.88 / 24059.46 <sup>+</sup>	ref ZP_07150767.1	bacteriophage Lambda NinG protein [ <i>Escherichia coli</i> MS 21-1] <sup>+</sup>
4(+)	1448 <sup>+</sup>	1705 <sup>+</sup>	258 <sup>+</sup>	84/85 (99%)	85/85 (100%) <sup>+</sup>	8.98 / 9333.86 <sup>+</sup>	ref YP_001438820.1	hypothetical protein ESA_02752 [ <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] <sup>+</sup>
5(+)	1878 <sup>+</sup>	2642 <sup>+</sup>	765 <sup>+</sup>	250/254 (99%)	252/254 (99%) <sup>+</sup>	8.71 / 27871.06 <sup>+</sup>	ref YP_003209524.1	antitermination protein q homolog from lambdoid prophage qin[ <i>Cronobacter turicensis</i> z3032] <sup>+</sup>
6(+)	3421 <sup>+</sup>	3711 <sup>+</sup>	291 <sup>+</sup>	92/96 (96%)	94/96 (98%) <sup>+</sup>	8.01 / 10977.53 <sup>+</sup>	ref YP_001439128.1	hypothetical protein ESA_03063 [ <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] <sup>+</sup>
7(+)	3720 <sup>+</sup>	4214 <sup>+</sup>	495 <sup>+</sup>	99/156 (64%)	120/156 (77%) <sup>+</sup>	9.37 / 17955.81 <sup>+</sup>	ref YP_003211789.1	lysozyme from lambdoid prophage dlp12 [ <i>Cronobacter turicensis</i> z3032] <sup>+</sup>
8(+)	4204 <sup>+</sup>	4695 <sup>+</sup>	492 <sup>+</sup>	79/144 (55%)	101/144 (71%) <sup>+</sup>	8.73 / 18099.53 <sup>+</sup>	ref YP_003613691.1	bacteriophage lysis protein [ <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047] <sup>+</sup>
9(+)	4664 <sup>+</sup>	5161 <sup>+</sup>	498 <sup>+</sup>	54/134 (41%)	70/134 (53%) <sup>+</sup>	9.90 / 18859.56 <sup>+</sup>	ref YP_001006557.1	hypothetical protein YE2335 [ <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081] <sup>+</sup>
10(+)	5570 <sup>+</sup>	6271 <sup>+</sup>	702 <sup>+</sup>	123/217 (57%)	153/217 (71%) <sup>+</sup>	5.91 / 26018.68 <sup>+</sup>	ref YP_003467977.1	putative DNA-binding protein (Roi) [ <i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004] <sup>+</sup>
11(-)	6342 <sup>+</sup>	6776 <sup>+</sup>	435 <sup>+</sup>	16/56 (29%)	29/56 (52%) <sup>+</sup>	5.50 / 16316.63 <sup>+</sup>	ref ZP_02906461.1	transcriptional regulator, LysR family [ <i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5] <sup>+</sup>
12(+)	6797 <sup>+</sup>	7354 <sup>+</sup>	558 <sup>+</sup>	137/190 (73%)	154/190 (82%) <sup>+</sup>	5.21 / 20833.78 <sup>+</sup>	emb CBK86240.1	Phage terminase, small subunit [ <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> NCTC 9394] <sup>+</sup>
13(+)	7305 <sup>+</sup>	8825 <sup>+</sup>	1521 <sup>+</sup>	114/258 (45%)	153/258 (60%) <sup>+</sup>	7.81 / 57039.30 <sup>+</sup>	ref YP_002128452.1	large subunit terminase TerL [Iodobacteriophage phiIPE] <sup>+</sup>
14(+)	9214 <sup>+</sup>	10554 <sup>+</sup>	1341 <sup>+</sup>	138/436 (32%)	216/436 (50%) <sup>+</sup>	4.82 / 49677.23 <sup>+</sup>	ref YP_001742041.1	putative portal protein [ <i>Salmonella</i> phage E1] <sup>+</sup>
15(+)	10499 <sup>+</sup>	12271 <sup>+</sup>	1773 <sup>+</sup>	97/228 (43%)	144/228 (64%) <sup>+</sup>	6.77 / 65528.77 <sup>+</sup>	ref ZP_05968212.2	head morphogenesis protein, SPP1 gp7 family [ <i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316] <sup>+</sup>
16(+)	12288 <sup>+</sup>	13562 <sup>+</sup>	1275 <sup>+</sup>	342/418 (82%)	380/418 (91%) <sup>+</sup>	5.07 / 45652.77 <sup>+</sup>	ref YP_003611839.1	hypothetical protein [ <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047] <sup>+</sup>
17(+)	13562 <sup>+</sup>	14014 <sup>+</sup>	453 <sup>+</sup>	110/150 (74%)	125/150 (84%) <sup>+</sup>	4.93 / 15754.53 <sup>+</sup>	ref YP_224146.1	putative decoration protein [ <i>Enterobacteria</i> phage ES18] <sup>+</sup>
18(+)	14029 <sup>+</sup>	15126 <sup>+</sup>	1098 <sup>+</sup>	127/356 (36%)	176/356 (50%) <sup>+</sup>	5.89 / 39692.86 <sup>+</sup>	ref ZP_07544697.1	phage coat protein [ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 13str. N273] <sup>+</sup>
19(+)	15137 <sup>+</sup>	15433 <sup>+</sup>	297 <sup>+</sup>	60/95 (64%)	79/95 (84%) <sup>+</sup>	5.91 / 10709.19 <sup>+</sup>	ref YP_003611842.1	hypothetical protein [ <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047] <sup>+</sup>
20(+)	15445 <sup>+</sup>	15894 <sup>+</sup>	450 <sup>+</sup>	115/133 (87%)	120/133 (91%) <sup>+</sup>	6.54 / 16089.56 <sup>+</sup>	ref ZP_04655850.1	hypothetical protein SentesTe_12906 [ <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Tennessee str. CDC07-0191] <sup>+</sup>
21(+)	16067 <sup>+</sup>	16417 <sup>+</sup>	351 <sup>+</sup>	80/116 (69%)	94/116 (82%) <sup>+</sup>	4.13 / 12782.16 <sup>+</sup>	ref ZP_05729347.1	conserved hypothetical protein [ <i>Pantoea</i> sp. At-9b] <sup>+</sup>
22(+)	16420 <sup>+</sup>	16791 <sup>+</sup>	372 <sup>+</sup>	99/123 (81%)	116/123 (95%) <sup>+</sup>	7.93 / 40409.74 <sup>+</sup>	ref YP_001439107.1	hypothetical protein ESA_03042 [ <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] <sup>+</sup>



ORF <sup>Ⓢ</sup>	Start <sup>Ⓢ</sup>	End <sup>Ⓢ</sup>	Length <sup>Ⓢ</sup>	BLAST protein <sup>Ⓢ</sup>		pI/MW <sup>Ⓢ</sup>	Link <sup>Ⓢ</sup>	
				Identity <sup>Ⓢ</sup>	Positives <sup>Ⓢ</sup>			
23(+)	16788 <sup>Ⓢ</sup>	17171 <sup>Ⓢ</sup>	384 <sup>Ⓢ</sup>	96/119 (81%)	107/119 (90%) <sup>Ⓢ</sup>	5.61 / 14002.93 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_003209544.1	hypothetical protein Ctu_11810 [ <i>Cronobacter turicensis</i> z3032] <sup>Ⓢ</sup>
24(+)	17273 <sup>Ⓢ</sup>	17815 <sup>Ⓢ</sup>	543 <sup>Ⓢ</sup>	75/174 (44%)	95/174 (55%) <sup>Ⓢ</sup>	9.53 / 20460.96 <sup>Ⓢ</sup>	ref ZP_06663130.1	endonuclease [ <i>Escherichia coli</i> B088] <sup>Ⓢ</sup>
25(+)	17882 <sup>Ⓢ</sup>	18625 <sup>Ⓢ</sup>	744 <sup>Ⓢ</sup>	74/157 (48%)	99/157 (64%) <sup>Ⓢ</sup>	4.44 / 26066.84 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_001742066.1	major tail subunit [ <i>Salmonella</i> phage E1] <sup>Ⓢ</sup>
26(+)	18677 <sup>Ⓢ</sup>	19351 <sup>Ⓢ</sup>	675 <sup>Ⓢ</sup>	213/219 (98%)	218/219 (99%) <sup>Ⓢ</sup>	6.60 / 24991.50 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_003209548.1	hypothetical protein Ctu_11850 [ <i>Cronobacter turicensis</i> z3032] <sup>Ⓢ</sup>
27(-)	19373 <sup>Ⓢ</sup>	19786 <sup>Ⓢ</sup>	414 <sup>Ⓢ</sup>	31/97 (32%)	44/97 (46%) <sup>Ⓢ</sup>	5.60 / 15197.25 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_001820651.1	hypothetical protein Oter_3776 [ <i>Qpinitus terrae</i> PB90-1] <sup>Ⓢ</sup>
28(-)	19789 <sup>Ⓢ</sup>	20022 <sup>Ⓢ</sup>	234 <sup>Ⓢ</sup>	39/83 (47%)	55/83 (67%) <sup>Ⓢ</sup>	9.10 / 9028.34 <sup>Ⓢ</sup>	ref ZP_03827087.1	regulatory protein <i>Mat</i> [ <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> PBR1692] <sup>Ⓢ</sup>
29(+)	20343 <sup>Ⓢ</sup>	21188 <sup>Ⓢ</sup>	846 <sup>Ⓢ</sup>	177/264 (68%)	198/264 (75%) <sup>Ⓢ</sup>	7.05 / 32158.16 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_002392175.1	Antirepressor protein ant [ <i>Escherichia coli</i> S88] <sup>Ⓢ</sup>
30(+)	21308 <sup>Ⓢ</sup>	21664 <sup>Ⓢ</sup>	357 <sup>Ⓢ</sup>	108/118 (92%)	113/118 (96%) <sup>Ⓢ</sup>	8.93 / 12663.59 <sup>Ⓢ</sup>	ref YP_001908340.1	hypothetical protein ETA_24170 [ <i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99] <sup>Ⓢ</sup>

### 제 3 절. *E. sakazakii*(*Cronobacter* spp.) 용균성 파지를 이용한 식품 적용

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 분리된 파지를 이용한 *C. sakazakii*의 생육 억제

분리된 용균성 파지를 사용하여 *C. sakazakii*와 분리주를 선발하여 각각 LBC broth에서 대수증식기까지 배양하였다. 배양 후 50mL의 LBC broth에 각각 접종하고 MOI가 약 0.1, 0.001 수준으로 파지를 각각 접종한 후 시간에 따라 생육 정도를 흡광도를 측정하여 확인하였다.

##### 나. Bacteriophage를 이용한 식품 중 *C. sakazakii*의 저감화

실제 식품에 오염되어 있을 경우에 생육 억제 효과를 확인하기 위해 시판하는 오염 가능성이 높은 비가열 채소 주스와 가장 문제가 많이 되는 조제분유 중 *C. sakazakii*가 검출되지 않은 분유를 이용하여 조제한 후 실험에 사용하였다. 조제분유와 채소 주스 시료에 *C. sakazakii*를 약 4 log CFU/mL 수준으로 각각 접종한 후 파지를 접종한 후 37°C에서 배양하면서 시간에 따른 생균수를 10진 희석법에 따라 DFI agar에 각각 도말한 후 24시간 이후에 개수하였다.

##### 다. 분리된 용균성 파지를 이용한 biofilm의 제어

최근 bacteriophage를 이용하여 biofilm을 제어하는 연구가 활발하게 진행 중에 있으며, 몇몇 논문 등을 통해 bacteriophage를 이용하여 효과적으로 biofilm을 제거할 수 있다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서는 분리된 bacteriophage를 이용하여 *C. sakazakii*가 생성하는 biofilm을 제어하고자 하였다. *C. sakazakii*가 biofilm을 형성시키기 위해 분리된 *Cronobacter* spp.들은 건조 조건에 노출하였으며, 그 중 biofilm 생성능이 높은 균을 대상으로 실험을 수행하였다. Biofilm이 형성된 후

분리한 용균성 파지를 접종하여 biofilm의 감소 효과를 확인하였다.

#### 라. *Bifidobacterium*, 유산균과 용균성 파지를 이용한 *C. sakazakii*의 제어

본 연구를 통해 분리한 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides* LAB kw5, *Sterptococcus thermophilus* LAB kw15와 *Bifidobacterium* BF8와 *Bifidobacterium* BF2-29를 *Cronobacter* spp.의 감소 효과를 확인하고자 하였다. MRS broth에 0.05% L-cystein이 첨가된 배지에 유산균을 접종한 후 3회 계대 배양하여 활성화 시키고 실험에 사용하였다. *Bifidobacterium*와 젖산균 배양액을 10,000g에서 10분동안 원심분리 후 상등액을 취해 pH 7.0으로 조정 한 후 0.22 um membrane filter를 이용하여 제균한 제균액과 pH 7.0으로 조정하지 않은 상등액을 제균하여 이를 희석하여 microplate에 접종한 후 분리한 용균성 파지를 약 6 PFU/mL 수준으로 첨가하고 시간에 따른 *C. sakazakii*의 생육 억제 정도를 확인하였으며, 이 때의 *C. sakazakii*의 생육 정도를 DFI agar에 10진 희석하여 도말한 후 37°C에 배양하고 집락을 개수하였다. 또한 조제 분유에 적용하여 *Bifidobacterium*의 상등액을 이용해 조제 분유를 혼합하고 마찬가지로 분리된 용균성 파지를 약 6 PFU/mL 수준으로 접종한 뒤 시간에 따른 생육 정도를 DFI agar에 10진 희석하여 도말한 후 개수하였다.

#### 마. *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperae phage의 분리 및 특성 분석

본 연구를 통해 분리된 *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperate phage를 분리하고 그 특성을 비교 분석하였다. 현재 보고된 *C. sakazakii*의 whole genome sequence에 의하면 *C. sakazakii*의 genome안에는 약 4종류의 prophage가 존재하는 것으로 보고되고 있다. 그 만큼 prophage는 *C. sakazakii*의 다양한 특성에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 일반적으로 prophage의 형태에서 temperate phage 유도되어 나와서 lytic cycle로 진행되기 위해서는 다양한 외부 환경스트레스에 기인하는 것으로 알려져 있다. 보통 temperate phage를 유도하기 위해서 사용되는 것은 대표적으로 UV 조사와 mitomycin C가 대표적이며 이외에도 열충격 등에 의해

서도 유도되어 나오는 것으로 알려져 있다. *Cronobacter* spp.가 오염되어 있는 조제 분유의 제조를 위한 가공 고정은 여러 가지 곡물, 야채, 과일 등의 raw material 들을 wet blend를 하고 열처리 공정 후 건조 공정을 거쳐 raw materials 들 중 dry blend한 제품과 섞어서 제조 하는 것이 일반적인 공정이고, 이 후에 소비자에게 판매되어 영유아에게 조제되어 섭취되게 된다. 하지만 건조 내성 등의 외부 스트레스에 강한 *Cronobacter* spp.는 오염도 또한 다양한 보고에 따르면 4~14% 수준으로 알려져 있어 영유아식인 조제 분유는 상당한 위험을 내포하고 있으며, 감염시 사망까지 유발하는 치명적인 위험이 있다. 하지만 오염도와 위험성에 비해 실제 사고 사례는 비교적 적은 편인데 이에 대한 원인을 *Cronobacter* spp.의 prophage로부터 유도되어 나오는 temperate phage가 lytic cycle을 하면서 *Cronobacter* spp.가 lysis가 되어 자체적으로 감소되었을 가능성이 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 분리된 *C. sakazakii* KYU90의 temperate phage를 열충격을 통해 분리하고 특성을 확인하고자 하였다.

본 연구에서 분리된 *C. sakazakii* KYU90을 LB broth에 접종한 뒤 37℃에서 200rpm으로 대수증식기까지 배양한 후 LBC broth에 접종하고 동일한 조건으로 배양하여 실험에 사용하였다. *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperate phage를 분리하기 위해 사용된 방법은 전통적으로 많이 사용되고 있는 mitomycin C와 다른 외부 스트레스로 열충격을 이용하여 수행하였다. 배양된 *C. sakazakii* KYU90에 흡광도 0.3~0.4 수준까지 배양한 후 mitomycin C를 첨가하고 재배양하면서 흡광도의 감소를 확인하였으며, 열충격의 경우 60℃에서 30분간 노출한 후 다시 37℃에서 재배양하면서 마찬가지로 흡광도의 감소를 측정하였다. 그리고 흡광도의 감소를 확인한 후 원심분리 후 10,000g에서 10분 동안 원심분리를 수행하고 0.22um membrane filter를 이용해 제균한 후 phage lysate로 사용하였으며, 유도되어 나온 phage의 확인을 위해 indicator strain으로 *C. sakazakii* ATCC29544를 사용하여 spot assay를 수행하고 plaque의 생성여부를 확인하였다.

Phage lysate를 이용하여 투과전자현미경을 이용한 형태학적인 특성을 확인하였고, 실험 방법은 용균성 파지에서의 방법과 동일하게 수행하였다. 또한 약 9~10 PFU/mL 수준의 phage lysate를 *C. sakazakii* ATCC29544에 첨가해서 생육 저해 효과를 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 방법은 용균성 파지에서의 방법과 동일하게 진행하였다. 그리고 조제 분유에 *C. sakazakii* ATCC29544를 오염시킨 후 여기에

mitomicin C와 열충격으로 유도된 temperate phage를 각각 첨가하여 *C. sakazakii*의 생육 억제 정도를 시간에 따라 DFI agar에 10진 희석하여 도말한 후 배양하고 집락을 개수해서 확인하였다.

열충격으로 *C. sakazakii* KYU90으로부터 분리된 temperate phage ENT90의 genome sequence를 분석하였으며, 방법은 용균성 파지의 genome sequence와 마찬가지로 GS-FLX sequencing을 수행하였으며, genome sequence의 분석도 용균성 파지의 분석에 사용된 software를 사용하여 수행하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 분리된 파지를 이용한 *C. sakazakii*의 생육 억제

분리된 용균성 파지들 중 *Cronobacter* spp. 분리주 들에 대한 숙주 저해를 대부분 가능하도록 하게하는 EI-1 phage, ES-1 phage, ES2 phage, KCES2 phage, ESP2949-1 phage, ESP2949-2 phage 들을 대상으로하여 *C. sakazakii*에 대한 생육 억제 특성을 MOI에 따라 확인한 결과는 Fig. 20, 21과 같다. MOI가 0.1과 0.001일 때의 6주의 용균성 파지들 모두 *C. sakazakii*의 초기 흡광도 값에서 5시간 이후에는 크게 변화하지 않는 것으로 나타나 생육 억제 효과가 우수한 것으로 나타났다. 용균성 파지를 첨가하지 않았을 경우에는 5시간 이후에 흡광도 값이 약 0.9 수준까지 증가하였다. 또한 분리된 용균성 파지들을 MOI가 약 0.1이 되도록 하여 LBC broth에 접종하고 생육 정도를 DFI agar에 도말하여 확인한 결과는 Fig. 22와 같다. 용균성 파지를 접종하지 않은 경우 초기 약 4 log CFU/mL에서 8시간 이후에는 약 8 log CFU/mL 수준으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 용균성 파지를 접종했을 때는 ES2와 ES-1 phage의 경우는 초기 균수를 유지하는 것으로 나타났으며, 나머지 용균성 파지의 경우는 6시간 이후에는 *C. sakazakii*가 검출되지 않았다. 따라서 이들 용균성 파지들을 이용하여 식품에 적용하여 다양한 *C. sakazakii*에 대한 제어가 가능할 것으로 판단된다.

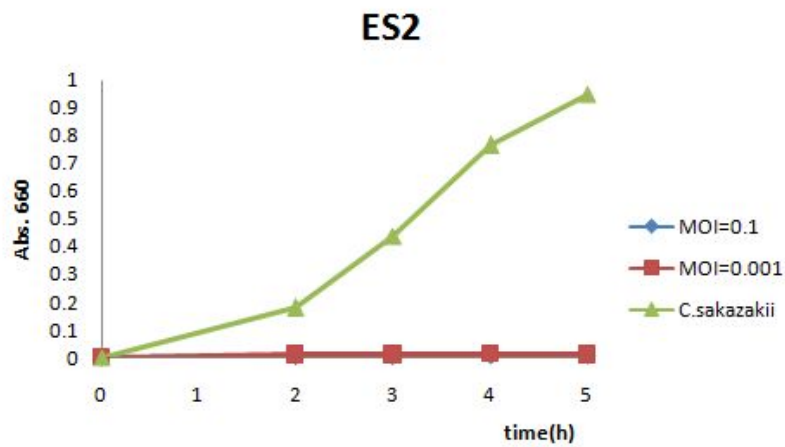
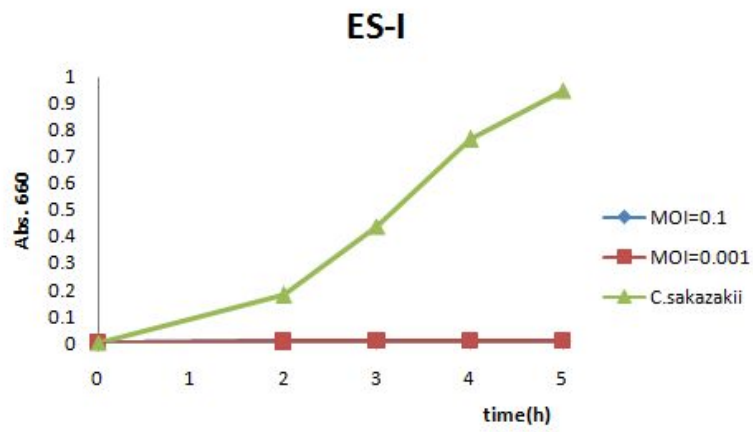
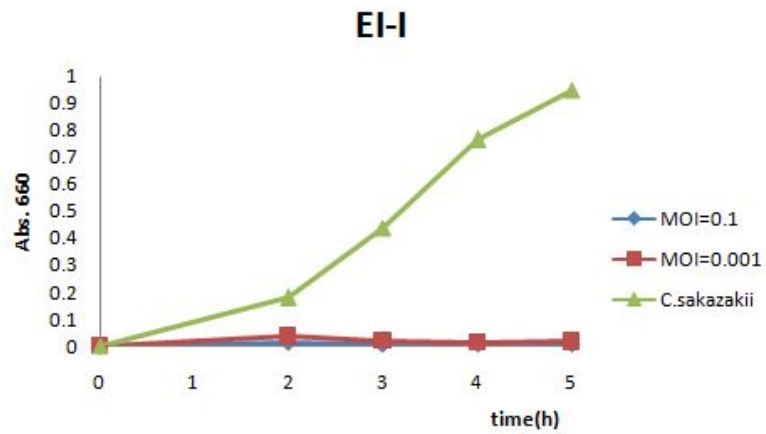


Fig. 20. Growth inhibition of *C. sakazakii* ATCC29544 by virulent phages

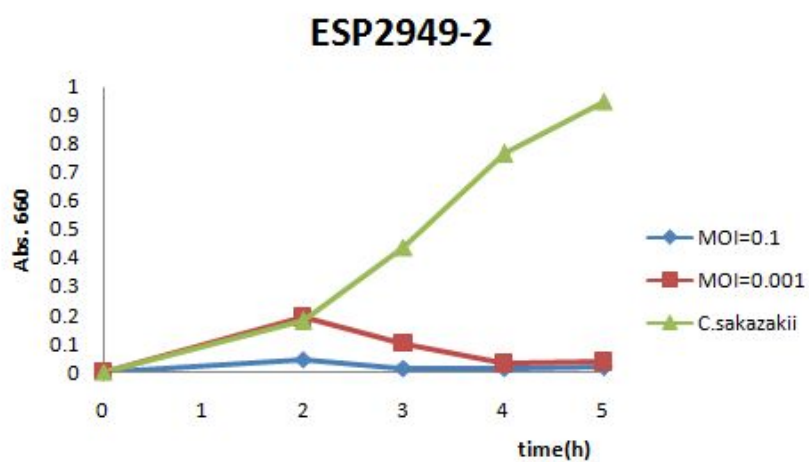
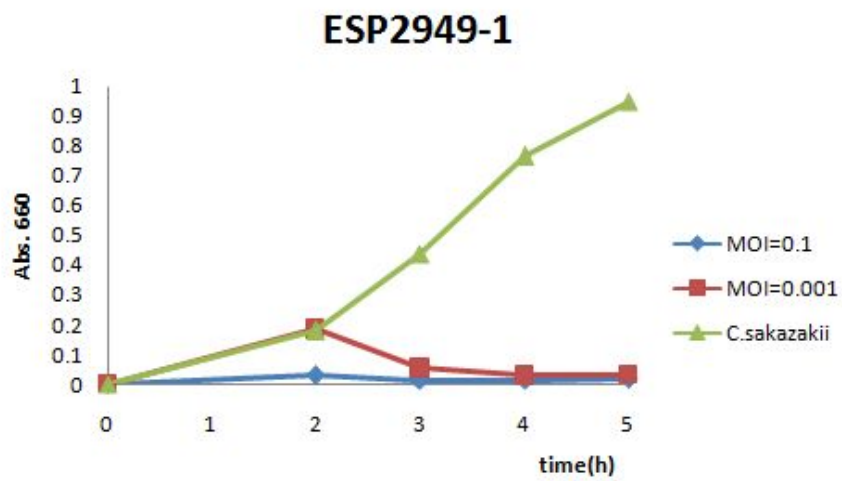
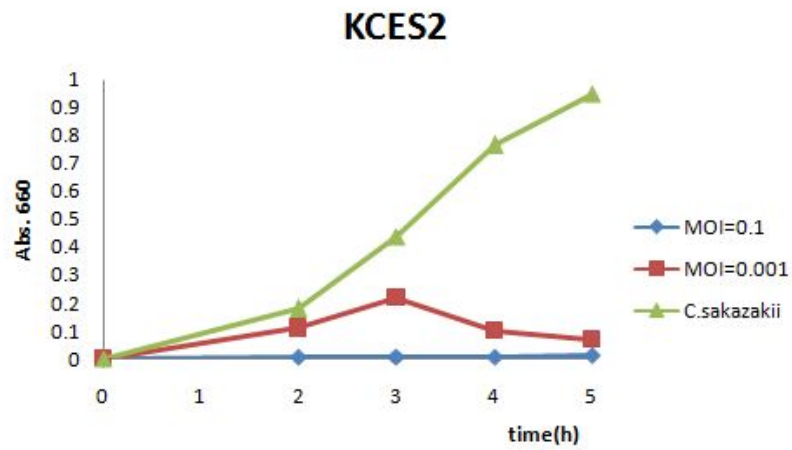


Fig. 21. Growth inhibition of *C. sakazakii* ATCC29544 by virulent phages



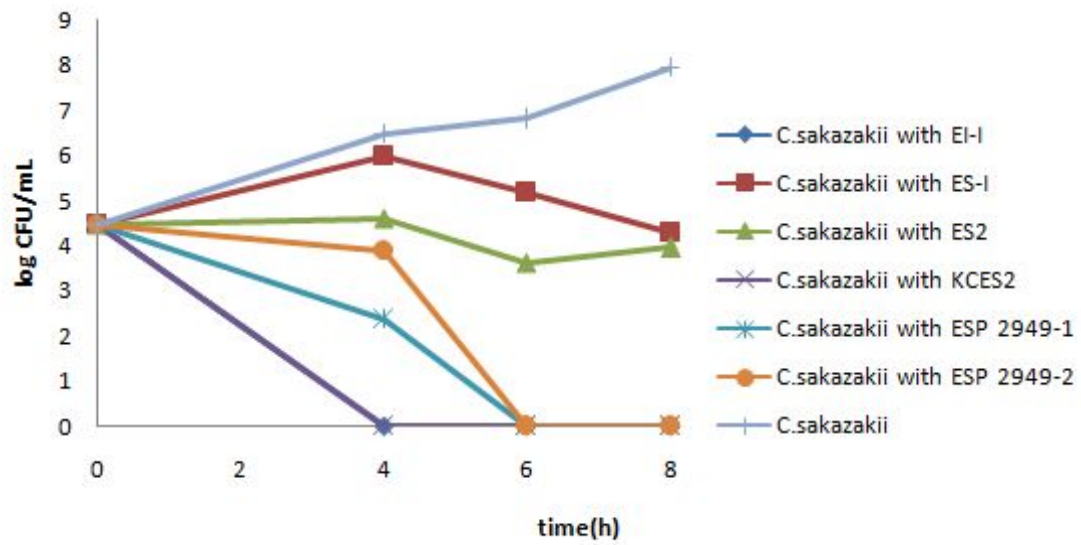


Fig. 22. Survival of *C. sakazakii* ATCC29544 by virulent phages in LBC broth

#### 나. Bacteriophage를 이용한 식품 중 *C. sakazkai*의 저감화

분리된 용균성 파지 6주를 이용하여 식품에 오염되었을 때의 제어 효과를 확인한 결과는 Fig. 23~26와 같다. 분리된 용균성 파지 6종은 본 연구에 확인된 *Cronobacter* spp.의 대부분을 감염할 수 있기 때문에 이들 각각의 용균성 파지를 섞어 cocktail 형태로 만든 후 실제 *Cronobacter* spp. 분리주를 이용해 식품에 적용하여 감소 효과를 확인하였다. 사용된 *Cronobacter* spp. 분리주들은 용균성 파지들의 저해 범위가 많은 것부터 적은 것 까지 선별하여 수행하였다. 그 결과 대체적으로 초기 균수들을 유지하거나 감소효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 하지만 앞선 실험에서는 순수 배양된 *C. sakazakii*가 LBC broth에서는 6시간 이후에 *C. sakazakii*의 생육이 확인되지 않았지만, 실제 조제 분유에 적용하여 수행했을 때는 그렇지 못하였다. 이는 분유에 다양한 식품의 구성성분이 존재하고 있기 때문에, 용균성 파지가 세포 표면에 부착을 방해하거나 숙주 내에서 replication의 억제, 조제 분유 자체에 오염되어 있는 일반 세균 등에 의한 것으로 판단된다. 따라서 보다 완벽한 제어를 위해서는 조제 분유에 존재하는 여러 가지 성분에 의해 용균성 파지가 제대로 증식을 하지 못하는 구성물을 조절해서 *C. sakazakii*를 온전히 제어를 해야 할 것으로 보인다.

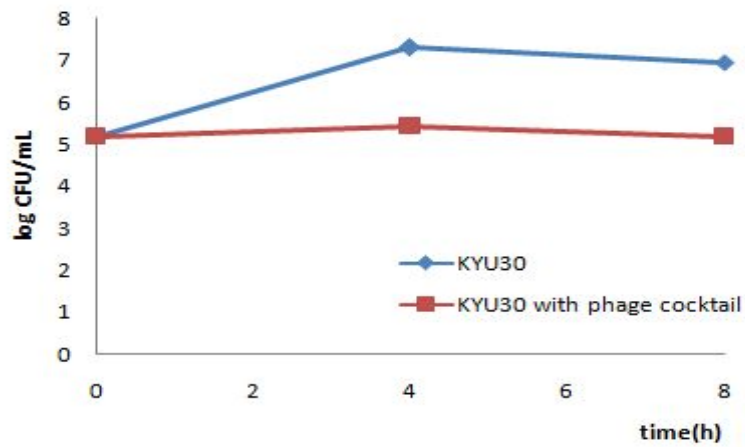
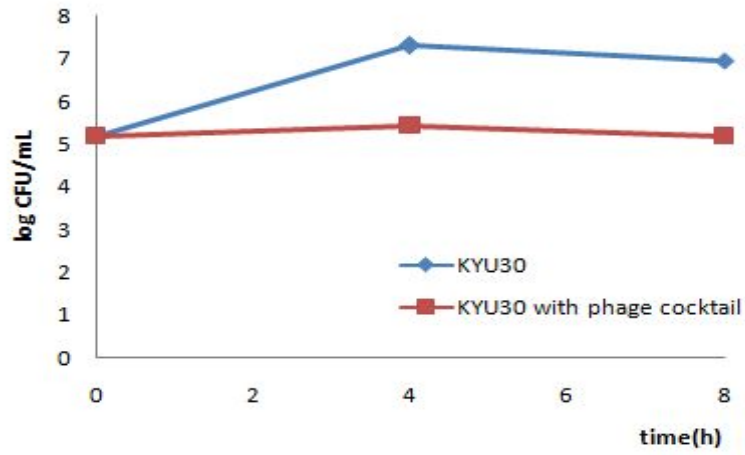
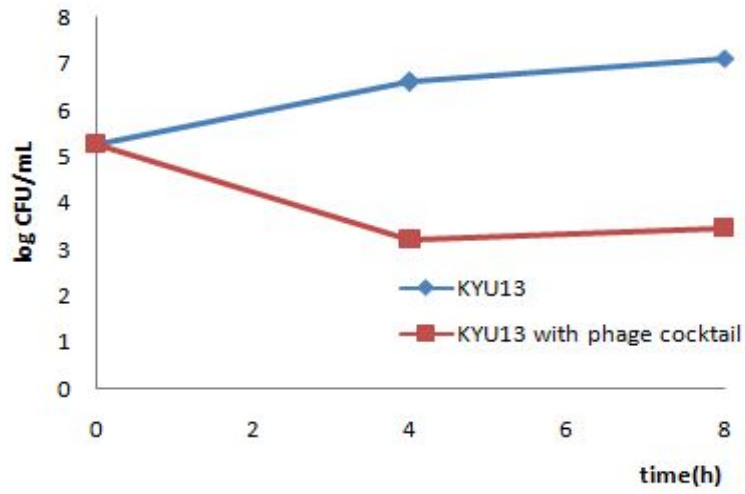


Fig. 23. Growth inhibition of *Cronobacter* spp. isolates by phage cocktail in infant milk formula.

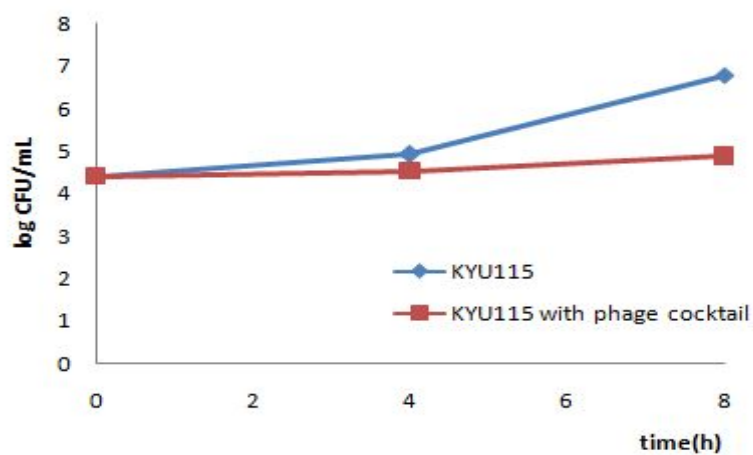
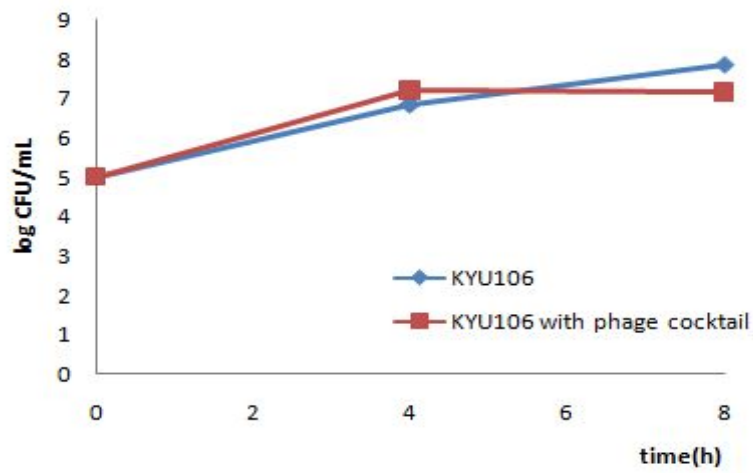
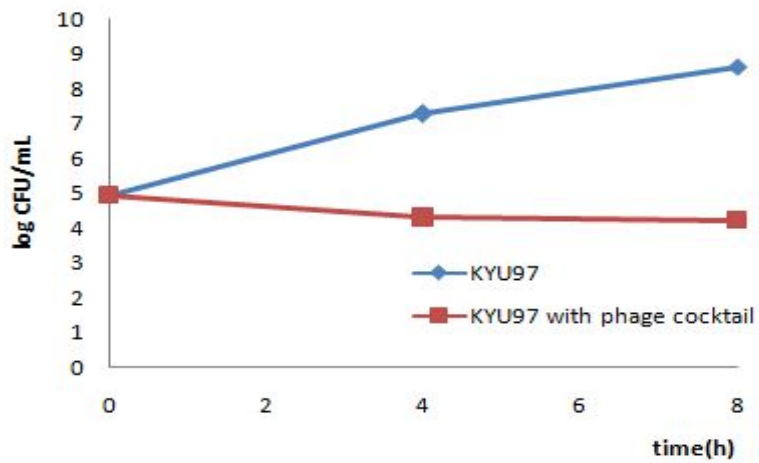


Fig. 24. Growth inhibition of *Cronobacter* spp. isolates by phage cocktail in infant milk formula.

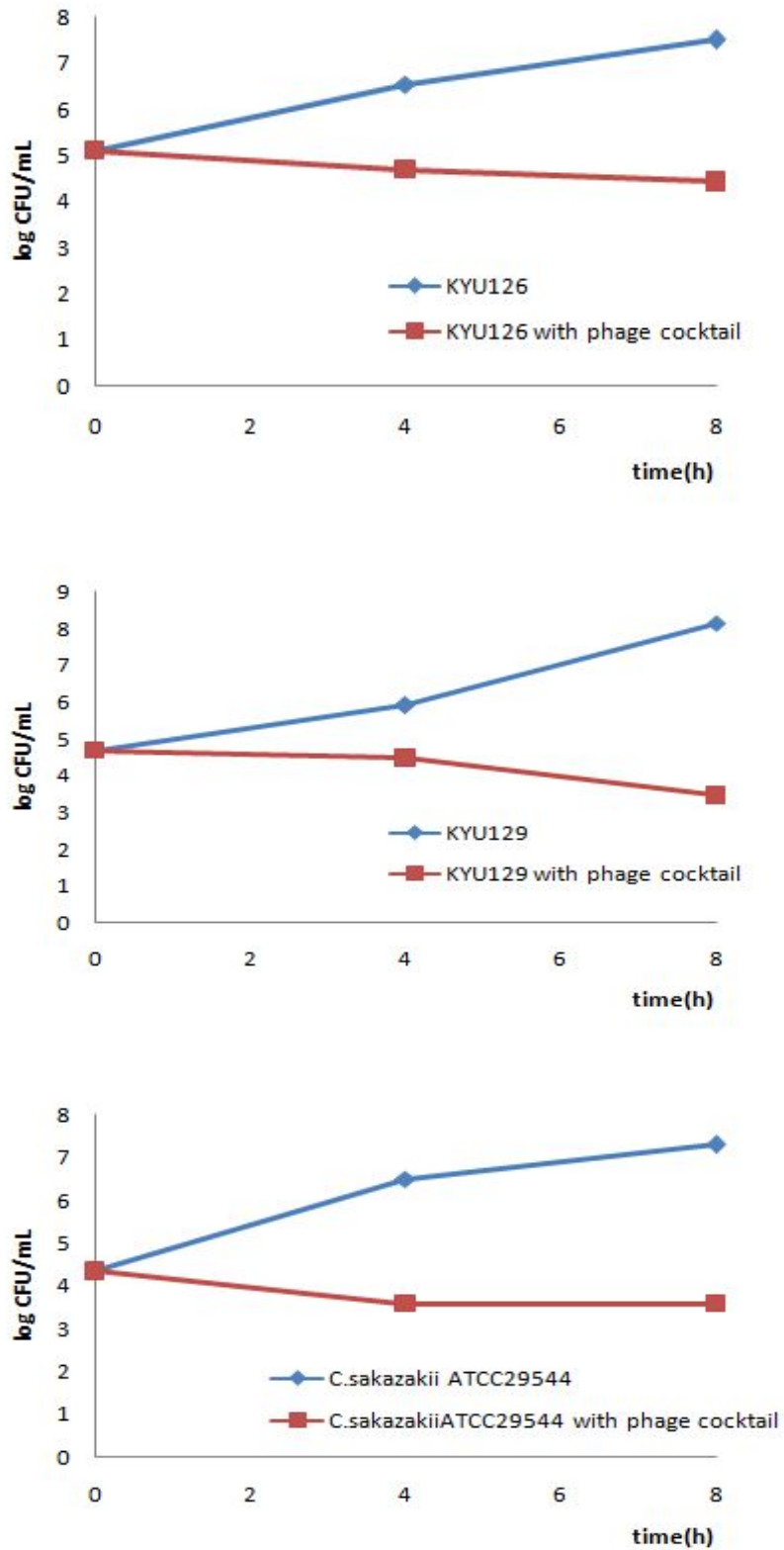


Fig. 25. Growth inhibition of *Cronobacter* spp. isolates by phage cocktail in infant milk formula.

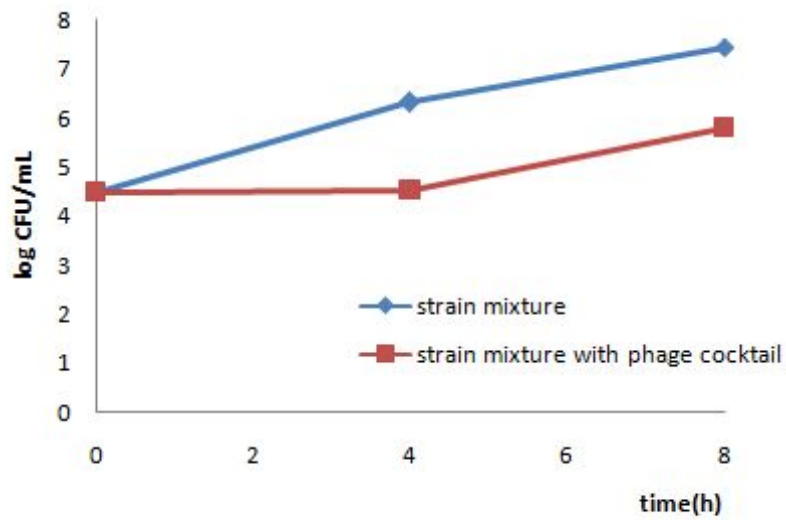


Fig. 26. Growth inhibition of *Cronobacter* spp. isolates by phage cocktail in infant milk formula.

#### 다. Bacteriophage를 이용한 biofilm의 제거 효과

본 연구를 통해 분리된 *Cronobacter* spp. 들을 대상으로 하여 biofilm의 생성능이 높은 분리주들을 대상으로 하여 microplate assay법을 수행해 확인하였다(Fig. 27, 28). 그 결과 *Cronobacter* spp. 분리주들은 다양한 양상으로 biofilm을 생성하는 것으로 확인되었다. 그 중 biofilm 생성능이 상대적으로 높은 KYU13, KYU25, KYU26, KYU27, KYU28, KYU29, KYU30, KYU31, KYU48, KYU90, KYU97, KYU99, KYU102, KYU105, KYU106, KYU107, KYU111, KYU115, KYU118, KYU120, KYU126, KYU127, KYU128, KYU129을 대상으로하여 분리된 용균성 파지인 T4 phage, ES-1 phage, ES2 phage, KCES2 phage를 접종하여 시간에 따른 biofilm의 감소 정도를 확인한 결과는 Fig. 29~32와 같다. 그 결과 *Cronobacter* spp. 분리주들이 형성한 biofilm을 분리된 용균성 파지들을 접종함으로써 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 기존에 다른 연구 보고에서 용균성 파지를 첨가하여 biofilm을 제거하는 효과를 확인한 결과와 유사한 결과를 확인하여, 본 연구에서 분리된 용균성 파지를 이용해 biofilm을 제어하는 데 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

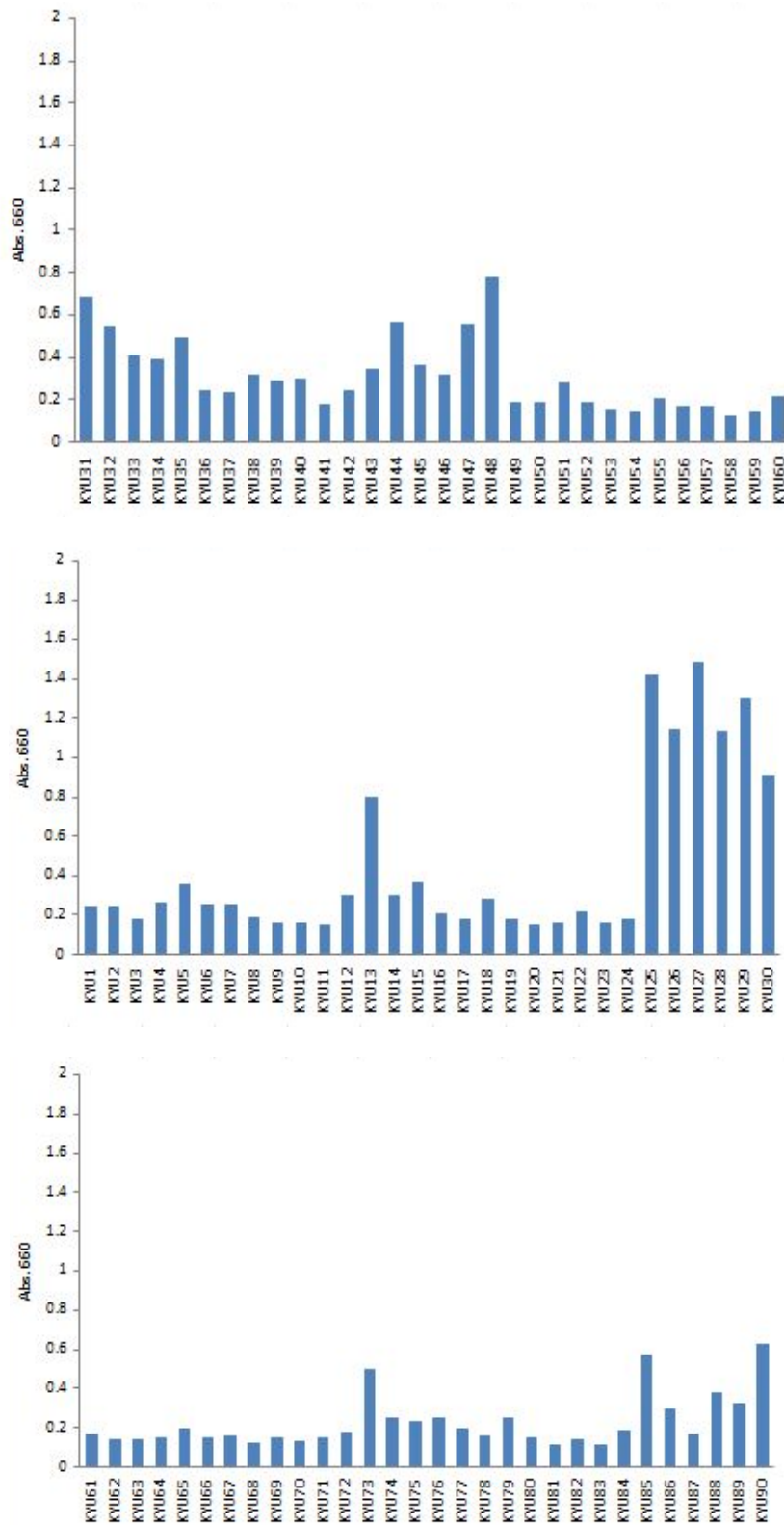


Fig. 27. Biofilm formation of *Cronobacter* spp. isolates



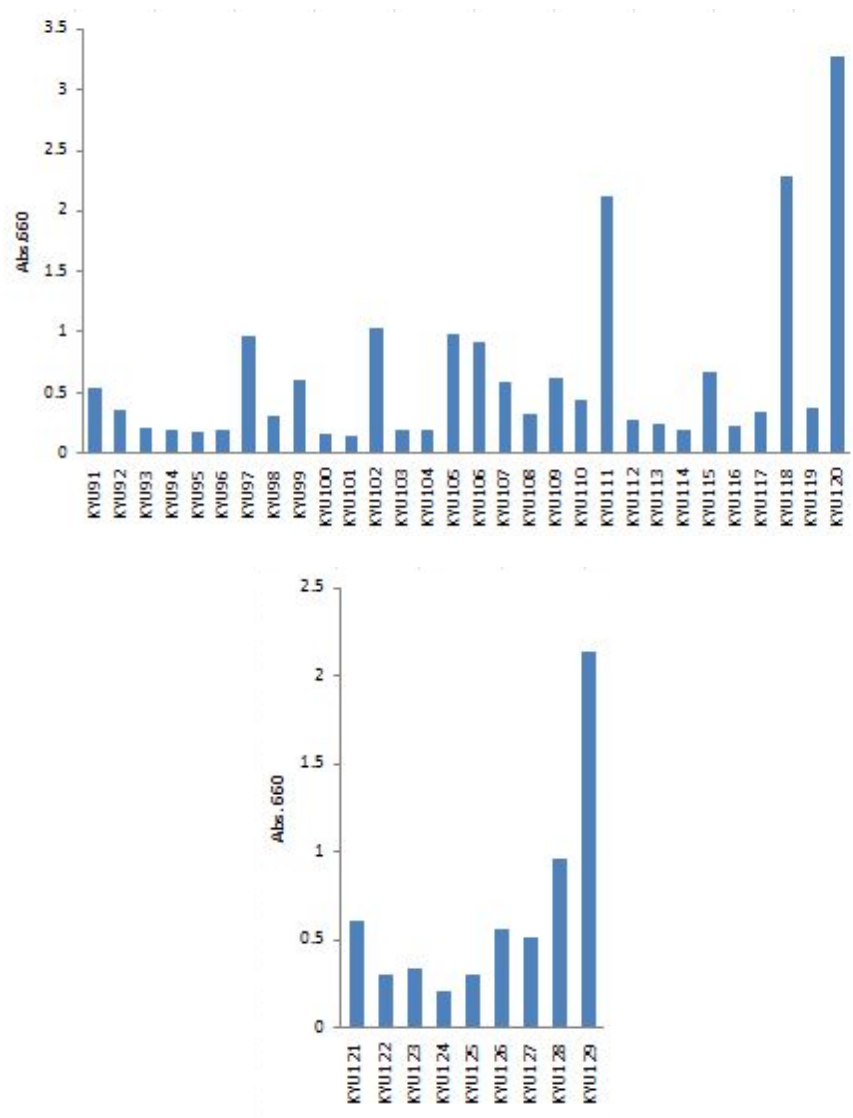


Fig. 28. Biofilm formation of *Cronobacter* spp. isolates

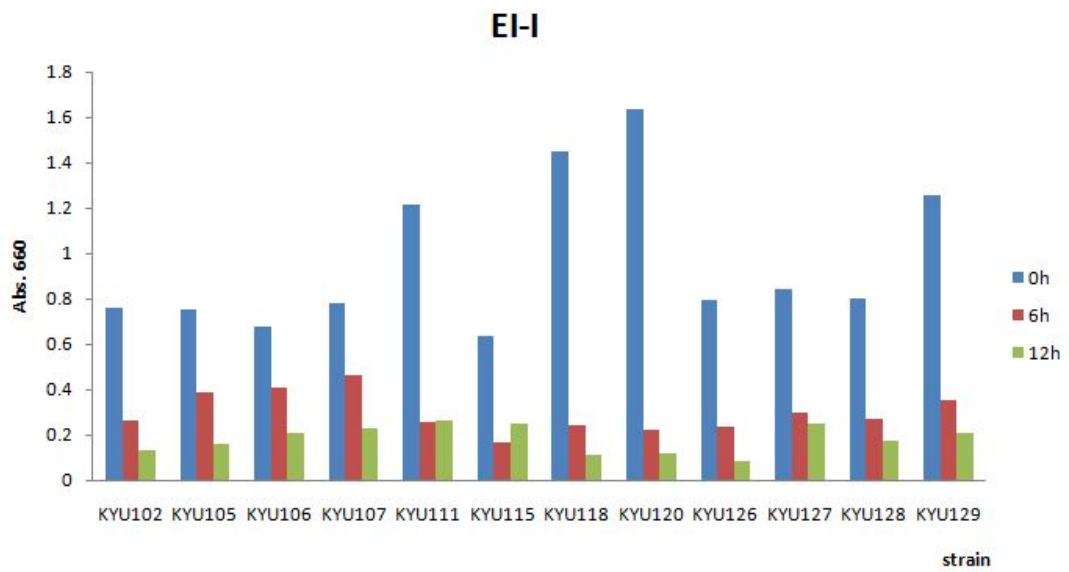
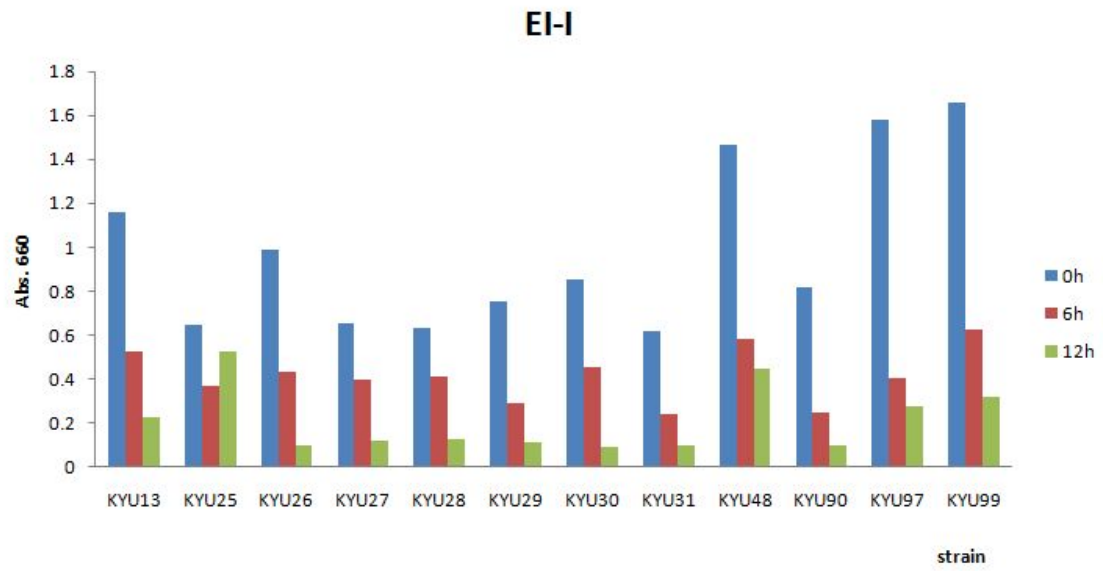


Fig. 29. Reduction of biofilm of *Cronobacter* spp. by virulent phages

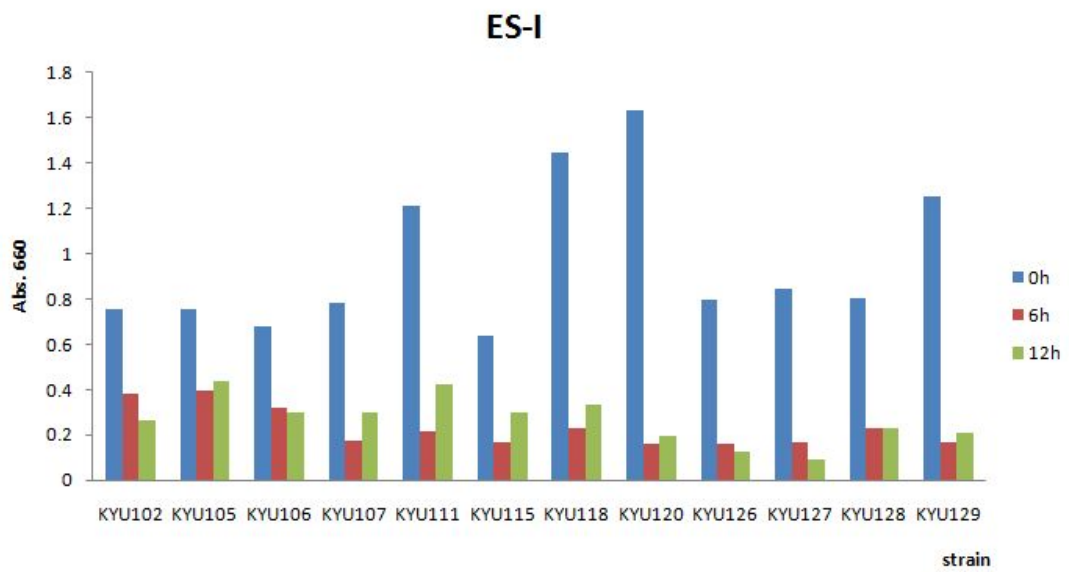
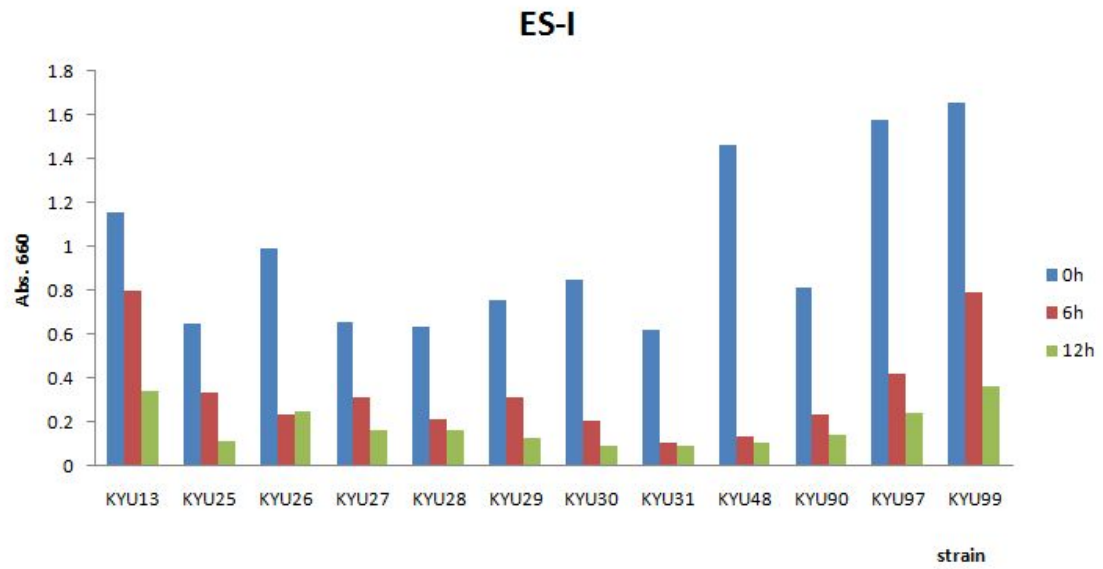


Fig. 30. Reduction of biofilm of *Cronobacter* spp. by virulent phages

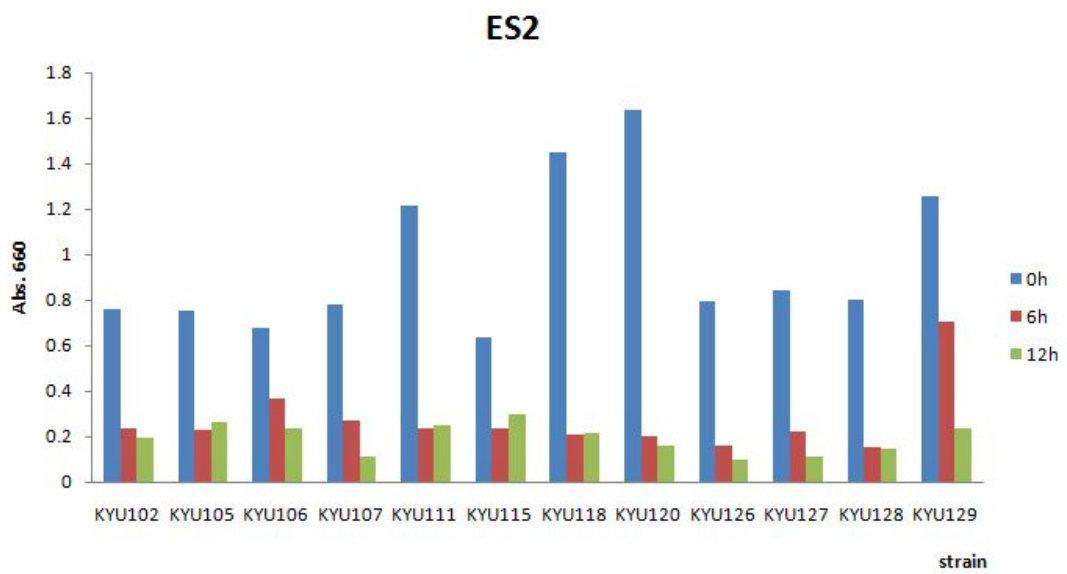
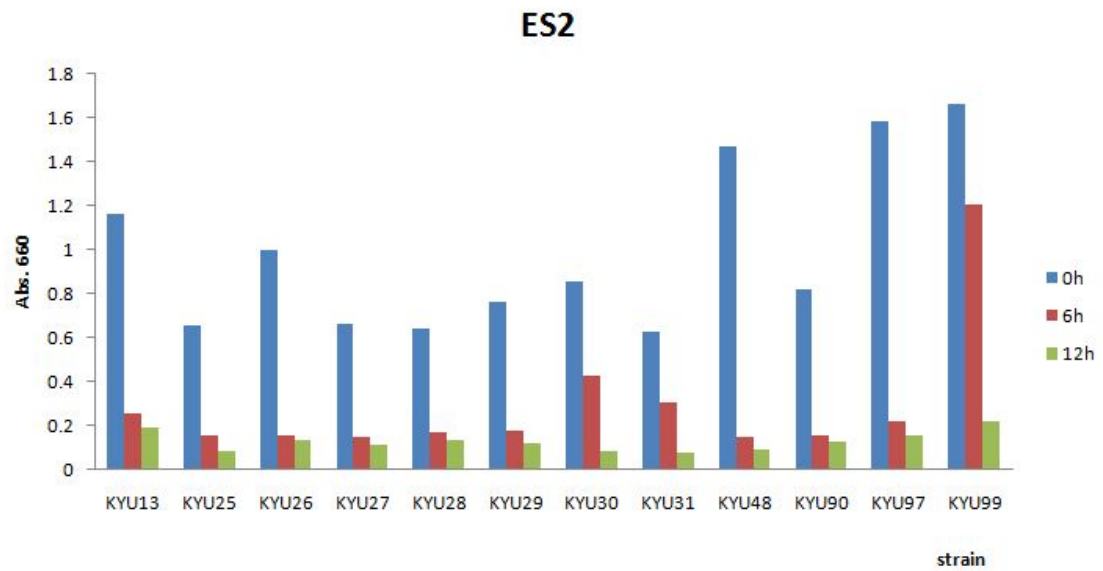


Fig. 31. Reduction of biofilm of *Cronobacter* spp. by virulent phages

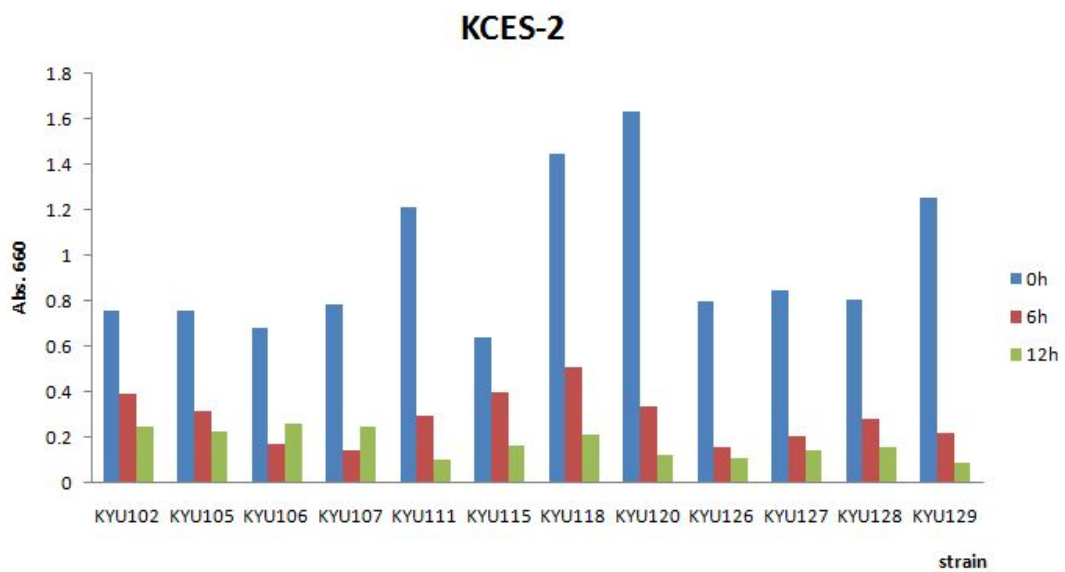
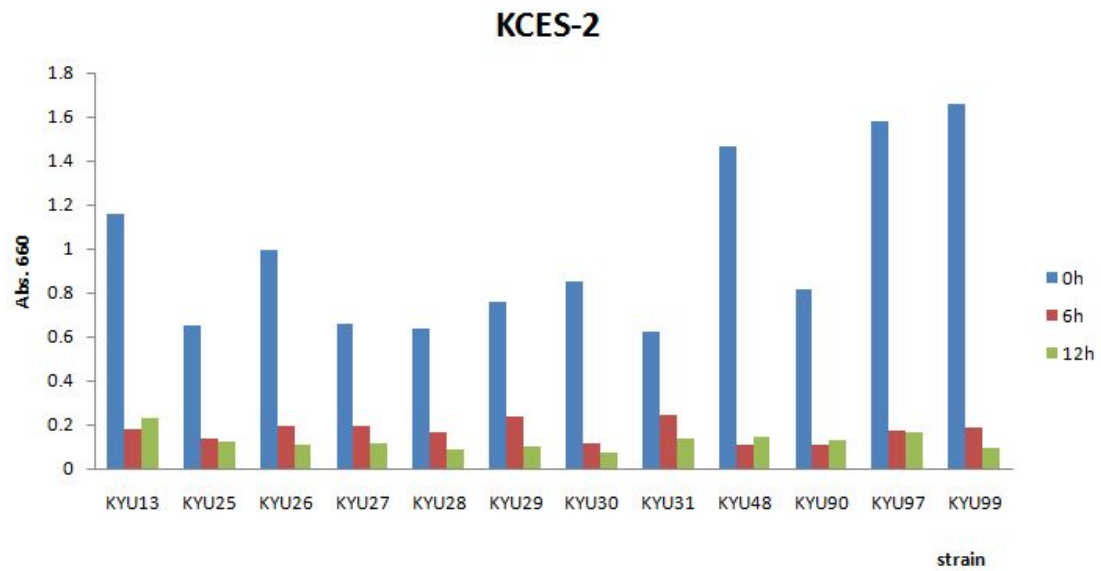


Fig. 32. Reduction of biofilm of *Cronobacter* spp. by virulent phages

## 라. *Bifidobacterium* spp., 유산균, 용균성 파지를 이용한 *C. sakazakii*의 제어

*Bifidobacterium* BF-8과 분리된 용균성 파지들을 이용하여 *C. sakazakii*의 저해 효과를 확인하였다. *Bifidobacterium* BF-8의 배양 상등액을 이용해 희석하여 *C. sakazakii* 배양액을 첨가하고 생육 저해 효과를 비교한 결과는 Fig. 33과 같다. *Bifidobacterium* BF-8의 배양액을  $2^{-1}$ ~ $2^{-3}$  희석하고 희석된 배양 상등액이 첨가되지 않은 *C. sakazakii*의 경우는 시간이 지나감에 따라 생육이 활발하게 일어나는 반면 배양 상등액을 첨가하였을 경우에는  $2^{-1}$ ,  $2^{-2}$  희석된 배양액은 *C. sakazakii*의 생육을 18시간 동안 저해하는 것으로 나타났으나,  $2^{-3}$ 의 경우 6시간 이후부터 생육이 시작되어 점차 증가하는 양상을 나타냈다. 그리고 본 실험 결과를 바탕으로 *Bifidobacterium* BF-8의 배양 상등액과 분리된 용균성 파지들을 각각 6 log PFU/mL 수준으로 접종한 후 혼합하여 *C. sakazakii*를 접종하고 저해 효과를 실험한 결과는 Fig. 34, 35와 같다. 앞서 *Bifidobacterium* BF-8의 상등액을 희석해서 저해 효과를 확인했을 경우  $2^{-3}$  희석액에서는 6시간 이후에는 *C. sakazakii*의 증식이 되었던 반면, 분리된 용균성 파지들을 각각 혼합하였을 경우 ES2 phage, KCES2 phage, ESP2949-2 phage의 경우 *C. sakazakii*의 증식이 확인되지 않았으며, ES-1 phage의 경우는 배양액 상등액만을 넣은 것에 비해 균증식이 낮은 것으로 나타났다. 따라서 *Bifidobacterium* BF-8과 분리된 용균성 파지들의 혼합액을 이용하여 *C. sakazakii*의 저해를 보다 효과적으로 저해할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 *Bifidobacterium* BF-8과 분리된 용균성 파지들의 혼합액에 의해 *C. sakazakii*의 시간에 따른 viability를 LBbroth와 분유에서 확인하기 위해 DFI agar에 도말하여 확인한 결과는 Fig. 36와 같다. 실험 결과 *Bifidobacterium* BF-8 만을 첨가하였을 경우 24시간 이후에는 *C. sakazakii* 만 배양했을 경우에 비해 약 5 log CFU/mL 수준으로 감소되는 것을 확인하였다. 그리고 분리된 용균성 파지들을 혼합하여 확인했을 경우 ES-1 phage, ES2 phage, ESP2949-1, ESP2949-2는 모두 *C. sakazakii*가 검출되지 않았으며, EI-1 phage와 KCES2 phage는 각각 약 6 log CFU/mL, 7 log CFU/mL 수준으로 감소되었다. 또한 우유에 *C. sakazakii*를 접종하여 *Bifidobacterium* BF-8과 용균성 파지 혼합액에 의한 생육 저해 정도를 확인했을 때도 이와 유사한 결과를 확인하였다. 하지만 ES2 phage와 ESP2949-2의 경우

LB broth에서 비해 분유에서는 효과가 약간 떨어지는 것으로 나타났는데, 이는 앞서 설명한 것처럼 식품 자체가 가지는 inhibitor나 receptor에 특성 등에 기인한 것으로 판단된다.

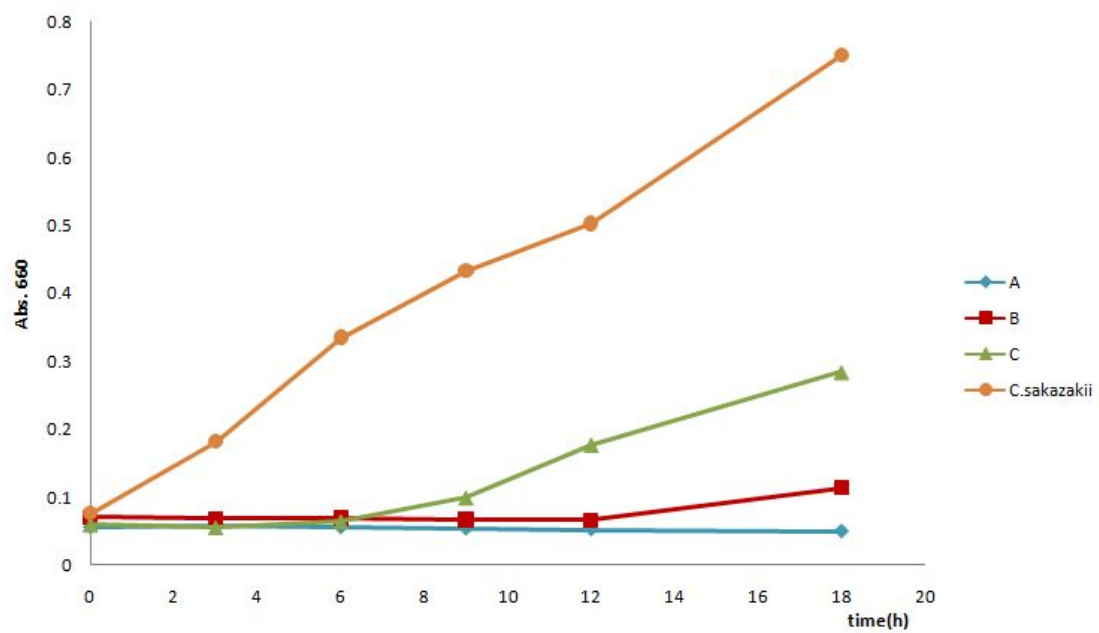


Fig. 33. Growth inhibition of *C. sakazakii* by supernatant of *Bifidobacterium* BF-8. A:  $2^{-1}$  diluent of supernatant, B;  $2^{-2}$  diluent of supernatant, C:  $2^{-3}$  diluent of supernatant



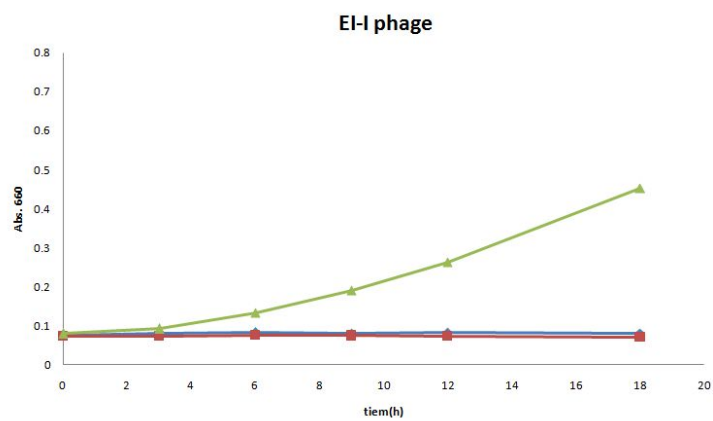
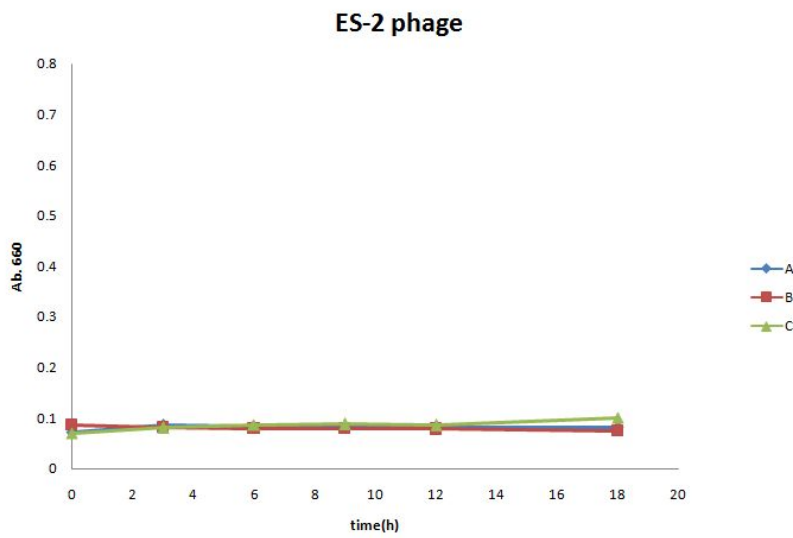
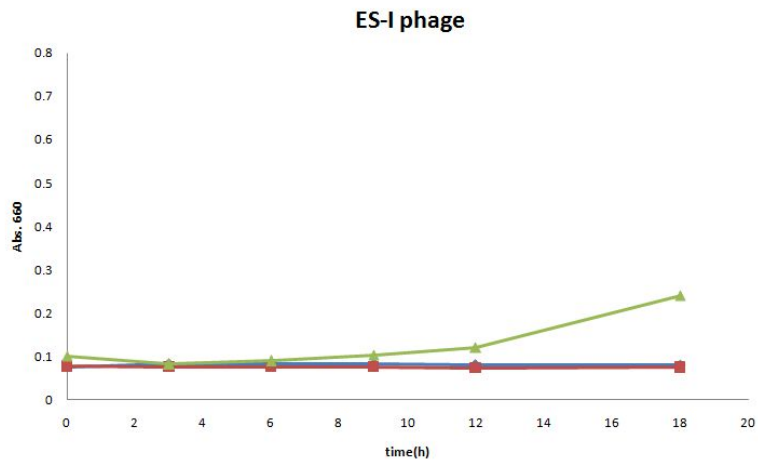


Fig. 34. Synergy effect of *C. sakazakii* by virulent phages with supernatant of *Bifidobacterium* BF-8. A:  $2^{-1}$  diluent of supernatant, B:  $2^{-2}$  diluent of supernatant, C:  $2^{-3}$  diluent of supernatant

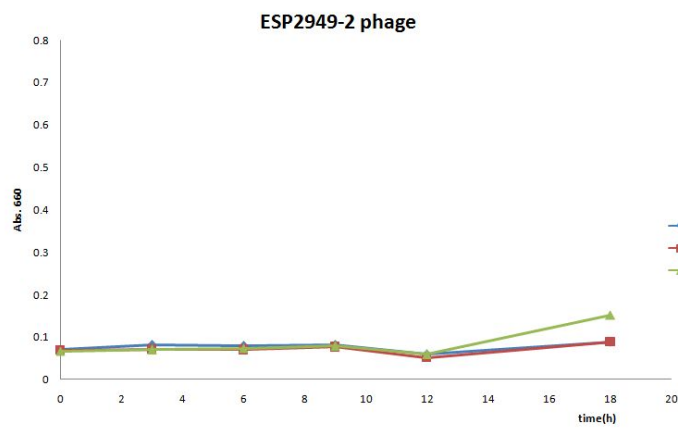
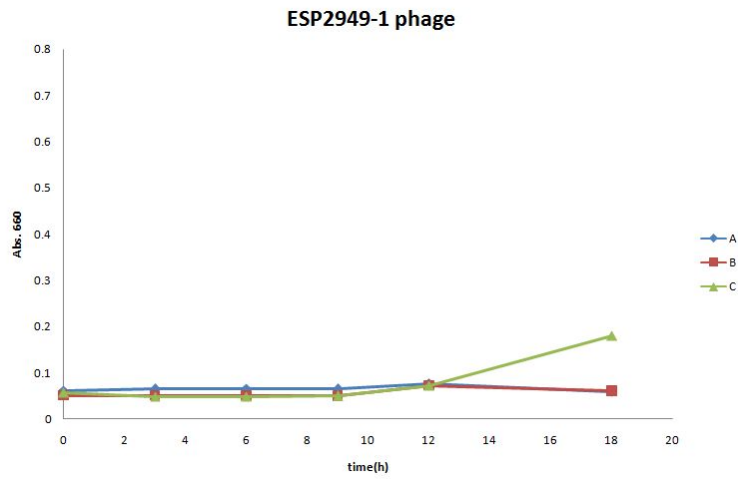
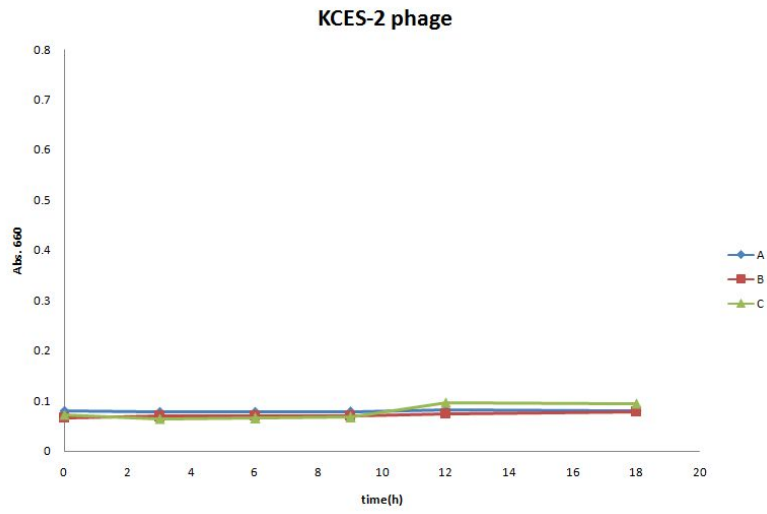
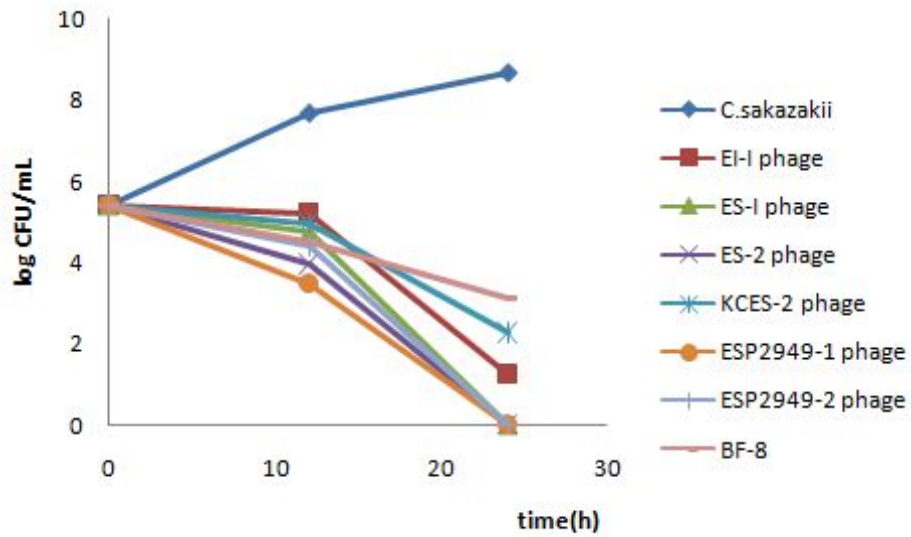


Fig. 35. Synergy effect of *C. sakazakii* by virulent phages with supernatant of *Bifidobacterium* BF-8. A:  $2^{-1}$  diluent of supernatant, B;  $2^{-2}$  diluent of supernatant, C:  $2^{-3}$  diluent of supernatant

(A)



(B)

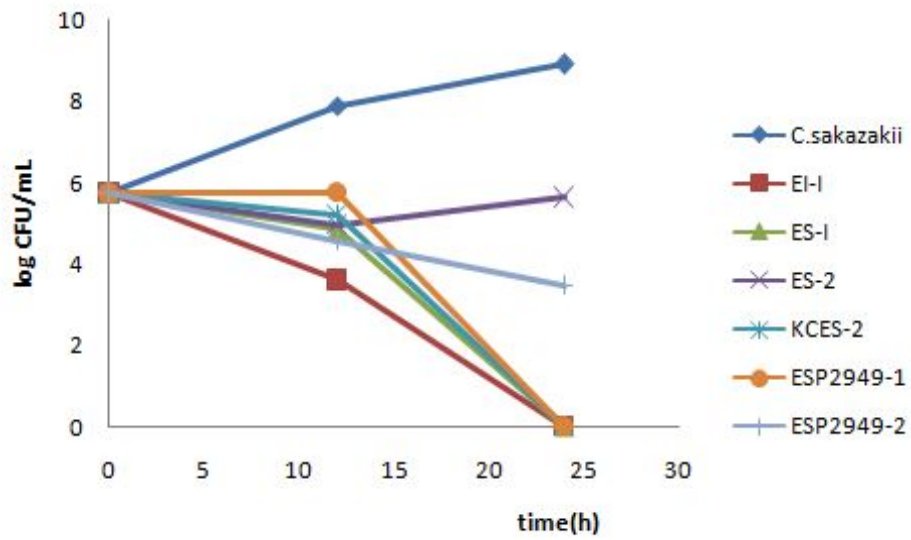


Fig. 36. Viability of *C. sakazakii* by virulent phages with supernatant of *Bifidobacterium* BF-8 in (A) LB broth and (B) infant milk formula

#### 마. *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperate phage의 분리 및 특성 분석

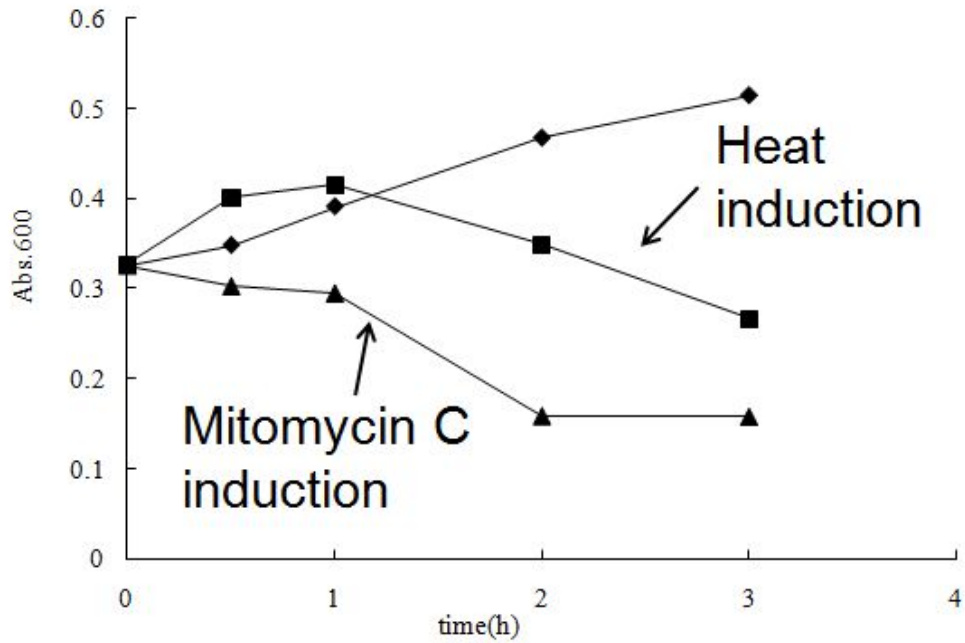
본 연구에서 분리된 *C. sakazakii* KYU90으로부터 mitomycin C와 열충격의 방법으로 분리하고자 하였다. *C. sakazakii* KYU90에 mitomycin C와 60°C에 노출시킨 뒤에 흡광도의 변화를 확인한 결과와, 최종 배양액을 0.2 um membrane filter를 이용해서 제균한 phage lysate를 indicator strain인 *C. sakazakii* ATCC29544를 사용하여 spot assay를 수행한 결과는 Fig. 37과 같다. Mitomycin C와 열충격으로 유도된 *C. sakazakii* KYU90의 temperate phage의 확인을 위해 흡광도의 변화를 통해 확인한 결과 mitomycin C와 열충격 처리 이후에 흡광도 값이 감소되는 것을 관찰하였으며, lysate를 이용하여 spot assay를 수행한 결과 mitomycin C와 열충격 처리 이후에 모두 plaque의 형성을 확인하여, 두 조건에서 모두 temperate phage가 유도되어 나온 것을 알 수 있었다. 일반적으로 미생물의 genome에는 다양한 prophage가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이들은 미생물의 evolution과 horizontal gene transfer 등에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 그리고 *E.coli* O157:H7, *S. aureus*, *C. botulinum* 등의 virulence에 관계하고 있다고 알려져 있어 phage 들은 미생물에 있어서나 인간 또는 동식물에 큰 영향이 있을 것이다. 하지만 본 연구에서는 열충격 등 외부의 자연적 요인 등에 의해 유도되어 나올 가능성이 있는 temperate phage에 의해 농수산물 등의 raw material이나 분유 등의 powdered foods에 오염되어 있는 *Cronobacter* spp.가 자연적으로 감소될 가능성에 대해 연구한 것으로서, temperate phage에 의한 gene transfer나 독소 관련 유전자에 대한 연구는 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

LBC broth에서 열충격에 의해 temperate phage가 유도되어 나오는 결과를 바탕으로 동일하게 조제 분유에 *C. sakazakii* KYU90을 접종한 후 50°C, 60°C, 70°C에서 유도되어 지는 temperate phage를 plaque assay를 통해 확인한 결과, LBC broth에서와 마찬가지로 열충격에 의해 *C. sakazakii* KYU90으로부터 temperate phage가 유도되어 나오는 것을 관찰하였으며, 60°C에서 가장 많은 수의 temperate phage가 유도되는 것을 확인하였다(Fig. 38). 또한 *C. sakazakii* KYU90이 조제 분유에 오염되어 있으면서 30분 이후에 약 4~5 log PFU/mL 수준으로 유도되었다. 일반적으로 일반 가정 등에서 조제하는 데 있어서 국내외 권고 사항은 60~70°C에서 제조하는 것을 권고하고 있으며, 이는 분유를 조제하는 온도에서는 *Cronobacter* spp.의 감소

시키는 온도이기도 하며, *Cronobacter* spp.의 prophage가 유도되어 temperate phage로 될 수 있는 온도일 것으로 판단된다. 또한 조제 분유의 제조, 가공 공정 중의 열처리 과정 또한 유사할 것으로 보인다.

열충격과 mitomycin C에 의해 유도된 temperate phage에 의한 *C. sakazakii* ATCC29544에서의 생육 억제 효과를 LBC broth와 분유에서 확인한 결과는 Fig. 39와 같다. 분리된 각각의 조건에서 유도된 temperate phage lysate는 *C. sakazakii* ATCC29544에 감염되어 생육을 못하게 하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리했던 용균성 파지들과 유사한 생육 제어 효과를 나타내고 있었으나, temperate phage의 특성이 integrase 등을 보유하고 있어 다른 세균에 integratoin 될 가능성 등이 있으므로 temperate phage를 이용하여 식품에 적용하여 *Cronobacter* spp.를 제어하는 것은 위험이 따를 것으로 판단된다.

(A)



(B)

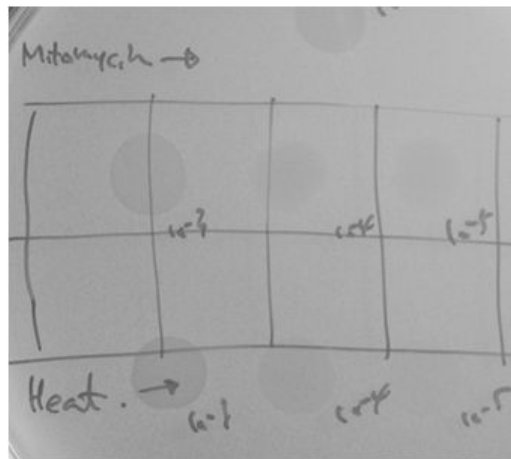


Fig. 37. (A) Induction of temperate phage from *C. sakazakii* ATCC 29544 by heat and mitomycin C. (B) Plaque formation of temperate phage by mitomycin C and heat treatment

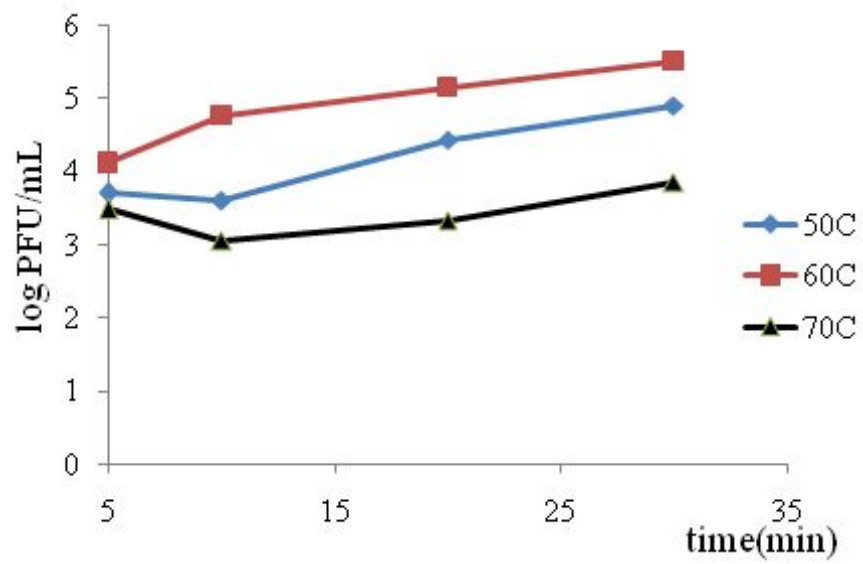


Fig. 38. Plaque formation of temperate phage induced from *C. sakazakii* KYU90 in infant formula according to temperature

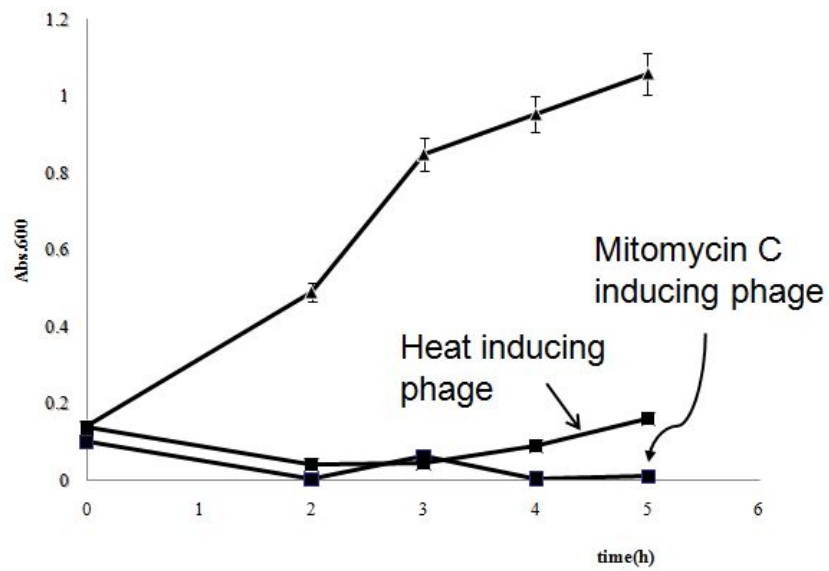
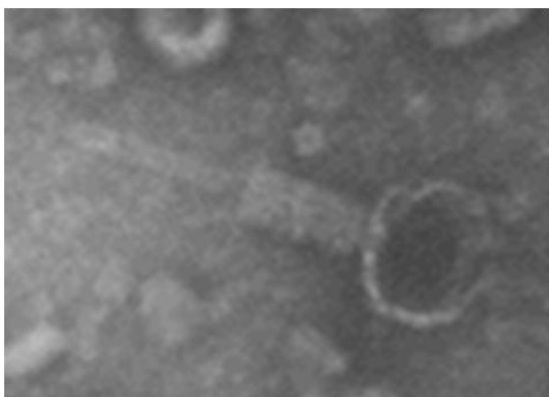


Fig. 39. Growth inhibition of *C. sakazakii* ATCC29544 by heat and mitomycin C inducing temperate phages



또한 분리된 temperate phage ENT90의 형태학적 특성을 투과 전자 현미경을 통해 확인한 결과 전형적인 Myoviridae famil에 속하는 것으로 관찰되었다(Fig. 40). 그리고 temperate phage ENT90의 genome sequence를 GS-FLX sequencing을 통 수행하고 분석한 결과, 총 genome 크기는 29,564bp로 원형의 dsDNA로 확인되었으며, G+C content가 55.81% 였다. 그리고 약 41개의 ORFs를 보유하고 있었으며, tRNA는 확인되지 않았다. 또한 temperate phage가 보유하고 있는 일반적인 기능을 하는 structure/morphogenesis, replication/regulation/modification, lysis, lysogenic module, DNA packaging 유전자들이 있음을 확인하였으며, genomic map 과 각각의 ORF의 특성은 Fig. 41.과 Table 9와 같다. 그러므로 본 연구를 통해 확인된 바와 같이 *Cronobacter* spp.의 prophage는 열충격 등에 의해서도 유도되므로 보다 다양한 외부 환경 스트레스에 의한 temperate phage에 대한 연구가 필요할 것으로 판단되며, 보다 다양한 *Cronobacter* spp. 분리주 들에 대한 연구도 필요할 것으로 판단된다. 그리고 실제 유도되어 나온 temperate phage들에 의해 분유 등에 오염되어 있는 식품에 존재하는 *Cronobacter* spp.에 미치는 보다 명확한 연구가 추가적으로 필요할 것이다. 더불어 앞서 기술한 바와 같이 이들 temperate phage 들의 horizontal gene transfer, evolution, virulence 등과 관련된 연구가 보다 심층적으로 이루어질 필요가 있을 것으로 사료된다.

(A)



(B)

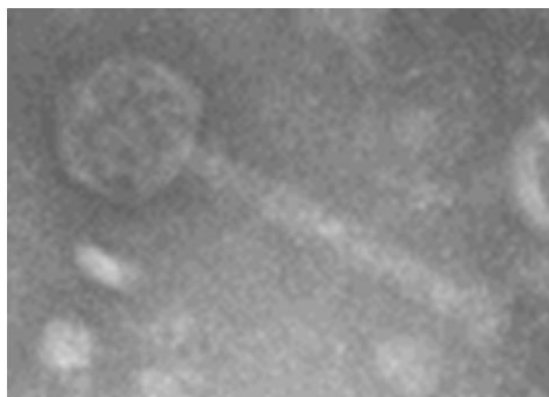


Fig. 40. Electron micrograph showing morphology of phage ENT90

(A) contracted tail, (B) non-contracted tail

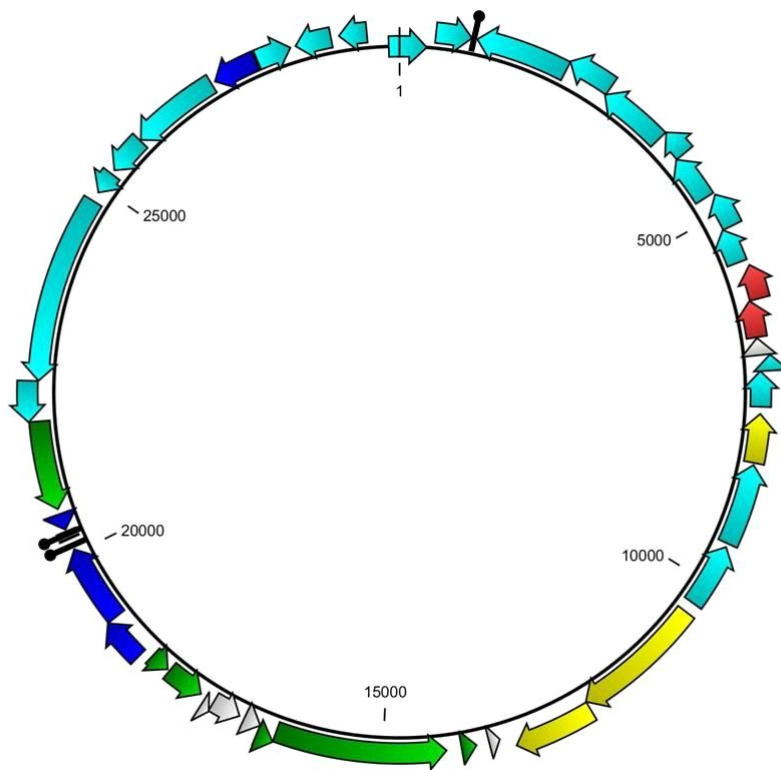


Fig. 41. Genetic prediction map of temperate phage ENT90 (Gene accession No: HQ110084)

Pale blue: Morphogenesis/Structure, Red: Lysis, Yellow: DNA packaging  
 Green: Replication/Regulation/Modification, Blue: Lysogeny, Gray:  
 hypothetical protein

Ω: rho-independent terminator

Table. 9. Database matches of the predicted ORFs of temperate phage ENT90

ORF (strand)	Genome Position	Predicted protein				
		Size(aa)	pI/Mw	Putative function (Matched Database)	Function in phage	E-value
1(+)	478-951	157	4.45 / 18000.27	Tail fiber protein (ZP_04623057.1)	Structure/Morphogenesis	1e-37
2(-)	1021-2247	408	5.29 / 42889.38	Phage Tail Collar domain protein (ZP_02777408.1)	Structure/Morphogenesis	1e-123
3(-)	2244-2852	202	5.21 / 22015.13	Phage tail protein I(ZP_07378093.1)	Structure/Morphogenesis	5e-90
4(-)	2845-3753	302	4.59 / 31993.97	Baseplate assembly protein J (YP_003931272.1)	Structure/Morphogenesis	2e-143
5(-)	3758-4108	116	5.23 / 12757.56	Baseplate assembly protein W (YP_003931271.1)	Structure/Morphogenesis	2e-46
6(-)	4105-4689	194	5.20 / 20259.70	Baseplate assembly protein V (YP_003931270.1)	Structure/Morphogenesis	2e-89
7(-)	4759-5208	149	10.81 / 16998.79	Phage virion morphogenesis protein (ZP_05728644.1)	Structure/Morphogenesis	1e-54
8(-)	5205-5672	155	4.53 / 17456.93	Tail completion protein R (YP_003931267.1)	Structure/Morphogenesis	4e-63
9(-)	5750-6196	148	9.95 / 16040.15	Control of lysis protein (ZP_05728642.1)	Lysis	4e-46
10(-)	6193-6453	86	9.49 / 9801.33	Phage lysozyme (YP_002147647.1)	Lysis	7e-26
11(-)	6686-6910	74	9.39 / 8597.07	Hypothetical protein (YP_003521710.1)		3e-31
12(-)	6916-7119	67	4.34 / 7382.23	Phage Tail Protein X (YP_001477107.1)	Structure/Morphogenesis	3e-19
13 (-)	7119-7583	154	5.07 / 16977.18	Enterobacteria phage P2 GpL (ZP_04641585.1)	Structure/Morphogenesis	6e-43
14(-)	7676-8344	222	9.86 / 24835.80	Terminase endonuclease subunit (YP_003931265.1)	DNA packaging	3e-87
15(-)	8348-9427	359	4.86 / 40547.73	Major capsid protein (ZP_07621366.1)	Structure/Morphogenesis	2e-155
16(-)	9478-10326	282	4.95 / 30268.77	Capsid scaffolding protein (YP_001721058.1)	Structure/Morphogenesis	2e-82
17(+)	10472-12235	587	6.31 / 66389.08	Terminase ATPase subunit (YP_003931263.1)	DNA packaging	0.0
18(+)	12235-13278	347	8.43 / 39199.55	Phage portal protein PBSX family (ZP_05728640.1)	DNA packaging	3e-177
19(-)	13462-13605	47	10.16 / 5228.06	Hypothetical protein (ZP_03223717.1)		0.25
20(-)	13774-14013	79	5.33 / 8910.40	SOS operon TUM protein (emb CBG26206.1)	Replication/regulation/modification	1e-17
21(-)	14172-16424	750	9.19 / 85349.73	Replication protein A (YP_003740470.1)	Replication/regulation/modification	0.0
22(-)	16424-16648	74	5.61 / 8463.58	Transcriptional regulator (ZP_05728635.1)	Replication/regulation/modification	2e-16
23(-)	16648-16875	75	5.90 / 8684.77	Hypothetical protein (YP_001178217.1)		3e-19

ORF (strand)	Genome Position	Predicted protein				
		Size(aa)	pI/Mw	Putative function (Matched Database)	Function in phage	E-value
24(-)	16945-17328	127	9.46 / 14918.14	Hypothetical protein (YP_003521468.1)		2e-43
25(-)	17321-17518	65	11.00 / 7402.52	Hypothetical protein (NP_752867.1)		2e-08
26(-)	17523-18032	169	7.69 / 18235.24	Regulatory protein CII ( ZP_05728632.1)	Replication/regulation/modification	1e-70
27(-)	18063-18326	87	10.00 / 9747.39	Phage regulatory protein (emb CBG26215.1)	Replication/regulation/modification	5e-33
28(+)	18450-19022	190	5.83 / 20895.05	CI repressor (YP_001178222.1)	Lysogeny	3e-69
29(+)	19022-20059	345	9.36 / 39376.19	Integrase (ZP_02347034.1)	Lysogeny	3e-165
30(-)	20337-20555	72	8.72 / 8072.22	Transcriptional activator (YP_003018758.1)	Lysogeny	2e-18
31(-)	20623-20889	88	4.78 / 9729.89	Late control gene D protein (YP_002330384.1)	Replication/regulation/modification	3e-30
32(-)	21792-22319	175	6.73 / 18584.22	Phage tail protein (YP_001337103.1)		2e-48
33(-)	22323-24800	825	9.51 / 86821.95	Phage tail tape measure protein (YP_003018755.1)	Structure/Morphogenesis	0.0
34(-)	24930-25226	98	4.71 / 10466.19	Phage tail E family protein (ZP_04641602.1)	Structure/Morphogenesis	9e-27
35(-)	25286-25798	170	4.74 / 18953.31	Major tail tube protein (YP_003521697.1)	Structure/Morphogenesis	4e-83
36(-)	25811-26980	389	4.98 / 41935.42	Major tail sheath protein (YP_003931278.1)	Structure/Morphogenesis	0.0
37(-)	27043-27432	129	10.08 / 14688.12	DNA-invertase (YP_003932290.1)	Lysogeny	7e-55
38(+)	27775-28122	115	5.96 / 12371.86	Tail fiber protein (dbj BAA96865.1)	Structure/Morphogenesis	0.006
39(-)	28192-28665	157	4.45 / 18000.27	Tail fiber assembly protein (YP_001005225.1)	Structure/Morphogenesis	2e-22
40(-)	28772-29047	91	9.10 / 9638.93	Tail fiber protein (YP_003880940.1)	Structure/Morphogenesis	1.2
41(+)	29420-29564,1-371	164	11.27 / 18874.18	Tail fiber protein (ZP_04617663.1)	Structure/Morphogenesis	6e-05

## 제 4 절. *Cronobacter* spp.의 검출을 위한 용균성 파지의 이용

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 분리된 용균성 파지들의 ferrous ammonium sulfate에 의한 제거

분리된 용균성 파지들 중 *Cronobacter* spp. 분리주들을 대부분 감염시킬 수 있는 파지들을 선별하였으며, 선발된 EI-I, ES-I, ES2, KCES2, ESP2949-1, ESP2949-2 phage를 ferrous ammonium sulfate(FAS)의 농도와 시간에 따른 viability를 확인하였다. 또한 *C. sakazakii* ATCC29544가 ferrous ammonium sulfate의 농도에 따른 viability를 확인하였다.

#### 나. Phage amplification assay에 의한 *C. sakazakii*의 검출

분리된 용균성 파지를 이용해 *C. sakazakii* ATCC29544에 대한 검출을 phage amplification assay를 통해 수행하였다. 대수 증식기의 *C. sakazakii*를 10진 희석한 후 희석액에 분리된 용균성 파지 cocktail을 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 그리고 FAS를 첨가하고 30분 동안 추가적으로 배양한 후 LBC broth를 첨가하고, indicator strain으로 사용될 *C. sakazakii* ATCC29544를 약 8 log CFU/mL 수준으로 접종한 후 1시간을 추가 배양하였다. 그리고 LBC soft agar와 혼합한 후 LBC agar에 중층하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 plaque의 형성을 확인하였다. 또한 시간에 따른 *C. sakazakii*의 검출도를 확인하기 위해 배양된 *C. sakazakii*를 10진 희석하고 이를 배양하면서 시간에 따른 검출도를 확인하였다.

#### 다. 식품에 오염된 *Cronobacter* spp.의 검출

식품에 오염된 *Cronobacter* spp.의 검출을 위해 시판 중인 분유, 야채 주스, 양상추를 이용해 실험을 수행하였다. 조제 분유와 야채 주스에 배양된 *C. sakazakii* ATCC29544를 10진 희석하여 희석액을 접종한 후 시간에 따른 검출도를 확인하였으며, 방법은 위와 동일하게 진행하였다. 그리고 양상추는 크기가 1X1 cm<sup>2</sup>로 절단한 후 70% alcohol에 30분 동안 담궈 놓은 후 멸균수를 이용해 2회 수세한 후 사용하였다. 수세한 후 *C. sakazakii* 배양액을 10진 희석한 후 희석액에 양상추 조각을 20분 동안 담궈 놓고 이를 꺼내 양상추에 오염된 *C. sakazakii*의 검출에 사용하였다.

#### 라. *Cronobacter* spp. 분리주를 대상으로한 식품 적용

분리된 *Cronobacter* spp. 분리주들을 대상으로 하여 식품에 적용하여 실제 검출이 가능한지를 확인하고자 하였다. 분리된 *Cronobacter* spp. 들 중 용균성 파지들의 숙주 저해를 많이 하는 분리주부터 적게 하는 분리주를 선발하여 실험을 수행하였으며, 실험은 위와 동일한 방법으로 진행하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 분리된 용균성 파지들의 ferrous ammonium sulfate에 의한 제거

분리된 용균성 파지 cocktail에 존재하는 파지를 제거하기 위한 시약으로 FAS를 사용하여 실험을 수행하였다. FAS는 대표적인 virucidal agent로 알려져 있고, 다른 연구 보고에 따르면 다양한 ammonium compound를 이용해 virucidal activity를 확인했을 때 FAS가 가장 우수한 효과가 있는 것으로 보고되어 본 연구에서는 FAS를 이용하여 실험을 수행하였으며, 그 결과는 Fig. 42, 43과 같다. FAS를 농도와 시간에 따라 분리된 용균성 파지의 제거 효과를 확인한 결과, 농도와 시간에 비례하여 감소가 되는 것으로 나타났고 이 결과를 바탕으로 하여 5% FAS의 농도를 처리한 후 30분 처리하는 것으로 phage amplification assay를 수행하고자 하였다.



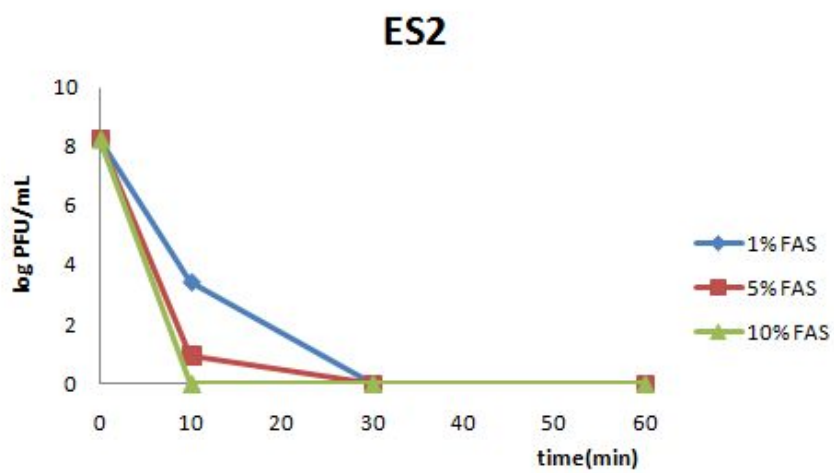
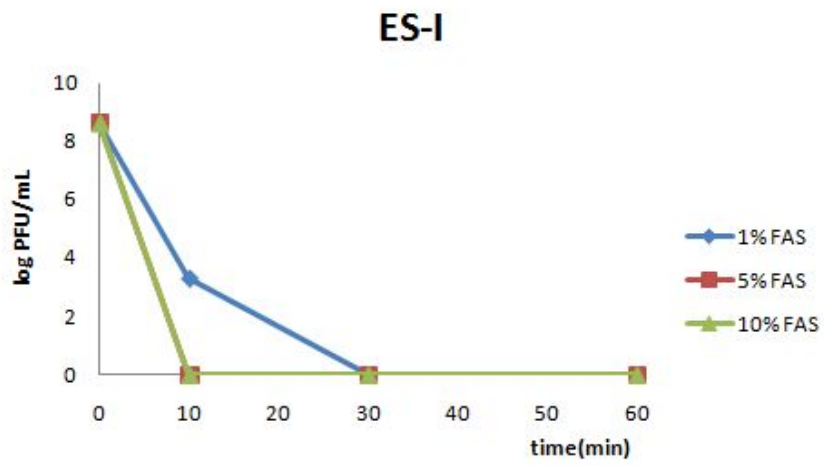
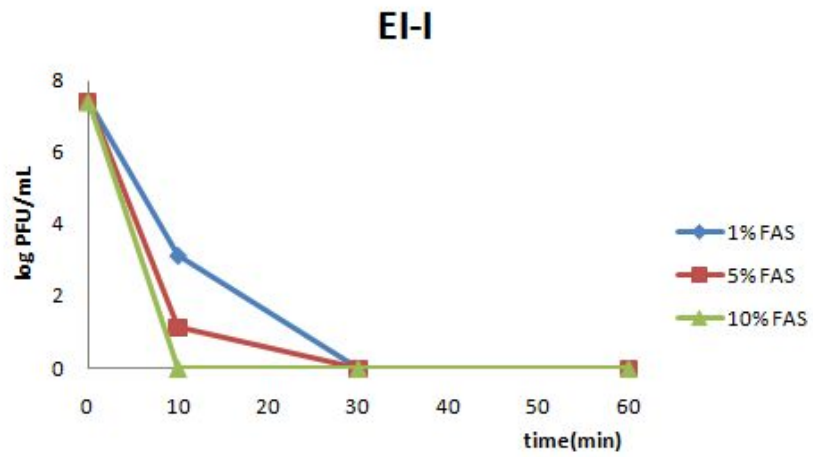


Fig. 42. Viability loss of virulent phages isolates by ferrous ammonium sulfate

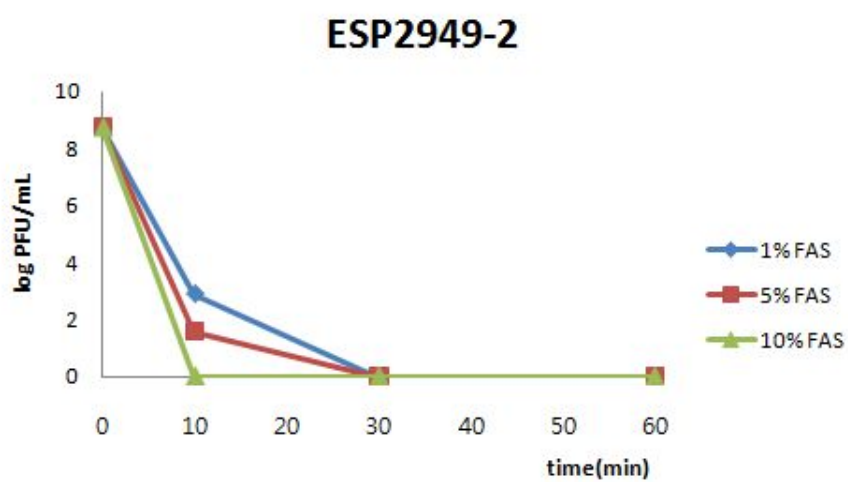
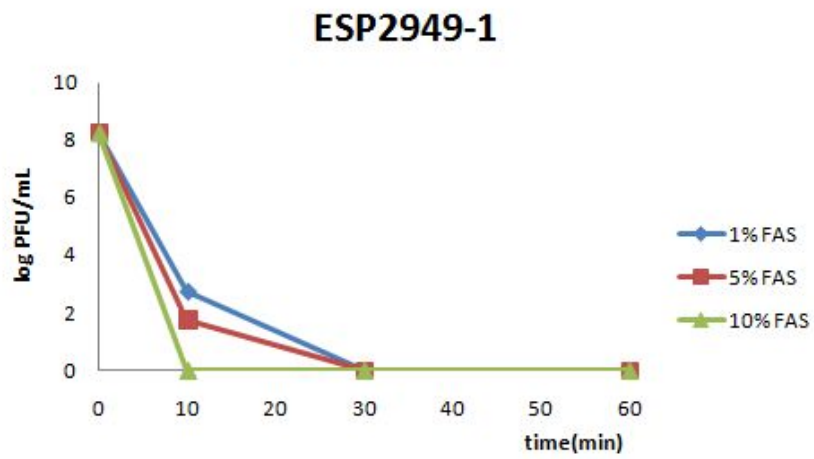
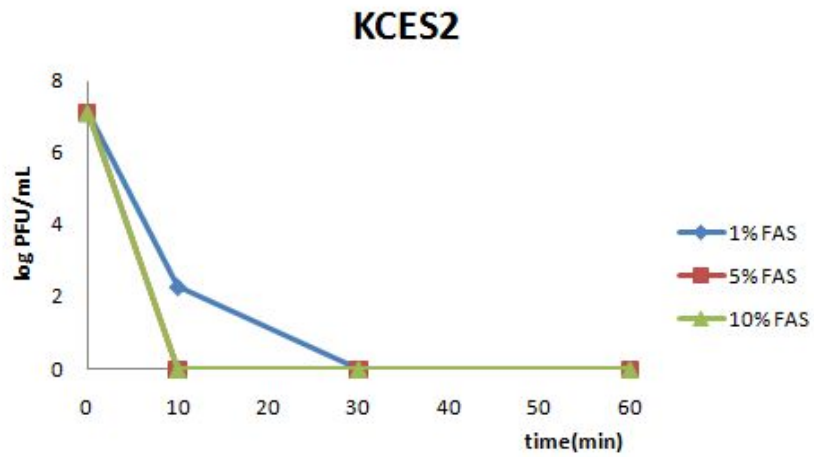


Fig. 43. Viability loss of virulent phages isolates by ferrous ammonium sulfate

#### 나. Phage amplification assay에 의한 *C. sakazakii*의 검출

분리된 용균성 파지 cocktail을 이용해 Phage amplification assay를 통한 *Cronobacter* spp.의 검출을 수행하였다. Phage amplification assay는 개발된 지 십수년 정도 밖에 되지 않았으며, 최근 phage를 이용한 다양한 응용 분야의 하나로 각광받고 있다. 일반적으로 phage를 이용한 미생물의 검출 방법은 luciferase gene 등의 특정 reporter gene을 phage에 삽입하여 형광의 증폭 정도를 확인하여 검출하는 방법과 phage가 특정 숙주를 감염시키고 난 후 특정 virucidal agent를 사용하여 감염되지 않은 phage를 제거한 후 indicator strain에 다시 감염시켜 plaque의 형성 유무를 관찰하여 미생물을 검출하는 방법이다. 이 방법은 조작이 간단하고 짧은 시간에 검출이 가능하며, 숙주 특이성이 있는 phage를 사용하기 때문에 선택성이 우수한 것으로 알려져 있다. 특히 해외에서는 Mycobacteria와 항생제 내성 Mycobacteria를 검출하기 위한 목적으로 생산되어 제품으로 판매되고 있다. 따라서 본 연구에서도 새롭게 분리한 *C. sakazakii*의 용균성 파지들을 이용하여 이를 cocktail 형식으로 혼합하여 *Cronobacter* spp.의 검출에 사용하고자 하였다. *C. sakazakii* ATCC29544의 세균 수에 따른 용균성 파지 cocktail을 이용한 검출 정도를 비교하였으며, negative control로는 *S. aureus* ATCC12103을 사용하여 수행하였다(Table 10). *C. sakazakii* ATCC29544를 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>로 LBC broth로 희석된 희석액을 시간이 지남에 따라 검출되는 정도는 1시간 이후 부터 검출이 가능하였으며, *C. sakazakii*의 세균 양에 많을 수록 plaque의 형성이 많았으며, 약 2 log CFU/mL 수준의 *C. sakazakii*의 경우 2개의 plaque 만이 확인되었으나, 시간이 3시간, 5시간 지남에 따라 plaque의 양이 계속 증가함을 알 수 있었다. 또한 negative control로 사용된 *S. aureus*의 경우 FAS의 농도가 1% 일 경우는 plaque가 형성이 됨을 알 수 있었는데 이는 FAS의 농도가 낮아서 처음에 감염시킨 용균성 파지 cocktail에 존재 하는 파지가 나온 것으로 확인되었다. 그러므로 FAS의 농도는 5% 이상을 처리해야 false-positive 결과가 없을 것으로 보인다. 따라서 본 실험 결과 적은 수의 *C. sakazakii*가 오염되어 있을 경우 3시간 정도의 배양 시간이 필요할 것으로 판단된다. 일반적으로 식품에 *Cronobacter* spp.가 오염되어 있을 경우 대부분 적은 양이 오염되어 있기 때문에, 용균성 파지 cocktail을 이용해 식품에 오염되어 있는 *Cronobacter* spp.를 검출하기 위해서는 3시간 이상의 배양 시간

이 필요할 것으로 사료된다.

Table. 10. Detection limits of *C. sakazakii* by virulent phage cocktails

<i>C. sakazakii</i> cell	Incubation time		
	1hr	3hr	5hr
	plaque formation/plate		
$4.12 \times 10^6$ CFU/mL	too many	too many	too many
$4.12 \times 10^4$ CFU/mL	161	too many	too many
$4.12 \times 10^2$ CFU/mL	12	142	too many

#### 다. 식품에 오염된 *Cronobacter* spp.의 검출

조제 분유, 야채 쥬스, 양상추에 배양된 *C. sakazakii* ATCC29544를 LBC broth를 이용해 희석하여 희석액을 접종한 후 시간에 따른 검출도를 확인하였으며, 방법은 위와 동일하게 진행하였고 negative control은 앞서와 마찬가지로 *S. aureus*를 사용하였다. 양상추와 조제 분유, 야채 쥬스에 *C. sakazakii*를 세균 수별로 인위적으로 오염시킨 후 시간에 따른 *C. sakazakii*에 대한 검출 정도를 확인한 결과는 Table 11과 같다. 그 결과 양상추와 분유의 경우 앞서 실험과 유사하게 *C. sakazakii*가 약 3 log CFU/mL(or g) 수준으로 오염되어 있을 때 1시간 후에는 양상추는 약 74 plaque formation/plate, 분유의 경우는 36 plaque formation/plate 각각 확인되었으며, 시간이 3시간, 5시간으로 지나감에 따라 plaque의 형성이 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 분유의 경우 *C. sakazakii*의 수가 약 6 log CFU/mL(or g)일 경우에 1시간 이후에 약 158 plaque formation/plate가 나타났지만 양상추의 경우 1시간 이후 때부터 많은 수의 plaque가 형성되었다. 이는 양상추의 표면에 주로 오염되어 있던 *C. sakazakii*가 phage가 감염되는데 큰 영향을 미치는 외적 요인이 거의 없기 때문이며, 분유의 경우는 분유 자체에 있는 다양한 물질들이 phage가 감염되는 것을 방해하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 야채 쥬스의 경우는 1 시간 때는 plaque가 형성되지 않았으며, 3시간 이후부터 plaque가 형성되어 5시간에 많은 수의 plaque가 형성되었다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 용균성 파지 cocktail을 이용하여 phage amplification assay를 수행하여 *Cronobacter* spp.의 검출할 때는 초기 균수의 영향과 식품 자체가 가지고 있는 성분, pH, inhibitor의 존재 유무 등 물성에 대한 특성을 고려하여 검출을 해야 할 것으로 판단된다.

Table. 11. Detection of *C. sakazakii* by virulent phage cocktails from contaminated foods

Lettuce		Incubation time		
		1hr	3hr	5hr
		plaque formation/plate		
<i>C. sakazakii</i>	5.5X10 <sup>6</sup> CFU/g	too many	too many	too many
	3.3X10 <sup>3</sup> CFU/g	74	too many	too many
Infant milk formula		Incubation time		
		1hr	3hr	5hr
		plaque formation/plate		
<i>C. sakazakii</i>	8.0X10 <sup>6</sup> CFU/mL	158	too many	too many
	4.2X10 <sup>3</sup> CFU/mL	35	too many	too many
Vegetable juice		Incubation time		
		1hr	3hr	5hr
		plaque formation/plate		
<i>C. sakazakii</i>	7.7X10 <sup>5</sup> CFU/mL	-	89	too many
	8.9X10 <sup>2</sup> CFU/mL	-	9	too many

## 라. *Cronobacter* spp. 분리주를 대상으로한 식품 적용

*Cronobacter* spp. 분리주를 대상으로 하여 숙주를 저해하는 용균성 파지의 수가 많은 것부터 적은 것들을 임의로 결정해 용균성 파지 cocktail을 이용해 조제 분유에 적용하여 검출하고자 하였다. 사용된 *Cronobacter* spp.는 KYU14, KYU51, KYU53, KYU72, KYU116, KYU129를 사용하여 약 2 log CFU/mL 수준으로 접종한 후 시간에 따라 검출되는 plaque를 확인하여 검출 정도를 확인한 결과는 Table 12와 같다. 그 결과 1시간 배양시에는 모든 분리주에서 plaque를 확인할 수 없었으나, 3시간 이후에는 20~111개의 plaque를 확인할 수 있었다. 그리고 5시간 이후에는 모든 분리주들에서 매우 많은 수의 plaque가 나타났다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 용균성 파지 cocktail을 이용해 *Cronobacter* spp.를 약 2 log CFU/mL 수준까지 검출이 가능하였으며, 전체적으로 실험이 수행되는 데 걸리는 시간은 약 20시간 미만으로 예상되며 용균성 파지의 가장 큰 장점이자 단점인 높은 숙주 특이성 때문에 매우 효과적인 검출 방법이 될 것으로 사료된다. 따라서 전통적인 배양 방법에 의한 검출과 본 연구를 수행하여 확인한 결과와 비교하면, 전통적인 배양 방법에 의한 검출의 경우 증균과 생화학적 특성 분석을 위해 최소 일주일이란 오랜 시간과 많은 비용이 소모되고 이와 함께 전문적인 지식이 필요한 반면, 본 연구에 수행했던 phage amplification assay의 경우 비전문인이라도 plaque의 형성 유무를 확인하게 되는 간단한 실험 방법과 함께 짧은 시간에도 특이적인 검출이 가능할 것이다. 그리고 PCR의 경우는 검출의 특이성과 시간적인 측면에서 많이 이용되고 있으나, 일반 식품 업체 등에서 수행하는 데 있어 초기에 고비용이 소요되고, 전문적인 지식을 필요로 하는 연구인력이 요구되는 단점이 있다. 또한 본 연구에서 얻어진 결과를 토대로 식품에 따른 추가적인 연구와 검출을 위한 최적에 조건에 대한 설정 등이 수반된다면 보다 다양한 식품에 적용할 수 있을 것으로 판단되며, 현재 시판 중인 Mycobacteria 검출용 kit에서처럼 상용 kit 형태로 연구 개발한다면 산업적으로 높은 수익이 발생할 것이다.



Table. 12. Detection of *Cronobacter* spp. isoaltes by virulent phage cocktails in infant milk formula

	Incubation time		
	1hr	3hr	5hr
	plaque formation/plate		
KYU14	-	72	too many
KYU51	-	82	too many
KYU53	-	32	87
KYU72	-	23	62
KYU105	-	74	108
KYU116	-	111	too many
KYU129	-	37	98

## 제 5 절 *C. sakazkaii* 길항성 유산균 및 *Bifidobacterium* 분리

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 발효식품으로부터 유산균의 분리

김치에서 유산균을 분리하기 위해 집과 식당, 시중에 파는 김치와 타락에서 유산균을 분리하였다. 총 sample은 10개로 유산균수 측정을 위해 사용한 배지는 BCP 첨가 평판측정용 한천배지(Plate Count Agar with Brom Cresol Purple), BCP 첨가한 MRS배지를 사용했다. 이 배지에 식품으로부터 분리한 시료를 적정한 승수로 희석한 균주를 접종하여 도말 후 접종이 끝난 Plate Count Agar with Brom Cresol Purple 배지와 BCP 첨가한 MRS배지는 35~37°C에서 72±3시간 배양한 후 발생한 황색의 집락을 유산균의 집락으로 확인하였다.

Sample에서 분리한 유산균의 집락을 미리 배양한 표준균주의 집락과 비교하여 크기와 모양에 따라 분류하고, 생화학적 특성 확인을 위해 3% KOH용액을 이용하여 Gram 양/음성 test와 catalase test를 기본적으로 수행하였다. 다음으로 API 50 CHL Kit 이용하여 당자화성 등의 특성 분석을 통해 동정 실험을 하였다. API 50 CHL Kit에 접종하기 위해 20시간 전에 배양한 유산균을 멸균 생리식염수를 이용하여 10 진 희석하였다. 희석한 배양액을 Kit에 접종하여 각 검출키트는 10배의 희석균수를 갖게 된다. 접종 양은 Kit에서 지시하는 양만큼을 접종한다. 접종 한 뒤 배양기에 넣고 48시간 후 Kit의 색 변화를 관찰하고, BioMerieux사에서 제공하는 동정 program을 이용하여 판독하고 유산균을 일차적으로 분리하였다.

#### 나. 발효 식품으로부터 *Bifidobacterium*의 분리

발효 식품으로부터 *Bifidobacterium*의 분리를 위해 유산균과 유사한 방법으로 수행하였으며, 추가적으로 16s rRNA sequence를 통해 homology 분석으로 통해 최종적

으로 *Bifidobacterium*를 선발하였다.

## 다. 분리된 유산균 및 *Bifidobacterium*에 의한 *C. sakazakii*의 길항 작용

김치 등의 발효 식품으로부터 분리한 *Bifidobacterium*와 유산균들이 *C. sakazakii*를 효과적으로 저해가 가능한지에 대한 실험은 수행하였다. 유산균과 *Bifidobacterium*를 L-cystein이 포함된 MRS broth(MRSC broth)에 접종한 후 혐기적 조건에서 3회 활성화 시킨 후 100mL의 MRSC broth에 접종하여 혐기적 조건에서 배양하였다. 그리고 배양 상등액으로부터 bacteriocin을 얻기 위해 chloroform을 이용하는 방법으로 추출하여 *C. sakazakii*에 저해 정도를 double agar overlay 방법으로 확인하였다.

*Bifidobacterium* BF-8과 *Bifidobacterium* BF2-29를 MRS broth에서 배양한 후 원심분리하고 상등액을 제균한 후 pH7.0으로 조정한 배양액과 pH7.0으로 조정하지 않은 상등액을 각각 *C. sakazakii*의 생육 억제 정도를 흡광도를 측정하여 비교하였다. 또한 고농도의 농축을 위해 유기 용매 추출법 대신 동결 건조를 하여 수행하였다. *Bifidobacterium* BF-8과 *Bifidobacterium* BF2-29를 100mL MRS broth에서 배양한 후 원심분리하고 상등액을 취해 pH7.0으로 조정하고 0.22um membrane filter를 이용 제균하고, 동결 건조를 통해 농축하였다. 동결 건조를 수행 후 이를 멸균수를 이용해 현탁한 후 농도에 따른 *C. sakazakii*의 생육 억제 효과를 흡광도를 측정하여 확인하였다. 또한 동결 건조된 배양 상등액을 LB broth와 조제 분유에 각각 혼합하고 *C. sakazakii*를 접종하였을 때의 생육도를 시간에 따라 DFI agar에 10진 희석하여 도말하여 확인하였다.

## 라. 선발균주의 생육특성 분석

### (1) 선발균주의 생육에 대한 탄소원의 영향

*C. sakazaki* 균주에 대한 항균활성이 우수한 것으로 선정된 BF-8, BF-29의 효과적인 생산을 위하여 균주의 성장에 대한 탄소원의 영향을 평가하였다. 기본 배지로는 Lactobacilli MRS broth의 기본조성(Table 13)을 바탕으로 dextrose를 다양한 탄소원으로 대체하여 시간별 생육을 평가하였다. Starter는 동일한 배지(Hardy

Diagnostics 사, 미국)에 18시간 배양하여 활성화한 것을 사용하였고 각각의 배지에 1% (v/v)이 되도록 첨가하여 시간별로 OD를 측정하였다. 각각 탄소원의 농도는 2%로 하였으며 사용한 탄소원으로는 Sucrose, Lactose, Dextrose, 액상과당, Fructo-oligosaccharide, Xylo-oligosaccharide, Rhamnose, Galacto-oligosaccharide, Arabinose, Maltodextrin, 결정과당, Pectin 등을 사용하였다. 초기 pH는 6.5로 조정하여 37°C에서 혐기적으로 배양하였다. 모든 실험은 동일한 조건에서 3회 반복하여 실시한 후 평균값을 구하였다.

## (2) 선발균주의 생육에 대한 질소원의 영향

1차 탄소원 연구를 수행하면서 각 탄소원에서 배양한 배양액의 *C. sakazaki* 균주에 대한 항균활성을 평가하여 상대적으로 활성이 우수한 것으로 나타난 BF-8에 대하여 최적 질소원을 탐색하고자 하는 연구를 수행하였다. 탄소원은 maltodextrin 혹은 액상과당을 2% 첨가하여 배지를 제조하고 질소원으로는 다양한 펩톤류(Fish peptone, Beef extract, soy peptone, Proteose peptone)를 1% 혹은 2% 되도록 Table 14와 같이 배합하여 제조하였다. BF8균주는 lactobacilli MRS broth에 18h 배양하여 활성화한 후 배양액에 1% v/v이 되도록 접종하였다. 배지의 초기 pH는 6.5가 되도록 조정한 후 37°C에서 혐기적으로 배양하였다.

Table 13. Composition of Lactobacilli MRS broth.

Composition	Source	Grams/Litre	%
Dextrose	Carbon source	20	2
Meat Peptone	Nitrogen source	10	1
Beef Extract	Nitrogen source	10	1
Yeast Extract	Nitrogen source	5	0.5
Sodium Acetate	Growth factor	5	0.5
Disodium Phosphate	Buffer	2	0.2
Ammonium Citrate	Growth factor	2	0.2
Tween 80	Growth factor	1	0.1
Magnesium Sulfate	Growth factor	0.1	0.01
Manganese Sulfate	Growth factor	0.05	0.005
L-cysteine HCl	Reduction agent	0.5	0.05

Table 14. Composition of modified MRS broth

Composition	Source	Grams/Litre	%
maltodextrin or fructose syrup	Carbon source	20	2
Nitrogen source group(I)	Nitrogen source	10	1
Nitrogen source group(II)	Nitrogen source	10	1
Yeast Extract	Nitrogen source	5	0.5
Sodium Acetate	Growth factor	5	0.5
Disodium Phosphate	Buffer	2	0.2
Ammonium Citrate	Growth factor	2	0.2
Tween 80	Growth factor	1	0.1
Magnesium Sulfate	Growth factor	0.1	0.01
Manganese Sulfate	Growth factor	0.05	0.005
L-cysteine HCl	Reduction agent	0.5	0.05

#### 마. *Bifidobacterium* BF-8의 bacteriocin의 정제

동결 건조한 시료를 1 ml의 3차 증류수에 녹이고 0.45  $\mu$ m 여과지를 통해 여과한 후 0.1% trifluoroacetic acid 용액으로 평형화시킨 C18 칼럼에 주입하여 역상 HPLC로 분리하였다. 실험에 사용한 조건은 다음과 같다.

##### <Conditions of HPLC analysis>

- Mobile phase: 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) in H<sub>2</sub>O (A pump)
- Gradient: 0-100% acetonitrile with 0.1% TFA (B pump)
- Running time: 40 min
- Flow rate: 1 mL/min
- Fraction volume: 1 mL
- Injection volume: 50  $\mu$ L
- Column temp.: RT
- Detection wavelength: 280 nm

##### <Column>

- ACE 5 C<sub>18</sub> column (particle size: 3  $\mu$ m; 4.6x150 mm)

#### 바. *Bifidobacterium* BF-8의 cell cytotoxicity

분리된 *Bifidobacterium* BF-8의 Hep-2 cell에서의 cytotoxicity를 확인을 위해 MTT assay를 통해 수행하였다. Hep-2 cell을 haemocytometer를 사용하여 cell 수를 확인한 후 96 well plate에 cell을 분주하고 *Bifidobacterium* BF-8의 배양상등액과 *Bifidobacterium* BF-8의 pellet을 PBS buffer로 현탁한 후 약 6 log CFU/mL 수준으로 각각 well에 첨가한다. 그리고 2시간, 4시간 배양한 후 시료를 제거하고 각 well에 MTT solution을 첨가한 후 4시간 동안 추가적으로 배양한 후 MTT solution을 제거하고 DMSO를 첨가한다. 그리고 15분 동안 shaker를 이용 충분히 혼합한 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도 540nm에서 측정하였다.

## 사. Pilot 생산

선발균주를 8ml MRS 배지에서 1차 활성화를 거친 후 500mL MRS 배지에서 2차 활성화 하고 5L에서 3차 활성화를 거친 후 50L에서 배양하면서 시험생산을 실시하였다. 5L 부터는 최적 조건으로 선정된 배지조성을 적용하였으며 4N NaOH로 pH를 5.0으로 일정하게 유지하며 혐기적인 배양을 실시하였다. OD의 측정은 Trucell로 on-line monitoring 하였다. 출력은 4mA를 기준으로 설정되었다.



## 2. 결과 및 고찰

### 가. 발효식품으로부터 유산균의 분리

김치와 타락에서 분리한 유산균 의심 집락은 평균  $10^5$  CFU/g의 수준으로 나타났으며, MRS에서 생육한 집락의 형태학적인 특성에 따라 분리한 후 Gram test, catalase test, 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성 확인 등을 통해 유산균으로 의심되는 균을 선별하였다. 그리고 API 50 CHL kit를 이용하여 당자화성 등의 생화학적 특성을 확인하고 그 결과를 동정 프로그램을 통해 확인하였으며, 동정 결과(%)가 85% 이상인 균주만을 선별하였다. 그 결과 *Lactobacillus curvatus*, *Leuconotoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*를 각각 분리하였다.

Table 15 Identification of lactic acid bacteria by API CHL kit

	Strain No.(ID %)																	
	① (94.5)	② (99.9)	③ (95.8)	④ (93.2)	⑤ (99.9)	⑥ (98.5)	⑦ (99.6)	⑧ (99.9)	⑨ (97.0)	⑩ (96.8)	⑪ (98.7)	⑫ (96.6)	⑬ (98.1)	⑭ (92.3)	⑮ (94.2)	⑯ (86.9)	⑰ (99.6)	
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RIB	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
DXYL	+	+	+	+	+	-	+	?	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
LXYL	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SBE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
AMY	-	-	?	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
ARB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰
SAL	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
CEL	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
MAL	+	?	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
LAC	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
MEL	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
SAC	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
TRE	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
RAF	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
TUR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	+	-	-	-	+	-	-	?	+	+	+	+	-	-	+
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“?” be hard to distinguish

*Lactobacillus curvatus*: ①, ②, ③, ⑦, ⑧, *Lactococcus lactis*: ⑥, ⑫,

*Lactobacillus fermentum*: ⑬, *Weissella confusa*: ⑨, ⑩, ⑭, *Leuconstoc mensenteroides*: ④, ⑤, ⑯

*Streptococcus thermophilus*: ⑮, *Lactobacillus plantarum*: ⑪, ⑰

#### 나. 유아 분변으로부터 *Bifidobacterium*의 분리

유아 분변으로부터 의심되는 *Bifidobacterium* strains 들 중 최종적으로 선정된 16개 균주들을 16S rRNA analysis, carbohydrate fermentation pattern(API test), Morphology 다음과 같은 방법에 의하여 동정하였다.

Table 16. 16S rRNA Analysis identified BF8

Organism & Strain	Query coverage	E-Value	Max identity
<i>Bifidobacterium animalis</i>	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium animalis</i> strain JSQ1	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium animalis</i> strain LZCL	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium animalis</i>	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium animalis</i> YIT 4090	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium animalis</i> YIT 4119	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium lactis</i> YIT 4121	98%	0.0	99%
<i>B.lactis</i>	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> strain KLDS 2.0609	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium</i> sp	98%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium infantis</i> Y1	98%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium animalis</i>	98%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	98%	0.0	97%
<i>Bacterium ic1332</i>	98%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	98%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	98%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	98%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	98%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	98%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	98%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain THT-010301	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG3	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium</i> sp. group III-3	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium</i> sp. BBDP69	98%	0.0	95%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11	98%	0.0	95%
<i>Metascardovia tsurumii</i>	98%	0.0	95%

The strain was approximately estimated to *Bifidobacterium animalis*

Table 17. 16S rRNA Analysis identified BF2-29

Organism & Strain	Query coverage	E-Value	Max identity
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium</i> sp. h12	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> strain KLDS 2.0611	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium</i> sp. oral strain A32ED	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium dentium</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium</i> sp. 65947	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium</i> sp. TM-7	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> isolate L2-32	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> clone nru-5	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> clone nru-1	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium</i> sp. PL1	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> strain klds.02.0608	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCTC 3202	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> strain THT-010201	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> strain THT-010101	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium infantis</i>	97%	0.0	97%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain THT-010301	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain BGM6	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG3	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i>	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7017	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7016	97%	0.0	96%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 1273	97%	0.0	96%

The strain was approximately estimated to *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

Table 18. 16S rRNA Analysis identified BF2-31

Organism & Strain	Query coverage	E-Value	Max identity
<i>Bifidobacterium longum</i> strain THT-010301	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG3	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain KLDS 2.0605	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain KB 6	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> strain BT1	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium infantis</i> strain KB 10	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> strain THT-010201	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium infantis</i>	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain PFK1	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain BGM6	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7017	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7016	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 1273	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain KB 92	97%	0.0	98%
<i>Butyrate-producing bacterium</i> T1-817	95%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain BR2	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7019	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15708	97%	0.0	98%

The strain was approximately estimated to *Bifidobacterium longum*

Table 19. 16S rRNA Analysis identified BF2-41

Organism & Strain	Query coverage	E-Value	Max identity
<i>Bifidobacterium longum</i> strain THT-010301	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG3	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain BG	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium</i> sp. group III-3	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain KLDS 2.0605	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain KB 6	97%	0.0	99%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> strain BT1	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium infantis</i> strain KB 10	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> THT-010201	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium infantis</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i>	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> strain PFK1	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain BGM6	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7017	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7016	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 1273	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain KB 92	97%	0.0	98%
<i>Butyrate-producing bacterium</i> T1-817	95%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain BR2	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium breve</i> strain JCM 7019	97%	0.0	98%
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15708	97%	0.0	97%

The strain was approximately estimated to *Bifidobacterium longum*



Figure 44. Fermentation patterns of BF8 were determined by API 50CHL system

[0] Control	[1] Glycerol	[2] Erycerol
[3] D-Arabinose	[4] L-Arabinose	[5] L-Ribose
[6] D-Xylose	[7] L-Xylose	[8] D-Adonitol
[9] Methyl-βD-Xylopyranoside	[10] D-Galactose	[11] D-Glucose
[12] D-Fructose	[13] D-Mannose	[14] L-Sorbose
[15] L-Rhamnose	[16] Dulcitol	[17] Inositol
[18] D-Mannitol	[19] D-Sorbitol	[20] Methyl-αD-Mannopyranoside
[21] Methyl-αD-Glucopyranoside	[22] N-Acetylglucosamine	[23] Amygdalin
[24] Arbutin	[25] Esculin ferric citrate	[26] Salicin
[27] D-Cellobiose	[28] D-Maltose	[29] D-Lactose
[30] D-Melibiose	[31] D-Saccharose	[32] D-Trehalose
[33] Inulin	[34] D-Melezitose	[35] D-Raffinose
[36] Amidon(starch)	[37] Glycogen	[38] Xylitol
[39] Gentiobiose	[40] D- Turanose	[41] D-Lyxose
[42] D-Tagatose	[43] D-Fucose	[44] L-Fucose
[45] D-Arabitol	[46] L-Arabitol	[47] Potassium gluconate
[48] Potassium 2-Ketogluconate	[49] Potassium 5-Ketogluconate	

Red part indicated that BF8 used the carbohydrate. The % identification resulted in 98% with *Bifidobacterium animalis* we named BF8 '*Bifidobacterium animalis* BF8'

Figure 45. Fermentation patterns of v were determined by API 50CHL system

[0] Control	[1] Glycerol	[2] Erycerol
[3] D-Arabinose	[4] L-Arabinose	[5] L-Ribose
[6] D-Xylose	[7] L-Xylose	[8] D-Adonitol
[9] Methyl-βD-Xylopyranoside	[10] D-Galactose	[11] D-Glucose
[12] D-Fructose	[13] D-Mannose	[14] L-Sorbose
[15] L-Rhamnose	[16] Dulcitol	[17] Inositol
[18] D-Mannitol	[19] D-Sorbitol	[20] Methyl-αD-Mannopyranoside
[21] Methyl-αD-Glucopyranoside	[22] N-Acetylglucosamine	[23] Amygdalin
[24] Arbutin	[25] Esculin ferric citrate	[26] Salicin
[27] D-Cellobiose	[28] D-Maltose	[29] D-Lactose
[30] D-Melibiose	[31] D-Saccharose	[32] D-Trehalose
[33] Inulin	[34] D-Melezitose	[35] D-Raffinose
[36] Amidon(starch)	[37] Glycogen	[38] Xylitol
[39] Gentiobiose	[40] D- Turanose	[41] D-Lyxose
[42] D-Tagatose	[43] D-Fucose	[44] L-Fucose
[45] D-Arabitol	[46] L-Arabitol	[47] Potassium gluconate
[48] Potassium 2-Ketogluconate	[49] Potassium 5-Ketogluconate	

Red part indicated that BF2-16 used the carbohydrate.

Figure 46. Fermentation patterns of v were determined by API 50CHL system

[0] Control	[1] Glycerol	[2] Erycerol
[3] D-Arabinose	[4] L-Arabinose	[5] L-Ribose
[6] D-Xylose	[7] L-Xylose	[8] D-Adonitol
[9] Methyl-βD-Xylopyranoside	[10] D-Galactose	[11] D-Glucose
[12] D-Fructose	[13] D-Mannose	[14] L-Sorbose
[15] L-Rhamnose	[16] Dulcitol	[17] Inositol
[18] D-Mannitol	[19] D-Sorbitol	[20] Methyl-αD-Mannopyranoside
[21] Methyl-αD-Glucopyranoside	[22] N-Acetylglucosamine	[23] Amygdalin
[24] Arbutin	[25] Esculin ferric citrate	[26] Salicin
[27] D-Cellobiose	[28] D-Maltose	[29] D-Lactose
[30] D-Melibiose	[31] D-Saccharose	[32] D-Trehalose
[33] Inulin	[34] D-Melezitose	[35] D-Raffinose
[36] Amidon(starch)	[37] Glycogen	[38] Xylitol
[39] Gentiobiose	[40] D- Turanose	[41] D-Lyxose
[42] D-Tagatose	[43] D-Fucose	[44] L-Fucose
[45] D-Arabitol	[46] L-Arabitol	[47] Potassium gluconate
[48] Potassium 2-Ketogluconate	[49] Potassium 5-Ketogluconate	

Red part indicated that BF2-29 used the carbohydrate. The % identification resulted in 95% with *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. we named BF2-29 '*Bifidobacterium pseudocatenulatum* BF2-29'

Figure 47. Fermentation patterns of BF2-31 were determined by API 50CHL system

[0] Control	[1] Glycerol	[2] Erycerol
[3] D-Arabinose	[4] L-Arabinose	[5] L-Ribose
[6] D-Xylose	[7] L-Xylose	[8] D-Adonitol
[9] Methyl-βD-Xylopyranoside	[10] D-Galactose	[11] D-Glucose
[12] D-Fructose	[13] D-Mannose	[14] L-Sorbose
[15] L-Rhamnose	[16] Dulcitol	[17] Inositol
[18] D-Mannitol	[19] D-Sorbitol	[20] Methyl-αD-Mannopyranoside
[21] Methyl-αD-Glucopyranoside	[22] N-Acetylglucosamine	[23] Amygdalin
[24] Arbutin	[25] Esculin ferric citrate	[26] Salicin
[27] D-Cellobiose	[28] D-Maltose	[29] D-Lactose
[30] D-Melibiose	[31] D-Saccharose	[32] D-Trehalose
[33] Inulin	[34] D-Melezitose	[35] D-Raffinose
[36] Amidon(starch)	[37] Glycogen	[38] Xylitol
[39] Gentiobiose	[40] D- Turanose	[41] D-Lyxose
[42] D-Tagatose	[43] D-Fucose	[44] L-Fucose
[45] D-Arabitol	[46] L-Arabitol	[47] Potassium gluconate
[48] Potassium 2-Ketogluconate	[49] Potassium 5-Ketogluconate	

Red part indicated that BF2-31 used the carbohydrate. The % identification resulted in 97% with *Bifidobacterium longum*. we named BF2-31 '*Bifidobacterium longum* BF2-31

Figure 48. Fermentation patterns of BF2-41 were determined by API 50CHL system

[0] Control	[1] Glycerol	[2] Erycerol
[3] D-Arabinose	[4] L-Arabinose	[5] L-Ribose
[6] D-Xylose	[7] L-Xylose	[8] D-Adonitol
[9] Methyl-βD-Xylopyranoside	[10] D-Galactose	[11] D-Glucose
[12] D-Fructose	[13] D-Mannose	[14] L-Sorbose
[15] L-Rhamnose	[16] Dulcitol	[17] Inositol
[18] D-Mannitol	[19] D-Sorbitol	[20] Methyl-α D-Mannopyranoside
[21] D-Glucopyranoside	Methyl-α [22] N-Acetylglucosamine	[23] Amygdalin
[24] Arbutin	[25] Esculin ferric citrate	[26] Salicin
[27] D-Cellobiose	[28] D-Maltose	[29] D-Lactose
[30] D-Melibiose	[31] D-Saccharose	[32] D-Trehalose
[33] Inulin	[34] D-Melezitose	[35] D-Raffinose
[36] Amidon(starch)	[37] Glycogen	[38] Xylitol
[39] Gentiobiose	[40] D- Turanose	[41] D-Lyxose
[42] D-Tagatose	[43] D-Fucose	[44] L-Fucose
[45] D-Arabitol	[46] L-Arabitol	[47] Potassium gluconate
[48] 2-Ketogluconate	Potassium [49] 5-Ketogluconate	Potassium

Red part indicated that BF2-41 used the carbohydrate. The % identification resulted in 98% with *Bifidobacterium longum*. we named BF2-41 '*Bifidobacterium longum* BF2-41'

#### 다. 유산균과 *Bifidobacterium*의 *C. sakazkai*에 대한 저해 효과

분리된 *Bifidobacterium* strain 들의 *C. sakazkai*에 대한 저해 효과를 확인한 결과는 Fig. 49와 같다. *Bifidobacterium*가 생산하는 bacteriocin(-like substance)을 *C. sakazkai*가 접종된 5mL TSB에 추출한 bacteriocin(-like substance) extract를 접종 후 시간에 따른 생육을 비교한 결과는 Fig. 50과 같다. 기존에 보고된 *Bifidobacterium* 관련된 bacteriocin 혹은 bacteriocin like substance들은 *Bifidobacterium bifidum*에서 최초로 발견된 이후 다양한 *Bifidobacterium* spp.에서 보고되고 있으며, pathogenic *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* 등 다양한 host spectrum을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 하지만 *C. sakazkai*를 저해하는 *Bifidobacterium*에 대한 보고는 없었으나, 본 연구를 통해 발효 식품에서 분리된 *Bifidobacterium*가 생산하는 bacteriocin(-like substance)에서 *C. sakazkai*를 특이적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이를 이용하여 sanitizer, 식품첨가물, 정장제 등으로의 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 분리된 *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*, *L. curvatus*, *W. confusa* 등에 의한 *C. sakazkai*의 대한 저해 효과를 확인한 결과, 분리된 유산균들에 의한 *C. sakazkai*에 대한 저해 효과는 없는 것으로 보여지나, 저해를 위한 bacteriocin 분비의 최적 조건을 위한 추가적인 확인이 필요할 것이라 사료된다.

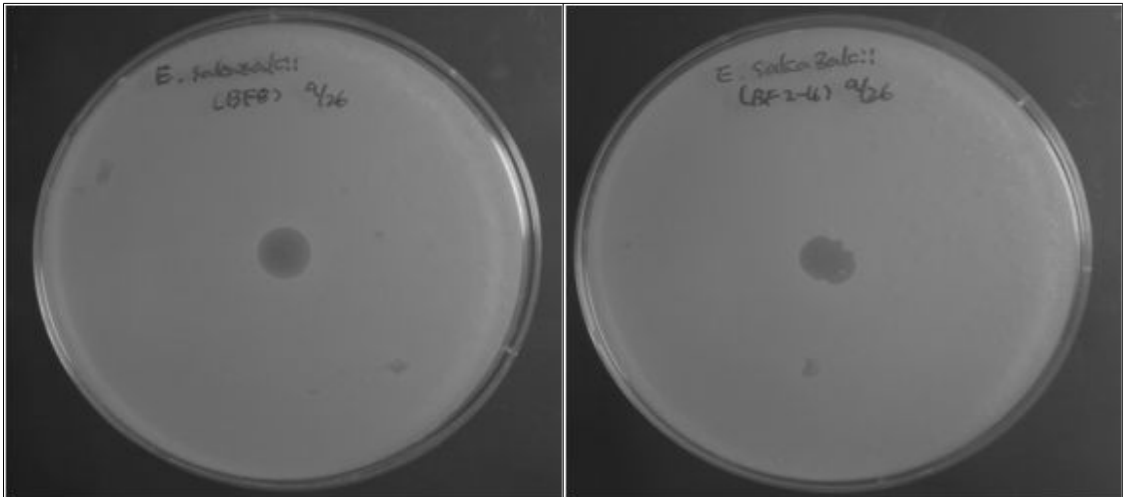


Fig. 49. Inhibition of *C. sakazakii* by bacteriocin of *Bifidobacterium* isolates

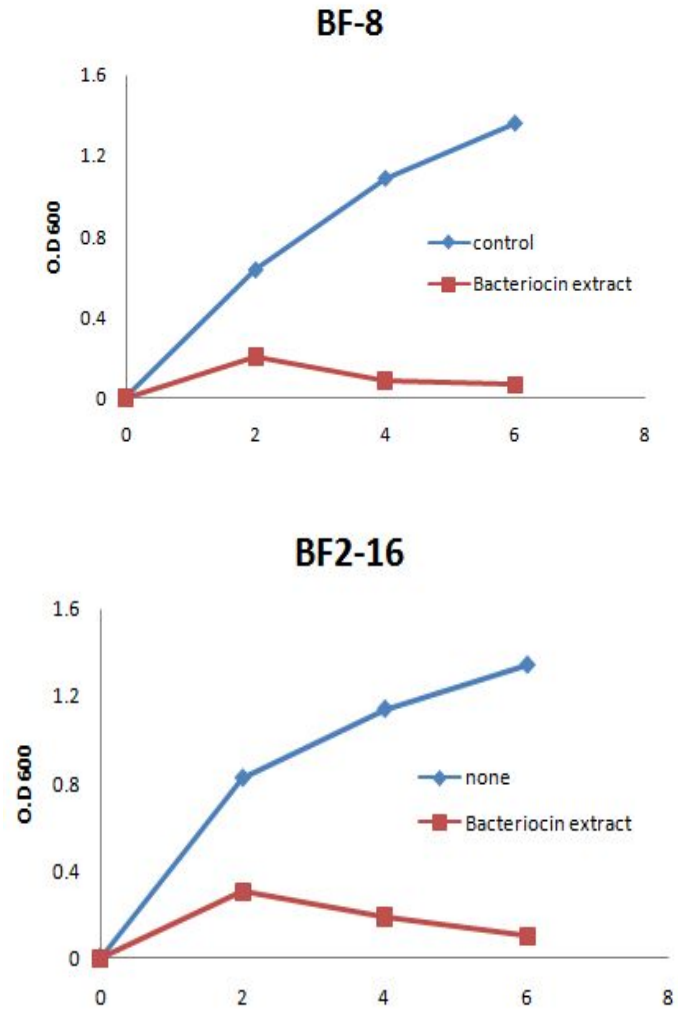


Fig. 50. Growth inhibition of *C. sakazkai* by bacteriocin(-like substance) of *Bifidobacterium* isolates



발효 식품 등으로부터 분리된 다양한 *Bifidobacterium*와 젖산균들 중 상대적으로 *C. sakazakii*에 대한 항균 효과가 좋은 *Bifidobacterium* BF8, *Bifidobacterium* BF2-29, *Leuconostoc mesenteroides* LAB kw5, *Streptococcus thermophilus* LAB kw15를 *Cronobacter* spp.의 감소 효과를 확인하고자 하였다. *Bifidobacterium*와 젖산균 배양액을 원심분리 후 상등액을 취해 pH 7.0으로 조정 한 후 조정하지 않은 상등액을 제균하여 이를 희석하여 microplate에 접종한 후 시간에 따른 *C. sakazakii*의 생육 억제 정도를 확인하였다. 실험 결과 pH 7.0으로 조정 한 상등액의 경우 *C. sakazakii*의 억제 정도가 미미한 것으로 나타났으며, pH 7.0으로 조정하지 않은 상등액의 경우 저해 효과가 나타났다(Fig. 51, 52). 이는 *Bifidobacterium*가 생산하는 다양한 유기산들에 의한 것이거나, bacteriocin like substance의 활성이 매우 낮은 농도가 매우 낮아 나타나는 현상으로 판단된다.

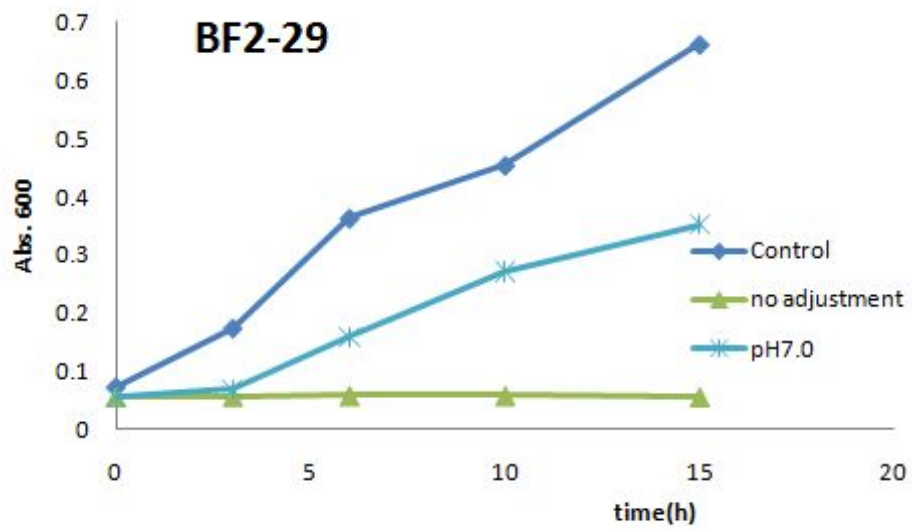
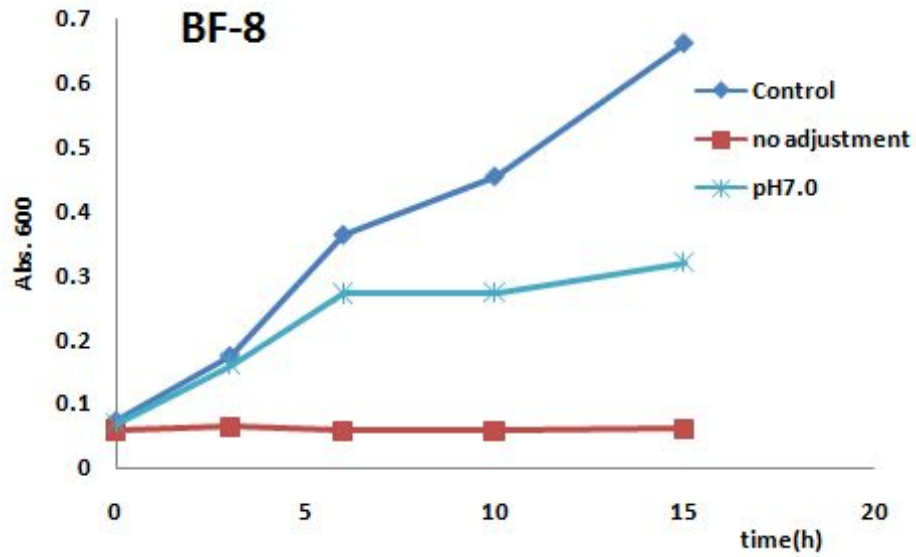


Fig. 51. Growth inhibition of *C. sakazakii* by supernatant of *Bifidobacterium* spp.

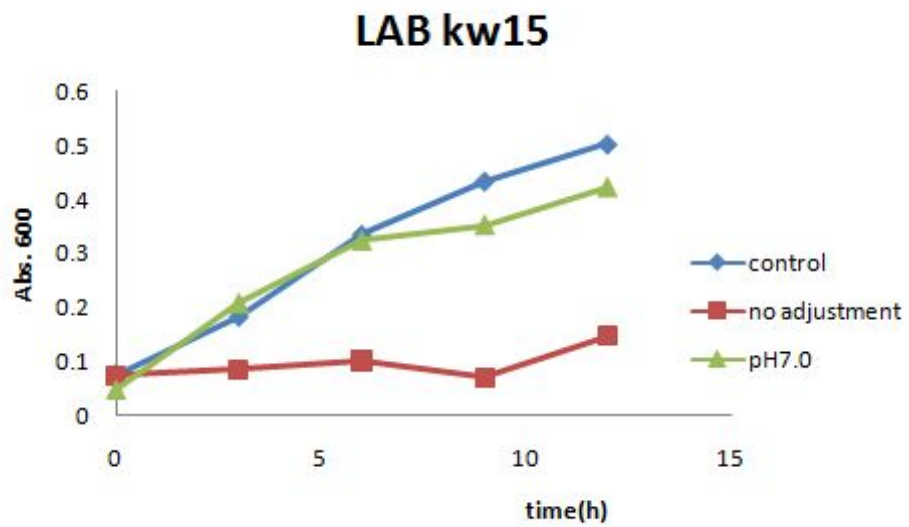
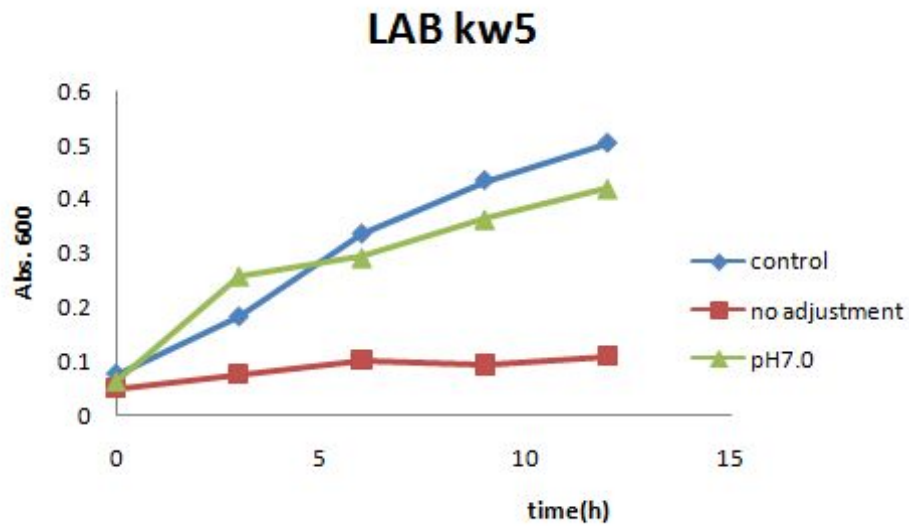


Fig. 52. Growth inhibition of *C. sakazakii* by supernatant of *L. mesenteroides* LAB kw5 and *S. thermophilus* LAB kw15

*Cronobacter* spp.에 대해 항균 효과를 젖산균과 Bifidobacteria 들 중 젖산균의 경우 유사한 결과가 있었기 때문에 본 연구에서는 Bifidobacteria를 중심으로 진행하였다. 따라서 *Bifidobacterium* spp.의 배양 상등액 농도를 높여 저해 효과를 확인하기 위해 배양 상등액을 pH 7.0으로 조정한 후 동결 건조를 수행하고 이를 1g/mL에 농도로 현탁한 후 희석해서 이용하여 *C. sakazakii*의 저해 효과를 microplate를 이용하여 확인하고자 하였으며, 또한 *C. sakazakii*의 viable cell을 DFI agar에 10진 희석하여 도말한 후 24시간 후에 집락을 계수한 결과는 Fig. 53과 같다. 배양 상등액을 동결 건조한 후 이를 이용해 생육 저해를 확인한 결과 약 40mg/mL의 농도에서 *C. sakazakii*의 생육이 되지 않았음을 확인하였으며, 또한 이때의 *C. sakazakii*의 viability를 DFI agar에 도말하여 확인한 결과 6시간 이후에 *C. sakazakii*가 검출되지 않았다(Fig. 54). 따라서 앞서 결과에서 bacteriocin의 낮은 활성으로 인해 고농도로 농축을 통해 *C. sakazakii*를 제어할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 실제 조제 분유와 배양 상등액을 동결 건조한 것을 혼합하여 *C. sakazakii*의 저해 효과를 확인한 결과에서는 조제 분유에서는 *C. sakazakii*가 6시간 이후에는 약 7 log CFU/mL 수준으로 증가하였으나, *Bifidobacterium* spp.의 동결 건조한 것을 혼합했을 경우 초기 균수인 4 log CFU/mL수준이 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 55). 이는 조제 분유와 동결 건조한 것이 혼합되면서 실제 식품에서는 효과가 감소함을 알 수 있었다. 따라서 조제 분유의 성분과 *Bifidobacterium* spp.의 배양 상등액의 조성에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

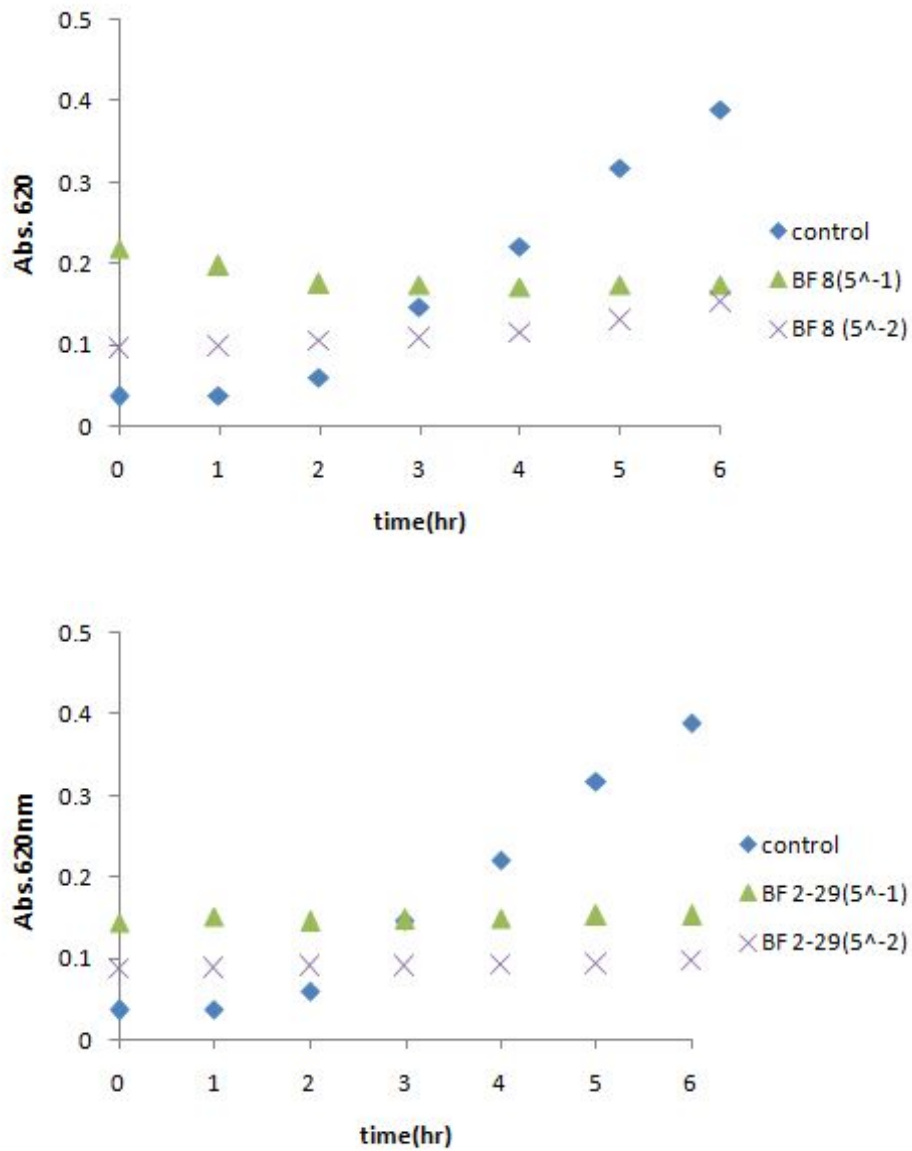


Fig. 53. Growth inhibition of *C. sakazakii* by lyophilized supernatant of *Bifidobacterium* spp.

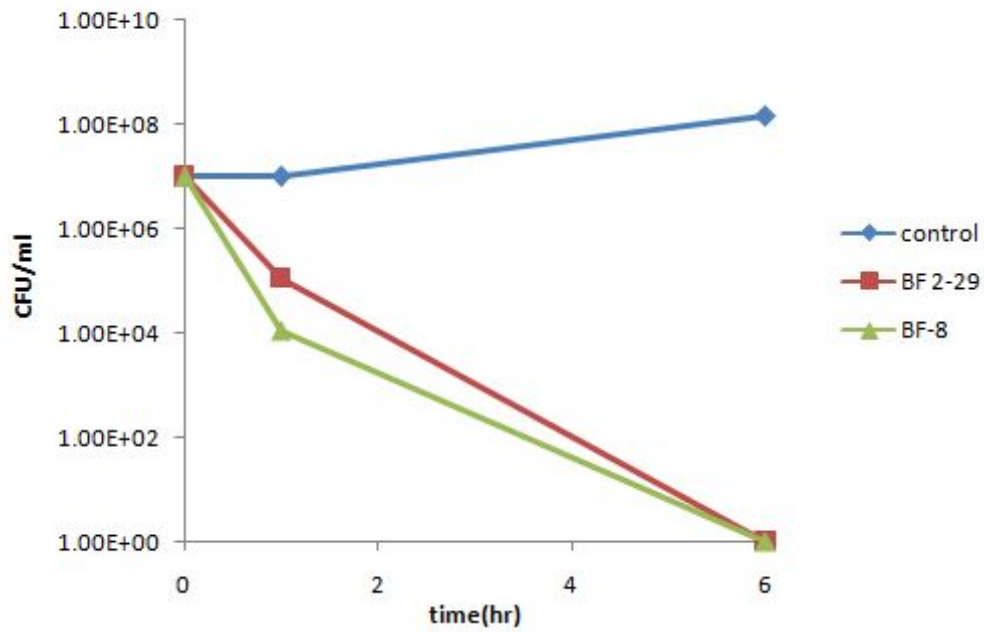


Fig. 54. Viability loss of *C. sakazakii* by lyophilized supernatant of *Bifidobacterium* spp.

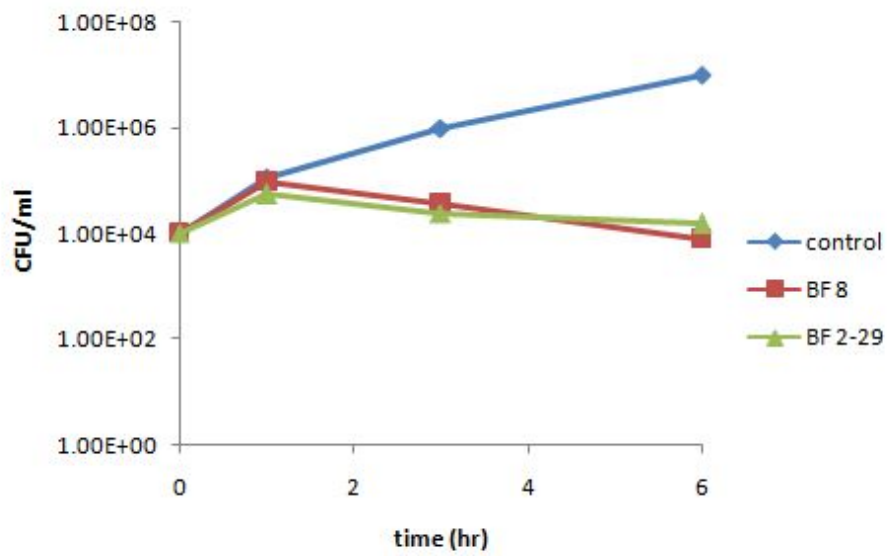


Fig. 55. Viability of *C. sakazakii* in infant milk formula with lyophilized supernatant of *Bifidobacterium* spp.

## 라. 선발균주의 생육특성 분석

### (1) *Bifidobacterium* BF8의 생육에 대한 탄소원의 영향

각 탄소원에 대한 *Bifidobacterium* BF8의 성장을 관찰한 결과 sucrose, maltodextrin, fructose syrup 등이 가장 우수한 생육을 보였다. 반면 rhamnose, arabinose, 결정과당 등에서는 성장을 관찰할 수 없었다. sucrose는 성장 속도가 가장 빠르게 나타났으며 maltodextrin의 경우는 성장속도는 느렸지만 최대의 OD값을 나타내었다. 액상과당은 비교적 우수한 생육을 보인데 반하여 결정과당은 거의 성장에 기여하지 못하여 흥미로운 결과를 보였다. 16시간 경과 후 OD값에서는 sucrose가 가장 높게 나타났지만 배양액에서의 생균수를 측정한 결과 maltodextrin에서 가장 높은  $2.55 \times 10^9$ CFU/ml을 보였다. 따라서 BF8의 고농도 배양과 효율적인 생산을 위해서는 탄소원으로는 maltodextrin이 가장 우수할 것으로 판단되었다.



Table 20. Growth of *Bifidobacterium* sp. BF8 on various carbon sources.

	control <sup>1</sup>	12h <sup>2</sup>	14h	16h	18h	final pH
1	0.155	0.863	0.906	0.952	0.963	4.55
MRS	0.151	0.885	0.918	0.966	0.977	
(Hardy)	0.147	0.886	0.933	0.971	0.986	
2	0.084	1.108	1.142	1.168	1.147	4.40
Sucrose	0.084	1.120	1.169	1.176	1.140	
	0.083	1.150	1.172	1.159	1.155	
3	0.086	0.679	0.709	0.734	0.756	4.93
Lactose	0.085	0.700	0.726	0.756	0.768	
	0.086	0.713	0.739	0.770	0.772	
4	0.084	0.814	0.868	0.927	0.937	4.58
Dextrose	0.084	0.841	0.888	0.951	0.962	
	0.085	0.860	0.905	0.969	0.976	
5	0.086	0.861	0.900	0.952	0.950	4.61
fructose syrup	0.085	0.871	0.911	0.959	0.944	
	0.084	0.896	0.928	0.970	0.974	
6	0.084	0.871	0.871	0.886	0.886	4.83
Fructo-	0.084	0.863	0.871	0.889	0.893	
oligosaccharide	0.083	0.881	0.877	0.888	0.888	
7	0.097	0.806	0.830	0.857	0.877	4.49
Xylo-	0.097	0.845	0.862	0.891	0.905	
oligosaccharide	0.097	0.850	0.869	0.899	0.915	
8	0.084	0.034	0.037	0.039	0.042	6.27
Rhamnose	0.084	0.033	0.035	0.039	0.042	
	0.082	0.036	0.040	0.042	0.045	
9	0.083	0.853	0.850	0.866	0.882	4.75
Galacto-	0.083	0.866	0.852	0.869	0.881	
oligosaccharide	0.083	0.861	0.857	0.867	0.886	
10	0.084	0.045	0.049	0.053	0.059	6.08
Arabinose	0.084	0.064	0.066	0.073	0.078	
	0.085	0.059	0.062	0.068	0.079	
11	0.084	0.912	0.993	1.105	1.187	4.49
Maltodextrin	0.083	0.898	0.970	1.096	1.169	
	0.085	0.858	0.935	1.063	1.149	
12	0.083	0.093	0.096	0.101	0.105	6.04
결정과당	0.083	0.089	0.094	0.097	0.099	
	0.083	0.091	0.093	0.099	0.107	
13	0.193	0.685	0.719	0.805	0.870	4.61
Pectin	0.180	0.637	0.712	0.792	0.862	
	0.183	0.604	0.687	0.792	0.860	

<sup>1)</sup> control means the OD of each medium at starting point.

<sup>2)</sup> OD at each time - each control

Table 21. Viable count of *Bifidobacterium* sp. BF8 at 16hr.

	* 10 <sup>7</sup> cfu/ml	Mean
MRS	169	1.87X10 <sup>9</sup>
	191	
	202	
Sucrose	126	1.30X10 <sup>9</sup>
	129	
	136	
Dextrose	160	1.87X10 <sup>9</sup>
	188	
	214	
fructose syrup	209	2.20X10 <sup>9</sup>
	210	
	243	
Maltodextrin	246	2.55X10 <sup>9</sup>
	251	
	269	

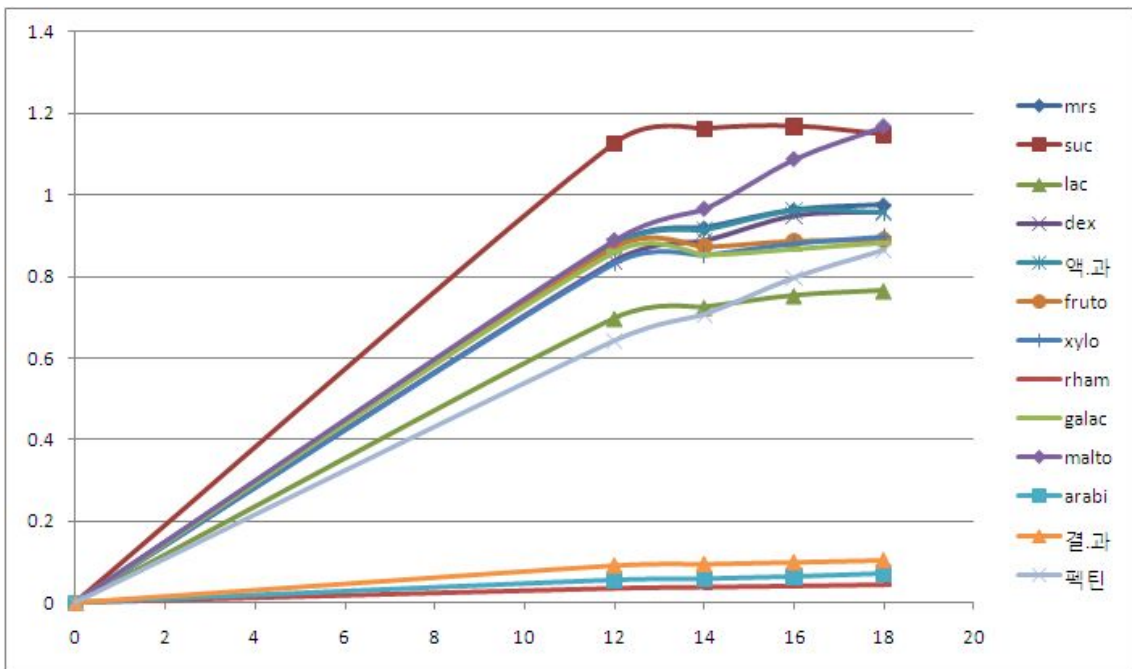


Fig. 56. Growth curve of *Bifidobacterium* sp. BF8 according to each carbon sources.

(2) *Bifidobacterium* sp. BF29의 생육에 대한 탄소원의 영향

BF8과 동일한 방법으로 각 탄소원에 대한 *Bifidobacterium* sp. BF29의 성장을 관찰한 결과 BF8과는 다르게 Fructooligosaccharide, fructose syrup, lactose 등에서 우수한 성장을 보였다. 반면에 rhamnose, arabinose, 결정과당에서는 저조한 생육을 보였다. 16시간 경과후에 배양액에서의 생균수를 측정한 결과 액상과당에서 가장 높은  $3.12 \times 10^9$  CFU/ml을 나타내었다.

Table 22. Growth of *Bifidobacterium* sp. BF29 on various carbon sources.

	control <sup>1)</sup>	12h <sup>2)</sup>	14h	16h	18h	final pH
1	0.167	0.833	0.899	0.914	0.927	4.49
MRS	0.161	0.830	0.887	0.889	0.920	
(Hardy)	0.163	0.840	0.897	0.918	0.928	
2	0.081	0.855	0.941	0.930	0.951	4.47
Sucrose	0.081	0.933	0.948	0.963	0.969	
	0.085	0.939	0.951	0.965	0.995	
3	0.085	1.003	1.043	1.087	1.096	4.46
Lactose	0.085	0.996	1.001	1.078	1.119	
	0.084	0.987	1.033	1.107	1.116	
4	0.084	0.916	0.986	1.006	1.054	4.46
Dextrose	0.083	0.921	0.992	1.056	1.044	
	0.083	0.951	1.007	1.054	1.077	
5	0.086	1.008	1.054	1.095	1.112	4.41
액상과당	0.084	1.000	1.028	1.113	1.116	
	0.084	1.047	1.022	1.139	1.148	
6	0.084	1.011	1.063	1.067	1.060	4.42
Fructo-	0.083	1.033	1.078	1.092	1.090	
oligosaccharide	0.082	1.028	1.060	1.095	1.112	
7	0.097	0.717	0.786	0.824	0.860	4.44
Xylo-	0.095	0.716	0.804	0.827	0.872	
oligosaccharide	0.095	0.721	0.788	0.837	0.868	
8	0.083	0.057	0.060	0.062	0.064	6.12
Rhamnose	0.083	0.055	0.060	0.061	0.065	
	0.084	0.056	0.059	0.061	0.063	
9	0.083	0.841	0.884	0.911	0.934	4.42
Galacto-	0.084	0.868	0.920	0.948	0.967	
oligosaccharide	0.082	0.895	0.960	0.950	0.986	
10	0.082	0.150	0.178	0.219	0.265	5.14
Arabinose	0.093	0.153	0.185	0.232	0.277	
	0.083	0.152	0.182	0.227	0.276	
11	0.083	0.677	0.795	0.873	0.921	4.63
Maltodextrin	0.083	0.670	0.804	0.874	0.923	
	0.084	0.638	0.781	0.867	0.922	
12	0.083	0.309	0.424	0.528	0.606	4.64
결정과당	0.084	0.285	0.408	0.511	0.569	
	0.083	0.163	0.226	0.338	0.436	
13	0.178	0.728	0.802	0.835	0.852	4.57
Pectin	0.180	0.757	0.820	0.851	0.889	
	0.172	0.722	0.805	0.841	0.869	

<sup>1)</sup> control means the OD of each medium at starting point.

<sup>2)</sup> OD at each time – each control

Table 23. Viable count of *Bifidobacterium sp.* BF29 at 16hr.

	* 10 <sup>7</sup> cfu/ml	Mean
	212	
Lactose	228	2.38*10 <sup>9</sup>
	274	
	296	
액상과당	300	3.12*10 <sup>9</sup>
	340	
	262	
Fructo- oligosaccharide	293	2.99*10 <sup>9</sup>
	343	

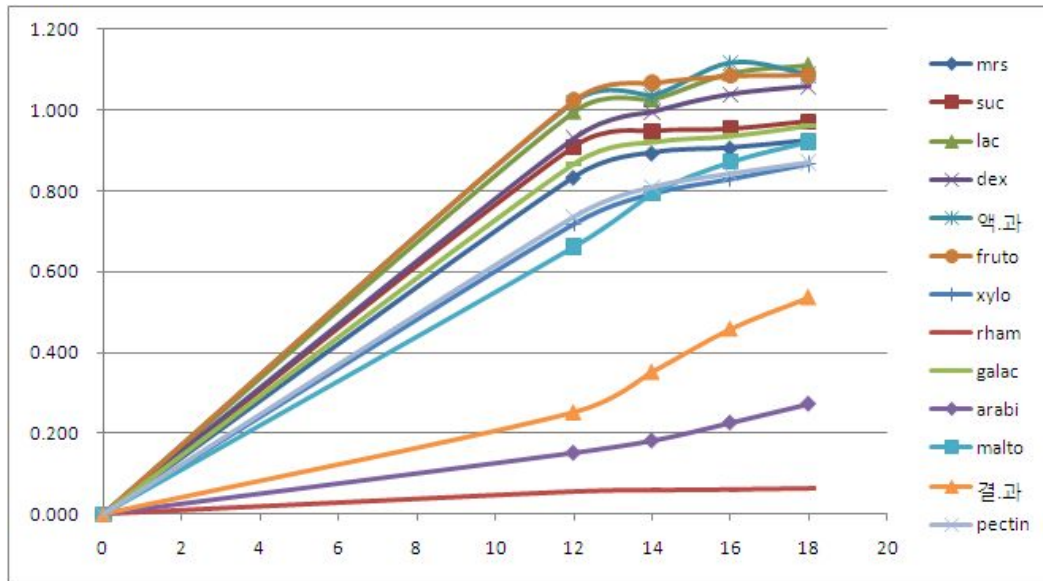


Fig. 57. Growth curve of *Bifidobacterium* sp. BF29 according to each carbon sources.

### (3) *Bifidobacterium* sp. BF8의 생육에 대한 질소원의 영향

탄소원을 maltodextrin 혹은 fructose syrup으로 고정하고 다양한 질소원을 농도별로 조합하여 배양한 결과 Fish peptone+Beef extract, Beef extract+soy peptone, soy peptone+proteose peptone을 조합이 우수한 것으로 나타났으며 그 중에서도 maltodextrin 2%에 soy peptone과 proteose peptone의 조합이 OD값과 생균수 ( $2.14 \times 10^9$  CFU/ml)에서 가장 높게 나타났다.



Table 24. Growth of *Bifidobacterium* sp. BF8 on various combination of nitrogen sources with maltodextrin as carbon source.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	all fish	all beef	all soy	all proteose	F+B*	F+S	F+P	B+S	B+P	S+P
	0.117	0.082	0.056	0.090	0.096	0.085	0.101	0.064	0.085	0.075
dh	0.117	0.078	0.054	0.089	0.096	0.085	0.101	0.066	0.084	0.074
	0.117	0.079	0.055	0.091	0.097	0.087	0.102	0.066	0.087	0.075
mean	0.117	0.080	0.055	0.090	0.096	0.086	0.101	0.065	0.085	0.075
	1.229	1.207	1.205	1.133	1.248	1.250	1.272	1.273	1.222	1.290
14h	1.166	1.262	1.168	1.208	1.225	1.261	1.277	1.275	1.225	1.303
	1.227	1.190	1.209	1.258	1.265	1.270	1.281	1.313	1.272	1.317
초기팬값	1.090	1.140	1.139	1.110	1.150	1.175	1.175	1.222	1.154	1.229
	1.219	1.282	1.237	1.228	1.289	1.270	1.288	1.272	1.265	1.323
16h	1.214	1.252	1.217	1.238	1.302	1.270	1.288	1.293	1.253	1.316
	1.227	1.267	1.257	1.264	1.319	1.283	1.305	1.302	1.264	1.314
초기팬값	1.103	1.187	1.182	1.153	1.207	1.189	1.192	1.224	1.175	1.243
	1.193	1.218	1.235	1.211	1.244	1.219	1.246	1.260	1.259	1.305
20h	1.169	1.210	1.198	1.220	1.266	1.224	1.267	1.293	1.212	1.321
	1.171	1.250	1.232	1.225	1.270	1.227	1.258	1.278	1.188	1.310
초기팬값	1.061	1.146	1.167	1.129	1.164	1.138	1.156	1.212	1.134	1.237

\* F: Fish peptone, B: Beef extract, S: soy peptone, P: proteose peptone

Table 25. Viable count of *Bifidobacterium* sp. BF8 in the modified MRS medium (maltodextrin) at 16hr.

	* 10 <sup>7</sup> cfu/ml	Mean
Fish+Beef	181	1.85*10 <sup>9</sup>
	182	
	194	
Beef+Soy	204	2.10*10 <sup>9</sup>
	204	
	224	
Soy+Proteose	205	2.14*10 <sup>9</sup>
	223	
	225	

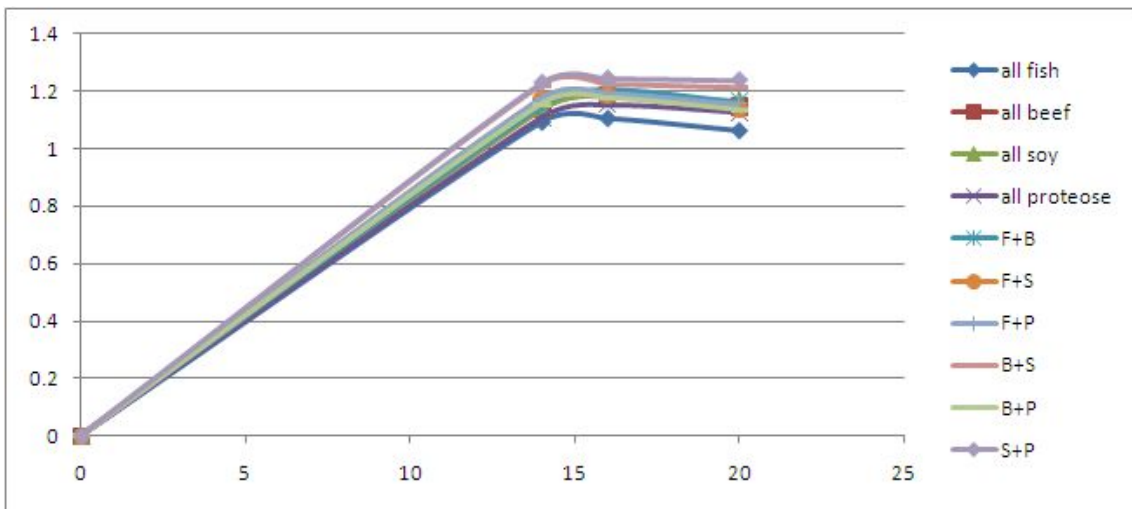


Fig. 58. Growth curve of *Bifidobacterium* sp. BF8 according to maltodextrin and various nitrogen combinations.

Table 26. Growth of *Bifidobacterium* sp. BF8 on various combination of nitrogen sources with fructose syrup as carbon source.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	all fish	all beef	all soy	all proteose	F+B	F+S	F+P	B+S	B+P	S+P
	0.113	0.078	0.053	0.085	0.097	0.085	0.101	0.065	0.084	0.075
초기배지	0.115	0.079	0.053	0.088	0.097	0.084	0.100	0.065	0.081	0.071
	0.114	0.082	0.055	0.091	0.098	0.086	0.102	0.066	0.086	0.072
<b>평균</b>	<b>0.114</b>	<b>0.080</b>	<b>0.054</b>	<b>0.088</b>	<b>0.097</b>	<b>0.085</b>	<b>0.101</b>	<b>0.065</b>	<b>0.084</b>	<b>0.073</b>
14h	1.095	1.077	1.029	1.093	1.131	1.078	1.164	1.091	1.116	1.107
	1.110	1.079	1.022	1.111	1.134	1.068	1.160	1.090	1.104	1.110
	1.132	1.131	1.078	1.113	1.154	1.090	1.159	1.116	1.132	1.096
초기뻘값	0.998	1.016	0.989	1.018	1.042	0.994	1.060	1.034	1.034	1.032
16h	1.104	1.102	1.026	1.096	1.152	1.076	1.156	1.109	1.098	1.118
	1.119	1.098	1.041	1.111	1.147	1.092	1.152	1.099	1.102	1.105
	1.138	1.108	1.076	1.133	1.164	1.101	1.151	1.108	1.116	1.104
초기뻘값	1.006	1.023	0.994	1.025	1.057	1.005	1.052	1.040	1.022	1.036
20h	1.108	1.062	1.007	1.047	1.119	1.065	1.140	1.073	1.101	1.096
	1.092	1.050	1.007	1.088	1.178	1.089	1.149	1.070	1.076	1.101
	1.103	1.041	1.077	1.080	1.132	1.094	1.136	1.092	1.094	1.098
초기뻘값	0.987	0.971	0.977	0.984	1.046	0.998	1.041	1.013	1.007	1.026

\* F: Fish peptone, B: Beef extract, S: soy peptone, P: proteose peptone

Table 27. Viable count of *Bifidobacterium* sp. BF8 in the modified MRS medium (fructose syrup) at 16hr.

	생균수(7승)	평균
Fish+Beef	176	1.82*10 <sup>9</sup>
	181	
	189	
Fish+Proteose	169	1.84*10 <sup>9</sup>
	188	
	195	
Beef+Soy	200	2.04*10 <sup>9</sup>
	203	
	210	

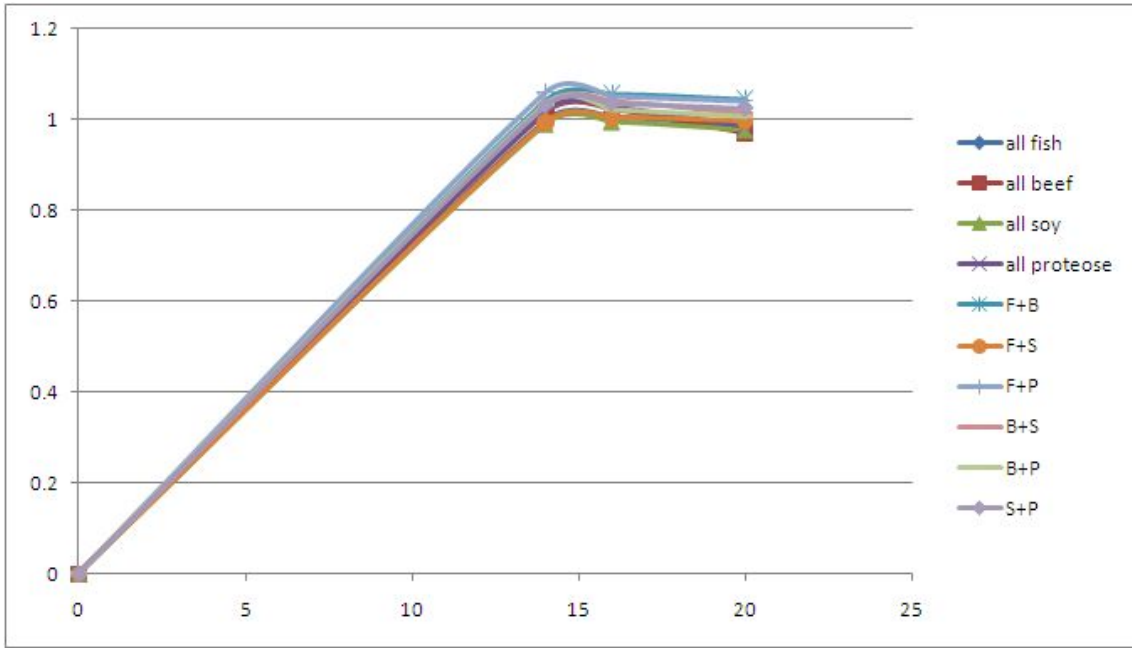


Fig. 59. Growth curve of *Bifidobacterium* sp. BF8 according to fructose syrup and various nitrogen combinations.

#### 마. *Bifidobacterium* BF-8의 bacteriocin like substance의 분리

*C. sakazakii*에 대한 상대적으로 높은 항균 효과를 나타냈던 *Bifidobacterium* BF-8에 대한 bacteriocin like substance를 분리하기 위해 동결 건조된 배양 상등액을 HPLC를 통해 분리 정제하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 60과 같다. 배양 상등액을 동결 건조한 것을 HPLC를 이용해 분석한 결과 bacteriocin like substance로 확인하지 못하였다. 최근 다양한 *Bifidobacterium* 가 생산해내는 bacteriocin에 대한 연구가 진행 중에 있다. 보고에 따르면 일반적으로 알려져 있는 다른 젓산균들의 bacteriocin과 유사하게 분자량이 10kDa 미만의 크기인 것과 분자량이 100 kDa 이상 되는 것도 보고 되고 있다. 따라서 본 연구에서 수행했던 *Bifidobacterium* BF-8의 경우도 분자량이 매우 커서 불안정하기 때문에 분리가 되지 않았을 가능성이 있으며, 따라서 보다 다양한 실험을 통해 분리, 정제가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

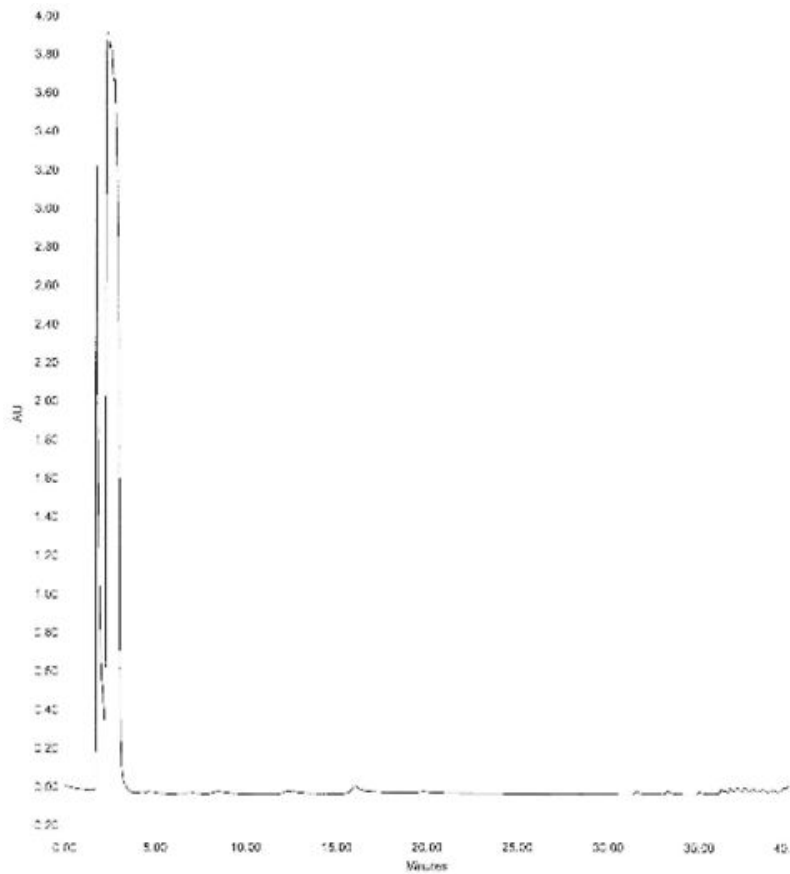


Fig. 60. Purification of bacteriocin like substance from lyophilized supernatant of *Bifidobacterium* BF-8 by HPLC.



#### 바. *Bifidobacterium* BF-8에 대한 cell cytotoxicity

*Bifidobacterium* BF-8의 안전성에 대한 연구를 위해 Hep-2 cell을 사용하여 MTT assay를 수행하여 확인한 결과는 Fig. 61과 같다. *Bifidobacterium* BF-8을 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 cell pellet을 PBS buffer로 현탁한 것과 배양 상등액을 Hep-2 cell 접종하여 1시간, 4시간 이후에 MTT assay를 수행하여 Hep-2 cell에 미치는 영향은 배양 상등액과 *Bifidobacterium* BF-8 cell 모두 1시간 이후에는 control에 비해 다소 높은 수치를 나타내고 있었다. 그리고 4시간 이후에는 control에 비해 약간 감소하는 것을 확인하여 *Bifidobacterium* BF-8은 Hep-2 cell에 낮은 cytotoxicity를 나타내고 있었다. 특히 Bifidobacteria의 경우 젖산균과 마찬가지로 GRAS로 인식되고 있어서, 안전성에 대한 문제는 배제가 가능하리라 사료된다.

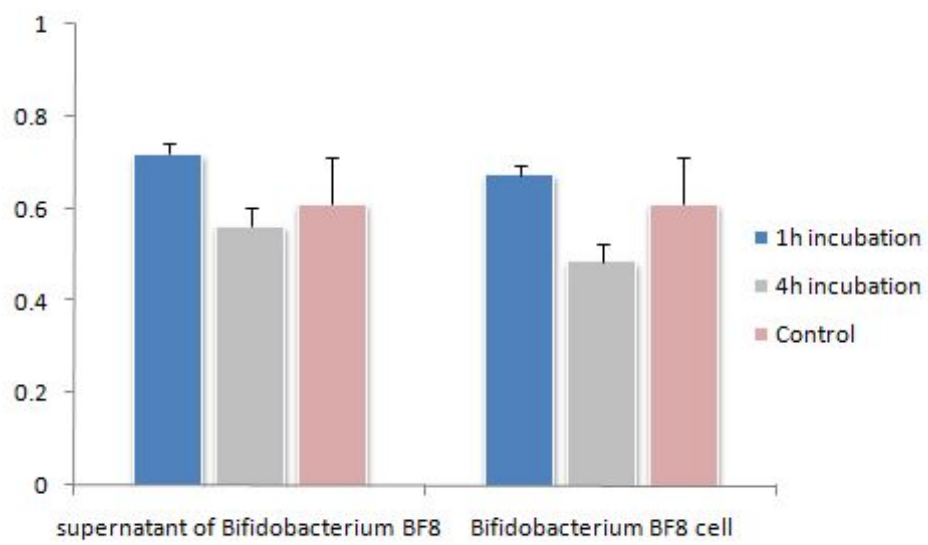


Fig. 61. Cytotoxicity of *Bifidobacterium* BF-8 by MTT assay in Hep-2 cell

## 사. Pilot 생산 배양

배양 결과 초기의 유도기를 거쳐 약 3시간 후부터는 대수기에 접어들어 13시간 만에 정체기에 도달하였다. 또한 이를 회수하여 동결 건조하여 생균수  $1.5 \times 10^{11}$  CFU/g 수준의 시제품을 생산할 수 있었다. 이는 기존에 당사에서 상업용으로 생산하고 있는 균주들과 유사한 성장속도와 수율을 보이는 것으로 판단되어 제품화에 큰 문제가 없는 것으로 보인다.

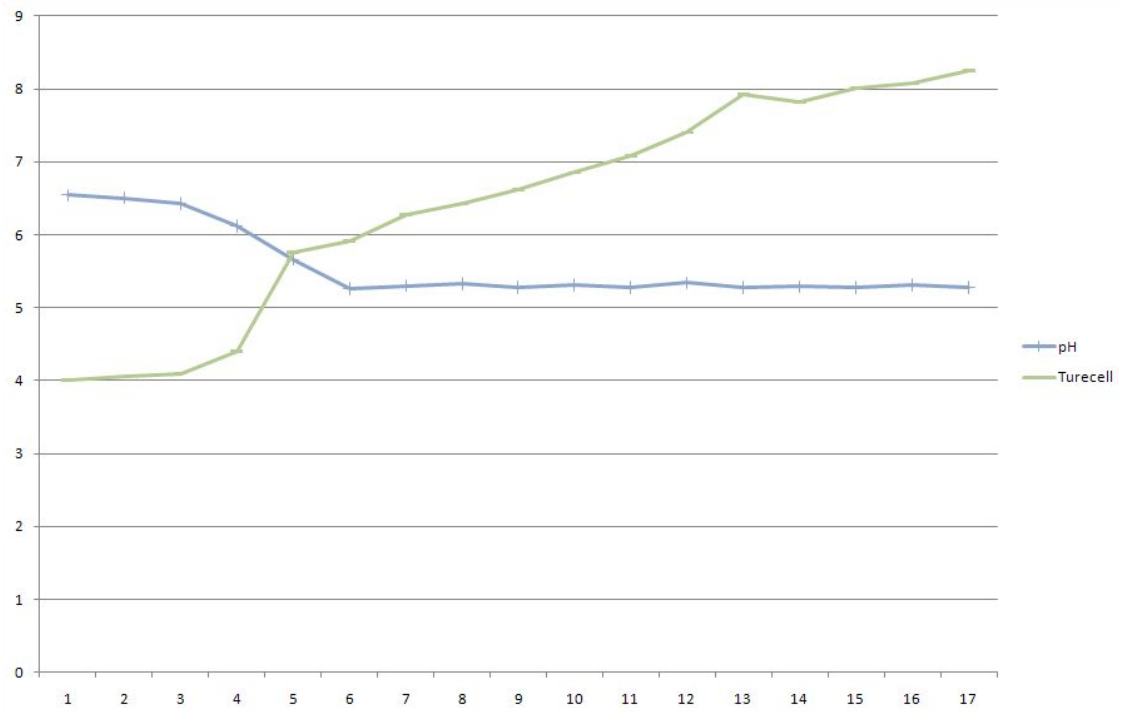


Fig. 62. Growth curve of *Bifidobacterium* sp. BF8 in pilot fermentor.

(A)



(B)



Fig. 63. Freeze dried product of *Bifidobacterium* sp. BF8.  
(A) freeze dried powder, (B) Aluminum pack

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	<i>C. sakazakii</i> 의 생리특성과 bac teriophage 분 리 및 특성 분석	<i>C. sakazakii</i> 의 생리특성 분석과 bacteriophage 분 리	100	○식품유래 119종 <i>C. sakazakii</i> 를 분리·동정 확보 ○분리균주의 Inositol, $\beta$ -glucoside 자화능 등의 생화학적 특성 분석
		Bacteriophage 특성분석	100	○12개의 bacteriophage 분리완료. ○ES2가 가장 넓은 host spectrum보임. ○ES2에 노출 ESa가 모두 사멸됨. ○ES2첨가 식품에서 ESa의 정균작용 유. ○ES2의 ESa의 biofilm능 저해 작용확인.
		<i>C.sakazakii</i> 의 건조내성 특성 분석과 biofilm 형성 분석	100	○분리균주 90%이상이 고건조내성 균주. ○고건조내성균주는 대부분이 강한 biofilm형성능있음을 확인.
	<i>C.sakazakii</i> 길 항성 유산균 분 리 및 제품화	길항성 유산균 분리 및 특성분석	100	○ 유산균 총 17 strains 분리 ○ Bifidobacteria 총 16 strains 분리
		항균물질 생산 균 분리	100	○ <i>C. sakazakii</i> 를 저해하는 Bifidobacteria 균주 선발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	분리된 <i>C. sakazakii</i> phage를 이용한 <i>C. sakazakii</i> 신속 검출법 확립 및 sanitizing agent로의 효능평가	분리된 여러 종류의 phage의 virucidal agent 효과	100	○ 분리된 용균성 파지 들에 대한 ferrous ammonium sulfate에 의한 효과 확인
		<i>C. sakazakii</i> 의 신속 검출을 위한 phage 이용	100	○ 분리된 용균성 파지 cocktail을 이용해 <i>C. sakazakii</i> 가 약 2 log CFU 수준까지 검출 확인 ○ <i>C. sakazakii</i> 의 시간에 따른 검출 효율 확인
		신속 검출법 이용을 위한 실제 식품에 적용	100	○ 분리된 용균성 파지 cocktail을 이용한 실제 식품에 적용하여 검출 확인 ○ <i>Cronobacter</i> spp. 분리주들을 사용해 실제 식품에서 적용하여 검출 확인
		분리한 bacteriophage의 sanitizing agent로서의 효능 평가	100	○ 분리한 bacteriophage를 이용해 <i>Cronobacter</i> spp.에 대한 생육 억제 효과 확인 ○ <i>Cronobacter</i> spp. 분리주 들 중 biofilm 형성이 높은 분리주 선별 ○ 용균성 파지를 이용한 biofilm의 감소 효과 확인
		유산균과 항균물질, bacteriophage의 복합처리를 통한 최적의 <i>C.sakazakii</i> 의 제어법 개발	100	○ Bifidobacteria가 생산하는 항균 물질이 포함된 상등액의 <i>Cronobacter</i> spp.에 대한 저해 효과 확인 ○ 또한 분리된 용균성 파지들과의 혼합에 따른 효과 확인 ○ 식품에 적용하여 효과 확인
	선발된 유산균과 항균 물질의 대량 생산	선발균주의 고농도 배양 조건 확립과 항균물질 고생산 조건 확립	100	○ 선발된 Bifidobacteria의 고농도 배양을 위한 pilot 생산 확인 ○ Bacteriocin like substance 분리, 정제에 대해서는 추가 연구 필요함
		<i>in vitro</i> 안전성 평가	100	○ Hep-2 cell에서의 MTT assay를 통한 cytotoxicity 확인

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

전 세계적으로 아직까지 박테리오파지에 의한 *C. sakazakii* 검출법은 개발되어 있지 않으므로 특허 출원후 *C. sakazakii*의 새로운 검출법으로 홍보한다. 이를 위하여 분리 파지의 cocktail kit를 개발하여 신속하고 정확하게 *C. sakazakii*의 검출이 가능하도록 한다. 특히 조제분유등 영유아식품 제조업체에 활용이 가능하도록 교육 지도 홍보를 통하여 우리 영유아식품의 품질이 제고되는 방법으로 실용화하도록 한다.

### 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

이러한 bacteriophage는 세균에만 작용하는 특이성으로 인하여 병원성균 제어 및 검출법은 항생제 내성균의 제어, 발효공정 제어 등등에서 활용이 가능하며 이것의 기술적 파급효과가 클 것으로 사료된다.

### 제 3 절. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

분리된 *C. sakazakii*파지의 host spectrum특성등을 검토하여 현재 2개의 특허를 출원하였으며 phage-*C. sakazakii* rapid detection법도 특허로 출원하도록 한다. 아울러 현재까지 아울러 SCI논문 2편(Int. J. Food Microbiol., Korean J. Food Sci. Ani. Resour.)을 게재하였으며 SCI 1편은 게재(Arch.Virology)가 가능한 상태이며 SCI 1편(Food Microbiol.)은 투고중이다. 향후 약간의 보완후에 phage-*E.sakazakii* rapid detection법도 SCI논문으로 투고 예정이다. 비SCI 논문으로 1편을 게재(한국식품과학회지)하였고 1편은 투고(한국식품과학회지)하여 심사중이다.



#### 제 4 절. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

본 연구의 결과 새로운 *C. sakazakii* probiotic로서의 *Bifidobacterium animalis* BF8는 *C. sakazakii*와 길항성을 가지고 있으며 아울러 bacteriocin-like substance 를 분비하고 있으므로 분리된 bacteriophage의 안전성을 확인 한 후 *C. sakazakii* 종합제어용 bacteriophage-*B.animalis* BF8 복합 식품첨가물, Phage-sanitizer로 개발하여 산업적 활용이 가능하도록 추진한다. 아울러 *Bifidobacterium animalis* BF8 가 분비하는 bacteriocin-like substance 물질에 대한 분리 정제하여 특성을 분석한 후 새로운 형태의 식품첨가물로의 개발이 가능하다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
Bacteriophage를 이용한 <i>C sakazakii</i> 의 효율적인 제어법 개발 (기술 1)	폴란드	10%	50%	100%	20세기 초 Phage 연구가 시작된 후 지속적으로 연구 하고 있음
유산균과 bacteriophage 복합 처리에 따른 <i>C. sakazakii</i> 제어 기술 개발(기술 2)	미국	50%	80%	100%	유산균 관련 연구 는 많이 진행되었 으나, phage와 함 께 이용하여 제어 하는 연구는 없음 또한 미국의 경우 phage를 첨가물 로서 인정하고 그 응용분야를 넓혀 가고 있음

## 제 2절 논문, 특허 및 시장 분석

### 1. 논문

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		<i>E. sakazakii</i> , bacteriophage	Bacteriocin, bacteriophage, <i>Lactobacillus</i>
검색건수		1 건	12건
유효논문건수		1 건	1 건
핵심논문 및 관련성	논문명	<i>Enterobacter sakazakii</i> bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula	Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium.
	학술지명	Int. J. Food Microbiol.	Curr. Opin. Microbiol.
	저 자	Kim KP, Klumpp J, Loessner MJ.	Konings WN, Kok J, Kuipers OP, Poolman B.
	게재년도	2007	2000
	관련성(%)	80%	20%
	유사점	<i>E. sakazakii</i> 의 bacteriophage 이용	GRAS로 이용되는 유산균들의 다양한 bacteriocin 등의 항균 물질 이용
	차이점	상이한 Sequence, 균주 특이성, lytic activity가 우수한 phage 분리	기존에 알려져 있던 bacteriocin 생성 등의 유산균의 특성을 이용하여 bacteriophage와의 복합처리를 통한 synergy 효과 확인 및 식품 생산 공정에서 제어 방법 설정

## 2. 특허

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		<i>E. sakazakii</i> , bacteriophage	Bacteriocin, <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
검색건수		8 건	15 건
유효특허건수		2 건	9 건
핵심특허 및 관련성	특허명	Isolated phages and their use as disinfectant in food or for sanitation of factory environment	A novel <i>Bifidobacterium longum</i> A24 with anti-bacterial activity against toxigenic pathogens)
	보유국	EU	한국
	등록년도	2005	2003
	관련성(%)	80%	30%
	유사점	<i>E.sakazakii</i> 의 bacteriophage를 이용한 식품에 적용	Bacteriocin 등의 항균 물질을 생산하는 유산균 등을 이용
	차이점	기존에 보고된 virulent bacteriophage보다 특이성, lytic activity가 우수한 phage 분리	유산균을 Bacteriophage와 함께 이용해서 병원성 세균을 제어하는 연구는 없음.

## 3. 시장 현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황 :없음.

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- (1) *L. monocytogenes* phage cocktails: 6가지 종류의 *L. monocytogenes* phage를 혼합하여 현재 미국 FDA에서 승인 후 식품 첨가물 등재 Bacteria-Eating Virus Approved as Food Additive. FDA Consumer Magazine. 41(1):00-00.(2007)
- (2) FASTPlaque TB assay(FPTB): *Mycobacterium tuberculosis*의 검출을 위

한 상용 kit

Development of a New, Combined Rapid Method Using Phage and PCR for Detection and Identification of Viable *Mycobacterium paratuberculosis* Bacteria within 48 Hours. Appl. Environ. Microbiol, 73(6):1851-1857(2007)

## 제 7 장 참고문헌

- Adamson DH, Rogers JR. *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis. Clin. Microbiol. News. 3:19-20 (1981)
- Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis JWL. Preparation and handling of powdered infant formula: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. JPGN. 39:320-322 (2004)
- Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. Int. J. Food Microbiol. 31:189-92. (2009)
- Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol. 27:2054-2056 (1989)
- Berkelman T, Stenstedt T. 2D Electrophoresis using immobilized pH gradients -Principles and Methods. Amersham Biosciences. Sweden (2002).
- Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. J. Food Protec. 70:2111-2117 (2007)
- Brussow A, Kutter E. Phage ecology. Boca Raton CRC Press, USA. pp. 129-163 (2005)
- Bremaud L, Fremaux C, Laalami S, Cenatiempo Y. Genetic and molecular analysis of the tRNA-tufB operon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Nucleic Acids Res. 23:1737-1743 (1995)
- Berchtold H, Reshetnikova L, Reiser C, Schirmer NK, Sprinzl M, Hilgenfeld R. Nature 365:126-132 (1977)
- Codex Alimentarius Commission. Report of the thirty-fifth session of the codex committee on food hygiene. Alinorm 03/13A, Orlando
- Chevill AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kasper CW. RpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance on *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ.

Microbiol. 62:822–1824 (1996)

Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, Osaili T, Shaker R, Jaradat Z, Hartantyo SH, Abdullah Sani N, Estuningsih S, Forsythe S. 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* 31:185–186.

Dineen SS, Takeuchi K, Soudah J, Boor K. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation system. *J. Food Prot.* 61: 602–1608 (1998)

Derzelle, S., Dilasser, F., Maladen, V., Soudrie, N., Leclercq, A., Lombard, B., Lafarge, V. Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Enterobacter sakazakii* from environmental samples from infant formulae factories. *J. Food Prot.* 70:1678–1684 (2007)

Danbing KE, Maurice B, Ann G, Francois JP, Johanne F, Marc O, Paul R, Michel GB. Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in Enterococci. *J. bacteriol.* 182:6913–6920 (2000)

Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clin. Infect. Dis.* 42:996–1002 (2006)

Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Protect.* 68:1900–1902 (2005)

El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol.* 2;9:24 (2009)

FDA method <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496–512 (1995)

Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The Enterobacteriaceae study

group, *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 369–58 (1980)

Food and Agriculture Organization–World Health Organization (FAO–WHO) *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. In: *Microbiological Risk Assessment Series 10*, p38. Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Switzerland (2006)

Farber, J. M. and Forsythe, S. J. *Enterobacter sakazakii*. ASM Press Inc., Washington, U.S.A. (2008)

Gurtler JB, Beuchat LR. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Protec.* 70:1579–1586 (2007)

35. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104:1–34 (2005)

Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 68:1102–1011 (2005)

Goodridge L, Chen J, Griffiths M. Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1397–1404 (1999)

Hassan AA, Akineden O, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* 116:214–220 (2007)

Hengge R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:148–152 (1990)

Hendrix RW. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 506–511. (2003)

Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Prot.* 68:426–437. (2005)

Iversen C, Waddington M, On SLW, Forsythe S. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 42:5368–5370 (2004)



Iversen C, Forsythe SJ. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* 14: 443–454 (2003)

Iversen C, Park JH, Barron JC, Hargreaves A, Forsythe S. Isolation, characterization and virulence *Enterobacter sakazakii* from Korean infant foods. <http://www.socgenmicrobiol.org.uk/meetings/MTGPAGES/HW.cfm>, General microbiology 156th meeting, Heriot-Watt Univ. Edinburgh, UK(2005)

Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *Malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp.nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol. Biol.* 7:64–67 (2007)

Iversen, C., Waddington, M., Farmer, J. J., Forsythe, S. 2006. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiology.* 6: 94.

Iversen, C., P.Druggan, Forsythe, SJ. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 133–139(2004)

Jung, MK, Park JH. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* 15(1):152–157 (2006)

Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 120:418--28. (2004)

Kim KP, Klumpp J, Loessner MJ. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 195–203 (2007)

Kim SH, Park JH. Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* isolates during rehydration of powdered infant formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 364–368 (2007)

Kim K, Jang SS, Kim SK, Park JH, Heu S, Ryu S. Prevalance and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* 122:196–203 (2008)

Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: Case reports and a review of the literature. *Med. Baltimore* 80: 113–122 (2001)

Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stemphan R. Biofilm formation, Extra cellular polysaccharide production, and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: Aspects promoting environmental persistence. *J. Food Prot.* 68:2287–2294 (2005)

Lee NA, Noh BS., Park JH. Biofilm formation of food-borne pathogens under stresses of food preservation. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 38:135–139 (2006)

Loewen PC, Hengg-Aronis R. The role of sigma factor  $\sigma^B$ (katF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:53–80 (1994)

Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspas GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 26:743–746 (1988)

Malony B, Wagner M. Detection of *Enterobacter sakazakii* by real time RT-PCR. *J. Food Protect.* 68(8):1623–1627 (2005)

Muytjens, HL, Roelofs-Willemse H, and Jaspas GH. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 26:743–746 (1988)

Mohan-Nair MK, Venkitanarayanan KS. 2005. Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Applied and Environmental Microbiology.* 72:2539–2546.

Molloy C, Cagney C, O'Brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail

foods. *Int. J. Food Microbiol.* 136:198–203. (2009)

Manfioletti, G., Schneider, C. A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16: 2873–2884 (1988)

McGrath S, van Sinderen D. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology.* Caister Academic Press. Norfolk, UK. (2007)

Marei AM, El-Behedy EM, Mohtady HA, Afify AF. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Med. Microbiol.* 52:331–5. (2003)

Muzaffar R, Batool S, Aziz F, Naqvi A, Rizvi R. Evaluation of FAST Plaque TB assay for direct detection of *M. tuberculosis* in sputum specimens. *Int. J. Tuber. Lung Dis.* 6:635–40 (2002)

Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:9–13 (1997)

Nazarowec-White M. Biological characterization of *Enterobacter sakazakii*. Ph.D. thesis. University of Ottawa. (1998)

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 123–153 (1999)

O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation on *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceed via multiple, convergent signaling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449–61(1998)

Ploux L, Beckendorff S, Nardin M, Neunlist S. Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids and Surface B: Biointerface* 57:174–181 (2007)

Park DJ, Drobniowski FA, Meyer A, Wilson SM. Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. *J Clin Microbiol.* 41(2):680–8 (2003)

Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becksser RJ. A chromogenic plating

medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. *J. Food Prot.* 69:315–322 (2006)

Seo KH, Brackett, RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Protect.* 68(1):59–63 (2005)

Somers EB, Schoeni JL. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Camphylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 22: 269–276 (1994)

Sambrook, J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)

Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Al-Zuby M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp. from food and food production environments. *Food Control.* 18:1241–1245. (2007)

Schmid M, Iversen C, Gontia I, Stephan R, Hofmann, A., Hartmann, A., Jha, B., Eberl, L., Riedel, K., Lehner, A. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Res. Microbiol.* 160:608–614 (2009)

Stock, I., Wiedemann, B. 2002. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clinical Microbiology and Infection.* 8, 564–578.

Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 232:1–6 (2004)

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr.. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649–659 (2001)

Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmal RN, Kartikeyan S, Deshmukh NM, Bisen PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis.* 87(3):193–201 (2007)

Ulitzur S, Kuhn J. Construction of lux bacteriophages and the determination of specific bacteria and their antibiotic sensitivities. *Methods Enzymol.* 305,

543–57 (2000)

Vasseur P, Soscia C, Voulhoux R, Filloux A. PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of protein involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* 89:903–915 (2007)

Van Acker J, De Smet F, Muyltermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* 39:293–297 (2001)

Wommack, K.E., Colwell, R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:69–114 (2000)

Wang, S., Kong, J., Gao, C., Guo, T., Liu, X., Isolation and characterization of a novel virulent phage ( $\phi$ ILdb) of *Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* 137:22–27 (2010)

Yoo MY, Kim SS, Oh SS. Isolation and genotyping of *Enterobacter sakazakii* of powdered infant formula manufactured in Korea. *Food Sci. Biotechnol.* 14(6): 875–877 (2005)

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.