

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개()발간등록번호()

고부가가치식품기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발 간 등 록 번 호

11-1543000-003064-01

신선농식품 품질안전을 위한
박테리오파지와 유산균기반의
식중독 세균검출 및 제어를
위한 산업기술개발 최종보고서

2020. 03. 26.

주관연구기관 / (주)마이크로진

협동연구기관 / 가천대학교

협동연구기관 / 서원대학교

협동연구기관 / 한국교통대학교

농 립 축 산 식 품 부
(농림식품기술기획평가원)

제출문

제 출 문

농림축산식품부 자료실 귀하

'신선농식품 품질안전을 위한 박테리오파지와 유산균기반의 식중독세균 검출 및 제어를 위한 산업기술개발'(연구개발 기간 : 2017. 06. 15. ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2019. 12. 31.

주관연구기관명 : ㈜마이프로진 (대표자) 조상희 (인)
협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단 (대표자) 황보택근 (인)
협동연구기관명 : 서원대학교 산학협력단 (대표자) 최홍필 (인)
협동연구기관명 : 한국교통대학교 산학협력단 (대표자) 전문수 (인)

주관연구기관책임자: 조상희
협동연구기관책임자: 박종현
협동연구기관책임자: 이영덕
협동연구기관책임자: 문기성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	1170060-3	해 당 단 계 연구 기 간	2017.06.15. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	신선농식품 품질안전을 위한 박테리오파지와 유산균기반의 식중독 세균검출 및 제어를 위한 산업기술개발			
연구 책임자	조상희	해당단계 참여연구원 수	총: 24명 내부: 24명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:265,000천원 민간:88,334천원 계:353,334천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 32명 내부: 32명 외부: 명	총 연구개발비	정부:710,000천원 민간:236,668천원 계:946,668천원
연구기관명 및 소속 부서 명	주식회사 마이크로진			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
----------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설· 장비	기술 요약 정보	소프 트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정 보	실 물
기탁 번호									K C C M121 40P		
기탁 번호									KCTC 14076 BP		
등록 번호		제 10-206 5620호									
등록 번호		제 40-156 1408호									
등록 번호		제 40-156 1411호									
등록 번호	시가 독소 생성 대장균의 제어를 위한 박 테리오파지의 분리와 특성 분석										
등록 번호	Isolation of a Lactococcus lactis Strain Producing Anti-staphylococcal Bacteriocin										
등록 번호	황색포도상구균 박테리오파지의 저감화를 위한 물리화학적 처리 효과										
등록 번호	Synergistic Inhibition by Bacteriocin and Bacteriophage against Staphylococcus aureus										
등록 번호	Characteristics and Lytic Activity of Phage-Derived Peptidoglycan Hydrolase, LysSAP8, as a Potent Alternative Biocontrol Agent for Staphylococcus aureus										
등록 번호	Isolation of bacteriophages having depolymerase and control of pathogenic E. coli O103 in biofilm on lettuce										
등록 번호	Enterococcus faecium CJNU 2008 균주 생산 박테리오플의 특성 규명										
등록 번호	박테리오파지와 유기산의 병용처리에 의한 효율적인 대장균 생육 억제										
등록 번호	Enterococcus faecium CJNU 2008 균주 생산 박테리오플의 특성 규명										
등록 번호	Isolation of a Lactococcus lactis Strain Producing Anti-staphylococcal Bacteriocin										
등록 번호	박테리오파지와 유기산의 병용처리에 의한 효율적인 대장균 생육 억제										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다.)

보고서 면수
258

〈요약문〉

연구의 목적 및 내용	<p>○ 박테리오파지 기반의 신속 검출 키트 개발</p> <p>○ 박테리오파지와 endolysin 및 유산균 등을 활용한 위생처리제 개발</p> <p>○ 산업화를 위한 유효성 평가와 개발 제품에 대한 국내외 인증</p>				
연구개발성과	<p>○ 박테리오파지 기반의 신속검출키트 개발을 위한 기반 기술 연구</p> <p>-기분리된 박테리오파지의 검출키트활용을 위한 선별화 작업</p> <p>-검출키트의 성능을 극대화 및 보안을 위해 황색포도상구균에 대한 박테리오파지 신규1종 분리 기탁(KCTC14076BP) 및 성능 평가 완료</p> <p>-선별된 황색포도상구균 박테리오파지의 키트 적용을 위해 최적 MOI 도출</p> <p>-식품공전법과의 조화 및 키트적용 최적화를 위해 황색포도상구균 선택증균배지 개발(SEB)과 장출혈성대장균 증균배지 최적화 (mTSB wo Bile)</p> <p>-박테리오파지 기반 키트활용 시 결과 확인법 개발 (Soft-agar법, Resazurin법)</p> <p>-발명의 명칭“박테리오파지를 이용한 식중독세균검출 키트 및 이를 이용한 검출방법”[특허번호: 제10-2065620호] 특허 등록완료 및 시제품 제작완료(PhageAmp-SA)</p> <p>-박테리오파지 기반 Phage Typing 기법을 활용하여 분리배양단계에서 동정키트 개발 및 시제품 제작됨(PhageID-SA, PhageID-O157)</p> <p>○ 박테리오파지 기반의 살균소독제의 개발</p> <p>-장출혈성대장균(O157, Non-O157) 약 56종에 대해 사용할 살균소독제로 박테리오파지 ECP 3종(26, 27, 32)선별되고 그 효과 검증됨</p> <p>-박테리오파지 기반의 살균소독제의 안정적인 생산을 위한 최적화된 대량생산 및 정제 기술 개발</p> <p>-장출혈성대장균을 제어할 박테리오파지 기반 살균소독제 시제품 제작(PhageGreen-STECC)</p> <p>-황색포도상구균 약 51종에 대해 사용할 살균소독제로 박테리오파지 SAP(84, 27) 2종 선별</p> <p>-황색포도상구균을 제어할 박테리오파지 기반 살균소독제 시제품 제작(PhageGreen-SA) 및 그 효과 검증완료</p> <p>-살균소독력을 향상시키기 위해 유기산 및 박테리오파지 함유 혼합액 II의 효과가 우수한 것으로 평가됨</p> <p>○ 산업화를 위한 유효성 평가와 개발제품의 국내외 인증</p> <p>-박테리오파지 검사키트와 현재 식품공전 시험법에 대한 비교실험 및 키트 평가</p> <p>-최신 분자생물학적 방법을 이용한 식중독균 검출 시험법과 개발된 박테리오파지 기반 검출 키트 비교 및 검출력 평가 완료</p> <p>-PhageID와 PhageAmp 키트의 해외 인증을 위한 국제기준에 부합하는 결과 데이터 확보 및 산업화</p> <p>-박테리오파지를 식품첨가물제제 살균소독제 등록을 위한 살균한시기준 충족 데이터 확보 및 제품화</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>-농산물, 식품 안전분야에 위해세균 저감화를 위해 비화학적 살균소독제의 활용을 통한 국민 건강 보건 이바지</p> <p>-박테리오파지 기반 식중독세균 검출키트와 효과적인 위생처리제 기반 기술의 확보 및 제품의 다각화를 통해 다양한 세균에 대한 대응 제품 개발 예상</p> <p>-박테리오파지관련 기술개발을 통해 위해세균의 검출과 제어 기술을 축적하여 관련 제품화 기술을 세계적인 수준으로 향상과 동시에 관련 기술인 양성</p> <p>-박테리오파지를 활용한 신기술 개발을 통해 제품의 다각화 및 매출발생을 통해 산업에 이바지하며 고부가가치 유도 및 바이오기반의 새로운 사업군으로 확장 기대됨</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	박테리오파지	유산균	검출	제어	식중독 세균
영문핵심어 (5개 이내)	Bacteriophage	Lactic acid Bacteria	Detection	Biocontrol	Food-poisoning bacteria

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	11
제1장. 연구개발 목적	11
제2장. 연구개발 필요성	18
제3장. 연구개발 범위	29
2. 연구수행 내용 및 결과	43
제1장. 박테리오파지를 이용한 식중독세균 검출 키트 개발	43
제2장. 박테리오파지 기반의 동정 기법(PhageID)을 이용한 검사키트 개발	79
제3장. 박테리오파지기반의 농산물 및 식품에 대한 위생처리제 개발	89
제4장. 기 구축된 박테리오파지 라이브러리 강화 및 위생처리제로써 기초연구	106
제5장. 박테리오파지에 대한 분자생물학적 특성 연구 및 위생처리제 응용연구	132
제6장. 박테리오파지 및 endolysin의 위생처리제 확립과 현장 평가	157
제7장. Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출을 위한 연구	165
제8장. 박테리오파지 용균 효소 분리, 정제와 Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 연구	172
제9장. Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 키트 확립 및 현장 평가와 박테리오파지의 안전성 분석	185
제10장. 유산균 라이브러리 활용 신규 유산균 확보	203
제11장. 유산균 유래 항균물질의 항균효과	204
제12장. 유산균 유래 박테리오신의 부분정제 및 안정성 확인	209
제13장. 박테리오신 생산 신규 유산균 분리	212
제14장. 박테리오신에 대한 서열 분석 및 특성 분석	216
제15장. 신규 박테리오신 생산 유산균의 최적배양 조건 및 생산 박테리오신의 안정성 분석	222
제16장. 박테리오파지와 박테리오신의 복합처리를 통한 항균력 평가	225
제17장. 혼합액(박테리오신+엔도라이신 or 박테리오파지)의 항균력평가	226
제18장. 항균활성 혼합액과 기존 위생처리제(차아염소산나트륨) 비교 평가	242
제19장. 항균활성 혼합액 현장적용	244
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	245
4. 연구결과의 활용 계획 등	251
제1장. 박테리오파지 기반의 식중독 세균 검출 키트 개발	251
제2장. 박테리오파지를 활용한 농산물 위생처리제 개발	253
제3장. 국내외 시장 진입 및 확대 방안	254
붙임. 참고 문헌	256

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

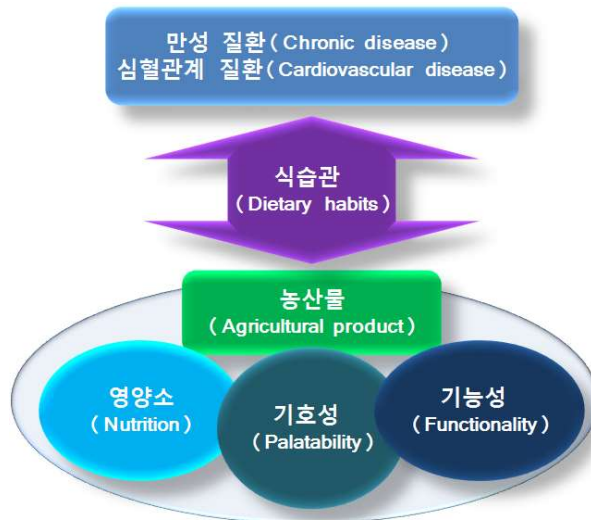
1. 연구개발과제의 개요

과제번호	1170060
------	---------

제1장. 연구개발 목적

1절. 농식품의 소비 성향

- 국민 소득의 증가와 더불어 소비자들의 건강에 대한 관심이 점차 높아지게 되면서 식생활 변화에도 상당한 변화를 가져와서 참살이(Well-being)를 추구하는 삶이 증대되었음. 이에 따라서 채소, 과일, 생식 등 신선 농식품에 대한 수요가 급증하여 열처리 식품보다 새로운 비열 살균 기술 가공법을 이용한 최소가공 처리된 고품질의 식품 생산이 요구되고 있음.
- 특히, 의학의 발전으로 다수의 사람들의 평균 수명은 늘어났으나 동맥 경화, 심장 질환, 고혈압, 간질환, 위장병 등의 만성 질환이 증가하고 있으며, 이러한 질병들은 대부분 식생활과 밀접한 연관을 가지고 있는 것으로 보고되고 있고, 농산물의 영양소, 기호성, 기능성이 중요하게 인식되고 있음.

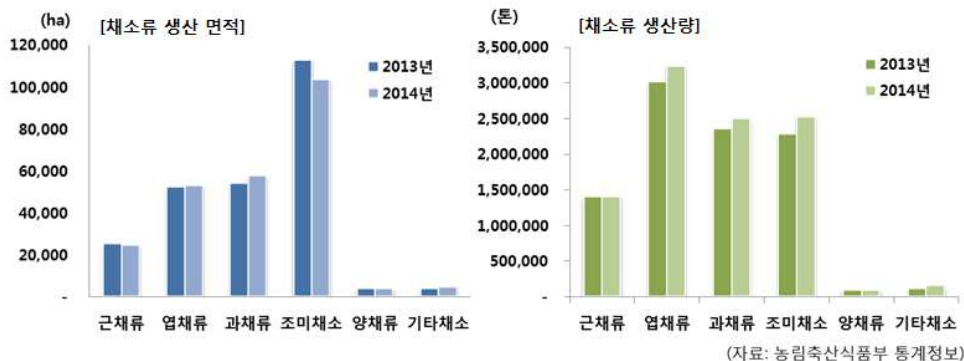


[그림] 농산물이 건강에 미치는 영향

- 이러한 농산물은 과거 우리나라의 주된 영양 공급원 역할을 하였으며, 지금까지도 널리 섭취

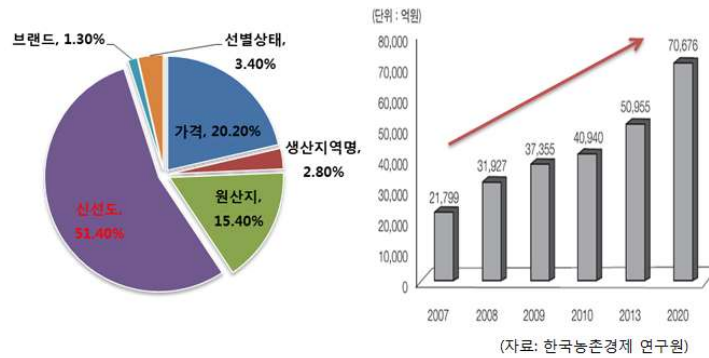
되고 있음. 최근 이러한 농산물들에 대한 과학적인 분석을 통해 영양원 또는 기능성이 확인되고 있는데, 콜레스테롤 저하와 심장 질환 예방에 효과적인 베타글루칸 (β -glucan), 활성산소를 제거하는 SOD(superoxide disumutase), 항암효과와 골다공증 예방에 좋은 이소플라본(isoflavone), 폴리페놀(polyphenol), 다양한 함황 화합물들 등이 알려져 있음.

- 또한, 여성의 사회진출로 인한 맞벌이 부부의 증가, 외식 및 급식 산업의 증가 등 급속도로 발전되는 사회 흐름에 따라 경제적 여유가 늘어나게 됨으로써 다수의 소비자는 식품섭취의 간편화, 시간절약 등을 위해 신선 편의 농식품 등 편리하게 섭취할 수 있는 식품을 구매하려는 추세가 점차 증가하고 있음. 뿐만 아니라 구매할 식품의 선택 시 건강지향성, 고품질 등을 보다 중요시 여기게 되어 식품 업계에서는 신선 농산물 및 신선 편의 농식품에 대한 생산량이 점차 증가하고 있는 추세에 있음.
- 2014년 국내 시설채소 온실현황 및 채소류 생산실적 통계자료를 보면 채소류의 생산량이 2013년에 비교해서 2014년에 전체적으로 증가된 것으로 조사되었으며 엽채류(배추, 양배추, 상추, 부추 등)는 7.5%, 과채류(수박, 오이, 호박, 가지, 토마토 등)는 6.6%, 조미채소(양파, 파, 생강 등)의 경우 10.7% 생산량이 증가한 것으로 조사되었음.



[그림] 2013년과 2014년 국내 채소류 생산현황

- 국내 신선 농식품의 시장 규모는 5,900-6,900억 원으로 전체 농산물 시장의 3.3-3.9% 수준으로 추정됨. 이 중 외식업의 취급 규모가 전체의 80%를 차지하고, 나머지는 식품제조업, 식품소매업 순이며, 또한, 2014년 한국농촌경제연구원의 식품소비행태조사 보고서에 따르면 소비자들은 채소류 구입 시 50% 이상이 신선도를 우선적으로 보는 것으로 조사되어 신선 농식품의 안전성을 중요시 하는 것으로 확인됨.

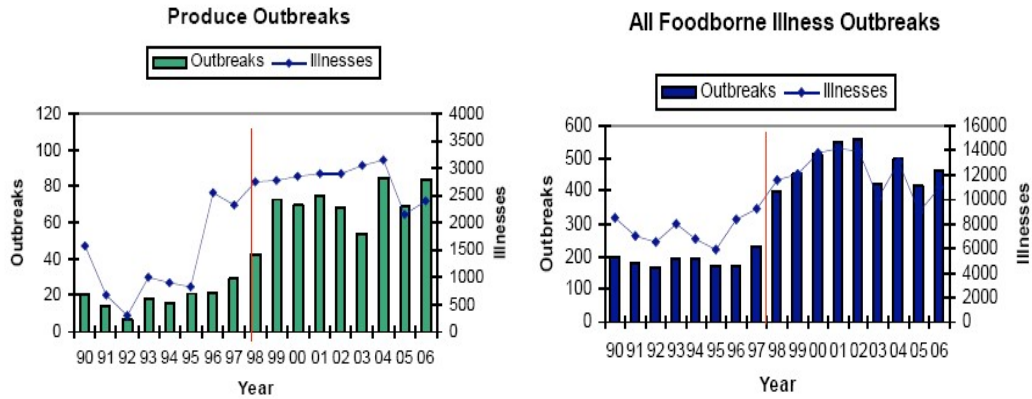


[그림] 채소류 구입 시 우선순위 [그림] 국내 친환경 농산물 시장 현황

- 신선 농식품의 국내 생산량 및 소비량은 급격하게 증가하고 있는 추세이므로, 신선 농식품 관련 식중독 관리대책이 시급한 실정임.
- 하지만, 신선 농식품의 소비 증가로 인해 최근 다양한 화학적, 물리적, 생물학적 위해 요소가 확인되고 있으며, 또한 이러한 원인들로 인해 인간에게 다양한 질환이 유발되거나 사망에 까지 이르고 있어서 커다란 경제적 손실과 인적 손실이 발생되고 있는 것이 현실임. 최근에는 미생물학적 안전성에 대한 문제가 신선 농식품에서 크게 대두되고 있음.
- 이에 따라, 식중독 유발 세균에 관리를 위해서는 신선 농식품에 오염되어 있는 식중독 세균들을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 기법이 점차 증가하고 있음.

2절. 신선 농식품의 식중독 세균의 중요성

- 보고되고 있는 대부분의 식중독 사고의 약 90% 이상이 세균성 식중독으로 알려져 있으며 몇몇 주요 병원성 미생물에 의한 식중독 사고는 인간의 건강에 치명적인 질병을 야기할 뿐만 아니라 전 세계적으로 다수의 사망 사고 및 큰 경제적 손실을 일으키고 있음. 신선 농식품의 병원성 미생물과 관련된 식중독 사고는 최근 건강과 신선 농식품에 대한 소비자의 관심이 지속적으로 증가하면서 그 수가 더욱 증가되는 경향을 나타내고 있음.
- 최근 미국 내 신선 농식품 관련 집단 식중독 발생현황은 1990년대 이후 급격히 증가하였으며, 최근에는 약간 줄어드는 추세를 보이고 있으나 신선 농식품의 식중독균 제어는 여전히 식품 안전 분야의 중요한 이슈임.



[그림] 미국의 전체 식중독 발생현황과 신선 농식품 관련 식중독 발생현황 (1990-2006)

○ 현재 미국 식품의약품 안전청(FDA)는 신선 농식품을 식중독관련 고위험 식품군으로 분류하고 있음. 미국에서 발생한 식중독 발생현황 통계에 의하면 1990년에서 2006년 사이에 발생한 총 5,778건의 집단식중독 중, 신선과채류(과실, 야채, 샐러드) 관련 집단식중독이 총 1,012건 (17.5%)이었다. 동 기간에 발생한 총 168,898명의 식중독 환자 중 신선과채류 관련 식중독 환자는 45,856명(27.2%)이었음.

[표] 2011-2016년 미국에서 신선 농산물과 관련된 식중독

Year	Pathogen	Cases	Death	Vehicle
2016	<i>Listeria monocytogenes</i>	19	1	Packaged salads
	<i>Salmonella muenchen</i>	11	0	Sweetwater farms alfalfa sprouts
	<i>E. coli</i> O157	13	0	Green sprouts alfalfa sprouts
2015	<i>Salmonella poona</i>	907	6	Cucumber
2014	<i>Escherichia coli</i> O121	19	0	Raw clover sprouts
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	2	Wholesome soy products sprouts
	<i>Salmonella enteritidis</i>	115	0	Bean sprouts
	<i>Salmonella newport</i>	275	0	Cucumber
2013	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	33	0	Ready-to-eat salads
	<i>Salmonella saintpaul</i>	84	0	Cucumber
2012	<i>Salmonella typhimurium</i> and <i>newport</i>	270	3	Cantaloupe
	<i>Salmonella braenderup</i>	121	0	Mangoes
	<i>Escherichia coli</i> O26	29	0	Raw clover sprouts
2011	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	60	0	Romaine lettuce
	<i>Listeria monocytogenes</i>	147	33	Cantaloupes
	<i>Salmonella agona</i>	106	0	Papaya
	<i>Salmonella enteritidis</i>	21	0	Alfalfa sprouts, spicy sprouts
	<i>Salmonella panama</i>	20	0	Cantaloupe

○ 특히, 2012년 8월 멜론에 오염된 *Salmonella typhimurium*과 *Salmonella newport*에 의한 식중독 사고는 미국의 26개주에서 발생하여 총 270명의 식중독 발생 건수를 나타내었으며, 미국의 한 농장이 오염되어 미국 전역으로 퍼진 것으로 보고되어 신선농산물의 안전성 및 유통의 중요성이 대두되고 있음. 또한 2011년 멜론에 오염된 *Listeria monocytogenes*에 의한 식중독 사고 또한 미국 28개주에서 발생하여 총 33명의 사망자를 발생시켰음.

○ 또한, 독일에서는 유기농 채소를 섭취하고 변종 장출혈성대장균(EHEC)에 약 3000명이 감염되었으며 약 30명이 사망한 것으로 보고되었으며, 유럽의 전 지역에서 약 3911명이 감염되어 47명이 사망한 것으로 알려졌다. 이 외에도 캐나다, 오스트레일리아, 유럽 등에서 이러한 신선농식품의 섭취로 인해 식중독 사고가 지속적으로 발생하고 있음.

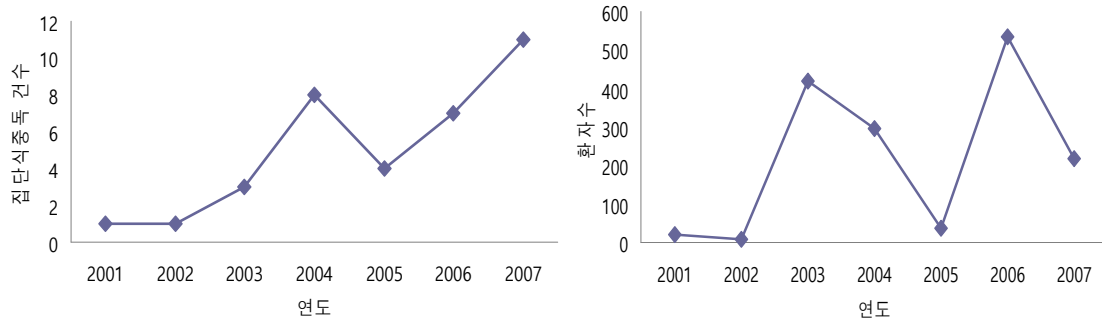
[표] 각국의 신선 농식품에 의한 세균성 식중독 발생

Location	Year	Pathogen	Produce	Cases (deaths)
Canada	2005	<i>Salmonella</i>	Mung bean sprouts	592
USA	2005	<i>Salmonella</i>	Tomatoes	459
USA	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Spinach	199 (3)
Australia	2006	<i>Salmonella</i>	Alfalfa sprouts	125
USA, Canada	2006	<i>Salmonella</i>	Fruit salad	41
USA	2006	<i>Salmonella</i>	Tomatoes	183
USA	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Lettuce	81
Australia	2006	<i>Salmonella</i>	Cantaloupe	115
USA	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Spinach	22
Europe	2007	<i>Salmonella</i>	Baby spinach	354
North America, Europe	2007	<i>Salmonella</i>	Basil	51
Australia, Europe	2007	<i>Shigella sonnei</i>	Baby carrots	230
Europe	2007	<i>Salmonella</i>	Alfalfa sprouts	45
USA, Canada	2008	<i>Salmonella</i>	Peppers	1442 (2)
USA, Canada	2008	<i>E. coli</i> O157:H7	Lettuce	134
UK	2008	<i>Salmonella</i>	Basil	32
USA	2008	<i>Salmonella</i>	Cantaloupe	51
USA, Canada	2008	<i>Salmonella</i>	Peanut butter	714 (9)
USA	2009	<i>Salmonella</i>	Alfalfa sprouts	235
USA	2010	<i>E. coli</i> O145	Lettuce	26
USA	2010	<i>Salmonella</i>	Alfalfa sprouts	44
USA	2010	<i>L. monocytogenes</i>	Fresh cut produce (celery)	10 (5)
USA	2011	<i>Salmonella</i>	Alfalfa and mixed sprouts	140
USA	2011	<i>Salmonella</i>	Cantaloupe	20
USA	2011	<i>Salmonella</i>	Papaya	106
Europe	2011	<i>E. coli</i> O104:H4	Vegetable sprouts	3911 (47)
USA	2011	<i>L. monocytogenes</i>	Cantaloupe	146 (31)
USA	2011	<i>E. coli</i> O157:H7	Strawberries	15 (1)
USA	2011	<i>E. coli</i> O157:H7	Lettuce	60

○ 현재 식품의약품안전처의 보고에 따르면 국내에서도 매년 다수의 식중독 사고가 발생하고 있으며 이는 학교 급식 및 외식 산업의 증가와 더불어 매년 증가하는 추세를 나타내고 있음 (2008년: 354건 7,487명, 2009년: 228건, 5,999명, 2010년: 271건 7,218명, 2011년: 249건, 7,105명, 2012년: 266건, 6,058명, 2013년: 235건, 4,958명, 2014년: 349건, 7,466명, 2015

년: 330건, 5,947건).

○ 특히, 2000년대 들어 영양학적으로 우수한 웰빙식품을 선호하는 경향이 뚜렷해지고, 식습관이 보다 서구화되면서 나타나는 현상으로 향후 지속적으로 신선 농식품 관련 식중독 집단발병은 지속될 것으로 예상된다.



[그림] 국내 신선 농식품 관련 식중독 발생현황

○ 이와 같이 전 세계적으로 최근 발생했던 농산물에 의한 식중독 사고와 같이 과일 및 채소와 같은 신선 농식품은 수확 후 소비되는 과정의 여러 단계에서 병원성 미생물을 포함한 다양한 미생물에 오염될 수 있음. 부패 미생물과 효모, 곰팡이 등이 채소나 과일에서의 우세한 미생물로서 존재하지만 식중독을 야기하는 병원성 미생물의 오염도 최근 보고 되고 있음.

○ 최근 국내 농산물의 수출이 증가하고 있는데 수출식품은 수송되는 기간이 더욱 길게 요구되기 때문에 미생물에 오염되었을 때 오염된 미생물의 생육 및 관련 식중독 사고의 위험이 더욱 크다고 할 수 있음. 실제로 미국의 보고에서 외국으로부터 수입된 과일 및 야채를 통한 여러 식중독 사고가 발표된 바 있음. 그리고 2014년 농촌진흥청에서 국내 신선 농식품인 들깨와 상추의 재배에서 소비까지 단계에서 단계별 유해미생물을 모니터링 한 결과, 식중독 미생물들이 유통단계까지 남아 있는 것으로 나타나, 섭취 시에 문제가 발생할 것으로 나타났음.

[표] 국내 신선 농산물 들깨 및 상추의 재배에서 소비까지 유해미생물 모니터링 결과

신선 농식품	식중독 미생물	농장	마트	도매시장
들깨	일반세균	5.46 Log	5.22 Log	5.60 Log
	대장균군	1.28 Log	1.99 Log	1.75 Log
	<i>B. cereus</i>	1.40 Log	1.74 Log	1.72 Log
	<i>S. aureus</i>	-	1.78 Log	-
상추	일반세균	4.93 Log	5.01 Log	6.01 Log
	대장균군	1.18 Log	1.35 Log	1.30 Log
	<i>B. cereus</i>	1.54 Log	2.02 Log	1.35 Log

- 이러한 신선 농식품에 오염되는 식중독을 유발하는 병원성 미생물은 다양한 오염 경로를 통하여 과일과 야채 등에 오염된 과일과 야채의 표면 및 상처 등의 틈에서 살아서 소비되기 전에 저장기간 동안 식중독을 일으킬 수 있는 충분한 농도로 성장할 수 있음.
- 특히 신선 농식품은 조리 및 가공 과정이 최소화되어 소비되기 때문에 수확 후 살균·소독 시스템 적용과 저장 시에 이용되는 저온저장법만이 이러한 식품의 미생물적 안전성을 증진시킬 수 있는 유일한 방어막으로 이용되고 있는 실정이어서 식중독 사고에 대한 위험성이 매우 높음. 또한, 이들의 제어를 위해서 다양한 물리적 방법, 화학적 방법, 생물학적 방법, 병행 처리 방법 등 다양하게 연구되고 있으며, 현장에서 사용가능한 다양한 응용 방법들이 시도되고 있음. 이를 통해 신선 농식품에 이미 오염된 식중독 유발 세균들에 대한 제어를 위한 노력을 하고 있음.
- 하지만, 신선 농식품에 이미 오염된 식중독 유발 세균들에 대해 물리화학적인 다양한 처리를 통한 제어도 중요하지만, 식중독 유발 세균의 관리를 위해서는 오염을 사전에 방지하거나 오염된 신선 농식품으로부터 식중독 유발 세균의 정확하고 신속한 검출이 필요할 것으로 판단됨. 또한, 일반인들도 식중독 유발 세균들을 검출할 수 있는 편이성도 함께 필요할 것으로 사료됨.
- 기존에 식품 공전 또는 FDA의 Bacterial Analytical Method 등에 의한 방법의 경우 미생물에 대한 전문적인 지식을 기반으로 실험적인 기술과 장비 등이 필요하기 때문에 인력과 소모되는 비용이 큼. 또한, 전통적인 배양 방법을 통한 검출은 기본 적으로 시간이 많이 소요됨. 이에 따라, 이를 보완하기 위한 다양한 검출법들이 개발되고 있으나, 이러한 검출법들은 식품 공전에 등재의 어려움, 현장에서 적용하기가 까다로움, 고가 검출 키트, 복잡성, 일반인 사용의 어려움 등의 개선이 필요할 것으로 판단됨.

제2장. 연구개발의 필요성

1절. 국내외 식품 안전 기술 현황

- 최근 식품 매개 질환이 발생한 경우에는 질병 발생으로 인해 심각할 경우 사망까지 유발하게 되기 때문에 개인에 미치는 영향이 매우 커지고 있으며, 국가 간 무역 분쟁을 야기 시켜 국가 경제에 미치는 영향이 점차 증가되고 있음.
- 따라서, 질병 치료를 위한 보건비용과 경제적 손해비용의 발생 및 국가 이미지 손실 등 국가 차원에서 막대한 손실을 초래하게 됨.
- 그러므로, 국내외에서는 식품 안전을 확보하기 위해 국제기구, 관련 기관 등에서는 다양한 권고나 가이드라인 제시 및 국가 네트워크 구축 등을 통하여 식품 안전 확보를 수행하고 있으며, 이를 위한 다양한 식품 안전 기술을 개발 보급하고 있음.
- 미국의 경우 사전예방에 중점을 식품안전 현대화법(Food Safety Modernization Act) 제정 등 식품안전 강화 추세이며, 이를 위해 혁신기술의 융합, 빅데이터 등 과학기술적 패러다임 변화에 대응 할 수 있는 식품안전관리체계 고도화를 수행하고 있음.
- 또한, EU에서는 소비자 안전을 위해서는 위해가 확인되기 이전이라도 사전에 예방 조치할 수 있도록 하는 식품 위생규정 시행 중에 있고, “Horizon2020 계획”을 통해 식품 중 유해물질 위해평가, 곰팡이 독소 제어, HACCP 기술, 가짜 식품 판별 등 연구 강화하고 있음.
- 일본에서는 소비자 안전을 최우선으로 하는 식품안전체계 모색을 위해 소비자청의 역할 강화하고 있으며, 식품 내 방사능과 바이오모니터링을 통한 방사성 물질 노출수준과 건강 영향 평가 등 안전관리 대상과 인체 간 통합 위해평가 연구 강화하고 있음.
- 국내에서도 국민의 먹을거리 안전과 건강한 식생활 보장을 위한 생산·제조부터 유통, 소비까지 종합적·사전예방 안전기술을 선진화하고자 하고 있음. 이를 위해 다음과 같은 안전 기술 개발을 수행하고 있음.

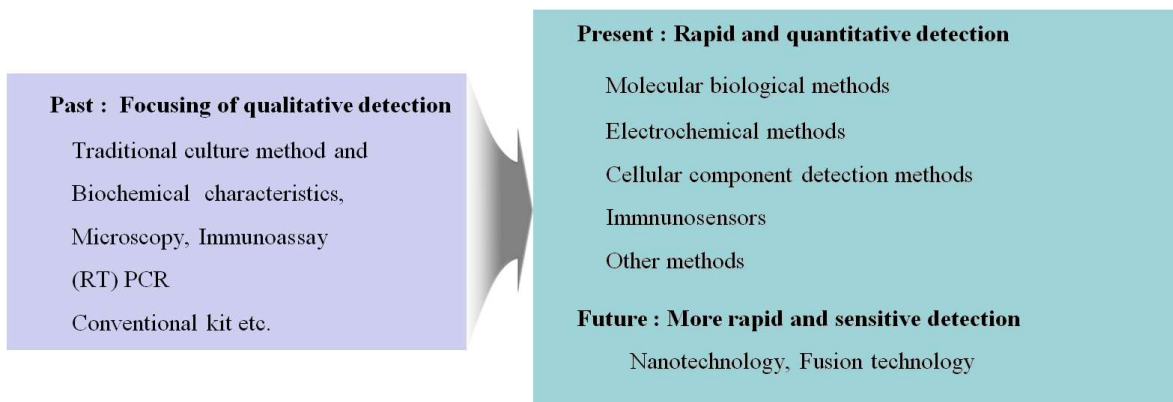


[그림] 국내 식품 안전 기술 선진화 방안

- 특히, 식품 위생 안전 기술 개발을 위해 화학적 위생 기술 개발의 경우, 곰팡이 독소 등 자연독소 시험법 개발, 중금속 및 감마선-전자선 조사처리 실태조사 및 중금속 안전성 평가, 신규 잔류농약 기준 설정을 위한 위해평가 및 수입 농산물 잔류농약 모니터링, 비의도적 생성물질, 식품첨가물에 대한 안전성평가 및 시험법 개발, 기구 및 용기 포장 유래 이행물질 시험법 개발 및 안전성 평가를 진행 중에 있음.
- 또한, 미생물 안전 관리 기반 강화를 위해 미생물의 합리적 관리방안 제시를 위한 미생물 위해평가와 새로운 위해가능 미생물에 대한 위해기술서 개발 확대를 위해 2015년 총 25 종 미생물에서 2016년에는 3종 이상 추가와 추후 식품 안전 관련 미생물에 대해 지속적으로 증가시킬 계획임.
- 그리고, 기존 미생물에 대한 검출과 제어를 위해 생물학적 기반, 화학적 기반, 물리적 기반, 융합 기술을 통한 기술 다변화를 통해 미생물 검출 기술 고도화 및 기준·규격 재평가 및 기생충 분석법 개발과 위해 미생물 저감화 기술 개발을 확대시킬 예정임.
- 따라서, 정부에서 추진 중인 식품 안전 선진화를 위한 다양한 기술 개발에 일환으로, 본 사업에서는 미생물인 박테리오파지 기반으로 하는 새로운 방법의 신속 검출법 개발과 신규의 미생물 저감화 기술을 추진할 것임.

2절. 기존 식중독 세균 검출법과 문제점

- 현재 전 세계적으로 식중독 세균 등의 병원성 미생물에 대한 신속 검출을 위한 다양한 방법들이 제시되고 있음. 대표적인 예로, 전통적인 배양 방법에 의한 검출, 생화학적 특성 분석을 통한 검출, 항체를 활용하는 검출, 핵산 기반의 검출 방법, Microarray 기법, 테라헤르츠 분광 영상을 이용한 기법, 기타 검출법 등 다양하게 알려져 있음.
- 일반적으로 식중독 세균 등 병원성 미생물의 검출을 위해서 과거에는 주로 정성적인 평가가 주된 목적으로 진행되었음. 이를 위해 배양법과 생화학 특성 분석법, 현미경 활용, 면역 측정 기법, (RT) PCR, API kit, VITEK, MIDI, VIDAS 등의 상업적 키트 등이 사용되었음.
- 최근에는 신속 검출과 정량 분석이 주된 목적으로 식중독 세균의 검출이 이루어지고 있으며, 다양한 분자생물학적 기법을 적용한 검출, 전기화학적 특성에 기반한 검출, 세포 구성 성분을 활용한 검출, 면역 센서, 나노 기술을 이용한 검출, Fusion technology를 활용한 기법, 박테리오파지 기반의 검출 등 다양한 방법들이 소개되고 있음.



[그림] 식중독 세균의 검출 기법의 변화

- 국내 식품 위생 검사의 경우 식품 공전에 의한 방법을 기본으로 하여 전통적인 배양법을 기반으로 수행하고 있으며, 이에 따라 미생물학적인 안전성 평가를 진행하고 있음. 따라서 국내 식중독 세균 신속 검출을 위해서 몇몇 어려움이 있음.
- 국내 식중독 세균 검출법의 문제점
 - 식중독 세균 검출 기술은 그 신속성과 정확성이 중요하게 요구되고 있으나 배지 배양 기반의

기술들은 해당 미생물의 검출 및 확진까지 매우 긴 시간과 복잡한 실험 단계를 요구하게 된다. 즉, 식품공전에 의거한 정성적인 양성균의 확진을 위해서는 증균 배양 12-16시간, 분리배양 최소 16시간, 확인시험에 24-48시간이 소요되어 총 3일 이상의 시간이 필요함.

- 또한, 검사과정에서 많은 시간과 노동력이 필요하여 검사항목이 확대되는 경우, 검사 횟수의 증가가 불가피함. 따라서 식중독 세균을 간편한 방법으로 검출할 수 있는 기술의 필요성이 대두되고 있음.
- 신선 농식품의 경우 다양한 세균들이 존재하고 유용 세균과 병원성 세균 등이 혼재하는 경우가 비일비재하며 원재료의 특성이 주는 식품 조성 또는 매트릭스(matrix)의 차이로 인해 검출 효율이 낮아지는 문제가 있으며 적은 수로 존재하는 세균을 검출해야 할 때 어려움이 있음.
- 또한, 식중독 세균의 검출을 위해서는 식품에 따라 적절한 전처리가 필요함.
- 그리고, 식중독 세균의 검출을 위한 장비로써 배양기, 고압 멸균기, 무균 상자, 고가의 배지, PCR 장비 및 관련 기기 등 초기 투자비용 및 운영비용이 지속적으로 소요되기 때문에 산업 현장에서 고가의 비용 필요함.
- 현재 국내 농식품 업체의 현실은 연구실을 따로 운영이 힘들고, 미생물에 대한 전문적인 지식을 보유하고 있는 인력 고용에 어려움이 있음. 그러므로 농식품 산업 현장에서 식중독 세균의 검출을 위해서는 검출 기법의 편이성과 더불어 좁은 공간에서도 활용이 가능해야 함.
- 신속 검출법에 대한 식품 공전 등재 어려움.



[그림] 식중독 세균 검출법의 문제점

○ 그러므로, 국내 식중독 세균의 신속 검출법에 대한 어려움을 해결하기 위해서는 기본적으로 신속성과 특이성을 기반으로 하는 최신 식중독 세균 검출법 개발이 필요하며, 식품 매트릭스에 영향을 최소한으로 해야 함. 또한, 상용화를 위해 가격 경쟁력 확보와 숙련된 연구원이 아닌 일반인도 사용이 가능할 수 있도록 간편성과 편의성을 확보해야 할 필요가 있으며, 최소한의 공간과 장비로 검출이 가능해야 할 것으로 판단됨.

○ 마지막으로, 개발된 방법에 대한 국내외 검증(validation and verification)이 반드시 수반되어야 할 것임. 그리고 검증된 식중독 세균 검출법에 대해 식품 공전에 등재하여 활용할 수 있도록 해야 할 필요가 있음.



[그림] 기존 식중독 검출법을 보완한 검출 키트화

3절. 기 식중독 세균의 제어법과 제약점

○ 현재 국내외에서 식중독 세균의 제어를 위한 다양한 연구와 응용에 대한 연구 개발이 활발하게 진행되고 있음. 현재 연구 개발되거나 적용되고 있는 식중독 세균의 제어방법으로는 물리적 처리 방법, 화학적 처리 방법, 생물학적 처리 방법, 병행 처리 방법 등을 통해 응용되고 있음.

○ 식중독 세균 제어를 위한 물리적 방법

- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심 증대와 1인 소비자 증가, 고령화 사회 진입 등으로 인해 신선 농식품과 연관된 최소가공식품 및 유기 농산물 시장의 소비가 증대됨에 따라 이들 식품에 오염될 가능성이 있는 식중독 유발 세균과 부패 세균의 제어를 통한 안전성과 저장성 증진

을 위해 식품의 품질 변화를 최소화하는 물리적 제어 방법인 비가열(Non-thermal) 처리법 등에 대한 연구가 진행 중에 있음.

- 현재 신선 농산물 살균·소독을 위한 물리적 처리 시스템 및 융복합 병행 시스템은 cold plasma, 초음파, UV, PEF(Pulsed electric field), ILP(Intense light pulse), OMF(Oscillating magnetic field), HPP(High pressure process), HPCD(high pressure carbon dioxide), Irradiation, 나노입자 살균처리 기술 등이 연구 중에 있으며, 최근에는 이들의 융합 처리를 통한 방안도 도입 중에 있음. 이러한 비가열 처리는 최근 응용 분야가 확장되고 있으며, 각각의 비가열 살균은 물리적 처리 방법에 따라 장단점을 가지고 있음. 그러므로 각 비가열 처리 방법들의 장단점과 식품의 물성에 따라 신선 농식품에 처리 방법의 다변화가 필요함.

[표] 비가열 처리의 장점 및 단점



	Advantages	Limitations
Irradiation	Effective for several foods Many different sources available (Gamma rays, electron beam)	Limited public acceptance Lipid oxidation of meat products
UV radiation	No chemicals are used Non-heat related method Lesser changes in quality attributes of food	Long term exposure can be harmful to the industry workers
HPP	Independent of the shape of food Can be used for both solid and liquid samples.	Changes in quality of food has been observed
HPCD	Can be used in a batch or continuous process CO ₂ is GRAS, nonflammable and non-toxic	Not very successful for solid foods Commercial application is still not a success
PEF	Pulse applied for a short period so no generation of heat Less usage of energy	Cannot be applied to foods which cannot withstand high fields Cannot be applied to foods that form bubbles

- 그러나, 식품 생산 공장의 대량 생산체계를 지닌 현재의 식품산업계에서 현실적으로 적용 가능한 물리적 처리 기술에 대한 연구가 미비한 상황이며, 비가열 처리 등과 같은 연구에 대한 요구는 점차 증가되고 있음.

○ 화학적 처리 방법

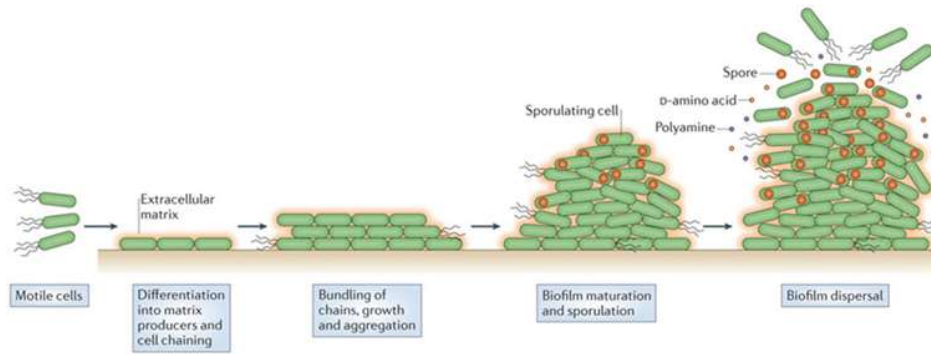
- 현재 미국 등의 외국의 경우 신선 농산물의 병원성 미생물에 대한 안전성 문제가 중요하게 인식됨으로써 대부분의 신선 농산물을 무세척(no-rinse) 살균소독제로 처리하도록 권장하고 있음.
- 이러한 무세척이고 식품표면에 이용될 수 있는 살균소독제로 미국의 FDA에 허가 받아 사용되고 있는 화합물로는 염소(chlorine), 이산화염소·산화염소계 화합물, 요오드 화합물(Iodophors), 4가 암모늄 화합물, 산성 음이온 소독제, carboxylic acid sanitizers, peroxy acid compounds, 페놀계 등이 있음.
- 미국은 이러한 식품의 세척에 이용되는 세척제 및 살균소독제에 대하여 자율표시제도를 운영하고 별도의 규정을 두지 않고 있음. 다만 과일, 야채의 껍질을 벗긴 뒤에 사용되는 성분을 2차 직접첨가물로써 지정하여 관리하고 있음.
- 하지만 우리나라의 경우는 식품에 사용되는 모든 살균제의 성분을 식품 첨가물로 규정하고 있으며 외국에서와 같이 병원성 미생물을 제어할 수 있는 무세척 살균소독제의 항목을 가지고 있지 않음.
- 다만 보건 복지부에서 관리하는 대한민국 위생용품의 규격 및 기준에서 과일과 야채를 씻는데 사용할 수 있는 1종 세척제의 기준을 가지고 있음(2종 세척제-식품의 용기 세척 시 사용, 3종 세척제- 가공·조리기구 등을 세척 시 사용). 하지만 이러한 세척제는 미생물을 제어할 수 있는 살균성분을 포함하고 있지 않아 미생물의 제어를 위해서 사용되는 살균제와는 구분되며 세척 후에 반드시 물로 헹구어야 함.

[표] 신선 농식품에 사용하는 주요 살균소독제 종류와 특성

살균소독제	처리장치	특성
염소수		<ul style="list-style-type: none"> • 유효염소100~200 ppm사용 • 넓은 스펙트럼의 항균효과 • 경제성이 높음 • 부식성 및 냄새 유발 • 유기물의 영향을 받음 • 독성물질(THM) 발생 우려
전해수		<ul style="list-style-type: none"> • 식염 또는 염산을 전기분해하여 생성 • 유효염소 10-80ppm • 염소에 비해 냄새가 적음 • pH에 따라 다른 장치 사용 • 설치 비용이 필요

오존수		<ul style="list-style-type: none"> • 2-5 ppm 농도 사용 • 살균효과가 높음 • 넓은 pH에서 효과 • 오존가스(배오존) 발생 • 설치비용이 높음
이산화염소		<ul style="list-style-type: none"> • 액체 또는 가스 형태 살균처리 가능 • 염소보다 강력한 살균력 • 기체는 빛에 의해 쉽게 분해됨 • 발암물질 생성 없음 • 넓은 pH에서 효과 • 고농도가스에서 불안정
과산화초산		<ul style="list-style-type: none"> • 유기물에 대한 내성이 강함 • pH 조절 필요 없음 • 넓은 온도범위에서 효과 • 금속 이온에 민감 • 강한 냄새 • 미국, 유럽에서 사용
Acidified sodium chlorite (ASC)		<ul style="list-style-type: none"> • 염소계와 구연산 등의 유기산 혼합 • 염소계에서 비해 높은 살균력 • 살균효과의 유지 능력이 좋음 • 처리 후 행굼이 필요 없음 • 높은 농도에서 조직연화 가능

- 현재 소비자의 건강과 영양에 대한 관심이 높아지면서 화학적 살균제의 식품에의 이용을 기피하고 있는 실정이므로 따라서 보다 안전하게 과일 및 야채와 같은 신선 농산물에서 오염된 미생물을 효율적으로 제어할 수 있는 방안이 매우 시급함.
- 이러한 화학적 살균제의 안전성에 보완하기 위해 최근에는 식물유래 천연 항균제로 대체하고자 하고 있음. 대표적인 예로 자몽추출물, 시트러스추출물 등 다양하게 시판되고 있음.
- 이러한 다양한 위생처리제들이 개발되어 효과에 대해 얘기하고 있으나, 실제 식품 중에 식중독 세균 등이 오염되어 있을 경우에는 제어가 매우 어려운 것으로 보고되어 있으며, 이러한 원인이 미생물들이 생성하는 바이오필름인 것으로 보고됨.
- 바이오필름은 미생물이 생물학적 또는 비생물학적 표면에 부착하여 자라면서 형성한 3차원적 구조를 의미하며, 통상적으로 미생물과 미생물이 분비한 Extracellular Polymeric substance(EPS), 외부에서 부착된 물질들을 통칭함.

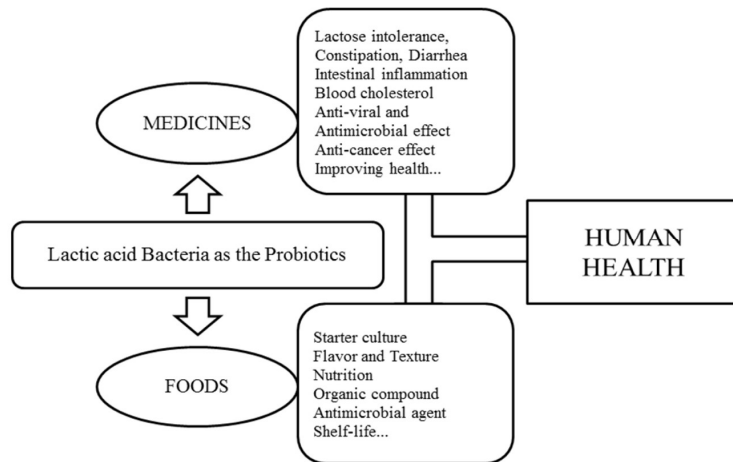


[그림] 바이오필름 형성 과정

- 지구상에 존재하는 99%의 미생물들은 표면에서 바이오필름을 형성한 상태로 존재하며, 단지 1%의 미생물만이 부유 상태(suspension)로 존재하고 있으므로 식품산업에서 미생물에 대한 저감화기술은 미생물이 형성한 바이오필름을 대상으로 연구해야 함.
 - 바이오필름을 형성한 미생물은 Extracellular polymeric substances (EPS)를 분비하여 미생물을 보호하게 되고, 그 결과 열, 낮은 pH, 낮은 수분활성도, 산화제 등의 환경스트레스 요인에 대하여 현저하게 증가된 저항성을 갖게 됨.
 - 신선 농식품은 토양과 지표수를 통한 식중독균의 오염에 무방비 상태로 노출되어 있으며, 토양과 지표수로부터 오염된 식중독균은 신선 농식품의 표면에 바이오필름을 형성하게 되며, 이렇게 형성된 바이오필름에 내재된 식중독균은 일반적으로 사용되는 살균소독제에 대하여 강한 저항성을 가지게 됨. 즉, 신선 농식품에 존재하는 바이오필름 내재 식중독균은 기존의 살균제 척과정에서 저감화가 거의 이루어지지 않음.
 - 신선 농식품 유래 식중독 발생의 최소가공 공정 중에 발생할 수 있는 또 다른 식중독균의 오염원인은 가공환경으로부터의 식중독균 교차오염임. 이러한 교차오염의 가장 큰 원인은 식품 제조환경에 형성된 식중독균의 바이오필름 형성임. 식중독균이 식품접촉 표면에 바이오필름을 형성하면 일반적인 살균소독제 처리로 제거가 되지 않기 때문에 지속적인 식중독균 교차오염의 원인이 됨.
- 생물학적 제어 방법
- 최근 화학제 사용에 대한 위험성과 소비자들의 불안감 증대로 인해 식품에 사용되는 다양한 살균제들에 거부감을 느끼고 있음. 특히, 최근 발생한 O사의 가슴기용 살균소독제 사용으로 인해 임산부 및 영유아 등이 사망 사고와 부작용 사고의 보고로 인해 이러한 상황은 더욱더 가중되고 있음.
 - 이에 따라 식중독 세균을 제어할 수 있는 방법으로 유산균과 이들이 생산하는 박테리오신

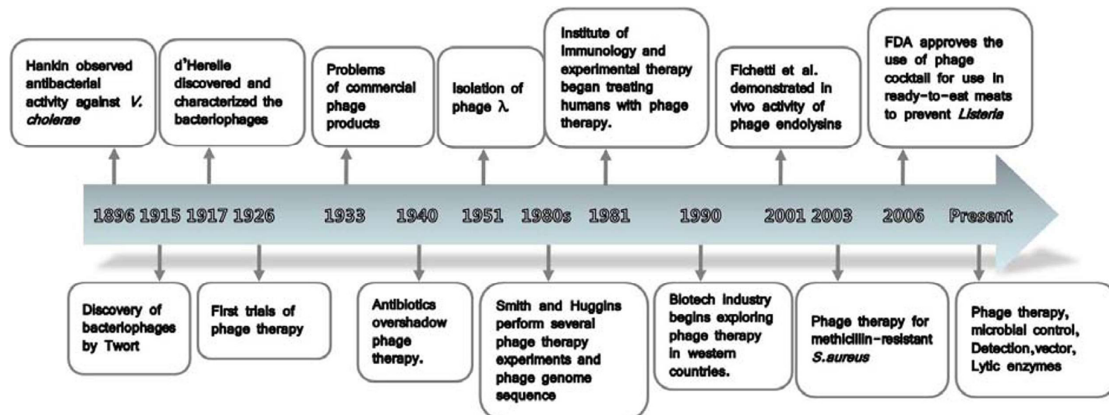
(bacteriocin), 박테리오파지(bacteriophage) 등이 생물학적 제어 방법이 제시되고 있음.

- 유산균의 경우는 최근 프로바이오틱스(Probiotics)로 활용되면서 식품 산업과 의약 산업에서 광범위하게 사용되고 있으며, 사람의 건강에 유용한 효능을 주는 것으로 알려져 있으며, 식품과 의약산업 발전에 이바지 하고 있음.



[그림] 유산균의 식품 및 의약 측면에서 효과

- 현재 유산균 이외에 박테리오파지가 식중독 세균 제어를 위한 위생처리제로써 적용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 이러한 박테리오파지는 19세기 후반에 발견된 virus로서 특정 세균을 용균(lysis)시켜 사멸시키는 특징을 갖고 있어 관련 치료제로서의 연구가 활발히 진행되었음. 하지만 항생제의 발견으로 인해 연구가 지지부진해오다가 항생제 내성 세균의 출현 등의 문제로 인해 항생제 대체제 및 식품 안전 등의 응용으로 다시금 활발한 연구가 진행 중에 있음.



[그림] 박테리오파지의 발전

4절. 본 연구 개발의 필요성

- 신선 농식품의 경우 대부분 최소한의 조리 및 가공 과정을 거쳐 섭취하는 경우가 많아 식중독 관련 세균의 오염 시에 식중독 사고 유발될 가능성이 높음.
- 이들 신선 농식품에 오염되어 있는 식중독 세균의 검출을 위해 다양한 화학적 제어 방법들이 연구되어 왔음. 하지만, 식품에 식중독 세균 등이 오염되었을 경우 이들을 화학적 처리를 통한 제어는 효과가 비교적 낮기 때문에 각각 식중독 세균을 특이적으로 보다 광범위하게 제어할 수 있는 새로운 방안이 필요함.
- 또한, 최근 국내외 소비자들은 화학제에 의한 사건으로 인해서 화학제에 대한 위험성 부각됨에 따라 거부감이 점차 높아지고 있음에 따라 이를 대체할 수 있는 유산균과 박테리오파지 등을 활용하는 생물학적 제어제에 대한 개발과 더불어 현장에서 적용 가능한 방법이 필요함.
- 그리고, 이들 식중독 세균에 오염된 신선 농식품에 대한 관리를 위해서는 보다 높은 특이성과 신속성을 갖는 검출법의 개발이 필요함.
- 현재 식중독 세균에 대한 검출법은 다양하게 개발되고 있으나, 비숙련자가 미생물에 대한 기초 지식을 필요로 하는 검출법을 수행하기는 매우 어려움. 또한, 대표적인 검출법에 하나인 PCR의 경우만 하더라도 특이성 및 신속성이 비교적 우수하지만, 비숙련자가 실험을 수행하기 힘들. 그리고 PCR 기기 및 전기영동 기기 등에 고가의 장비 구매 비용이 필요하며, 일정 공간의 실험실이 필요로 하고 있음.
- PCR 기법이 아니라도 면역 반응을 기초로 하는 키트, 생화학 특성 분석 키트, 독소 분석 키트 등 현재 개발되어 상용화되어 시판 중인 키트 제품도 역시 PCR과 유사한 단점을 보유하고 있음.
- 국내의 경우 전통적인 배양법에 기초한 식품 공전에 따라 식중독 세균의 검출을 기본으로 하고 있음. 식중독 세균 검사를 위해서 일반 비숙련자의 사용이 편리성이 우수한 신속 검출법 개발이 필요함.
- 또한, 기존에 개발된 다양한 검출법의 경우 주로 단순한 연구용으로 그친 경우가 매우 많음. 그러므로 단순 연구용이 아닌 제품화와 식품 공전 등재를 위해서는 반드시 국내외 검증이 필요함.

제3장. 연구개발범위

1절. 유산균의 응용 분야

- 유산균은 과거부터 현재까지 오랜 시간 동안 식품 발효에 사용되어 왔으며, 발효 동안 생산되는 다양한 영양 물질, 향기 성분, 향균 물질 등 식품의 풍미와 제품 수명에 영향을 주는 것으로 보고됨. 그리고 probiotics로서 사람의 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있음.
- 이러한 유산균은 또한 생육하면서 생성하는 유기산, 저급 지방산, 박테리오신 등에 의해 병원성 또는 부패 미생물에 대해 생육을 억제하게 됨.
- 특히 박테리오신은 유산균이 생성하는 대표적인 저분자 peptide 향균 물질로서 현재까지 저해 기작, 구성 성분 등에 따라 매우 많은 종류가 보고되고 있으며, 최근에는 식품 안전을 위해 응용 분야가 확대되고 있음.
- 설사증과 변비 예방으로 probiotics 섭취 시에 장 통증 및 과민 반응감소, 장내 대사 촉진 등의 효과가 있으며, 세 번째로 항암, 항종양, 항돌연변이 효과로 종양 세포의 생육 억제, 발암 물질의 불활성화 또는 합성 억제, 체내 발암물질 합성 효소 작용 억제, 유산균의 세포벽과 발암 물질 또는 돌연변이 유발원들의 흡착 등으로 가능한 것으로 알려져 있음.
- 사람의 면역과 관련된 T 세포, B 세포, macrophage, cytokine 등의 활성화를 통한 면역 증강 효과, 면역 과민 반응에 의해 나타나는 알레르기 또는 아토피에 대한 치료효과, 여섯 번째로 다양한 심혈관계의 질환에 효과가 알려져 있고 임상 실험을 통해서도 확인되었으며, 이외에도 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있음.
- 현재 국내외적으로 많은 사람들이 건강에 대한 관심 증가로 인해 probiotics 관련 산업들이 지속적으로 증대되고 있는 추세임. 그리고 세계적으로 여러 probiotics 관련 회사가 있으며 이들 회사에서는 일찍이 새로운 기능성을 가진 유산균을 발굴하여 probiotics 제품으로 개발하여 판매하고 있음. 현재도 새로운 유산균들을 분리하고 다양한 효능을 확인하고 임상실험 등을 통해 안전성과 기능성이 우수한 probiotics를 개발되고 있음.

2절. 박테리오파지의 응용 분야

- 바이러스의 일종인 박테리오파지는 일반적으로 용균성 생활환(lytic cycle-virulent phage)과 용원성 생활환(lysogenic cycle-temperate phage)을 거치면서 증식하며, 각각의 박테리오파지는 그 특성에 따라 최근 다양한 연구 분야에 응용되어 있음.
- 최근 항생제 내성 세균의 치료에 사용되는 phage therapy, 박테리오파지 유전자를 이용한 용균 효소 등의 유용 효소의 생산, 병원성 세균의 검출, 특정 protein 또는 antibody를 만들어내는 phage display, 병원성 미생물의 typing, vaccine 관련 연구, 유제품에 있어서 lactic acid bacteria의 phage resistant 균주 개발, 환경오염 지표, phage 유전자의 전이, phage의 host specificity와 밀접한 관계를 갖는 receptor 연구 등 매우 광범위하게 연구되고 있음.
- 또한, 식품, 축산식품 등에 위생 처리제 등으로 응용을 통해 식품에 오염되어 있는 식중독 유발 세균 또는 부패 세균에 대한 저감화 효과가 확인되어 식품 분야에서도 적용 범위가 점차 확대되어 가고 있음.

3절. 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 저감화

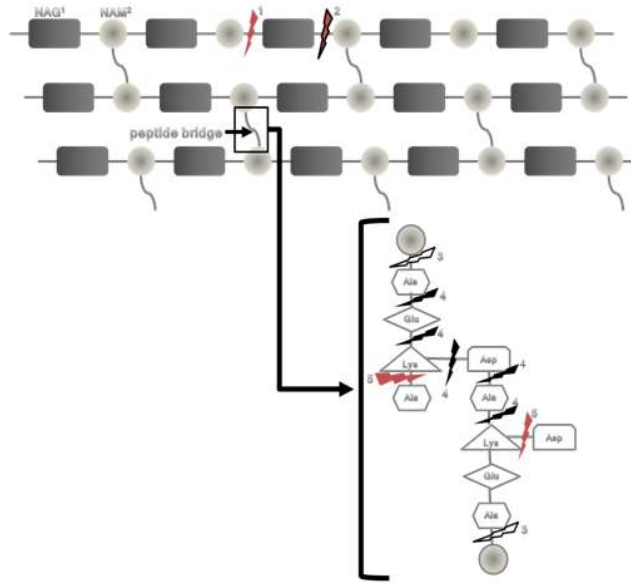
- 최근 식품에 오염되어 있는 야생형의 세균 또는 biofilm을 형성한 세균은 저감화를 위해 열처리 등의 물리적 방법이나 화학적 살균소독제 등이 사용되어 왔으나 그 효과가 크지 않은 것으로 보고됨. 아울러 소비자는 가능하면 최소의 열처리 등의 가공을 원하므로 새로운 천연 식품보존 및 살균제의 개발이 요구 되고 있으며, 이에 따라서 천연항균제, 박테리오파지, lytic enzyme인 endolysin 등이 새롭게 제안됨.
- 또한, 박테리오파지는 세균만을 감염시키는 선택성을 가지고 있으면서 특정 병원성 세균을 사멸시킬 수 있는 특성을 활용하여 농산물 재배와 생산, 식품과 식품 생산 공정에서 다양하게 접목시키고자 하는 연구와 응용이 진행되고 있음.

[표] FDA 승인된 박테리오파지 상품

	Regulatory approval	Application
ListShield™ Intralytix, Inc.	US FDA(2006) and USDA for direct application onto foods(21 CFR 172.185) EPA(EPA registration 74234-1)	Ready to eat foods sea foods Food contact surface
EcoShield Intralytix, Inc.	FDA(2011) cleared as Food contact notification or FCN(FCN No.1018). FSIS directive 7120.1	Red meat parts and trim intended to be ground
SalmoFresh Intralytix, Inc.	FDA(GRAS Notice No. GRN000435), FSIS Directive the star K-certified Kosher and IFANCA-certified Halal product.	Poultry Fish and shellfish Fresh and processed vegetables and fruits
LISTEXTM Mircleos EBI.	In 2006 approved by the FDA as GRAS, and by the USDA in 2007 and by the EFSA, Health Canada, BAG(Switzerland) and FSANA(Australia, New Zealand)	Meat Ready to eat meat Fish and cheese
Agriphage Omnilytics.	EPA 2005 for agriculture	In agriculture on vegetables

○ 현재 다양한 연구진들에 의해 박테리오파지를 활용하여 생물학적 위생 처리제로서의 효용성을 확인하고 있으며, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* 등이 많이 연구와 응용이 이루어지고 있음.

○ 또한, 최근 박테리오파지의 다양한 응용 분야 중 최근 각광을 받고 있는 lytic enzyme의 경우 대표적으로 endolysin이 있으며, lytic enzyme의 경우 특히 식품의 보존제로 좋은 예가 될 수 있을 것으로 제안되고 있음. 특히 endolysin은 세균의 cell wall의 구성 요소인 peptidoglycan을 분해하여 세포를 파괴하고, 그 분해 특성에 따라 N-acetylmuramidase, endo-β-N-acetylglucosaminidase, lytic transglycosylase, endopeptidase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase가 다양한 박테리오파지에서 보고됨.

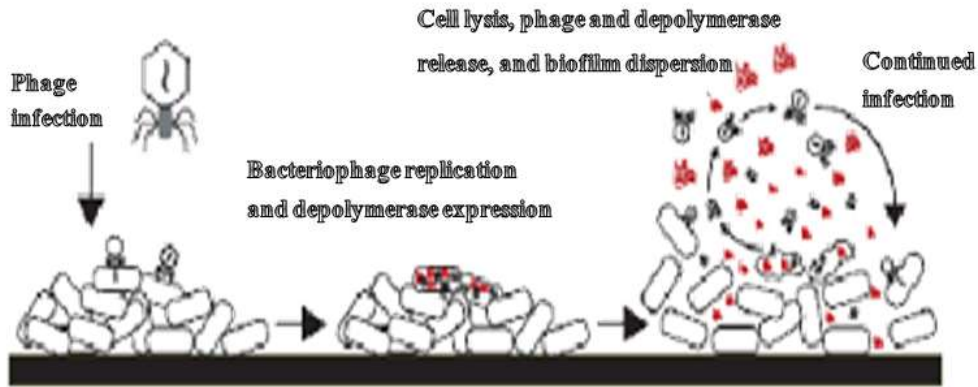


[그림] 세포벽 구조와 endolysin 작용 부위

(1: N-acetylglucosaminidase, 2: N-acetylmuramidase, 3: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, 4: endopeptidase, 5: carboxypeptidase. NAG¹:N-acetylglucosamine, NAM²:N-acetylmuramic acid)

- 이러한 endolysin의 세포벽을 분해하면서, 숙주 특이성이 높은 특성을 이용하여 최근에는 특정 항생제 내성 세균의 치료를 위한 대체제 및 제어제로 가능성이 대두되고 있으며, 이와 동시에 식품 위생처리제로 응용에 대한 연구가 활발하게 진행 중에 있음.
- 최근에는 biofilm을 제거하기 위해 생물학적 제재인 박테리오파지를 이용하는 연구가 응용되고 있음. 미생물 물질 표면에 부착하여 생육하면서 polysaccharide 등의 다양한 extra-polymer들을 생산하여 자신을 보호하면서 생존함.
- 특히, 식품 산업 분야에서는 생산 공정에 오염된 biofilm에 의해 지속적으로 식품에 오염이 유발되는 것으로 알려져 있으며, biofilm이 형성된 미생물의 경우는 가열 처리, 위생 처리 등에도 생존하면서 안전한 식품 생산에 영향을 미치고 있음.
- 이러한 생물막 제거를 위해 물리적 처리 또는 화학적 처리 등을 통한 연구가 진행 중에 있으나, 이러한 단일 방법만으로는 완벽하게 biofilm을 제거하기가 어려운 것으로 보고되고 있으며, 복합 처리가 대안인 것으로 알려져 있음. 또한, 최근 생물학적 제어제인 박테리오파지가 biofilm의 제거에 효과적인 것으로 여러 연구 결과를 통해 입증되고 있음.
- 생물학적 처리제인 박테리오파지의 경우, 일반적으로 biofilm을 구성하고 있는

exopolysaccharide를 박테리오파지의 endolysin, depolymerase 등이 분해하면서 biofilm을 제거하면서 target cell의 outer membrane 등에 부착하여 감염하여 사멸시키면서 biofilm 형성한 미생물의 제어가 가능함.



[그림] 박테리오파지와 biofilm 분해

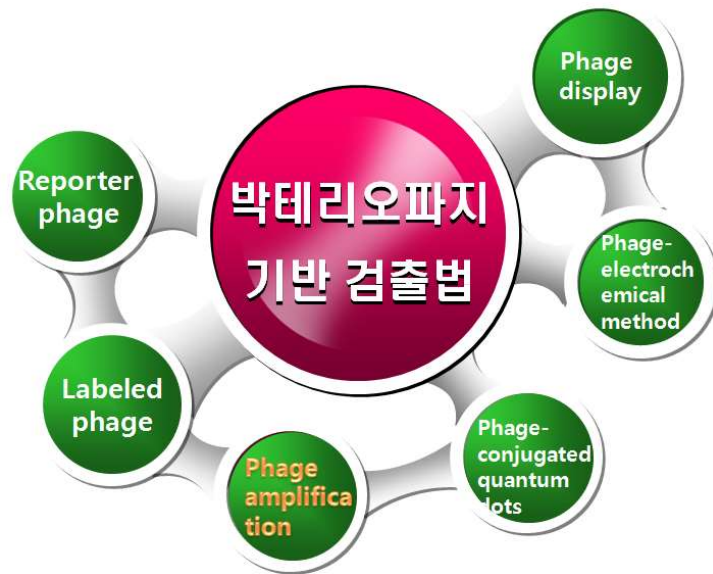
○ 현재 국내에서도 이러한 추세에 맞춰 박테리오파지와 endolysin 등을 식품 위생 처리제로 적용하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 본 연구진은 기존에 다양한 식중독 세균들에 대한 박테리오파지를 분리 및 분자생물학적 특성과 생리특성, 유전체 연구, endolysin 분리 등의 기초적인 연구 자료를 기반으로 식중독 세균 제어, endolysin 적용, 식품에서 다양한 식중독 세균의 제어 효과 등 식품에 적용하는 연구를 지속적으로 수행해 왔음.

○ 하지만, 세계적인 수준에 비해서는 아직까지 다양한 식품에서의 특성 및 저감화 효과 등 기초적인 연구가 아직은 미흡하며, 특히, 식품에 응용하여 현장 적용하는 부분은 더욱 미진한 상황으로 기초적인 연구 결과들을 활용하여 식품 위생 처리제로서 응용이 필요할 것임.

○ 특히, 가열 처리 등의 물리적인 처리 방법을 통한 미생물 저감화가 제한적인 신선 식품의 경우 박테리오파지와 같은 생물학적 위생처리제와 함께 이들이 보유하고 있는 endolysin 등의 다양한 효소들을 활용하여 미생물학적 안전성을 확보할 연구가 필요할 것으로 판단됨.

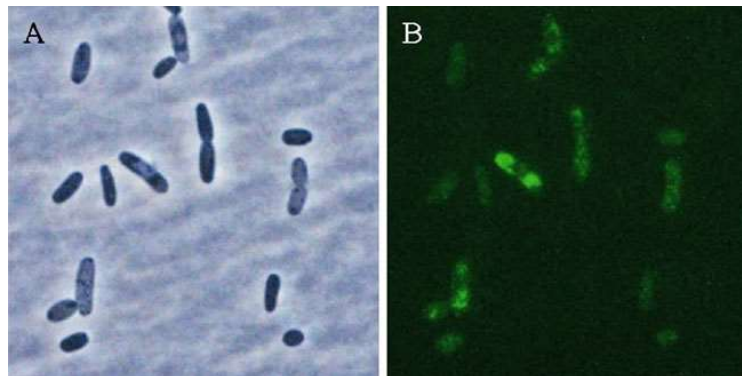
4절. 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출법

- 박테리오파지를 이용한 세균의 검출은 박테리오파지가 갖는 수주 특이성(host specificity)의 특성을 기반으로 하고 있으며, 소요 비용이 매우 저렴하고 정확도와 민감도가 높은 것으로 알려져 있음.
- 이러한 박테리오파지를 기반으로 하여 식중독 세균을 비롯한 병원성 세균의 검출을 위한 다양한 연구가 진행 중에 있음.



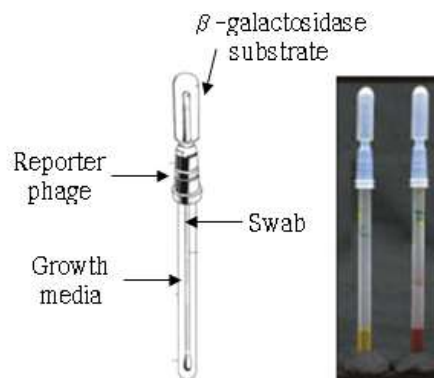
[그림] 대표적인 박테리오파지 기반의 병원성 세균 검출법

- Labeled phage는 비교적 간단한 방법으로 특정 병원성 세균을 감염시키는 박테리오파지의 DNA에 YOYO-1, DAPI(4, 6-diamidino-2-phenylindole), SYBR Gold 등의 형광 염색을 하여 형광 현미경 또는 flow cytometry 등의 검경을 통해 검출하는 방법으로 *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *S. enterica*, *S. typhimurium* 등이 보고되었음.
- Reporter phage의 경우 GFP(Green fluorescent protein) reporter phage, Lux reporter phage, Luc reported phage, LacZ-based colorimetric reporter phage, InaW Ice Nucleation reporter phage 등이 보고되고 있으며, 이들은 특정 형광 관련 유전자를 박테리오파지에 삽입하여 감염 후 형광 강도를 확인하여 검출하는 방법임.
- 대표적인 방법인 GFP reporter phage의 경우 λ phage, T4 phage 등에 GFP를 삽입하여 GFP- λ (or T4) reporter phage를 만들어 *E. coli*에 감염 후 형광현미경 검경을 통해 검출하는 방법임.



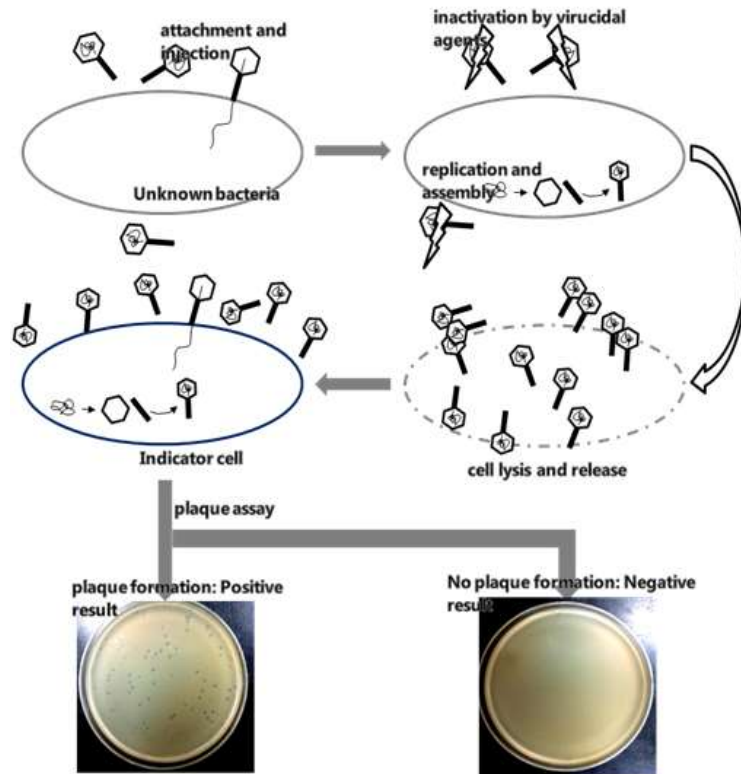
[그림] *E. coli*에 감염된 GFP T4 reporter phage의 (A)광학현미경, (B)형광현미경 검경

○ 그리고, LacZ reporter phage는 β -galactosidase를 암호화하는 lacZ 유전자를 T4 phage에 삽입하여 기질인 β -galactoside를 분해하는 것을 색도 또는 형광 등의 변화를 확인하여 *E. coli*를 검출하는 방법임. 하지만, 이 방법은 검출 한계가 순수 배양된 *E. coli*가 100 CFU/mL로 보고됨. 현재 swab sampling kit가 개발되어 있음.



[그림] Swab diagnostic kit

○ Phage amplification assay는 박테리오파지의 높은 숙주 특이성을 이용하는 것으로 박테리오파지가 숙주를 감염시킨 후 용균성 생활환(lytic cycle) 후 숙주를 사멸시키면서 만들어지는 plaque의 형성 유무를 확인하여 하는 방법임.



[그림] Phage amplification assay 모식도

- 특히 이 방법은 비용이 매우 적으며 비 숙련자도 쉽게 현장에서 적용이 가능하다는 장점을 가지고 있음.
- 현재 박테리오파지를 이용하여 폐, 혈액, 기타 조직 sample에서 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 검출하는 FASTPlaque TB 키트가 상용화되어 시판 중에 있다.



[그림] FASTPlaque TB 키트

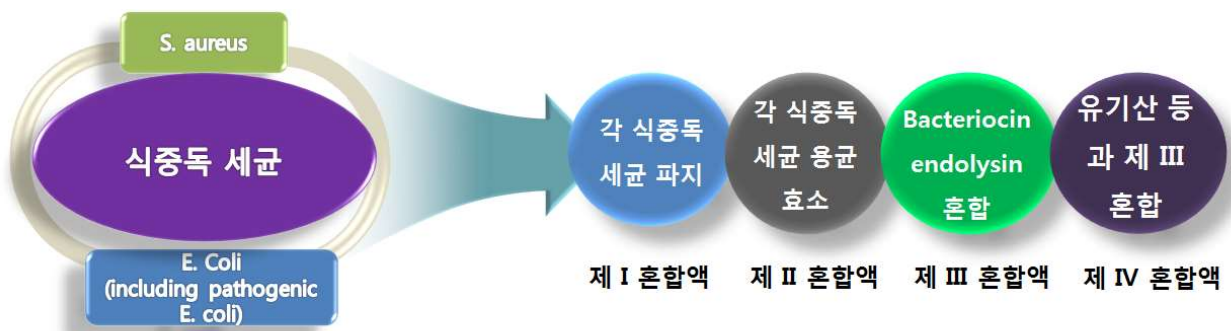
- 그리고, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* 등의 병원성 미생물 검출과 항생제 내성균 확인에도 이용되고 있으나, 아직까지 국외에서는 연구단계로 상용화된 키트가 개발되어 있지는 않음.
- 다른 박테리오파지 기반의 검출법들의 경우 기술적으로 매우 복잡하며, 아직 상용화가 어려울 것으로 판단됨.
- 따라서, 본 연구 사업을 통해 신선 농식품과 관련 있는 식중독 유발 세균인 *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *E. coli* (O157:H7), *Cronobacter sakazakii*에 대한 신속하고 정확한 검출을 위해 phage amplification assay를 기반으로 하는 키트 개발을 통해 비숙련자들의 식중독 세균의 검출이 용이할 것임.
- 또한, 현재 식품에 박테리오파지의 직접적인 처리가 법적으로 제한적이긴 하지만, 이들 식중독 세균들에 대해 박테리오파지를 위생처리제로서 개발하여 제품화하여 국내 시장에서 사용이 가능한 사료 첨가제로 판매가 가능할 것임.
- 그리고, 현재 국외의 경우 박테리오파지의 위생처리제로써 축산업 및 식품 쪽에 활용이 많이 되고 있고 관련 기업에서도 관심이 높기 때문에 우수한 박테리오파지 위생처리제의 개발을 통해 해외 시장으로의 수출의 기회가 있을 것으로 판단되며, 이를 통해 기업 매출 증대가 가능할 것으로 판단됨.

5절. 유산균과 박테리오파지 기반의 위생처리제 연구 개발 개요

- 연구 개발 내용 : 유산균과 박테리오파지 기반의 위생처리제 개발
- 국내외에서 식중독 사고 발생 빈도와 위해성이 증대되고 있는 *S. aureus*과 *E. coli*(pathogenic *E. coli* 포함)에 대한 각각의 박테리오파지 제 I 혼합액 2종
- 각각의 박테리오파지로부터 용균 효소인 endolysin의 분리 및 정제를 통한 endolysin 제 II 혼합액 2종
- 유산균 유래 항균물질 및 endolysin 혼합액을 모두 혼합하여 *S. aureus*과 *E. coli*(pathogenic *E.*

coli 포함)의 식중독 세균의 동시 제어를 위한 제 III 혼합액

- 기존에 GRAS로 인정되고 있는 유기산 등을 활용하여 *S. aureus*과 *E. coli*(pathogenic *E. coli* 포함)의 식중독 세균 제어의 최적화를 위한 제 IV 혼합액 제품
- 신선 농식품 중 2 종의 식중독 세균의 오염을 또는 식중독 감염율이 높은 대상으로 하여 현장에서 제 I ~ IV 혼합액에 대한 저감화 효과 평가



[그림] 박테리오파지를 이용한 위생처리제

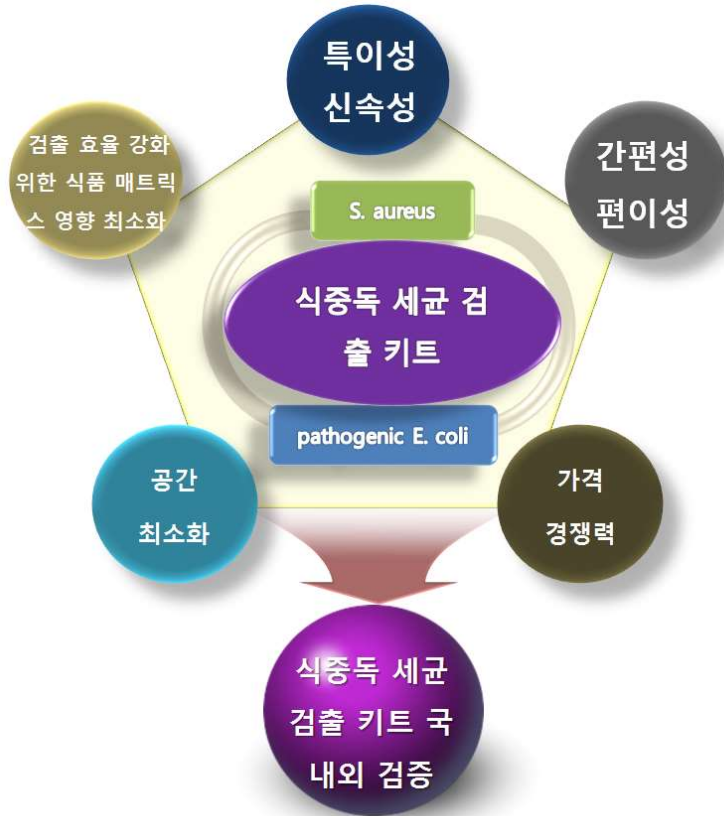
- 신선 농식품 중에 오염되어 있는 *S. aureus*와 *E. coli*(pathogenic *E. coli* 포함) 2 종의 식중독 세균의 제어 효과의 외부 검증을 통한 제품화

6절. 식중독 세균 신속 검출 키트의 연구 개발 개요

- 연구 개발 내용 : Phage amplification을 기초로 하는 2 종 신속 검출 키트 개발
- *S. aureus*와 *E. coli*(pathogenic *E. coli* 포함)의 검출을 위해 박테리오파지를 활용한 phage amplification을 통해 각각의 식중독 세균에 대한 특이성과 신속성을 갖는 각각의 키트 개발
- 각각의 식중독 세균의 오염 가능성이 높은 신선 농식품들을 대상으로 현장 검사와 비숙련자 사

용 편이성과 간편성에 대한 사용과 이에 대한 평가

○ 개발된 박테리오파지 기반의 검출 키트에 대한 국내외 검증



[그림] Phage amplification assay를 통한 검출 키트 개발

7절. 가격경쟁력 확보가 가능한 제품 개발 전략

○ 박테리오파지 기반의 검출 키트

- 신속검사키트의 경우 1세대로 면역침강기법을 활용한 검사키트가 축산물 업체를 중심으로 사용되어져 왔으며 검사 빈도의 감소와 민감도 등의 이유로 그 사용이 줄어들고 있다. 현장에서 검사 시 식중독 의심 균의 발생이 빈번하지 않으므로 식품공전법 중 분리배양단계에서 의심 균의 불검출로 실험을 종결시킨다. 이 때 의심 균에 대한 정보가 없는 경우 선택분리배지 상에서 특정 색, 모양, 크기 등을 통해 유추할 뿐 정해진 규정이 현재는 없는 실정이며 의심되는 균에 대해 생화학적 검사 및 면역학적 검사 등으로 거의 이어지지 않는 실정이다.

- 최근 신속검사법으로 분자생물학적 방법이 확대 사용되고 있지만 유전자 추출, 유전자 증폭, 전기영동 등 현장에서 전문적인 검사기법을 교육 및 활용하는 데는 한계가 있으며 국내 식품제조업 90% 이상이 10인 이하의 영세업체에서는 도입이 매우 어려운 현실이다.
- 중견기업의 경우 분자생물학적 방법으로 일반 PCR, Real-time PCR 등을 도입하여 사용하고 있으나 일반 PCR의 경우 식품 유형별로 유전자 증폭 패턴에 영향을 주게 되어 다양한 이상 밴드의 출현하게 된다. 이로 인해 검사자가 단순 크기에 대한 정보를 통해 판독하기가 어려운 형편이며, Real-time PCR의 경우 증폭의 패턴이 영향을 받아 Ct 값의 변화로 결과해석에 어려움을 주고 있는 실정이다.
- 분자생물학적 방법은 생균과 사균의 구별이 어려운 단점이 있어 특히 농산 가공과정에서 가열 후 공정으로 영양세포는 제거되었지만 일부 사균에 의한 양성반응이 지적되고 있다.
- Phage amplification 기법을 통한 황색포도상구균과 장출혈성 대장균 검사키트가 개발 될 경우 소규모 영세 업체에서도 기존 건조필름배지로 검사하는 정도의 편리성으로 병원성 세균을 검사할 수 있을 것으로 기대된다.
- 식품 시료 1건당 가격비교를 보면 전통적인 방법의 배지 제조 및 검사가 비교적 저렴하지만 기존 검사법 수준의 비용으로 빠르게 결과를 얻을 수 있는 장점이 되며 최근 식품 시료의 2군법, 3군법 등의 적용으로 (n=5)검사비용이 오르고 있어 위생관리에 비용 적으로 어려움을 겪고 있는 영세업체에 Phage amplification 기법의 식중독 검사키트는 식품안전 확보에 기여할 것으로 기대된다.

	식품공전법	분자생물학적 신속 검사법	Phage amplification assay 기법 키트
검사 순서	증균-분리배양-안정화-생화학적 검사-면역학적 검사	증균-균 회수-DNA 추출-유전자 증폭-전기영동-확인	Short enrichment-키트 사용- 배양-결과확인
장비	배양기	배양기, Heating block, 원심분리기, PCR 장비, 전기영동장치, UV illuminator	배양기, 키트
기타 장비 비용	없음	10,000,000원(일반 PCR), 30,000,000원(RT PCR)	없음
1회 검사 시 비용(확정 시)	3,500원(확정 전) 36,000원(확정시)	7,000원/건	4,000원/건
1회 검사 시 시간(확정 시)	3~4일	1.5일	1일
검사 특징	· 확정 까지 3~4일 소요, 신속한 품질	·고가의 장비 비용으로 소규모 식품업체에서 사용 어려움	·고가의 장비 없이 기존에 식품공전법을 사

	관리 부적합 · 배지제조, 조작 등 노동 집약적 · 결과 판독에 전문적인 교육 필요	· 민감도가 높아 오염에 의한 결과 이상 발생할 수 있고, 결과 판독에 대한 전문적인 교육 필요 · 생균과 사균 구별 없이 유전자 검사가 되므로 결과 판독 어려움	용하는 곳에서 거부감 없이 사용가능 · 가격이 비교적 저렴 · 결과 판독이 초보자도 쉽게 가능
--	--	---	--

○ 박테리오파지 기반의 위생처리제

- 박테리오파지 위생처리제의 가격 및 제품력 비교

제품	박테리오파지 위생처리제	염소살균제	4급 암모늄 계열 살균제
사용대상	식품첨가물제재, 기구 등 살균제	식품첨가물 제재, 기구 등 살균제	기구 등 살균제
사용 후 행굼	불필요	반드시 행굼	300배 행굼 불필요 200 배 행굼 필요
유통규격	1L, 3.8L, 18L	1L, 3.8L, 18L	1L, 3.8L, 18L
농축형태	1X, 100X, 1000X (예상)	40,000 ppm (유효염소농도), 최종 농도는 30~200 ppm	300 배 희석 (No-rinse 기준)
단가비교(살균액 20L 제조 기준)	1500원 (예상)	200원	1,000 원
적용 방식	스프레이, 침지	침지	침지
살균력	좁은 범위의 선택적인 살균력우수 및 광범위	광범위	광범위
기타	바이오필름 분해	바이오필름 비분해	바이오필름 비분해

- 제품개발 시 식품첨가물형태의 영양배지 사용으로 Fermenting 이후 1차 제균 공정 이후 바로 사용할 수 있도록 디자인 하여 생산비용을 감소시킬 수 있다.

- 기존 염소살균제와 4급암모늄계열이 갖는 광범위 살균력이 아닌 특정 세균을 대상으로 개발되며 황색포도상구균이 주로 문제를 일으키는 공정, 장출혈 대장균이 문제를 일으키는 공정에

우선 사용이 가능하며 기존 살균제가 가지는 문제를 극복할 수 있을 것으로 예상된다.

- 그러므로 식품유형별로 위해세균 제어 또는 박테리오파지 각테일 과 기타 기능성 첨가제로 살균력의 범위를 정할 수 있으며 행굼이 불필요 하므로 기존 염소 계 등이 가지는 문제를 보완 하여 No-rinsing 살균제 및 살균 코팅제의 효과로 유통과정 중의 균의 저해를 지속적으로 할 수 있다.

2. 연구수행 내용 및 결과

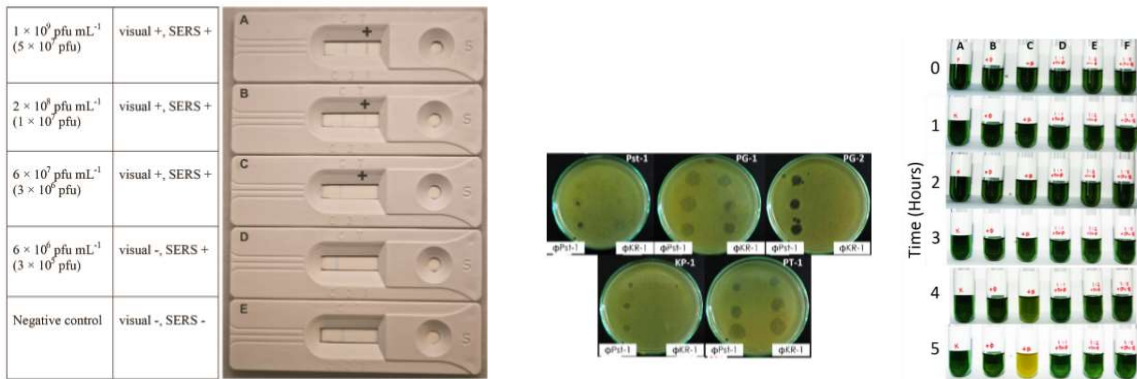
과제번호	1170060
------	---------

주관기관 : (주)마이크로진

제1장. 박테리오파지를 이용한 식중독세균 검출 키트 개발

1절. Bacteriophage를 활용한 검출 키트 관련 연구·개발 동향

- 박테리오파지를 식중독 유발 세균에 대해 검출하려는 연구가 최근 들어 증가하고 있는 추세임.
- Bacteriophage amplification 기법과 세균 검출로 형광 염색을 통해 Dead/Live 세포의 구별 기법의 혼합기법으로 검출 한계를 10 CFU/ml을 4시간 이내검출 사례가 있음.
- 식품 pathogen인 *Listeria monocytogenes*를 Bacteriophage amplification assay기법으로 검출, 이 경우 Virucidal reagent를 사용하는 것이 아닌 Virucidal laser광 처리를 이용하여 Free virus를 제거 시키는 기법을 사용함. 최근 *Listeria* 분석에 Bacteriophage의 Specificity와 Surface enhanced Raman spectroscopy -lateral flow immunochromatography와 결합한 기법으로 검출기법이 발표됨.



[그림] SERS-immunochromatography 와 박테리오파지 결합 검출 예 [그림] Spot assay를 활용한 검출 및 Tube color method를 활용한 정성분석의 예

- 그러나 국내외 Bacteriophage amplification 기법을 활용하여 식중독균 검출 키트에 관한 연구는 아직 없는 것으로 평가됨.

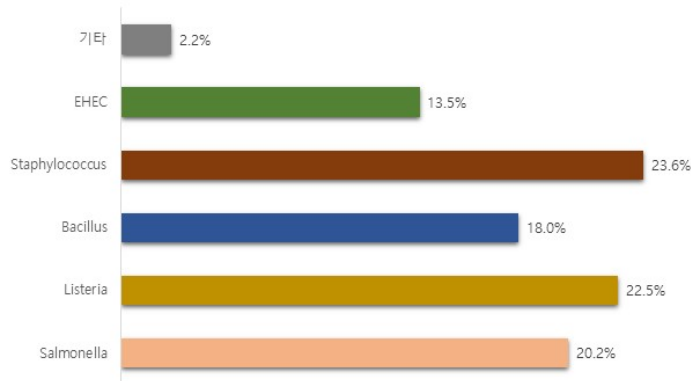
[표] 최근 박테리오파지 및 식중독 세균 검출 관련 주요 논문

NO	논문 제목	발행 연도	간략 내용
1	Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins	2016	Reporter phage이용 검출
2	Rapid multiplex detection and differentiation of <i>Listeria</i> cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains.	2010	phage endolysin을 이용한 <i>Listeria</i> 검출
3	A Simple Bacteriophage-Based Detection Kit for Detecting <i>Escherichia coli</i> on Post-Harvest Agricultural Product	2016	Tube method를 활용한 kit개발
4	Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of <i>Escherichia coli</i>	2010	ATP측정기법과 박테리오파지 기법 융합 방법
5	Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens	2012	감염 진단에 박테리오파지의 활용
6	A bacteriophage detection tool for viability assessment of <i>Salmonella</i> cells.	2014	살모넬라 균 검출에 박테리오파지 이용
7	Bacteriophage amplification assay for detection of <i>Listeria</i> spp. using virucidal laser treatment	2012	Virucidal reagent 개발 관련 논문
8	Rapid Detection of <i>Listeria</i> by Bacteriophage Amplification and SERS-Lateral Flow Immunochromatography.	2015	<i>Listeria</i> 균 검출에 박테리오파지 활용

2절. 식품관련 업체에 식중독세균에 대한 검사 현황에 대한 설문조사

○ 식품관련업체 대략 110 개소(식품제조 75개소, 축산물가공 30개소, 기타 5 개소)에 대하여 식중독세균 관리에 대한 내용을 설문조사하였음. 특히 황색포도상구균에 대한 검사법 및 검사 시 겪고 있는 문제점에 대하여 질문하고, 향후 본 제품과 같은 제품 출시 시 사용의향에 대해서도 조사하였음.

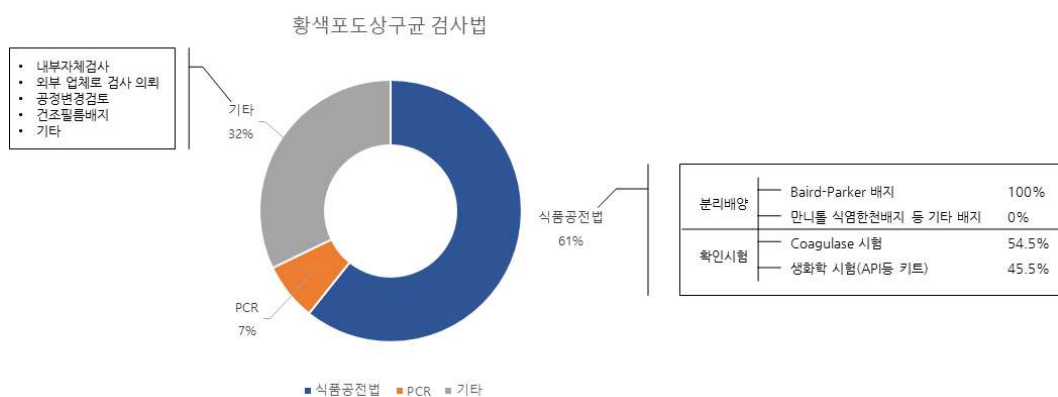
식중독균 검사 종류



[그림] 식품관련업체에서 검사를 실시하고 있는 식중독세균 종류에 대한 조사 결과 (EHEC; 장출혈성대장균, *Staphylococcus*; 황색포도상구균, *Bacillus*; 바실러스균, *Listeria*; 리스테리아균, *Salmonella*; 살모넬라균)

○ 조사에 응하여 설문조사한 식품관련업체 중 대부분은 황색포도상구균, 리스테리아균, 살모넬라균, 장출혈성대장균, 바실러스균에 대한 검사를 실시하고 있었고, 특히 황색포도상구균에 대한 검사가 가장 많았으며, 그 다음으로 리스테리아균, 살모넬라, 바실러스, 장출혈성대장균 순서로 검사 수가 많았음.

○ 이번 조사를 통해 대부분의 식품 관련 업체에서는 특히 황색포도상구균에 대하여 민감하게 반응하고 있고 이에 대한 검사를 주기적으로 실시하고 있음을 알 수 있었음.



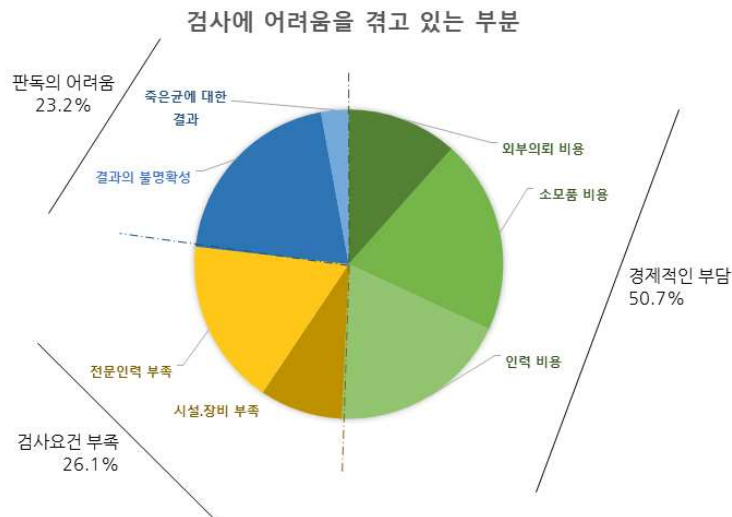
[그림] 식품관련업체에서 황색포도상구균에 대한 식중독균 검사 실시 시 사용하는 방법에 대한 조사결과

○ 조사에 응한 업체 60% 이상에서 황색포도상구균에 대한 검사 실시 시 식품공전법에 의거해 진행한다고 답했으며, 기타는 황색포도상구균용 건조필름을 사용하여 검사가 이루어지고 있음.

○ 검사방법의 선택에 있어 자가품질검사 기준, HACCP 위해요소 분석 기준, 식품제조업체 자체 관리 기준 등으로 나뉘어져 있으며 자가품질검사항목이 아닌 경우 검사법 선정에 비교적 유연하게 대응하고 있음.

○ 식품공전법을 이용한다고 답한 업체들의 경우 모두 분리배양 시 난황첨가 Baird-parker agar(BPA)를 사용한다고 답했고, 난황첨가 만니톨 식염한천배지나 토끼혈장첨가 Baird-parker agar(RPF)배지는 사용하지 않는다고 답했음. 일부 자가품질검사기관의 경우 난황첨가 만니톨 식염한천배지를 사용하고 있으나 보다 저렴하게 제조 또는 구입할 수 있는 Baird-Parker agar를 주로 사용하고 있으며 Baird-Parker agar에 Rabbit Plasma Fibrinogen의 경우 Coagulase 검사를 생략할 수 있어 간편하지만 경제적인 이유로 사용을 하지 않고 있음.

○ 의심집락에 대한 확정시험은 Coagulase 테스트나 생화학키트(API kit 등)를 사용한다고 답했지만 의심집락이 검출되었을 때 경제적/기술적 문제로 확정시험단계를 진행하지 못하고, 외부업체에 의뢰하거나 제품 폐기, 소독을 실시하고 있어 불편함이 있음을 확인함. 또한 확정시험단계에서 사용되는 Coagulase test kit, API kit 등의 사용 숙련도 또한 매우 낮아 실험결과의 신뢰성이 많이 낮음.



[그림] 식품관련업체에서 식중독균 검사 시 가장 큰 어려움을 겪고 있는 부분에 대한 조사 결과

○ PCR법의 경우 우선 공인된 시험법이 아니고, 관련 키트제품이 별로 없을 뿐만 아니라, PCR 시스템을 구축하기 위한 장비나 인력 등 비용적인 부담이 있어 검사에 많이 사용하지 못하고 있다고 답했음.

○ 기타 검사법으로는 내부 자체 검사 또는 외부업체 검사 의뢰, 공정 자체의 변경 검토 그리고 필름배지 사용 등을 답했음.

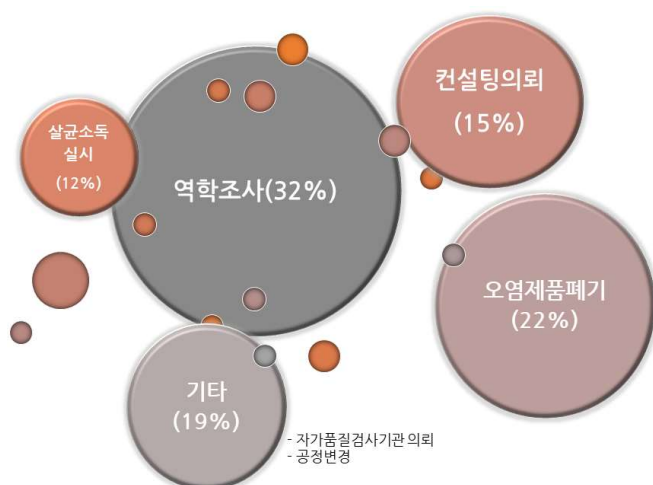
○ 가장 큰 어려움이나 부담을 느끼는 부분은 경제적인 부담이었고, 검사장비나 전문 인력 등 요건의 부족, 판독결과 해석에 대한 어려움이 뒤를 이었음.

○ 경제적인 분야에서도 특히 API 검사 kit나 기타 소모품에 대한 비용 부담이 가장 크다고 답했고, 이를 시행할 수 있는 전문인력에 소비되는 인건비 부담이 뒤를 이었음. 또 외부업체에 의뢰했을 때 발생하는 의뢰비용에 대해서도 경제적 부담을 느끼고 있어, 비전문 인력이 수행할 수 있는 간편한 검사키트가 있다면 이런 문제들을 해결할 수 있을 것으로 생각됨.

○ 결과판독에 숙련도 문제 때문에 식중독검사 장비와 소프트웨어 개발 시 자동판정기능을 추가하거나, 검사자에 의한 판정은 인정하지 않고 오직 색조표, 발색표, 측정 기준값 등의 정량화된 판정을 기준으로 개발되고 있는 추세임. (예, API, MacFarend Standard, Color index, Real time PCR 의 Ct value 등)

○ 경제적인요인 다음으로 검사요건 부족을 답했는데, 전문 인력의 부재나 멸균된 공간 등 적당한 시험 시설이 없거나 검사에 필요한 시험기기/장비가 없어 자체적인 검사에 어려움이 있다고 답했음.

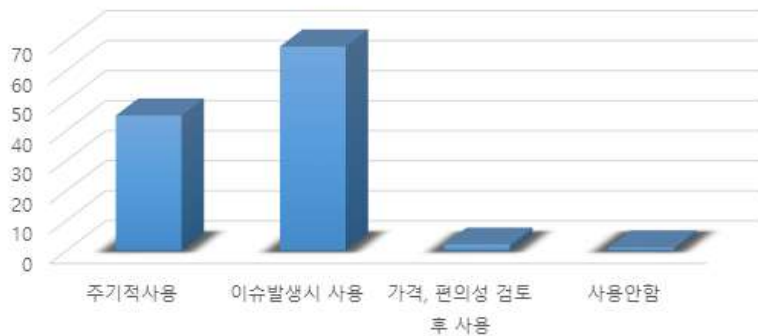
○ 몇몇 업체에서는 자체적 또는 외부업체에 의뢰하여 얻게 되는 검사결과 해석에도 어려움이 있다고 답했는데, 식품공전법을 위주로 하는 업체는 위양성/위음성 등 결과로 불명확할 때, PCR검사를 위주로 하는 업체는 살균작업에 의해 이미 죽은 균에 대하여 위양성 결과로 판독이 어려울 때 불편함이 있다고 답했음. 이로 인해 향후 조치에 대한 방안을 결정할 때도 어려움이 있다고 말했다.



[그림] 식품관련업체에서 식중독세균 검사 후 발견되는 의심집락에 대한 후속 조치에 대한 조사결과

- 조사에 응한 식품관련업체에서는 식중독세균으로 의심되는 집락이 발견되었을 때 대부분 우선 역학조사를 실시한다고 했지만 역학조사를 위해 간편하게 오염여부를 확인할 수 있는 방안이 마땅치 않아 어려움이 있다고 답했음.
- 다음으로 많은 응답률을 보인 것은 오염제품 폐기였는데 대부분 원료 또는 완제품에 대한 검사를 실시하기 때문에 오염 의심 제품을 폐기하게 되었을 때 경제적 손실이 있다고 답함.
- 그 다음으로 외부에 컨설팅을 의뢰하여 방안을 마련하거나, 관련 제품 및 공정에 대한 살균소독을 재실시한다고 답했음. 기타 의견 중엔 자가품질검사기관 등에 의심집락 동정을 의뢰하거나 공정자체 변경을 검토한다고 답했음.
- 위의 응답과 같이 일반적인 업체에서는 의심집락에 대하여 확정을 하는데 어려움이 있기 때문에 외부에 컨설팅, 동정을 의뢰하거나 제품을 폐기하는 등 경제적 손실을 얻고 있었고, 간편하게 확인 할 수 있는 방법 또는 제품 개발을 원하고 있었음. 실제 관련 기술이나 제품이 나온다면 사용할 의향이 있다고 답했음.

관련기업의 해당 키트 사용여부 의사 조사 결과



[그림] PhageAMP-SA 사용 여부 의사 조사 결과

- 조사를 실시한 식품관련업체 대부분에서 해당 과제 결과물 중 하나인 황색포도상구균 검출 키트(PhageAMP-SA)을 사용하고 싶다는 답변을 했고, 주로 모니터링을 위한 주기적인 사용이나 이슈 발생 시 검사목적으로 사용하고 싶다고 답변함.
- 가격이나 편의성을 검토 후 결정하고 싶다는 의견도 있었고, 해당제품은 인증이나 식약처에서 공인하는 방법이 아니기 때문에 사용하지 않겠다는 답변도 있었음.
- 이번 설문조사를 통해 많은 업체에서 황색포도상구균을 식품공전법으로 검사하고 있다는 것을 알 수 있었지만, 검사를 통해 검출되는 의심집락이 있어도 확정시험을 직접 진행하기 어려워하는

업체가 많았음.

○ 그 이유는 적당한 시설이나 장비 등 검사요건이 갖추어져 있지 않거나 이를 갖추어도 진행할 수 있는 전문 인력의 부재 또는 인건비에 대한 부담이 있는 것으로 파악됨. 이러한 이유로 외부 업체에 동정서비스나 컨설팅을 의뢰하는 곳에서도 그 비용 때문에 똑같이 경제적 부담을 느끼고 있었음.

○ 이에 의심집락이 검출되거나 이슈가 발생하여 역학조사를 실시할 때 저렴하고 간편하게 검사할 수 있는 방법이나 제품 개발을 원하고 있었고, 관련 제품이 나온다면 사용하겠다는 답변을 들을 수 있었음.

○ 배지법으로 검사했을 때 나오는 위양성/위음성 결과를 확정하거나, 단시간에 결과를 확인하기 위해 PCR법을 사용하기도 하는데 이는 식약처에서 공인하고 있는 방법이 아니고, 장비나 인력 등의 부담을 느끼고 있었음. PCR법을 사용하는 몇몇 업체에서는 살균 소독 작업들로 이미 죽은 균에 대한 위양성 결과를 얻을 때가 있어 어려움이 있다고 답했음.

○ (주)마이크로진에서 해당 과제를 통해 개발한 검사키트는 오염의심 제품 폐기로 인한 손실이나 동정의뢰 비용, 컨설팅의뢰 비용, 살균소독 비용 등 경제적 손실을 예방할 수 있음. 특히 오직 살아있는 균에 대해서만 검출되고 비전문 인력도 사용할 수 있기 때문에 실제 소비자가 느끼는 효과는 더 클 것으로 생각됨.

○ 이미 이런 제품에 대한 수요가 있는 만큼 해당 과제 결과물이 식품관련 업계에 미칠 수 있는 영향은 대단히 클 것으로 예상함.

3절. 검출 키트 개발 과정

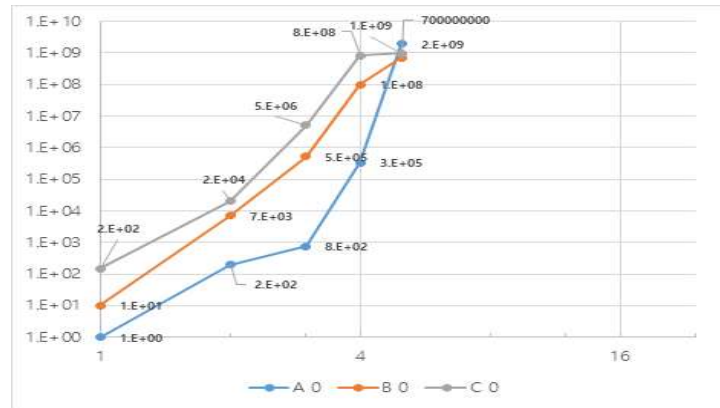
가. 증균 조건 확립 및 증균 배지 개발

(1) 식품공전에서 제안하는 배지를 이용한 증균 조건 확립

○ 용균활성에 대한 특성이 조사된 *E. coli* bacteriophage를 이용해 mTSB 225 ml 배지에서 *E. coli* O157:H7 NCCP13930을 대상으로 증균 조건을 설정하고자함.

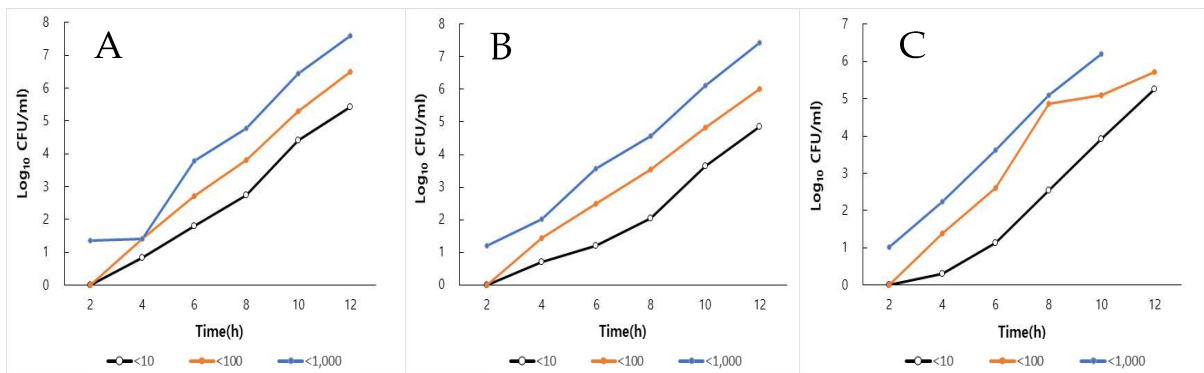
○ 증균 조건을 확립하기 위하여 *E. coli* O157:H7 NCCP13930을 각각 <10 CFU/ml, <100 CFU/ml, <1,000 CFU/ml로 제조하여 배지에 접종 후 총 24시간 동안 35도에서 정치 배양하였

고, 4시간 간격으로 생균수를 측정하였고, mTSB 225ml에서 *E. coli* O157:H7 NCCP13930이 12시간 배양 후 $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml 수준으로 증균됨을 확인함.



[그림] mTSB배지에서 시간에 따른 균 농도 측정

○ 이에 실제 농산물에 각각의 농도의 균이 존재할 때 비슷한 증균속도를 보이는지 확인하기 위하여 시중에 판매되고 있는 로메인, 새싹, 양상추를 구입하여 감마처리 [10kg, 6시간 30분] 후 mTSB 225ml 배지에 넣어 주었음. 이때 앞선 실험과 동일한 균주를 각각 <10 CFU/ml, <100 CFU/ml, <1,000 CFU/ml로 접종 후 총 12시간 배양하여 4시간 간격으로 증균수를 확인함.



[그림] 농산물에 따른 균 농도 비교 (A; 로메인, B; 새싹, C; 양상추)

○ 실험결과 오염된 농산물에 존재하는 장출혈성대장균의 농도는 다음 그래프와 같이 나타났고, 그 결과는 초기 접종농도에 따라 배양시간이 길어질수록 균 농도도 비례적으로 증가했지만 최소 3 log₁₀ CFU/ml 이상으로 배양되었음을 알 수 있었음.

(2) 효율적인 증균을 위한 증균배지 최적화 - 장출혈성대장균

○ 앞서의 실험은 [식품공전-4.16 장출혈성 대장균] 시험법에 따라 mTSB 225 ml (with bile salt)를 증균 배지로 사용하였으나, Karina Ramirez, et, al (2018), Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study의 문헌을 통해 bile salts가 bacteriophage 안정성에 영향 준다는 것을 확인함.

○ mBPW-p배지는 FDA(미국식품의약국), Bacteriological Analytical Manual, BAM Media M192a: Modified Buffered Peptone water with pyruvate (mBPWp) and Acriflavin-Cefsulodin-Vancomycin (ACV) Supplement에서 장출혈성대장균의 증균 배지로 고시되어있어 증균 배지 후보군으로 포함시켰음. 이에 최종적으로 mTSB with bile salt와 mTSB without bile salt, mBPW-p 이렇게 3가지 배지로 테스트를 진행함.

○ 증균 테스트는 앞서 실험을 참고하여 동일한 균주를 $<10^2$ CFU/ml 농도로 접종하였고, 증균조건은 기존과 동일하게 35°C에서 12시간 동안 정치배양시킴. 이때 pH변화를 측정하여 검출키트에 가장 적합한 배지를 선별하고자 하였음.

[표] 12시간 배양 후 배지별 균 수 비교




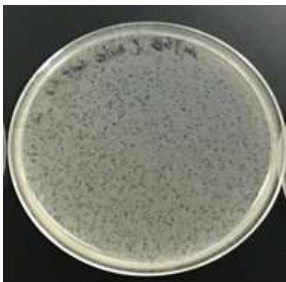



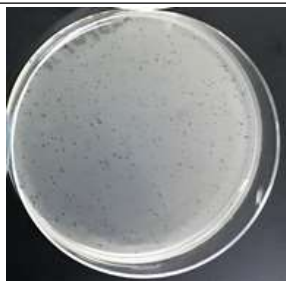

배지	접종 균수	12시간 배양 후
mTSB w bile salts	$<10^2$ CFU/ml	1.97×10^7 CFU/ml
mTSB w/o bile salts	$<10^2$ CFU/ml	1.26×10^7 CFU/ml
mBPW-p	$<10^2$ CFU/ml	4.9×10^7 CFU/ml

[표] 12시간 배양 후 배지별 pH 비교

배지	접종 전	12시간 배양 후
mTSB w bile salts	7.63	6.72
mTSB w/o bile salts	7.86	6.9
mBPW-p	6.86	6.79

○ 실험 결과, 3가지 배지 모두에서 약 10^7 CFU/ml 수준으로 비슷하게 증균되었으나 mBPW-p에서 약간 더 많이 증균된 것을 확인할 수 있었고, 증균 전-후 pH 변화를 측정한 결과 mBPW-P, mTSB w/o bile salts, mTSB w bile salts 순서로 안정적인 것을 확인할 수 있었음.

[표] 배지별 검출키트 protocol에 적용 결과

반응액의 희석 배수	10^0	10^1	10^2
mTSB w bile salts			
mTSB w/o bile salts			
mBPW-p			

○ 각각의 배지에서 증균된 균을 이용하여 키트 과정을 수행한 결과 배지에 따라 최대 8배까지의 차이를 나타 내었는데, 이는 증균정도나 pH 안정성에 대한 결과 값과 비슷하게 mBPW-P와 mTSB w/o bile salts에서 증균되었을 때 더 좋은 결과를 내었음.

○ 증균정도도 중요하고 pH안정성도 중요하지만 박테리오파지의 안정성이 가장 중요하고, 또한 [식품공전-4.16 장출혈성 대장균] 시험법에 mTSB가 사용되고 있는 점을 고려하여 최종적으로 장출혈성대장균 검출키트의 증균 배지를 mTSB w/o bile salts로 결정하게 되었음.

[표] 배지별 검출키트 protocol에 적용 결과 plaque 수

배지	반응액의 희석 배수		
	10^0	10^1	10^2
m-TSB	TNTC	15	10
mTSB w/o bile	TNTC	TNTC	55

salts			
m-BPW-p	TNTC	TNTC	81

(3) 효율적인 증균을 위한 증균배지 개발 - 황색포도상구균

○ 황색포도상구균 검사를 위한 증균배지로 [식품공전-4.12 황색포도상구균] 시험법 상 TSB w/ 10% NaCl를 공시하고 있지만, 이는 선별력이 약하고, 염의 농도가 너무 높아 박테리오파지 활성화에 영향을 주었음. 이에 명확한 키트 결과 확인을 위해 증균배지 수정이 필요했음.

○ 그러나, 일반적으로 알려져 있는 *S. aureus* 선별배지는 황색포도상구균 증균속도나 비싼 시약값으로 인해 키트에 사용하기 적합하지 않았음. 이에 황색포도상구균만을 선별적으로 적정 수준으로 증균시키기 위해 증균배지 개발이 불가피했음.

○ 증균배지는 *Staphylococcus aureus* Enrichment Broth(SEB)로 칭하여 개발을 시작하였고, 과정은 다음과 같음.

○ 황색포도상구균을 선택적으로 분리하는 상품화된 배지 및 관련 논문 및 대사과정 등을 조사하여 배지 개발에 활용하였으며 선택성과 증균능력을 고려하여 황색포도상구균 외 기타 균주를 억제할 수 있는 성분을 수집하고, 각각 농도를 조절해주었고, 비슷하게 황색포도상구균이 이용할 수 있는 영양원을 주영양원으로 공급함으로써 기타 균주에 대한 생육을 불리하게 해주었음. 또한 황색포도상구균의 증균속도가 실험적으로 기타 장내세균보다 상대적으로 느린 현상을 보이므로 성장속도 (Growth specificity)를 높일 수 있는 첨가제를 고려하였다.

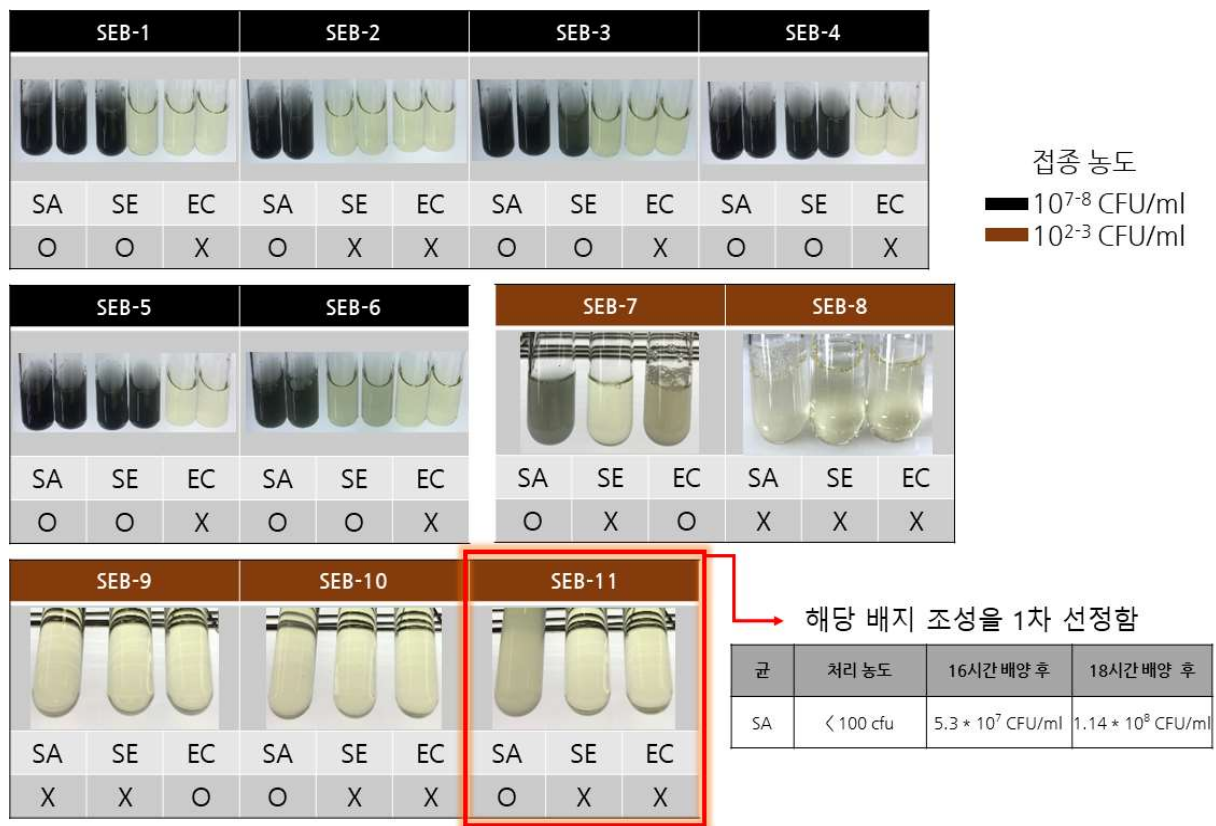
○ SEB 개발과정에서 제조하게 된 broth는 테스트 순서에 맞게 순차적으로 번호를 붙여주었고, 해당 배지에는 각각 *Staphylococcus aureus*(SA) 외 영양원이 비슷한 *Staphylococcus* 속 균인 *Staphylococcus epidermidis*(SE)와 대표적인 그람음성균이자 다양한 환경에서 생육을 잘 한다고 알려져 있는 *Escherichia coli*(EC)를 선정하여 비교하였음. 각 균주는 진행상황에 맞춰 농도를 달리하며 접종하였고, 배양결과를 비교분석함.

○ 다음 그림에서 보여주고 있는 SEB-1~6번(검은색 라벨) 테스트의 주목적은 황색포도상구균 외 기타균주의 생육을 억제할 수 있는 ‘선택성’을 탐색하는데 초점을 두었기 때문에 균액의 농도를 고농도(10^{7-8} CFU/ml)로 접종한 후 배양시켰음. 배지 내 그람음성균 및 그람양성 간균을 억제하는 효과를 위하여 Potassium tellurite를 첨가하였기 때문에 균이 10^{7-8} CFU/ml 이상 고농도로 증식이 되면 검게 변하게 됨을 알 수 있음.

○ SEB-1~6번(검은색 라벨) 테스트에서는 2번째 테스트인 SEB-2조성이 가장 적합하다고 판단


되어 해당 조성을 기준으로 수정하며 SEB-7~11번(갈색 라벨) 테스트를 진행함. SEB-7~11번(갈색 라벨) 테스트의 주목적은 낮은 농도의 균액에서 황색포도상구균이 가장 잘 자랄 수 있는 ‘증균성’을 탐색하는데 초점을 두었기 때문에 균액의 농도를 저농도(10^{2-3} CFU/ml)로 접종한 후 배양시켰음.

○ 5번의 추가시도 끝에 11번째 테스트인 SEB-11을 1차적으로 선정하게 되었고, 황색포도상구균을 10^1 CFU/ml의 낮은 농도로 접종시킨 후 배양 시간에 따라 농도를 측정된 결과 16시간 경과 후 5×10^7 CFU/ml로 약 6Log_{10} CFU/ml 정도 증균되었고, 18시간 경과 후엔 1×10^8 CFU/ml로 약 7Log_{10} CFU/ml 정도 증균됨을 확인할 수 있었음.



[그림] 다양한 조성의 SEB에 균 접종 후 생육여부를 확인한 결과
 (SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, EC; *Escherichia coli*
 ○; 색깔이 변하거나 뿌옇게 배양된 경우, X; 배양되지 않아 배지 투명한 경우)

○ 이에 실제 증균 조건과 동일하게 225ml 용량의 배지를 제조하고, 이에 황색포도상구균 및 기타균주를 접종하여 225ml 용량에서도 동일한 선택성 결과를 나타내는지 확인함. 이땐 황색포도상구균과 배양조건이 비슷하면서, 대표적인 그람양성 간균인 *Listeria monocytogenes*를 추가하여 진행하였음.





	SA	SE	LM	EC
접종 농도	10 ³ CFU/ml	10 ³ CFU/ml	10 ³ CFU/ml	10 ⁴ CFU/ml
	6,750 CFU	2,250 CFU	9,000 CFU	20,250 CFU
배양	35C, 정치, 33시간			
결과	검은색	약간 뿌옇짐	균 엉킴	억제
				

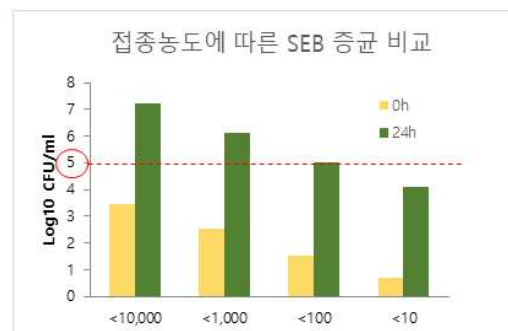
[그림] SEB-11배지의 선택성 확인 결과

(SA; *Staphylococcus aureus*, SE; *Staphylococcus epidermidis*, LM; *Listeria monocytogenes*
EC; *Escherichia coli*)

○ 각 균액의 농도는 SA, SE, LM은 10³ CFU/ml, EC은 10⁴ CFU/ml로 접종 후 정치 배양하였고, 그 결과는 위 그림과 같음. 실험결과 황색포도상구균이 매우 우세적으로 배양되었음을 확인할 수 있었고, *Staphylococcus epidermidis* 와 *Listeria monocytogenes*에서도 균이 약간 배양됨을 확인할 수 있었음. 그러나 접종한 농도에 비하면 증균속도는 매우 느리다고 할 수 있고, 배양시간 등 몇 가지 조건을 통해 충분히 해결할 수 있는 문제라 판단함.

○ 추가적으로 황색포도상구균을 농도 별로 제조하여 배양한 후 증균성 결과도 확인하였음.

	1	2	3	4
접종 농도	1,000-10,000	100-1,000	10-100	1-10
	3400 CFU	345 CFU	34 CFU	5 CFU
배양	35C, 정치, 24시간			
결과	뿌옇짐	투명	투명	투명
				
배양 농도	1×10 ⁷ CFU/ml	1×10 ⁶ CFU/ml	1×10 ⁵ CFU/ml	1×10 ⁴ CFU/ml



[그림] SEB-11배지의 증균성 확인 결과

○ 황색포도상구균을 ①1,000-10,000 CFU ②100-1,000 CFU ③10-100 CFU ④1-10 CFU가 접종될 수 있도록 구성하였고, 증균시간도 24시간으로 제한하였음.

○ 최종적으로 접종된 균액의 농도를 환산하고, 증균 후 측정된 농도와 비교하여 증균정도를 확인해보니 35°C, 24시간, 정치배양 조건에서 약 10⁶ CFU/ml정도 증균됨을 확인할 수 있었고, 오직 1-10 CFU만 접종된 배양액에서도 10⁴ CFU/ml까지 증균됨을 확인할 수 있었음.

○ SEB-11조성의 경우 황색포도상구균에 대한 선택성 및 증균성 모두 우수한 편이라고 판단하였지만, 당초 목적인 10⁵ CFU/ml까지 증균되지 못하였고, Potassium tellurite에 의해 증균액이 검은빛을 띄게 되면 향후 Resazurin 등 시각화단계에서 혼동을 초래 할 것으로 예상되어 Potassium tellurite 제외하기로 결정함.

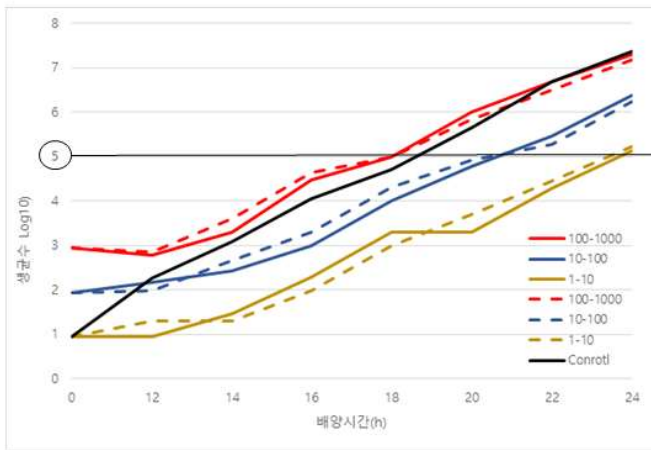
○ SEB-11 배지에서 Potassium tellurite의 주역할은 그람음성균 및 그람양성 간균을 억제였으므로, 이를 대체할 수 있고 대체된 조성들이 기존 조성 및 추가된 조성끼리 상호보완적으로 작용할 수 있는 구성을 고안함.

○ 앞선 테스트와 비슷하게 몇 차례 테스트를 통해 2가지의 조성을 선별하였고, 각각의 조성 배지에 황색포도상구균을 ①100-1,000 CFU ②10-100 CFU ③1-10 CFU가 접종될 수 있도록 구성함.

○ 증균시간 범위를 지정하기 위해 12시간 이후부터 2시간 간격으로 농도를 측정하였고, 측정된 농도는 로그 값으로 환산하여 비교분석함.

		1번 테스트			2번 테스트			Control
접종 CFU		10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
증균 시간	0	2.94	1.94	0.94	2.94	1.94	0.94	0.94
	12	2.78	2.16	0.95	2.85	1.98	1.30	2.26
	14	3.30	2.43	1.48	3.60	2.66	1.30	3.08
	16	4.48	3.00	2.30	4.65	3.30	2.00	4.06
	18	5.00	4.00	3.30	5.00	4.30	3.00	4.70
	20	6.00	4.78	3.30	5.85	4.92	3.70	5.65
	22	6.69	5.46	4.28	6.50	5.27	4.46	6.68
	24	7.29	6.37	5.13	7.17	6.23	5.24	7.38

TSB w/
10% NaCl



[그림] 증균 농도에 따른 키트 결과 비교 및 적정 증균 농도 결정

○ 위 그림과 같이 1번과 2번 조성 모두 증균성이 더 증가됨을 확인할 수 있었고, 1-10 CFU를





접종한 시료에서도 24시간 후 10^5 CFU/ml까지 증균되었음을 확인할 수 있었음. 이에 최종적으로 더 경제적인 1번 조성을 SEB 조성으로 결정함.

나. Free phage에 대한 Inactivation법 개발

○ 대부분 논문에서 Bacteriophage 단독으로 사용하는 것이 아닌 기존 기술과의 연계, 융합으로 선택성을 높이는 연구가 발표되었지만 Virucidal reagent의 효율에 따라서 결과에 크게 영향을 미쳤음. 이는 대상 세균에 결합되지 않은 Free virus의 제거와 inactivation관련 연구가 선행되어야 하는 것을 의미하고, Virucidal 효율을 높이기 위한 개발이 필요함.

○ 외부 phage를 제거하기 위해 사용할 중화제로는 Lee Y.D, (2011), Biocontrol and Detection of *Cronobacter sakazakii* by using bacteriophages의 문헌을 참고하여 Ferrous ammonium sulfate(이하 FAS)[$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] 를 평가하였고, 평가 시 phage에 대한 불활성화뿐만 아니라 FAS에 의한 배지의 물성, 색 등 영향도 확인함.

[표] FAS의 Inactivation 효과

phage 농도	11 log PFU/mL	10 log PFU/mL	9 log PFU/mL	8 log PFU/mL
10% FAS				
PFU/ml	0	0	0	0

○ FAS에 의해 phage NOECP91이 완벽하게 불활성화되는 것을 확인할 수 있었지만, 배지의 색이 황색으로 변하고 Ammonium sulfate의 단백질과 응고 반응에 의해 plaque를 구별하기 어려운 단점이 있어 FAS를 제거하는 과정이 반드시 필요한 것으로 판단함.

○ FAS 제거를 위하여 문헌조사를 통해 다음과 같이 centrifuge(원심분리)법과 centrifugal filter를 이용하는 법, 두 가지 방법을 고안하여 비교 평가 진행함.







FAS제거 방법 비교		
	centrifuge(원심분리)	centrifugal filter
사용기구	- 1.5ml microtube - centrifuge	- centrifugal filter(0.22um) - centrifuge

원심분리 조건	12,000rpm, 10min	12,000rpm, 10min
방법	1. 원심분리 2. pellet에 LB + 10mM CaCl ₂ (LBC) 이용 1회 washing 3. LBC 이용 resuspend	1. 원심분리 2. filter 위쪽에 존재하는 내용물에 LBC 이용 1회 washing 2. LBC 이용 resuspend

○ FAS제거 방법만 다르게 하여 kit 기존 방식대로 처리한 최종 반응액의 plaque수를 확인한 결과 centrifuge(원심분리) 및 centrifugal filter 두 가지 방법 모두에서 비슷한 경향을 나타내었음. 이를 통해 FAS 제거방법으로 두 방법 모두 이용할 수 있음을 확인함.

○ 기존에 문제가 되었던 배지의 색변화 및 단백질 응고문제에 대하여 제거방법 두 가지 방법 모두에서 배지의 색깔변화를 억제시키고, 단백질 응고반응을 억제시켜 FAS 제거방법으로 두 방법 모두 이용할 수 있음을 확인함.

[표] FAS 제거 방법별 결과 (Centrifuge-Centrifugal filter)

	Negative control	10 ¹	10 ²
centrifuge			
PFU/ml	0	24	1
centrifugal filter			
PFU/ml	0	26	2

○ 그러나 centrifugal filter를 이용하는 경우 제품 자체가 고가여서 검출키트 제품 단가 인상이 불가피하기 때문에 상대적으로 가격 경쟁력이 있는 centrifuge(원심분리)를 FAS 제거방법으로 최종 선정함.

다. FAS 대체제 개발

○ 키트 결과 확인을 위해 Resazurin을 사용하였을 때 FAS에 의해 pH 변화에 따른 sensor cell 증균 영향 및 최종 판정 시 색깔 영향 등 문제가 있었음. 또한 원심분리작업의 불편함이나 원심분리기 기계를 사용해야한다는 단점을 극복하고자 Virucidal 효율은 비슷하지만 FAS물질을 대체할 수 있는 방안에 대하여 개발을 진행함.

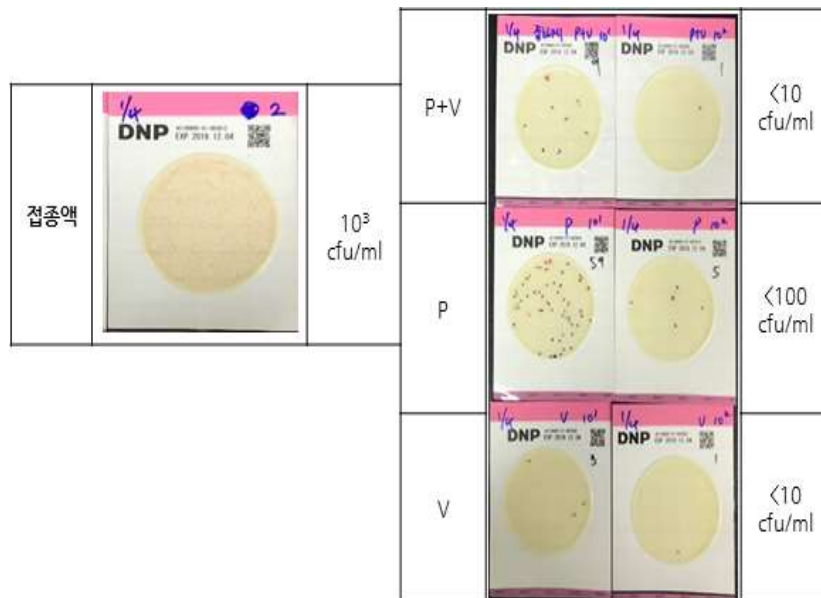
(1) FeSO₄+Tea extract 효과 검증

○ 첫 번째로 시도한 대체제는 Tea 추출물을 활용한 물질로 자료조사를 통해 스리랑카 산의 우바홍차 가루를 선정하였고, 이를 추출한 추출물에 FeSO₄가 최종농도 10mM가 되게끔 조정하여 Virucidal reagent를 제조함.

○ Virucidal 효율은 ①균액+파지액+중화제 처리 후 반응, ②균액+파지액 1차 반응 후 중화제처리, ③균액+물+중화제 3가지방법으로 진행하여 대체제의 효율 및 균 억제성 등을 동시에 확인함.

○ 확인 결과, 균액과 중화제만 반응시킨 시료와 균액, 파지액, 중화제를 동시에 처리한 시료의 결과가 비슷하게 나와 phage의 활성을 확인하기 어려웠고, 균과 파지를 먼저 반응시킨 후 중화제를 처리한 시료에선 약간 더 높은 값이 나왔지만 phage 제거효과가 불명확함.

○ 무엇보다 FeSO₄+Tea extract 중화제 자체가 균에 대한 살균력이 있어 효율 확인 자체가 무의미했음. 이에 해당 중화제는 본 제품 구성에 적합하지 않는 것으로 판단함.

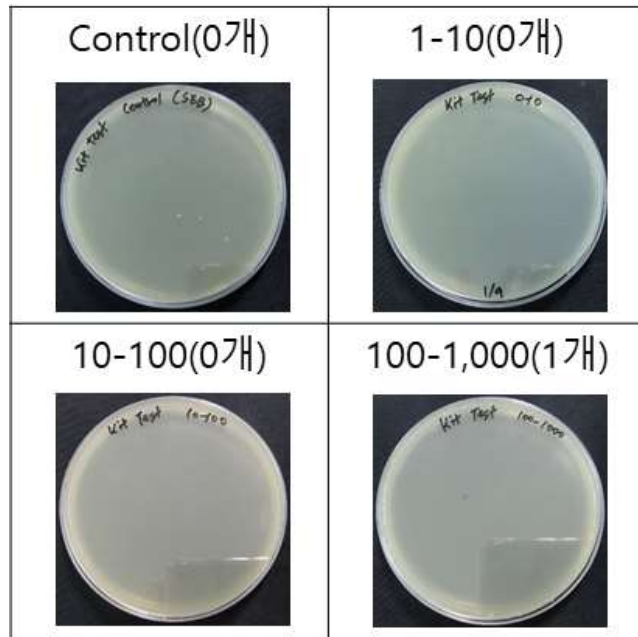


[그림] FeSO₄+Tea extract의 중화제 효율 평가

(P+V; 균액, 파지액, 중화제 동시 처리한 시료, P;균과 파지를 먼저 반응시킨 후 중화제를 처리한 시료, V; 균액, 중화제만 처리한 시료)

(2) FAS 중화 물질, Trisodium citrate+EDTA+염

- 몇 가지 시도를 통해 기존의 Virucidal reagent인 FAS를 대체할만한 물질을 찾지 못하였지만, 앞서 문제점을 해결하기 위해 FAS 중화 단계를 고안함.
- FAS 중화는 문헌조사를 통해 Trisodium citrate와 EDTA, 염을 포함하는 물질로 선정하였고, 각각의 농도를 Trisodium citrate 80mM, EDTA 10mM, 염 100mM로 결정하였음. 염의 종류로는 phage의 infection에 도움을 준다고 알려진 CaCl_2 를 이용하였고, 이때 pH는 7로 조정하였음.
- FAS의 중화여부를 확인하기 위해 앞서의 Virucidal 효율 검사와 달리 FAS 중화 물질과 FAS를 먼저 반응시킨 후 비교평가를 진행함.



[그림] FAS 중화물질 평가 결과

- 결과를 통해 해당 과정으로 균이 제거되거나 농도가 감소하지는 않았지만, FAS 중화 물질이 FAS를 제대로 중화시키지 못한다는 것을 알게 되었음. 그림에 나오는 것처럼 각각의 농도로 존재해야 하는 phage(Free phage상태)가 전혀 살아남지 못했다는 것을 알 수 있음.

라. 시각화 단계 업그레이드 Closed system

- 키트 마지막 단계인 시각화단계에서 방법을 다양화시켜 작업자의 선호도에 따라 제품을 골라 쓰거나, 작업자의 실험환경에 따라 맞추어 쓸 수 있게끔 키트 업그레이드를 시도함.

○ 문헌조사를 통해 키트 결과에는 영향을 주지 않으면서, 판독 시 불편함이 없을만한 물질 Guar gum을 선정함. 해당 물질을 이용해 시각화할 수 있는 두 가지 방법 고안하였고, 테스트를 진행함.

○ 상기 시험법으로 테스트한 결과, 35°C에서 7시간 배양한 후 다음과 같은 결과를 확인할 수 있었음. 예상과 비슷한 모습으로 결과가 나왔기 때문에 추가적으로 sensor cell로 사용할 균액의 농도를 결정하기 위하여 다음 단계를 진행함.

○ Sensor cell의 농도 결정 실험은 균액을 10⁰ CFU/ml부터 10⁸ CFU/ml 까지 단계 희석하여 제조하고, 이를 배양액, 발색시약(TTC)를 조성에 맞게 조합하고, Guar Gum를 넣어 섞어준 후 균혀주었음. 이를 35°C에 보관하며 색변화를 관찰함.

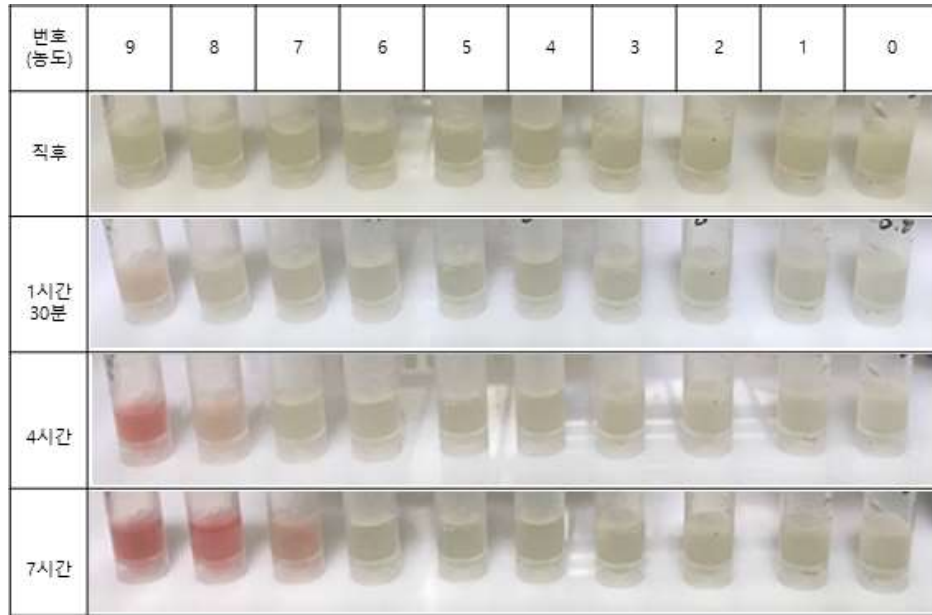
[표] sensor cell 농도결정을 위해 준비한 균액의 농도 및 표시번호

번호	9	8	7	6	5	4	3	2	1
농도 (CFU/ml)	5.45 *10 ⁸	5.7 *10 ⁷	4.85 *10 ⁶	3.6 *10 ⁵	5 *10 ⁴	4.85 *10 ³	3.75 *10 ²	4.9 *10 ¹	3 *10 ⁰

1번 방안		2번 방안		
Protocol 1. LBC broth 490ul + TTC 10ul + guar gum(1%) 혼합 2. 상온에서 균침 3. Sensor cell 20ul 첨가 4. Phage cocktail 20ul 접종 5. 35°C 보관하며 경과 시간에 따라 색 변화 확인		Protocol 1. Sensorcell + LBC broth 240ul 현탁 2. TTC 10ul + guar gum(0.8%) 혼합 3. Phage cocktail 250ul 접종 4. Vortex 후 상온에서 균침 5. 35°C 보관하며 경과 시간에 따라 색 변화 확인		
예상 결과				

	1번		2번	
	음성	양성	음성	양성
결과				

[그림] Closed system 결과



[그림] sensor cell 농도결정 시험 결과

○ 최종적인 결과만 놓고 봤을 때 균액의 농도에 따라 색변화를 일으킬 수 있는 시간이 달랐지만, 농도가 가장 높은 9번 시료에서도 변화 확인까지 4시간 정도의 시간이 소요되었음. 또한 Guar gum 특성 상 비숙련자의 경우 어려움이 있을 것으로 예상하여 현 방법은 추후 재정비하여 다시 개발하기로 하고 잠정 보류함.

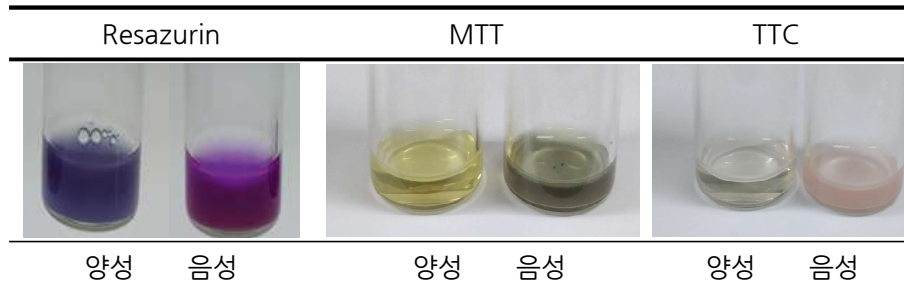
마. 기존의 시각화 단계인 Resazurin법 업그레이드

○ 해외제품 등 자료조사를 통해 박테리오파지를 이용한 검출은 균의 사멸과 생존을 기반으로 대상 배지의 pH 변화 차를 이용한다는 것을 알게 되었고, 여러 방법 중 가장 이용성이 높은 연구 분야임을 알게 되었음.

○ 이에 본 연구에서는 Target균만 용균 된다는 kit 기본원리를 참고하여 세균의 호흡에 의한 산화환원반응과 pH 변화를 지표로 사용하고자 하였음.

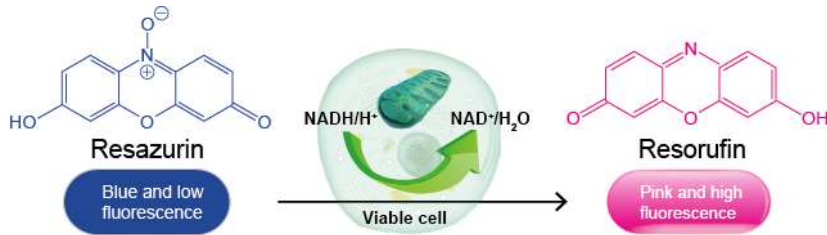
○ pH 변화를 확인할 수 있는 지표로 다음과 같이 alamar blue(Resazurin), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT), Triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 3가지 시약을 선정함. 이를 비교 평가하기 위해 기존 Alamar blue assay, MTT assay, TTC assay를 참고하여 진행함.

[표] Resazurin, MTT, TTC 결과 비교



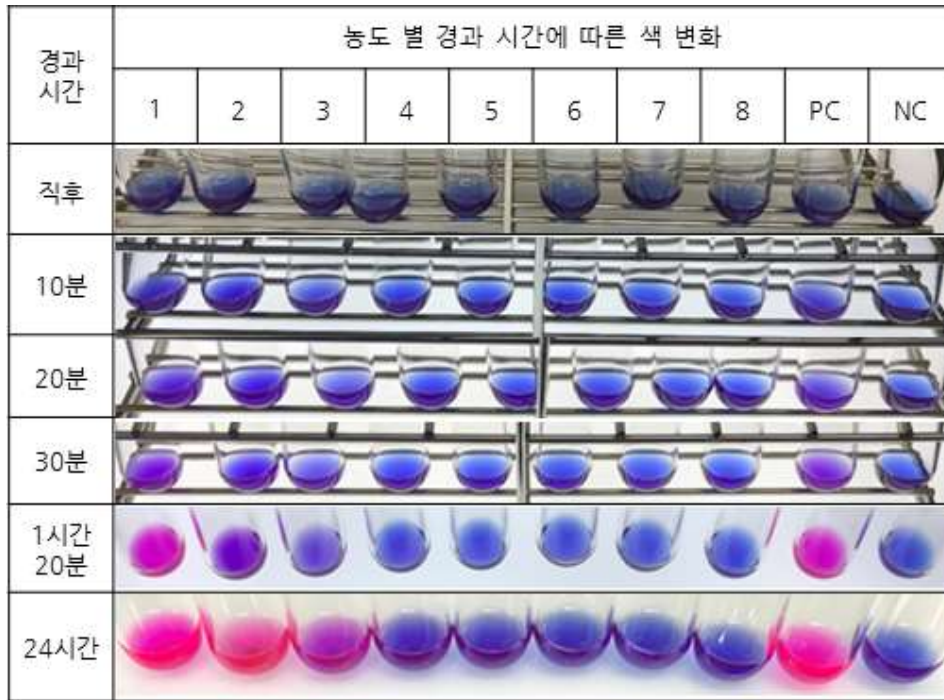
- 비교평가 결과 3가지 시약 모두 음성과 양성에서 발색되는 색깔은 다르게 내었지만, 즉각적인 반응을 나타내는 Resazurin과 달리 MTT와 TTC의 경우 음성/양성 판독이 가능한 정도로 색변화를 유발하기 위해선 1시간 이상의 배양 시간이 필요했음.
- 이에 본래 취지 가장 적합한 시약은 Resazurin이었고, 음성과 양성을 3가지 시약 중 가장 명확하게 구분시켜주었기 때문에 최종적으로 Resazurin을 선정함.

Resazurin을 이용한 방법의 원리



바. sensor cell 농도 결정

- 키트 결과 확인에 꼭 필요한 sensor cell을 키트제품 내 포함시키기 위하여 적절한 농도를 탐색하기 위하여 농도결정을 위한 실험을 진행함.
- sensor cell을 농도 별로 준비하고, 해당 sensor cell을 감염시킬 수 있으며, 농도를 알고 있는 phage를 준비한 후 이를 배합하고 배양한 후 resazurin을 첨가해 결과를 관찰함.



[그림] 농도 별 경과시간에 따른 색변화 결과

[표] 농도 별 sensor cell 희석액 준비

번호	1	2	3	4	5	6	7	8	PC(1)
농도 (CFU/ ml)	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^8

○ 실험을 통해 1번, 2번 희석액은 20~30분 사이 색변화가 시작되었고, 3번 용액은 80분정도 경과 후부터 색깔이 변화되는 것을 확인할 수 있었음.

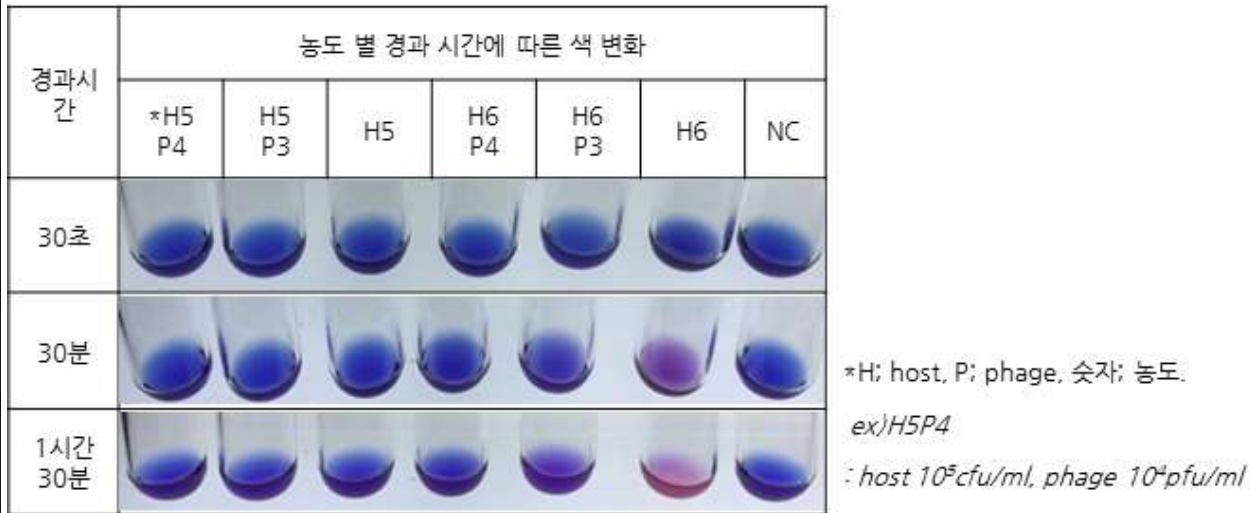
○ 그러나 4번액(10^6 CFU/ml) 이하의 농도에서는 24시간이 지나도 색변화가 일어나지 않았음. 이는 접종된 phage에 의해 희석액속의 모든 균이 죽어나 불활성화된 것을 의미함.

○ 또한 실험에 사용한 phage의 농도가 실제 키트에 사용할 농도보다 낮게 들어간 것을 감안하여 4번, 5번에 해당하는 농도인 10^{5-6} CFU/ml를 sensor cell의 농도 중 하나를 최종 결정 하는 게 좋다고 판단함. 해당 실험을 통해 phage는 MOI=0.001까지는 충분히 균을 제어할 수 있다는 것 또한 알 수 있었음,

○ 이에 최종적으로 sensor cell의 농도를 결정하기 위해 10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml 두 가지 농

도로 실험을 진행함.

○ 실험은 전 실험과 기본적인 조건은 동일하게 진행하였지만, 균액의 농도를 10^{5-6} CFU/ml로, phage의 농도는 10^{3-4} PFU/ml로 준비하였음. 비율에 맞게 각각 처리하고 resazurin을 이용해 색변화를 관찰하였음.



[그림] 농도별 경과시간에 따른 색변화 경과

○ 상기 추가적인 실험결과를 통해 10^5 CFU/ml의 경우 phage가 접종되어 있는 시료(H5P4, H5P3)에서 색변화를 일으키지 않아 MOI는 적합한 것으로 판단하였으나, phage가 없는 시료(H5)에서도 색변화를 일으키지 못하여 sensor cell로는 부적합하다고 최종 판정함.

○ 이와 다르게 10^6 CFU/ml의 경우 phage가 접종되어 있지 않은 시료(H6)에서 색변화가 잘 일어났음을 확인할 수 있었음. 그러나 시료에 접종된 phage의 농도에 따라 결과가 약간 상이하게 나왔음.

○ phage가 10^4 PFU/ml 농도로 접종된 시료(H6P4)에서는 시간이 경과하여도 색변화가 없었던 반면 phage가 10^3 PFU/ml 농도로 접종된 시료(H6P3)에서는 90분경과 후 색변화가 시작되었고, 이는 향후 비숙련자가 판단할 때 영향을 줄 수 있는 부분이었음.

○ 이에 최종적으로 sensor cell의 농도를 10^6 CFU/ml로 결정하되, 판독시간을 10분 이내로 한정하고 더 많은 시간이 경과 시 판단에 영향을 줄 수 있음을 공지하기로 결정함.

사. sensor cell의 병원성문제 해결을 위한 조치

○ sensor cell의 병원성문제 등의 문제가 우려되어 식품 등 시료에 대한 황색포도상구균 검사키트에 병원성균을 사용하는 것에 대하여 국가기관에 문의하였음.

○ 신청번호 1AA-1907-353650으로 국민신문고에 개발 중인 신속검출키트 구성에 불가피하게 병원성균을 포함하여야 했을 때 발생할 수 있는 문제점과 대처방안에 대하여 다음과 같은 문제들에 대하여 문의하였고, 이를 통해 제품 내 병원성 균을 포함하는 것이 문제가 되지 않음을 확인함.

- 병원성균을 포함한 제품을 상용화 할 수 있는가?

- 어렵다면 다음과 같은 방안으로 대처가능한가?

대처방안1. 제품 내 병원성 균임을 명시하고, 사용 전후 지침사항 및 위험성 안내 문구 삽입

대처방안2. 위 내용 명시와 함께 해당 균을 죽일 수 있는 살균제를 키트구성에 포함

- 제품 상용화를 위하여 갖추고 있어야 할 조건이나 제출해야할 서류가 별도로 있는가?

○ 보건복지부 질병관리본부 감염병분석센터 세균분석과의 답변 전문

안녕하십니까?

귀하께서 국민신문고를 통해 신청하신 민원(신청번호, 1AA-1907-353650)에 대한 답변을 다음과 같이 알려드립니다.

본 사항은 제품 상용화에 관한 사항으로 우리기관과 관련이 없으나, 포함된 병원체가 고위험병원체 ((ex) Vibrio Cholerae O1, Clostridium botulinum 등) 라면 감염병예방법에 따라 확인이 필요하오니 질병관리본부 "생물안전평가과"에 문의하여 주시기 바랍니다.

추가로 문의하실 사항이 있으시면 질병관리본부 세균분석과 홍사현 (전화: 043-719-8115)에게 문의하여 주시면 성심성의껏 답변하여 드리도록 하겠습니다.

○ 환경부 국립환경과학원 환경건강연구부 화학물질연구과의 답변 전문

□ 민원인: 유OO(접수번호 2AA-1907-437635)

□ 민원명: [다부처민원]식중독균 검출 키트 개발 관련 문의

□ 민원내용

○"병원성 균을 포함한 식중독 세균 검출 키트 상용화" 관련 조건 문의

□ 회신내용

1. 안녕하십니까? 귀하께서 국민신문고를 통해 신청하신 민원(신청번호 1AA-1907-353650)이다

부처민원으로 설정됨에 따라 환경부 소관 사항에 대한 검토 결과를 아래와 같이 알려드립니다.

2. 귀하의 민원 내용은 “『병원성 균을 포함한 식중독 세균 검출 키트』 의 상용화를 위한 조건”으

로 이해됩니다.

3. 귀하의 질의사항에 대해 검토한 의견은 다음과 같습니다.

가. 귀사에서 개발하려는 제품이 병원균과 식중독균을 모두 검출 할 수 있는 기능만을 가진 제품

이러면 환경부의 '생활 화학제품 및 살생물의 안전관리에 관한 법률(약칭: 화학제품안전법)'에 해당하지 않습니다.

나. 그러나 병원균을 검출하여 제거하거나 무해화(살균) 시키는 기능을 가진 제품이라면 화학제품안전법 제10조제5항에 의한 안전확인대상생활화학제품 승인 요청을 하여야 하며, 제출자료 등

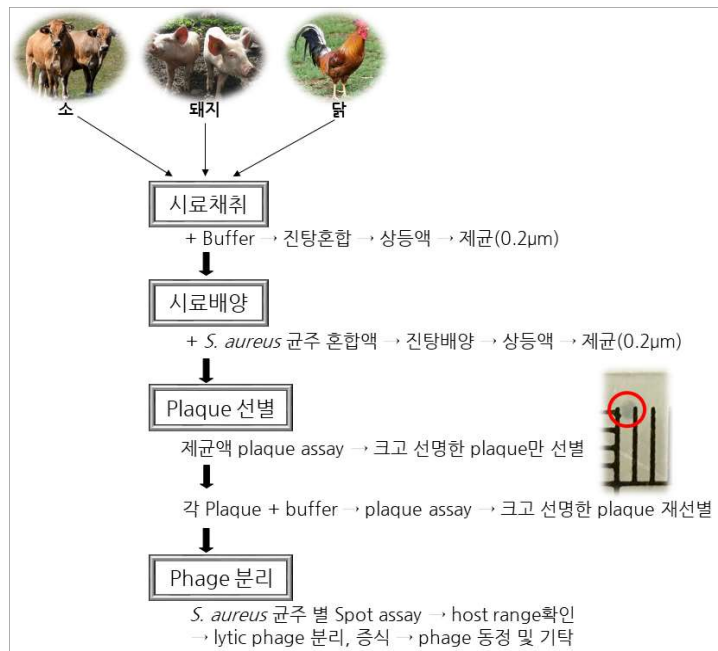
세부사항은 국립환경과학원 고시 제2018-72호 제4조를 참고하시면 됩니다.

4. 현행 관련 규정은 법제처 국가법령정보센터 홈페이지에서 검색하여 확인 가능함을 알려드립니다(해당법률 : 화학제품안전법, 화학제품안전법 시행령 및 시행규칙, 안전확인대상생활화학제품 승인 등에 관한 규정 등).

5. 귀하의 질문에 만족스러운 답변이 되었기를 바라며, 기타 추가적인 문의사항이 있으시면 국립 환경과학원 화학물질연구과 황문영 연구사(032-560-7203)에게 연락주시면 친절히 안내해 드리도록 하겠습니다. 감사합니다. 끝.

아. 키트 성능 향상을 위한 황색포도상구균 Bacteriophage 분리

○ 황색포도상구균 박테리오파지를 황색포도상구균이 많이 존재할만한 가축의 축사와 분변 등에서 분리를 시도하였고, 모식도는 다음과 같음.



[그림] 박테리오파지 분리 과정

- 채취한 시료는 buffer에 넣어 진탕혼합하고 상등액만 취하여 1차 제균 작업을 실시함.
- 제균액에 배지성분과 host혼합액을 넣고 진탕배양하면 phage propagation을 유도함.

- 이를 원심분리하여 상등액만 취한 후 제균작업을 통해 박테리오파지만을 선별함.
- 선별된 액은 target균주를 sensor cell로 하여 plaque assay를 진행함.
- 크고 선명한 plaque만 선별하여 채취하고, 이를 buffer에 푼 후 다시 plaque assay를 진행함.
- 다시 크고 선명한 plaque를 선별하여 plaque assay을 진행함.
이 작업을 수차례 반복하여 가장 효과적인 박테리오파지를 분리함.
- 분리된 파지들을 황색포도상구균 균주들에 대한 host range 테스트를 진행하고, range가 가장 넓고, plaque가 크고 선명한 박테리오파지를 최종 선발함.

○ 위의 박테리오파지 분리 작업을 통해 최종적으로 1종의 박테리오파지를 선별하였고, 해당 박테리오파지를 황색포도상구균 표준균주에 대하여 용균성을 확인하고 기존 kit 구성에 포함된 박테리오파지와 비교하며 키트 내 포함시킬지 여부를 결정함.

[표] 새롭게 분리한 박테리오파지(SAP27)의 주요 병원체에 대한 항균력 및 기존 박테리오파지와 비교 (-; No plaque, +; Turbid plaque, ++; Clear plaque, +++; Complete clear plaque)

	SAP17	SAP33	SAP87	SAP89	SAP27
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> KCCM 12103	-	++	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC 13565_SEA	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 23235_SED	+++	+	-	++	-
<i>S. aureus</i> ATCC 19095_SEC	++	++	++	++	++
<i>S. aureus</i> ATCC 14458_SEB	+	++	+	+	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 27664_SEE	-	-	-	-	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+	+	+++	+	+
<i>S. aureus</i> RN4220	+++	+++	+++	+++	-

[표] 기탁내용 및 결과

자원 등록 내용	
기탁처	한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)
등록명	<i>Staphylococcus aureus</i> phage-SAP27
기탁번호	KCTC14076BP
최종기탁일	2019년 12월 13일

○ 새롭게 분리한 박테리오파지는 임시로 SAP27라 칭하였고, 이는 기존 구성에 상호보완적이었으며, 황색포도상구균 표준균주에 대한 용균활성도 가장 강하게 나타남.

○ 해당 파지는 최종적으로 황색포도상구균 검출 키트 내 포함 시키기로 결정함으로써, 제품력을 향상시킬 수 있었음. 해당 파지는 Siphoviridae속에 속하는 파지로 다음과 같이 생물자원센터의 생물자원으로 등록시킴.

자. 키트 제품의 편의성 및 유통성을 위한 기술 개발

○ 키트의 편의성 및 유통성을 위하여 박테리오파지와 sensor cell을 동결건조하여 제품 내 포함 시키고자 하였고, 관련 기기구입 및 기술 개발을 진행함.

○ 동결건조 기술 개발을 위해 보조제와 부형제 선정 및 분주량, 냉동시간, 동결건조 시간 등 몇 가지 조건을 확립해야 했음. 문헌조사를 통해 몇 가지 조건을 선정하였음.




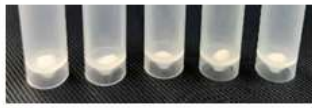
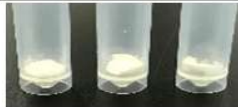

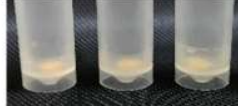
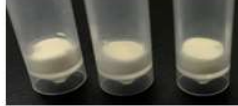
○ 각 조건에 따라 박테리오파지 또는 sensor cell을 동결건조 진행하였음. 진행 후 파지나 sensor cell농도를 측정하여 동결건조 전 농도와 비교하여 ‘안정성’을 확인하였고, 동결건조 후 cake 모양 등을 비교해 ‘상품성’을 확인하였으며, 작업과정을 고려하여 ‘생산성’을 비교분석 함으로써 키트에 가장 적합한 동결건조 조건 및 기술을 확립하였음.

○ 테스트 결과 phage의 경우 Sucrose를 보조제로 하고, PVP를 부형제로 하여 142ul을 분주 후 냉동시간 30분을 거쳐 20시간 동안 동결건조를 진행한 결과 가장 좋은 결과를 나타내었음.

○ sensor cell의 경우 Skim milk를 보조제로 사용할 경우 현탁 시 cake가 제대로 풀리지 않는 현상이 있었음. 이에 Cryoprotectant 18을 보조제로 하고, PVP를 부형제로 하여 285ul을 분주 후 냉동시간 30분을 거쳐 20시간 동안 동결건조를 진행하였을 때 결과값이 가장 좋아 상기 조건을 최종 동결건조 조건으로 확정함.

[표] 동결건조 조건 확립 과정

시료	분주량	동결건조 시간	보조제	부형제	예상농도	건조 후 농도
Phage(ECP)	142ul	26시간	Sucrose	PVP	10 ⁴ PFU/ml	1.55*10 ⁴ PFU/ml
Phage(ECP)	142ul	30시간	Sucrose	PVP	10 ⁴ PFU/ml	1.62*10 ³ PFU/ml
Phage(ECP)	142ul	20시간	Sucrose	PVP	10 ⁴ PFU/ml	1.19*10 ⁴ PFU/ml
Host(EC)	285ul	26시간	Skim milk	PVP	10 ⁹ CFU/ml	7.8 *10 ⁸ CFU/ml
Host(EC)	285ul	30시간	Cryoprotectant 18	PVP	10 ⁹ CFU/ml	5.25*10 ⁸ CFU/ml
Host(EC)	285ul	30시간	Cryoprotectant 18	PVP	10 ⁸ CFU/ml	9.15*10 ⁷ CFU/ml
Host(EC)	285ul	20시간	Cryoprotectant 18	PVP	10 ⁸ CFU/ml	1.79*10 ⁸ CFU/ml

phage			Sensor cell		
시도	모양	비고	시도	모양	비고
1차		무너짐	1차-1		멸균수 현탁 1-1 1-2 
2차		무너짐	1차-2		
3차		안정적	2차		무너짐
			3차		안정적

[그림] 동결건조 조건 확립을 위한 안정성, 상품성, 생산성 평가

차. 키트 간편화 및 결과 명확성을 위한 Protocol 개발

○ 제품 각 구성 별 최적화를 위해 Protocol 개발 및 수정/보완 작업을 지속적으로 진행하였음.

○ 크게 변화하거나 주요 내용은 다음 표와 같으며, 개발 및 보완 과정에서 증균배지 수정, 구성물의 물성 수정, 시각화 수정 등이 있었음. 특히 키트에서 가장 중요한 성분인 박테리오파지와 기주균주의 안정화 및 유효기간 연장을 위해 동결건조법 등 다양한 시도를 했고, 최종 동결건조법으로 확인한 이후 동결건조에 의해 약간 저하되는 안정성 등을 고려하여 기타 다른 조건들도 수정하였음.

○ 주된 수정 항목들은 구성별 농도나 물성의 변화로, 경우에 따라 동결건조, powder, 액상 등 다양하게 시도해 보았으며, 유통 및 보관 조건을 고려하여 농도를 상향조정하기도 하였음. 이에 최종적으로 확립된 Protocol이자, 실제 사용자가 작업할 키트수행과정은 다음과 같이 확정하였음.




[표] Protocol 개발과정 중 주요 내용 및 과정





	Protocol-1	Protocol-2	Protocol-3	Protocol-확정
Enrichment	TSB w/10%NaCl 35℃, o/n 배양	LB w/10mM CaCl ₂ 35℃, o/n 배양	SEB 35℃, 12-16시간배양	SEB 35℃, 16-24시간배양
Infection	phage-cocktail → 35℃, 30분	동결건조-phage → 35℃, 30분	염 제거 → LBC 현탁 → 현탁액+동결건조	염 제거 → LBC 현탁 →현탁액+phage-cocktail

			phage →35℃, 30분	→ 35℃, 30분
Inactivation	Virusol(FAS 15%) → RT, 15분	Virusol(FAS 15%) → RT, 5분	Virusol(FAS 50mM) → RT, 5분	Virusol(FAS 100mM) → RT, 5분
Removal	LBC 세척 1회 → LBC 현탁	PBS, LBC 각 1회 세척 → LBC 현탁	PBS, LBC 각 1회 세 척 → LBC 현탁	PBS 1회 세척 → LBC 현탁
Sensor cell	현탁액 + host균주	현탁액 + 동결건조 host → 35℃, 4시간	현탁액 + 동결건조 host → 35℃, 4시간	현탁액 + 동결건조 host
Visualization	LBC soft- agar or Resazurin	배양액+Resazurin → RT, 10분 내	배양액+Resazurin → RT, 10분 내	LB w/ 1% agar

카. 키트검증 및 확정

- 실제 증균된 균을 이용해 키트를 검증해보았음. 증균액은 시료에 존재하는 황색포도상구균의 농도에 따라 다르기 때문에 농도를 10^{0-8} CFU/ml까지 제조하여 키트를 검증해보았음.
- 실험결과를 통해 증균 후 농도가 10^{3-6} CFU/ml 범위 내에 있을 때 판독성이 가장 좋았음. 최종 결과판독의 명확성 및 키트 간편성을 위해 최근 새로 개발한 SEB 증균배지 구성을 한 번 더 수정하고자 하였음.
- 황색포도상구균이 선별적으로 증균시키기 위해 고안한 SEB 구성에는 항생물질이 포함되어 있어 단가를 하향시키기 어렵고, 증균 후 농도를 10^{3-6} CFU/ml 범위 내로 맞추기 위해 SEB조성을 한 번 더 점검하였고, 단가 등을 고려하여 항생제를 제외시키고, 이를 대체하여 기타균을 억제시키면서 황색포도상구균 증균에 영향을 주지 않는 성분을 추가하여 최종적으로 다음과 같이 SEB 조성을 확정함.

항균 농도	10 ⁸ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	...	10 ² CFU/ml	10 ¹ CFU/ml	10 ⁰ CFU/ml
결과	TNTC	TNTC	...	10 ⁰ PFU/ml (1-9개)	0 PFU/ml (0개)	0 PFU/ml (0개)
사진			...			

증균 농도	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁴ CFU/ml	10 ³ CFU/ml
결과	TNTC (10 ⁴)	TNTC (10 ³)	10 ² PFU/ml (100-999개)	10 ¹ PFU/ml (10-99개)
사진				

10³⁻⁶ CFU/ml
판독성을 위한
적정한 증균 농도

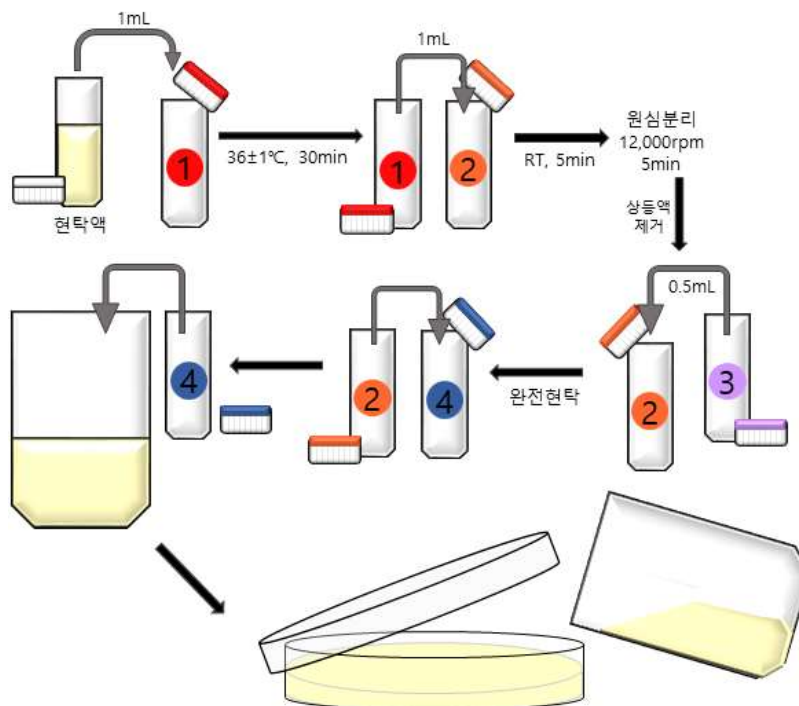
[그림] 황색포도상구균 증균정도에 따른 키트결과 비교 (TNTC; Too Numerous To Count)

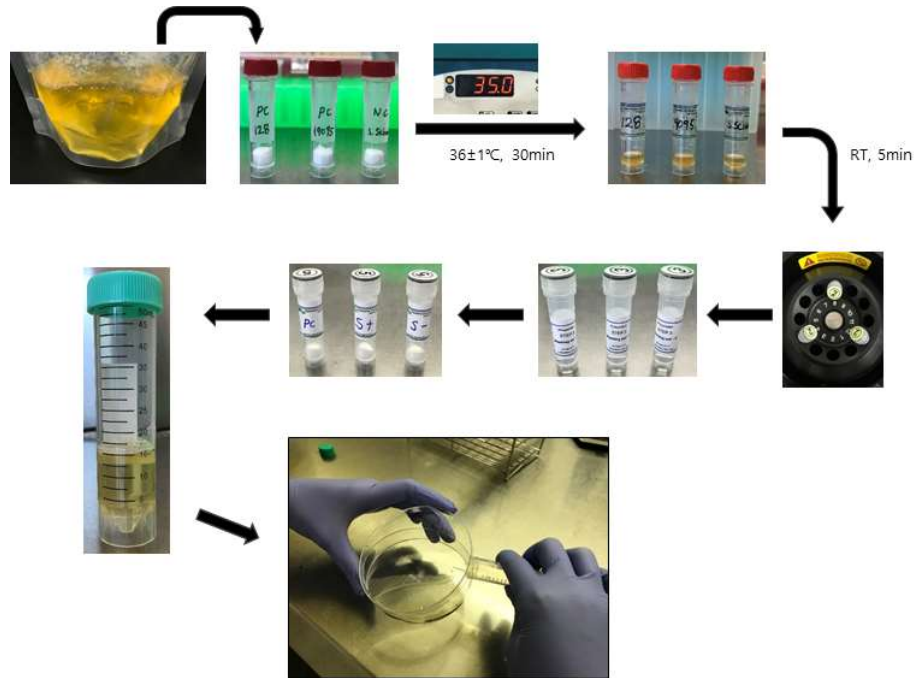
○ 최종 확정된 SEB(*S. aureus* Enrichment Broth)의 조성은 다음과 같고, 해당 배지 이용 시 16-24시간 내 황색포도상구균을 선별적으로 또 유효한 농도 수준만큼만 증균 시킬 수 있게 되었음. SEB배지는 현재 특히 출원을 위하여 자료를 검토 중에 있음.

[표] SEB(*S. aureus* Enrichment Broth) 조성 별 역할

성분	역할
Nurtient mix 1 (4종)	아미노산 소스, 영양원
Nurtient mix 2 (4종)	황색포도상구균 증균성
Nurtient mix 3 (2종)	황색포도상구균 특이성
Nurtient mix 4 (2종)	기타 균 억제
Nurtient mix 5 (2종)	박테리오파지 효율 증대

○ 개발된 키트는 농산물, 식품 또는 환경에 존재하는 미량의 황색포도상구균도 신속하게 검출할 수 있고, 비전문인력도 쉽게 이해하고 따라 할 수 있으며, 식품공전법 대비 작업시간이 절반으로 단축됨. 또한 황색포도상구균에 특이적인 박테리오파지를 5종 포함하고 있기 때문에 그 정확도가 매우 높음.





[그림22. PhageSolution, PhageAMP-S 키트 사용 절차도]

타. 키트인증

○ 국내에는 박테리오파지를 이용한 검출키트를 인증 받을 수 있는 기관이 없기 때문에 해외인증을 알아보았음. 그 중 절차가 빠르고, 타 인증 취득에 유리한 MicroVal 인증을 준비중임.

○ MicroVal 인증은 식음료의 미생물 분석을 위한 ISO와 같은 공인된 시험법을 대체할 수 있는 검증법에 대하여 승인해주는 국제인증기관임, 인증을 위해 필요한 자료는 박테리오파지 정보, Target균에 대한 specificity, ISO등 reference 방법과 비교자료, 제품의 inclusivity 및 exclusivity 자료, kit insert 등이 있음.

○ 현재 관련 자료는 준비중에 있고, 몇 가지의 테스트만 남겨놓고 있는 상황임. 과제가 종료되어도 인증 준비를 계속하여 키트에 대한 MicroVal 인증을 취득할 예정임.

MICROVAL 인증?



MicroVal은 식음료의 미생물 분석을 위한 대체 방법의 검증 및 승인을 위한 국제 인증 기관

MicroVal 인증은 ISO 16140-2:2016, ISO / DIS 16140-6:2017 및 기타 검증 표준과 연계되기 때문에 타 인증에 용이함.

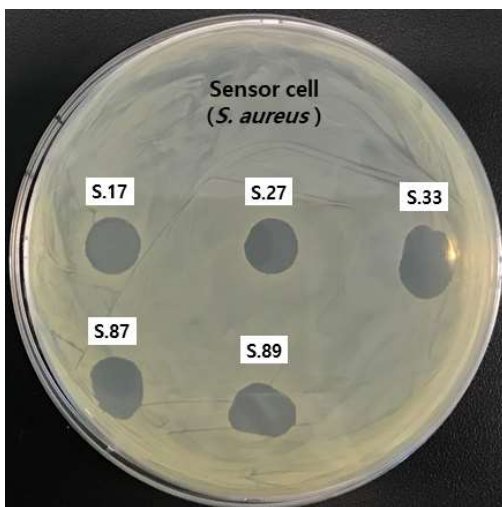
준비 항목	달성도
박테리오파지 선별	90%
Target 균주에 대한 specificity	90%
Method 비교	50%
-Reference method	
-Alternative method	
Inclusivity & Exclusivity	90%
Kit insert	90%

[그림] MicroVal 인증을 위한 준비

4절. 키트 시제품 제작 및 제품화

1. phage 및 sensor cell 검증

○ kit 구성으로 포함하는 *S. aureus* specific 박테리오파지 5종에 대하여, 최종판독 시 sensor cell로 사용되는 균주에 대한 용균성을 검증함.





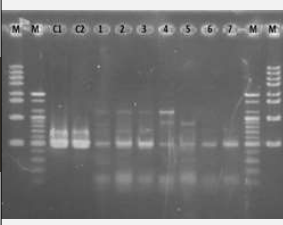

[그림] cocktail에 사용되는 박테리오파지 별 sensor cell에 대한 용균성 검증

(S.17; *S. aureus* phage17(SAP17), S.27; *S. aureus* phage27(SAP27), S.33; *S. aureus* phage33(SAP33), S.87; *S. aureus* phage87(SAP87), S.89; *S. aureus* phage89(SAP89))

2. 키트 protocol 검증 및 기존 황색포도상구균 검사법 비교







○ 본 과제를 통해 개발한 황색포도상구균 검사 키트와 식약처에서 공인하고 있는 [식품공전 -4.12 황색포도상구균] 시험법과 의심집락을 확정할 때 주로 이용하는 PCR법을 각각 시행하여 비교함.

[표] 식품공전법 vs PCR법 vs PhageAMP-SA 비교

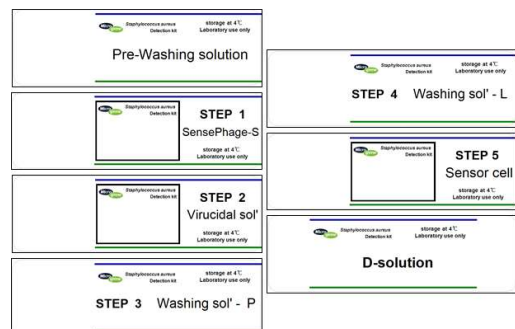
	KFDA-배지법	KFDA-PCR	PhageSolution (주)마이크로진
중균	TSB w/ 10% NaCl	TSB w/ 10% NaCl	자체개발한 SEB
분리배양	BPA	없음	없음
분리배양결과		-	-
단계			
확인시험	Coagulase 검사	PCR 사용	키트 사용
최종확정 결과			
총 소요시간	최소 72시간(3일)	최소 27시간	32-44시간
기타 필수항목	각종 배지, 확인시험 용 제품	PCR장비, 전문인력	PhageAMP-S kit

3. 키트 제품

A. 키트 구성

				5tests
(1)	SensePhage-S		빨강색 Tube	x 5
(2)	Virucidal solution		주황색 Tube	x 5
(3)	Washing solution-P		보라색 Tube	x 5
(4)	Sensor cell		파란색 Tube	x 5
(5)	Agar powder		분말 Bottle	x 5
(6)	Pre-Washing solution		무색 Tube	x 5

B. 구성 별 라벨



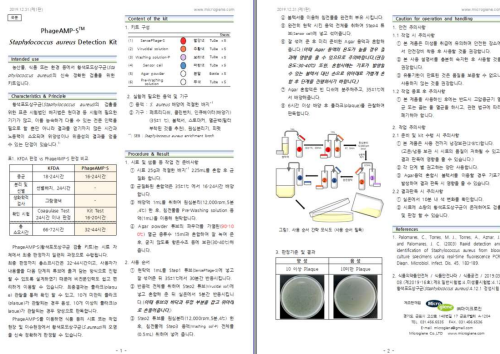
D. 외부박스 라벨 디자인



C. 외부박스 디자인



E. 제품 Insert



F. 시제품



5절. 키트 특허 취득

○ 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트 및 이를 이용한 검출방법에 대한 특허를 출원 시킴.

[표] 특허 출원 정보

특허 출원 정보	
출원일자	2019.01.21
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2019-0007697 (접수번호 1-1-2019-0073449-34)
출원인 명칭	주식회사 마이크로진(1-2019-002326-1)
대리인 성명	특허법인(유한) 해담(9-2015-100041-6)
발명자 성명	조상희 허진영
발명의 명칭	박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트 및 이를 이용한 검출방법

[표] 특허 등록 정보 및 특허증

특허 등록 정보	
등록일자	2020.01.07
특허번호	제 10-2065620호
발명의 명칭	박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트 및 이를 이용한 검출방법
특허권자	주식회사 마이크로진

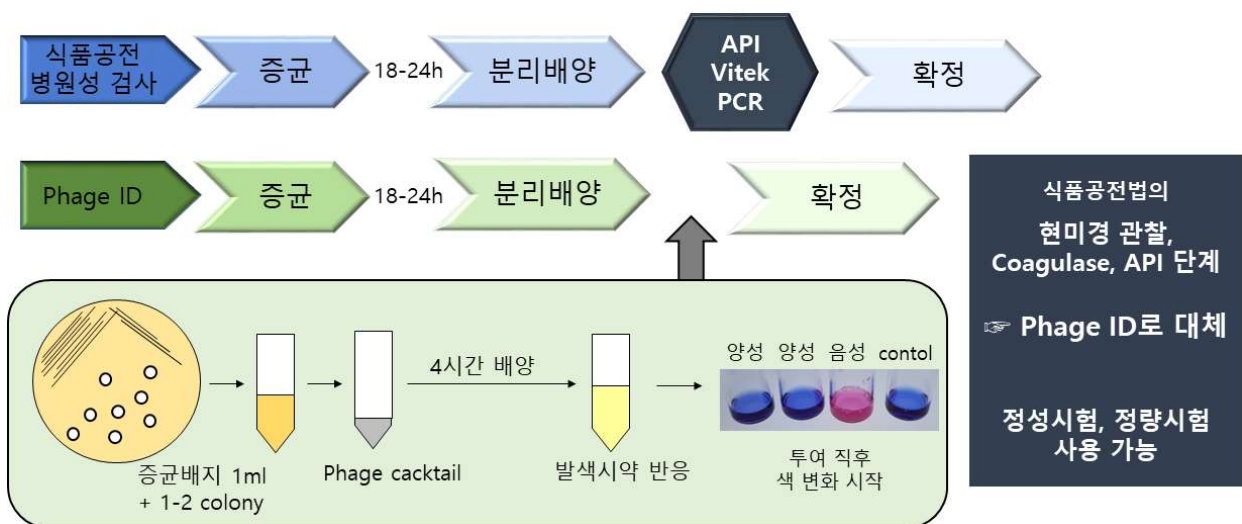
○ 박테리오파지를 이용한 식중독세균검사 기법에 대한 특허를 취득함. 특허 취득한 발명의 명칭은 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트 및 이를 이용한 검출방법으로 세부 내용은 (a) 시료를 배지에 넣고, 배양하는 단계, (b) 시료 배양액과 박테리오파지 각테일 혼합하여, 시료에 존재하는 식중독 세균에 박테리오파지를 감염시키는 단계, (c) 박테리오파지가 혼합된 시료 배양액과 박테리오파지 불활성화 시약을 혼합반응 시켜, 박테리오파지를 불활성화시키는 단계, (d) 반응액으로부터 박테리오파지 불활성화 시약을 제거하는 단계, (e) 박테리오파지 불활성화 시약이 제거된 반응액을 센서 셀(sensor cell)에 혼합하는 단계, (f) 센서셀(sensor cell) 혼합액을 확인하는 단계를 포함하는 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출방법 임.

제2장. 박테리오파지 기반의 동정 기법(PhageID)을 이용한 검사키트 개발

1절. 미생물 생화학적 동정시험에 대한 대체 시험법 개발

○ PhageID기법은 Phage typing 기법을 활용한 병원성세균 동정법으로 기존 식품공전법 등에서 제안하고 있는 확정단계의 현미경관찰, Coagulase 테스트, API키트 테스트 등의 시험을 대체할 수 있어 제품화되었을 때 오히려 일반 키트보다 수요도가 더 높을 수 있으며 보다 빠른 매출화를 이루기 위해 고안함.

○ 해당 기법은 추후 균주의 정성시험뿐만 아니라 및 정량시험을 대체할 수 있는 방안이 될 수 있음. 해당 기법이 대체할 수 있는 단계 및 간략한 과정은 다음과 같음.



[그림] 기존 병원균 검사법 중 확정시험법을 대체할 수 있는 PhageID기법의 모식도

2절. 제품화를 위한 세부 조건 확립

1. 발색시약개발

○ 기존에 검출키트에서 사용하고자 시도했던 호흡을 통한 산화환원반응 및 pH 변화를 확인할 수 있는 지표시약 중 Alamar blue(Resazurin), Triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 2가지 시약을 선정하여 테스트 했고, 이는 기존 Alamar blue assay, TTC assay를 참고하여 진행하였음.

○ 테스트는 TSB 배지에 colony를 1개에서 5개까지 현탁하여 기본 균액을 만들었고, 4시간 배양하여 접종액이 배양할 시간을 주었음. 각 배양된 시료는 Resazurin과 TTC를 0.1g/L, 0.11g/L 농도로 첨가한 후 시간에 따라 색변화를 확인함.

○ 확인결과, Resazurin을 지표시약으로 사용한 경우, 시약 첨가 직후부터 뚜렷한 색변화가 나타났음. 2분 정도 경과 후 접종된 colony의 수에 따라 색변화가 크게 나타났음. 특히 2~5 colony의 경우 핑크-투명 수준으로 변화되어 차이를 확인하는 의미가 없을 정도였음. 1colony를 접종한 시료에서도 색변화가 관찰되었음,

○ TTC를 지표시약으로 사용한 경우, 직후부터 수 분 내엔 색변화가 관찰되지 않았고, 대략 90분 정도 경과했을 때, 시료별 차이를 확인할 수 있었음.

○ 지표시약에 따라 시간 차이는 있었으나, 두 시약 모두에서 차이를 분명하게 확인할 수 있을 정도로 색변화가 일어났기 때문에 박테리오파지를 첨가한 후 차이를 확인해 보았음.

Colony수 경과 시간	Resazurin					Colony수 경과 시간	TTC				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
직후						직후					
2분						35분					
						90분					
						150분					

[그림] 지표시약 별 colony 수에 따른 차이 비교

○ 차이를 확인하기 위한 시험은 TSB에 colony를 각각 1개~5개까지 현탁시키고 박테리오파지를 접종하여 4시간동안 반응 시켰음. 이때 파지에 의한 효과 및 차이를 확인하기 위하여 Positive control에는 TSB에 파지만 넣어주었고, Negative control에는 TSB에 균만 넣어주었음.

○ 실험결과, 지표시약으로 Resazurin을 사용한 경우 현탁된 colony 수에 상관없이 모두 색변화를 일으키지 않았지만 Negative control에서 지표시약 첨가 직후부터 뚜렷한 색변화를 보여주었기 때문에 phage가 매우 효과적으로 작용했다는 것을 알 수 있었고, 해당 기법이 실제 적용가능

하다는 판단을 할 수 있었음.

○ 지표시약으로 TTC를 사용한 경우, 앞서 실험과 동일하게 첨가 직후엔 색변화가 관찰되지 않았음. 이에 먼저 진행한 실험결과를 참고하여 해당 시료들을 추가 배양하였고, 배양 60분 후에 뚜렷한 색변화를 관찰할 수 있었음. TTC를 사용한 경우 역시 Negative control에서만 색변화가 관찰된 것으로 보아 phage가 매우 효과적으로 작용했다는 것을 알 수 있었음.

시약 첨가 후 경과 시간	Resazurin							시약 첨가 후 경과 시간	TTC												
	PC	1	2	3	4	5	NC		PC	1	2	3	4	5	NC						
직후								직후													
3분								색 변화 관찰 X, 먼저 진행한 데이터를 근거로 추가 배양을 결정함.													
								60분													

[그림] 지표시약 별 colony 수에 따라 phage를 적용했을 때 효과 비교

○ 이에 TTC시약을 별도로 제조하여 관찰시간을 단축할 수 있는지 확인하였음. TTC시약은 최종적으로 1, 0.7, 0.5, 0.25, 0.125 g/L 농도가 되게끔 조정하여 제조하였고, colony 수는 앞선 실험 데이터를 참고하여 3개로 결정 후 진행하였음.

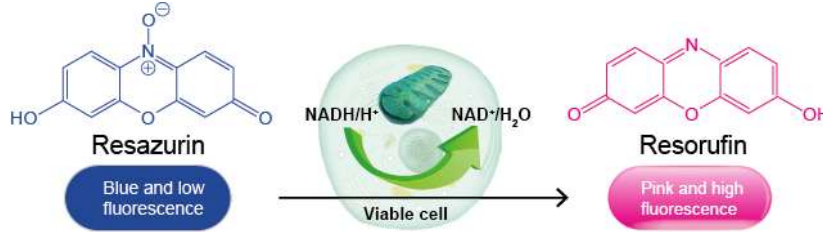
시약 첨가 후 배양 시간	TTC				
	1 g/L	0.7 g/L	0.5 g/L	0.25 g/L	0.125 g/L
직후					
60분					
120분					

[그림] TTC농도 별 색 변화 관찰 시간 비교

○ 그러나 테스트 결과 농도에 따른 색 변화 관찰시간이 크게 차이나지 않았음을 확인할 수 있었

음. 이에 PhageID제품화에 쓰일 수 있는 지표시약을 Resazurin으로 최종 결정하였음.

Resazurin을 이용한 방법의 원리



○ 세포 신진대사를 정량화하는데 사용되는 시약으로 우유의 미생물 오염 측정에 사용됨. 염료환원 시험법의 일종으로 resazurin은 산화상태에서 푸른색을 띠지만, 환원되면 보라색으로 변하고 최종적으로 무색의 dihydroresorufin으로 환원되어 이러한 원리로 결과 판독이 용이함.

3절. PhageID의 주요 특징

○ 식품공전법을 이용해 황색포도상구균을 검사하는 식품 관련 업체에서 모두 사용하고 있는 Baird-Parker Agar(BPA)에 다음과 같이 *Staphylococcus*속 균을 접종한 결과 모두 *Staphylococcus aureus*가 BPA배지에서 나타나는 전형적인 colony 모습과 매우 유사하게 배양됨을 확인할 수 있었음.

[표] *Staphylococcus aureus* 및 *Staphylococcus*속 다른 균주의 배지(Baird-Parker Agar)상에서 모습

<i>S. caprae</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. xylosus</i>

→ 식중독균인 *S. aureus*의 BPA배지에서 나타나는 전형적인 colony모습과 매우 유사함
→ 위양성 모습으로 확실한 판단을 위하여 확정시험 단계를 진행해야함.

○ 설문조사를 통해 대다수의 식품업체에는 비전문인력이 많은데 이러한 인력 또는 개인차로 인

해 다음과 같은 모습을 보고 양/음성 판독에 착오가 일어나거나 확정시험 진행여부 등에 혼동 야기 할 수 있음.

[표] *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus sciuri* 속 균을 육안으로 구별할 수 있는 방법

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	
		 <p data-bbox="1153 539 1428 784"> ← 확정시험단계 진행 여부 결정을 위해 Clear zone 확인 필요 ← 개인차에 의한 판단 착오 가능 </p>

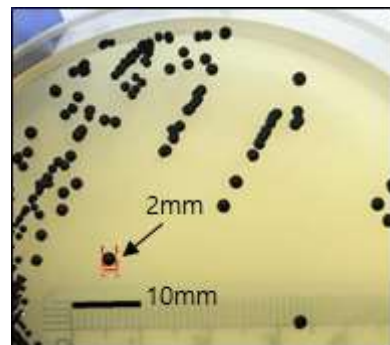
○ 확정시험 진행을 결정하였더라도, 앞서 설문조사 결과와 같이 외부업체에 의뢰하거나 검사키트를 비싼 값에 구매 후 진행해야 함. 또한 확정시험 진행시 필요한 장비, 시약을 구매하고, 이를 능숙하게 다룰 수 있는 전문인력이 필요로 함.

○ 저렴한 가격에 간단하게 진행할 수 있는 확정검사 방법 또는 제품이 마땅치 않아 관련 제품개발이 필요한 상황에서 본 제품 PhageID 검사 키트는 검출키트와 마찬가지로 많은 업체에서 어려워하는 부분을 해결해 줄 수 있는 방안이 될 수 있음.

○ 본 제품 PhageID는 이러한 상황에서 기업체 또는 개인의 부담을 줄여주고, 빠른 시간 내 확정판단에 도움을 줄 수 있음.

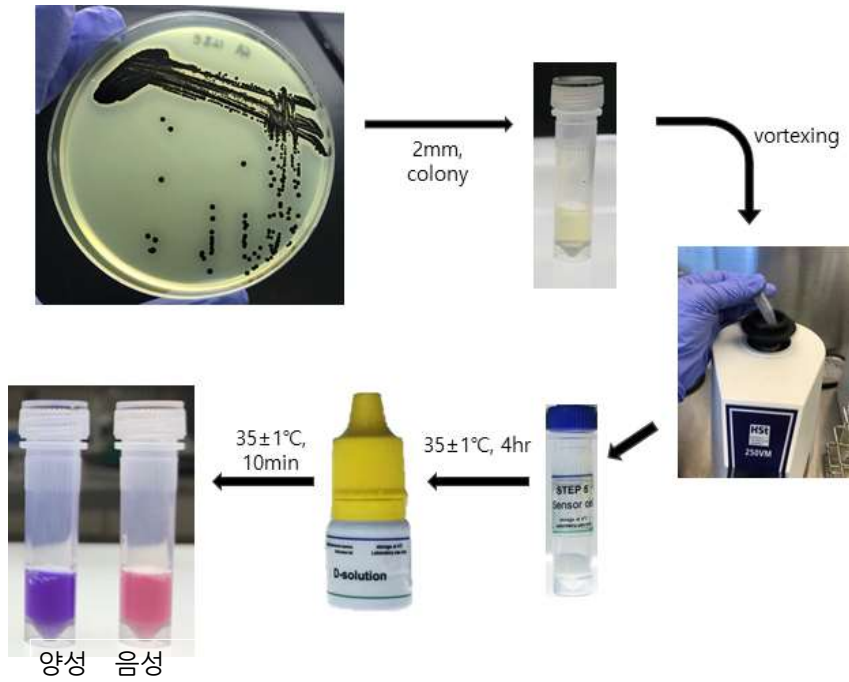
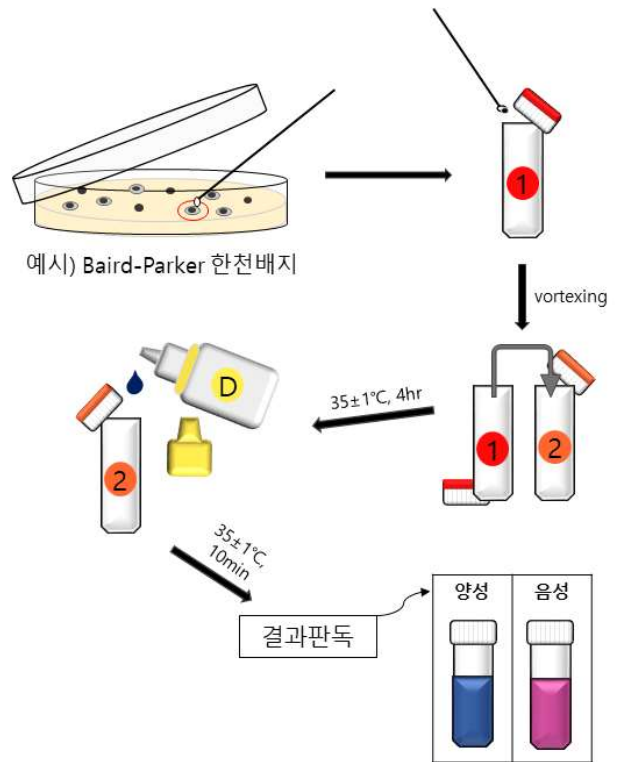
4절. PhageID protocol 확립 및 검증

○ PhageID 작업 순서는 다음과 같이 선별배지(BPA) 상에 나타난 의심집락 중 2mm 정도 크기의 colony를 취하여 액상배지에 현탁 시키고, 여기에 phage를 접종시킨 후 4시간 동안 반응시켜 줌. 반응이 끝난 시료에 D-solution인 Resazurin을 첨가 하고 10분 내 색변화를 확인함으로써 검사결과를 판정할 수 있음.



Protocol

1. Baird-Parker Agar등 선별배지 상에 나타난 의심집락 확인
2. 2mm 크기의 1~2 colony 채취하여 배양 배지에 현탁
3. 현탁액 + phage cocktail
4. 35°C, 4시간 배양
5. D-solution 1~2방울 첨가
6. 10분 내 색깔변화로 최종 판독



[그림] PhageID protocol

5절. PhageID제품의 inclusivity 및 exclusivity

[표] 해당제품(PhageID-SA)의 inclusivity 및 exclusivity 결과

PhageID Inclusivity (79종)			
No	Strains		결과
1	<i>S. aureus</i>	KCTC 1621	+
2	<i>S. aureus</i>	KCCM 12103	+
3	<i>S. aureus</i>	ATCC 13565	+
4	<i>S. aureus</i>	ATCC 23235	+
5	<i>S. aureus</i>	ATCC 19095	+
6	<i>S. aureus</i>	ATCC 14458	+
7	<i>S. aureus</i>	ATCC 27664	+
8	<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	+
9	<i>S. aureus</i>	RN4220	+
10	<i>S. aureus</i>	Newman	+
11	<i>S. aureus</i> S-71C	분리균주	+
12	<i>S. aureus</i> S-72C	분리균주	+
13	<i>S. aureus</i> S-73C	분리균주	+
14	<i>S. aureus</i> S-74C	분리균주	+
15	<i>S. aureus</i> S-75C	분리균주	+
16	<i>S. aureus</i> S-76C	분리균주	+
17	<i>S. aureus</i> S-77C	분리균주	+
18	<i>S. aureus</i> S-78C	분리균주	+
19	<i>S. aureus</i> S-79C	분리균주	+
20	<i>S. aureus</i> S-80C	분리균주	+
21	<i>S. aureus</i> S-81C	분리균주	+
22	<i>S. aureus</i> S-82C	분리균주	+
23	<i>S. aureus</i> S-83C	분리균주	+
24	<i>S. aureus</i> S-84C	분리균주	+
25	<i>S. aureus</i> S-85C	분리균주	+
26	<i>S. aureus</i> S-86C	분리균주	+
27	<i>S. aureus</i> S-87C	분리균주	+
28	<i>S. aureus</i> S-88C	분리균주	+
29	<i>S. aureus</i> S-89C	분리균주	+
30	<i>S. aureus</i> S-90C	분리균주	+
31	<i>S. aureus</i> S-91C	분리균주	+
32	<i>S. aureus</i> S-92C	분리균주	+
33	<i>S. aureus</i> S-93C	분리균주	+
34	<i>S. aureus</i> S-94C	분리균주	+
35	<i>S. aureus</i> S-95C	분리균주	+
36	<i>S. aureus</i> S-96C	분리균주	+
37	<i>S. aureus</i> S-97C	분리균주	+
38	<i>S. aureus</i> S-98D	분리균주	+
39	<i>S. aureus</i> S-99D	분리균주	+
40	<i>S. aureus</i> S-100D	분리균주	+
41	<i>S. aureus</i> S-101D	분리균주	+
42	<i>S. aureus</i> S-102D	분리균주	+

43	<i>S. aureus</i> S-103D	분리균주	+
44	<i>S. aureus</i> S-105D	분리균주	+
45	<i>S. aureus</i> S-106D	분리균주	+
46	<i>S. aureus</i> S-108D	분리균주	+
47	<i>S. aureus</i> S-109D	분리균주	+
48	<i>S. aureus</i> S-111D	분리균주	+
49	<i>S. aureus</i> S-112D	분리균주	+
50	<i>S. aureus</i> S-113D	분리균주	+
51	<i>S. aureus</i> S-115D	분리균주	+
52	<i>S. aureus</i> S-117D	분리균주	+
53	<i>S. aureus</i> S-118D	분리균주	+
54	<i>S. aureus</i> S-119D	분리균주	+
55	<i>S. aureus</i> S-120D	분리균주	+
56	<i>S. aureus</i> S-121E	분리균주	+
57	<i>S. aureus</i> S-122E	분리균주	+
58	<i>S. aureus</i> S-123E	분리균주	+
59	<i>S. aureus</i> S-124E	분리균주	+
60	<i>S. aureus</i> S-125E	분리균주	+
61	<i>S. aureus</i> S-126E	분리균주	+
62	<i>S. aureus</i> S-127E	분리균주	+
63	<i>S. aureus</i> S-128E	분리균주	+
64	<i>S. aureus</i> S-129E	분리균주	+
65	<i>S. aureus</i> S-130E	분리균주	+
66	<i>S. aureus</i> S-131E	분리균주	+
67	<i>S. aureus</i> S-132E	분리균주	+
68	<i>S. aureus</i> S-133E	분리균주	+
69	<i>S. aureus</i> S-136E	분리균주	+
70	<i>S. aureus</i> S-137E	분리균주	+
71	<i>S. aureus</i> S-138E	분리균주	+
72	<i>S. aureus</i> S-139E	분리균주	+
73	<i>S. aureus</i> S-140E	분리균주	+
74	<i>S. aureus</i> S-141E	분리균주	+
75	<i>S. aureus</i> S-142E	분리균주	+
76	<i>S. aureus</i> S-144E	분리균주	+
77	<i>S. aureus</i> S-145E	분리균주	+
78	<i>S. aureus</i> S-146E	분리균주	+
79	<i>S. aureus</i> S-147E	분리균주	+
79종/79종			

PhageID Exclusivity (55종)			
No	Strains		결과
1	<i>Staphylococcus condimentii</i>	KCCP 60045	-
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCCP 60047	-
3	<i>Staphylococcus hominis</i>	KCCP 60048	-
4	<i>Staphylococcus warneri</i>	KCCP 60052	-
5	<i>Staphylococcus warneri</i>	KCCP 11105	+
6	<i>Staphylococcus warneri</i>	KCCP 11224	+
7	<i>Staphylococcus xylosus</i>	KCCP 60053	-

8	<i>Staphylococcus sciuri</i>	KCCP 60058	-
9	<i>Staphylococcus sciuri</i>	KCCP 60060	-
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	분리균주	+
11	<i>Staphylococcus xylosus</i>	KCCP 60059	-
12	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM 40417	-
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC 3108	-
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM 12116	-
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 35464	-
16	<i>Lactobacillus sakei</i>	MGB 0001	-
17	<i>Lactobacillus sakei</i> D501	분리균주	-
18	<i>Lactobacillus sakei</i> D520	분리균주	-
19	<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11315	-
20	<i>Bacillus creus</i>	KCCM 1316	-
21	<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 40443	-
22	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCCM 1034	-
23	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCCM 11428	-
24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCCM 11429	-
25	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCCM 1507	-
26	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCTC 1512	-
27	<i>Salmonella typhimurium</i>	ACTC 14028	-
28	<i>Salmonella enteridis</i>	KCCM 12021	-
29	<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM 40307	-
30	<i>Listeria innocua</i>	KCTC 3568	-
31	<i>Escherichia coli</i>	NCCP 13979	-
32	<i>Escherichia coli</i>	NCCP 14010	-
33	<i>Escherichia coli</i> 01	분리균주	-
34	<i>Escherichia coli</i> 07	분리균주	-
35	<i>Escherichia coli</i> 26	분리균주	-
36	<i>Escherichia coli</i> 29B	분리균주	-
37	<i>Escherichia coli</i> 28B	분리균주	-
38	<i>Escherichia coli</i> 3B	분리균주	-
39	<i>Weissella cibaria</i>	KCTC 3807	-
40	<i>Weissella cibaria</i>	KCTC 3499	-
41	<i>Weissella cibaria</i> B005	분리균주	-
42	<i>Weissella cibaria</i> B248	분리균주	-
43	<i>Weissella kimchii</i>	KCCM 41287	-
44	<i>Weissella koreensis</i>	KCCM 41517	-
45	<i>Weissella confusa</i>	MGB 0189	-
46	<i>Weissella confusa</i>	MGB 0333	-
47	<i>Leuconostoc citreum</i>	KCCM 12030	-
48	<i>Leuconostoc citreum</i>	MGB 0169	-
49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCCM 11325	-
50	<i>Leuconostoc lactis</i>	MGB 0020	-
51	<i>Leuconostoc lactis</i> D101	분리균주	-
52	<i>Leuconostoc lactis</i> D121	분리균주	-
53	<i>Leuconostoc citreum</i> B093	분리균주	-
54	<i>Leuconostoc citreum</i> D340	분리균주	-
55	<i>Lactococcus lactis</i>	KCCM 40104	-
52종/55종			




○ 황색포도상구균을 포함한 29개 속의 134종류 세균에 대하여 inclusivity 및 exclusivity를 확인한 결과 황색포도상구균 79종류 중 79종류 모두 양성 결과를 얻을 수 있었음. 반면 *Staphylococcus*속 세균을 포함한 기타 균주 55종류 중 3종류에서 양성, 52종류에서 음성의 결과를 얻을 수 있었음.

○ *Staphylococcus warneri* 또는 *Staphylococcus epidermidis* 중 몇몇 균주에 대하여 양성의 결과가 나와 파지 구성의 변화 및 이를 배제할 수 있는 방안에 대하여 추가적으로 연구 개발 중임.

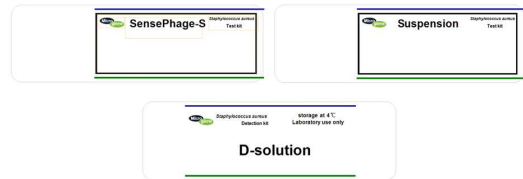
6절. PhageID 제품화

○ phageID 제품화를 위하여 키트수행과정 모식도 및 구성을 결정함.

A. 키트 구성

12tests			
(1)	Suspension		빨강색 Tube x 12
(2)	SensePhage-S		주황색 Tube x 12
(3)	D-solution		노란색 Bottle x 1

B. 구성 별 라벨



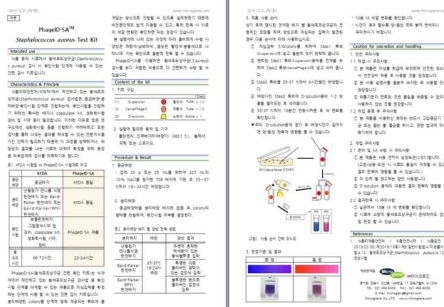
C. 외부박스 디자인



D. 외부박스 라벨 디자인



E. 제품 Insert



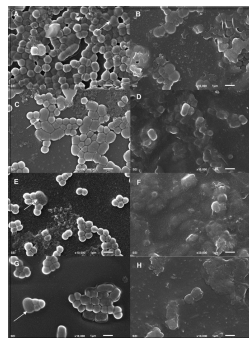
F. 시제품



제3장. 박테리오파지 기반의 농산물 및 식품에 대한 위생처리제 개발

1절. 박테리오파지를 이용한 살균소독제 국외 동향

- 박테리오파지를 농산물에 직접 투여하여 저감화 시키는 연구나 제품들이 출시되고 있으며 그 효율을 증가시키기 위한 연구가 병행되고 있음. 특히 박테리오파지 자체보다 특정 세균을 선택적으로 사멸시킬 수 있는 Endolysin에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 DNA shuffling기법을 이용해 Endolysin의 기능을 향상시키는 연구가 진행되고 있음.
- 황색포도상구균 대상의 Endolysin과 살모넬라 대상의 Endolysin 유전자 및 단백질에 대한 기초 연구가 추가적으로 진행되는 흐름임.
- 박테리오파지의 추가 기능인 Biofilm의 제거효율에 대한 연구도 시작된 것으로 보여지며 식품 제조산업 및 의료기관에 오염된 균 및 바이오필름의 제거에 관한 연구가 활발히 진행됨.



[그림] 박테리오파지가 황색포도상구균에 의해 형성된 바이오필름에 처리하여 제거하는 모습

- 미국 Intralytix사에서 기존 식품제조환경에서 ListShield(리스테리아 위생처리제), EcoShield(대장균O157:H7)위생처리제, SalmoFresh(살모넬라 위생처리제) 이외에 최근에 Shigella spp. 균을 저해하는 ShigaShield 제품을 출시하였으며 애완동물 사료 첨가제로 Ecolicide, Salmolyse, List phage 등을 출시하여 판매하고 있음.

국외의 박테리오파지를 이용한 살균소독제 제품

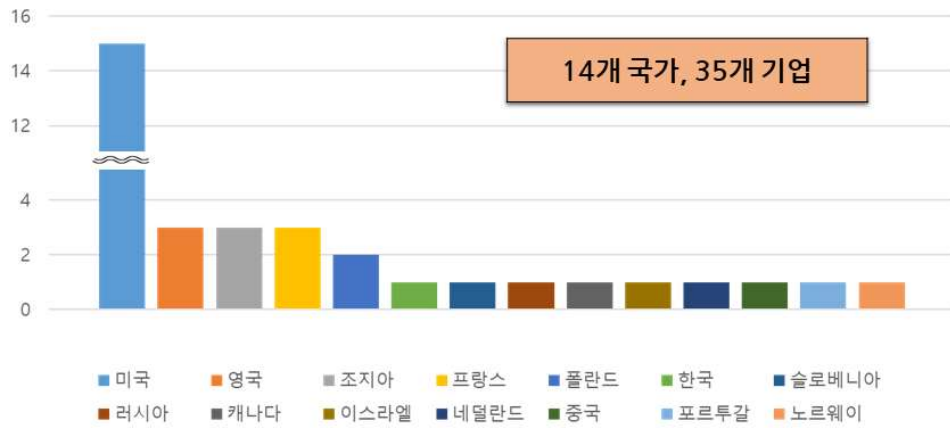


○ 이 최신 제품의 경우 FDA에서 GRAS(Generally Recognized As Safe) 인증을 2017년 4월 얻어냈다. [GRAS Notice 672] Pre-harvest 단계 사용하는 처리제로 Ecolicide PX 등이 또한 최근에 판매가 되고 있는 제품임. 이를 통해 저해균의 확장, 적용 산업균의 확장을 이끌고 있으며 박테리오파지를 활용한 제품 사용의 분위기를 띄우고 있다.

[표] 최근 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 살균소독과 관련된 주요 논문

NO	논문 제목	발행 연도	간략 내용
1	Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria.	2015	위생처리제 이용
2	Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods.	2016	박테리오파지 고정화를 이용한 포장기법
3	Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain	2015	황색포도상구균에 대한 Lytic activity 갖는 Endolysin domain
4	Enhanced staphylolytic activity of the <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophage vB_SauS-phiIPLA88 HydH5 virion-associated peptidoglycan hydrolase: fusions, deletions, and synergy with LysH5	2012	황색포도상구균유래 endolysin(Peptidoglycan hydrolase)이용 위생처리제
5	Use of bacteriophages to reduce Salmonella in chicken skin in comparison with chemical agents	2013	가금류에서 살모넬라 감소에 박테리오파지 사용
6	Bacteriophages lytic for Salmonella rapidly reduce Salmonella contamination on glass and stainless steel surfaces	2013	환경 오염된 살모넬라의 저감화
7	Evaluation of Microencapsulation of The UFV-AREG1 Bacteriophage in Alginate-Ca Microcapsules using Microfluidic Devices	2017	박테리오파지의 alginate에 고정화하여 Sanitizer로 이용성 연구
8	Application of Bacteriophage-containing Aerosol against Nosocomial Transmission of Carbapenem-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> in an Intensive Care Unit	2016	병동에서 <i>Acinetobacter baumannii</i> 감염균에 대한 박테리오파지의 Sanitizer로의 이용성 연구
9	Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry	2016	박테리오파지를 활용하여 바이오필름 제거 이용연구
10	The Behavior of <i>Staphylococcus aureus</i> Dual-Species Biofilms Treated with Bacteriophage phiIPLA-RODI Depends on the Accompanying Microo	2017	박테리오파지를 활용하여 바이오필름 제거 이용연구

	rganism.		
11	Bacteriophage preparation lytic for Shigella significantly reduces Shigella sonnei contamination in various foods.	2017	시겔라 타겟의 박테리오파지 연구
12	Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates Listeria monocytogenes contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods.	2015	농축수산물에 대한 리스테리아 저해 박테리오파지 연구



[그림] 박테리오파지관련 업체 조사

○ 전 세계 다양한 국가에서 박테리오파지를 이용한 연구가 이루어지고 있고, 제품 개발도 시도하고 있음. 실제 제품을 출시한 기업을 조사한 결과 미국, 영국, 조지아, 프랑스, 폴란드 등 14개 국가의 약 35개 기업에서 제품화에 성공한 것을 확인하였음. 그러나 실제 연구 또는 제품개발을 진행하고 있는 기업은 더 많을 것으로 추정하고 있음.

○ 그 중 미국에 가장 많은 기업에 있었고 연구개발 분야, 제품 종류, 제품 수 등 가장 활발한 연구가 진행되고 있었음. 그 다음으로 영국, 조지아, 프랑스에서 많은 연구가 진행되고 있음을 확인하였음.

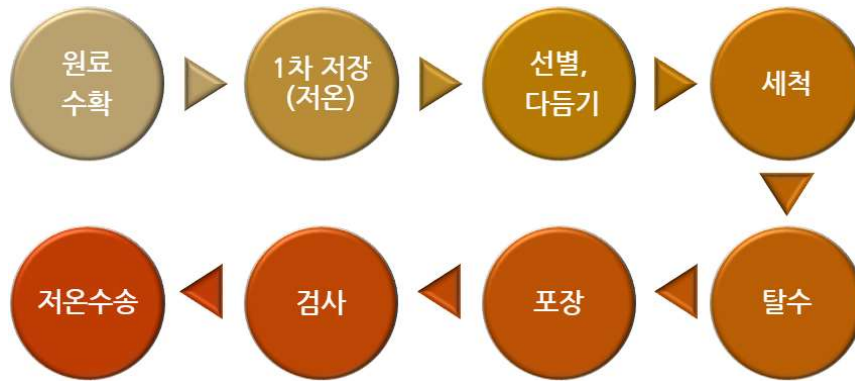


[그림] 박테리오파지 관련 연구 및 제품개발 분야

- 조사된 기업에서 박테리오파지를 이용해 연구 개발되거나 진행 중인 사업에 대하여 조사한 결과 사람이나 동물에 직접적으로 사용하는 경우가 많았음. 이는 많은 국가에서 박테리오파지를 식품첨가물로서 인정하고 있기 때문으로 파악됨.
- 특히 이미 감염된 사람에게 항생제 대체제로 파지를 이용하거나, 질병예방의 목적으로 이용하는 경우가 36%로 가장 높았고, 그 다음으로 개인이 키우는 애완동물 또는 가축들의 질병을 치료하기 위한 분야가 15%로 높았음.
- 해당 과제에서 개발을 진행하고 있는 살균제나 진단키트 분야는 각각 13%, 11%였음, 살균제의 경우 거의 대부분이 식품에 직접 처리하는 방식을 하고 있었고, 그 외 병원, 학교 등 다양한 시설에서 살균소독시 이용하는 제품으로 파악되었음.
- 진단키트의 경우 박테리오파지의 특성을 활용한 Amplification 사업을 진행하고 있었는데 *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. 등 다양한 유해균에 대하여 개발하고 있었음. 식품의 유해균보다 사람이나 동물에 유해한 균을 진단하기 위한 제품이 많았음.
- 이외 양식장 소독제, 농산물에 감염치료 및 예방제, 사료첨가제, 제약, 화장품 등 다양한 산업 분야에서 박테리오파지를 이용하여 제품화하고 있음을 확인하였음.

2절. 신선편의 및 농산물 제품 제조 공정 조사

○ 실제 제품을 제조하는 업체에서 살균소독제를 어떻게 사용하고 있는지 조사하여 사용자가 제품을 어떻게 사용할지 파악할 필요가 있었음. 이에 국내 식품 제조업체 중 업체류, 과채류와 같은 농산물을 주로 생산하고 있는 중견업체 2곳을 섭외하여 인터뷰를 진행하였음.



[그림] 일반적인 식품 제조 공정

○ 일반적으로 식품을 제조하기 위하여 위와 같이 원료수확-1차저장-선별, 다듬기-세척-탈수-포장-검사-수송 단계를 거치는데 식품 유형(신선편의, 과채류 등)에 따라 많게는 11단계까지 세분화되어 진행하고 있었음.

○ 살균소독제는 세척단계에서 사용하게 되는데 먼저 ①깨끗한 물을 이용하거나 털기 작업을 통해 이물질 제거하는 단계를 거친 후 ②식품유형에 따라 소독제를 침지 또는 분무의 방법으로 처리하였음 ③식품유형이나 소독제의 종류에 따라 깨끗한 물로 소독제를 세척하는 경우도 있었음 ④이렇게 세척된 상품은 포장단계로 넘어감.

○ 사용하는 살균소독제는 주로 차아염소산수를 이용하고 있었는데 과산화초산 등 몇 가지 소독제에 대하여 테스트 진행 중이라 답했음.

○ 소독제는 35~200ppm까지 경우에 따라 약간씩 다르게 희석 후 사용했고, 800L 수조 등 대용량 수조에 30-40L(생산량에 따라 다름)의 소독제를 채워 30초~5분 간 처리한다고 하였음. 그러나 수산물 등 유형에 따라 수 시간동안 처리하는 경우도 있다고 답함. 또한 주기적으로 살균소독제의 농도를 측정하여 농도가 떨어지면 소독제를 보충하여 일정농도를 유지한다고 하였음. 경우에 따라 소독제는 필터 멸균하여 재사용하기도 하였음.

○ 이 과정에 박테리오파지 살균소독제를 대체 또는 첨가의 방법으로 사용하였을 때 파지의 활성이나 농도를 간편하게 확인하는 방안이나, 과정을 고려하여 농도를 설정할 필요가 있다고 생각함.

또한 최종 작업 후 생산라인의 기계를 150~200ppm의 락스를 사용해 소독하기 때문에 이 과정에서 파지가 잔존하며 지속적인 효과를 줄 수 있는지도 확인이 필요함.

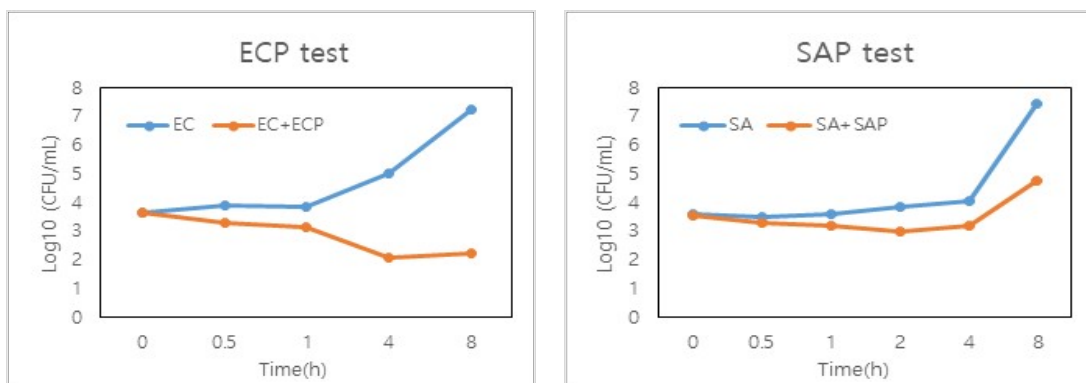
○ 포장은 진공포장을 하는 경우도 있지만 주로 밀봉한다고 답했고, 포장된 제품의 유통기한은 제품에 따라 유통기한설정시험을 통해 결정하지만 대개 3~5일 사이라고 답했음. 유통은 저온(5°C)으로 하였음.

○ 일반적으로 구매부터 유통까지 모든 작업이 하루 안에 이루어졌고, 선별, 다듬기 단계부터 포장까지 약20-30분 정도의 짧은 시간 안에 이루어지기 때문에 이 과정에서 박테리오파지를 기반으로 하는 살균소독제의 효율을 높이기 위한 방안을 모색할 필요가 있음.

3절. 박테리오파지의 살균소독력 시험

○ 협력기관으로부터 전달받은 박테리오파지의 살균소독력을 확인하였음. 살균력테스트는 파지자체의 살균력을 확인하고 실제 적용 시 효과 및 제품규격 결정에 참고하기 위하여 환경(재질)에서 살균력을 테스트함.

○ 파지 자체의 살균력을 확인하기 위하여 먼저 100ml의 배지에 장출혈성대장균 및 황색포도상구균을 10^3 CFU/ml 농도로 접종하고, 각각의 부합되는 파지를 10^7 PFU/ml의 농도로 접종해 주었음. 그 다음 150rpm, 35°C 조건으로 균을 배양시켰고, 배양 시간에 따라 농도를 측정함으로써 파지에 의해 감소되는 균 농도를 확인함.



[그림] 박테리오파지의 살균력 테스트

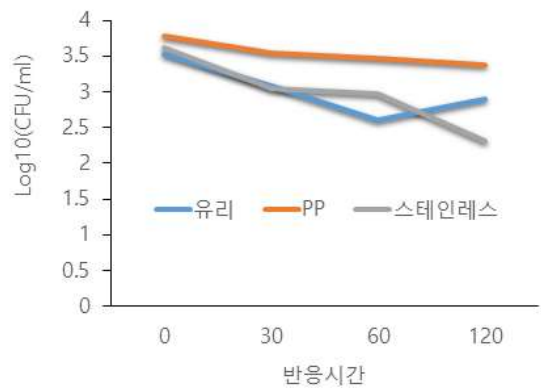
(ECP test; 장출혈성대장균에 대한 파지 살균력, SAP test; 황색포도상구균에 대한 파지 살균력)

○ 실험결과 장출혈성대장균에 대한 파지의 효과가 더 높게 나타났음. 장출혈성대장균의 경우 배양 30분경과 후부터 효과가 나타나기 시작했고, 1시간에서 4시간 사이 효과가 가장 크게 나타남을 확인할 수 있었음.

○ 반면 황색포도상구균의 경우 배양 2시간 경과 후 유의한 효과가 나타났고, 8시간 배양 후 약 10^3 CFU/ml 정도의 감소효과를 보여주었음. 그러나 장출혈성대장균의 경우 8시간 경과 후 약 10^5 CFU/ml 이상의 효과를 보여주었음. 이로써 살균제에 사용하는 박테리오파지의 살균력을 확인할 수 있었음.

○ 이에 환경에서 살균력을 평가하기 위하여 실리콘(Silicon), 스테인레스(Stainless steel), 폴리프로필렌(Polypropylene,PP), 유리(Glass)를 준비하였고, 살균력테스트는 기본적으로 [식품첨가물공전-제4.일반시험법-37.살균소독력시험] 방법을 따랐지만, 박테리오파지의 특성을 고려하여 약간 변형 후 진행하였음.

재질 별 살균력 비교



재질	유리	폴리프로필렌 (PP)	스테인레스
경과시간			
0분	-	-	-
30분	64.7%	41.7%	73.8%
60분	88.2%	51.7%	77.4%
120분	76.5%	60.8%	95.2%

[그림] 환경시료에서 박테리오파지의 살균력 평가

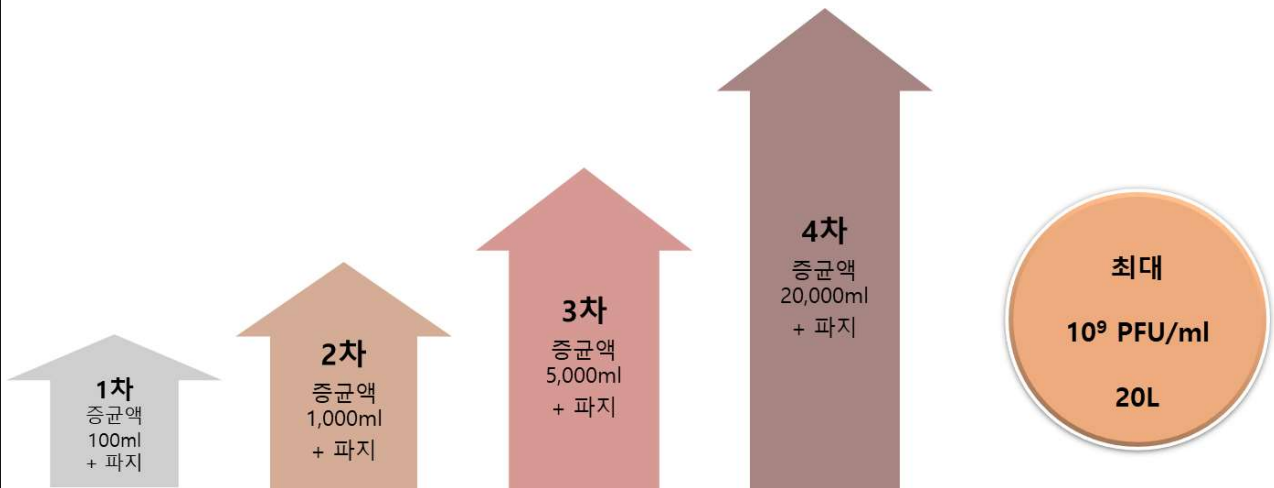
○ 각 재질을 1cm² 크기로 준비하고, 그 위에 균을 접종하였음. 충분히 건조시켜 균이 각 재질에 밀착되거나, biofilm 형성을 유도한 후 파지액을 그 위에 분주하여 접종시켰음. 15분간 반응시킨 후 중화 시켰고, 최종 현탁액은 단계별로 희석하여 균 농도를 측정함.

○ 실리콘의 경우 균 회수에 문제가 있어 농도를 확인하지 못했지만, 그 외 3가지 재질에서 살균력을 확인한 결과 PP보다 유리 및 스테인레스에서 더 효과적으로 작용했음을 확인할 수 있었음.

○ 대체적으로 반응한 시간이 길어질수록 효과는 증가했기 때문에 시료에 최대한 오랫동안 유지시킬 수 있게끔 제품을 디자인할 필요가 있다고 생각함.

4절. 박테리오파지 기반의 살균소독제 생산 공정 개발

○ 주원료인 박테리오파지를 위생적이고 안정적으로 대량생산을 위하여 다음과 같이 공정을 확립함.



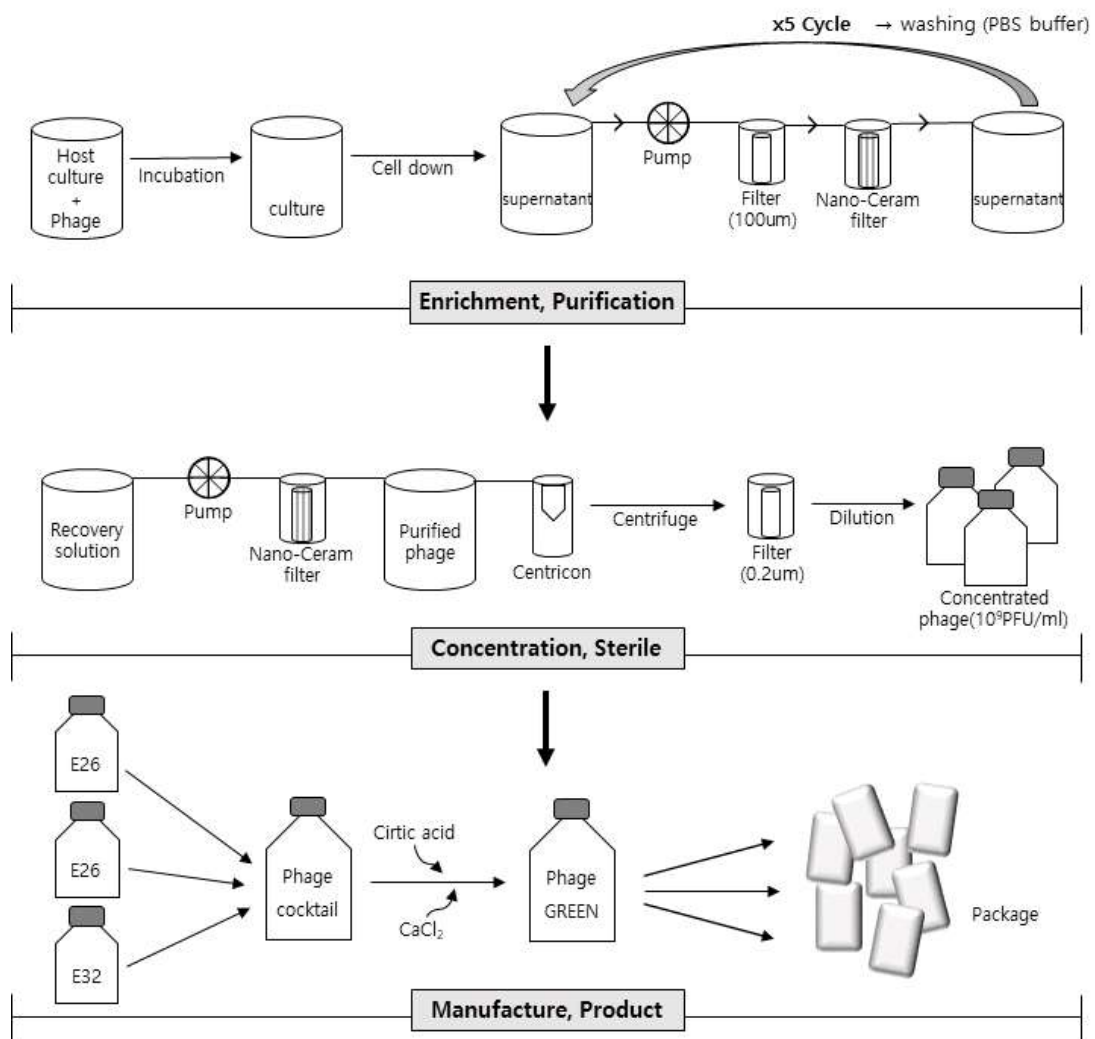
[그림] 박테리오파지 대량 증식 과정

- 1) 비병원성이고 독소를 생산하지 않으면서, 원료 박테리오파지가 기주로 이용할 수 있는 세균(이하 비병원성 기주)을 선정한다.
- 2) 비병원성 기주와 박테리오파지 활성화에 적합한 배지를 선정한다.
- 3) 적합한 배지에서 배양한 비병원성 기주 배양액과 해당 박테리오파지를 100배 비율로 혼합한다.
- 4) 적합한 온도, 시간, 교반율 등 조건에 맞게 1차 증식한다.
- 5) 1차 증식액과 새롭게 배양된 비병원성 기주 배양액을 다시 혼합한다.
- 6) 상기 조건에 맞춰 2차 증식 시키고, 같은 방법으로 3차, 4차 증식을 시킨다.
- 7) 각 단계 별 phage titer 및 균액의 농도를 확인해준다.

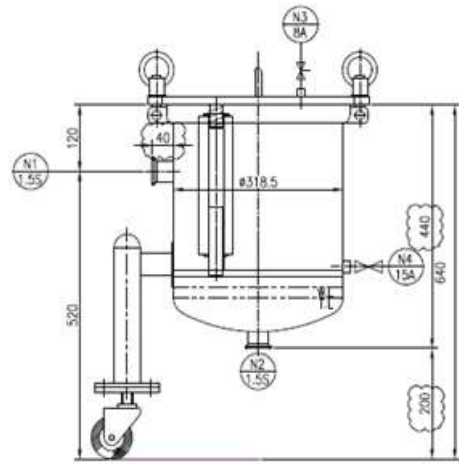
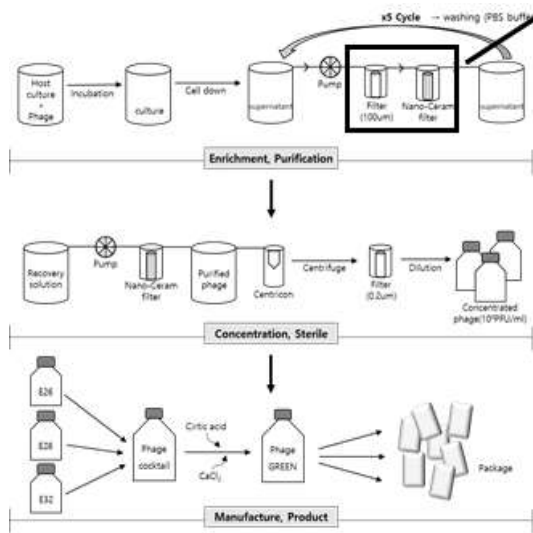
○ 박테리오파지를 증식시킨 대량생산액은 위생안전을 위하여 정제과정을 거친 후, 생산성을 위하여 고농도로 농축 한 후, 소비자의 사용에 적합한 농도로 희석 및 포장 단계를 거쳐 최종 제품을 만드는 공정을 다음과 같이 확립함.

- 1) 대량증식액에서 비병원성 기주를 제거하기 위하여 원심분리한다.
- 2) 상층액은 0.2 μ m 필터를 통과시켜 남아있는 기주 또는 이물질을 제거한다.

- 3) 이어서 박테리오파지만 선택적으로 부착되는 필터를 이용해 배지 성분 및 독소 등 위해할 수 있는 인자를 제거한다.
- 4) 2),3) 단계를 5회 이상 반복하고, 세척과정을 추가하여 순수한 박테리오파지만 남긴다.
- 5) 박테리오파지 회수액을 필터에 통과시켜 순수한 박테리오파지만 획득한다.
- 6) 정제된 박테리오파지는 농축기를 이용해 농축한다.
- 7) 농축된 박테리오파지는 0.2 μ m 필터를 통과시켜 필터 멸균한다.
- 8) 각 파지와 기타 첨가물을 혼합하여 제품원액을 만들어 준다.
- 9) 제품규격에 맞춰 희석하고, 멸균된 공간에서 포장한다.



[그림] 박테리오파지 정제, 농축 및 제품 포장 과정



[그림] 바이러스 정제 및 농축 여과장치

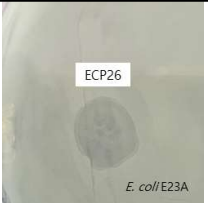
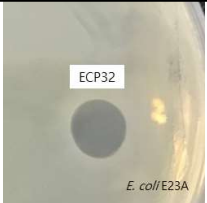
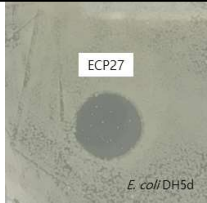

○ 해외에서 인증까지 받은 제품 중 제조과정이 공개된 제품과 새롭게 개발한 생산 공정을 비교해 보았음.

○ 비교 결과 사용하는 세부적인 농도나 정제 시 사용하는 필터 등에서 차이가 있었지만 배지 및 기본적인 enrichment 과정이 매우 유사함을 알 수 있었음. 또한 새롭게 개발한 제조공정은 제품에 사용하는 파지 및 첨가물에 적합하게 세팅하였고, 생산성을 고려하여 결정하였기 때문에 위 공정을 최종적으로 확정하였음.

[표] 해외인증 살균소독제 제품과 개발한 제품의 제조공정 비교

	PhageGuard E™	Secure Shield E1	PhageGreen-STECC
제조사	Micreos	Fink TEC's	(주)마이크로진
사용 배지	LB		LB
Host	shiga toxin 생성하지 않는 균주	non-pathogenic host (shigatoxin 생성x)	non-pathogenic host (shigatoxin 생성x)
Enrichment 과정	1.Host 배양 2.Phage접종 3.Filtration으로 1차 분리 4.Ultra-filtration 이용 정제, 농축 5.멸균	1.Host배양 2.Phage접종 3.Cell down 4.tangential flow filtration 으로 정제 5.멸균	1.Host배양 2.Phage접종 3.Cell down 4.Nano-ceram filter 이용 정제, 농축 5.멸균
제품 Spectrum	O157 strains 84/88 (95%)	Shiga toxin 생성균주 17/18 (94.44%)	Shiga toxin 생성균주 19/21(90.5%)

○ 위 공정에 맞게 실제 PhageGREEN-STECC 또는 PhageGREEN-SA를 제조하기 전 제품 내 가장 중요도가 높은 박테리오파지에 대하여 host에 대한 용균성 및 파지 활성을 재확인하였음.

제품명	대량증식에 사용되는 Host를 대상으로 phage 활성 및 용균성 검증		
PhageGREEN-STECC			
PhageGREEN-SA			

[그림] 파지 별 host에 대한 용균성 검증

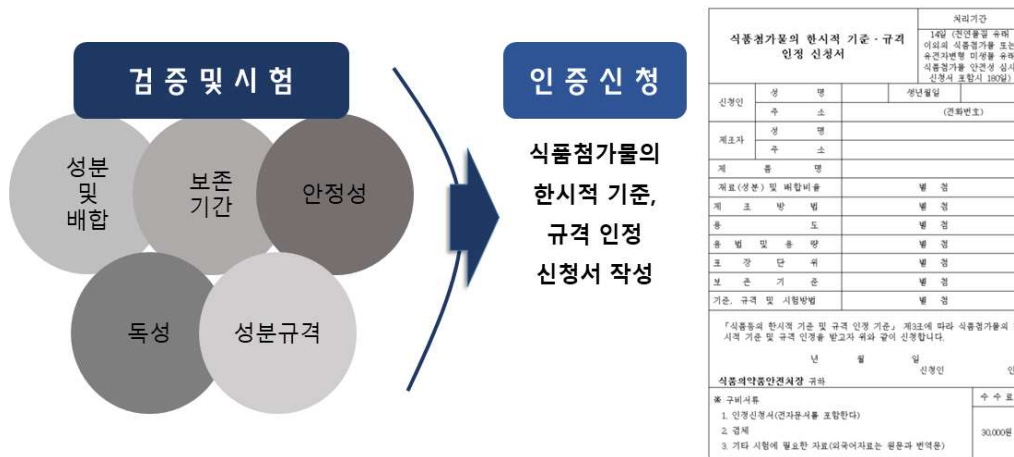
4절. 국내외 인증

1. 국내인증 - 한시적 인증(준비 중)

○ 해당 제품은 식품의약품안전처에서 승인하고 있는 식품위생법 시행규칙(식품의약품안전처) [총

리령 제1472호] 제5조(식품 등의 한시적 기준 및 규격의 인정 등)에 따라 한시적으로 제조·가공 등에 관한 기준과 성분에 관한 규격을 인증해주는 “식품첨가물의 한시적 기준, 규격 인증”을 준비 중임.

○ 인증을 위하여 개요 및 제품명, 기원 및 외국 사용현황, 제조방법, 성분규격에 관한 자료, 확인시험, 순도시험 등에 대한 내용을 작성 중에 있고, 과제종료 후에도 인증작업을 계속 진행 할 예정임.



[그림] 식품첨가물의 한시적 기준, 규격 인증을 위한 절차 및 준비항목

[그림] 신청서 작성 내용

2. 국외인증 - AOAC(Association of Official Analytical Chemists) 인증

○ 인증기관별로 특징이 있지만 AOAC의 경우 Grade를 OMA와 PTM 등으로 나눠서 주고 있으며 PTM을 목표로 할 경우 약 1~2년 정도 소요될 것으로 보고 있으며 제품제조가 완료 된 이후 관련 논문 및 기초 데이터를 취합하여 인증지원을 하게 됨.

○ 인증절차에 대한 추가적인 내용을 수집 중에 있음

3. 국외인증 - GRAS(Generally Recognized As Safe) 인증

○ FDA에서GRAS Notification Process라는 절차 거침.

○ 제조업자가 스스로 식품 전문가들의 안전성 테스트를 해서 GRAS로서 안전성이 입증된 소재를 결정하고, 안정성을 뒷받침 할 수 있는 증거를 FDA에 제시하여 승인을 받는 구조로 FDA가 약 90일간의 검토 후 최종 인증.

○ 보통 준비하는 서류는

- 1) 신청자의 이름과 주소, 신청 물질의 common or usual name, 신청 물질의 용도(적용제품, 제품에 대한 사용량, 사용목적, 물질의 예상수요 등), GRAS 판단 근거 등에 대한 일반적인 자료
- 2) 신청 물질에 관한 모든 이, 화학적인 Data, 제조방법, 규격 등에 관한 이,화학 자료
- 3) 신청 물질의 사용량, 안전성을 입증할 수 있는 독성 및 임상자료
- 4) 기타 GRAS 물질임을 입증할 수 있는 자료

○ 기타 인증절차에 대한 추가적인 내용을 수집 중에 있음

5절. 살균소독제 시제품 제작 및 제품화

1. 해외 인증 제품과 PhageGreen제품 비교

[표]박테리오파지를 이용한 장출혈성대장균 제어 해외 인증 제품과 비교

	PhageGuard E™	Secure Shield E1	EcoShield	PhageGreen-STECC
제조사	Micreos	Fink TEC's	Intralytix	(주)마이크로진
Target	<i>E. coli</i> O157	Shiga toxin 생산하는 <i>E. coli</i> O157 및 non-O157	<i>E. coli</i> O157:H7	Shiga toxin 생산하는 <i>E. coli</i> O157 및 non-O157
주 사용처	Beef	Beef	Red beef	식품 및 유가공 설비
파지 종류	2종 Myoviridae과, Podoviridae과	2~3종/6종, Myoviridae과, Podoviridae과	3종, Myoviridae과	3종, Myoviridae과
제품 내 파지 농도	2×10^{11} PFU/ml	$5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ PFU/ml	10^{10} PFU/ml	10^7 PFU/ml
사용방법	물, 100배 희석	물, 용도에 따라 희석	물, 10배 희석	물, 400배 희석
사용(적용) 농도	10^9 PFU/ml	10^{5-7} PFU/ml	10^9 PFU/ml	10^5 PFU/ml
파지 분리원	다양한 식품, 채소	환경	환경	환경
제품특징	무색~옅은 노랑, 무향	무색~옅은 노랑, 무향	무색~옅은 노랑, 무향	무색~옅은 노랑, 무향
pH		7.0-7.4	7.2-7.5	5.0 이상
보관 온도	2-6 °C	4-8 °C	2-6 °C	2-8 °C
보관 조건	빛이 없는 곳	어둡고, 빛이 없는 곳	어둡고, 빛이 없는 곳	어둡고, 빛이 없는 곳
인증	GRAS, FDA	GRAS, FDA	FDA, Kosher, Halal	살균한시기준 인증 신청(예정)

○ 인증을 받은 제품은 대부분 식품에 뿌리는 등 직접적으로 사용하고 있었음. 하지만 국내에선 직접 사용 시 인식 등의 문제가 있을 것을 우려하여 분무 또는 침지하는 방식으로 선정함.

○ 박테리오파지는 주로 Myoviridae과 또는 Podoviridae과 파지 2~3종을 cocktail로 만들었고, 사용처나 사용법에 따라 희석배수를 다양하게 제시하고 있었음. 박테리오파지는 직접 분리한 파지를 이용했으며, 주로 환경에서 분리하지만 식품에서 분리하여 사용하는 경우도 있었음,

○ pH는 대부분 중성으로 맞춰주었음. 그러나 해당 과제를 통해 개발한 PhageGreen의 경우 유

기산 등의 첨가물과의 혼용효과 등을 모색하고 있기 때문에 pH 5.0이상의 약산성으로 결정하였음.

○ 박테리오파지의 특성상 제품은 햇빛을 차단할 수 있게끔 디자인하였고, 냉장보관을 제시하고 있었음.

2. 규격설정

○ 해외인증을 받은 박테리오파지 기반의 살균제를 참고하여 제품규격을 설정하였지만, 국내 기준 및 업체에서 주로 사용하는 방법에 맞게 조건을 설정하였음,

[표] 살균소독제 유효성분 및 함량

구분	PhageGREEN-SA			PhageGREEN-STEC		
	성분	제품 내 농도	함량	성분	제품 내 농도	함량
주성분	bacteriophage	10 ⁷ PFU/ml	20%	bacteriophage	10 ⁷ PFU/ml	20%
첨가물	bacteriocin	900 IU/ml	2%	Citric acid	1.5mM	2%
첨가물	CaCl ₂	0.5M	2%	CaCl ₂	0.5mM	2%
첨가물	Water			Water		
Target	<i>Staphylococcus aureus</i>			Shiga독소를 생산하는 <i>E. coli</i> O157 및 non-O157		
사용법	물, 400배 희석			물, 400배 희석		
제품특징	무색~옅은 노랑, 무향			무색~옅은 노랑, 무향		
pH	pH5.0 이상			pH5.0 이상		
보관온도	2-6 °C			2-6 °C		
보관조건	빛이 없는 곳			빛이 없는 곳		
인증	식약처-식품첨가물 한시적기준인증, 진행중			식약처-식품첨가물 한시적기준인증, 진행중		

○ 국내 농산물 제품 관련 제조업체 2곳의 제품 생산 담당자 인터뷰를 통하여 실제 농산물을 이용한 제품을 가공/제조 할 때 소독과정에 대하여 조사함.

3. 제품화

A. 외부박스 디자인



B. 제품 Insert

PHAGE Solution **PHAGE GREEN**

MICROGENE CO.LTD. www.microgene.com

Characteristics

Phage GREEN-STECS는 식용 유제품 중 유산균의 식중독을 유발시키는 *Escherichia coli* O157 및 *Shiga* 독소를 생산하는 *Escherichia coli*에 대한 비병원적 소독제입니다. Phage GREEN-STECS는 저온에서 분포한 유균을 핵티코라지(Lytic Bacteriophage) 및 기타 첨가물로 이루어진 소독제인 식용, 가우 등에서 *Escherichia coli* O157 및 *shiga*독소를 생산하는 *Escherichia coli*에 의한 오염을 효율적으로 제거할 수 있습니다.

핵티코라지(Bacteriophage)란?

핵티코라지라는 식용 동물, 식물 등 다양한 곳에 존재하는 물로써 기포 특이성이 강하여 특정 식균 특성을 가진다는 특징이 있습니다. 핵티코라지는 가우에서 약 10¹⁰ CFU 이하가 존재한다고 알려져 있고, 우유가 있는 물이나 물속에 많이 존재하고 있는 단세포생물입니다.

Product Information & Intended

Phage GREEN-STECS는

- *Escherichia coli* O157 및 *shiga*독소를 생산하는 *E. coli*를 단량체로 축적한 37가지의 물상 핵티코라지로 구성된 복합-물상 노화제에 해당 소독제입니다.
- 식용수 또는 유가공 액체, 식용가공 용에 살균소독제로 사용할 수 있습니다.
- 본 제품은 식용이나 가우 등의 액, 향, 색깔 등 변화시키지 않습니다.

How to use & Storage

Phage GREEN-STECS는 적사물질을 제거하고, 사용하고자 냉장보관(2-8도)을 권장합니다.

- ① 용기 내용 50ml를 개량할 물 200ml 첨가 혼합하여 사용한다. (400ml 용량)
- ② 식용, 식기 등의 오염물을 제거하고, 용기 후 복벽 소독에 첨가 또는 분무 등의 방법으로 처리합니다.
- ③ 상온에서 5분 이상 접촉 시간 후 자연건조 시켜 사용합니다.
- ④ 자연건조 후 별도의 멸균 작업 없이 가우를 사용합니다. (No-Rinse 제품)
- ⑤ 제품은 제조로부터 6개월간 사용할 수 있으며, 제조하는 제품 내 유통기한이 있습니다.

Caution for operation

1. 용액에 가우를 투입할 수 있으나 침투하지 않으며 용다.
2. 사냥장, 자사에 따라 용액에 복벽하여 용액을 가라소독, 세척, 용기물에 혼합하지 않는다.
3. 기타 자세한 사항은 물질안전보건자료(MSDS)를 참조하십시오.

고품질 및 맞춤형 제조
 제조, 판매처: (주)마이크로진, 경기도 군포시 고신로, 148번길 17 사:1204 마이크로진
 TEL: 031-456-6535 / FAX: 031-456-6536 / E-mail: msp@microgen.com

C. 라벨디자인

가우 등의 살균소독제

PHAGE GREEN-STECS

식용유생분해에 의한 물질표시

- 제품명 : Phage GREEN-STECS
- 성분(중량%) :
 - Bacteriophage
 - Calcium phosphate -- CHIC acid
- 사용 : 1. 100ml 용액 200ml 용액에 용해하여 사용
- 성분 : 1. 100ml 용액 200ml 용액에 용해하여 사용
- 용도 : 1. 100ml 용액 200ml 용액에 용해하여 사용

사용방법

1. 용액 100ml를 200ml 용액에 혼합하여 사용한다.
2. 용액 100ml를 200ml 용액에 혼합하여 사용한다.
3. 용액 100ml를 200ml 용액에 혼합하여 사용한다.
4. 용액 100ml를 200ml 용액에 혼합하여 사용한다.

사용상의 주의 사항

1. 용액의 사용 용량을 초과하지 않도록 주의한다.
2. 용액의 사용 용량을 초과하지 않도록 주의한다.
3. 용액의 사용 용량을 초과하지 않도록 주의한다.
4. 용액의 사용 용량을 초과하지 않도록 주의한다.

제조업체 : (주)마이크로진

주식회사 마이크로진
 경기도 군포시 고신로 148번길 17
 TEL: 031-456-6535 / FAX: 031-456-6536

F. 시제품



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	1 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	2.18억원	
			향후 3년간 매출	3 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 3 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 30 % 국외 : 0 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		5년		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	1	3
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	5	10
		국외	0	0	0
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		식중독균 검사 키트 2종 식중독균 동정 키트 2종 식중독균 위생처리제 1종			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 1 협동기관 : 가천대학교

제4장. 기 구축된 박테리오파지 라이브러리 강화 및 위생처리 제로써 기초 연구

1절. 여러 환경시료로부터 2종 식중독 세균에 대한 신규 박테리오파지 분리와 특성 분석

1. *Escherichia coli* 유래 bacteriophage의 분리

○ 전국 각지의 하천수 및 농업용수 시료로부터 bacteriophage를 분리하기 위하여 3주의 *E. coli* O157:H7 type균주와 4주의 *E. coli* Non-O157 type균주를 host strain으로 사용하였음. 시료와 LBC broth를 1:9 비율로 섞어 균질화하고, LBC broth에서 전 배양된 약 8 - 9 log CFU/ml 수준의 host strain을 각각 100 μ l씩 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 24시간 배양하였음. 배양액을 8000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 0.22 μ m syringe filter를 이용해 제균하였음. 제균된 상등액을 이용하여 LBC agar에 double overlay agar법을 통한 plaque assay를 수행하고 37°C에서 24시간 배양하였음. 생성된 plaque는 형태학적인 특성에 따라 single plaque로 순수 분리하고, 각각 10% glycerol stock하여 -70°C에서 보관하였음.

○ 그 결과, 3주의 *E. coli* O157:H7 type균주를 host strain으로 사용하여 11주의 phage를 분리하였으며, 4주의 *E. coli* Non-O157 type균주를 host strain으로 사용하여 45주의 phage를 분리하여 총 56주의 phage를 순수분리하였음.

○ 분리된 phage는 host strain이 O157:H7 type에서 분리된 경우 ECP로 명명하였으며, Non-O157 type에서 분리된 경우는 NOECP로 명명하였음. 같은 시료로부터 여러 가지 host strain을 사용하여 분리하더라도 plaque morphology가 다른 것을 선별하여 순수분리 하였음.

[표] Host strain of isolated *Escherichia coli* phage from water samples

Host type	Host strain	Name
O157:H7	<i>E. coli</i> NCCP 13930	ECP31, ECP32, ECP33, ECP35, ECP37, ECP41
	<i>E. coli</i> NCTC 12079	ECP34, ECP38, ECP40
	<i>E. coli</i> O157:H7 505B	ECP36, ECP39
Non-O157	<i>E. coli</i> NCCP 13979	NOECP61, NOECP64, NOECP69, NOECP70, NOECP71, NOECP75, NOECP78, NOECP80, NOECP81, NOECP83, NOECP86, NOECP88, NOECP89, NOECP93, NOECP97
	<i>E. coli</i> NCCP 13934	NOECP62, NOECP63, NOECP65, NOECP67, NOECP68, NOECP72, NOECP76, NOECP77, NOECP82, NOECP84, NOECP85, NOECP87, NOECP90, NOECP92, NOECP94, NOECP96, NOECP99
	<i>E. coli</i> NCCP 13937	NOECP66, NOECP73, NOECP74, NOECP79, NOECP91, NOECP95, NOECP98, NOECP100, NOECP101
	<i>E. coli</i> NCCP 13939	NOECP102, NOECP103, NOECP104, NOECP105

2. *Staphylococcus aureus* bacteriophage의 분리

○ 전국 각지의 토양 시료로부터 bacteriophage를 분리하기 위하여 6주의 *Staphylococcus aureus* type균주를 host strain으로 사용하였음. 고체 시료로부터 phage를 효율적으로 분리하기 위해 시료를 1× PBS buffer에 1:2 비율로 혼합하여 상온에서 150 rpm으로 2시간동안 진탕시킨 후, 3000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상등액을 얻었음. 이러한 시료현탁액을 LBC broth와 1:10 비율로 섞어 균질화하고, LBC broth에서 전 배양된 약 8 - 9 log CFU/ml 수준의 host strain을 각각 100 μl씩 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 24시간 배양하였음. 배양액을 8000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 0.22 μm syringe filter를 이용해 제균하였음. 제균된 상등액을 이용하여 LBC agar에 double overlay agar법을 통한 plaque assay를 수행하고 37°C에서 24시간 배양하였음. 생성된 plaque는 형태학적인 특성에 따라 single plaque로 순수 분리하고, 각각 10% glycerol stock하여 -70°C에서 보관하였음.

○ 그 결과, 6주의 *S. aureus* 균주를 host strain으로 사용하여 총 11주의 phage를 순수 분리하였음.

○ 분리된 phage는 SAP로 명명하였음. 같은 시료로부터 여러 가지 host strain을 사용하여 분리하더라도 plaque morphology가 다른 것을 선별하여 순수분리 하였음.

[표] Host strain of isolated *Staphylococcus aureus* phage from soil sample

Host strain	Name
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	SAP84, SAP86, SAP87, SAP88
<i>S. aureus</i> KCCM 12103	SAP83, SAP85
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	SAP82
<i>S. aureus</i> ATCC 19095	-
<i>S. aureus</i> ATCC 23235	-
<i>S. aureus</i> RN 4220	SAP89, SAP90, SAP91, SAP92

3. 분리된 bacteriophage의 숙주저해범위 분석 및 선별

○ 분리된 *E. coli* 유래 phage 중 숙주 저해범위가 넓은 phage를 선별하기 위해 *E. coli* phage는 *E. coli* O157 strain 뿐만 아니라 주요 발병 Non-O157 EHEC 또한 감염시킬 수 있는 phage 들을 선별하였으며, 이를 위해 18주의 O157 type strain 18주, 6가지 주요 Non-O157 EHEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145)와 2010년대에 독일에서 문제가 되었던 Non-O157 EHEC (O104)에 해당하는 type strain 11주를 대상으로 spot assay를 수행하였고, 추가적으로 Non-O157 type strain 26주를 대상으로 spot assay를 추가적으로 수행하였다.

○ 총 56주의 bacteriophage 중 4주의 phage는 주요 Non-O157 STEC 11주에 대해 80% (8/11) 이상의 비교적 넓은 host spectrum을 보였으며, 나머지 52주의 phage는 평균 20% 내외의 좁은 host spectrum을 나타내었음. 비교적 넓은 host spectrum을 나타내는 4주의 phage 중에서 plaque morphology, host spectrum, 분리원 등을 고려하여 3주의 phage (ECP32, ECP33, NOECP91)를 선별하였으며, 선별파지들 중 다음 표와 같이 NOECP91의 경우는 총 44주의 *E. coli* type strain에 대해 약 63.6%에 가까운 28주의 균에 대해 숙주 저해능을 가지고 있음을 확인하였으며, ECP32와 ECP33의 경우에도 45% 이상의 균주에 대해 숙주 저해능을 가지고 있음을 확인함.

○ 분리된 11개의 *S. aureus* 유래 phage 중 숙주 저해 범위가 우수한 phage를 선별하기 위해서 type strain을 포함한 37개의 *S. aureus*에 대해 spot assay를 수행하였음. 실험결과 SAP83, SAP84, SAP87, SAP89 4 가지 phage가 숙주 저해범위가 우수한 것으로 판별되어 4개 phage를 *S. aureus* 제어 및 phage 기반 신속검출용으로 선별하였음.

○ 또한 좀 더 효과적인 병원성 *E. coli* 제어 및 검출을 위해 본 연구실에서 분리된 *E. coli* phage 중 비교적 넓은 host spectrum을 가지는 phage 4종 (ECP26, ECP27, NOECP32, NOECP43)을 추가적으로 선별함.

[㉔] Host spectrum of selected *E. coli* phage

bacteriophage	Total	Major Non-O157 <i>E. coli</i> type strain						
		O26	O45	O103	O111	O121	O145	O104
ECP32	9/11	1/1	0/1	2/2	2/2	1/1	0/1	3/3
ECP33	9/11	1/1	0/1	2/2	2/2	1/1	0/1	3/3
NOECP91	9/11	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	3/3

[㉕] Host spectrum of selected *E. coli* phage on *E. coli* type strain

bacteriophage	Host spectrum		
	<i>E. coli</i> O157 type strain	<i>E. coli</i> non-O157 type strain	Total
ECP32	6/18	15/26	21/44
ECP33	10/18	10/26	20/44
NOECP91	10/18	18/26	28/44

[㉖] Host spectrum of selected *S. aureus* infecting phage on *S. aureus*.

bacteriophage	Host spectrum		
	<i>S. aureus</i> type strain	Food isolated <i>S. aureus</i>	Total
SAP83	6/9	26/28	32/37
SAP84	8/9	26/28	34/37
SAP87	8/9	26/28	34/37
SAP89	6/9	22/28	28/37

[㉗] Host spectrum of selected *E. coli* phage

bacteriophage	Total	Major Non-O157 <i>E. coli</i> type strain						
		O26	O45	O103	O111	O121	O145	O104
ECP26	9/11	1/1	0/1	2/2	2/2	0/1	1/1	3/3
ECP27	8/11	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	0/3
NOECP32	11/11	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	1/1	3/3
NOECP43	10/11	1/1	0/1	2/2	2/2	1/1	1/1	3/3

[표] Host spectrum of selected *E. coli* phage on *E. coli* type strain

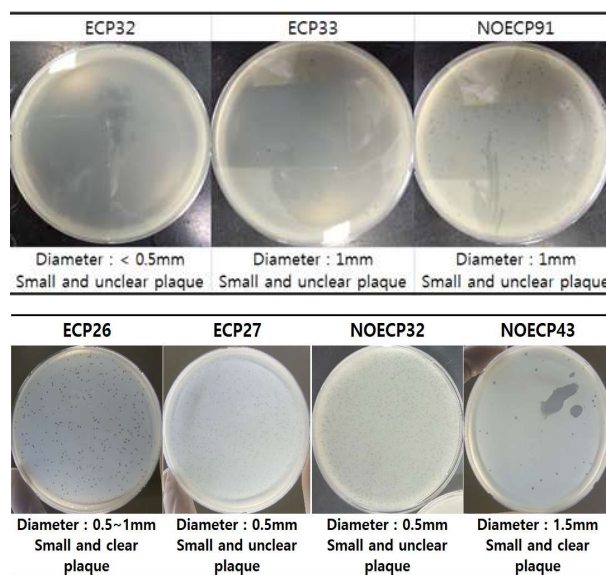
bacteriophage	Host spectrum		
	<i>E. coli</i> O157 type strain	<i>E. coli</i> non-O157 type strain	Total
ECP26	14/18	22/26	36/44
ECP27	9/18	17/26	26/44
NOECP32	8/18	19/26	27/44
NOECP43	8/18	19/26	27/44

4. 분리된 bacteriophage의 형태학적 특성 분석

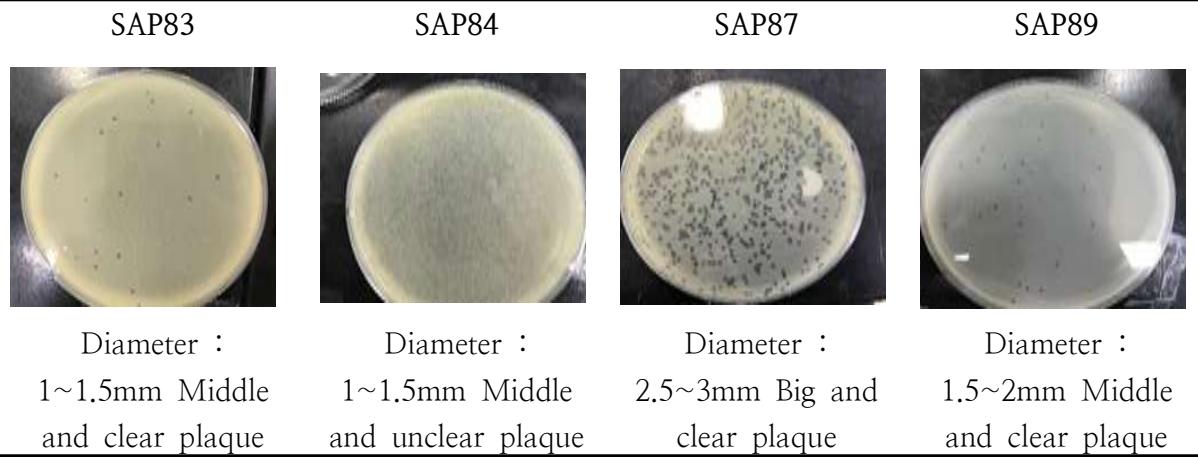
○ 선별한 *E. coli* phage 7종 및 *S. aureus* phage 4종을 plaque assay를 실시하여 plaque morphology를 확인하였음.

○ ECP27과 NOECP32는 크기가 작고 unclear한 plaque를 가지며, ECP26과 NOECP43의 경우 크기는 작지만 비교적 clear한 plaque를 가졌으며 ECP32, ECP33, NOECP91은 모두 size가 작고 unclear plaque를 보였음.

○ SAP83과 SAP84는 모두 중간정도의 크기를 가졌으나 SAP84가 SAP83에 비해 좀 더 혼탁한 plaque 형태를 가졌으며, SAP87과 SAP89는 모두 clear한 plaque 형태를 가졌지만 SAP87의 plaque가 훨씬 큰 plaque 크기를 보였음.



[그림] Plaque morphology of selected *E. coli* phage

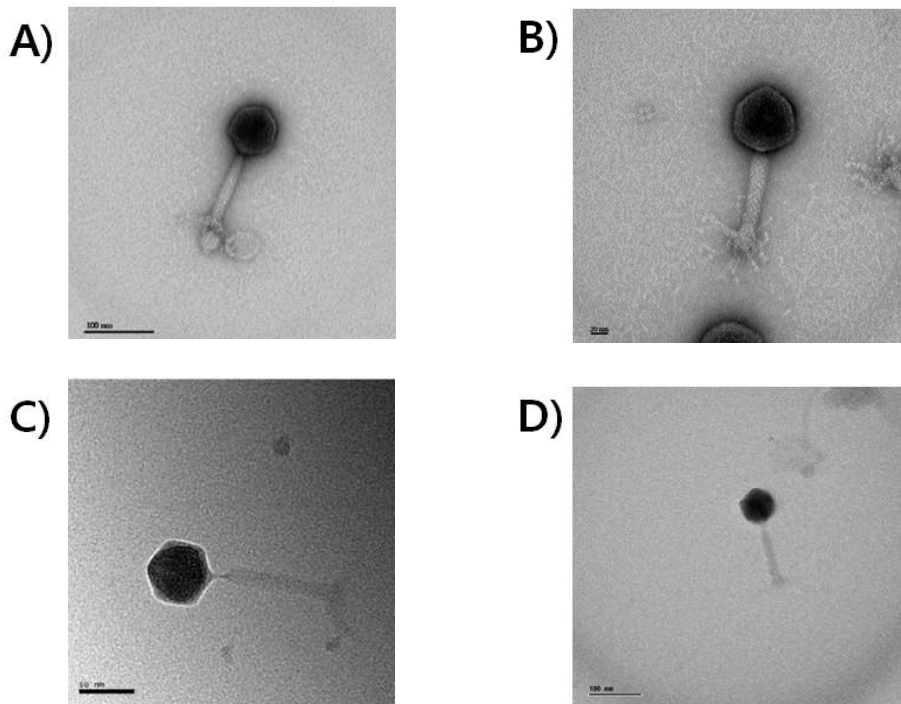


[그림] Plaque morphology of selected *S. aureus* phage

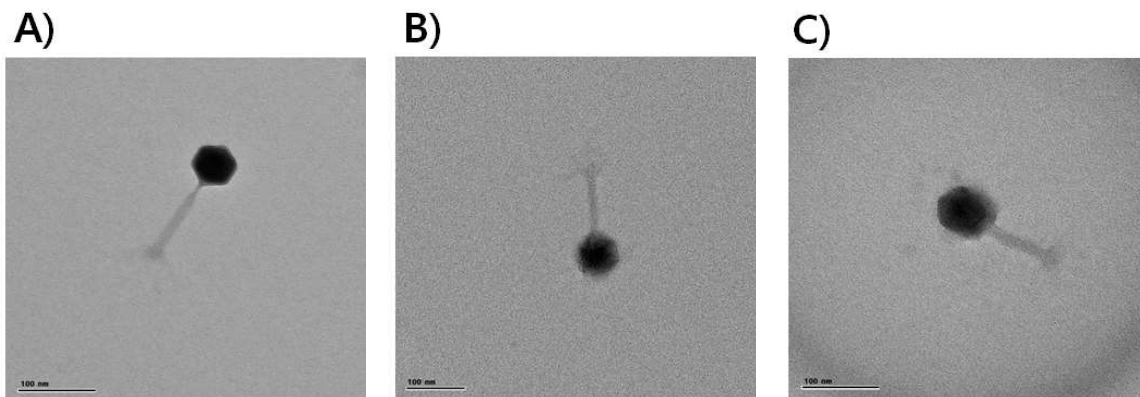
○ 선별한 bacteriophage 11종의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 다량의 bacteriophage 용액을 2 M NaCl이 첨가된 20% polyethylene glycol (PEG) 8000을 이용하여 약 9-10 log PFU/ml 수준으로 농축시켰음. 농축시킨 용액을 25,000 g, 1 h, 4 °C의 조건으로 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 0.1 M ammonium acetate 용액을 이용하여 수세하는 과정을 2회 반복하고 최종적으로 1× SM buffer에 현탁하는 bacteriophage 정제과정을 거쳤음. 정제된 bacteriophage 용액을 2% uranyl acetate을 이용하여 negative stain을 수행하고 투과 전자 현미경 (Transmission electron microscope, TEM)을 통해 형태학적 특성을 확인하였음.

○ TEM을 통해 형태학적 특성을 확인한 결과 *E. coli* phage 7종은 모두 *Myoviridae* family에 속함을 알 수 있었으며, *S. aureus* phage 4종은 모두 *Siphoviridae*에 속함을 알 수 있었음. 또한 SAP83과 SAP84는 *Siphoviridae* 이면서 elongated head를 가지고 있었고 SAP87과 SAP89는 icosahedral head를 가지고 있어 차이점을 보였음.

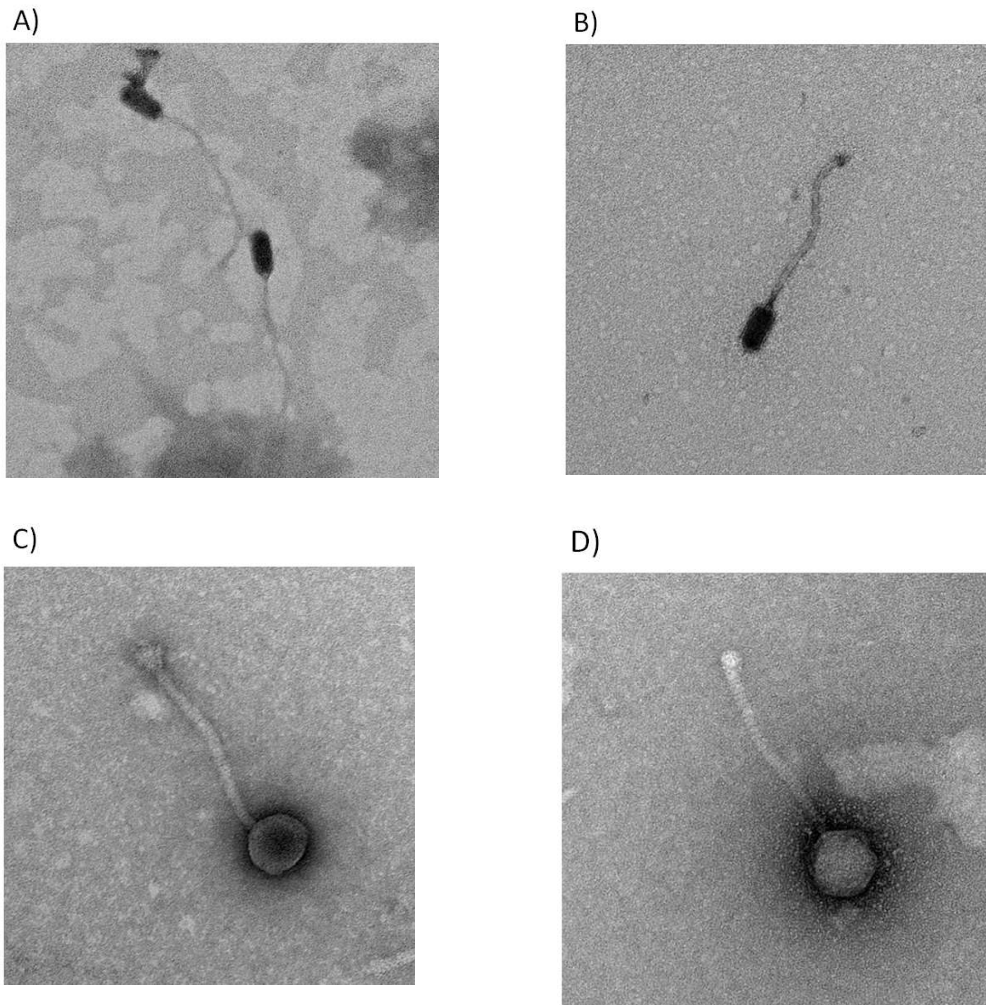
○ 선별 phage들의 plaque morphology, TEM을 통한 형태학적 특성, 숙주 저해범위 결과를 교차로 비교하였을 때 선별 phage들은 모두 서로 다른 박테리오파지들이므로 사료됨.



[그림] Morphological characterization of *E. coli* bacteriophage by TEM
 A) ECP26, B) ECP27, C) NOECP32, D) NOECP43



[그림] Morphological characterization of *E. coli* bacteriophage by TEM
 A) ECP32, B) ECP33, C) NOECP91



[그림] Morphological characterization of *S. aureus* bacteriophage by TEM
 A) SAP83 B) SAP84, C) SAP87, D) SAP89

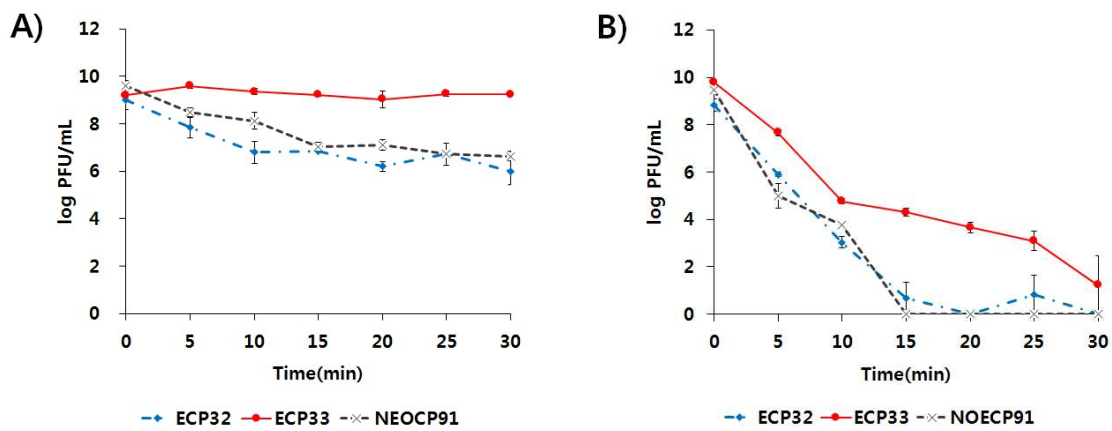
2절. 위생처리 방법에 따른 박테리오파지 안정성

1. 선별된 박테리오파지들의 온도 안정성 평가

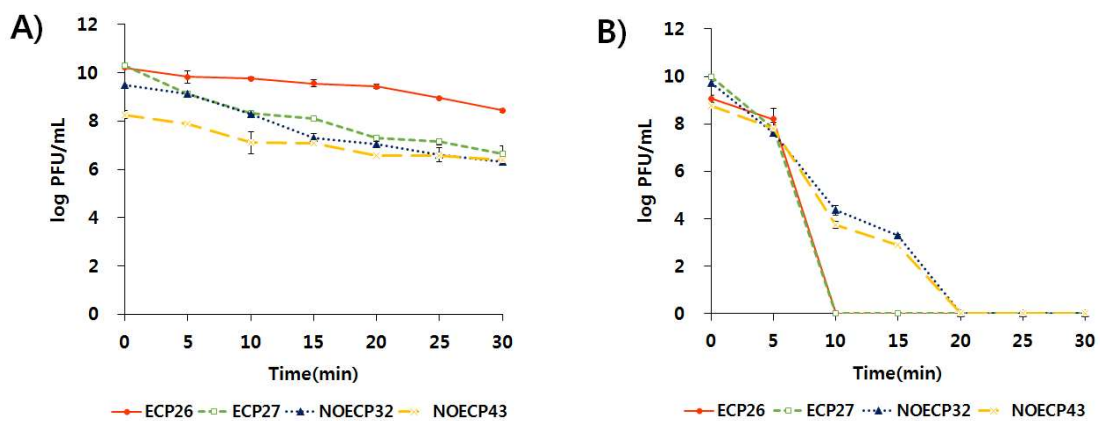
○ 선별된 *E. coli* 유래 phage 7종에 대해 65°C, 70°C에서 30분 동안 phage를 노출시켜 파지의 안정성에 대해 확인하였음, 65°C에서는 7종의 phage 모두 30분까지 약 0-2 log PFU/mL 정도의 감소만을 보였으나, 70°C에서는 매우 불안정하여 30분 이내에 모두 불활성화 되었음. ECP26과 ECP27은 10분 내에, ECP32와 ECP33은 15분 내에 완전히 사멸되는 것에 비해 NOECP32와 NOECP43은 20분, NOECP91의 경우 30분에도 1 log PFU/mL 정도 생존하는 것을 보아 ECP보

다 NOECP그룹이 열에 보다 안정함을 알 수 있었음.

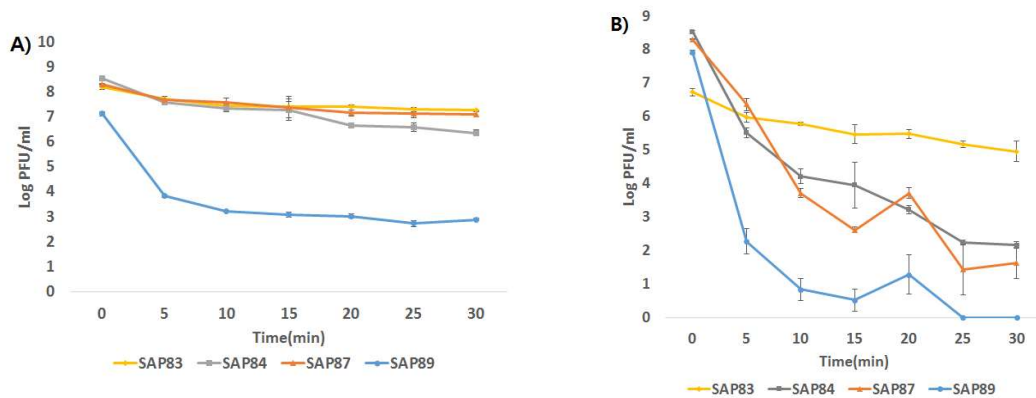
○ 선별된 *S. aureus* 유래 phage 4종에 대해 65°C, 70°C에서 30분 동안 phage를 노출시켜 파지의 안정성에 대해 확인하였음, 65°C에서는 4종의 phage 중 SAP89를 제외한 3개 phage 모두 30분까지 약 0-2 log PFU/mL 정도의 감소만을 보였으며, 70°C에서는 SAP83을 제외한 3개 phage들이 매우 불안정하여 30분 이내에 대부분이 불활 되었음. SAP89는 다른 phage들에 비해 온도 안정성이 매우 낮았던 반면, SAP83은 70°C에서도 30분까지 약 1 log PFU/mL 정도만의 감소만을 나타내어 온도에 대해 매우 안정적임을 알 수 있었음.



[그림] Stability of selected *E. coli* phages at A) 65°C and B) 70°C



[그림] Stability of ECP, NOECP at A) 65°C and B) 70°C



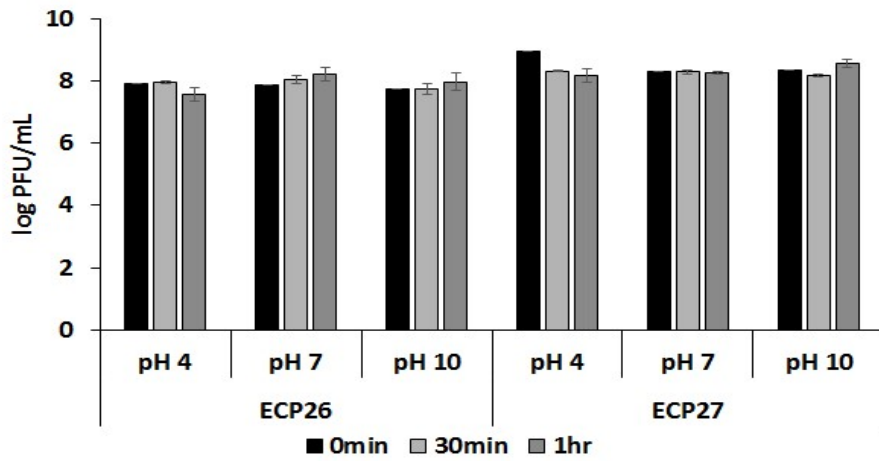
[그림] Stability of SAP at A) 65°C and B) 70°C

2. 선별된 박테리오파지들의 pH 안정성 평가

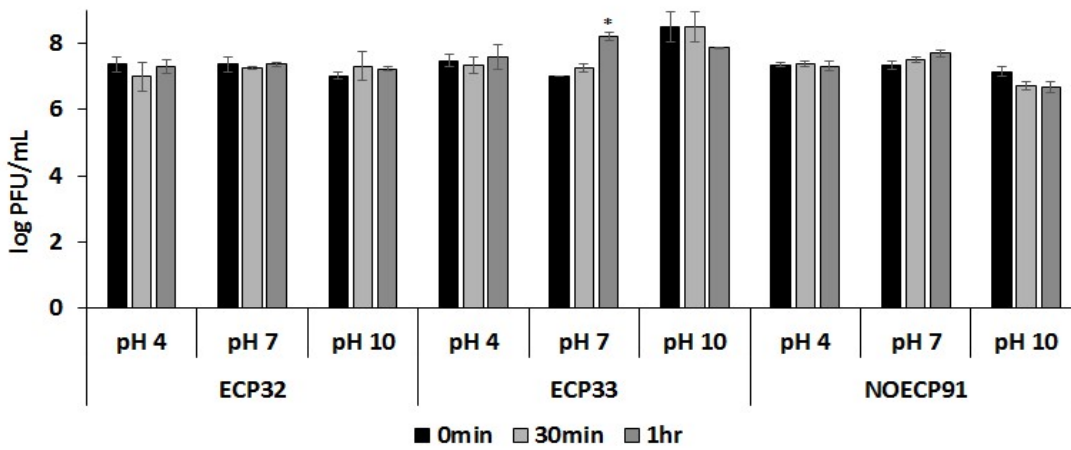
○ 다양한 pH에서의 안정성을 분석하기 위하여 *E. coli* phage 5종 및 *S. aureus* phage 4종을 선별하여 다양한 pH 조건의 buffer에 반응시킨 뒤 역가를 확인하였음.

○ HCl과 NaOH를 사용하여 pH 4, pH 7, pH 10으로 맞춘 1× SM buffer를 제조한 뒤 pH가 조정된 1× SM buffer 990 μl에 선별 phage용액을 10 μl씩 혼합하였음. 이후 실온에서 30분 및 1시간 동안 방치한 후 LBC agar에 spot assay를 수행하였음. 37°C에서 24시간 배양한 후 pH 처리를 하지 않은 대조군과 plaque 수를 비교하여 phage의 감소량을 확인하였음.

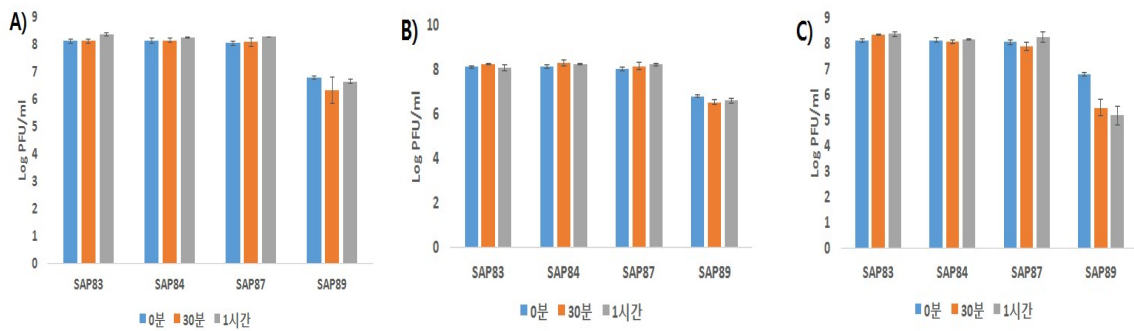
○ *E. coli* phage 5종 및 *S. aureus* phage 4종 모두 0min 처리 시인 대조군과 비교하여 1시간 처리 시까지도 유의하지 않은 수준의 감소율을 보여 9종의 선별 *E. coli* phage 및 *S. aureus* phage 모두 산성인 pH 4에서 강염기인 pH 10에 이르는 다양한 환경에서 비교적 안정적임을 확인하였음.



[그림] Stability of ECP26, ECP27 under various pH



[그림] Stability of selected *E. coli* bacteriophage under various pH



[그림] Stability of selected *S. aureus* bacteriophage under various pH
A) pH4, B) pH7, C) pH10

3. 선별된 박테리오파지들의 EtOH 처리에 의한 안정성 평가

○ 유기용매에서의 안정성을 알아보기 위해 99.9% Ethyl alcohol을 사용하여 11종의 phage용액과 v/v으로 각각 30%, 50%, 70%의 EtOH농도가 되도록 혼합함. 그리고 실온에서 각각 30분, 1시간 동안 방치한 후 LBC agar에 spot assay를 수행하였음. 37°C에서 24시간 배양한 후 EtOH 처리를 하지 않은 대조군과 plaque 수를 비교하여 phage의 감소량을 확인하였음.

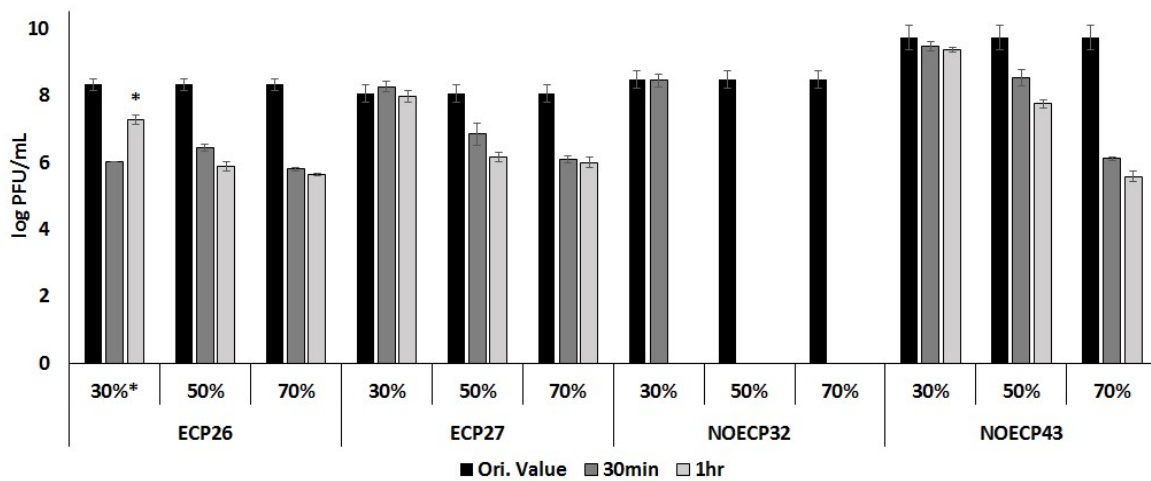
○ 선별된 *E. coli* phage를 30%, 50%, 70% EtOH에 각각 30분, 1시간 동안 노출시킨 결과, 다양한 농도의 EtOH에 대해 3주의 phage가 다소 다른 양상을 보임. 그 중 ECP33의 경우 30% EtOH에서는 1시간 처리 시까지 0.5 log 미만의 감소를 보였으며 50%에서는 약 1 log정도, 70% EtOH에서 1시간 처리 시에도 1.5 log정도의 감소를 보여 다양한 EtOH에 대해 비교적 안정함을 알 수 있었음. 이와 대조적으로 NOECP91의 경우 초기 약 8.7 log PFU/mL의 농도에서 30%의 EtOH에 30분만 처리하여도 약 3 log PFU/mL까지 감소하고 1시간 처리 시와 이보다 높은 농도의 EtOH에서 모두 사멸하여 EtOH 처리에 매우 취약한 것으로 보임. ECP32의 경우 70% EtOH 처리 시 30분까지는 초기농도 대비 약 2 log정도 감소하고, 1시간 처리에는 완전히 사멸하며, 50%의 EtOH 농도에서는 30분정도 처리에도 초기농도 대비 99.8%에 가까운 감소율을 보임.

○ 본 연구실에서 기존에 보유하고 있는 *E. coli* phage 중 선별되었던 4주의 phage에 대해 30%, 50%, 70% EtOH에 각각 30분, 1시간 동안 노출시킨 결과, 먼저 ECP26의 경우 30% EtOH 1시간 처리의 경우를 제외하고는 EtOH의 농도와 상관없이 초기 약 8 log PFU/mL에서 30분 및 1시간 처리에 약 2 log정도의 감소율을 보임. ECP27과 NOECP43의 경우에는 저농도인 30% EtOH 처리에는 1시간 처리 시에도 각각의 초기 농도가 거의 유지되었으며, EtOH의 농도가 높을수록 감소율이 높아짐. NOECP32는 저농도인 30% EtOH에 30분 반응까지는 초기 값이 유지되나, 1시간동안 노출 시 모두 사멸하였으며, 이보다 고농도의 EtOH에서는 30분 안에 모두 사멸하여 EtOH 처리에 대해 다른 phage에 비해 취약함을 알 수 있었음.

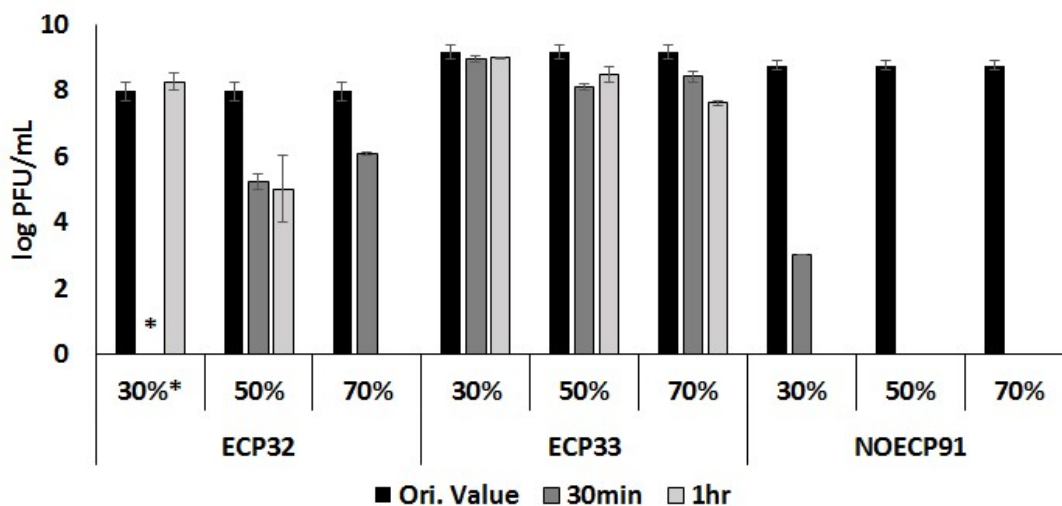
○ 본 연구에서 분리되어 선별된 3주의 phage와 기존에 분리되어 선별된 phage는 다양한 농도의 EtOH 처리에 대해 보통 EtOH의 농도가 높아질수록 안정성이 떨어지는 양상을 보였음. 그 중에 ECP33의 경우가 EtOH에 비교적 가장 안정성이 높아 30% EtOH에는 1시간 처리에도 거의 영향을 받지 않았으며, 70% EtOH 처리에도 1시간 동안 노출 시까지 초기농도 대비 약 9.6%정도의 감소율을 보임. 이에 반해 NOECP32와 NOECP91의 경우 30% EtOH에 30분만 처리까지는 phage가 생존하나, 그 이상의 농도에서는 모두 사멸하여 EtOH 처리에 대해 상대적으로 불안정한 것으로 보였음.

○ 선별된 *S. aureus* phage를 30%, 50%, 70% EtOH에 각각 30분, 1시간 동안 노출시킨 결과, 다양한 농도의 EtOH에 대해 4주의 phage가 다소 다른 양상을 보임. SAP84는 30%, 50%, 70% EtOH에서 모두 유의한 감소율을 보여 유기용매에 대해 매우 불안정함을 보여준 반면 나머지 3

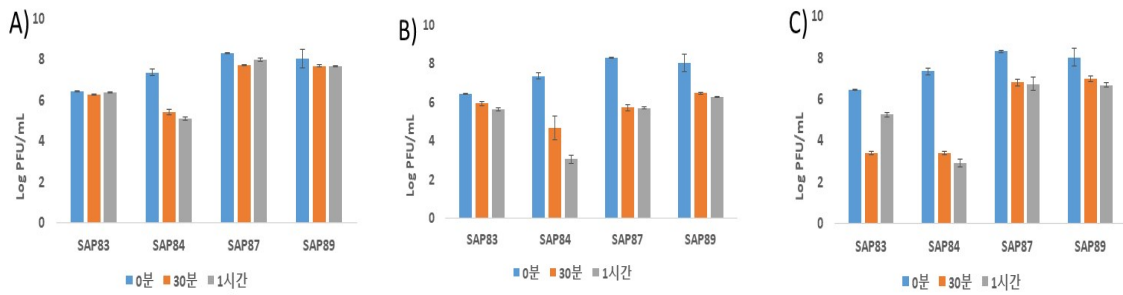
개 phage들은 모두 30% EtOH에서는 역가의 감소 없이 매우 안정함을 보였음. 또한 50% EtOH에서는 SAP83, SAP87, SAP89 3개 phage 모두 역가의 유의한 감소를 보였으나 70% EtOH 처리 시 SAP87과 SAP89는 상대적으로 매우 안정함을 보였고 SAP83은 불안정함을 보였음. 따라서 SAP84는 4개 SAP phage중에서 가장 유기용매에 불안정함을 보였고 SAP87과 SAP89는 상대적으로 안정적임을 보여주었음. 이는 *S. aureus* phage 4종 모두가 같은 *Siphoviridae* 일지라도 유기용매에 대한 안정성이 다르며 구분될 수 있음을 의미함.



[그림] Stability of selected *E. coli* bacteriophage under various EtOH



[그림] Stability of selected *E. coli* bacteriophage under various EtOH



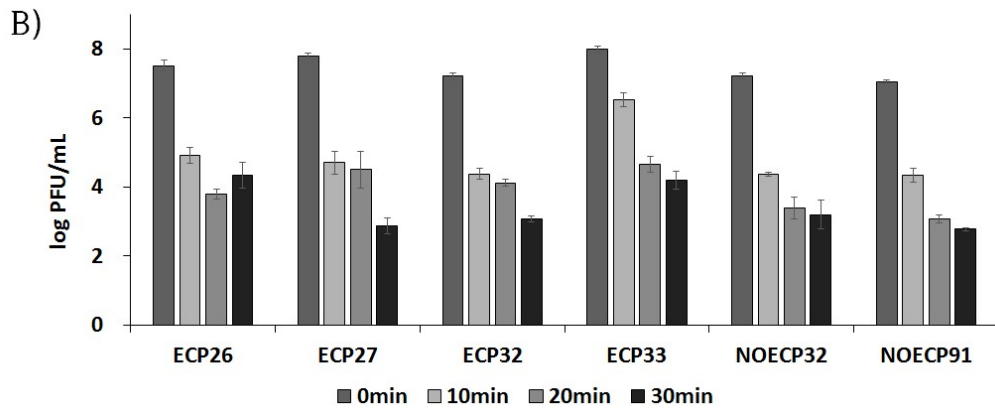
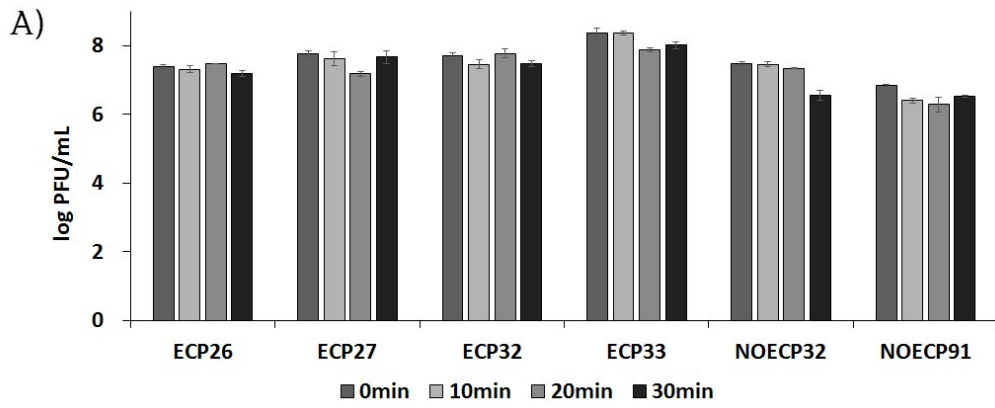
[그림] Stability of selected *S. aureus* bacteriophage under various EtOH
 A) EtOH 30%, B) EtOH 50%, C) EtOH 70%

4. 선별된 박테리오파지들의 차아염소산 처리에 의한 안정성 분석

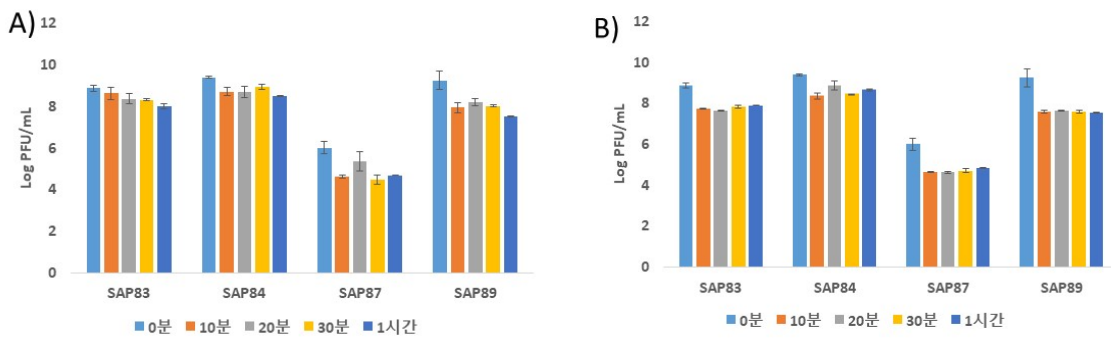
○ 식품에서 대표적인 살균소독제로 이용되는 차아염소산(NaClO)은 일반적으로 바이러스에 대해 200 ppm의 농도로 처리하도록 권장됨. 본 연구에서는 차아염소산에 대한 선별 *E. coli* phage 및 *S. aureus* phage의 안정성을 분석하기 위해 100 ppm, 200 ppm의 농도로 맞춘 1× SM buffer를 제조하였음. 제조한 1× SM buffer와 선별 phage용액을 1:1비율로 혼합하여 최종 50 ppm, 100 ppm 농도의 차아염소산 환경에 노출시켰음. 이후 실온에서 0, 10, 20, 30분 동안 방치한 후 LBC agar에 spot assay를 수행하였음. 37°C에서 24시간 배양한 후 pH 처리를 하지 않은 대조군과 plaque 수를 비교하여 phage의 감소량을 확인하였음.

○ *E. coli* phage의 경우 50 ppm 농도의 차아염소산 환경에서는 30분까지 방치하여도 NOECP32를 제외한 5주의 phage 모두 0.5 log PFU/ml 미만의 감소율을 보여 비교적 안정적임을 확인하였음. NOECP32의 경우에도 30분에서야 약 0.92 log PFU/ml의 감소로 안정적인 편이라 생각할 수 있음. 반면에 100 ppm 농도에서는 30분 방치 시까지 파지별로 3 - 5 log PFU/ml의 감소를 보였으며, ECP26이 약 3.17 log PFU/ml의 가장 낮은 감소율을 보였으며, ECP27은 약 4.94 log PFU/ml로 6주의 phage 중 비교적 차아염소산에 대한 안정성이 떨어지는 것으로 나타남.

○ *S. aureus* phage의 경우 50ppm에서 1시간동안 방치하여도 유의할만한 수준의 역가 감소를 보이지 않아 안정적임을 확인 가능하였고, 100ppm에서 또한 초기역가가 낮아 약 1 log PFU/ml의 감소를 보인 SAP87을 제외하고는 3개 phage 모두 안정적임을 확인할 수 있었음. 따라서 *E. coli* phage들이 *Myoviridae*에 속하는 반면 *S. aureus* phage들이 모두 *Siphoviridae*임을 감안하였을 때 *Siphoviridae*에 속하는 SAP phage들이 좀 더 차아염소산에 안정적일 것으로 사료됨.



[그림] Stability of *E. coli* bacteriophage to NaClO
 A) NaClO 50 ppm, B) NaClO 100 ppm



[그림] Stability of *S. aureus* bacteriophage to NaClO
 A) NaClO 50 ppm, B) NaClO 100 ppm

3절. 바이오필름 형성 조건 수립 및 제어 효과

1. Microplate reader를 활용한 박테리오파지들의 multiplicity of infection (MOI)에 따른 식중독 세균 제어능 평가

○ 바이오필름을 제거하기 위해서는 phage들의 숙주 세균 제어능력을 평가한 이후 바이오필름 처리를 위한 파지 처리 조건을 수립하여야함. 따라서 *E. coli* phage 7종 및 *S. aureus* phage 4종의 식중독 세균에 대한 제어능을 평가하기 위해 여러 가지 MOI 조건 및 phage cocktail 조건으로 식중독 세균에 phage를 접종하여 흡광도를 통해 제어능을 평가하였음.

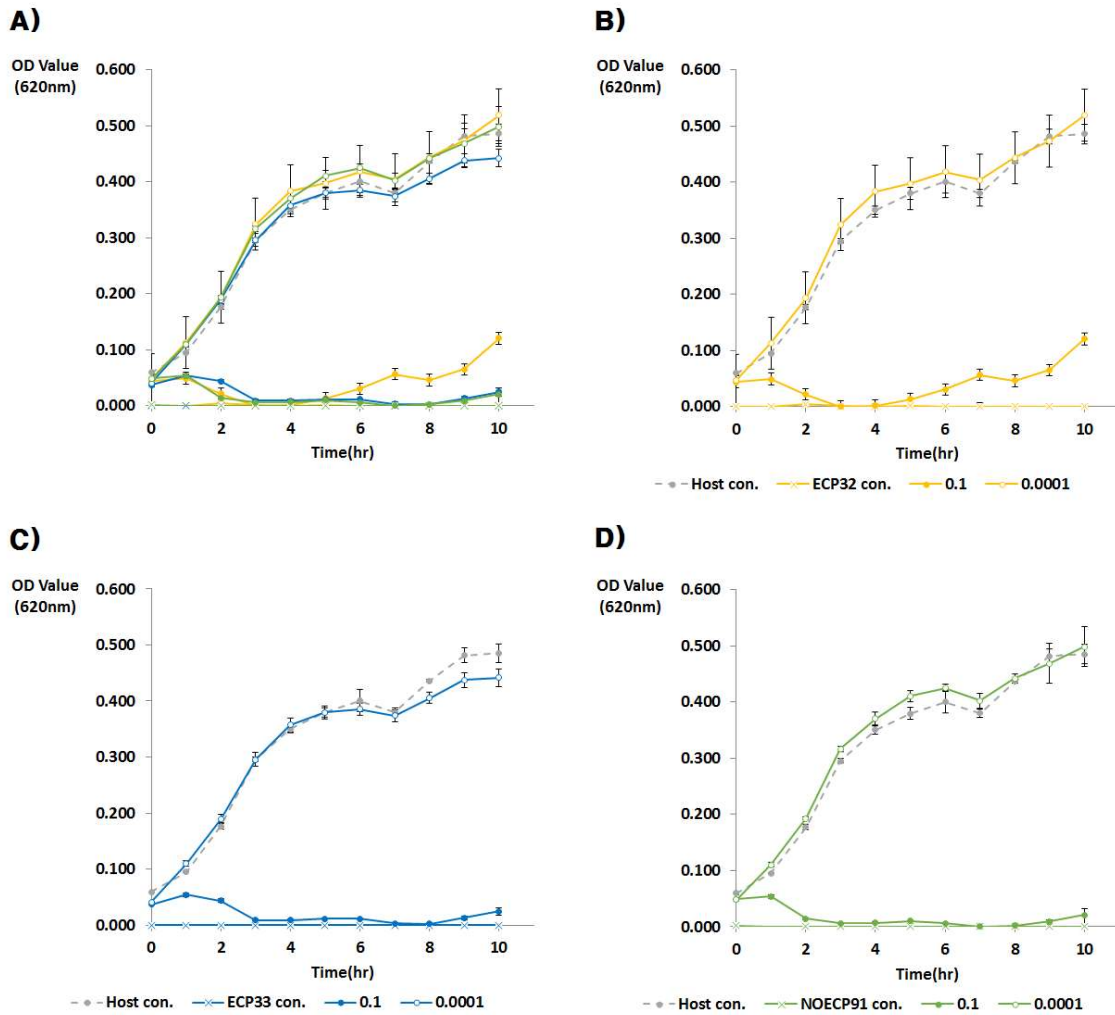
○ 선별된 *E. coli* phage에 의한 *E. coli*의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 200 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 대수 증식까지 배양한 *E. coli* 3주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934, *E. coli* O103 NCCP 13937)를 개별로 접종함. 여기에 선별된 phage 3주를 각각 0.1과 0.0001 수준의 MOI가 되도록 접종한 후 37°C의 배양기에 150rpm으로 교반하며 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정함. 3주의 phage를 혼합한 phage cocktail solution을 각 *E. coli* 균주에 접종하여 같은 방법으로 흡광도를 측정함.

○ 96-well count plate 상에서 분리한 *E. coli* phage에 의한 *E. coli*의 생육억제를 10시간 동안 알아본 결과는 3주의 *E. coli* type strain에 대해 MOI 0.1과 0.0001의 두 가지 MOI 조건으로 실험하였으나, MOI 0.0001의 경우에는 개별파지 및 phage cocktail 모두 표적으로 삼았던 3주의 *E. coli* control과 유사하거나 20% 미만의 낮은 감소율을 보여 생육제어가 되지 않았음.

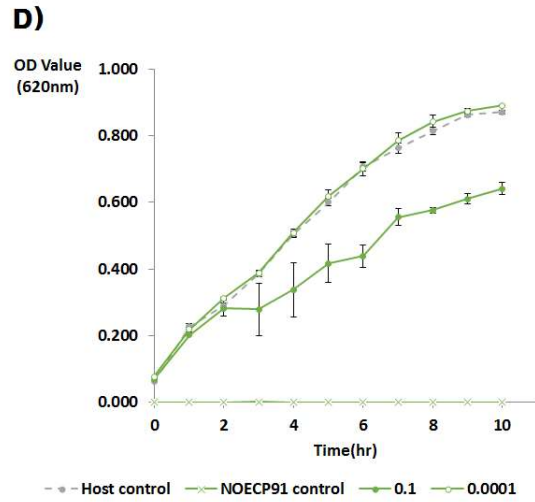
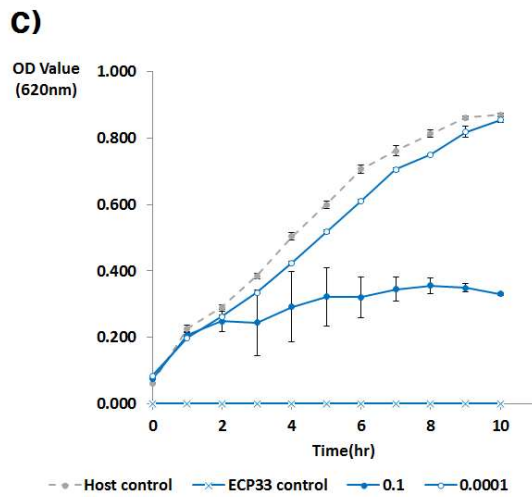
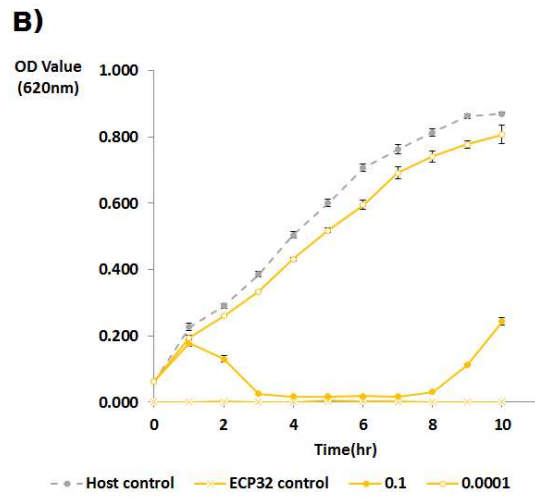
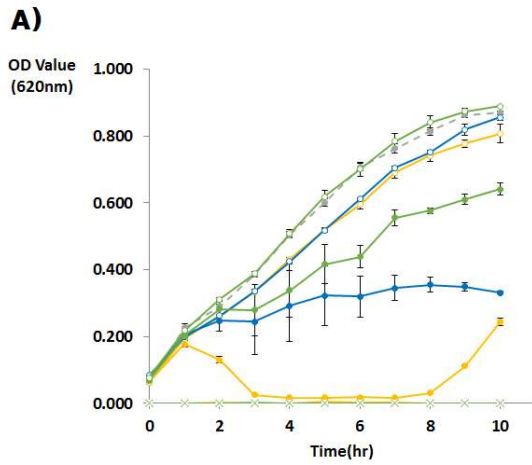
○ ECP32의 경우, MOI 0.1 수준에서 타깃 균주별로 생육제어능이 다소 상이하였음. *E. coli* NCCP 13930, *E. coli* NCCP 13934 균주에 대해서는 lysis가 일어나는 1시간 시점부터 흡광도가 감소하기 시작하여 13930 균주의 경우 4시간까지 0에 가까운 수치를 보이다 이후부터 흡광도가 서서히 증가하여 host strain이 resistant하게 변하였음. 13934 균주의 경우, 배양 후 8시간까지는 0에 가까운 수치로 생육이 제어되었으나 이후 급격하게 host strain이 resistant하게 변하는 것으로 보임. 또한 *E. coli* NCCP 13937 균주에 대해서는 MOI와 상관없이 host control과 흡광도가 똑같이 상승하여 거의 제어가 안 되는 것으로 보였으며, 4시간 이후에서야 점점 host control에 비해 감소하여 10시간 배양 시 약 15% 정도의 감소율을 보임.

○ ECP33의 경우, O157:H7 균주인 *E. coli* NCCP 13930에 대해서는 10시간 배양 시까지 0에 가까운 수치를 보이며, 이때의 감소율이 약 94.9%인 것으로 나타남. 이에 대조적으로 Non-O157 균주인 *E. coli* NCCP 13934와 *E. coli* NCCP 13937의 경우 host control 대비 생육제어가 되긴 하나, 초기에 접종한 균수 수준으로 유지되거나 약하게 생육함. 10시간 배양 시 각각의 균에 대해 약 69.1%, 약 75.2%의 감소율을 보였음.

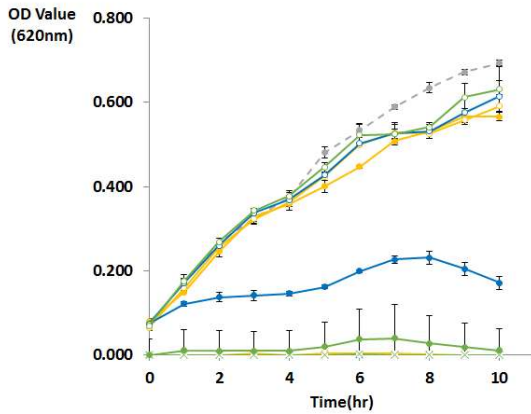
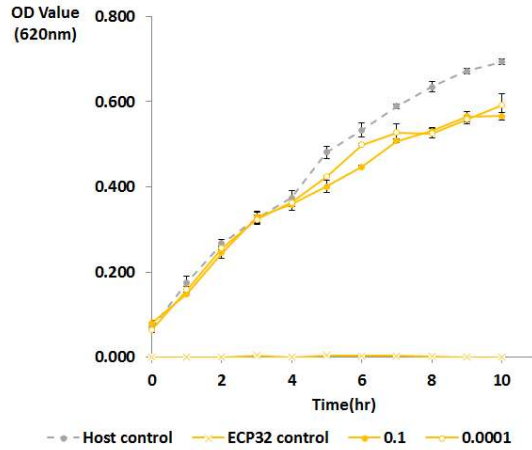
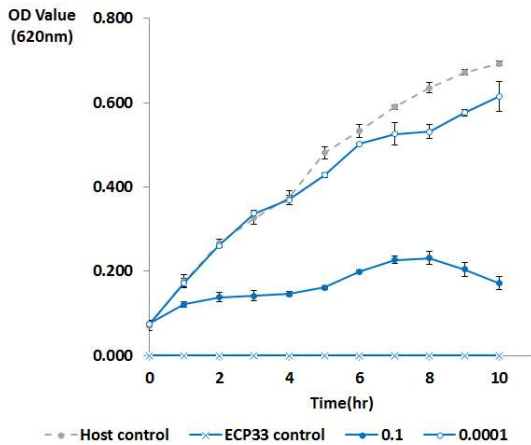
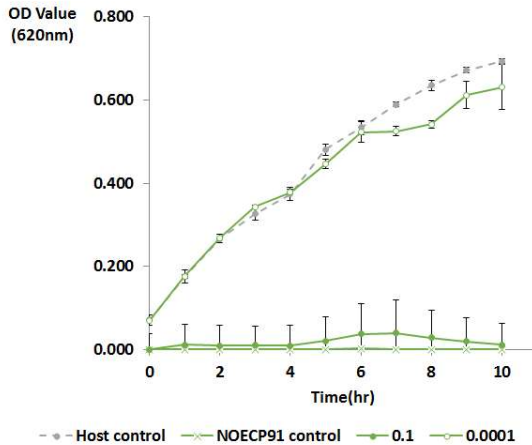
○ NOECP91의 경우, *E. coli* NCCP 13930과 *E. coli* NCCP 13937 균주에 대해서는 10시간 배양 시까지 흡광도가 0에 가까운 수치를 보여 이때의 감소율이 각각 약 95.8%, 약 98.4%로 다른 파지들에 비해 더 효과적으로 제어가 가능할 것으로 보임. 반면에 *E. coli* NCCP 13934의 경우 같은 시간대의 ECP33보다도 흡광도 수치가 높고 10시간 배양 시의 감소율이 약 26.3% 정도로 13934 균주에 대한 생육억제능이 약한 것으로 판단됨.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O157:H7) NCCP 13930
 A) Total data, B) ECP32, C) ECP33, D) NOECP91
 0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O179) NCCP 13934
 A) Total data, B) ECP32, C) ECP33, D) NOECP91
 0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001

A)**B)****C)****D)**

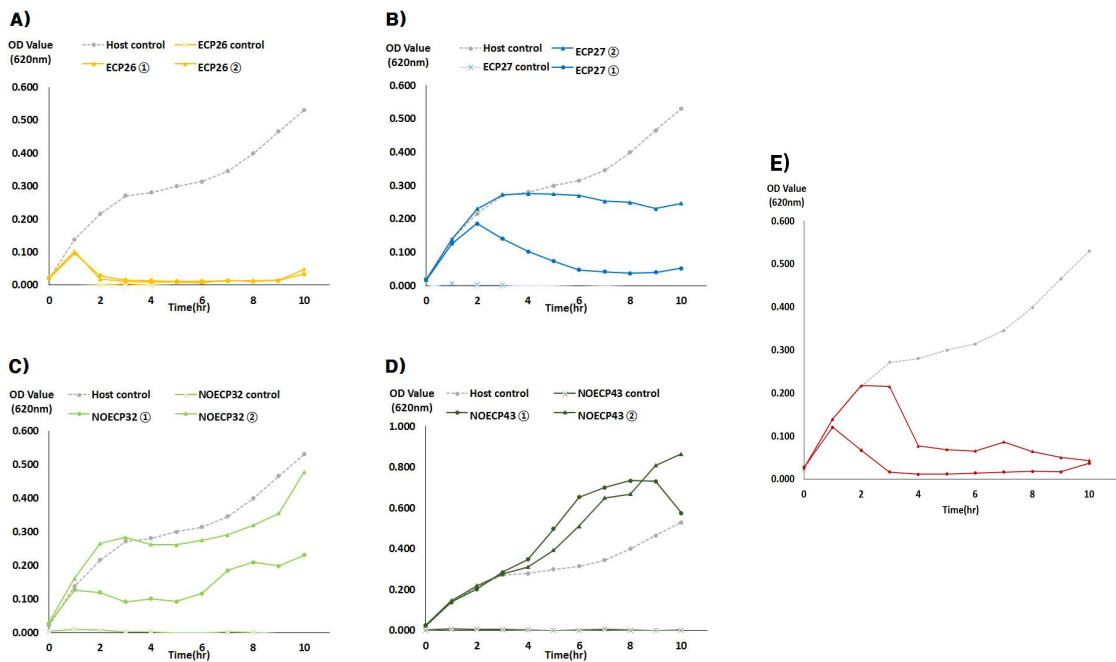
[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O103) NCCP 13937

A) Total data, B) ECP32, C) ECP33, D) NOECP91

0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001

○ 즉, MOI 0.1 수준에서 개별 파지의 생육제어 정도를 살펴본 결과, 같은 phage를 처리한 경우라도 host strain 별로 생육억제 정도가 상이하였음. 또한 단독으로 처리한 경우보다 phage cocktail 형태로 처리할 경우 각각의 host strain에 대해 개별파지 처리 시 가장 제어가 잘 되었던 파지의 제어 정도와 유사한 패턴으로 장시간동안 균의 생육을 제어하였으며, 이는 infection이 잘되는 파지가 막을 뚫으면서 infection이 잘 안 되는 파지들의 유입을 보다 쉬게 해주어 cocktail 제조 시 개별 파지의 농도는 낮아짐에도 가장 제어능이 높았던 파지의 패턴과 유사하게 나오는 것이라 사료됨. 특정 균에 대해 제어능이 많이 떨어지는 파지가 섞였을 경우에도 해당 파지를 단독으로 처리하였을 때보다는 높은 감소율을 보임. 따라서 위생처리제 등의 phage application 기법에 단독 파지보다 cocktail을 사용하는 것이 더 다양한 균에 대해 효과적으로 작용할 것으로 보임.

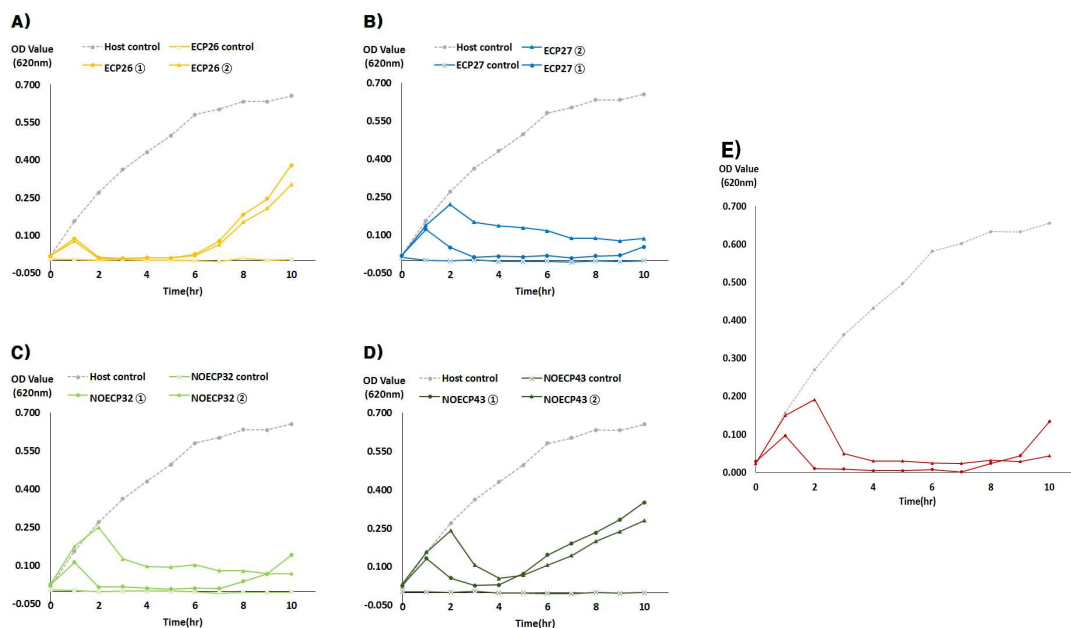
○ 선별 phage 중에서 4주의 phage로 *E. coli* 2주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934)에 대해 개별 phage 및 4주의 phage를 혼합한 cocktail solution을 각각 MOI 0.01과 0.0001 수준이 되도록 접종한 후 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 620nm에서 흡광도를 측정한 결과, phage마다 그 감소율은 다르나, 같은 strain에 대해 본 연구에서 선별된 3주의 phage와 달리 MOI 0.0001 수준에서도 *E. coli*의 생육이 제어되었음. 개별 파지별 결과로는 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930에 ECP26의 경우 9시간까지 흡광도가 0에 가까운 수치를 보였으며, 이 때 MOI 0.01 수준에서 약 93.7%, MOI 0.0001수준에서 약 91.0%의 감소율을 보여 해당 균주에 대한 생육제어능이 매우 강함을 알 수 있었음. ECP27의 경우도 ECP26보다는 약하지만 10시간 배양 시에 MOI 0.0001 수준에서도 흡광도가 control 대비 절반가량으로 53.5%의 감소율을 보임. *E. coli* O179 NCCP 13934균주의 경우 ECP27과 NOECP32가 장시간동안생육 제어가 이루어졌으며, 상대적으로 ECP26은 6시간, NOECP43은 4시간 정도 만에 host strain이 resistant하게 변하였음. phage cocktail의 경우 역시나 개별 파지 처리 시 가장 제어능이 뛰어난 파지의 생육억제 정도와 유사하거나 강하게 제어됨을 볼 수 있었음.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O157:H7) NCCP 13930

A) ECP26, B) ECP27, C) NOECP32, D) NOECP43, E) Phage cocktail

①: MOI 0.01, ②: MOI 0.0001



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O179) NCCP 13934
 A) ECP26, B) ECP27, C) NOECP32, D) NOECP43, E) Phage cocktail
 ①: MOI 0.01, ②: MOI 0.0001

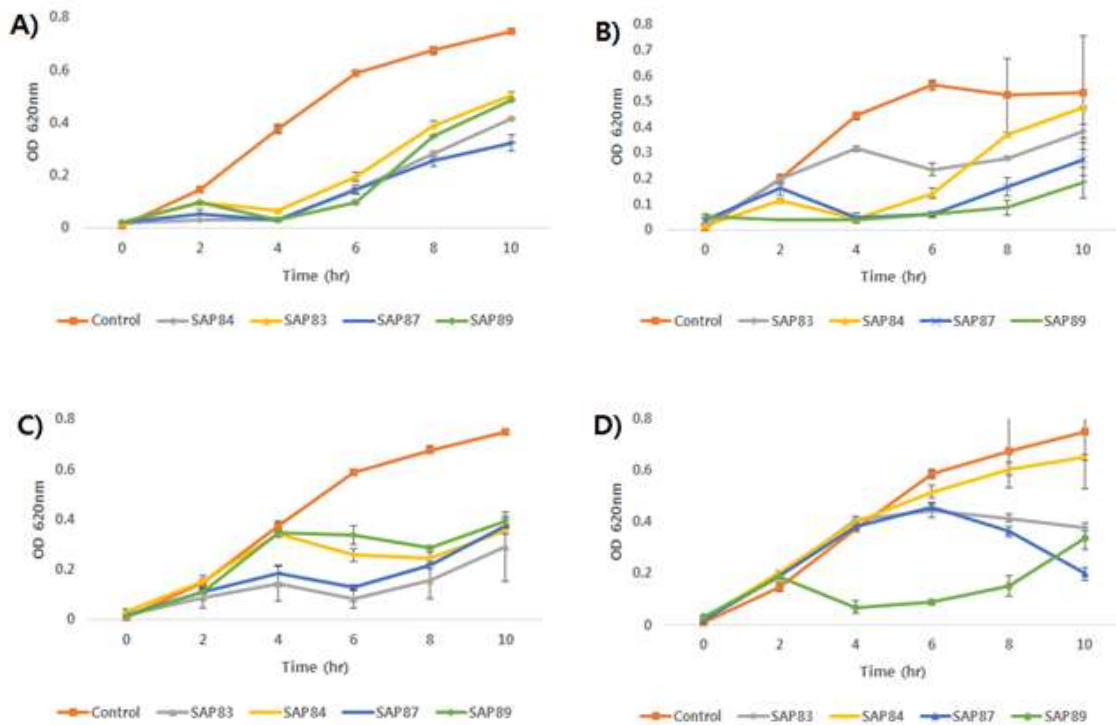
○ 선별 phage 중에서 4주의 phage로 *E. coli* 2주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934)에 대해 개별 phage 및 4주의 phage를 혼합한 cocktail solution을 각각 MOI 0.01과 0.0001 수준이 되도록 접종한 후 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 620nm에서 흡광도를 측정된 결과, phage마다 그 감소율은 다르나, 같은 strain에 대해 본 연구에서 선별된 3주의 phage와 달리 MOI 0.0001 수준에서도 *E. coli*의 생육이 제어되었음. 개별 파지별 결과로는 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930에 ECP26의 경우 9시간까지 흡광도가 0에 가까운 수치를 보였으며, 이 때 MOI 0.01 수준에서 약 93.7%, MOI 0.0001수준에서 약 91.0%의 감소율을 보여 해당 균주에 대한 생육제어능이 매우 강함을 알 수 있었음. ECP27의 경우도 ECP26보다는 약하지만 10시간 배양 시에 MOI 0.0001 수준에서도 흡광도가 control 대비 절반가량으로 53.5%의 감소율을 보임. *E. coli* O179 NCCP 13934균주의 경우 ECP27과 NOECP32가 장시간동안생육 제어가 이루어졌으며, 상대적으로 ECP26은 6시간, NOECP43은 4시간 정도 만에 host strain이 resistant하게 변하였음. phage cocktail의 경우 역시나 개별 파지 처리 시 가장 제어능이 뛰어난 파지의 생육억제 정도와 유사하거나 강하게 제어됨을 볼 수 있었음.

○ 선별된 *S. aureus* phage 4종에 의한 *S. aureus*의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 180 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 Stationary phase까지 배양한 *S. aureus* 2주(*S. aureus* KCTC 1621, *S. aureus* RN4220)를 개별로 10 μ l씩 접종하였다. 여기에 선별된 phage 4주를 각각 10,000과 0.0001 수준의 MOI가 되도록 접종한 후 37°C의 온도로 배양기에 150rpm으로 진탕 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 10시간동안 UV-spectrophotometer를 이용하여

620nm에서 흡광도를 측정하였다. 37°C에서의 실험결과는 다음 그림과 같다.

○ *S. aureus* KCTC 1621에 대해서는 MOI 10000 조건에서, 4개의 phage 모두 약4시간까지는 생육 억제능을 보이다가, 6시간부터 조금씩 Resistance가 나타나기 시작해 10시간에서는 약 30% 정도로 생육억제능이 크게 떨어짐을 확인 가능 했다. MOI 0.0001 조건에서는 SAP83의 경우 2시간까지 생육억제능이 나타나지 않다가 Control과 비교하였을 때 4시간부터 10시간 까지 약 25%정도의 생육억제능을 나타내었다. 반면 나머지 3개 phage들은 4시간까지 resistance가 나타나지 않다가 6시간부터 resistance가 나타나기 시작하였으며, 10시간에서는 정도의 차이는 있으나 모든 phage들에서 resistance가 나타남을 확인가능 했다.

○ *S. aureus* RN4220에 대해서는 MOI 10000 조건에서, SAP83을 제외한 3개 phage들 모두 4시간까지는 resistance를 보이지 않다가, 6시간부터 resistance가 서서히 나타나기 시작하였다. SAP83 접종 실험군은 4시간에서 OD value가 다른 phage 접종시보다 높게 나타났는데, 이는 SAP83의 *S. aureus* RN4220에 대한 생육억제능이 다른 phage에 비해 떨어지기 보다는, SAP83의 latent period가 길기 때문에 나타나는 특성이라고 추측된다. 반면 MOI 0.0001 조건에 대해서는 SAP89를 제외하고는 생육억제능이 떨어지는 것으로 확인되었는데, SAP89의 경우, *S. aureus* RN4220 균주에 대해 높은 EOP(Efficiency of phage)를 가지는 것으로 확인되었기 때문에 MOI1000, MOI 0.0001 조건 모두에서 높은 생육억제능을 가지는 것으로 생각되고, 다른 3개 phage들은 SAP89에 비해 *S. aureus* RN4220 균주에 대한 EOP가 낮기 때문에 이와 같은 결과를 보인 것으로 생각된다. 하지만 이와 같이 두 가지 균주에 대해 두 가지 MOI 조건으로 phage를 처리하였을 때, 모두 10시간에 도달하였을 때, resistance가 나타난 것을 관찰할 수 있었다. 또한 *E. coli*에 생육억제 실험과 비교하였을 때, *S. aureus*에 대한 생육억제는 MOI나, 시간적으로 고려하였을 때, 경제적으로 비효율적인 것으로 관찰되었음. 이에 따라 *S. aureus*의 생육저해는 특히 개별적으로 phage를 처리하여 균의 성장을 억제하기보다는 cocktail로 phage를 혼합하여 처리하는 것이 균의 생육억제에 있어 더 큰 효과를 얻을 것으로 사료됨.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *S. aureus* at 37°C
 A) *S. aureus* KCTC 1621 (MOI 10000) B) *S. aureus* RN4220 (MOI 10000)
 C) *S. aureus* KCTC 1621 (MOI 0.0001) D) *S. aureus* RN4220 (MOI 0.0001)

2. 2종 식중독세균의 바이오필름 형성 조건 수립

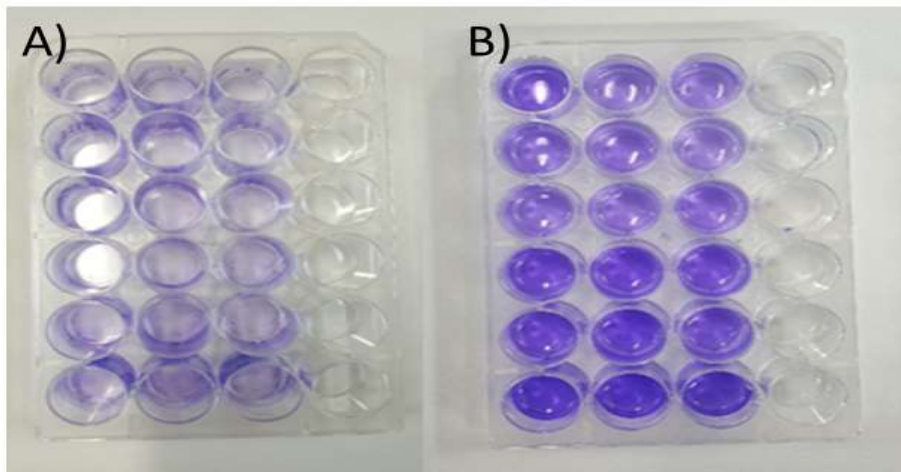
○ 파지처리에 따른 바이오필름 제거능 평가에 앞서 바이오필름의 형성 조건 확인과 형성이 되었는지를 확인하기 위해, 24-well microplate, glass wool, 2가지 소재를 사용하여 바이오필름의 형성을 확인하였으며 biofilm 형성 균주로는 *E. coli* NCCP 13937와 *S. aureus* RN4220을 사용하였음.

○ 24-well microplate에 *E. coli* 의 바이오필름을 형성하기 위해서 24-well plastic plate assay를 수행함. TSB 10 ml에 *E. coli* 및 *S. aureus*를 접종하여 37°C overnight 배양된 bacteria와 배양액을 TSB에 1:100으로 희석시켜 2승수 낮아진 *E. coli*를 24-well tissue culture test plate의 각 well에 2 ml 접종하였음. 24시간동안 배양된 24-well microplate에서 부유세균과 배양액을 완전히 제거한 후 PBS buffer를 각 well에 분주하여 washing을 3회 실시하여 biofilm 이외의 물질들을 세척하였음. 이후 1시간 동안 60°C에 건조하여 biofilm을 표면에 완전히 부착 시켰고, 부착이 완료되면 crystal violet solution으로 30분 동안 착색하였음. 이 후 PBS buffer를 분주하여 완전히 제거하는 과정을 2번 반복하여 착색되지 않은 crystal violet solution을 제거한 뒤 99%

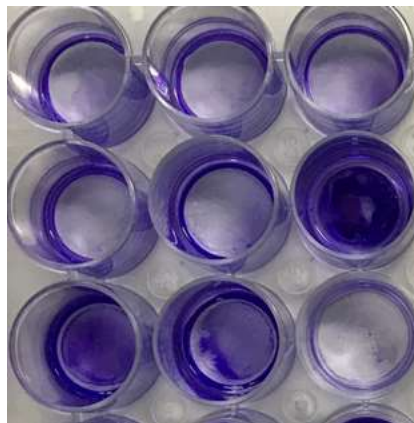
EtOH로 crystal violet을 석출한 plate를 확인하였음.

○ Glass wool에 biofilm을 형성시키기 위해 0.2g의 glass wool을 잘라, 멸균하여 100mL 삼각플라스크에 넣고 LBC 50mL과 37°C에서 overnight 배양한 *E. coli* NCCP 13937 및 *S. aureus* RN4220을 100 μ l 접종하고 30°C에서 72시간 동안 배양한 뒤 glass wool을 멸균된 forcep으로 꺼내어 증류수 100mL이 담긴 bottle에 넣고 5분간 교반하여 세척하였음. 이후 petri dish에 옮겨 1시간동안 자연건조 시킨 뒤, 1% crystal violet으로 30분간 염색한 뒤 멸균수로 염색약을 세척하고 건조하여 염색된 부분을 광학현미경을 이용해 관찰하였음.

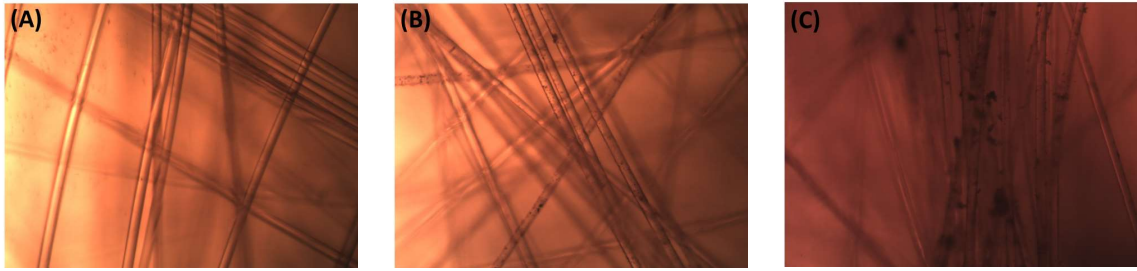
○ 실험결과 *E. coli*와 *S. aureus*의 biofilm이 microplate 및 glass wool상에 확실하게 형성되었으며 형성 이후 phage를 이용하여 제어효과를 확인할 수 있을 정도의 양임을 육안으로 확인하였음.



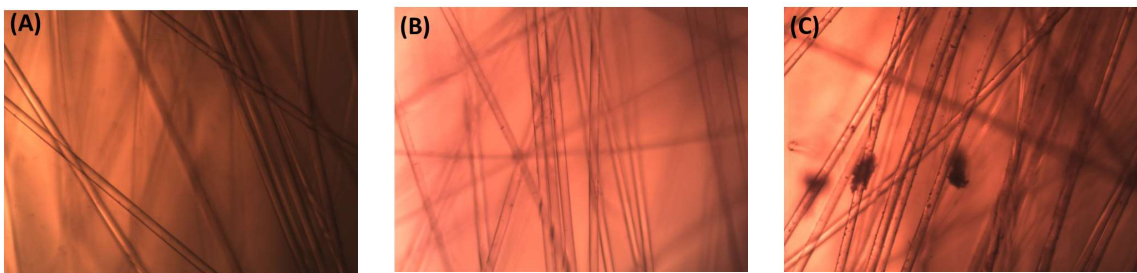
[그림] Biofilm of *E. coli* NCCP 13937 on the 24-well microplate at 30°C
A)Before treatment EtOH, B)After treatment EtOH



[그림] Biofilm of *S. aureus* RN4220 on the 24-well microplate at 30°C



[그림] *E. coli* NCCP 13937 biofilm on the surface of glass wool(X1000)
A) 0hr, B) 24hr, C) 72hr



[그림] *S. aureus* RN4220 biofilm on the surface of glass wool(X1000)
A) 0hr, B) 24hr, C) 72hr

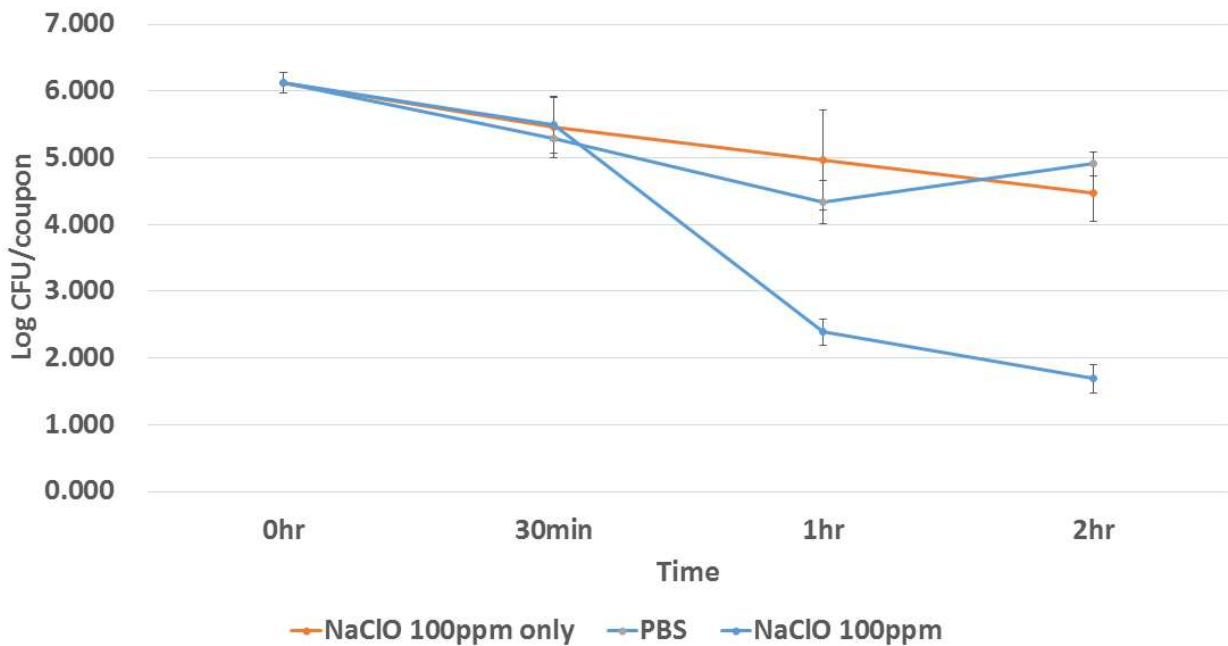
3. 박테리오파지 처리에 따른 바이오필름 저감화

○ 실질적으로 박테리오파지만을 사용하여 표면 및 여러 소재에 존재하는 식중독세균 유래 바이오필름을 제거하는 것은 매우 어려움 일임. 따라서 효율적인 박테리오파지와 다른 저감화 소재를 혼합 사용하는 것이 필요함. 본 실험에서는 식품대상 바이오필름 저감화를 위한 혼합소재로 차아염소산나트륨을 선정하여 선별한 박테리오파지들의 cocktail과 함께 실제 신선 농식품에 적용하는 실험을 진행하였음.

○ 양상추에 바이오필름을 형성하기 위해 양상추의 바깥 껍질을 3회 이상 벗긴 후 물로 세척하고 EtOH 70%로 15분간 담가 소독함. 이후 2cmX2cm로 양상추를 자르고 Lamina flow에서 UV를 쬐는 상태로 1시간동안 건조시킴. 이후 overnight culture한 *E. coli* NCCP 13937 균주를 30°C에 24시간동안 정치배양 시킴. 정치배양이 끝나면 양상추 조각들에 바이오필름 이외에 부유하고 있는 세균을 없애기 위해 PBS용액에 담근 뒤 5분간 교반시켜 세척했음. 양상추의 세척이 끝나면 혼합액 소재, 혼합액, cocktail 용액, PBS용액에 일정시간동안 반응시킨 뒤, 25mL의 saline이 담긴 stomaching bag에 넣고 3분간 high speed로 stomaching 해주었음. 이후 파쇄액을 EMB agar에 십진희석을 통해 희석한 후 도말해준 뒤 37°C에서 overnight 배양한 plate를 viable cell count

를 통해 계수하여 결과를 비교하였음.

○ 실험 결과 phage cocktail 30분 처리 후 PBS를 처리한 결과에서는 약 1.2 Log CFU 정도의 감소효과가 나타났고 NaClO 100ppm 단독처리 결과 2시간에서 1.5Log CFU/coupon 정도의 감소효과가 나타남을 확인하였음. 반면 phage cocktail을 30분 선 처리 후 NaClO 100ppm을 후 처리 하였을 때 4.2Log CFU/coupon의 바이오필름 감소효과를 확인할 수 있었고 이는 매우 유의할만한 수준의 값 변화라고 판단됨($p < 0.05$). 따라서 실험결과를 응용해 병원성 *E. coli*의 biofilm을 제어하는데 NaClO와 phage를 적절히 교차 처리 한다면 높은 수준의 sanitizing 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료됨.



[그림] Effect of reducing biofilm using phage cocktail and NaClO on lettuce for 2hr

제5장. 박테리오파지에 대한 분자생물학적 특성 연구 및 위생 처리제 응용 연구

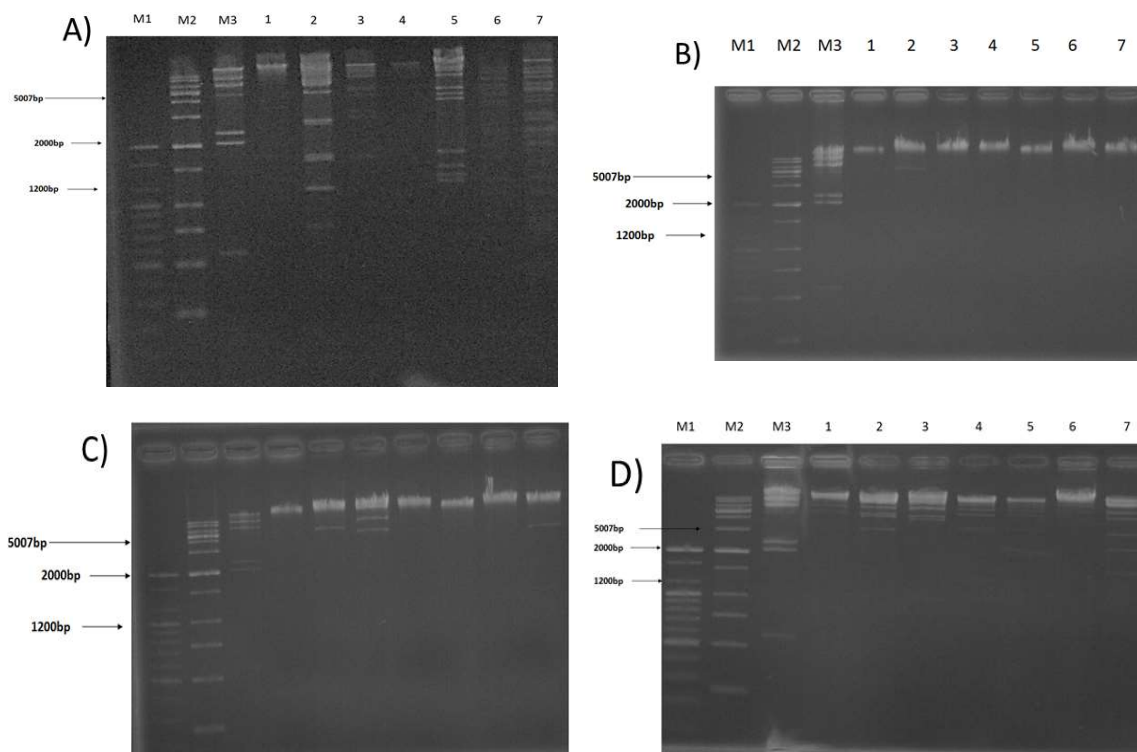
1절. 분리된 박테리오파지에 대한 유전체 분석 등의 분자 생물학적 연구

1. 박테리오파지의 DNA 특성

○ 박테리오파지의 DNA 특성 분석을 위해서 7주의 *E. coli* phage들을 LBC broth를 이용한 liquid lysate 과정을 통해 증식시킨 후 20% PEG solution(8000w, Orange)을 이용해 약 10-11 PFU/mL 수준으로 농축시켜 DNA extraction kit(NORGEN)을 이용해 DNA를 추출하였음.

○ 분리된 *E. coli* phage DNA를 Takara사에서 제조된 제조한 제한효소를 사용하여 절단하였으며, 사용한 제한효소는 *EcoRI*, *NotI*, *PstI*, *SmaI* 4가지를 사용하였음. DNA 농도 측정 후 약 200~300ng/uL의 phage DNA당 1ul/10U의 활성을 가지는 제한효소 1ul를 buffer와 함께 처리하여 제한효소의 최적온도에 1시간동안 반응시킨 후 전기영동을 수행하여 잘려진 DNA 밴드 패턴을 확인하였음.

○ 그 결과, *EcoRI*에 의해 7주의 모든 phage DNA가 절단 되었고, ECP26과 ECP33을 제외한 모든 파지들의 절단 패턴이 확연하게 다름을 확인할 수 있었다. *PstI*에 의해 ECP27의 DNA만이 절단되었고 나머지 6종의 phage DNA에서는 절단패턴을 확인할 수 없었음. *NotI*에 의해 7주의 phage DNA중 ECP27, ECP32, NOECP91만이 절단되었고 나머지 4종의 phage DNA에서는 절단패턴을 확인할 수 없었음. *SmaI*에 의해 7주의 모든 phage DNA가 절단 되었고, 모든 phage들의 절단패턴을 분석결과 ECP33과 NOECP43을 제외한 phage들은 모두 다른 phage임이 확인되었음. 따라서 4가지 제한효소에 의한 패턴 분석결과 7주의 용균성 파지들이 모두 *Myoviridae*에 속함에도 불구하고 서로 다른 phage임을 확인할 수 있었음.

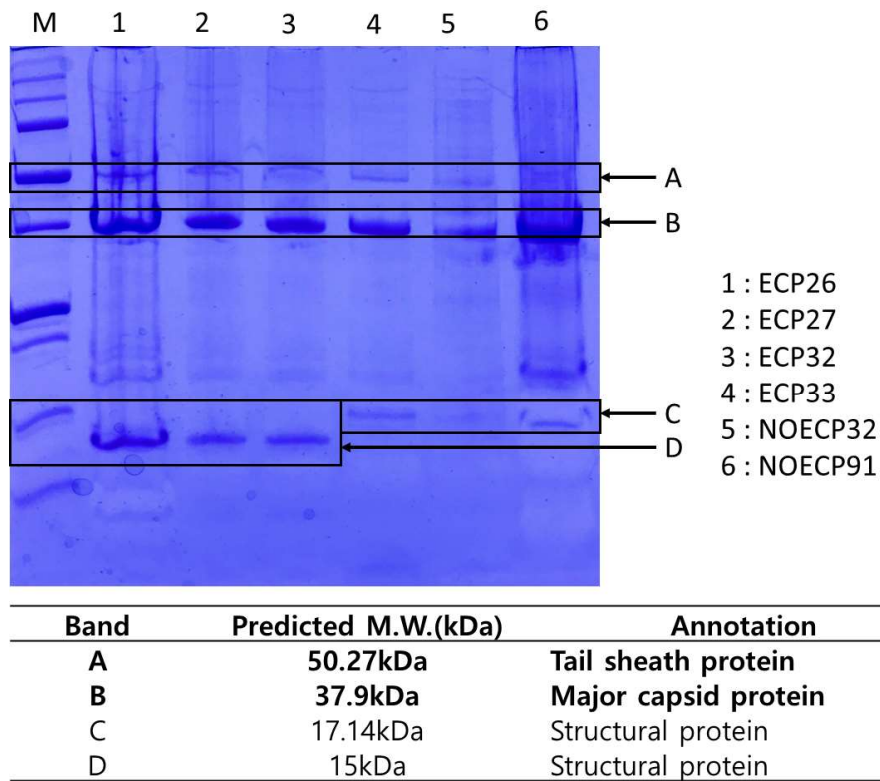


[그림] The pattern of digested phage DNA by restriction enzyme. A) *EcoRI* B) *PstI* C) *NotI* D) *SmaI*.

2. 박테리오파지의 구조단백질 분석

○ *E. coli* phage의 구조 단백질 패턴을 분석하기 위해 Tricine SDS-PAGE gel을 이용하였음. 약 9-10 log PFU/mL 수준으로 농축 및 정제된 bacteriophage 용액 16 μ L와 5x sample buffer (T&I, Korea) 4 μ L를 혼합하여 끓는 물에서 10분간 반응시킨 후 Tricine SDS-PAGE gel을 이용하여 120V에서 60분간 전기영동 하였음. 그 후 염색시약 (0.2% w/v Coomassie blue(R-250, T&I), 10% acetic acid, 50% CH₃OH, 40% D.W)으로 염색하고, 탈색 시약(40% MtOH, 10% acetic acid, 50% D.W)로 탈색하여 단백질 패턴을 분석하였음.

○ ECP26과 NOECP91 모두 37kDa의 위치에서 공통의 굵은 band가 확인되었으며, 37kDa의 band는 Stevens 등(2016)의 연구와 비교해 보았을 때 Major capsid protein인 것으로 사료됨. ECP33을 제외한 ECP phage 계열은 대개 비슷한 pattern을 보였으며, ECP33과 NOECP는 거의 비슷한 단백질 pattern을 보였음. 또한 1-3 lane과 4-6 lane은 10kDa에서 20kDa 사이에서는 상이한 band 패턴을 보여 주었는데, 이는 선별된 *E. coli* phage들이 *Myoviridae* family에 속하더라도 다른 구조 단백질을 가지고 있을 수 있다는 것을 보여 주며 이와 관련해 Renata 등(2018)은 같은 종에 속하는 균을 숙주로 하는 *Myoviridae* family에 속하는 파지더라도 상이한 구조 단백질을 가질 수 있다고 보고한 바 있음.



[그림] Proteomic analysis of *E. coli* infecting phage structural proteins using SDS-PAGE

3. 박테리오파지의 Genome sequence analysis

○ *E. coli* phage 7주중 가장 host spectrum이 넓은 ECP26과 ECP32 두 phage의 whole genome sequencing을 통해 genome analysis를 실시하였음.

○ 그 결과, ECP26 phage는 136,993 bp의 크기를 갖고 있었으며, 약 43.59%의 G+C contents임을 확인하였으며, 214개의 open reading frame(ORFs)를 보유하고 있음을 확인하였고 tRNA는 5개 보유하고 있음을 확인하였다. ECP32 phage는 133,317 bp의 크기를 갖고 있었으며, 약 43.69%의 G+C contents임을 확인하였으며, 200개의 open reading frame(ORFs)를 보유하고 있음을 확인하였고 tRNA는 6개 보유하고 있음을 확인하였음.

○ ECP26과 ECP32의 ORF들을 NCBI BLASTP를 이용하여 분석한 결과 rv5-like phage의 ORF와 매우 높은 유사성을 보였다. 또한 rv5-like phage의 여러 가지 특징을 발견하여 ECP26과 ECP32가 rv5-like phage에 속함을 확인함. rv5-like phage는 *Myoviridae* phage에 속하며, Host spectrum이 매우 넓은 것이 특징이며, Host의 세포벽을 분해하는 Endolysin의 경우 Lambda phage의 Endolysin과 매우 유사한 lysozyme superfamily에 속하는 것으로 알려져 있음. 하지만 rv-5 like phage가 분류되기 시작한 것은 얼마 되지 않았으며 규명되지 않은 ORF들이

대부분인 것으로 알려져 있음. 이에 따라서 연구에서 확인된 ECP26과 ECP32의 genome sequence에 대한 내용을 바탕으로 rv5 like phage의 기능에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료됨.

[표] Whole genome sequence results of *Escherichia coli* phage

Bacteriophage	Host	Predicted ORFs	Genome size	G+C	tRNA
ECP26	<i>E. coli</i> <i>NCCP13930</i>	214	136,993 bp	43.59%	5
ECP32	<i>E. coli</i> <i>NCCP13930</i>	200	133,317 bp	43.69%	6

○ 추가적으로 본 연구실에서 보유하고 있는 *S. aureus* phage 중 Whole genome sequencing 이후 contig 조합까지 완료된 phage인 SAP8에 대해 BLASTP를 기반으로 한 genome annotation을 진행함.

○ SAP8의 총 genome size는 45,553 bp 였고 64개의 ORF를 가지는 동시에 tRNA는 가지고 있지 않은 것으로 확인되었음. 64개의 ORF 중 31개가 기능을 알 수 없는 hypothetical gene으로 판별되었고, Encoding region은 92.77% 이며 G+C content는 33.41%로 확인되었음. Annotation 결과 cell wall과 cell membrane을 target으로 하는 endolysin과 holin 유전자가 확인되었으며, lysogenicity에 관여하는 transcription regulator들과 host 유래 독소 유전자들이 확인되었기 때문에 temperate phage인 것으로 확인이 가능하였음.

[표] Functional group of ORF in phage SAP8 and homology to proteins in the NCBI database determined by BLASTP

Group	Locus_tag	Function	Annotation source	Accession no.	E-value
Structure	SAP8_00005	putative phage capsid protein	Staphylococcus haemolyticus	CPL66138.1	0
	SAP8_00006	phage gp6-like head-tail connector protein	Terrabacteria group	WP_000050973.1	1.00E-59
	SAP8_00010	tail protein	Terrabacteria group	WP_000807536.1	5.00E-154
	SAP8_00011	major tail protein	Staphylococcus phage vB_SauS_phi2	YP_009204267.1	2.00E-102
	SAP8_00014	tail tape measure protein	Staphylococcus phage phiSa2wa_st72	AUM58008.1	0
	SAP8_00015	phage tail family protein	Staphylococcus aureus	WP_001190534.1	0
	SAP8_00016	peptidase	Staphylococcus aureus	WP_117207238.1	0
	SAP8_00018	minor structural protein	Bacilli	WP_000429558.1	0
Packaging	SAP8_00001	terminase	Staphylococcus	WP_000778933.1	9.00E-67
	SAP8_00002	terminase large subunit	Staphylococcus aureus	WP_050974185.1	0
	SAP8_00003	phage portal protein	Staphylococcus	WP_001100665.1	0
	SAP8_00004	portal protein	Staphylococcus aureus	CFS39571.1	0
DNA manipulation	SAP8_00025	Integrase site-specific integrase	Staphylococcus aureus	WP_016060005.1	0
Host lysis	SAP8_00024	CHAP domain-containing protein	Staphylococcus	WP_000930258.1	0
	SAP8_00023	holin, SPP1 family	Staphylococcus aureus subsp. aureus 21304	EZH96359.1	1.00E-66
DNA regulation	SAP8_00026	ATPase	Staphylococcus aureus	WP_111014752.1	3.00E-141
	SAP8_00028	Quinonprotein alcohol dehydrogenase-like	Staphylococcus xylosus	EZV18744.1	3.00E-22
	SAP8_00030	XRE family transcriptional regulator	Staphylococcus	WP_000429766.1	2.00E-73
	SAP8_00031	XRE family transcriptional regulator	Staphylococcus	WP_031918210.1	2.00E-37
	SAP8_00035	phage DNA-binding protein	Staphylococcus aureus M0449	EUZ19989.1	2.00E-57
	SAP8_00039	nuclease	Staphylococcus aureus subsp. aureus	WP_048518683.1	0
	SAP8_00040	DNA polymerase	Staphylococcus aureus	SAP02126.1	2.00E-90
	SAP8_00041	phage DNA polymerase, family A	Staphylococcus aureus SCL6100	EUP42400.1	0
	SAP8_00043	phage DNA polymerase	Staphylococcus aureus	WP_044426014.1	2.00E-91
	SAP8_00051	acetyltransferase	Staphylococcus aureus	WP_114621342.1	4.00E-81
	SAP8_00053	dUTP diphosphatase superfamily protein	Staphylococcus phage SMSAP5	YP_007005700.1	3.00E-127
	SAP8_00058	transcriptional activator RinB	Staphylococcus	WP_000595263.1	5.00E-28
	SAP8_00062	putative DNA helicase	Staphylococcus aureus	CUD22574.1	0
	SAP8_00063	transcriptional regulator	Staphylococcus	WP_000528512.1	3.00E-101
	SAP8_00064	HNH endonuclease	Staphylococcus	WP_000160686.1	3.00E-70
	Additional functions	SAP8_00029	toxin	Staphylococcus aureus	WP_115306526.1
SAP8_00060		virulence-associated protein E	Staphylococcus aureus	WP_001571115.1	0
SAP8_00061		vrr-nuc domain protein	Staphylococcus phage vB_SauS_phi2	YP_009204314.1	8.00E-82

2절. 2종 식중독 세균에 대한 외부 조건에 따른 생육 억제 특성

1. 온도 및 MOI에 따른 EHEC에 대한 박테리오파지 처리 효과

○ 선별된 *E. coli* phage들의 온도에 따른 EHEC의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 180 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 Stationary phase까지 배양한 EHEC 3주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934, *E. coli* O103 NCCP 13937)를 개별로 10 μ l씩 접종하였음. 여기에 선별된 phage 7주를 각각 0.1과 0.0001 수준의 MOI가 되도록 접종한 후 최적온도보다 높은 40°C의 온도로 배양기에 150rpm으로 진탕 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 10시간동안 spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 40°C에서의 실험결과는 다음 그림과 같음.

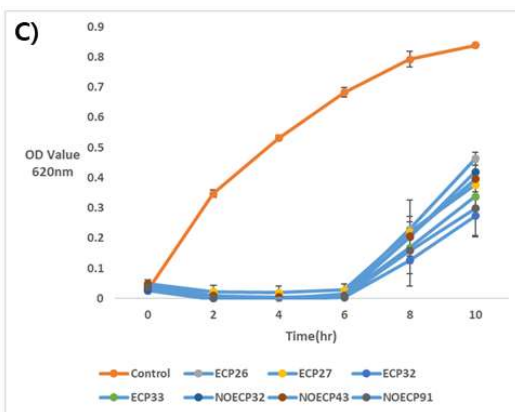
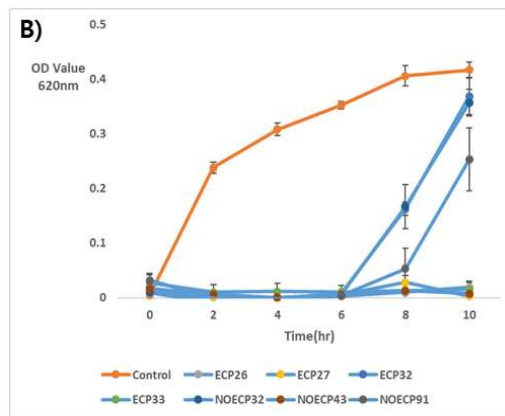
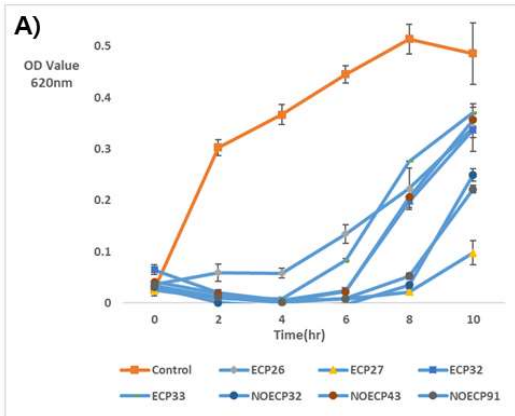
○ *E. coli* NCCP 13937 균주에 대해서는 MOI 0.1 조건에서는 ECP27을 제외한 모든 6개

phage들에서 6시간이후로 host가 resistance를 보였으며, MOI 0.0001 조건에서는 ECP26은 숙주 저해능이 매우 떨어지는 것으로 나타났고, ECP27을 제외하고는 6시간 이후로 host가 resistance를 보였음.

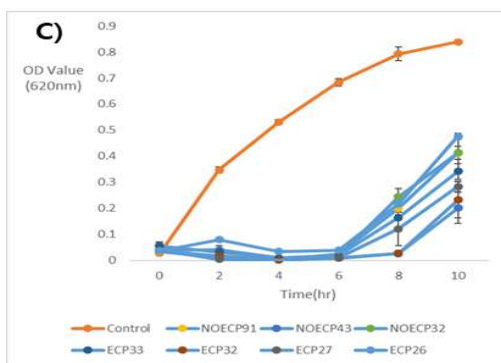
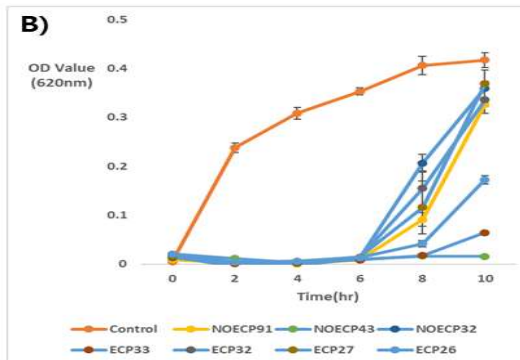
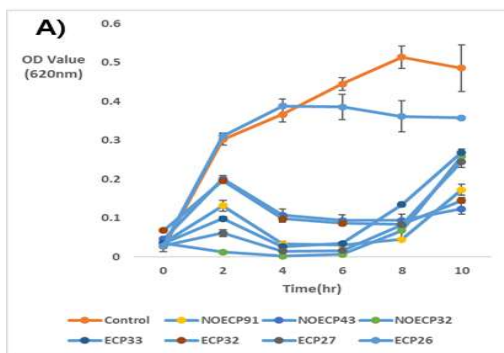
○ *E. coli* NCCP 13930 균주에 대해서는 MOI 0.1조건에서는 ECP32와 NOECP91이 6시간 이후로 resistance가 나타난 반면 다른 모든 phage들은 10시간까지도 resistance가 나타나지 않았음을 확인하였고, MOI 0.0001 조건에서는 모든 phage가 MOI 0.1 조건에서와 마찬가지로 6시간 까지 높은 숙주저해능을 보이다가, NOECP43을 제외한 모든 phage들에서 6시간 이후로 resistance가 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

○ *E. coli* NCCP 13934 균주에 대해서는 MOI 0.1, MOI 0.0001 두 개조건 모두에서 6시간 이후로 모든 phage에서 저항성이 나타났으며 ECP26의 경우 MOI 0.1조건에서는 숙주저해능력이 매우 떨어짐을 확인할 수 있었다. ECP26을 제외하면 MOI 0.1과 MOI 0.0001조건에서의 차이점은 숙주의 저항성이 얼마나 빠르게 나타나는지가 큰 차이점으로 확인되었음.

○ 37°C에서와 40°C에서의 온도에 따른 숙주저해능의 차이점을 비교해보면, 온도를 크게 높이지는 않아 대개 큰 차이는 관찰되지 않았으나, 일부 균들은 특정 phage에 대해 resistance를 조금 더 빠르게 보였는데, 이는 균의 성장 속도 및 생산해내는 protein이 두 온도에서 차이를 보이기 때문에 phage-host의 infection cycle에도 영향을 주었다고 생각된다. 또한 두 온도를 비교하였을 때 MOI나 숙주 저해능에 있어서 큰 차이가 없음을 확인하여 실험의 재현성을 확인 가능했음. MOI 0,1에서도 저항성이 나타나는 것으로 보아 단독 phage를 사용하기보다 cocktail phage를 사용하는 것이 더 다양한 균에 효과적으로 작용할 것으로 사료됨.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* under MOI 0.1 at 40°C
 A) *E. coli* NCCP 13937 B) *E. coli* NCCP 13934 C) *E. coli* NCCP 13930



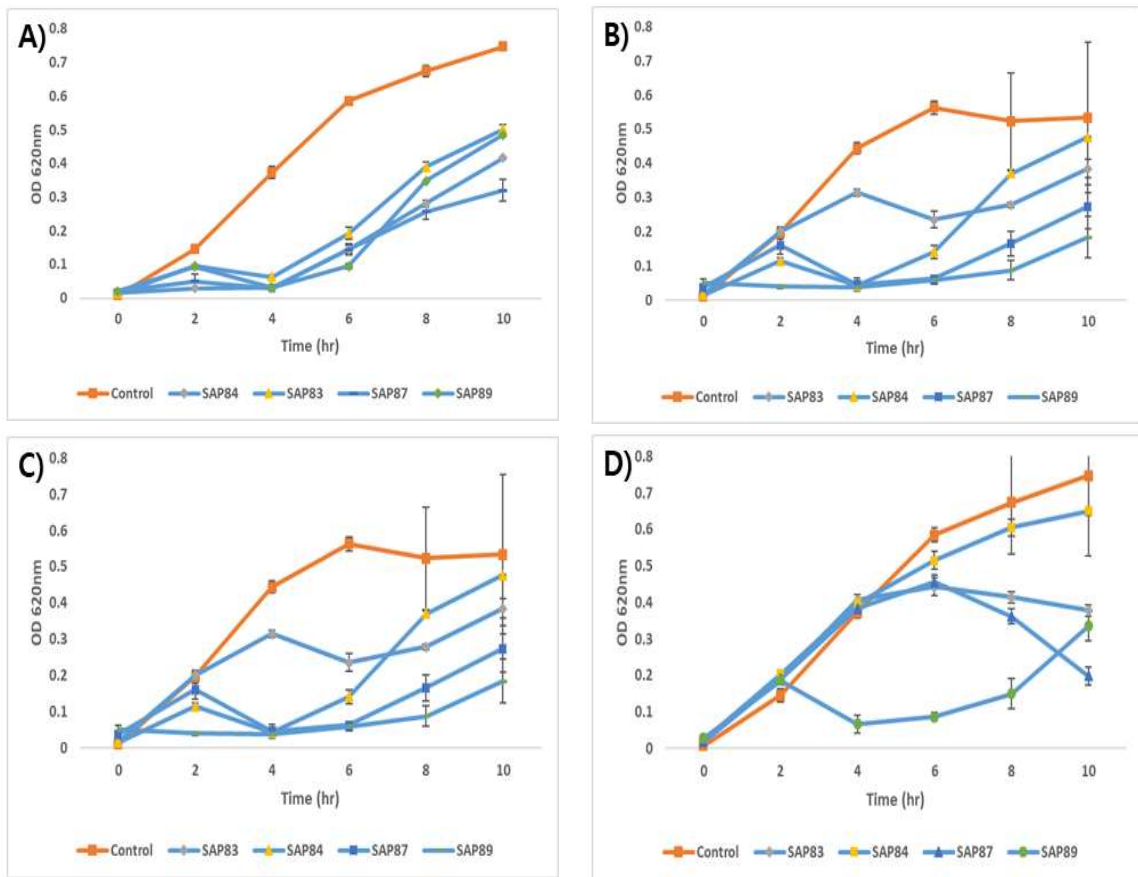
[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* under MOI 0.0001 at 40°C
 A) *E. coli* NCCP 13937 B) *E. coli* NCCP 13934 C) *E. coli* NCCP 13930

2. 온도 및 MOI에 따른 *S. aureus*에 대한 박테리오파지 처리 효과

○ 선별된 *S. aureus* phage에 의한 *S. aureus*의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 180 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 Stationary phase까지 배양한 *S. aureus* 2주(*S. aureus* KCTC 1621, *S. aureus* RN4220)를 개별로 10 μ l씩 접종하였음. 여기에 선별된 phage 4주를 각각 10,000과 0.0001 수준의 MOI가 되도록 접종한 후 37°C의 온도로 배양기에 150rpm으로 진탕 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 10시간동안 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 37°C에서의 실험결과는 그림과 같음.

○ *S. aureus* KCTC 1621에 대해서는 MOI 10000 조건에서, 4개의 phage 모두 약4시간까지는 생육억제능을 보이다가, 6시간부터 조금씩 Resistance가 나타나기 시작해 10시간에서는 약 30% 정도로 생육억제능이 크게 떨어짐을 확인 가능했음. MOI 0.0001 조건에서는 SAP83의 경우 2시간까지 생육억제능이 나타나지 않다가 Control과 비교하였을 때 4시간부터 10시간 까지 약25% 정도의 생육억제능을 나타내었다. 반면 나머지 3개 phage들은 4시간까지 resistance가 나타나지 않다가 6시간부터 resistance가 나타나기 시작하였으며, 10시간에서는 정도의 차이는 있으나 모든 phage들에서 resistance가 나타남을 확인 가능했음.

○ *S. aureus* RN4220에 대해서는 MOI 10000 조건에서, SAP83을 제외한 3개 phage들 모두 4시간까지는 resistance를 보이지 않다가, 6시간부터 resistance가 서서히 나타나기 시작하였음. SAP83 접종 실험군은 4시간에서 OD value가 다른 phage 접종시보다 높게 나타났는데, 이는 SAP83의 *S. aureus* RN4220에 대한 생육억제능이 다른 phage에 비해 떨어진 다기 보다는, SAP83의 latent period가 길기 때문에 나타나는 특성이라고 추측됨. 반면 MOI 0.0001 조건에 대해서는 SAP89를 제외하고는 생육억제능이 떨어지는 것으로 확인되었는데, SAP89의 경우, *S. aureus* RN4220 균주에 대해 높은 EOP(Efficiency of phage)를 가지는 것으로 확인되었기 때문에 MOI 1000, MOI 0.0001 조건 모두에서 높은 생육억제능을 가지는 것으로 생각되고, 다른 3개 phage들은 SAP89에 비해 *S. aureus* RN4220 균주에 대한 EOP가 낮기 때문에 이와 같은 결과를 보인 것으로 생각됨. 하지만 이와 같이 두 가지 균주에 대해 두 가지 MOI 조건으로 phage를 처리하였을 때, 모두 10시간에 도달하였을 때, resistance가 나타난 것을 관찰할 수 있었음. 또한 *E. coli*에 대한 생육억제 실험과 비교하였을 때, *S. aureus*에 대한 생육억제는 MOI나, 시간적으로 고려하였을 때, 경제적으로 비효율적인 것으로 관찰되었음. 이에 따라 *S. aureus*의 생육억제는 특히 개별적으로 phage를 처리하여 균의 성장을 억제하기보다는 cocktail로 phage를 혼합하여 처리하는 것이 균의 생육억제에 있어 더 큰 효과를 얻을 것으로 사료됨.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *S. aureus* at 37°C

- A) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 10000) B) *S. aureus* RN4220(MOI 10000)
 C) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 0.0001) D) *S. aureus* RN4220(MOI 0.0001)

○ 37°C에서와 마찬가지로 온도만 40°C로 변경하여 동일 조건하에서 phage의 생육억제능을 측정하였으며 결과는 그림과 같음.

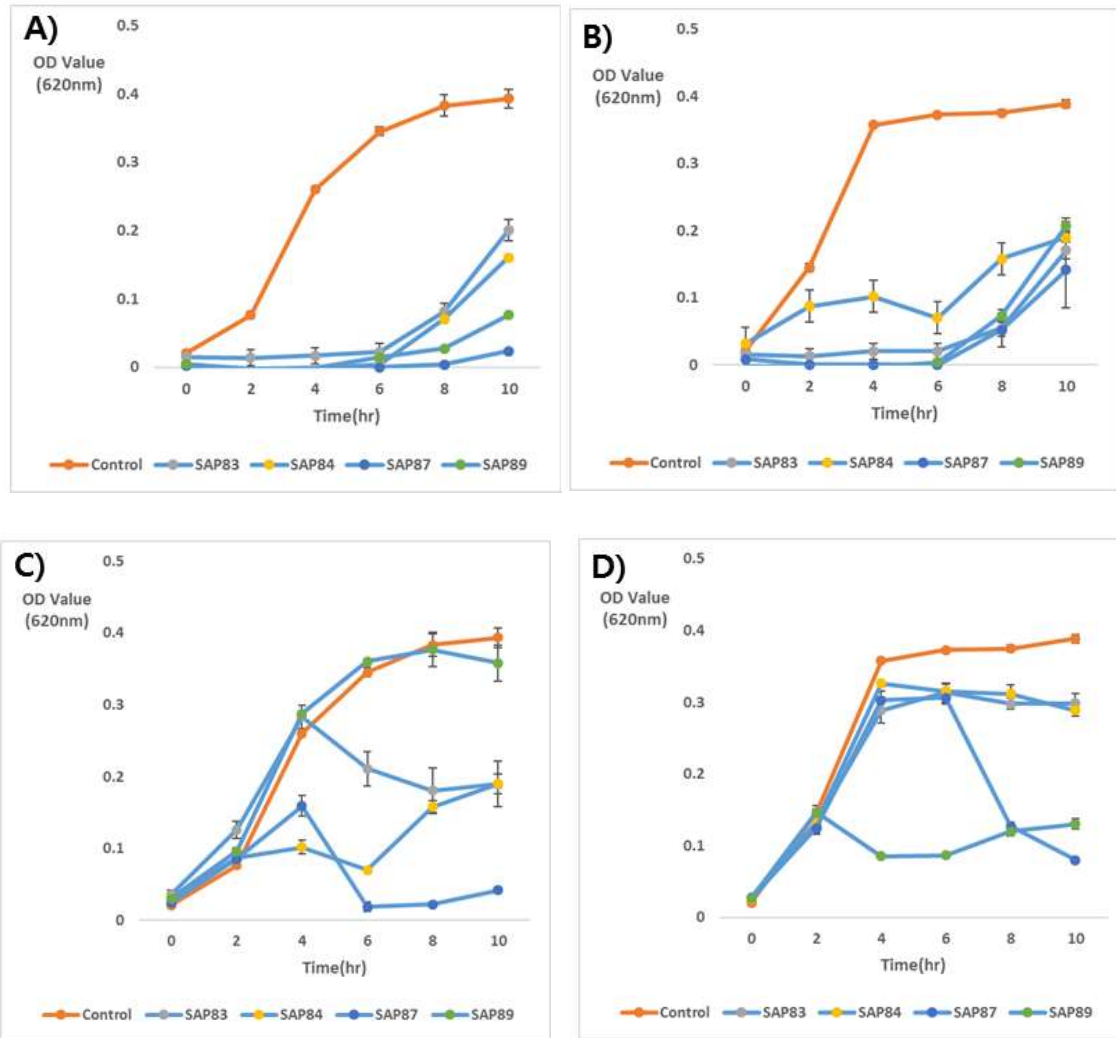
○ *S. aureus* KCTC 1621에 대해서는 MOI 10000 조건에서, 4개 phage 모두 6시간까지는 높은 생육억제능을 보여주다가, 8시간부터 서서히 resistance가 나타나는 것이 확인되었다. Host가 37°C일 때보다 40°C일 때 생육 정도가 낮게 측정되었으며, 이에 따라서 phage들의 생육억제능도 37°C일 때 보다 높고 길게 나타났음. 반면 MOI 0.0001 조건에서는 SAP87을 제외한 3개 phage들은 생육억제능이 매우 떨어지는 것으로 확인되었고, SAP89 접종군은 오히려 Host만 배양하였을 때와 유사한 생육곡선을 나타내어 생육억제능이 매우 떨어지는 것으로 확인되었음. SAP87 접종군은 MOI 10000 조건과 마찬가지로 모든 시간대에서 높은 생육억제능을 보여주었으며, SAP83과 SAP84는 약 50% 정도의 생육억제능을 보이는 것으로 확인되었음.

○ *S. aureus* RN4220에 대해서는 MOI 10000 조건에서, 4개 phage 모두 6시간까지는 높은 생

육억제능을 보여주다가, 8시간부터 서서히 resistance가 나타나는 것이 확인되었는데, 정도의 차이는 있으나, *S. aureus* KCTC 1621에 대한 결과와 유사한 생육억제 성상이 확인되었음. *S. aureus* RN4220 또한 37°C일 때에 비해서 40°C일 때 생육 정도가 낮게 측정되었으며, 이에 따라서 phage들의 생육억제능도 37°C에서의 실험결과와 비교하였을 때 더 높고 길게 나타났다. MOI 0.0001 조건에서는 37°C에서의 실험결과와 마찬가지로 SAP89의 생육억제능이 가장 크게 나타났으며 이는 상술한 EOP때문인 것으로 생각된다. SAP87의 경우 6시간까지는 생육억제능이 매우 떨어지는 것으로 측정되다가, 10시간까지 관찰하였을 때, 생육 억제능이 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 37°C에서의 결과와 매우 유사한데, SAP87의 Latent period는 다른 phage와 유사하나 burst size가 다른 phage들에 비해 크기 때문에, 적정 MOI인 0.0001 조건에서 *S. aureus* RN4220을 host로 하여 함께 장시간 배양하였을 때 높은 효율이 나타난 것으로 생각된다. SAP83과 SAP84는 37°C에서와 마찬가지로 약 10-20%의 생육억제능을 보였음.

○ 37°C에서와 40°C에서의 온도에 따른 숙주저해능의 차이점을 비교해보면, *E. coli*에 대한 실험결과와 마찬가지로 온도차이가 크지 않아 주목할 만한 차이는 관찰되지 않았으며, *E. coli*의 생육억제능 실험과는 다르게, 온도에 따른 생육 정도의 차이에 의한 host의 phage에 대한 resistance의 차이는 나타나지 않았으며, 37°C에서의 실험결과와 40°C에서의 실험결과를 비교하였을 때 실험결과가 유사하였으며 재현성을 확인할 수 있었다.

○ *E. coli*와 *S. aureus*의 온도 조건에 따른 생육 억제능 실험 결과를 종합해보면, 두 균주와 선별 phage 모두 특별한 영향을 받지 않는 것으로 보이며 최적 조건인 37°C에 비해서 40°C에서 host의 생육정도가 저해되어 나타나는 infection 효율의 정도 차이만 나타났음. 또한 온도와 관계없이 *E. coli* phage에 비해서 *S. aureus* phage의 경우 생육 억제 정도의 효율이 매우 떨어지는 것으로 확인되었으며, *E. coli*와 *S. aureus* 모두 phage에 대한 resistance가 온도와 관계없이 나타나는 것으로 확인되었기 때문에 2종 식중독균의 생육 억제를 위해 선별 phage들의 cocktail 사용이 필요할 것으로 사료됨.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *S. aureus* at 40°C

- A) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 10000) B) *S. aureus* RN4220(MOI 10000)
 C) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 0.0001) D) *S. aureus* RN4220(MOI 0.0001)

3. 박테리오파지 혼합 처리에 따른 제어 효과

○ *E. coli*에 대한 phage cocktail 제조를 위해 plaque morphology 및 숙주저해범위, 환경에서의 안정성, *E. coli*에 대한 제어정도의 특성을 고려하여 1차년도에 선별한 7가지 phage인 ECP26, ECP27, ECP32, ECP33, NOECP32, NOECP43, NOECP91을 cocktail로 제조하였다. Cocktail 제조방식은 phage propagation을 통해 얻어진 각각의 phage solution을 titer를 측정하고, 7주의 phage를 log값 수준에서 동일한 승수로 맞춘 다음 1:1 비율로 혼합하여 cocktail을 제조하였으며, 제조한 cocktail의 승수확인한 후 적용실험에 사용함. 또한 cocktail 용액은 보관해서 사용하는 것이 아닌 실험을 실시할 때마다 일회용으로 제조하여 사용하였다.

○ 7주의 선별 *E. coli* phage로 제조한 phage cocktail에 대하여 *E. coli*의 생육억제를 알아보기

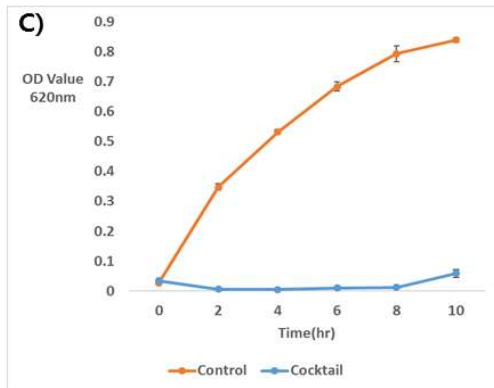
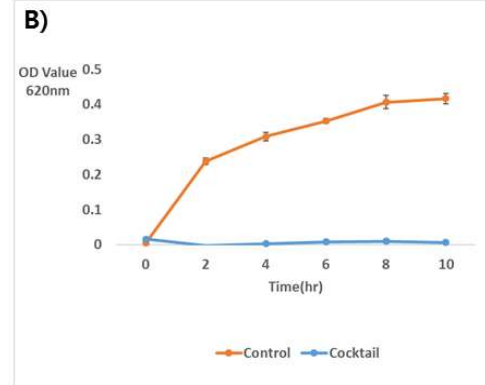
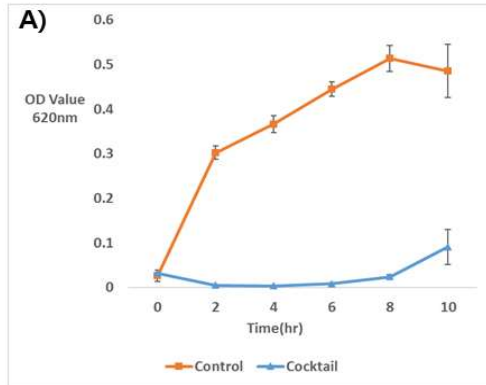
위해 96-well count plate에다 180 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 Stationary phase까지 배양한 EHEC 3주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934, *E. coli* O103 NCCP 13937)를 개별로 10 μ l 접종하였다 여기에 MOI 0.1과 MOI 0.0001의 수준으로 phage cocktail 용액을 10 μ l 접종한 후 40°C의 배양기에 150rpm으로 교반하며 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

○ 이전 실험에서 37°C와 40°C 두 가지 온도조건이 phage infection 자체에는 큰 영향을 주지 않았음을 확인하였으므로 최적조건인 37°C가 아닌 40°C로 실험을 진행하였으며 결과는 그림과 같다

○ MOI 0.1 조건으로 EHEC 3종에 대해 phage cocktail을 처리하였을 때 이전 실험에서 발생했던 Host의 resistance가 3종 모두에서 8시간 동안 나타나지 않았으며 10시간이 경과하였을 때 *E. coli* NCCP 13937과 *E. coli* NCCP 13930에서 매우 미세한 resistance가 발생하였다.

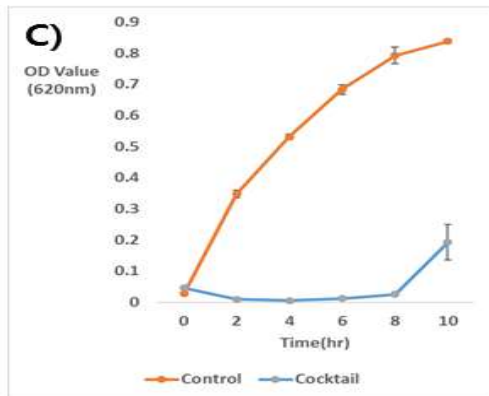
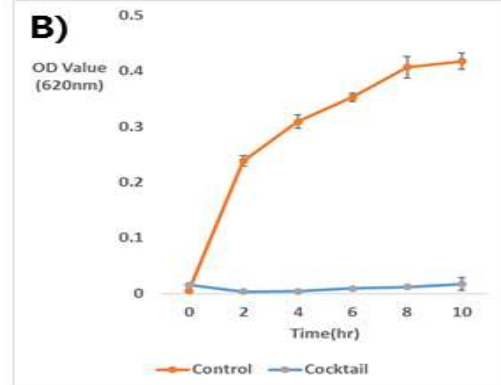
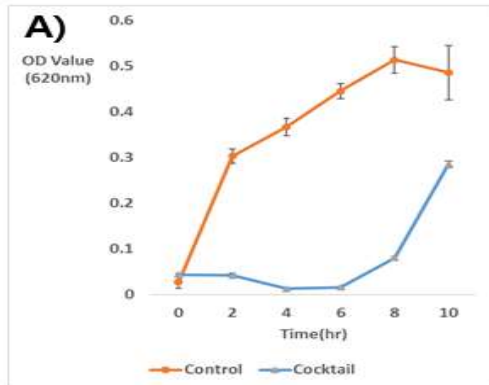
○ MOI 0.0001 조건으로 EHEC 3종에 대해 phage cocktail을 처리하였을 때는 *E. coli* NCCP 13930에서 MOI 0.1 조건에서와 마찬가지로 Host의 resistance가 발생하지 않았고, *E. coli* NCCP 13937과 *E. coli* NCCP 13934에서는 8시간 이후로 resistance가 발생하는 것이 확인되었다.

○ 따라서 EHEC에 phage를 단독 처리한 경우보다 phage cocktail 형태로 처리할 경우 균의 생육 억제능이 더 뛰어나게 나타났으며 MOI 0.0001에서 resistance가 나타나기는 하나, resistance 발생 시간이 늦추어지는 것을 확인하였으므로, 단독 phage보다 cocktail phage를 사용하는 것이 더 다양한 균의 생육을 효율적으로 저해할 수 있다는 것으로 결론을 내릴 수 있다. 또한 MOI 0.1 조건에서는 3개 균주 모두 10시간동안 유의할만한 수준의 resistance가 나타나지 않았으므로 phage cocktail을 살균소독제로 응용 시 최소 MOI 0.1 이상을 사용하는 것이 적합하다고 판단된다.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage cocktail for *E. coli* under MOI 0.1 at 40°C
 A) *E. coli* NCCP 13937 B) *E. coli* NCCP 13930 C) *E. coli* NCCP 13934

○ *S. aureus*에 대한 phage cocktail 제조를 위해 plaque morphology 및 숙주저해범위, 환경에서의 안정성, *E. coli*에 대한 제어정도의 특성을 고려하여 1차년도에 선별한 4가지 phage인 SAP83, SAP84, SAP87, SAP89을 cocktail로 제조하였다. Cocktail 제조방식은 phage propagation을 통해 얻어진 각각의 phage solution을 titer를 측정하고, 4주의 phage를 log값 수준에서 동일한 승수로 맞춘 다음 1:1 비율로 혼합하여 cocktail을 제조하였으며, 제조한 cocktail의 승수확인한 후 적용 실험에 사용함. 또한 cocktail 용액은 보관해서 사용하는 것이 아닌 실험을 실시할 때마다 일회용으로 제조하여 사용하였다.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage cocktail for *E. coli* under MOI 0.0001 at 40°C
 A) *E. coli* NCCP 13937 B) *E. coli* NCCP 13930 C) *E. coli* NCCP 13934

○ 4주의 선별 *S. aureus* phage로 제조한 phage cocktail에 대하여 *E. coli*의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 180 μl의 LBC broth를 담은 후, 각각 Stationary phase까지 배양한 *S. aureus* 2주(*S. aureus* KCTC 1621, *S. aureus* RN4220)를 개별로 10 μl 접종하였다 여기에 MOI 10000과 MOI 0.0001의 수준으로 phage cocktail 용액을 10 μl 접종한 후 40°C의 배양기에 150rpm으로 교반하며 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

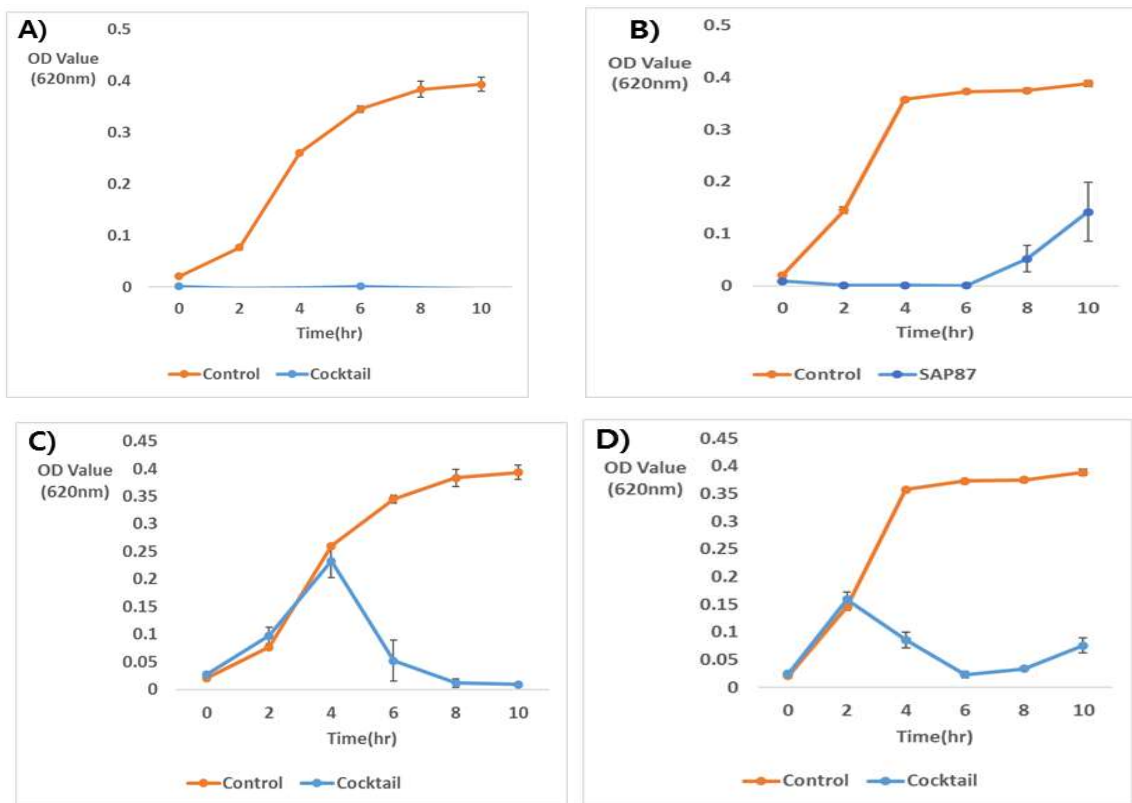
○ 이전 실험에서 37°C와 40°C 두 가지 온도조건이 phage infection 자체에는 큰 영향을 주지 않았음을 확인하였으므로 최적조건인 37°C가 아닌 40°C로 실험을 진행하였으며 결과는 그림과 같다.

○ MOI 10000 조건에서 *S. aureus* KCTC 1621에 대해서는 resistance 없이 10시간동안 0에 가까운 값이 나타났으며 이는 cocktail phage가 *S. aureus* KCTC 1621을 장시간동안 완전히 제어했음을 의미한다. *S. aureus* RN4220에 대해서는 8시간부터 저항성이 나타나기 시작했는데, 그럼에도 불구하고 단일 phage 처리시보다 높은 저해효율을 보였고, resistance가 나타나는 시간도 늦추었음을 확인할 수 있었다.

○ MOI 0.0001 조건에서 *S. aureus* KCTC 1621에 대해서는 4시간 까지 저해능력이 나타나지 않다가 뒤늦게 생육억제능이 나타나 10시간에서는 완전히 phage가 균을 제어했으며, 단일 phage

를 처리하였을 때에 비하여 월등히 높은 효율을 보였다. 초기에 생육억제능이 나타나지 않은 이유를 추론해보면, *S. aureus* KCTC 1621에 대해 상대적으로 효율이 떨어지는 phage인 SAP83, SAP84, SAP89 세 개의 phage의 감염이 초기에 우세하다가, 효율이 높은 SAP87에 의한 감염이 시간이 지나면서 우세해지면서 생육억제능이 늘어난 것으로 생각된다. *S. aureus* RN4220에 대해서는 2시간까지는 생육억제능이 나타나지 않다가, 그이후로 생육 억제능이 나타나고 8시간부터 다시 약간의 resistance가 나타나는 것을 확인하였다. 또한 수치상으로도 단독 phage를 처리하였을 때 보다 cocktail로 phage를 처리하였을 때 더 높은 효율이 나타남을 확인할 수 있었다.

○ *S. aureus* RN 4220에 대해 MOI 10000 조건과 MOI 0.0001 조건에서의 눈에 띄만한 생육억제능이 나타나지 않은 이유는 MOI 조건 형성 시 10000 조건은 균을 희석하여 MOI 조건을 형성하였고, 0.0001 조건은 phage를 희석하여 MOI 조건을 형성하였기 때문이라고 생각된다. 따라서 *S. aureus*의 생육을 억제하기 위한 살균소독제로 phage를 사용할 때 단독 phage 보다 cocktail phage를 사용하는 것이 효율적일 것이라 사료된다.



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *S. aureus* at 37°C

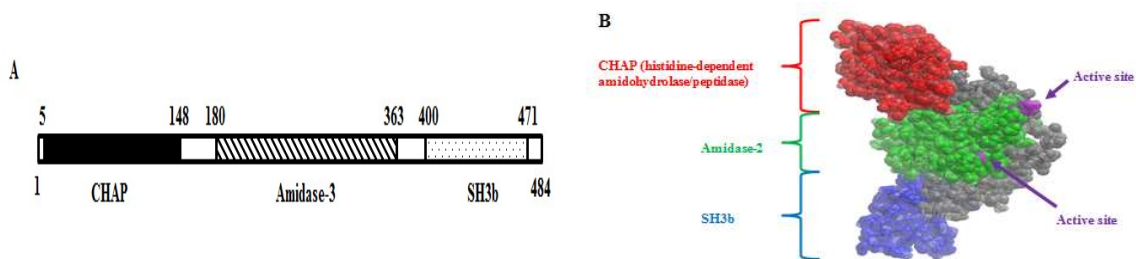
- A) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 10000) B) *S. aureus* RN4220(MOI 10000)
 C) *S. aureus* KCTC 1621(MOI 0.0001) D) *S. aureus* RN4220(MOI 0.0001)

3절. 박테리오파지 유래 endolysin의 분리와 정제

1. Endolysin의 유전자 클로닝

○ *S. aureus*는 현존하는 다양한 항생제에 대해 내성을 나타내기 때문에 문제가 되고 있으며, 이를 해결하기 위해 여러 가지 천연 소재 및 항균물질들이 연구되고 있고, 박테리오파지 유래 용균효소인 endolysin은 항생제 대체제로서 각광받고 있는 소재 중 하나임. 따라서 본 연구에서는 *S. aureus* 유래 phage 의 Whole genome sequence로 부터 phage의 용균효소인 endolysin sequence를 annotation 하고 분석한 뒤, *E. coli* pET vector expression system을 통해 endolysin을 분리 및 정제를 실시함.

○ Annotation data를 기반으로 *in silico* analysis를 통해 SAP8의 endolysin의 domain 분석을 진행하고 SAP8의 endolysin을 LysSAP8이라고 명명함. LysSAP8은 484개의 amino acid 와 N-terminal CHAP, middle amidase-3, C-terminal SH3b domain들로 구성되어 있는 것으로 확인되었음.



[그림] Modular organization of the endolysin LysSAP8. A) Linear structure, B) 3D structure Black box: histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP); Diagonal stripes: amidase-3; Black dots: SH3b. Unit: amino acid sequence.

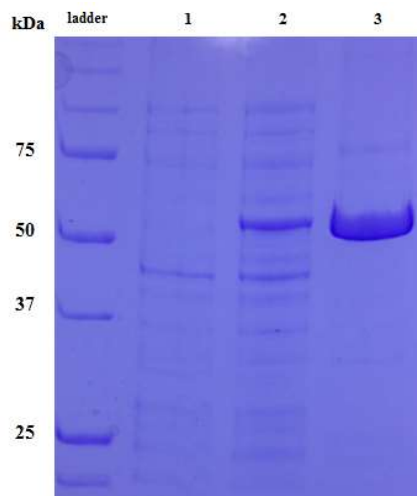
○ LysSAP8의 endolysin gene의 PCR을 진행하기 위해 DNA extraction kit (NORGEN)을 이용해 phage SAP8의 DNA를 추출한 후, 추출한 DNA를 정제하고 미리 추출해놓은 pET23a vector에 제한효소 *XhoI* (Takara) 과 *NdeI* (Takara)을 처리한 후 ligation 하여 heat-shock 기법을 이용하여 Rosseta(DE3)에 transformation을 진행함.

2. Endolysin의 발현 조건 및 확립

○ 24시간 배양한 Transformant *E. coli* 용액 1%를 ampicillin이 포함된 LB broth 500mL에 3

7°C에서 log phase (OD₆₀₀; 0.5)까지 배양한 뒤 IPTG 1mM을 넣고 18°C에서 18시간동안 150rpm으로 배양하여 overexpression step을 진행함. Induction이 끝난 *E. coli*를 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 cell 을 harvest하여 200mL에 해당하는 *E. coli* pellet당 50mL의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl/500 mM NaCl/10 mM imidazole, pH8.0)로 washing 해주고 30분 동안 sonicator (VCX130, Vibracell, Sandy Hook, CT, USA)로 sonication 해주었음 (5/2s pulse on/off, Amp 40%). Lysate의 debris를 제거하기 위해 원심분리 (13,000rpm, 10분)를 진행하여 상등액의 soluble한 protein들만을 얻어내고, Ni-NTA superflow resin (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 단백질 정제를 진행함. 레진은 20mL의 lysis buffer와 20mL의 soluble한 상등액을 통과시킨 뒤 washing buffer (50 mM Tris-HCl/500 mM NaCl/50mM imidazole, pH 8.0)을 이용하여 2회 washing 해주고 20mL의 elution buffer (50 mM Tris-HCl/500 mM NaCl/200 mM imidazole, pH 8.0)을 이용하여 3회에 걸쳐 elution하였음. 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 발현 및 정제 여부를 확인함.

○ 실험결과 55kDa에 해당하는 band가 나타나 overexpression이 잘 일어났는지 확인 가능하였고, 레진을 통해 정제한 결과 또한 하나의 밴드만 나타났기 때문에 LysSAP8이 순수하게 soluble 형태로 정제되었다고 판단할 수 있었음.



[그림] SDS-PAGE analysis for expression and purification of the endolysins. (A) LysSAP8 (55 kDa) (B) LysSAP33 (30 kDa). Lane 1: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the backbone plasmid; Lane 2: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the recombinant plasmid; Lane 3: partially purified endolysin.

4절. Endolysin의 위생처리제로써 효과

1. Endolysin의 식중독 세균에 대한 효과 및 스펙트럼확인

○ 분리한 LysSAP8의 특성 분석을 위해 Ni-NTA resin을 이용하여 1차 정제한 LysSAP8을

Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, USA)를 이용하여 2차 정제한 뒤 Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하고 Reaction buffer (50mM Tris-HCl/500mM NaCl, pH 8.0)로 희석한 10uM의 LysSAP8을 실험에 사용하였음.

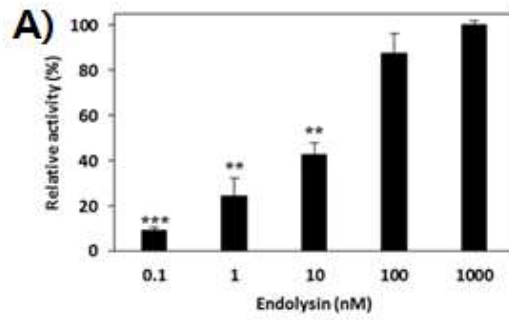
○ 특성 확인으로는 용균 스펙트럼을 비롯하여 Minimal inhibitory concentration (MIC) 측정, LysSAP8의 온도, 염, 2가 양이온, pH에 대한 안정성 및 부유 세포와 바이오필름에 대한 용균능력 의 평가를 진행하였음.

○ 용균 스펙트럼 확인 실험에는 MRSA를 포함한 *Staphylococcus* spp, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Streptococcus* 및 다른 그람 음성균들을 사용하였으며 각 균들을 exponential phase까지 배양한 후 LBC soft agar에 접종하여 LBC agar에 중층함. 이후 soft agar가 굳으면 준비된 LysSAP8을 spot assay를 이용해 10uL씩 분주하고 37도에서 overnight culture 하여 clear zone의 형성 유무를 확인하여 용균 스펙트럼을 확인하였음.

○ LysSAP8은 *S. aureus*에는 대부분 clear zone을 형성하였고 (82/84) 이중 MRSA 70종에 clear zone을 형성함. *S. aureus*를 제외한 *Staphylococcus* spp (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*)에 대해서도 clear zone을 형성함. 반면 다른 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해서는 clear zone을 형성하지 못함. 박테리오파지와는 다르게 endolysin은 세포벽을 기질로 인식하여 분해하는 방식으로 용균을 일으키기 때문에 세포벽의 구조가 비슷하다면 그 균의 생리적, 항생제 내성 특성과 관계없이 용균 시킬 수 있는 것이 특징이며 따라서 그 용균 범위도 파지에 비해 매우 넓은 것으로 알려져 있음. 따라서 본 실험 결과는 LysSAP8을 살균소독제로 응용한다면 유산균과 같은 유용미생물은 죽이지 않으면서 *S. aureus*만을 선택적으로 용해시키는 것이 가능할 것으로 사료됨.

○ LysSAP8의 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 알아보기 위해 2차 정제된 LysSAP8을 Reaction buffer를 이용하여 여러 가지 농도로 희석한 뒤, exponential phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 reaction buffer로 2회 washing해줌. Washing이 끝난 균은 96-well plate에 180uL씩 분주함. 이후 96-well plate에 LysSAP8을 최종 농도가 0.1, 1, 10, 100, 1000nM이 되도록 20uL씩 분주함. 분주가 완료된 plate를 30°C에 30분 동안 배양하고, UV spectrophotometer를 이용해 OD₆₀₀ 값을 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 실시해 통계적 유의성을 결정함.

○ 농도에 비례하여 용균능력이 늘어났고 최종 농도가 1000nM 일 때, 용균능력이 가장 높게 나타남. 하지만 0.1nM과 10nM 일 때에는 상대적으로 낮은 용균능력을 보여주었음. 본 실험 결과로 보았을 때 LysSAP8을 실제 살균소독제로서 응용하기 위해서는 최소 10nM이상 사용하여야 효율적으로 식품 유래 *S. aureus*를 제어할 수 있을 것으로 사료됨.



[그림] Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the LysSAP8. (*: $P < 0.01$; **: $P < 0.001$; ***: $P < 0.0001$).

[표] Lysis spectrum of LysSAP8. Symbols, +: LysSAP8 sensitive strain, -: LysSAP8 insensitive strain, *: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

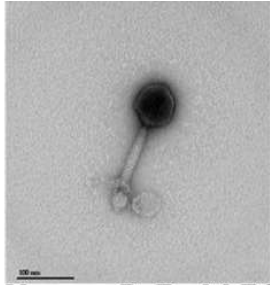
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> S-99D	+	Other Gram-	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 40935	-
	<i>S. aureus</i> S-100D*	+			
	<i>S. aureus</i> S-101D	+		<i>Bacillus thuringiensis</i> KCCM 11429	-
	<i>S. aureus</i> S-102D	+			
	<i>S. aureus</i> S-103D	+		<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3206	-
	<i>S. aureus</i> S-105D	+			
	<i>S. aureus</i> S-106D	+		<i>Enterococcus faecium</i> KCTC 12118	-
	<i>S. aureus</i> S-108D	+			
	<i>S. aureus</i> S-109D	+		<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-
	<i>S. aureus</i> S-111D	+			
	<i>S. aureus</i> S-112D*	+		<i>Lactobacillus reuteri</i> KCCM 40717	-
	<i>S. aureus</i> S-113D	+			
	<i>S. aureus</i> S-115D	+		<i>Lactobacillus casei</i> KCCM 12452	-
	<i>S. aureus</i> S-117D	+			
	<i>S. aureus</i> S-118D	+		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 799	-
	<i>S. aureus</i> S-119D	+			
	<i>S. aureus</i> S-120D	+		<i>Listeria innocua</i> KCTC 3568	-
	<i>S. aureus</i> S-121E	+			
	<i>S. aureus</i> S-122E	+		<i>Streptococcus agaractiae</i> KCCM 11957	-
	<i>S. aureus</i> S-123E	+			
	<i>S. aureus</i> S-124E	+			
	<i>S. aureus</i> S-125E	+		<i>Escherichia coli</i> NCCP 13937	-
	<i>S. aureus</i> S-126E	+			
	<i>S. aureus</i> S-127E	+		<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 1949	-
	<i>S. aureus</i> S-128E	+			
	<i>S. aureus</i> S-129E	+	Gram-negative	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-
	<i>S. aureus</i> S-130E	+			
	<i>S. aureus</i> S-131E	+		<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	-
	<i>S. aureus</i> S-132E	+			
	<i>S. aureus</i> S-133E	+		<i>Vibrio parahaemolyticus isolates</i>	-
	<i>S. aureus</i> S-134E	+			
	<i>S. aureus</i> S-136E*	+			
	<i>S. aureus</i> S-137E	+			
	<i>S. aureus</i> S-138F	+			
	<i>S. aureus</i> S-139F	+			
	<i>S. aureus</i> S-140F	+			
	<i>S. aureus</i> S-141F*	-			
	<i>S. aureus</i> S-142F	+			
	<i>S. aureus</i> S-143F	+			
	<i>S. aureus</i> S-144F	+			
	<i>S. aureus</i> S-145F*	-			
	<i>S. aureus</i> S-146F	+			
	<i>S. aureus</i> S-147F	+			

	Strains	Lysis Activity LysSAP8				
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> KCTC 1621	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> S-67C*	+	
	<i>S. aureus</i> KCCM 12103	+		<i>S. aureus</i> S-68C*	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 13565_SEA	+		<i>S. aureus</i> S-69C	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 23235_SED	+		<i>S. aureus</i> S-70C	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 19095_SEC	+		<i>S. aureus</i> S-71C*	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 14458_SEB	+		<i>S. aureus</i> S-72C*	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 27664_SEE	+		<i>S. aureus</i> S-73C*	+	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+		<i>S. aureus</i> S-74C*	+	
	<i>S. aureus</i> RN4220	+		<i>S. aureus</i> S-75C*	+	
	<i>S. aureus</i> Newman	+		<i>S. aureus</i> S-76C	+	
					<i>S. aureus</i> S-77C*	+
	<i>S. condimentii</i> KCCP 60045	-			<i>S. aureus</i> S-78C	+
					<i>S. aureus</i> S-79C*	+
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 35494	-			<i>S. aureus</i> S-80C*	+
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 40416	-			<i>S. aureus</i> S-81C*	+
	<i>S. epidermidis</i> PS10-3	+			<i>S. aureus</i> S-82C*	+
	<i>S. epidermidis</i> NMK1	+			<i>S. aureus</i> S-83C*	+
					<i>S. aureus</i> S-84C*	+
	<i>S. hominis</i> DTG7	+			<i>S. aureus</i> S-85C	+
					<i>S. aureus</i> S-86C*	+
	<i>S. sciuri</i> RCG901	+			<i>S. aureus</i> S-87C*	+
	<i>S. sciuri</i> PLF903	+			<i>S. aureus</i> S-88C*	+
					<i>S. aureus</i> S-89C*	+
	<i>S. warneri</i> PG-001	+			<i>S. aureus</i> S-90C*	+
	<i>S. warneri</i> ON-197	-			<i>S. aureus</i> S-91D*	+
	<i>S. warneri</i> KSCL904	+			<i>S. aureus</i> S-92D*	+
	<i>S. warneri</i> SSC902	+			<i>S. aureus</i> S-93D*	+
<i>S. warneri</i> CCBK901	+		<i>S. aureus</i> S-94D*	+		
<i>S. warneri</i> CCBK902	+		<i>S. aureus</i> S-95D*	+		
<i>S. warneri</i> CCBK903	+		<i>S. aureus</i> S-96D*	+		
<i>S. warneri</i> CCBK904	+		<i>S. aureus</i> S-97D*	+		
			<i>S. aureus</i> S-98D*	+		
<i>S. xylosum</i> FSL901	+					

5절. 제 I 혼합액 제조와 식품 대상으로 기존 살균제와 비교 평가

1. 병원성 *E. coli*의 제어를 위한 제 I 혼합액 제조

○ 박테리오파지를 살균소독제로 사용하기 위해서는 horizontal gene transfer를 통해 위해 유전자를 비병원성 균에도 전달할 수 있는지에 대해서 확인해야하며, 이를 위해 유전자 분석을 통해 항생제 내성 유전자, 독성유전자, Site-specific recombinase, Integrase 등의 존재 유무를 통해 temperate phage를 제외시키고 lytic phage만을 2차 선별해야함. Phage 최종 선별을 위해 sequencing data를 기반으로 lytic phage인 것으로 판별된 ECP26과 ECP32를 살균소독제에 사용할 박테리오파지로 선별함.



Name : vB_EcoM-ECP26

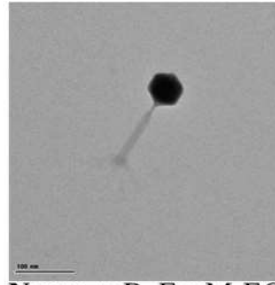
Order : Caudovirales

Family : Myoviridae

Properties : Double-stranded DNA, Lytic

Toxin or Antibiotics gene : Non

Genbank accession # : MK883717.1



Name : vB_EcoM-ECP32

Order : Caudovirales

Family : Myoviridae

Properties : Double-stranded DNA, Lytic

Toxin or Antibiotics gene : Non

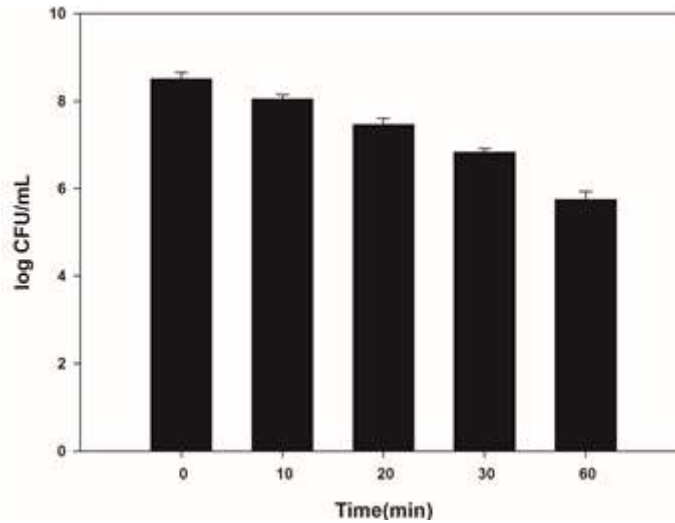
Genbank accession # : MK883718.1

[그림] Identity of *E. coli* O157:H7 infecting phages

2. 제 I 혼합액에 대한 식중독 세균 제어 평가

○ 최종 선별한 ECP26과 ECP32를 cocktail로 만들어 살균소독력을 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930을 대상으로 평가함. Overnight 배양한 *E. coli*를 10^8 수준으로 Saline에 희석하여 원심 분리한 뒤 cell pellet에 1x SM buffer에 희석한 10^8 의 Phage cocktail을 MOI 1 수준으로 분주하여 시간대별로 반응시킴. 반응이 끝나면 원심분리하여 pellet을 Saline으로 2회 washing하고 심진희석하여 Filmedia EC(DNP, Japan)에 접종한 뒤, 제조사에서 권장하는 방법에 따라 36°C에서 24시간동안 배양하고 colony를 계수하여 log CFU/mL로 변환하여 결과를 확인함. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.01 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단함.

○ 실험결과, Control 대비 10분 처리 시 46.01%, 20분 처리 시 104.73%, 30분 처리 시 167.31% 1시간 처리 시 275.56% 감소하였으며 수치상으로는 1시간 처리 시 약 2.7 log CFU/mL만큼의 균 감소효과를 보임. MOI 1로 확인하였기 때문에 MOI를 높여 반응시킨다면 더 높은 살균소독력을 보일 것으로 생각되며, 실제 식품에서의 균수는 10^8 보다 훨씬 낮은 $10^3 \sim 10^4$ 로 존재하므로 10^8 의 phage cocktail을 사용한다면 대부분의 병원성 *E. coli*는 제어할 수 있을 것으로 사료됨.



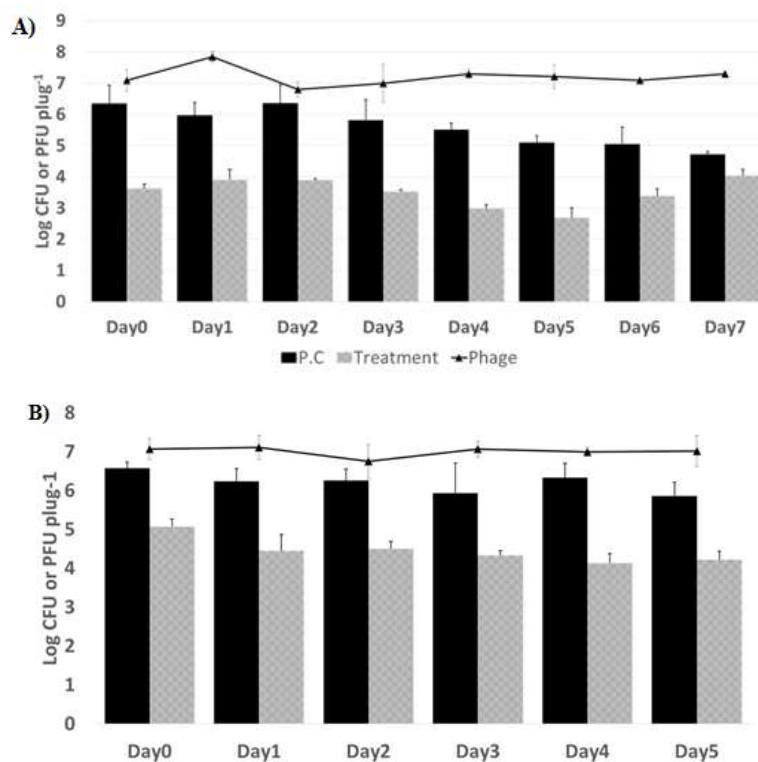
[그림] Activity of the phage cocktail against *E. coli* O157:H7 NCCP 13930 (MOI 1). Each experiment was performed in triplicate, and the bars indicate standard deviations.

3. 제 I 혼합액의 바이오필름, 신선 농식품 대상 효능 평가

○ 신선농식품에서 발생하는 식중독은 배양 및 수확과정에서 뿐만 아니라 저장 및 유통과정에서의 교차오염에 의한 감염으로 인해 발병함. 따라서 phage cocktail의 제품화를 위해서는 phage cocktail의 신선농식품 처리효과가 냉장 보관 시에도 지속적으로 나타나는지, Phage cocktail의 역가가 감소하지 않는지 확인하는 실험이 필요함. 따라서 *E. coli* O157:H7의 제어를 위해 청로메인에 70% EtOH를 이용해 전처리를 실시 후 phage cocktail 및 1x SM buffer에 5분간 반응시키고 saline에 washing을 1회 실시 후 stomaching bag에 담아 7일간 보관함. 보관하는 동안 일차별로 반응이 완료되면 stomaching 후 pellet은 saline으로 현탁 후 십진희석하여 Filmedia EC에 36°C에서 24시간동안 배양하고 colony를 계수하여 log CFU/g로 변환하여 결과를 확인하였고, 상등액은 LBC soft agar에 overnight 배양한 *E. coli* O157:H7 NCCP13930과 함께 분주 후 LBC agar에 plaque assay를 실시한 뒤, 24시간동안 37°C에서 배양 후 log PFU/g로 변환하여 결과를 확인함. 새싹채소에 대해서도 5일 동안 동일하게 실험을 진행하였으며 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단함.

○ 실험결과, 0일차에 약 1.5 log CFU/g의 유의한수준의 균 감소효과를 나타냈고, 저온 방치시 일차별로 균수가 지속적으로 감소하였다. 하지만 6일, 7일차에는 균수가 증가하는 양상을 보였는데 이는 샘플의 차이에 의한 오차 값으로 사료됨. Phage cocktail의 수도 0일차에는 7 log PFU/g

이었고 7일차까지도 약 7 log PFU/g의 역가를 유지한 것으로 보았을 때 phage cocktail은 저온 및 신선농식품 표면에서도 매우 안정한 것으로 사료됨. 지속적인 균의 감소 효과가 나타나지는 하였으나 양성시료에서도 시간이 지남에 따라 균 감소 효과가 나타난 것을 감안하면 저온 방치시의 phage의 균 감소능인 LO(Lysis from without)효과는 미미한 것으로 사료됨. 따라서 Phage cocktail의 저온 및 식품에서의 안정성이 뛰어나고 살균력도 확보되므로 phage cocktail에 유기산 및 다른 제제를 혼합하여 사용한다면 더 효과가 좋은 살균소독제로 개선이 가능할 것으로 사료됨. 새싹채소에서 로메인에서와 유사하게 초기에 약 1.3 log CFU/g 정도의 저감화 효과 이후 미미한 LO에 의한 균 감소효과가 나타나 5일차에는 약 1.5 log CFU/g 정도의 저감화가 나타났음.

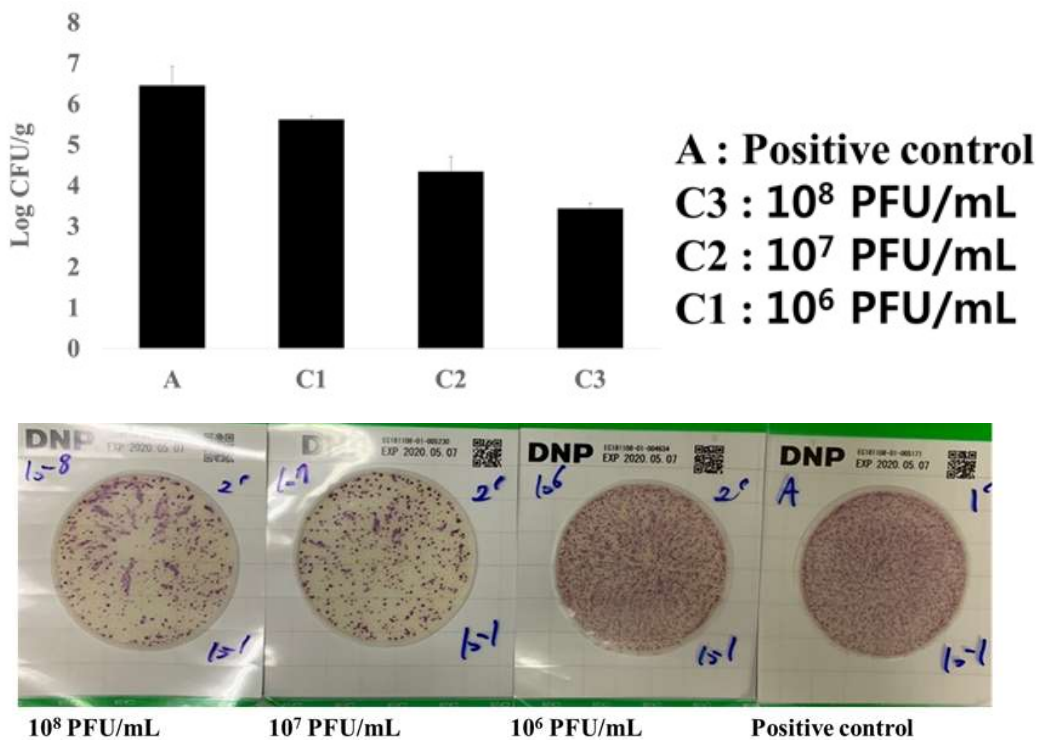


[그림] Reduction of *E. coli* O157 NCCP 13930 counts on A) Romaine lettuce and B) Sprout treated with phage cocktail for 7days and 5days. (applied 10^8 PFU/mL)
The statistical significance of all the data was analysed with Student's t-test.
Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

○ Phage cocktail 제품의 방향성(spray type, immerse type) 및 효과 확인을 확실하게 하기 위해서 phage cocktail의 농도에 따라 식품상에 존재하는 *E. coli* O157:H7을 얼마나 저감화 시킬 수 있는지에 대해 실험을 진행함. 따라서 청로메인에서의 *E. coli* O157:H7의 제어를 위해 그림에서와 마찬가지로 청로메인에 전처리를 실시 후 phage cocktail (10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL) 및 1x SM buffer에 5분간 반응시키고 stomaching 후 pellet을 saline으로 현탁 후 십진희석하여 Filmedia

EC에 36°C에서 24시간동안 배양하고 colony를 계수하여 log CFU/g로 변환하여 결과를 확인함. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였다.

○ 실험결과, phage cocktail의 농도에 비례하여 균 감소 효과가 나타났고, 최소 10^6 PFU/mL의 농도를 사용하여야 어느 정도의 저감화 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다. 초기 균수가 더 낮을 경우 phage cocktail의 효과가 증대될 것으로 예상됨.



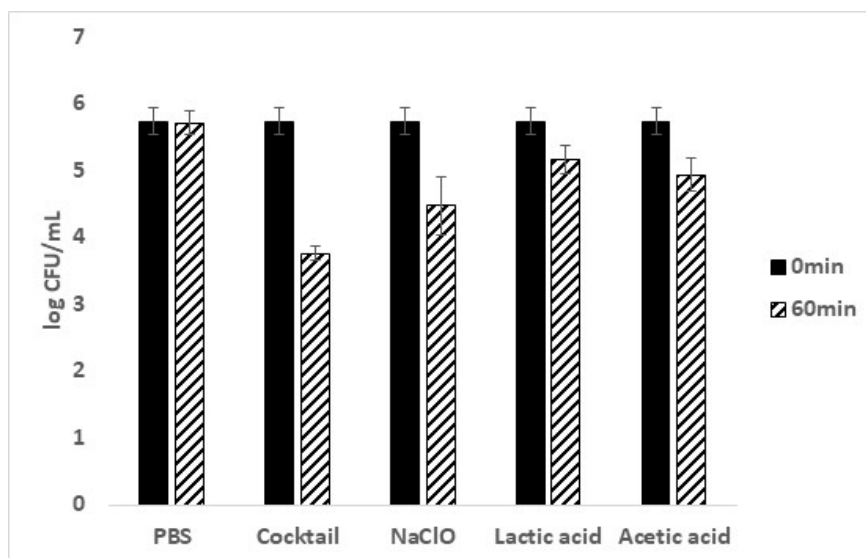
[그림] Reduction of *E. coli* O157 NCCP 13930 counts on Romaine lettuce treated with phage cocktail for 5min. (applied 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL). The statistical significance of all the data was analysed with Student's t-test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

4. 기존 살균제와 생육억제 특성 비교 분석

○ 제 I 혼합액의 효능을 다른 살균제와 비교 분석하기 위해, 생물학적 제재로 가장 많이 사용되는 NaClO, Lactic acid, Acetic acid와 처리효과를 시험관상에서 비교하였음. Exponential phase 까지 배양한 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930을 원심분리하여 각 살균제 및 PBS buffer를 1mL씩 1시간동안 처리하였음. NaClO는 100ppm, Lactic acid와 Acetic acid는 1%씩 처리하였음. 반응

이 끝나면 다시 원심분리하여 PBS로 2회 washing EMB agar에 십진희석하여 spreading해주고 37°C에서 24시간동안 배양하고 colony를 계수하여 log CFU/mL로 변환하여 결과를 확인하였음. 실험은 3회반복 실시하였고, PBS treatment group을 negative control로 하여 unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단함.

실험결과, 제 I 혼합액 (phage cocktail)이 약 2 log CFU/mL의 저감으로 가장 저감효율이 높았으며 NaClO (1.26 log CFU/mL), Acetic acid (0.8 log CFU/mL), Lactic acid (0.58 log CFU/mL) 순으로 저감화 효과가 나타났음. 이는 제 I 혼합액이 기존의 생물학적 제재에 비해서 우수하다는 것을 의미하며, lytic phage가 Lysis from without 효과가 있다는 점을 감안하였을 때 기존 제재들에 비해서 응용성 측면에서도 더 우수할 것으로 사료됨. 또한 phage가 산에 어느 정도 내성을 가지고 있다는 점을 감안하였을 때, 제품화 시 효과가 좋았던 acetic acid와 혼합하여 사용하는 것 또한 의미가 있을 것으로 사료됨.



[그림] Effect of reducing *E. coli* O157 H7 NCCP 13930 using phage cocktail and various sanitizer for 1h. Each experiment was performed in triplicate, and the bars indicate standard deviations.

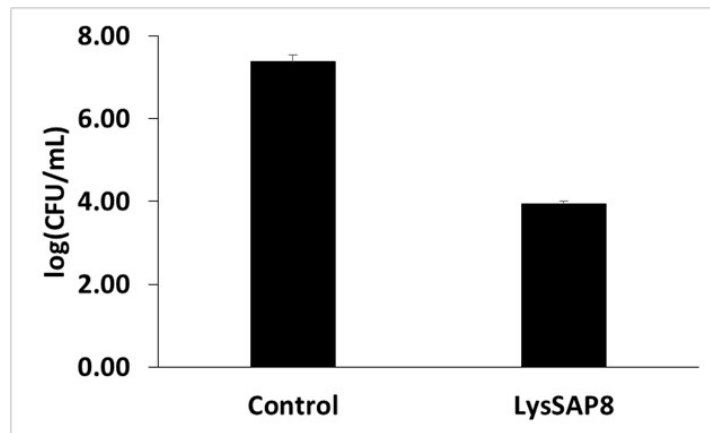
제6장. 박테리오파지 및 endolysin의 위생처리제 확립과 현장 평가

1절. 제 II 혼합제(Endolysin)에 대한 식중독 세균에 대한 식품에서 생육 억제 평가와 조건 확립

1. 제 II 혼합제에 대한 식중독 세균의 제어 효과

○ LysSAP8의 식품 적용을 위해 이전 실험에서 최적 조건을 알아내었고, 이를 이용해 Planktonic cell (부유미생물)을 대상으로 한 최적 조건에서의 용균 능력을 평가하였음. Exponential phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl₂, pH8.0)로 2회 washing해주고 EP tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 EP tube에 endolysin의 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시켜줌. 이후 반응이 끝난 균은 endolysin을 제거하기 위해 원심분리하고 0.85% Saline으로 washing해주고 10진 희석해주어 LB agar에 spreading 하여 37°C에서 24시간동안 배양하였음. 배양이 끝나면 각각의 배양접시의 colony수를 세어 용균능력을 평가하였다. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였음.

○ 실험결과, 초기농도(Negative control) 7.39 log CFU/mL에서 3.46 log CFU/mL로 약 3.93 log CFU/mL 만큼의 균의 감소효과를 보였음. 흡광도로 LysSAP8의 용균능력을 확인한 이전 실험과 다르게 Cell viable count를 이용해 균수를 직접 측정하였기 때문에 신뢰도가 높은 결과이고, 최적조건하에서 30분 만에 약 3.93 log CFU/mL의 매우 높은 효율의 용균력을 보였기 때문에 본 실험을 기반으로 식품 유래 *S. aureus*에 LysSAP8을 적용한다면 효율적으로 균의 억제가 가능할 것으로 사료됨.



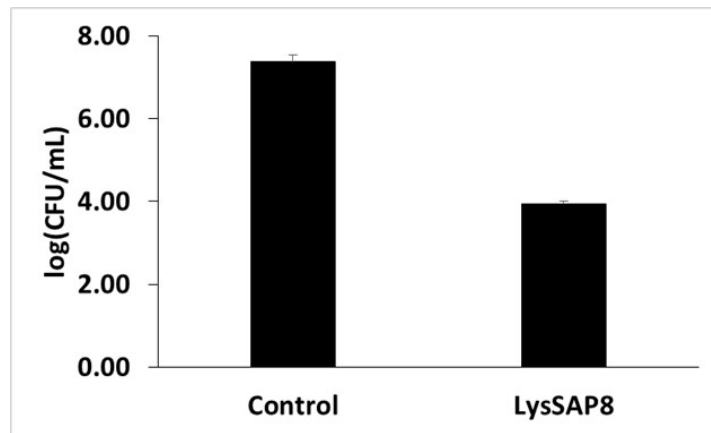
[그림] Lysis capabilities of LysSAP8 under the optimized condition. The data are presented as means of the standard deviations of triplicate assays.

2. 신선 농식품에 대한 제 II 혼합제 평가

가. Endolysin의 식품적용을 위한 독성평가

○ 선행된 연구에서 최적조건으로 사용한 buffer인 Tris-HCl은 인체에 해로울 수 있어 실제 식품에 사용하기 위한 용매로는 적합하지 않음. 따라서 Tris-HCl 보다 좀 더 식품적용에 적합하다고 알려진 용매인 DPBS로의 용매전환을 위해 DPBS에 녹인 LysSAP8을 CaCl₂를 DPBS에 첨가한 용액으로 buffer를 바꾸어준 뒤 용균능력을 비교하였음. Exponential phase까지 키운 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하고 Tris-HCl 과 DPBS로 2회 washing 해주고 180uL씩 96-well plate에 분주하고 buffer를 바꿔준 endolysin과 기존의 endolysin 20uL를 각각 최종 농도가 1uM 이 되도록 분주하여 30분 동안 30°C에서 반응시킨 뒤, UV spectrophotometer를 이용해 OD₆₀₀ 값을 측정하였음. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과와 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단함.

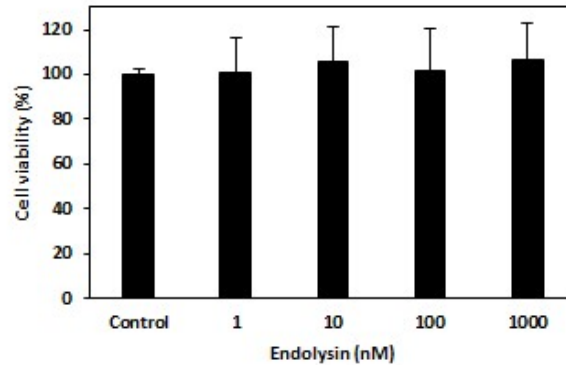
○ 실험결과, Tris-HCl을 용매로 한 LysSAP8과 DPBS를 용매로 한 LysSAP8간의 용균능력의 차이가 유의한 수준만큼 차이가 나타나지 않았음. 이는, DPBS를 용매로 사용하더라도 LysSAP8의 단백질 안정성 및 활성에 영향을 주지 않는다는 것을 의미하며 LysSAP8의 식품상에서의 *S. aureus*의 응용가능성이 충분하다고 사료됨.



[그림] Lysis activities of the LysSAP8 in DPBS. The data are presented as means of the standard deviations of triplicate assays.

○ 식품적용에 앞서 LysSAP8의 세포독성 여부를 평가하기 위해 Macrophage RAW 264.7 (KCLB, No. 40071)을 Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene) 에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY)와 1% penicillin (Gibco, NY)가 함유된 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였음. 배양한 200uL의 Macrophage (1x10⁶ cells/mL)를 seeding하여 96-well plate에 37도에서 2시간동안 부착시켰음. 이후 plate를 DPBS로 2회 washing 해주고 180uL의 culture media와 20uL의 LysSAP8을 cell이 부착된 plate에 분주한 뒤 37°C에서 24시간 동안 배양하였음 (최종농도 1, 10, 100, 1000nM). Cytotoxicity를 평가하기 위해 cell viability를 확인하였고 cell proliferation reagent로 WST-1 (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하였으며 10uL의 WST-1을 24시간 배양된 plate에 첨가하고 37°C에서 4시간동안 반응 후 UV spectrophotometer를 이용해 OD₄₄₀ 값을 측정하였음. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였음.

○ 실험결과 LysSAP8에 의해 유의한 수준의 cell viability의 차이가 나타나지 않았으며 1000nM의 농도에서도 마찬가지였음. 이는 LysSAP8에 의해 RAW264.7 cell의 생장이 영향을 거의 받지 않았음을 의미하며, LysSAP8의 식품 적용시 세포 독성이 나타날 가능성이 높지 않을 것으로 사료됨.

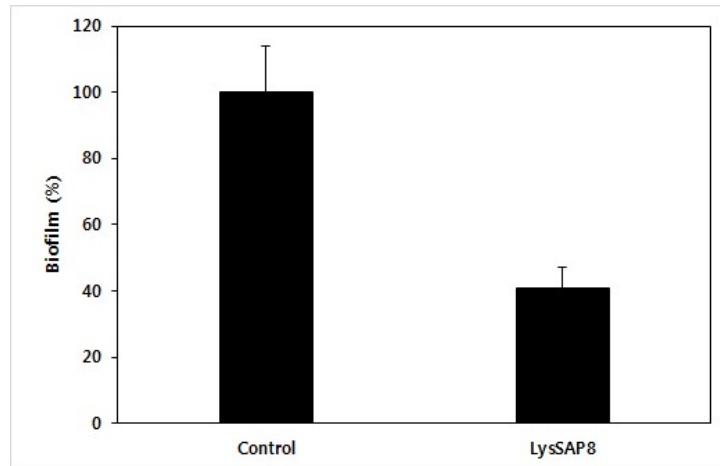


[그림] Cytotoxicities of the LysSAP8 with macrophage RAW264.7. The data are presented as means of the standard deviations of triplicate assays.

나. 제 II혼합액 (Endolysin)의 바이오필름 제어효과

○ 신선농식품 상에서 병원균이 문제가 되는 주요 원인중 하나는 바이오필름임. 바이오필름을 형성한 미생물은 Extracellular polymeric substances (EPS)를 분비하여 미생물을 보호하기 때문에 여러 가지 살균소독제에 내성을 가지게 됨. LysSAP8의 바이오필름 제거능을 확인하기 위해 Exponential phase까지 키운 *S. aureus* newman을 200uL의 1% glucose가 첨가된 TSB에 접종하여 96-well plate에 37°C에서 48시간동안 배양하였음. 배양이 끝난 뒤 DPBS를 이용하여 상등액을 버리고 washing 해준 뒤, 60°C에서 1시간동안 바이오필름을 고정하였음. 고정이 끝난 바이오필름에 LysSAP8 1uM을 접종하여 30분간 30°C에서 반응시켰음. 반응이 끝난 뒤 LysSAP8을 제거하고 DPBS로 washing 해준 뒤, 200uL의 0.1% crystal violet으로 상온에서 10분간 바이오필름을 염색시켜주었다. 염색이 끝난 뒤 DPBS로 2회 washing하여 부착된 crystal violet을 제거하고 33% acetic acid으로 남아있는 바이오필름을 용출시키고 UV spectrophotometer를 이용해 OD₅₉₅ 값을 측정하였음. 실험은 9회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과와 P-value가 0.01 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였음.

○ 실험결과, 30분의 LysSAP8 1uM의 처리로 DPBS 처리군(Negative control)와 비교하였을 때 약 60%의 바이오필름 제거능을 나타내었음. 이러한 결과는 LysSAP8이 Planktonic cell 뿐만 아니라 신선농식품 상에서 자주 발생하는 바이오필름 생성 *S. aureus* 또한 제거가 가능하다는 것을 의미함.

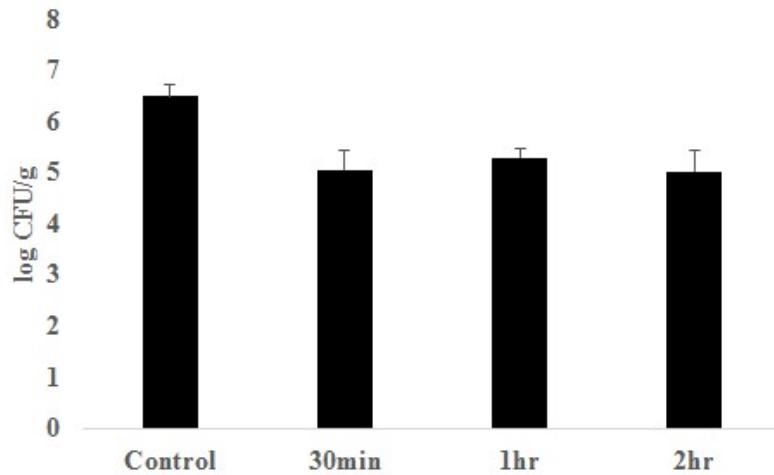


[그림] Biofilm reducing activities of LysSAP8. The data are presented as means of the standard deviations of triplicate assays.

다. 제 II혼합액 (Endolysin)의 식품 상에서의 바이오필름 제어효과

○ 신선농식품에서 바이오필름을 인위적으로 생성한 뒤 LysSAP8의 바이오필름 제거능을 cell viable count를 통해 평가하였음. 양배추를 잘라 70% 알코올에 담가 5분간 소독하여 잡균을 제거한 뒤 건조시키고 5g씩 무게를 재서 분류함. *S. aureus* Newman을 TSB에 Exponential phase 까지 배양하고 원심분리한 뒤 DPBS로 washing 2회를 실시함. Washing한 균을 6-well plate에 1.5mL씩 분주하고 5g의 양배추를 담가 37°C에서 48시간동안 배양하였음. 배양이 끝난 뒤 양배추를 Saline에 2회 washing 해주고 LysSAP8 100nM에 30분, 1시간, 2시간 동안 담가 반응시켰음. 반응이 끝난 양배추는 Saline에 2회 washing 해준 뒤, 25mL의 Saline에 넣고 stomaching 해준 뒤, 용액만을 얻어내어 십진희석하여 BPA(Baird parker agar, BD, USA) 배지에 평판도말하고 37°C에서 24시간동안 배양하였음. 배양이 끝난 plate에서 colony수를 세고 log CFU/g으로 환산하여 결과를 확인하였다. 실험은 3회반복 실시하였고, unpaired one-tailed t-test를 통해 실험결과의 P-value가 0.01 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였음.

○ 실험결과 30분, 1시간, 2시간동안 LysSAP8을 처리하였을 때 약 1.2 - 1.5 log CFU/g만큼의 감소효과를 보였고, 30분 - 2시간 처리군 간의 유의한 시간에 비례한 감소효과는 보이지 않았음. 이는 100nM의 LysSAP8의 처리는 바이오필름을 형성한 균을 유의한 수준으로 제어 가능하나, 완전한 제어는 할 수 없고 많은 시간을 처리하더라도 시간에 비례한 효과는 볼 수 없다고 사료됨. 하지만 LysSAP8은 효소이기 때문에 실제 식품에서 존재하는 초기 바이오필름 형성시의 균 농도인 3 - 4 log CFU/mL의 균에 적용한다면 더 높은 균 감소 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각됨. 따라서 이번 실험 및 선행된 실험을 고려하였을 때 제 II 혼합제인 LysSAP8를 단독 사용은 *S. aureus*를 제어하는데 매우 적합하나, 좀 더 강하고 안전한 살균소독제를 개발하기 위해서는 유기산 또는 박테리오신과 혼합사용하는 방향도 고려하는 것이 효율적일 것으로 사료됨.



[그림] Reduction of *S. aureus* Newman counts on chinese cabbage treated with LysSAP8 (applied 100nM). The data are presented as means of the standard deviations of triplicate assays.

2절. 각 위생처리제의 제품화 및 현장 평가 지원

1. 제 I 혼합제의 제품화를 위한 propagation host 균주 선정

○ 비록 Phage cocktail의 host가 *E. coli* O157:H7 균주더라도, propagation 이후 LPS 또는 시가독소가 phage propagation 용액에 잔존해 있을 수 있기 때문에 host를 비병원성 *E. coli*로 선정하여야 한다. Propagation을 위한 host 균주는 안전성뿐만 아니라 효율적으로 phage수를 늘릴 수 있어야 하며 제품화시, propagation 시간 및 접종비율을 최적화해야한다. 따라서 첫 번째로 host에 따른 phage의 infection 효율을 알 수 있는 Efficiency of phage (EOP) test를 double layer spot assay를 통해 확인하였다. 두 번째로 host와 phage 비율 및 배양 시간을 조정하는 실험을 위해 원래 host인 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930과 E23A의 Propagation 효율 차이를 확인하기 위해 phage ECP26과 ECP32를 200mL LBC broth에 1mL 씩 접종 후 exponential phase까지 배양 하였다. 배양 후 10^8 PFU/mL 농도의 phage lysate를 접종하여 4시간동안 150rpm, 37°C 조건으로 propagation을 진행하고 배양액을 0.22um filter로 여과 하여 propagation된 용액을 Plaque assay method를 이용해 역가를 측정하였다. 세 번째로 *E. coli* O157:H7 균주 두 가지와 E23A의 gDNA를 Genomic DNA prep kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 추출한 뒤 VT1, VT2 primer를 이용한 PCR을 통해 독소유전자 유무를 확인하였다.

○ antigen negative 균주를 선별하여 EOP를 확인한 결과, cloning strain에서는 0.4~0.6정도의

EOP를 나타냈고, 14개 wild type중 5개 strain에서는 infection이 되지 않았다. 9개 wild type 중 돼지고기 유래 *E. coli*인 ECO23(E23A) 균주가 0.97로 EOP가 가장 높게 나타났다. Propagation 효율 차이 및 최적화 조건 실험결과, *E. coli* O157:H7 NCCP 13930과 E23A간의 propagation 효율 차이가 거의 나지 않았고 exponential phase까지 키운 *E. coli* 200mL에 log 10⁸ PFU/mL의 phage lysate용액을 접종하여 propagation을 4시간동안 150rpm, 37°C 조건으로 propagation을 진행하면 log 8 - 9 PFU/mL의 농도의 lysate 용액을 얻어낼 수 있을 것으로 생각된다. E23A의 시가독소 유무를 확인하기 위해 VT1과, VT2 primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과, positive control 균주 두 가지의 band와 비교하였을 때 target band가 E23A에서는 나타나지 않았다. 이는 E23A가 완전히 독성이 없다고 판단할 수는 없으나 적어도 인체에 매우 위험한 시가독소를 방출하는 유전자는 가지고 있지 않다고 판단은 가능하다. 따라서 3가지 실험 결과로 보았을 때 E23A를 propagation host로 사용한다면 효율적으로 phage cocktail 제품의 대량생산을 할 수 있을 것으로 사료된다.

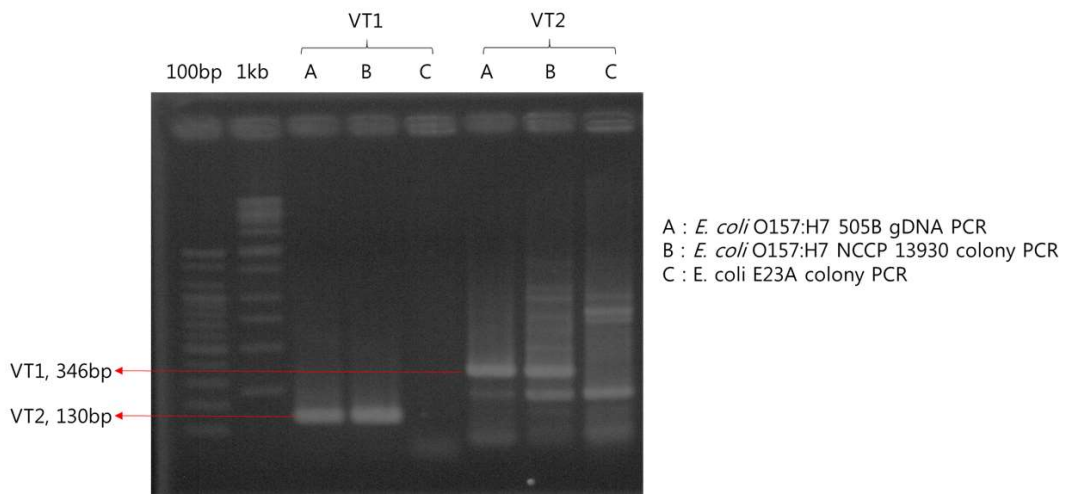
[표] Phage propagation results by liquid lysate methods.

	ECP26	ECP32
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP 13930	8.90	8.69
<i>E. coli</i> E23A	9.30	8.60

단위 : log CFU/mL

[표] Phage propagation results by liquid lysate methods.

E.coli strains	E.coli phage cocktail (LogPFU/ml)	EOP Value	비고	
E.coli NCCP 13930 (O157)	9.90	1.00	Type strain	
E-12A (gimbab isolate)	0.00	0.00	Wild type	
E-13A (gimbab isolate)	0.00	0.00		
E-14A (gimbab isolate)	0.00	0.00		
E-15A (gimbab isolate)	0.00	0.00		
E-17A (gimbab isolate)	3.00	0.30		
ECO06 (chicken isolate)	3.00	0.30		
ECO09 (burger isolate)	4.00	0.40		
ECO10 (beef isolate)	4.60	0.46		
ECO13 (beef isolate)	4.00	0.40		
ECO14 (pork isolate)	5.00	0.51		
ECO15 (chicken isolate)	5.30	0.54		
ECO17 (oyster isolate)	3.00	0.30		
ECO23 (pork isolate)	9.60	0.97		
C41(DE3)	5.00	0.51		Cloning strain
DH5a	4.00	0.40		
BL21(DE3)	6.00	0.61		



[그림] Shigga toxin gene detection using colony PCR. (using VT1, VT2 primer)

제 2 협동기관 : 서원대학교

제7장. Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출을 위한 연구

1절. 기 구축된 2 종의 식중독 세균에 대한 각각의 박테리오파지 cocktail 조제를 위한 기초 연구

1. Phage amplification의 적용을 위한 phage cocktail의 조건 및 필요성

○ 본 연구과제의 최종 목표인 식중독균 신속검출 kit화와 위생처리제를 개발하기 위해서는 표적으로 삼은 식중독균종에 대해 최대한 많은 strain에 대해서 적용이 가능하고, 식품을 비롯한 다양한 환경에 안정성이 높은 phage를 선별하는 것이 중요함. 그러나 같은 균종에 대해 infection이 되는 phage들끼리도 host spectrum이 상이하고 각각의 환경에 대한 안정성이나 식중독균을 제어하는 정도가 다르기 때문에 phage amplification의 적용 시 개별파지를 단독으로 적용하는 것보다 phage cocktail을 제조하여 적용하는 것이 훨씬 효과적인 결과를 얻을 수 있음.

○ 이는 본 과제와 관련하여 제 1 공동기관에서 bacteriophage를 분리하여 특성 분석한 결과에서도 3주의 선별 *E. coli* phage와 이전 연구결과에서 얻은 기 라이브러리의 4주의 phage의 개별 파지의 숙주저해범위와 환경 조건별로 안정성 정도가 다름을 확인하였으며, *E. coli*균의 생육제어 실험 시 단독 phage 처리 시보다 cocktail 상으로 처리하는 것이 더 오랜 시간 동안 강하게 제어되는 것이 확인할 수 있었음. 그러므로 phage amplification 적용 시 phage의 cocktail 제조가 필요함.

2. *Escherichia coli* phage의 cocktail의 제조

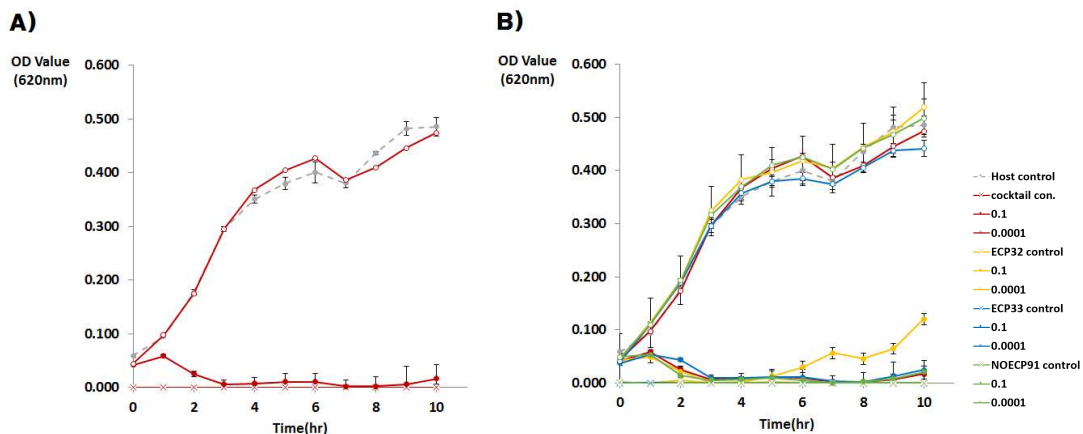
○ *E. coli*에 대한 phage cocktail 제조를 위해 plaque morphology 및 숙주저해범위, 환경에서의 안정성, *E. coli*에 대한 제어정도의 특성을 고려하여, 본 연구 과제에서 선별된 3주의 phage인 ECP32, ECP33, NOECP91외에도 본 연구실에서 이전 연구결과에서 얻은 기 파지라이브러리에 서 특성이 좋았던 4주의 phage 중 ECP26, ECP27 및 NOECP43을 추가하여 총 6주의 phage를 이용하고자 함. cocktail 제조방식은 phage propagation을 통해 얻어진 각각의 phage solution을 titer를 측정하고, 6주의 phage를 log값 수준에서 동일한 승수로 맞춘 다음 1:1 비율로 혼합하여 cocktail을 제조하였으며, 제조한 cocktail의 승수확인한 후 적용실험에 사용함.

3. *E. coli* bacteriophage cocktail의 MOI에 따른 *E. coli*의 생육억제

○ 3주의 선별 *E. coli* phage로 제조한 phage cocktail에 대하여 *E. coli*의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에다 200 μ l의 LBC broth를 담은 후, 각각 대수 증식까지 배양한 *E. coli* 3주(*E. coli* O157:H7 NCCP 13930, *E. coli* O179 NCCP 13934, *E. coli* O103 NCCP 13937)를 개별로 접종함. 여기에 MOI 0.1과 MOI 0.0001의 수준으로 phage cocktail 용액을 접종한 후 37°C의 배양기에 150rpm으로 교반하며 배양하여 시간에 따른 생육 정도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정함.

○ 96-well count plate 상에서 선별 *E. coli* phage로 제조한 phage cocktail에 의한 *E. coli*의 생육억제를 10시간 동안 알아본 결과는 다음 그림과 같음. 3주의 *E. coli* type strain에 대해 MOI 0.1과 0.0001의 두 가지 MOI 조건으로 실험하였으나, MOI 0.0001의 경우에는 표적으로 삼았던 3주의 *E. coli* control과 유사하거나 20% 미만의 낮은 감소율을 보여 생육제어가 되지 않았음.

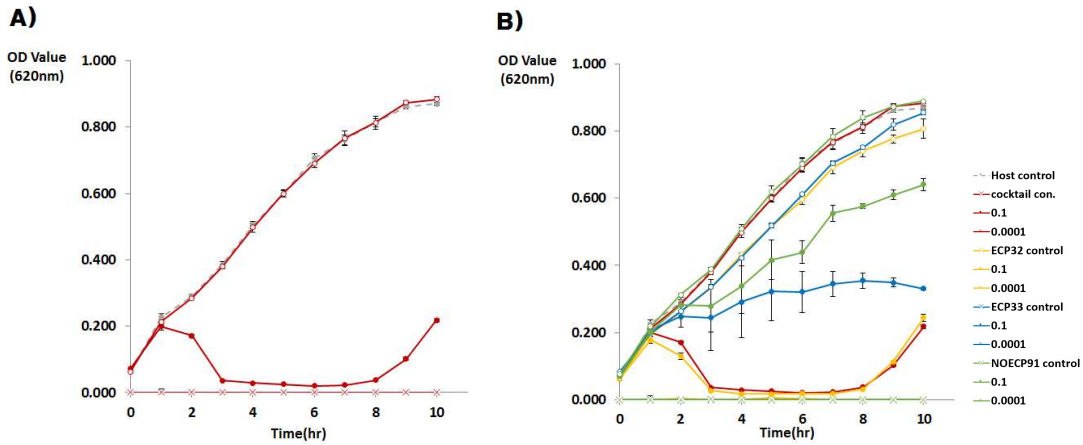
○ MOI 0.1 수준에서 개별 파지의 생육제어 정도를 살펴본 경우에도 host strain 별로 생육억제 정도가 다소 상이하였음. 또한 단독으로 처리한 경우보다 phage cocktail 형태로 처리할 경우 각각의 host strain에 대해 개별파지 처리 시 가장 제어가 잘 되었던 파지의 제어 정도와 유사한 패턴으로 장시간동안 균의 생육을 제어하였으며, 특정 균에 대해 제어능이 많이 떨어지는 파지가 섞였음에도 해당 파지를 단독으로 처리하였을 때보다는 높은 감소율을 보이는 것으로 보아 infection이 잘되는 파지가 막을 뚫으면서 infection이 잘 안 되는 파지들의 유입을 보다 쉬게 해주어 cocktail 제조 시 개별 파지의 농도는 낮아짐에도 가장 제어능이 높았던 파지의 패턴과 유사하게 나오는 것이라 사료됨. 따라서 phage application 기법에 단독 파지보다 cocktail을 사용하는 것이 더 다양한 균에 대해 효과적으로 작용할 것으로 보임.



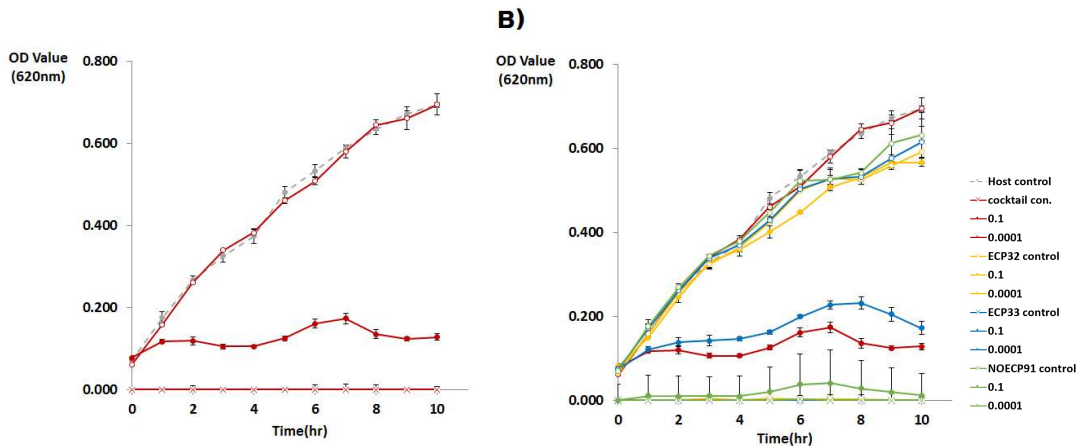
[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O157:H7) NCCP 13930

A) Phage cocktail, B) Compared with individual phage(total data)

0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O179) NCCP 13934
 A) Phage cocktail, B) Compared with individual phage(total data)
 0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001



[그림] Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* (O103) NCCP 13937
 A) Phage cocktail, B) Compared with individual phage(total data)
 0.1: MOI 0.1, 0.0001: MOI 0.0001

2절. 신규 및 기 박테리오파지의 virucidal agents의 생육 특성 변화

1. phage amplification에 적용할 virucidal agents 선정

○ Phage amplification assay는 박테리오파지의 높은 숙주 특이성을 이용하는 것으로 박테리오파지가 숙주를 감염시킨 후 용균성 생활환(lytic cycle) 후 숙주를 사멸시키면서 만들어지는 plaque

의 형성 유무를 확인하여 하는 방법임. 본 과제에서의 개발목표 중 하나인 식중독균 신속검출을 위한 phage kit 개발에 있어 Phage amplification 기법을 적용하고자 하며, 이 경우 표적으로 하는 균주에 대해 phage가 감염되고 나면, 외부에 잔류하고 있는 phage를 제거해주기 위하여 virucidal agents가 필요함.

○ 외부 phage를 제거하기 위해 사용할 virucidal agent로는 Lee Y.D, (2011), Biocontrol and Detection of *Cronobacter sakazakii* by using bacteriophages의 문헌을 참고하여 Ferrous ammonium sulfate((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O)를 사용함.

2. *E. coli* bacteriophage 의 Virucidal agents의 처리 시간에 따른 영향

○ virucidal agent로 선정한 Ferrous ammonium sulfate(FAS, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O)가 외부 파지를 완전히 제거하는지를 파악하기 위하여, 선별된 6주의 *E. coli* phage(ECP26, ECP32, ECP33, NOECP32, NOECP43, NOECP91)와 1.2의 방법으로 제조된 phage cocktail에 20%로 제조한 FAS와 각각 1:1비율로 처리하여 최종 10% FAS에 대해 0min, 10min, 30min간 처리한 후 십진희석하고 각 phage의 host strain에 대해 plaque assay를 통해 제어 여부를 분석함.

○ 그 결과, 선별된 6주의 개별파지 및 그 cocktail 모두 초기 평균 약 8 log PFU/mL에서 10% FAS 처리 직후인 0min때부터 plaque를 관찰하지 못하여, 10% FAS에 대해서 수용액 상태에서 만난 phage는 모두 제거되는 것으로 보임.

[표] Viability loss of bacteriophage isolates by 10% ferrous ammonium sulfate

host	<i>E. coli</i> phage	Inoculation titer (log PFU/mL)	250mM Ferrous ammonium sulfate		
			0min	10min	30min
<i>E. coli</i> NCCP 13930	ECP26	7.70	-	-	-
	ECP32	7.72	-	-	-
	ECP33	9.06	-	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13937	NOECP32	7.70	-	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13934	NOECP43	9.02	-	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13937	NOECP91	8.18	-	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13930	Phage cocktail	8.72	-	-	-

3. *S. aureus* bacteriophage 의 Virucidal agents의 처리 시간에 따른 영향

○ *E. coli* phage와 마찬가지로 본 과제와 관련하여 제 1 공동 기관인 가천대학교에서 분리한 11주의 *S. aureus* phage(SAP82 - SAP92) 또한 virucidal agent로 선정된 Ferrous ammonium sulfate(FAS, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)에 의해 외부 파지를 완전히 제거하는지를 파악하기 위하여, 11주의 개별 *S. aureus* phage와 1.2의 방법으로 제조된 phage cocktail에 20%로 제조한 FAS와 각각 1:1비율로 처리하여 최종 10% FAS에 대해 0min, 10min, 30min간 처리한 후 십진희석하고 각 phage의 host strain에 대해 plaque assay를 통해 제어 여부를 분석함.

○ 그 결과, 분리된 11주의 개별 *S. aureus* phage 및 그 cocktail 모두 초기 평균 약 8.24 log PFU/mL에서 10% FAS 처리 직후인 0min때부터 plaque를 관찰하지 못하여, 10% FAS에 대해서 수용액 상태에서 만난 phage는 모두 제거되는 것으로 보임.

[표] Viability loss of bacteriophage isolates by 10% ferrous ammonium sulfate

host	<i>S. aureus</i> phage	Inoculation titer (log PFU/mL)	10% Ferrous ammonium sulfate		
			0min	10min	30min
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	SAP84	7.75	-	-	-
	SAP86	7.70	-	-	-
	SAP87	9.06	-	-	-
	SAP88	8.10	-	-	-
<i>S. aureus</i> KCCM 12103	SAP83	7.73	-	-	-
	SAP85	9.01	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	SAP82	9.02	-	-	-
	SAP89	8.18	-	-	-
<i>S. aureus</i> RN 4220	SAP90	7.80	-	-	-
	SAP91	7.98	-	-	-
	SAP92	8.32	-	-	-
Host cocktail	Phage cocktail	8.24	-	-	-

4. 숙주와 공동 처리에 따른 virucidal agent의 영향

가. 수세과정을 거치지 않은 경우

○ virucidal agent로 선정된 Ferrous ammonium sulfate(FAS)에 표적으로 하는 *E. coli*와 phage cocktail을 공동으로 처리하여 virucidal agent의 영향을 살펴보기 위하여, 표적으로 삼은 *E. coli* NCCP 13937과 음성대조군으로 *S. aureus* KCCM 12103를 각각 7log CFU/mL수준으로 맞추어 약 8 log PFU/mL의 phage cocktail과 1:1비율로 15분간 접종한 후, 20% FAS 접종(최종 6%)하여 0min, 10min, 30min동안 처리함. 이후 십진희석하여 indicator균주를 넣고 LBC soft agar로 증충배양 함(37°C, 150rpm, overnight). 또한, virucidal agent를 0min, 30min 처리 후 희석한 것에 대해 평판도말을 하여 균의 영향 여부도 확인함.

○ 표적 균주인 *E. coli* O103 NCCP 13937의 경우 cocktail 처리에 있어 처리 직후에는 접종한 균수와 유사하게 7 log PFU/mL 정도의 plaque를 확인하였으며, 10분경과시 까지는 약 6.69 log PFU/mL, 30분 처리 시에는 약 5.50 log PFU/mL 정도로 처리 시간이 길어질수록 다소 감소함을 볼 수 있었음. 또한 이 실험의 경우 따로 수세과정을 거치지 않았는데, 음성대조군으로 잡았던 *S. aureus*의 경우에서도 plaque가 관찰됨. 이는 0min의 경우는 바로 indicator균주를 넣어주었다고 하지만, 10분, 30분 처리 시에도 plaque가 나온 부분은 FAS의 농도가 낮았거나, 균과 함께 있음으로서 외부 phage가 잔류할 수도 있음을 보임. 또한 균수측정에 있어 phage cocktail과 FAS를 함께 처리한 경우 처리직후와 달리 30분에서의 균수가 감소한 것을 보여 평판도말 시 cocktail + FAS 용액이 영향을 주는 것으로 사료됨. 따라서 실험방법을 수정하여 FAS 처리 후 원심분리를 통해 균체만을 얻어내어 수세과정을 거치기로 함.

[표] Detection of *E. coli* by bacteriophage cocktail

Host	Condition	Count	6% Ferrous ammonium sulfate		
			0min	10min	30min
<i>E. coli</i> NCCP 13937 (Target)	Phage cocktail + 6% FAS	phage count (log PFU/mL)	7.85	6.69	5.50
	Saline + 6% FAS	bacteria count (log CFU/mL)	7.18	N.A*	1.00
<i>S. aureus</i> KCCM 12103 (N.C)	Phage cocktail	phage count (log PFU/mL)	7.78	3.31	3.48
	+ 6% FAS	bacteria count (log CFU/mL)	8.00	N.A	6.80

* N.A: Not analyzed

나. 수세과정을 거친 경우

○ 10.3.1의 방법을 기준으로 실험하되, FAS의 최종 농도를 10%로 조정하고, FAS처리 후 원심분리(18,000rpm, 1min)와 saline으로 2번의 수세과정을 거치고 십진희석하여 indicator 균주와 함

계 LBC soft agar로 중층배양 함(37°C, 150rpm, overnight). negative control의 경우, 균주를 cocktail과 반응하기 전에 saline으로 수세한 것(W)과 안한 것(C)으로도 경우의 수를 나누어 배지 성분의 유무도 비교함. 또한, virucidal agent를 처리하고 시간별 평판도말을 하여 균의 안정성도 확인함.

○ 결과는 표적 균주인 *E. coli* O103 NCCP 13937의 경우수세과정을 거치지 않았던 10.3.1의 결과와 달리 virucidal agent 처리 30분까지 plaque 수가 7 log에 가깝게 나타나면서도 균수의 경우도 접종한 승수에 유사하게 유지되는 것을 보여 FAS처리에도 균은 안정함을 보임. 음성대조군인 *S. aureus*의 경우에는 0min, 15min, 30min에 대해 진행하였는데, 배양원액상태에서 실험한 경우는 15분까지 약 1 log PFU/mL정도로 phage가 검출되었으나, 처음부터 saline으로 수세를 한 번 거친 경우 15분까지 plaque가 관찰되지 않았음. 따라서 cocktail 및 FAS를 처리하기 전에 수세과정을 거치는 것이 더 좋을 것으로 생각됨.

[표] Detection of *E. coli* by bacteriophage cocktail

Host	Count	Condition	10% Ferrous ammonium sulfate		
			0min	10min	30min
<i>E. coli</i> NCCP 13937 (Target)	phage count (log PFU/mL)	Phage cocktail	7.17 ± 0.08	6.98 ± 0.05	7.05 ± 0.02
		+ 10% FAS			
	bacteria count (log CFU/mL)	Phage cocktail	7.78 ± 0.04	7.74 ± 0.02	7.60 ± 0.07
+ 10% FAS					
		10% FAS	7.30	7.20	8.30

[표] Detection of *E. coli* by bacteriophage cocktail (Negative control)

Host	Count	10% Ferrous ammonium sulfate		
		0min	15min	30min
<i>S. aureus</i> KCTC 1621 (C)	Phage (log PFU/mL)	0.98	1.24 ± 0.24	2.04 ± 0.73
	Bacteria (log CFU/mL)	7.26 ± 0.08	5.06 ± 0.02	4.47 ± 0.11
<i>S. aureus</i> KCTC 1621 (W)	Phage (log PFU/mL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.35 ± 0.48
	Bacteria (log CFU/mL)	6.33 ± 0.19	4.75 ± 0.15	5.37 ± 0.59

제8장. 박테리오파지 용균 효소 분리, 정제와 Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 연구

1절. 박테리오파지 유전체 분석 결과에 대한 생물정보학적 특성분석

○ 가천대에서 Sequencing한 data를 바탕으로 ORF 서열을 아미노산 서열로 바꾼 뒤 NCBI의 BLAST P(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)를 이용하여 ECP26과 ECP32의 Functional group을 확인하였음. ORF와 Database 서열을 비교하였을 때 E value가 0.01 이상인 protein은 제외하였고 hypothetical protein들은 제외하였음.

1. ECP 26과 ECP 32의 Open reading frame(ORFs) 분석

○ ECP26의 ORF를 분석한 결과, structure 형성에 관여하는 protein이 26가지, DNA replication과 regulation에 관여하는 protein이 11가지, 그 밖에 추가적인 기능을 하는 protein 39가지를 규명할 수 있었음. 규명된 76개 protein 이외에 기능을 알 수 없는 protein은 총 148가지로 밝혀졌음. ECP26의 규명된 protein 및 규명되지 않은 protein 모두 rv5-like phage의 protein들과 높은 상동성을 보였음.

○ ECP32의 ORF를 분석한 결과, structure 형성에 관여하는 protein이 15가지, DNA replication과 regulation에 관여하는 protein이 12가지, 그 밖에 추가적인 기능을 하는 protein은 총 139가지로 밝혀졌다. ECP32 또한 규명된 protein 및 규명되지 않은 protein 모두 rv5-like phage의 protein들과 높은 상동성을 보였음.

2. ECP 26과 ECP 32의 Holin 규명

○ ECP26과 ECP32 두 phage 모두 Gram 음성균의 세포벽을 분해하는 phage 유래 용균효소인 Endolysin(lysozyme)과 phage의 lytic cycle에 관여하는 O-spanin과 I-spanin이 발견되었음에도 불구하고, Cell membrane의 용해를 통해 endolysin이 cell wall에 도달할 수 있게 유도해주는 Holin을 규명할 수 없었음. 비록 Holin 없이 endolysin 자체적으로 cell wall 까지 도달하여 bacteria를 용해할 수 있는 능력을 가지는 endolysin도 소수 밝혀졌으나, Gram 음성균 유래 phage들에서 흔히 나타나는 경우는 아니고, endolysin도 Lambda phage의 endolysin과 매우 유사하므로, rv5-like holin이 존재는 하지만 아직 밝혀지지 않은 것으로 추론됨. 따라서 본 연구를 바탕으로 rv5-like phage의 holin을 규명하는 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료됨. 또한 두 phage 모두에서 temperate phage 임을 규명할 수 있는 lysogenic module이 포함되어있지 않아

이 부분에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨.

3. ECP 26과 ECP 32의 tRNA 분석

○ tRNA의 경우 ECP26에서 6개(Pro, Met, Thr, Ser, Tyr, Arg)를 확인하였고, ECP32에서 5개(Pro, Met, Thr, Ser, Arg)를 확인하였음. 이처럼 phage가 compact한 genome속에 tRNA를 가지고 있는 이유는 codon usage와 연관이 있다고 알려져 있음. Host가 만들어 내는 아미노산과 phage가 필요로 하는 아미노산의 구성 차이가 있을 수 있는데, 이 때 phage가 필요로 하는 아미노산이 Host가 만들어 내지 못한다면, phage의 생존에 영향을 줄 수 있음. 따라서 진화적으로 phage는 필수적인 아미노산에 대한 tRNA를 자신의 genome에 가지고 있는 경우가 있으며, 이렇게 tRNA를 가지는 phage들은 tRNA를 가지지 않는 phage들에 비해서 host spectrum이 넓고 EOP가 높은 경우가 대부분임. 이에 따라서 ECP26과 ECP32의 넓은 host spectrum의 이유 중 하나가 tRNA의 보유 때문이라고 판단됨.

[표] Functional groups of ORF in phage ECP26 and homology to proteins in the NCBI database determined by BLASTP.

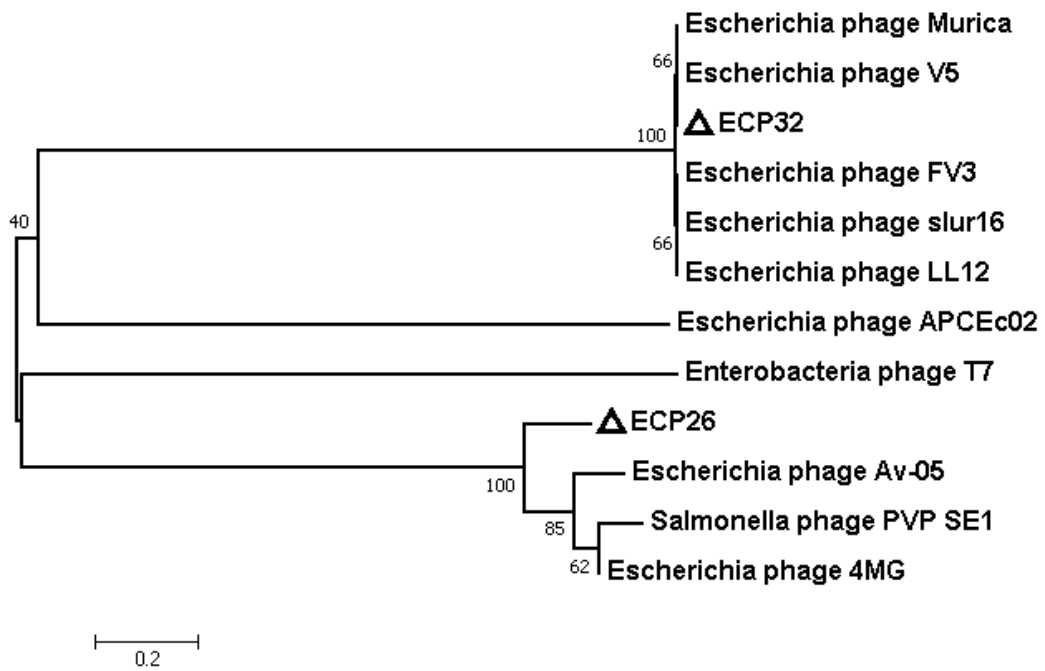
Functional group	Gene	Range	Homologous protein	Identity	E-Value	NCBI accession no.	
Structure	ECP26-DNA_00030	34813 - 36579	tail fiber protein [Escherichia phage IFH2]	98%	1.00E+00	WP_000030196.1	
	ECP26-DNA_00031	36863 - 37507	tail fiber protein [Escherichia phage IV3]	99%	1.00E+00	WP_007006207.1	
	ECP26-DNA_00053	38233 - 38908	putative tail fiber assembly protein [Escherichia phage IV3]	100%	5.00E-140	WP_007006203.1	
	ECP26-DNA_00054	38922 - 39963	putative tail fiber protein [Escherichia phage IV3]	100%	0	WP_007006204.1	
	ECP26-DNA_00057	42745 - 44236	putative baseplate component [Escherichia phage JES2013]	99%	0.00E+00	WP_008530280.1	
	ECP26-DNA_00058	44341 - 48181	tail fiber protein [Phage 203]	100%	0.00E+00	ATW61385.1	
	ECP26-DNA_00063	50186 - 54626	tail fiber protein [Escherichia phage IFH2]	98%	0	AKC42791.1	
	ECP26-DNA_00064	54863 - 57261	putative phage tail fiber protein [Escherichia phage JES2013]	98%	0.00E+00	WP_008530286.1	
	ECP26-DNA_00071	61730 - 64067	tape measure protein [Phage 203]	98%	0.00E+00	ATW61397.1	
	ECP26-DNA_00074	65018 - 65482	structural protein [Escherichia phage V5]	99%	2.00E-109	WP_002002354.1	
	ECP26-DNA_00075	65502 - 66879	tail sheath protein [Escherichia phage Wt EcoM FFH2]	99%	0.00E+00	WP_000177499.1	
	ECP26-DNA_00076	66951 - 67593	structural protein [Escherichia phage APCE d2]	99%	2.00E-132	WP_007434593.1	
	ECP26-DNA_00081	70070 - 71881	major head protein [Escherichia phage JES2013]	100%	0.00E+00	WP_008530303.1	
	ECP26-DNA_00082	71527 - 71592	head stabilization/decoration protein [Escherichia phage JES2013]	99%	0	WP_008530304.1	
	ECP26-DNA_00083	71523 - 72504	head stabilization/decoration protein [Escherichia phage APCE d2]	84%	0	AKC61912.1	
	DNA replication and regulation	ECP26-DNA_00013	6931 - 9170	DNA replicative helicase/primase [Escherichia phage JES2013]	99%	0	WP_008530451.1
		ECP26-DNA_00020	12810 - 13398	putative helicase [Escherichia phage IV3]	99%	8.00E-130	WP_007006384.1
		ECP26-DNA_00033	22317 - 23127	anti-sigma factor [Escherichia phage IV3]	100%	0	WP_007006382.1
		ECP26-DNA_00034	23160 - 24621	putative anti-sigma factor [Escherichia phage APCE d2]	98%	0	AKC61964.1
ECP26-DNA_00086		74619 - 81382	terminase large subunit [Escherichia phage IV3]	100%	0.00E+00	WP_007006235.1	
ECP26-DNA_00102		811661 - 82012	transcriptional regulator [Escherichia phage V5]	97%	9.00E-76	WP_007006243.1	
ECP26-DNA_00103		82059 - 82634	putative transcriptional regulator [Escherichia phage APCE d2]	99%	2.00E-136	AKC61998.1	
ECP26-DNA_00104		82621 - 83932	5'-phosphatase, 5'-polyphosphate kinase [Phage 203]	100%	5.00E-97	ATW61422.1	
ECP26-DNA_00111		86340 - 87824	ATP-dependent DNA ligase [Escherichia phage IV3]	99%	0.00E+00	WP_007006252.1	
ECP26-DNA_00115		89917 - 89382	putative HFH1 endonuclease [Escherichia phage V5]	99%	2.00E-111	WP_002003589.1	
ECP26-DNA_00123		92843 - 93827	putative DNA polymerase/endothecase [Escherichia phage JES2013]	99%	0.00E+00	WP_008530333.1	
Additional functions		ECP26-DNA_00018	11067 - 12411	adenine methyltransferase [Escherichia phage IV3]	98%	0.00E+00	WP_007006386.1
		ECP26-DNA_00021	13447 - 14179	ATP-dependent RecD-like DNA helicase [Escherichia coli O157 typing phage 34]	98%	7.00E-175	AKC47183.1
	ECP26-DNA_00022	14178 - 15384	tIB protector [Escherichia phage V5]	99%	0.00E+00	AE81331.1	
	ECP26-DNA_00023	15394 - 17377	PIIA protector from prophage induced early lysis [Escherichia phage IV3]	98%	0	WP_007006372.1	
	ECP26-DNA_00032	21095 - 21995	putative alpha-1,3-fucosyltransferase [Escherichia phage IV3]	99%	0	WP_007006381.1	
	ECP26-DNA_00024	11373 - 11874	cell wall hydrolase [Escherichia phage Murca]	99%	2.00E-121	AKL44894.1	

[표] Functional groups of ORF in phage ECP32 and homology to proteins in the NCBI database determined by BLASTP.

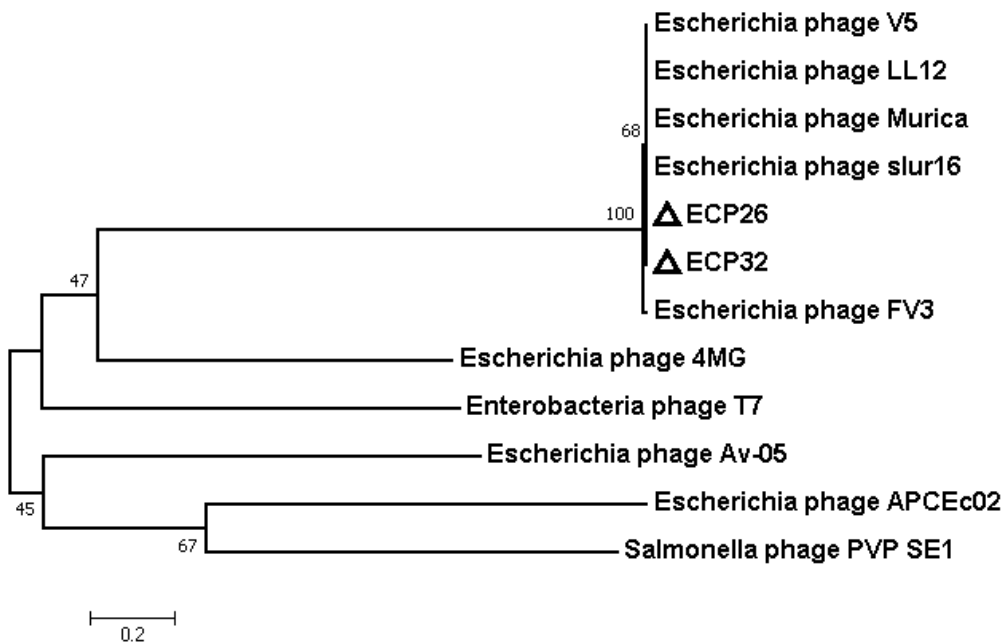
Functional group	Gene	Range	Homologous protein	Identity	E-Value	NCBI accession no.	
Structure	ECP32-DNA_00026	1915.2 - 208.98	tail fiber protein (<i>Escherichia</i> phage V5)	98%	0.00E+00	YP_002003531.1	
	ECP32-DNA_00027	2118.3 - 222.27	tail fiber protein (<i>Escherichia</i> phage PV3)	98%	0.00E+00	YP_007006201.1	
	ECP32-DNA_00029	2264.3 - 232.28	tail fiber assembly protein (<i>Escherichia</i> phage PV3)	100%	5.00E-141	YP_007006203.1	
	ECP32-DNA_00030	2324.2 - 242.83	tail fiber protein (<i>Escherichia</i> phage PV3)	100%	0	YP_007006204.1	
	ECP32-DNA_00033	2706.5 - 285.56	tail plate protein (<i>Escherichia</i> phage JES2013)	99%	0.00E+00	YP_008530281.1	
	ECP32-DNA_00034	2896.0 - 328.06	tail fiber protein (Phage 203)	81%	0.00E+00	ATW61385.1	
	ECP32-DNA_00038	3447.3 - 382.83	tail fiber protein (<i>Escherichia</i> phage Muncal)	96%	0	AJLJ4413.2.1	
	ECP32-DNA_00039	3831.8 - 409.16	phage tail protein (<i>Escherichia</i> phage JES2013)	98%	0.00E+00	YP_007006213.1	
	ECP32-DNA_00046	4538.2 - 477.59	age measure protein (Phage 203)	98%	0.00E+00	ATW61397.1	
	ECP32-DNA_00048	4866.9 - 491.43	structural protein (<i>Escherichia</i> phage V5)	99%	2.00E-109	YP_002003554.1	
	ECP32-DNA_00049	4915.3 - 505.30	tail sheath protein (<i>Escherichia</i> phage FFH2)	99%	0.00E+00	YP_009030962.1	
	ECP32-DNA_00050	5060.2 - 511.54	structural protein (<i>Escherichia</i> phage APCEc02)	99%	4.00E-132	AKO61919.1	
	ECP32-DNA_00055	5372.6 - 547.34	major capsid protein (<i>Escherichia</i> phage Muncal)	99%	0.00E+00	AJLJ4415.0.1	
	ECP32-DNA_00056	5478.4 - 551.71	head stabilization/dissociation protein (<i>Escherichia</i> phage slur 16)	98%	2.00E-84	YP_009177506.1	
	ECP32-DNA_00057	5519.1 - 561.69	head stabilization/dissociation protein (<i>Escherichia</i> phage APCEc02)	98%	0	AKO61912.1	
	DNA replication and regulation	ECP32-DNA_00011	674.3 - 772.1	anti-sigma factor (<i>Escherichia</i> phage FFH2)	98%	0	YP_009030921.1
		ECP32-DNA_00012	775.4 - 921.5	putative anti-sigma factor (<i>Escherichia</i> phage APCEc02)	98%	0.00E+00	AKO61964.1
		ECP32-DNA_00060	5831.4 - 598.62	terminase large subunit (<i>Escherichia</i> phage FFH2)	99%	0.00E+00	YP_009030973.1
		ECP32-DNA_00075	6431.6 - 644.67	putative transcriptional regulator (<i>Escherichia</i> phage slur 16)	100%	5.00E-77	YP_009177520.1
ECP32-DNA_00076		6471.4 - 652.89	phosphohydrolase (Phage 203)	99%	7.00E-136	ATW61421.1	
ECP32-DNA_00077		6527.6 - 656.87	3'-phosphatase, 5'-polynucleotide kinase (Phage 203)	99%	5.00E-97	ATW61422.1	
ECP32-DNA_00084		6919.6 - 704.80	ATP-dependent DNA ligase (<i>Escherichia</i> phage PV3)	99%	0.00E+00	YP_007006252.1	
ECP32-DNA_00088		7157.3 - 720.38	HNH endonuclease (<i>Escherichia</i> phage V5)	99%	2.00E-111	YP_002003589.1	
ECP32-DNA_00096		7549.9 - 764.83	putative DNA polymerase/exonuclease (<i>Escherichia</i> phage JES2013)	100%	0.00E+00	YP_008530338.1	
ECP32-DNA_00108		12341.0 - 126.188	DNA-directed DNA polymerase (<i>Escherichia</i> phage V18)	99%	0.00E+00	AS80553.1	
Additional functions	ECP32-DNA_00199	12624.6 - 128.325	DNA replicative helicase/primase (<i>Escherichia</i> phage PV3)	99%	0.00E+00	YP_007006381.1	
	ECP32-DNA_00205	13073.1 - 132.102	ATP-dependent RecD-like DNA helicase (<i>Escherichia coli</i> O157:H7 phage 14)	99%	0.00E+00	AKL47183.1	
	ECP32-DNA_00001	0 - 1983	RNA protector from prophage-induced early lysis (<i>Escherichia</i> phage PV3)	98%	0.00E+00	YP_007006172.1	
	ECP32-DNA_00002	197.9 - 248.0	cell wall hydrolase (<i>Escherichia</i> phage Muncal)	99%	8.00E-121	AJLJ4409.4.1	
	ECP32-DNA_00004	291.9 - 410.4	Motor ATPase (<i>Escherichia</i> phage FFH2)	99%	0	YP_009030913.1	
ECP32-DNA_00005	410.3 - 437.3	Motor ATPase (<i>Escherichia</i> phage APCEc02)	76%	6.00E-42	AKO61971.1		
ECP32-DNA_00010	570.1 - 660.1	putative alpha 1-3 fucosyltransferase (<i>Escherichia</i> phage PV3)	99%	0.00E+00	YP_007006181.1		
ECP32-DNA_00025	1347.0 - 191.04	iq-like domain protein (<i>Escherichia coli</i> O157:H7 phage 4)	96%	0	AKL4537.1		

4. *Escherichia coli* phage의 비교유전체학 분석

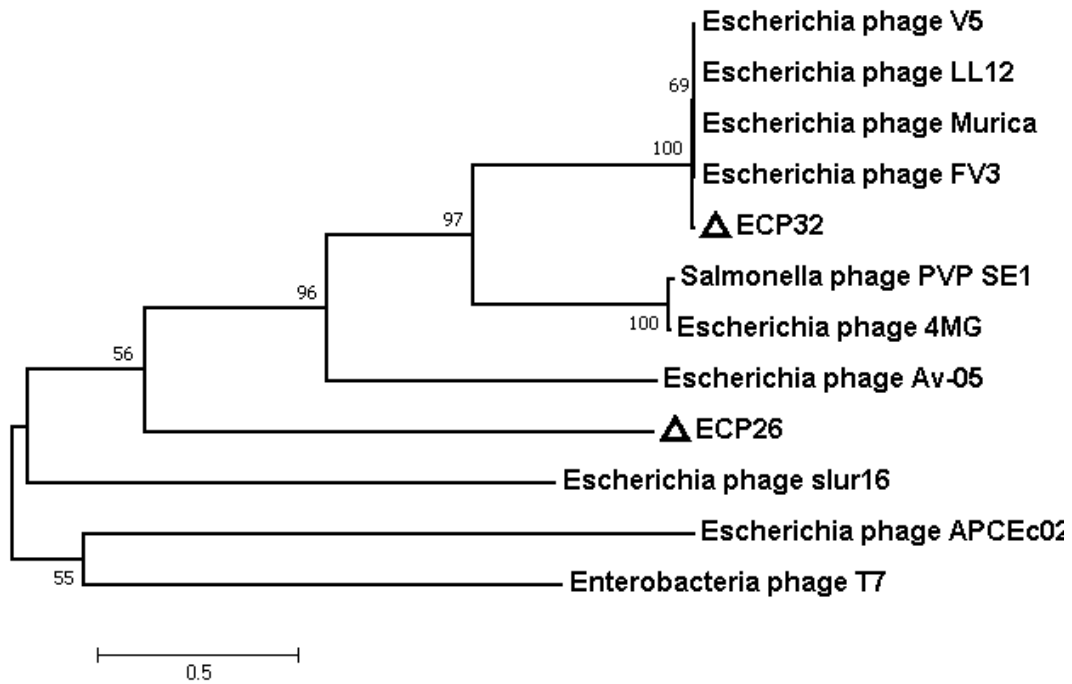
○ ORF 분석을 통한 정보를 바탕으로 phage에서 가장 잘 보존되어있고 핵심적인 단백질인 capsid, endolysin, terminase 3가지의 아미노산 서열을 NCBI에서 BLAST database로부터 확인하였고, 가장 서열이 유사한 rv5-like phage family의 서열과 ECP26, ECP32의 서열을 phylogenetic tree를 통해 유사성을 확인하였음.



[그림] Neighbor-joining tree of *Escherichia coli* phage based on Capsid protein sequences(bootstraps=1000)



[그림] Neighbor-joining tree of *Escherichia coli* phage based on Endolysin protein sequences(bootstraps=1000)



[그림] Neighbor-joining tree of *Escherichia coli* phage based on Terminase protein sequences(bootstraps=1000)

○ Capsid protein의 경우, ECP26과 ECP32의 유연관계가 멀게 나타났으며, ECP32는 *Escherichia* phage V5 와 Murica와 유연관계가 가깝게 나타났음. 또한 두 개 phage모두 *Podoviridae*에 속하는 T7 phage와는 매우 유연관계가 멀게 나타나 확실한 *Myoviridae* family에 속한다는 것을 확인할 수 있었음.

○ Endolysin protein의 경우 ECP26과 ECP32의 유연관계가 매우 가깝게 나타났으며, 실제로 둘의 아미노산 서열차이는 매우 비슷하였음. 또한 ECP26과 ECP32 phage는 규명된 endolysin 중 rv5-like phage의 endolysin인 Lysozyme super family에 속하는 것으로 확인되었으며 실제 유연관계도 매우 가깝게 나타났음. 반면 T7 phage의 endolysin과는 유연관계가 매우 낮게 나타났으며, holin 없이 자체적인 endolysin으로 그람음성균을 효율적으로 억제한다고 알려진 rv5-like phage에 속하는 *Salmonella* phage PVP SE1의 endolysin과는 유연관계가 매우 낮게 나타나 ECP26과 ECP32의 endolysin이 holin없이 작용하기는 어려울 것으로 예상할 수 있었음.

○ Terminase protein의 경우 ECP26과 ECP32의 유연관계가 어느 정도 거리가 있었으며, ECP26의 Terminase가 다른 rv5 phage들에 비해 상동성이 상대적으로 떨어지는 것이 확인되었음. 반면 ECP32의 Terminase는 전형적인 rv5 phage들과 매우 유연관계가 높게 나타났음을 확인 가능했음. 또한 ECP26과 ECP32 모두 T7 phage와는 유연관계가 매우 낮음을 확인 가능했음.

○ 생물정보학적 연구를 통해 분리한 ECP26 phage와 ECP32의 차이점을 판별할 수 있었고,

Myoviridae phage family 중 rv5 like species에 정확히 속하는지 확인가능 했음. 또한 차후에 있을 endolysin 연구에 있어 endolysin의 분리 이전에 특성을 어느 정도 확인하였으며, 추후 단백질 분리과정을 통해 정확한 기능을 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료됨.

2절. Phage amplification을 기반으로 하는 검출법 확립

1. Phage amplification을 기반으로 하는 검출법의 기본 원리

○ Phage amplification을 기반으로 하는 검출법은 기본적으로 phage가 균을 lysis 시키고 밖으로 터져 나오는 점을 이용함. 균을 lysis 시키고 나오는 phage를 검출함을 통해 phage가 lysis시킬 수 있는 균의 유무를 판단할 수 있음.

2. FAS (Ammonium iron(II) sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 처리

○ 균과 phage cocktail 을 1:1로 10min, 37°C 진탕 배양한 용액을 10,000rpm에서 원심분리하여 phage에 감염된 cell을 pellet 형태로 얻음. Pellet 형태의 cell을 FAS용액으로 현탁하면서 직접 처리하는 방식을 이용함. 원심분리를 통해 상등액을 제거함으로써 cell에 부착되지 않은 자유 bacteriophage를 1차적으로 제거할 수 있음.

○ FAS 농도에 따른 자유 bacteriophage의 제거 정도를 확인하기 위해 FAS 농도별로 처리 후 생성된 plaque를 비교함. 그 결과, 10% FAS를 사용 시 target 균에서 더 많은 plaque가 관찰되고 target 균이 아닌 *S. aureus*에서는 plaque가 관찰되지 않았음. 따라서 10% FAS를 사용하는 것이 효율적이라 판단됨.

[표] Detection results according to FAS concentration. - *E. coli*

Host	Count	FAS		
		10%	20%	30%
<i>E. coli</i> NCCP 13930(Target)	phage (log PFU/ml)	3.9	3.14±0.16	2.8
<i>S. aureus</i> KCTC 12103(N.C)		0	0	0.49±0.49

3. Washing solution

○ FAS 처리 후 FAS의 제거 및 FAS에 의해서 불활성화된 bacteriophage를 제거하기 위해서 washing과정을 거침. 이 때, washing시 적합한 solution을 찾기 위해서 균의 배양시 사용되는 10mM $CaCl_2$ 가 첨가된 LB (Luria-Bertani) broth, 증류수와 1X PBS를 사용하여 bacteriophage amplification 검출법을 진행해본 후 그 결과를 비교함.

○ 실험 결과, LBC와 증류수를 washing solution으로 사용할 경우 target으로 하지 않는 *S. aureus*을 대상으로 bacteriophage amplification을 진행했을 때 plaque가 1 log PFU/mL이하로 생성되는 것을 확인함. 1X PBS를 사용한 경우에는 최대 0.5 log PFU/mL이 생성되며, FAS 처리한 용액의 색상이 청록색으로 변하는 특징이 있었음. 따라서 3가지 solution 중 target 균이 아닌 균을 대상으로 적은 plaque가 검출되고 육안으로 pellet을 확인할 수 있는 1X PBS를 washing solution으로 사용함.

[표] The effect of washing solution to non-target bacteria.

Host	Count	washing solution		
		LBC	D.W	1X PBS
<i>S. aureus</i> KCTC 12103 (N.C)	phage (log PFU/ml)	0.44 ±0.24	0.67 ±0.33	0.57 ±0.57

4. phage amplification을 기반으로 하는 검출법을 통해 검출 가능한 *E. coli* 의 최소농도 및 phage cocktail의 최소농도

○ *E. coli* detection시 검출이 가능한 균의 최소농도를 파악하기 위하여 다양한 농도의 균을 이용하여 실험을 진행함. 실험을 통해 균의 농도가 4-5 log CFU/ml이상이 되어야 detection이 가능함을 알 수 있음. 또한 *E. coli* detection시 균을 검출 할 수 있는 bacteriophage의 최소농도를 파악하기 위하여 다양한 농도의 bacteriophage cocktail용액을 이용하여 실험을 진행함 phage cocktail의 농도가 6 log PFU/ml 이상이 되어야 detection이 가능함을 알 수 있음.

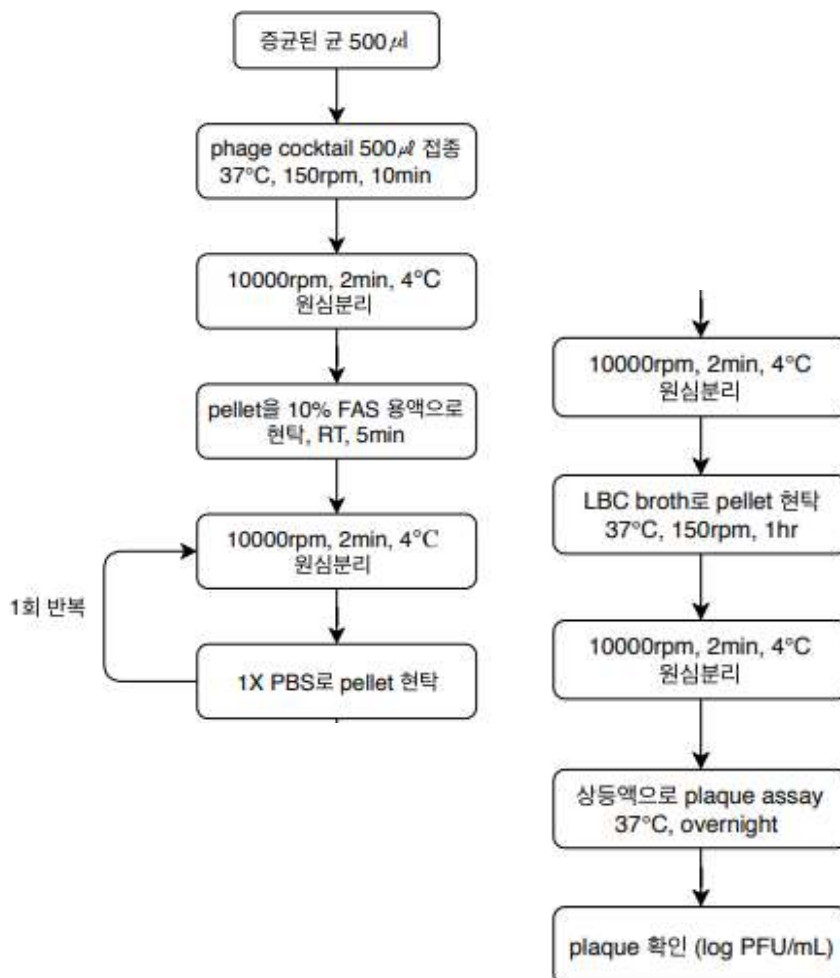
[표] Detection results by bacterial concentration.

Host	Count	phage cocktail					
		8	7	6	5	4	3
<i>E. coli</i> NCCP 13930 (Target)	phage (log PFU/ml)	3.43 ±0.16	3.32	1.20 ±0.1	1.33 ±0.2	0.33 ±0.33	0.33 ±0.33
<i>S. aureus</i> KCCM 12103 (NC)	phage (log PFU/ml)	0.83 ±0.44	0.43 ±0.43	0.43 ±0.43	0.57 ±0.57	0	0

[표] Detection results according to the concentration of the Phage cocktail.

Host	Count	phage cocktail (log PFU/mL)		
		8	6	4
<i>E. coli</i> NCCP 13930 (Target)	phage (log PFU/ml)	3.18 ± 0.38	0.59 ± 0.59	0
<i>S. aureus</i> KCCM 12103 (NC)		0	0	0

5. 전반적인 bacteriophage amplification을 기반으로 둔 *E. coli* 검출방법



3절. 신선 식품으로부터 bacteriophage amplification 검출법 및 기존 PCR법을 이용한 *E. coli* 검출

○ 식품공전의 장출혈성 대장균 검출법에 명시된 증균과정을 기반으로 신선식품에 *E. coli*를 인위적으로 접종하여 검출함. 최종농도가 약 1, 3 log CFU/mL이 되도록 *E. coli* NCCP 13930을 접종한 sample들을 37±2 °C에서 배양하며 1, 3, 6 시간마다 *E. coli*의 선택배지인 EMB 배지를 이용하여 대장균수를 측정함. 또한 배양액을 이용하여 bacteriophage amplification 검출법을 통해 검출함. 음성대조군으로 *E. coli* 대신 *S. aureus* KCCM 12103을 접종하여 결과를 비교함.

○ Bacteriophage amplification 검출법과 PCR을 이용한 검출결과를 비교하고자 6시간 배양액을 boiling 하여 DNA를 추출한 후 shiga toxin 1 (F: GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG- R: AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA)과 shiga toxin 2 (F: TTA ACC ACA CCC ACG GCA GT- R: GCT CTG GAT GCA TCT CTG GT) 를 검출할 수 있는 primer를 이용하여 PCR을 진행함. PCR 진행 후에는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동 후 target band의 크기를 확인함 (stx 1: 130bp, stx 2: 346bp).

○ 기존의 PCR 법을 이용한 검출결과와 bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *E. coli*를 검출할 수 있었음. 두 방법 모두 전통적인 배양법보다 소요되는 시간이 짧고 특이적으로 *E. coli*만 검출할 수 있다는 장점이 있지만 PCR법은 별도의 기기 및 특정 primer를 필요로 함.

1. 양상추

○ 양상추를 대상으로 증균 및 bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *E. coli*를 검출함. Bacteriophage amplification 검출법의 검출 가능한 균의 최소농도인 4-5 log CFU/mL까지 증균시키는데 평균적으로 6시간 이상이 소요되는 것으로 보임. 6시간 증균시 초기 승수가 약 1 log CFU/mL 인 샘플과 약 3 log CFU/mL인 샘플은 각각 약 5 log CFU/mL와 약 7 log CFU/mL로 증균됨. 또한 음성대조군으로 *E. coli* 대신 *S. aureus* KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 *E. coli*가 검출되지 않음.

○ Bacteriophage amplification 검출법을 통해 증균된 샘플용액에서 *E. coli*를 검출한 결과는 약 5 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 1 log PFU/mL의 plaque가 형성되었고 약 7 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 3 log PFU/mL의 plaque가 형성되는 것을 통해 인위적으로 접종한 *E. coli*를 검출함. 음성대조군으로 *S. aureus* KCCM 12103을 접종하여 배양한 샘플은 약 0.4 log PFU/mL의 plaque가 형성됨.

○ PCR을 진행한 결과에서는 초기 승수가 약 1 log CFU/mL인 샘플과 약 3 log CFU/mL인 샘플 모두에서 target band인 130bp와 346bp가 모두 검출되었다. 음성대조군으로 *S. aureus*

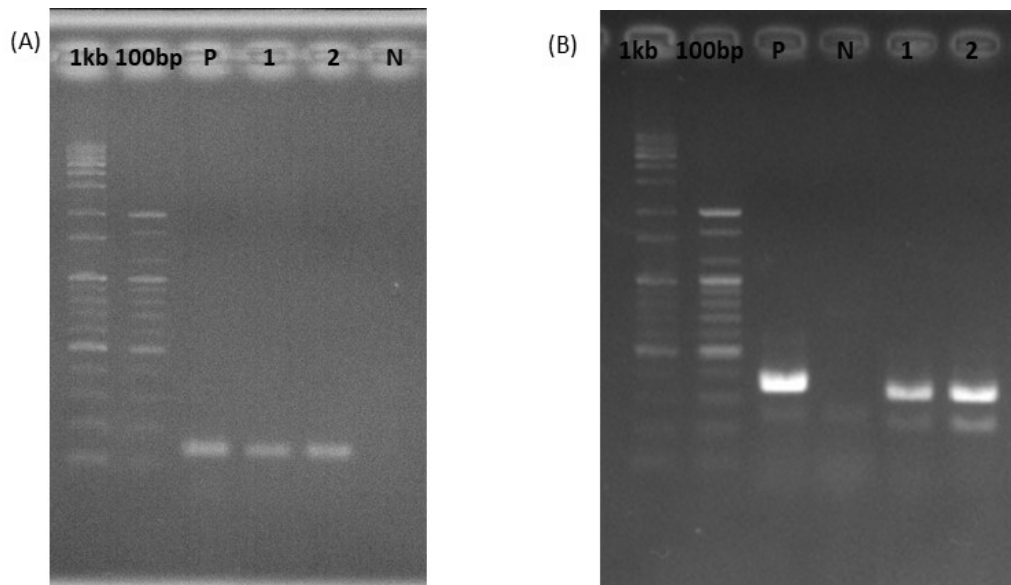
KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 target band가 검출되지 않음.

[표] Enrichment of *E. coli* NCCP 13930 after 6hr incubation (lettuce).

Initial concentration (log CFU/mL)	after 6hr enrichment (log CFU/mL)
1	5.78
3	7.44

[표] Bacteriophage amplification assay after 6hr incubation (lettuce).

log CFU/mL (initail concentration)	log PFU/mL
5.78 (1)	1.94 ± 0.32
7.44 (3)	3.30 ± 0.09
Negative control	0.434 ± 0.434



[그림] PCR of the enriched samples (lettuce) (A) stx 1 (B) stx 2
P: *E. coli* 13930 DNA, 1: initial concentration 1 log CFU/mL, 2: initial concentration 3 log CFU/mL, N: *S. aureus* 12103

2. 방울토마토

○ 방울토마토를 대상으로 증균 및 bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *E. coli*를 검출함. Bacteriophage amplification 검출법의 검출 가능한 균의 최소농도인 4-5 log CFU/mL까지 증균 시키는데 평균적으로 6시간 이상이 소요되는 것으로 보임. 6시간 증균시 초기 승수가 약 1 log CFU/mL 인 샘플과 약 3 log CFU/mL인 샘플은 각각 약 4 log CFU/mL와 약 5 log CFU/mL로 증균됨. 또한 음성대조균으로 *E. coli* 대신 *S. aureus* KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 *E. coli*가 검출되지 않음.

○ Bacteriophage amplification 검출법을 통해 증균된 샘플용액에서 *E. coli* 를 검출한 결과는 약 4 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 1 log PFU/mL의 plaque가 형성되었고 약 5 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 2 log PFU/mL의 plaque가 형성되는 것을 통해 인위적으로 접종한 *E. coli* 를 검출함. 음성대조균으로 *S. aureus* KCCM 12103을 접종하여 배양한 샘플은 약 0.4 log PFU/mL의 plaque가 형성됨.

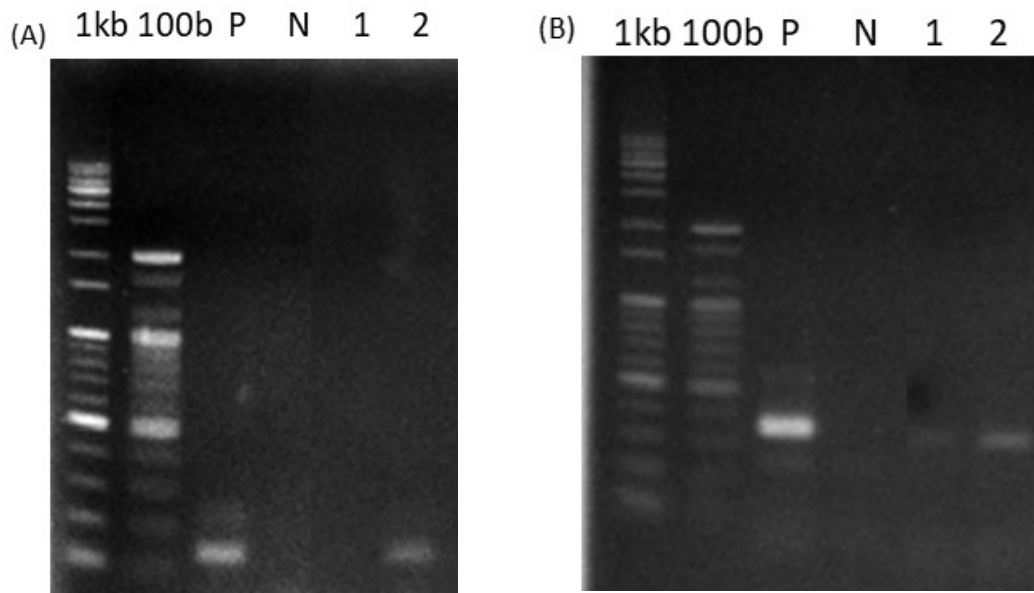
○ PCR을 진행한 결과에서는 초기 승수가 약 1 log CFU/mL인 샘플은 stx 1에 해당하는 band가 제대로 보이지 않았으나 stx 2에 해당하는 band가 관찰되었다. 초기 승수가 약 3 log CFU/mL인 샘플은 stx1과 stx2에 해당하는 band인 130bp와 346bp가 모두 검출되었다. 음성대조균으로 *S. aureus* KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 target band가 검출되지 않음.

[표] Enrichment of *E. coli* NCCP 13930 after 6hr incubation (cherry tomato),

Initial concentration (log CFU/mL)	after 6hr enrichment (log CFU/mL)
1	3.90
3	4.95

[표] Bacteriophage amplification assay after 6hr incubation (cherry tomato),

log CFU/mL (initail concentration)	log PFU/mL
3.90 (1)	1.65 ± 0.88
4.95 (3)	2.12 ± 0.49
Negative control	0.434 ± 0.434



[그림] PCR of the enriched samples (cherry tomato) (A) stx 1 (B) stx 2
P: *E. coli* 13930 DNA, 1: initial concentration 1 log CFU/mL, 2: initial concentration 3 log CFU/mL, N: *S. aureus* 12103

3. 파프리카

○ 파프리카를 대상으로 증균 및 bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *E. coli* 를 검출함. Bacteriophage amplification 검출법의 검출 가능한 균의 최소농도인 4-5 log CFU/mL까지 증균시키는데 평균적으로 6시간 이상이 소요되는 것으로 보임. 6시간 증균시 초기 승수가 약 1 log CFU/mL 인 샘플과 약 3 log CFU/mL인 샘플은 각각 약 5 log CFU/mL와 약 7 log CFU/mL로 증균됨. 또한 음성대조균으로 *E. coli* 대신 *S. aureus* KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 *E. coli*가 검출되지 않음.

○ Bacteriophage amplification 검출법을 통해 증균된 샘플용액에서 *E. coli* 를 검출한 결과는 약 5 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 2 log PFU/mL의 plaque가 형성되었고 약 7 log CFU/mL로 증균된 샘플의 경우는 약 3 log PFU/mL의 plaque가 형성되는 것을 통해 인위적으로 접종한 *E. coli* 를 검출함. 음성대조균으로 *S. aureus* KCCM 12103을 접종하여 배양한 샘플은 plaque가 형성되지 않음.

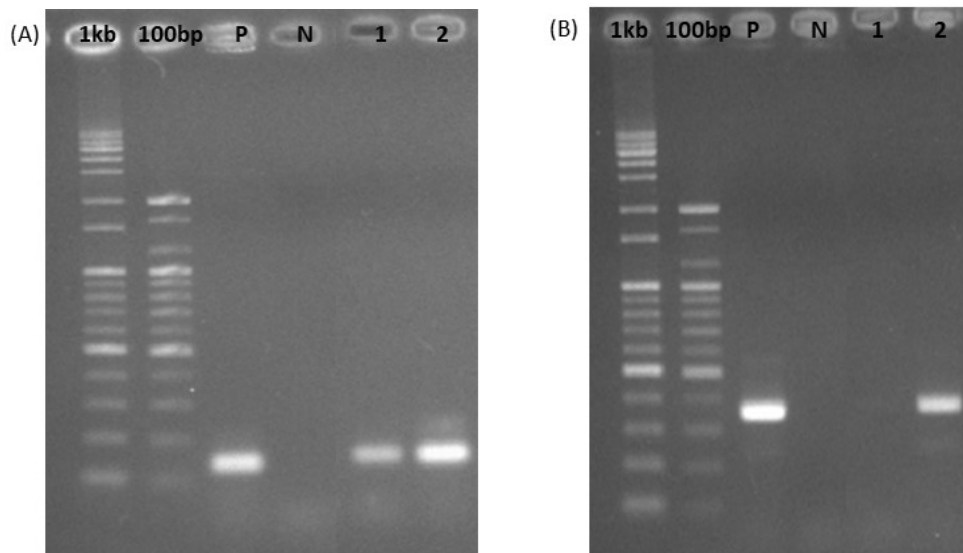
○ PCR을 진행한 결과에서는 초기 승수가 약 1 log CFU/mL인 샘플은 stx 2에 해당하는 band가 제대로 보이지 않았으나 stx 1에 해당하는 band가 관찰되었다. 초기 승수가 약 3 log CFU/mL인 샘플은 stx1과 stx2에 해당하는 band인 130bp와 346bp가 모두 검출되었다. 음성대조균으로 *S. aureus* KCCM 12103을 접종한 샘플에서는 target band가 검출되지 않음.

[㉞] Enrichment of *E. coli* NCCP 13930 after 6hr incubation (paprika),

Initial concentration (log CFU/mL)	after 6hr enrichment (log CFU/mL)
1	4.73
3	6.95

[㉞] Bacteriophage amplification assay after 6hr incubation (paprika),

log CFU/mL (initial concentration)	log PFU/mL
4.73 (1)	1.90 ± 0.95
6.95 (3)	3.32 ± 0.17
Negative control	0



[그림] PCR of the enriched samples (paprika) (A) stx 1 (B) stx 2

P: *E. coli* 13930 DNA, 1: initial concentration 1 log CFU/mL, 2: initial concentration 3 log CFU/mL, N: *S. aureus* 12103

9장. Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 키트 확립 및 현장 평가와 박테리오파지의 안전성 분석

1절. Bacteriophage amplification 기반으로 하는 *S. aureus* 검출법 확립

1. Phage amplification을 기반으로 하는 검출법의 기본 원리

○ Phage amplification을 기반으로 하는 검출법은 기본적으로 phage가 균을 lysis 시키고 밖으로 터져 나오는 점을 이용함. 균을 lysis 시키고 나오는 phage를 검출함을 통해 phage가 lysis시킬 수 있는 균의 유무를 판단할 수 있음.

2. FAS (Ammonium iron(II) sulfate, $((NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O)$ 처리

○ *E. coli* 검출법과 다르게 균과 phage cocktail 을 1:1로 10min, 37°C 진탕 배양한 용액을 FAS 분말과 직접 반응 시키는 방향으로 FAS 처리방법을 수정함. 또한 기존의 FAS 농도인 250mM (약 10%)보다 더 낮은 농도에서 더 효율적인 결과를 얻기 위해서 FAS 농도를 수정하고자 함. 따라서 5 mM-250 mM의 FAS를 약 8 log PFU/mL의 phage cocktail 용액과 상온에서 5분 동안 반응 시킨 후 plaque assay방법을 통해 감소한 phage의 농도를 확인함.

○ 그 결과, 50mM의 FAS 농도에서는 약 6 log PFU/mL이 감소하였고 100mM이상에서는 약 7-8 log PFU./mL의 phage가 감소하는 것을 확인함. 따라서 bacteriophage amplification 검출법에서 사용하는 phage cocktail 농도인 약 6-7 log PFU/mL을 제어하기 위해서 기존의 사용하던 250mM 보다 낮은 농도인 100mM의 FAS를 사용하는 것이 더 효율적일 것으로 사료됨.

[표] Reduction of plaque according to concentrations of FAS

	log PFU/mL	reduction (log PFU/mL)
Control (FAS X)	8.78	-
250 mM	<1	7-8
200 mM	<1	7-8
150 mM	<1	7-8
100 mM	<1	7-8
50 mM	1.99	6.52

25 mM	3.64	5.14
10mM	4.54	4.24
5mM	5.72	3.06
-: no plaque		

3. Resazurin 색변화 차이를 위해 필요한 bacteriophage 농도 확인

○ 6 log CFU/mL의 sensor cell과 phage cocktail을 35°C에서 4시간 동안 배양 한 후 resazurin (final con: 0.01%)의 색 변화에 소요되는 시간을 관찰하여 필요한 phage cocktail 농도를 확인함. 5, 6, 7, 8 log PFU/mL의 phage cocktail을 대상으로 실험을 진행함.

○ Control인 LBC broth와 sensor cell만 4시간동안 배양한 용액은 5분 내에 붉은색으로 변하였고 5 log PFU/mL을 배양한 용액은 30분 내에 변하였음. 6 log PFU/mL 이상의 phage cocktail 농도의 경우에는 색변화에 1시간 이상의 시간이 소요되는 것을 확인함. phage cocktail과 sensor cell을 배양한 sample과 phage cocktail이 첨가되지 않은 control 사이의 시간 변화 차이를 통해서 4시간 동안 phage cocktail이 약 5 log PFU/mL까지 propagation 된다면 target cell과 non-target cell의 resazurin 색 변화에 소요되는 시간의 차이가 육안으로 확인될 것으로 사료됨.

[표] Effect of phage concentration to time to change resazurin color.

Sample	time (min)
Control (LBC)	0-5
5 log PFU/mL	30
6 log PFU/mL	
7 log PFU/mL	>60
8 log PFU/mL	

4. 확립한 조건으로 resazurin을 이용한 bacteriophage amplification 기반 검출

○ 확립한 조건들을 토대로 bacteriophage amplification을 기반으로 한 *S. aureus* 검출을 하였음. *S. aureus* 와 non-*S. aureus*가 kit 제작시 사용할 *S. aureus*의 특이적인 배지인 SEB 증균배지에서 증균되는 속도가 서로 다를 것을 예측하여 positive control인 *S. aureus* KCTC 1621의 초기 승수는 5, 6 log CFU/mL로, negative control인 *E. coli* NCCP 13930의 초기 승수는 2, 4 log CFU/mL로 하였음.

○ 확립한 조건에서 진행한 결과, 10분 이후에 positive control인 *S. aureus* KCTC 1621과

negative control인 *E. coli* NCCP 13930의 resazurin 색이 육안으로 차이나는 것을 확인할 수 있음. 따라서 변경된 조건들을 토대로 bacteriophage amplification을 기반으로 한 *S. aureus*를 검출법을 확립함.

[표] Concentration of phage and bacteria after 4hr incubation.

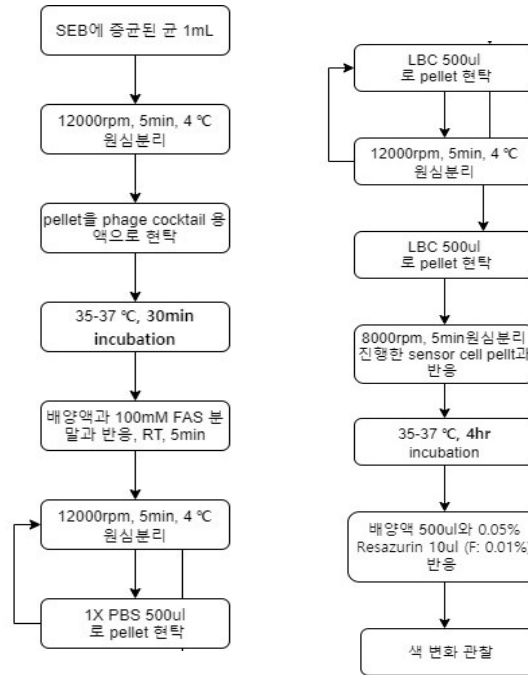
	initial concentration	after 4hr incubation	
		log CFU/mL	log PFU/mL
<i>S. aureus</i> KCTC1621	6 log CFU/mL	4.79	7.69
	5 log CFU/mL	5.44	6.91
<i>E. coli</i> NCCP 13930	2 log CFU/mL	6.99	-
	4 log CFU/mL	7.32	-



[그림] Result of new phage amplification assay.

1,2: *S. aureus* KCTC 1621 6 log CFU/mL, 3,4: *S. aureus* KCTC 1621 5 log CFU/mL 5,6: *E. coli* NCCP 13930 2 log CFU/mL, 7,8: *E. coli* NCCP 13930 4 log CFU/mL

1.5. Bacteriophage amplification을 기반으로 둔 전반적인 *S. aureus* 검출방법



2절. 식품으로부터 bacteriophage amplification 검출법을 이용한 *S. aureus* 검출

○ 식품을 대상으로 식품공전의 *S. aureus* 검출법과 bacteriophage amplification 검출법을 비교하고자 신선식품과 크림에 *S. aureus* 를 인위적으로 접종하여 검출함. 최종농도가 약 1 log CFU/mL이 되도록 *S. aureus* 2 종, Non-*S. aureus* 4종 (*E. coli* 2종, *E. faecalis* 2종)을 접종한 sample들을 이용함.

○ 식품공전의 *S. aureus* 검출법 시험 시 식품공전에 명시된 10% NaCl이 첨가된 TSB 배지를 사용하여 샘플을 35°C에서 18-24시간동안 증균시킴. 증균된 용액은 LBC agar와 각 균에 해당하는 선택배지를 사용하여 증균(배양)된 sample의 승수를 확인함. 또한 식품공전법에 따라 *S. aureus*의 선택배지인 BPA 와 10% 난황이 첨가된 MSA에 획선 도말하여 colony 성상을 확인함. *S. aureus*와 유사한 colony 성상을 가진 집락은 그람염색 및 coagulase test를 진행함.

○ Bacteriophage amplification 검출법 시험 시 마이크로진에서 개발한 SEB (*S. aureus* Enrichment Broth)배지를 사용하여 샘플을 35°C에서 12-16시간동안 증균시킴. 증균된 용액은 LBC agar와 각 균에 해당하는 선택배지를 사용하여 증균(배양)된 sample의 승수를 확인함.

○ Bacteriophage amplification 검출법과 PCR을 이용한 검출결과를 비교하고자 식품공전방법으로 증균한 용액을 DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후

*S. aureus*의 특이적인 유전자인 nuc gene을 검출할 수 있는 primer (F: GAA AGG ATA AAA GA, R: TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT)를 이용하여 PCR을 진행함. PCR 진행 후에는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동 후 target band의 크기를 확인함 (482 bp).

1. 크림

○ 크림을 대상으로 식품공전법에 따라 10% NaCl이 첨가된 TSB 배지를 이용하여 증균한 결과, *S. aureus*를 접종한 sample은 상당히 잘 증균되었지만 non-*S. aureus*를 접종한 sample은 균이 거의 증균되지 않았음. *S. aureus*를 접종한 sample들 간의 농도차가 있는 것으로 보아 모든 *S. aureus*가 10% NaCl이 첨가된 TSB에서 동일하게 증균되는 것은 아닌 것으로 사료됨.

○ 식품공전법에 따라 증균한 용액을 BPA 및 10% 난황이 첨가된 MSA에 희석 도달하여 형성된 집락이 BPA에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검은색집락이 있는지, 난황첨가 MSA에서 황색불투명하며 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락이 있는지를 확인함. 그 결과, *S. aureus*를 접종한 2개의 sample을 제외한 모든 sample에서는 BAP와 난황첨가 MSA에서 관찰하고자 하는 집락의 형태는 관찰 할 수 없었음. 반면, *S. aureus*를 접종한 2개의 sample에서는 BPA에서는 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검은색집락을, 난황첨가 MSA에서는 주변에 혼탁한 백색환이 있는 황색불투명 집락을 관찰할 수 있었음.

○ 식품공전법에 따라 선택배지에서 *S. aureus*와 유사한 성상을 띠는 집락을 선택하여 보통한천 배지에 옮겨 배양한 후 그람염색법을 진행함. 그 결과 BPA와 10% 난황 첨가 MSA에서 관찰된 *S. aureus* 의심집락 모두 보라색으로 관찰되며 포도상의 배열을 갖는 구균의 그람양성균임을 확인할 수 있었음.

○ 식품공전법에 따라 그람염색으로 그람양성의 구균을 확인한 후 coagulase test를 실시하여 24 시간 이내의 응고유무를 판단함. BPA에서 전형적인 *S. aureus*의 집락인 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검은색 집락이 관찰된다면 coagulase test를 생략할 수 있으나 실제 *S. aureus*인지 확인하기 위하여 coagulase test를 진행함. BPA에서 배양되고 그람염색을 통해 그람양성의 구균임을 확인한 sample을 이용함. 그 결과 배양 후에는 2개의 sample을 접종한 용액은 음성대조군과 달리 응고가 되어 움직이지 않는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 선택배지, 그람염색과 coagulase test를 통해서 *S. aureus* 만 접종한 2개의 sample에서 배양된 균이 *S. aureus*임을 확인함.

○ 식품공전법에 따라 증균한 증균액 중 *S. aureus*로 의심되는 증균액을 대상으로 *S. aureus*의 특이적인 nuc gene에 대한 PCR을 진행함. 그 결과, *S. aureus*로 의심되는 모든 sample에서 target band인 482 bp에 해당하는 band가 관찰됨.

[㉔] Enrichment of sample in TSB + 10% NaCl

Sample (): inoculated bacteria	TSB + 10% NaCl	
	LBC agar	selective agar
control (no bacteria)	-	-
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	2.85	BPA agar 3.78
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	5.90	6.04
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	1.26	1.04
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	1.00	EMB agar 1.34
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	1.41	Enterococcosel 1.30
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	1.82	agar 1.79

-: no colony

[㉕] Colony properties on selective agar (cream).

Sample (): inoculated bacteria	BPA		MSA +egg yolk	
	colony color	clear zone	colony color	opaque zone
control (no bacteria)	-	-	-	-
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	black	○	yellow	○
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	black	○	yellow	○
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	-	-	-	-
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	-	-	-	-
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	-	-	-	-
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	-	-	-	-

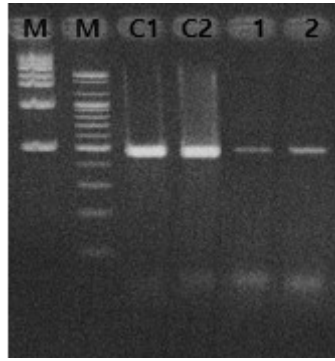
(-): no growth

[㉖] Gram staining (cream).

Sample (): inoculated bacteria	BPA	MSA + egg yolk
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Gram (+) ㉔㉔	Gram (+) ㉔㉔
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Gram (+) ㉔㉔	Gram (+) ㉔㉔

[㉗] Coagulase test (cream)

Sample (): inoculated bacteria	before incubation	after incubation
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	-	+
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	-	+



[그림] PCR (cream).- target band: 482bp

M: Marker, C1: *S. aureus* KCTC 1621 DNA, C2: *S. aureus* RN 4220 DNA, 1: a sample of the inoculated *S. aureus* KCTC 1621, 2: a sample of the inoculated *S. aureus* RN 4220

○ 크림을 대상으로 Bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *S. aureus*를 검출하고자 SEB (*S. aureus* Enrichment Broth)에 샘플들을 증균한 결과, *S. aureus*를 접종한 sample과 *E. faecalis*를 접종한 sample은 SEB에서 상당히 잘 증균되었지만 *E. coli*를 접종한 sample은 균이 거의 증균되지 않았음. SEB에서 *E. coli*가 배양되지 않는 것을 보아 SEB을 증균배지로 사용한다면 *S. aureus*외의 그람음성균은 상당히 억제될 가능성이 높을 것으로 보임.

○ SEB에서 증균된 용액을 이용하여 bacteriophage amplification 검출을 진행한 결과, *S. aureus* 2종을 접종한 각각의 sample이 non-*S. aureus*를 접종한 sample 보다 붉은색으로 변하는데 더 오랜 시간이 소요되는 것을 확인함. 이를 통해서 다양한 samples 사이에 *S. aureus*가 증균된 sample을 검출할 수 있었음.

[표] Result of phage AMP kit (cream).

Sample 0: inoculated bacteria	color	(+)/(-)
control (no bacteria)	Pink	(-)
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Blue	(+)
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Blue	(+)
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	Pink	(-)
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	Pink	(-)
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	Pink	(-)
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	Pink	(-)

+ : positive result (*S. aureus*) - : negative result (non-*S. aureus*)

2. 로메인

- 크림과 달리 로메인은 검출을 진행하기에 앞서 70% ethanol에 dipping하여 전처리를 진행함.
- 로메인을 대상으로 식품공전법에 따라 10% NaCl이 첨가된 TSB 배지를 이용하여 증균한 결과, *E. faecalis* KCTC 3206을 접종한 sample을 제외한 모든 sample이 증균된 결과가 비슷함. 또한 LBC agar와 접종한 각 균의 선택배지에서 배양한 균의 승수가 차이가 나는 것으로 보아, 기존 로메인에 존재하던 잡균이 10% NaCl이 첨가된 TSB에서 증균된 것으로 보임.
- 식품공전법에 따라 증균한 용액을 BPA 및 10% 난황이 첨가된 MSA에 희석도말하여 형성된 집락이 BPA에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검은색집락이 있는지, 난황첨가 MSA에서 황색불투명하며 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락이 있는지를 확인함. 그 결과, 난황첨가 MSA에서는 모든 sample에서 노란색의 colony가 관찰됨. 하지만 *S. aureus*를 접종한 2개의 sample에서만 미세한 혼탁한 백색환이 관찰되었다. BPA에서도 모든 sample에서 집락이 형성되었다. 하지만 검은색 집락은 *S. aureus*를 접종한 sample 2종과 *E. coli*를 접종한 sample 1종에서 관찰되었고 투명한 띠는 *S. aureus*를 접종한 sample 2종에서만 관찰됨.
- 식품공전법에 따라 선택배지에서 *S. aureus*와 유사한 성상을 띠는 집락을 선택하여 보통한천 배지에 옮겨 배양한 후 그람염색법을 진행해야 하지만 난황첨가 MSA에서 다양한 성상의 colony가 확인되어 제외하고 BPA의 *S. aureus*로 의심되는 집락만을 대상으로 그람염색을 진행함. 그 결과, BPA에 배양된 모든 sample의 집락은 그람양성균이며 구균임을 확인할 수 있었음.
- 식품공전법에 따라 그람염색으로 그람양성의 구균을 확인한 후 coagulase test를 실시하여 24시간 이내의 응고유무를 판단함. BPA에서 전형적인 *S. aureus*의 집락인 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검은색 집락이 관찰된다면 coagulase test를 생략할 수 있으나 실제 *S. aureus*인지 확인하기 위하여 coagulase test를 진행함. BPA에서 배양되고 그람염색을 통해 그람양성의 구균임을 확인한 sample을 이용함. 시험 결과, *S. aureus*를 접종한 2종의 sample에서 생성된 집락을 이용한 tube는 응고가 되어 움직이지 않았음. 따라서 선택배지, 그람염색과 coagulase test를 통해서 *S. aureus* 만 접종한 2개의 sample에서 배양된 균이 *S. aureus*임을 확인하였음
- 식품공전법에 따라 증균한 증균액 중 *S. aureus*로 의심되는 증균액을 대상으로 *S. aureus*의 특이적인 nuc gene에 대한 PCR을 진행함. 그 결과, *S. aureus*로 의심되는 모든 sample에서 target band인 482 bp에 해당하는 band가 관찰됨.

[㉔] Enrichment of sample in TSB + 10% NaCl (romaine).

Sample (): inoculated bacteria	TSB + 10% NaCl	
	LBC agar	selective agar
control (no bacteria)	6.778151	-
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	6.23	BPA agar 4.70
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	6.26	5.26
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	6.18	EMB agar 4.85
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	5.78	4.85
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	6.08	Enterococcosel 1.40
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	4.30	agar 3.32

[㉕] Colony properties on selective agar (romaine).

Sample (): inoculated bacteria	BPA		MSA +egg yolk	
	colony color	clear zone	colony color	yellow zone
control (no bacteria)	*	X	yellow	X
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	black	○	yellow	○
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	black	○	yellow	○
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	*	X	yellow	X
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	black	X	yellow	X
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	*	X	yellow	X
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	*	X	yellow	X

(-): no growth

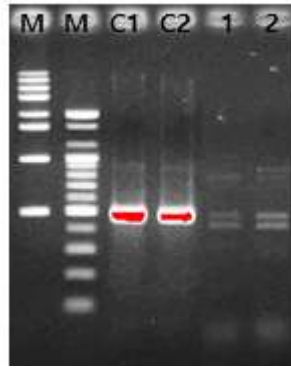
* : grow but not black colony

[㉖] Gram staining (romaine).

Sample (): inoculated bacteria	BPA
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Gram (+), 구균
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Gram (+), 구균
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	Gram (+), 구균

[㉗] Coagulase test (romaine).

Sample (): inoculated bacteria	before incubation	after incubation
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	-	+
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	-	+



[그림]. PCR.(romaine)- target band: 482bp

M: Marker, C1: *S. aureus* KCTC 1621 DNA, C2: *S. aureus* RN 4220 DNA, 1: a sample of the inoculated *S. aureus* KCTC 1621, 2: a sample of the inoculated *S. aureus* RN 4220

○ 로메인을 대상으로 Bacteriophage amplification 검출법을 이용하여 *S. aureus*를 접종한 sample은 SEB에서 상당히 잘 증균되었지만 non-*S. aureus*를 접종한 sample은 균이 거의 증균되지 않았음. SEB에서 *E. coli*가 배양되지 않는 것을 보아 SEB을 증균배지로 사용한다면 *S. aureus* 외의 그람음성균은 상당히 억제될 가능성이 높을 것으로 보임. 또한 LBC agar와 접종한 각 균의 선택배지에서 배양한 균의 승수가 차이가 나는 것으로 보아, 기존 로메인에 존재하던 잡균이 SEB에서 증균된 것으로 보이거나 10% NaCl이 첨가된 TSB에 배양한 sample에서 보단 덜 증균된 것으로 보임.

○ SEB에서 증균된 용액을 이용하여 bacteriophage amplification 검출을 진행한 결과, *S. aureus* 2종을 접종한 각각의 sample이 non-*S. aureus*를 접종한 sample 보다 붉은색으로 변하는데 더 오랜 시간이 소요되는 것을 확인함. 이를 통해서 다양한 samples 사이에 *S. aureus*가 증균된 sample을 검출할 수 있었음.

[표] Enrichment of samples in SEB (romaine).

Sample (0): inoculated bacteria	SEB broth	
	LBC agar	selective agar
control (no bacteria)	3	-
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	4.59	BPA agar 4.59
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	3.90	4.71
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	3.78	EMB agar 0.69897
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	3.90	0.60206
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	4.48	Enterococcosel agar 1.38
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	3.78	< 1

[표] Result of phage AMP kit (romaine).

Sample (): inoculated bacteria	color	(+)/(-)
control (no bacteria)	Pink	(-)
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Blue	(+)
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Blue	(+)
3 (<i>E. coli</i> NCCP 13930)	Pink	(-)
4 (<i>E. coli</i> NCCP 13937)	Pink	(-)
5 (<i>E. faecalis</i> KCTC 3206)	Pink	(-)
6 (<i>E. faecalis</i> KCTC 2011)	Pink	(-)

+: positive result (*S. aureus*) -: negative result (non-*S. aureus*)

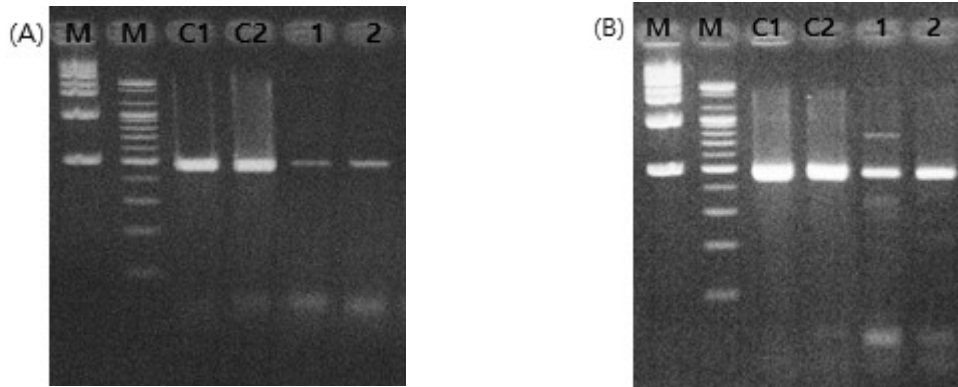
3. 생균과 사균

○ 생균과 사균의 PCR 및 Phage AMP kit을 통한 검출결과를 비교하고자 실험을 진행함. 생균은 시료와 *S. aureus* 2 종을 접종한 후 배양된 용액을 사용함. 사균은 30분 이상 boiling하여 사균화 하였고 LBC agar에 spreading하여 사균이 된 것을 확인함.

○ PCR은 10% 염이 첨가된 TSB에서 배양된 sample을 이용하였고 *S. aureus*의 nuc gene을 target으로 하였다. DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후 F: GAA AGG ATA AAA GA, R: TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT의 primer와 반응시킴. PCR cycle은 94°C에서 5분 1 cycle, 94°C 1분- 62°C 1분- 72°C 1분 35 cycles, 72°C에서 8분 1cycle로 진행함.

○ bacteriophage amplification 검출법 (phage AMP kit)은 SEB에서 배양된 sample을 이용함.

○ PCR은 생균과 사균 모두 같은 결과를 얻었고 phage AMP kit는 생균에서만 검출이 가능한 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해서 식품에서 문제가 되는 생균을 검출하기 위해서는 phage AMP kit가 적절하다고 사료되었으며, PCR은 생균이나 사균이나 모두 검출이 되기 때문에 PCR의 결과가 생균을 검출한 것인지는 확신할 수 없다고 사료됨.

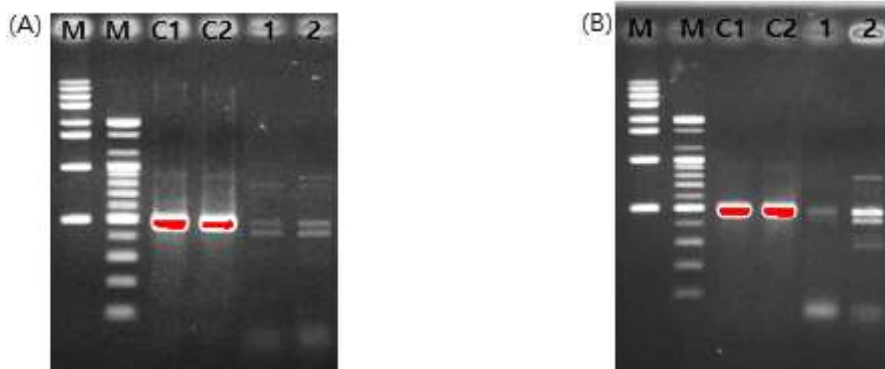


[그림] PCR of Live cell and dead cell (cream) (A) live cell (B) dead cell
 M: Marker, C1: *S. aureus* KCTC 1621 DNA, C2: *S. aureus* RN 4220 DNA, 1: a sample of the inoculated *S. aureus* KCTC 1621, 2: a sample of the inoculated *S. aureus* RN 4220

[표] Phage AMP kit result from live cell and dead cell (cream)

(A) Live cell		(B) Dead cell	
live sample (): inoculated bacteria	color (+)/(-)	dead sample (): inoculated bacteria	color (+)/(-)
1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Blue (+)	1 (<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Pink (-)
2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Blue (+)	2 (<i>S. aureus</i> RN 4220)	Pink (-)

+ : positive result (*S. aureus*) - : negative result (non-*S. aureus*)



[그림] PCR of Live cell and dead cell (romaine) (A) live cell (B) dead cell
 M: Marker, C1: *S. aureus* KCTC 1621 DNA, C2: *S. aureus* RN 4220 DNA, 1: a sample of the inoculated *S. aureus* KCTC 1621, 2: a sample of the inoculated *S. aureus* RN 4220

[표] Phage AMP kit result from live cell and dead cell (romaine)

(A) Live cell		(B) Dead cell			
(A)	live sample (): inoculated bacteria	color (+)/(-)	(B)	dead sample (): inoculated bacteria	color (+)/(-)
1	<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Blue (+)	1	<i>S. aureus</i> KCTC 1621)	Pink (-)
2	<i>S. aureus</i> RN 4220)	Blue (+)	2	<i>S. aureus</i> RN 4220)	Pink (-)

+: positive result (*S. aureus*) -: negative result (non-*S. aureus*)

3절. 박테리오파지의 안전성 평가

1. Phage cocktail의 안전성 평가

○ 박테리오파지는 포유류에게 파지에 대한 항체 생성을 유도할 수 있으며 박테리오파지 용액은 대개 숙주로부터 유래한 LPS (Lipopolysaccharide)나 teichoic acid등의 내독소를 포함할 수 있음. 따라서 박테리오파지 용액의 안전성을 검증하는 단계는 중요한 과정 중 하나이며 미국 FDA에서는 박테리오파지 제품의 내독소 농도를 일정 수준을 넘지 않도록 관리하고 있으며 해외 파지 제품인 Listex™이나 SalmoFresh™등의 파지 제품들은 여러 가지 가이드라인 및 검증법을 구축하여 FDA로부터 GRAS(Generalized Recognized as Safe)로 인증을 받고 판매하고 있다. 따라서 대표적인 식중독 세균인 1차년도에 선별한 박테리오파지 6종 용액의 in vitro 안전성 평가를 진행함.

○ 박테리오파지 용액에 존재하는 내독소 함량을 정량분석하기 위해서 LAL chromogenic endotoxin quantitation kit (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. *E. coli* O111:B4를 제조사에서 지시한 용량의 멸균 증류수에 녹여 1 EU/mL농도의 용액을 만든 뒤, 용액을 희석하여 0.5 EU/mL, 0.25 EU/mL, 0.125 EU/mL의 표준농도를 만들어 표준곡선을 만들. 9 - 10 log PFU/mL 수준의 파지 용액 100 uL와 LAL 시약 50 uL를 37 °C에서 10분간 배양한 뒤 37 °C에서 가온해 둔 발색 기질시약 100 uL를 첨가하여 37°C에서 6분 동안 배양하고 25% 아세트산 50 uL을 첨가하여 반응을 정지시키고 자외선 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정함.

○ 실험결과, 9 log PFU/mL 농도의 박테리오파지 시료들은 평균 18.6 EU/mL의 내독소가 검출되었고, 이보다 농도가 10배 높은 10 log PFU/mL 농도의 박테리오파지 시료들에서는 평균 5.9 EU/mL의 내독소가 검출되었으며, 9 log PFU/mL 용액과 10 log PFU/mL의 용액간의 내독소 함량이 유의한 수준의 차이를 나타내었음 (p<0.05). 10 log PFU/mL 용액의 내독소 함량이 더 적

게 나타난 이유는, 파지 용액이 농축됨에 따라 폴리에틸렌글리콜에 의해 크기가 큰 파지들은 농축되고 크기가 작은 대부분의 내독소들은 상등액에 남게 되기 때문인 것으로 예상됨. 내독소는 인간이 살아가는 거의 모든 환경에서 발견되며 특히 장내에 서식하는 그람음성 세균들은 매일 많은 양의 내독소를 방출하지만 건강한 사람에게는 유해성이 크지 않음. 실험 결과를 보았을 때 박테리오파지 용액에 존재하는 내독소는 식품 내에 존재하는 수준의 내독소보다 현저히 낮은 농도로 존재하므로 식품 내에 존재하는 병원균을 제어하기 위한 살균소독제로의 응용에는 문제가 없을 것으로 사료됨.

[표] Results of quantitative endotoxin tests by LAL (limulus amoebocyte lysate) assay. The values shown are means±SD of triplication experiment.

a; Means in 9 log PFU/mL sample and 10 log PFU/mL sample followed by are significantly different at $p < 0.05$ by one-way ANOVA test. b; Means in 1x SM buffer and six phage samples followed by are significantly different at $p < 0.05$ by one-way ANOVA test.

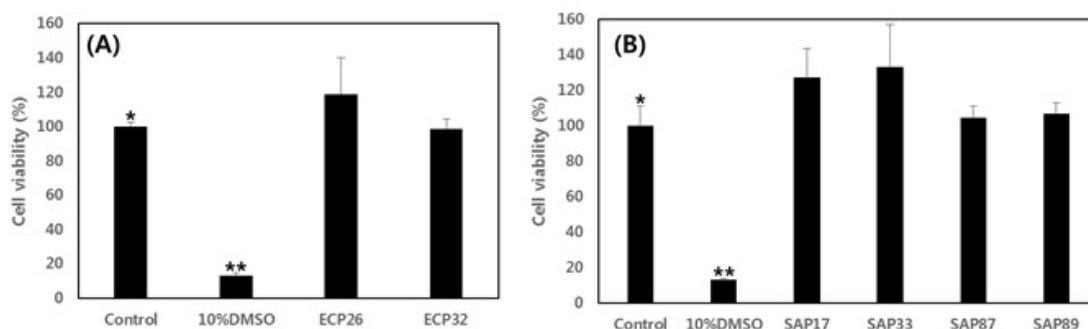
Sample name	Endotoxin Level (EU/mL)		Host Strains
	9 log PFU/mL	10 log PFU/mL	
vB_EcoM-ECP26	19.22±1.17	8.44±2.33 ^a	<i>Escherichia coli</i>
vB_EcoM-ECP32	17.41±1.58	7.28±7.55 ^a	<i>Escherichia coli</i>
vB_SauS-SAP17	14.84±2.21	4.16±0.24 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>
vB_SauS-SAP33	21.27±1.89	5.26±1.22 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>
vB_SauS-SAP87	23.36±0.98	6.47±1.14 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>
vB_SauS-SAP89	15.54±3.31	3.81±0.19 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>
1x SM buffer	1.326±0.12 ^b		

2. 박테리오파지 용액의 세포독성 평가

○ 박테리오파지 용액의 세포독성을 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약으로 inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA (Gibco), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)을 사용하였다. 세포 배양은 5% 이산화탄소 (CO₂)가스가 존재하는 37°C 배양기에서 진행하였으며, 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였음. Raw 264.7 세포 1 x 10⁴ cells/well를 96 well plate에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양후 1x SM buffer에 희석된 9 log PFU/mL의 박테리오파지 용액을 처리하여 24시간 반응시

켰음. 배양 후 2 mg/mL의 MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 처리한 후 37°C에서 2시간 동안 재배양하였다. 용액을 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하고 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 백분율로 계산하였음.

○ 실험결과, 10% DMSO를 처리한 경우 대조군 (100%) 대비 13%까지 감소하였으나 ($p < 0.05$), *E. coli* phage인 vB_EcoM-ECP26과 vB_EcoM-ECP32 용액을 각각 9 log PFU/mL 농도로 처리 시에는 118%와 98%의 생존율을 보였음($p > 0.05$). *S. aureus* phage인 vB_SauS-SAP17, vB_SauS-SAP33, vB_SauS-SAP87, vB_SauS-SAP89 용액을 9 log PFU/mL 농도로 처리 시에는 126%, 132%, 104%와 106%의 생존율을 보였음 ($p > 0.05$). 이는 파지 용액이 소량의 내독소뿐만 아니라 고농도의 파지를 함유하고 있음에도 불구하고 유의할 만한 수준의 세포독성을 일으키지 않는다는 것을 나타낸다.



[그림] Effect of bacteriophage lysate on viability of Raw 264.7 cells. (A): After pre-treatment of cells with 9 log PFU/mL *Escherichia coli* phages. (B): After pre-treatment of cells with 9 log PFU/mL *Staphylococcus aureus* phages. Each bar is the mean \pm SD for triplication experiment. * $p > 0.05$ versus the phage pre-treatment groups. ** $p < 0.05$ versus the control and phage pre-treatment groups.

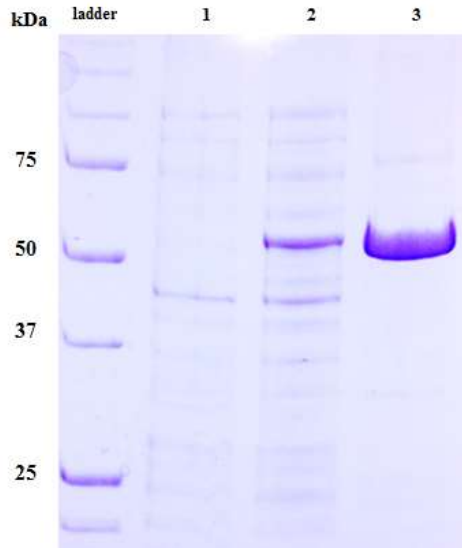
4절. Endolysin의 purity 및 안정성 평가

1. LysSAP8의 purity 평가

○ LysSAP8의 순수 정제를 위해서, 2차년도에 구축한 pET-23a_LysSAP8 vector를 이용하여 LysSAP8의 overexpression 이후, NI-NTA Superflow resin (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제를 진행하였음. Partially purified LysSAP8에 존재하는 imidazole을 제거하고 장시간 보관하기 위해서 Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)를 이용해 보관용 elution buffer (50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 30% glycerol, pH 8.0)으로 buffer change 및 2차 정제를 진행하였음. 정제된 LysSAP8은 -80°C에서 냉동 보관하였고, SDS-PAGE를 이용하여

정제 유무를 확인하였음.

○ 실험결과, LysSAP8을 제외한 나머지 단백질들은 대부분 제거되었고, LysSAP8을 나타내는 band가 55 kDa 부근에서 진하게 나타남. 이는 2차 정제를 통해 LysSAP8의 정제가 충분히 이루어 졌으며, 식품유래 *S. aureus*에 적용에는 충분한 purity라고 사료됨.

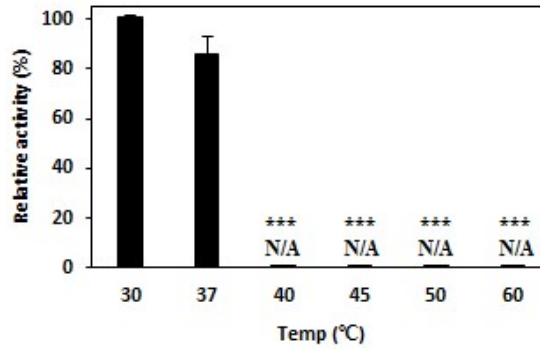


[그림] SDS-PAGE analysis for expression and purification of the endolysins. LysSAP8 (55 kDa) Lane 1: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the backbone plasmid; Lane 2: total lysate of IPTG-induced *E. coli* harboring the recombinant plasmid; Lane 3: partially purified endolysin.

2. LysSAP8의 열 안정성 평가

○ LysSAP8의 열 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP8 10uM을 여러 가지 온도(30, 37, 40, 45, 50, 60°C)에 30분간 반응시켜 주었음. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, Exponential phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl₂, pH8.0)로 2회 washing해 주고 EP tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 EP tube에 여러 가지 온도에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시켰음. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD₆₀₀ 값을 측정하였음.

○ 실험결과, 30°C에서 가장 활성이 높았고 *S. aureus*가 가장 잘 자랄 수 있는 온도인 37°C에서는 활성이 약간 떨어지는 것이 확인되었으며, 40°C부터는 활성이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 LysSAP8는 30°C~37°C에서 가장 안정한 것으로 사료되며, 고온에서는 매우 불안정한 단백질인 것으로 판명되었음.

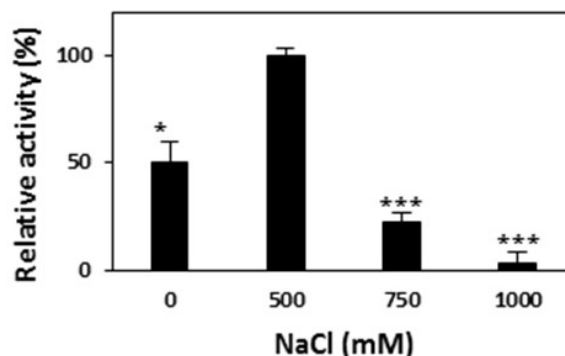


[그림] Effects of temperature on lysis activity.
 (A) LysSAP8 ***: $P < 0.0001$; N/A: not available.

3. LysSAP8의 염 안정성 평가

○ LysSAP8의 염에 대한 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP8 10uM을 여러 가지 농도의 NaCl 용액(0, 500, 750, 1000mM)에 30분간 반응시켜 주었음. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, Exponential phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl₂, pH8.0)로 2회 washing해주고 EP tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 EP tube에 여러 가지 농도의 염에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시켰다. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD₆₀₀ 값을 측정하였음.

○ 실험결과, 500mM의 NaCl에서 가장 활성이 높았으며, 이보다 고농도의 염에서는 활성이 떨어지는 것으로 확인됨. 또한 NaCl을 첨가하지 않은 buffer에서 보다 500mM의 NaCl이 첨가된 buffer에서 더 높은 활성을 나타내었음. 이는 LysSAP8이 활성을 갖기 위해서는 어느 정도의 염이 필요하다는 것을 나타내며, 보관 시에도 NaCl이 일부 첨가되어야 안정적인 것으로 사료됨.

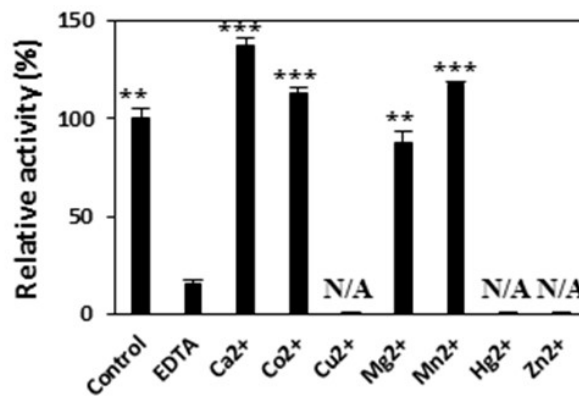


[그림] Effects of NaCl on LysSAP8 lysis activity.

4. LysSAP8의 금속이온에 대한 안정성 평가

○ LysSAP8의 금속에 대한 안정성을 평가하기 위해서 2차 정제한 LysSAP8 10uM을 여러 가지 1mM 금속양이온을 녹인 buffer(Ca, Co, Cu, Mg, Mn, Hg, Zn)에 30분간 반응시켜 주었음. 또한 cofactor의 유무에 따른 효과를 확인하기 위해 1mM의 EDTA에 대한 반응 실험 또한 동시에 진행하였음. Target 균주로는 *S. aureus* KCCM 12103을 target으로 결정하였으며, Exponential phase까지 배양한 *S. aureus* KCCM 12103을 원심분리하여 Optimized buffer(Tris-HCl 500mM, NaCl 500mM, 1mM CaCl₂, pH8.0)로 2회 washing해주고 EP tube에 90uL씩 분주하여 주었고, 균이 분주되어 있는 EP tube에 여러 가지 2가 금속양이온에 반응시킨 endolysin을 최종 농도가 1uM이 되도록 10uL씩 분주하고 30분 동안 30°C에서 반응시켰음. 반응이 끝난 균 용액은 UV spectrophotometer를 이용해 OD₆₀₀ 값을 측정하였음.

○ 실험결과, Cu, Hg, Zn에 반응시 활성이 완전히 사라졌고, Mg에 반응 시에는 활성이 약간 감소되었음. 또한 Ca, Co, Mn에 반응 시에는 활성이 오히려 증가하였으며 EDTA에 반응시에는 활성이 급격하게 감소되었다. 따라서 LysSAP8은 cofactor로 2가 금속양이온을 필요로 하며, 일부 중금속에는 불안정하여 활성을 잃지만, Ca와 같은 이온은 오히려 활성을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었음. 또한 Ca의 처리에 따라 가장 높은 활성 증가율을 보였기 때문에 식품 적용 시 Ca이온을 첨가한 LysSAP8이 식품유래 *S. aureus*의 제어 효율을 증대시킬 것으로 사료됨.



[그림] Effects of divalent metal ion on lysis activity.

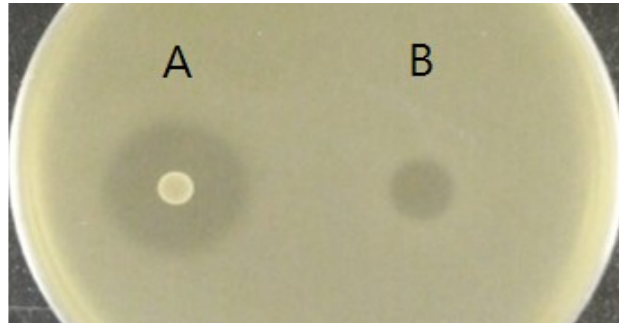
제 3 협동기관 : 한국교통대학교

10장. 유산균 라이브러리 활용 신규 유산균 확보

- 실험실에 보관하고 있는 유산균주들을 이용하여 한천확산법(agar diffusion method)으로 박테리오파지 생산균주를 선별함
- MRS broth(Difco)를 배지원으로 하여 활성화된 균주 1% 접종함. MRS 고체배지에 유산균주 배양액 1 μ l를 점적한 후 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양함. 이후 5ml MRS top agar(0.7% agar 포함)를 microwave oven에서 끓인 후 40 $^{\circ}$ C 부근으로 식혀 지시균을 1% 접종하여 이를 잘 섞은 후 유산균주 배양액이 점적된 MRS 고체배지 위에 부음. 이를 배양하면서 콜로니 주변에 생육저해환(inhibition zone)이 형성되는지 관찰함. 동시에 배양 상등액에 대한 항균활성을 확인하기 위해 배양액을 1M NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 보정한 후 제균(원심분리 및 주사필터 여과)·농축하여 지시균이 도말된 MRS 고체배지 위에 2 μ l씩 점적함. 이후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 생육저해환을 관찰함.

11장. 유산균 유래 항균물질의 항균효과

- 막걸리로부터 분리된 유산균주(CJNU 2524)가 지시균에 대하여 항균활성을 가지는 것을 확인함
- 항균활성 유산균주(CJUN 2524)에 대하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 동정 결과 *Enterococcus faecium*으로 확인됨
- 유산균 및 유산균이 생산한 박테리오신(부분정제)을 이용하여 다양한 지시균(그람양성 및 그람 음성세균)에 대한 항균활성을 상기의 한천확산법에 기초하여 조사함
- *E. faecium* CJNU 2524 배양액은 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3145, *Escherichia coli* DH5 α , *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Leuconostoc mesenteroides* CJNU 0147, *Pediococcus acidilactici* K10, *E. faecium* MK3, *B. subtilis* SCB 균주 등에 대하여 항균활성을 나타냄. 반면, 배양상등액은 *L. acidophilus* KCTC 3145, *L. monocytogenes* KCTC 3569, *Leu. mesenteroides* CJNU 0147 균주에만 항균 활성이 나타남. 두 시료가 항균활성에서 차이가 나는 것은 pH에 따른 항균활성의 차이로 추론됨
- *E. faecium* CJNU 2524 균주의 박테리오신 생산 최적배양조건을 확인하기 위해 배지(BHI broth, MRS broth), 온도(25, 30, 37 $^{\circ}$ C), 초기 pH(5.0-8.0)를 달리하여 경시적으로(0, 3, 6, 9, 12, 24 시간) 시료를 취해 pH, 흡광도(OD₆₀₀) 및 박테리오신 활성을 측정함
- 배지의 경우 MRS broth, 온도의 경우 30 $^{\circ}$ C 그리고 초기 pH의 경우 7.0이 최적 조건으로 확인됨



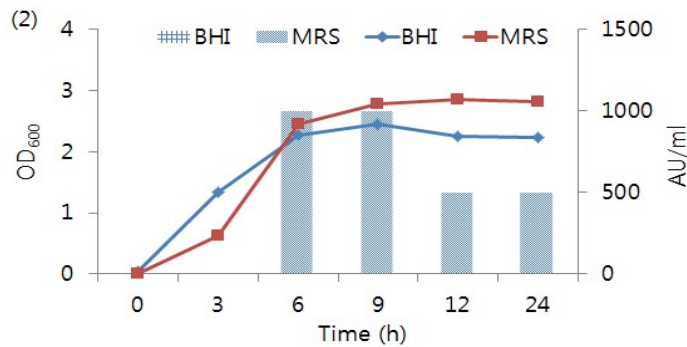
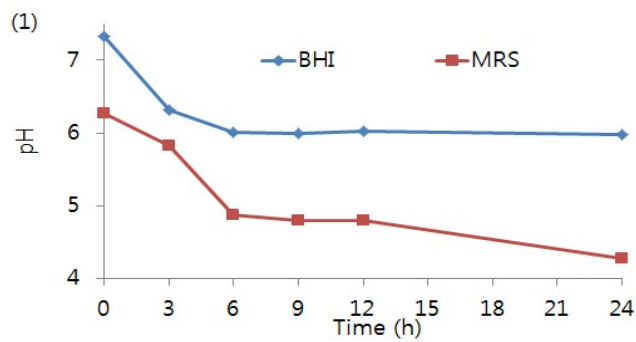
[그림] *E. faecium* CJNU 2524 항균 효과(지시균: *L. acidophilus*)
 A: Deferred antagonism assay(배양액); B: Spot on the lawn test(배양상등액)

[표] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 균주의 항균 스펙트럼

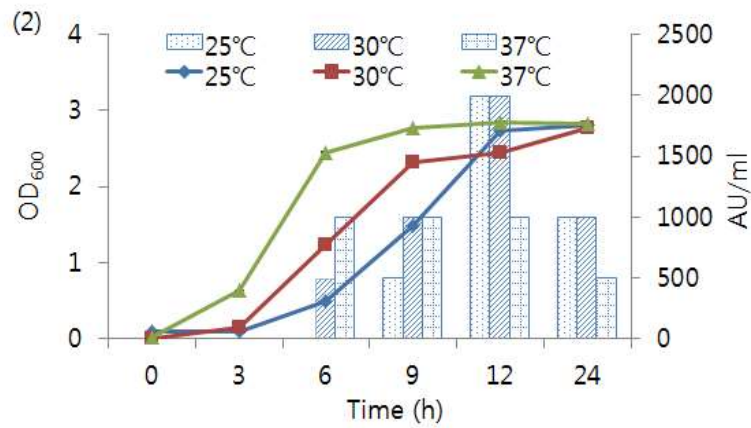
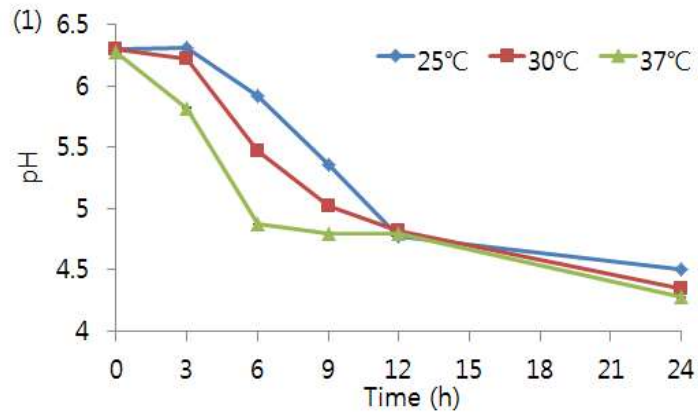
Target strains	Antimicrobial activities	
	Deferred antagonism assay	Spot on the lawn test for culture supernatant
<i>Escherichia coli</i> DH5a	+	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3679	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> CJNU 0588	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3145	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJNU 0147	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> K10	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> MK3	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> SCB	+	-

[표] 배양조건에 따른 *Enterococcus faecium* CJNU 2524의 박테리오신 생산(AU/mL)

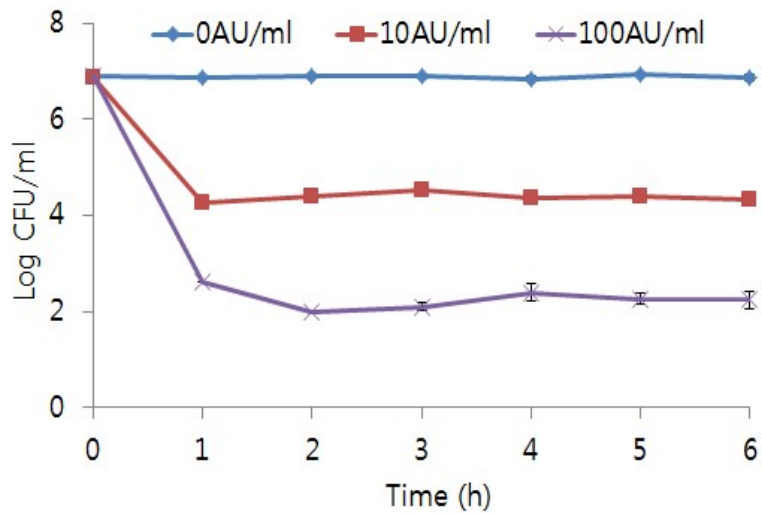
Broth	0 (h)	3	6	9	12	24
BHI	0	0	0	0	0	0
MRS	0	0	1000	1000	500	500
Temp.	0 (h)	3	6	9	12	24
37°C	0	0	1000	1000	1000	500
30°C	0	0	500	1000	2000	1000
25°C	0	0	0	500	2000	1000
pH	0 (h)	3	6	9	12	24
5.0	0	0	0	0	0	X
6.0	0	0	500	1000	1000	X
7.0	0	0	1000	2000	1000	X
8.0	0	0	1000	1000	500	X



[그림] 배양 배지 조건에 따른 *Enterococcus faecium* CJNU 2524의 박테리오신 생산



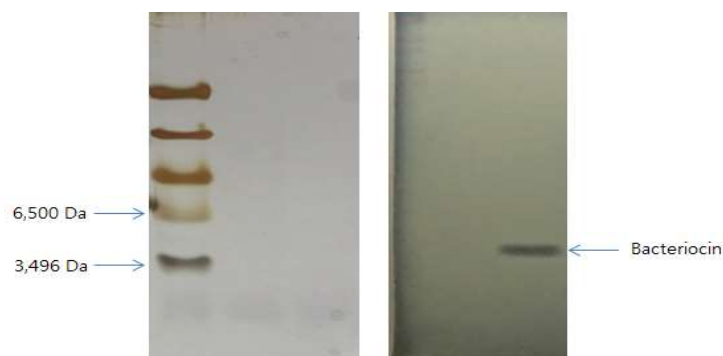
[그림] 배양 온도 조건에 따른 *Enterococcus faecium* CJNU 2524의 박테리오신 생산



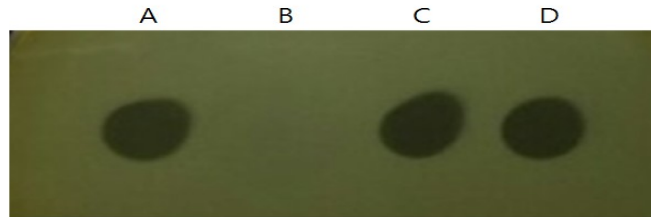
[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 균주 생산 박테리오신의 작용 양상(지시균: *L. monocytogenes*)

12장. 유산균 유래 박테리오신의 부분정제 및 안정성 확인

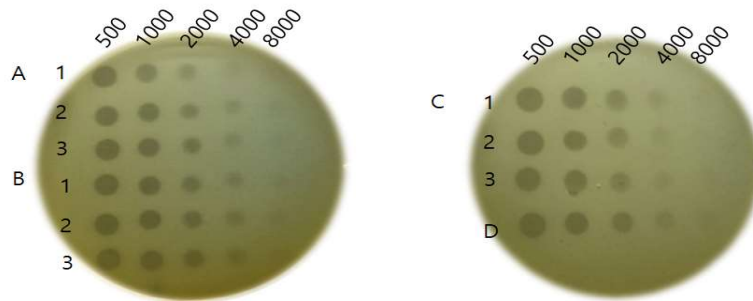
- *E. faecium* CJNU 2524 균주를 최적조건으로 배양한 후 제균된 상등액에 acetone을 첨가하여 추출하였으며 원심분리 후 상등액을 회전식 감압 농축기로 농축하여 부분 정제 박테리오신 용액을 확보함
- 부분 정제된 박테리오신의 분자량을 확인하기 위해 12% 아크릴아마이드 겔을 이용하여 Tricine-SDS-PAGE를 진행함. 이후 silver staining을 통해 박테리오신의 분자량을 추정함. Silver staining 결과 박테리오신 밴드 확인이 어려워 동시에 bioassay를 진행하여 박테리오신의 분자량이 4-5 kDa임을 확인함
- 부분 정제 박테리오신의 물리·화학적 안정성을 시험하기 위하여 효소(protease, α -amylase, lipase), 온도(60, 80, 100°C), pH(4.0-9.0), 유기용매(ethanol, methanol, acetonitrile, acetone, chloroform)를 달리하여 처리함
- 효소(각각 1unit)를 처리하였을 때 protease를 제외한 나머지 효소(α -amylase, lipase)에서 안정성이 확인됨. 온도의 경우 60°C, 80°C, 100°C에서 1시간 동안 열처리한 이후에도 박테리오신 활성에 변화가 없었음. pH의 경우 부분 정제 박테리오신 1mL과 pH 4.0-9.0 완충용액을 섞어 1시간 반응시킨 후 pH 7.0로 보정한 후 활성을 측정한 결과 pH 4.0-9.0 범위에서 안정성을 보임. 유기용매의 경우 유기용매(ethanol, methanol, acetonitrile, acetone, chloroform)와 부분 정제 박테리오신을 1:1 비율로 혼합한 다음 37°C에서 1시간 반응시켰을 때 활성이 안정하게 유지됨



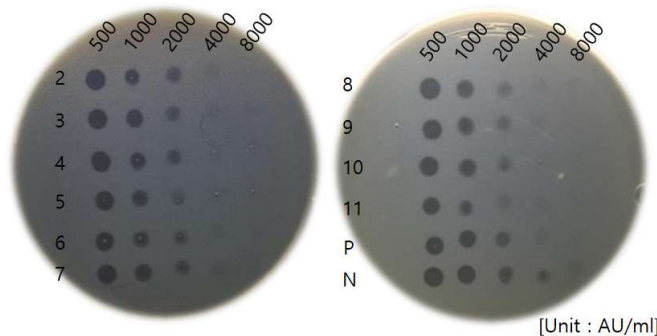
[그림] SDS-PAGE 겔에서 부분 정제된 *E. faecium* CJNU 2524 박테리오신의 분자량



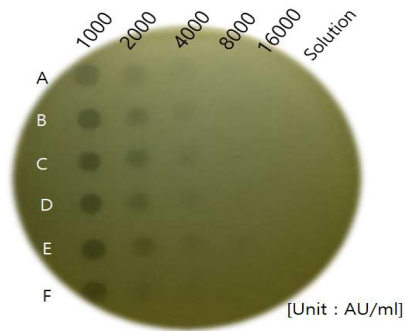
[그림] 효소처리에 대한 부분 정제된 *E. faecium* CJNU 2524 박테리오신의 안정성
A: Control; B: Protease C: Lipase; D: α -Amylase 처리



[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 균주 생산 박테리오신의 열 안정성
A(1-3): 60°C 15분, 30분, 60분; B(1-3): 80°C 15분, 30분, 60분; C(1-3): 100°C 15분, 30분, 60분; D: 양성 대조구



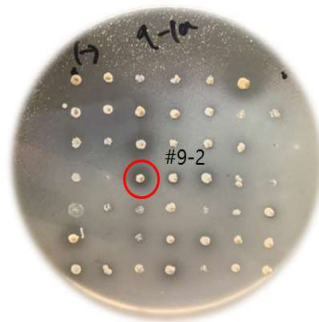
[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 균주 생산 박테리오신의 pH(2-11) 안정성
P, N: 양성 대조구



[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 균주 생산 박테리오신의 유기용매 안정성 A: 양성 대조구; B: 메탄올; C: 에탄올; D: 아세톤; E: 아세트니트릴; F: 클로로포름

13장. 박테리오신 생산 신규 유산균 분리

- 상기의 박테리오신이 *Enterococcus* 속 균주가 생산한다는 점을 감안하여 박테리오신 생산 신규 유산균종 분리를 진행함
- 유산균 및 유산균이 생산하는 박테리오신의 항균활성을 시험하기 위하여 한천확산법을 이용함
- 지시균(*S. aureus*)을 5mL MRS 액체 배지에서 활성화 시킨 후 MRS soft agar에 1% 접종하여 유산균 콜로니가 형성된 MRS 고체 배지 위에 부어 굳힌 뒤 37°C, 12시간 배양함. 이후 유산균 콜로니 주변으로 생육저해환(Inhibition zone)이 나타나는지를 확인하여 박테리오신 생산 유무를 판단하였음
- 다양한 김치 및 젓갈 시료에서 유산균을 분리하고 지시균(*S. aureus*)에 대한 항균활성 유무를 확인한 결과 두 균주(#9-2, #2)에서 항균활성이 나타남
- 각각의 균주 배양 상등액(농축)이 protease에 의해 항균활성이 소실되는 것으로 보아 박테리오신임을 추정할 수 있음
- 16S rRNA 유전자 분석에 의한 균주 동정 결과 #9-2 균주는 *Lactococcus lactis*로 #2는 *Weissella viridescens*로 확인됨

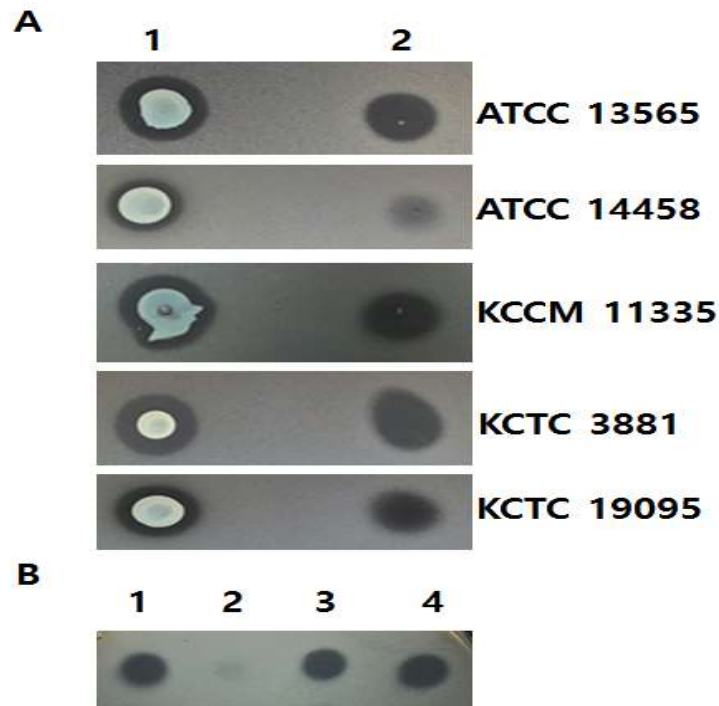


김치 시료에서 #9-2 균주 분리

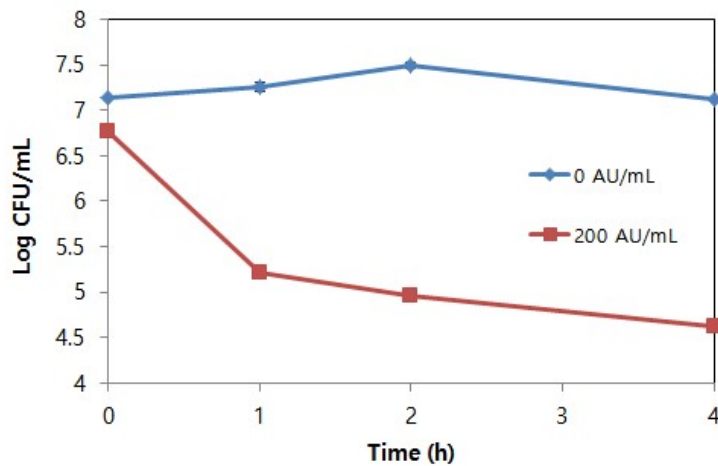


#9-2 균주 배양상등액 농축액의 pH 보정(7.0) 전·후 항균활성(*S. aureus*)

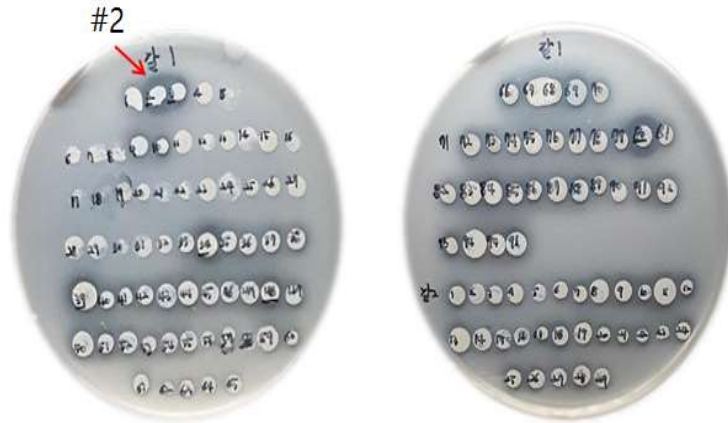
[그림] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 분리 및 항균활성



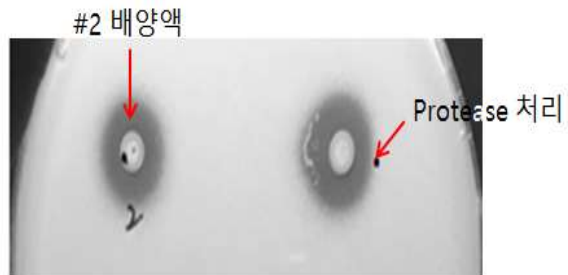
[그림] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 균주 배양액 및 부분정제 박테리오신의 다양한 *Staphylococcus aureus* 균주에 대한 항균활성(A)과 박테리오신의 효소안정성(B)
 A: 1) 배양액, 2) 부분정제 박테리오신; B: 1) 무처리구, 2) Protease 처리, 3) Lipase 처리, 4) α -Amylase 처리(지시균: *S. aureus* KCTC 3881)



[그림] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 박테리오신의 *S. aureus*에 대한 항균 작용양상(action mode)



젓갈 시료에서 #2 균주 분리



#2 균주의 *S. aureus*에 대한 항균활성 및 protease에 의한 항균활성 소실

[그림] *Weissella viridescens* #2 균주 분리 및 *S. aureus*에 대한 항균활성

Sample name : 9-2_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_040955.1	Lactococcus lactis	1499	1	1499	100	2769	0.0	1499/1499	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Streptococcaceae	Lactococcus	Lactococcus lactis

Sample name : 2_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

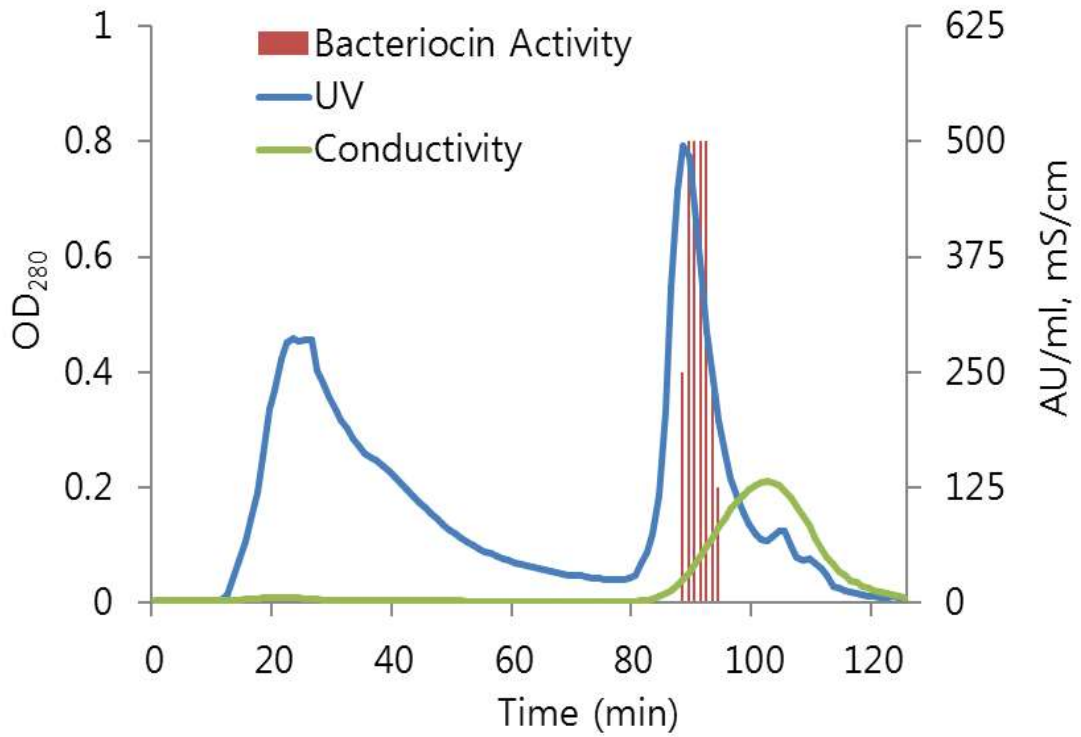
Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_040813.1	Weissella viridescens	1479	1	1479	100	2732	0.0	1479/1479	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Leuconostocaceae	Weissella	Weissella viridescens

[그림] #9-2, #2 균주 동정(16S rRNA gene sequencing)

14장. 박테리오신에 대한 서열 분석 및 특성 분석

- *E. faecium* CJNU 2524, *E. faecium* CJNU 2008 및 *L. lactis* #9-2로부터 생산된 박테리오신을 아세톤 추출, 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, Prep-HPLC, HPLC 등의 방법을 활용하여 정제함
- 박테리오신 활성 측정은 한천확산법을 이용하였으며 *E. faecium* CJNU 2524와 *E. faecium* CJNU 2008은 지시균으로 *L. monocytogenes*를 사용하였으며 *L. lactis* #9-2는 *S. aureus*를 사용함
- 아세톤 추출을 위해 균주를 최적조건으로 배양하여 제균한 후 상등액에 아세톤을 첨가하여 추출하였으며, 원심부리 후 상등액을 회전식 감압 농축기로 농축하여 부분 정제 박테리오신 용액을 제조함
- 아세톤추출로 부분 정제한 박테리오신을 사용하여 이온교환 크로마토그래피를 진행하였으며 이온교환 크로마토그래피 조건은 칼럼(DEAE 충전제, 2.5cm x 4.5cm)에 시료 주입 후 유속 1mL/min으로 125분 동안 A용매(Tris-HCl, pH 8.3)와 B용매(Tris-HCl, pH 8.3 + 1M NaCl)를 이용하여 0min(B 0%)→60min(B 0%)→70min(B 100%)→75min(B 100%)→125min(B 0%)의 조건으로 흘려주었고 분획하여 흡광도 및 박테리오신 활성 등을 측정함
- 겔 여과 크로마토그래피 조건은 Superdex™ (Prep grade; GE Healthcare Life Sciences) 레진을 칼럼(16mm x 330mm)에 충전한 후 완충액(50mM Tris-HCl, pH 7.0)을 사용하여 평형화하여 사용함. 부분 정제 박테리오신 시료를 주입하였으며 120분 동안 완충액을 흘려주며 분획 후 박테리오신 활성을 측정함
- Prep-HPLC 조건은 YMC-Triart C18(250 x 10 mm) 칼럼을 사용하였으며 gel filtration chromatography로부터 얻은 박테리오신 분획물을 농축하여 컬럼에 적용한 후 이동상으로 acetonitrile 40%를 사용하였으며 유속 1.8mL/min으로 40분 동안 흘려주며 분획하여 박테리오신 활성을 측정함
- HPLC 조건은 ion exchange chromatography로부터 확보한 박테리오신 분획물을 농축한 것을 시료로 사용하였으며 칼럼은 ACE 5 C18(4.6 x 150mm), 검출 파장은 210nm, 칼럼온도는 상온으로 사용하였음. 이동상 용매로는 A용매(물 + 0.1% TFA)와 B용매(Acetonitrile + 0.1% TFA)를 이용하여 0min(B 0%)→10min(B 0%)→50min(B 100%)→60min(B 100%)→70min(B 0%)의 조건으로 흘려주며 분획한 후 박테리오신 활성을 측정함.



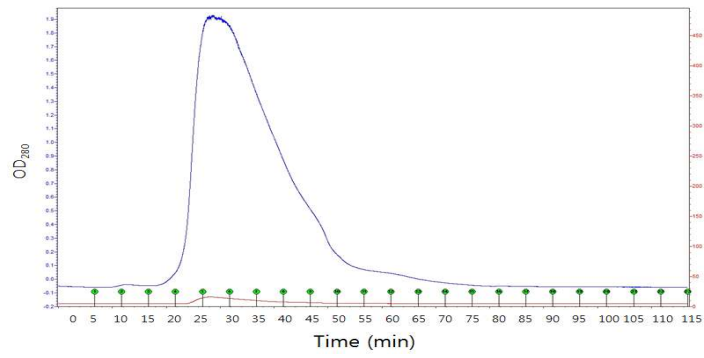
71-75
76-80
81-85
86-90

91-95
96-100
101-105
106-110

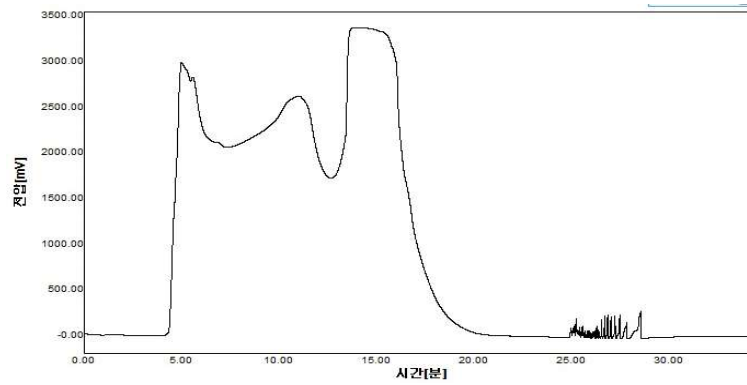
[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 박테리오신 정제
이온 교환 크로마토그래피 크로마토그램(위), 분획의 박테리오신 활성(아래)

○ 이온교환크로마토그래피를 이용한 *E. faecium* CJNU 2524 박테리오신 활성은 retention time 89~93분대에서 확인됨

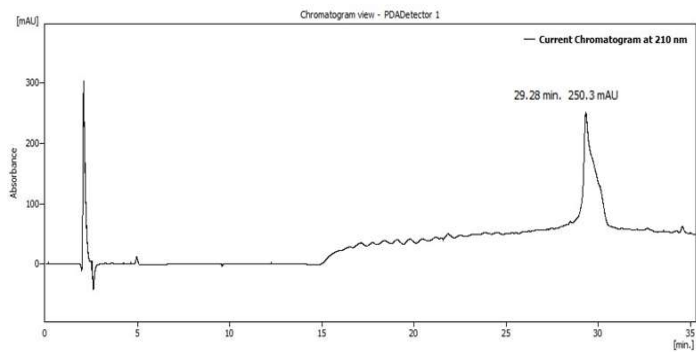
A



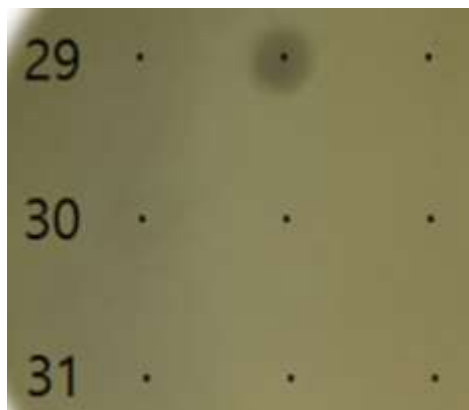
B



C

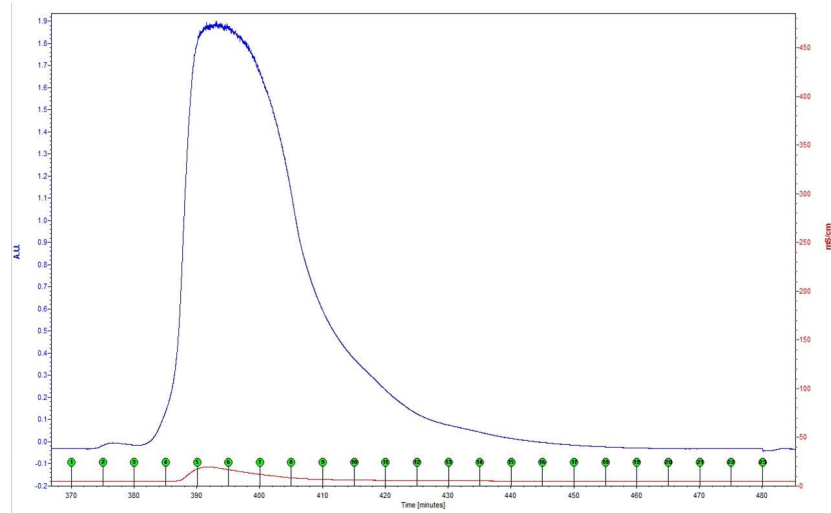


D

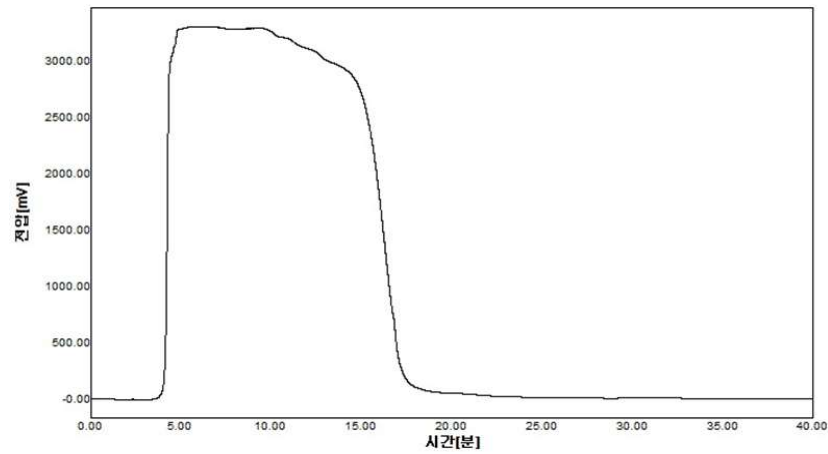


[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2524 박테리오신 정제
 겔여과 크로마토그래피(A), Prep-HPLC(B) 및 HPLC(C) 크로마토그램; HPLC 분획물
 박테리오신 활성(D)

A



B

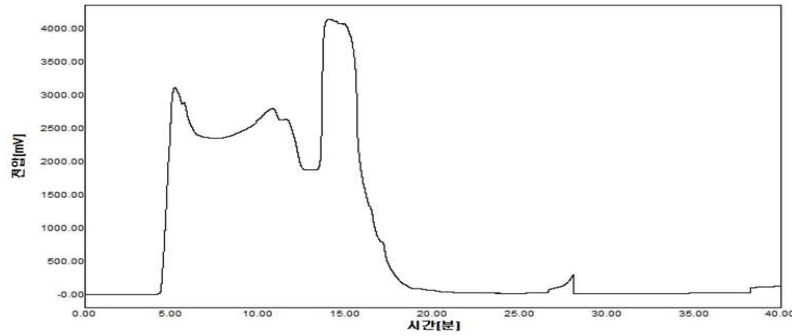
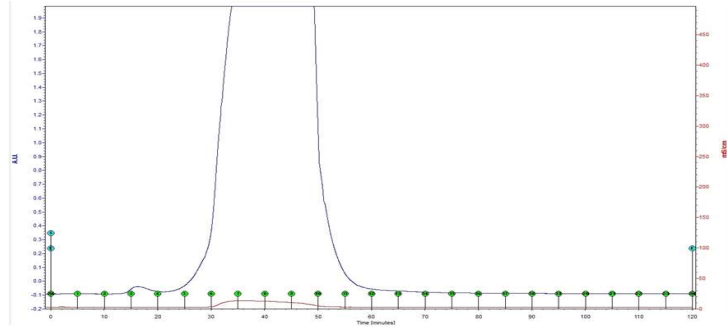


10분 ->

C



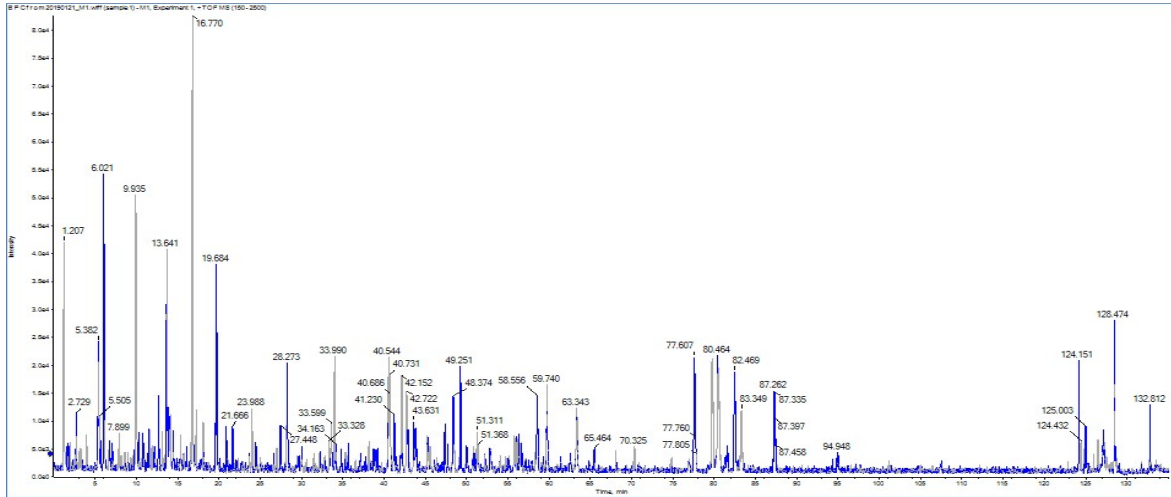
[그림] *Enterococcus faecium* CJNU 2008 박테리오신 정제
겔 여과 크로마토그래피(A)와 Prep-HPLC(B) 크로마토그램; Prep-HPLC 분획물의 박테리오신
활성(C)



[그림] *Lactococcus lactis* #9-2 박테리오신 정제
 겔 여과 크로마토그래피(위)와 Prep-HPLC(아래) 크로마토그램

- 겔 여과 크로마토그래피 결과 전체적으로 한 개의 피크가 확인되었으며, *E. faecium* CJNU 2524는 35-40분, *E. faecium* CJNU 2008은 4-7분, *L. lactis* #9-2는 30-40분에서 박테리오신 활성이 확인됨
- Prep-HPLC 결과 *E. faecium* CJNU 2524는 10-14분, *E. faecium* CJNU 2008은 10-13분, *L. lactis* #9-2는 15-16분에서 박테리오신 활성이 확인됨
- HPLC 결과 *E. faecium* CJNU 2524는 29-30분에서 박테리오신 활성이 확인됨
- 박테리오신 분획물(*E. faecium* CJNU 2524 및 *L. lactis* #9-2 유래)에 대해서는 단백질 분석업체에 의뢰하여 동정을 실시함
- 분석 결과, *E. faecium* CJNU 2524 유래 박테리오신은 엔테로신 P(enterocin P)와 상동성이 있는 것으로 확인되었으며 *L. lactis* #9-2 유래 박테리오신은 상동성이 있는 박테리오신이 확인되지 않았으며 대신 해당 분획물에서 나이신(nisin) 면역단백질과 상동성을 가진 단백질이 검출되어 *L. lactis* #9-2 생산 박테리오신은 나이신이나 다른 lantibiotics로 추정되었음.

A



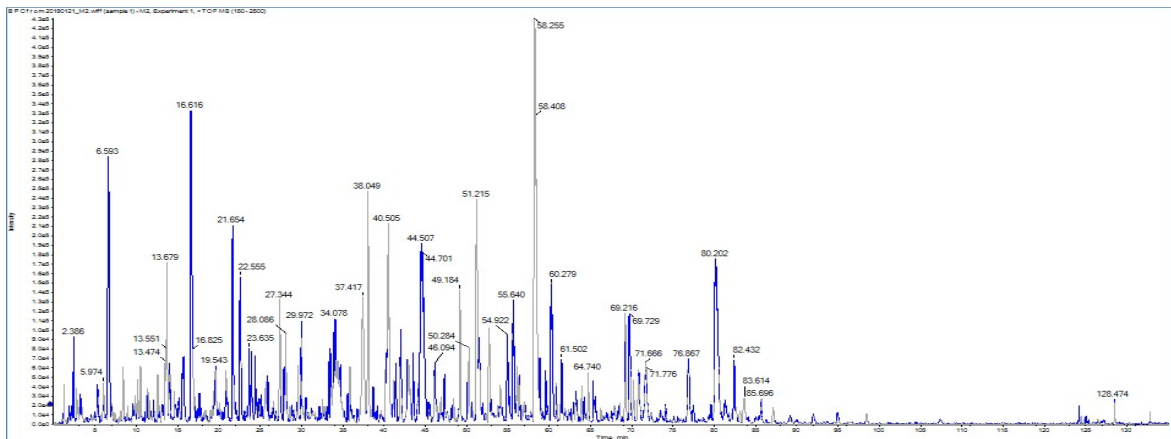
Prot N3 (bacteriocin) : <https://www.uniprot.org/uniprot/O30434>

MRKKLFSLALIGIFGLVVTNFGTKVDAATRSYNGVVCNNSKCVWNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH

B

Confidence : Green > Yellow > Red, Gray : not detected.

C



Prot. N4

MRKYLILLIVALIGITGLSGCYQTSQKKVRFDEGSYTNFIFDNKSYFVTDKEIQENVNNSKVKFYNLLIVDMKSEKLLSSNKNKSVTLVLLNNIYEASDKSLCMGINDRYYKILPESDKGAVKALRLQNFVDTSDISDDNFVIDKNDNRKIDYMGNIYSISDTTVSDEELGEYQDVLAEVRVFDVSVSGKSI PRSEWGRIDKDGNSKQSRTEWDYGEIHSIRGKSLTEAFAVEINDDFKLATKVG N

D

Confidence : Green > Yellow > Red, Gray : not detected.

[그림] LC-MS 크로마토그램(A, C) 및 펩타이드 동정 결과 (B, D)

A, B: *E. faecium* CJNU 2524 박테리오신 분획물; C, D: *L. lactis* #9-2 박테리오신 분획물 *Enterococcus* 속 유래 박테리오신(엔테로신 P)(accession number: sp|O30434|ETCP_ENTFC) 아미노산 서열(B) 및 *Lactococcus* 속 유래 나이신 면역단백질(NisI)(accession number: tr|A0A1V0NLK4|A0A1V0NLK4_LACLL) 아미노산 서열(D)

15장. 신규 박테리오신 생산 유산균의 최적배양 조건 및 생산 박테리오신의 안정성 분석

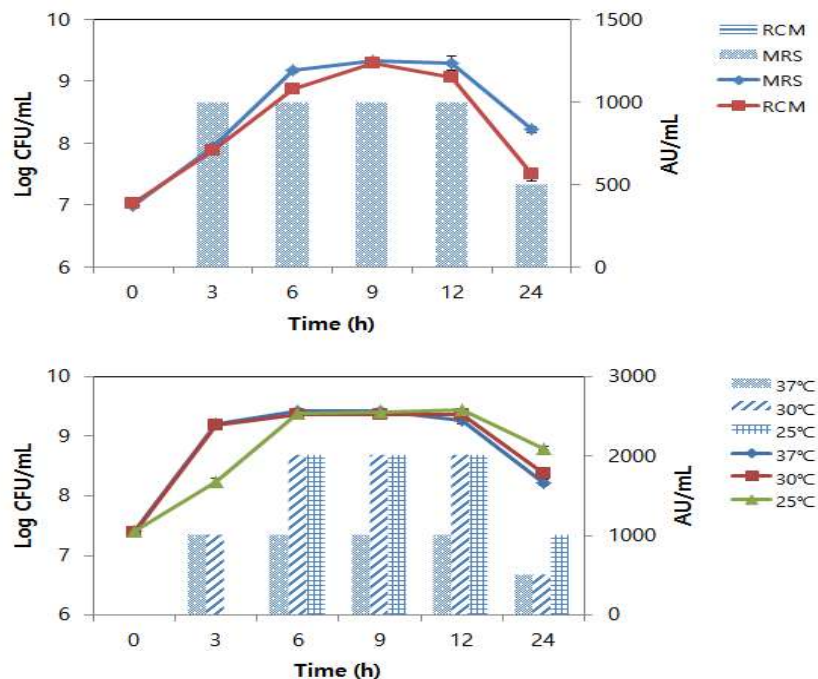
○ *L. lactis* #9-2 균주의 배양조건인 배지(RCM broth, MRS broth), 온도(25, 30, 37°C), 초기 pH(2.0-11.0)를 달리하여 경시적으로(0, 3, 6, 9, 12, 24 시간) 시료를 취해 생균수, pH 및 박테리오신 활성을 측정함

○ *L. lactis* #9-2 균주의 박테리오신 부분 정제액을 대상으로 pH, 온도, 유기용매 및 효소에 대한 안정성을 확인함

○ 안정성 실험으로 온도 안정성은 박테리오신 부분정제액을 60, 80, 100°C에서 15, 30, 60분 및 121°C에서 15분간 반응시켰음. 유기용매 안정성은 시료와 유기용매를 1:1로 반응시켜 37°C에 2시간 반응시켰음

○ *L. lactis* #9-2 균주의 박테리오신 생산을 위한 최적조건은 배지로서는 MRS, 그리고 배양온도는 25°C와 30°C로 확인됨

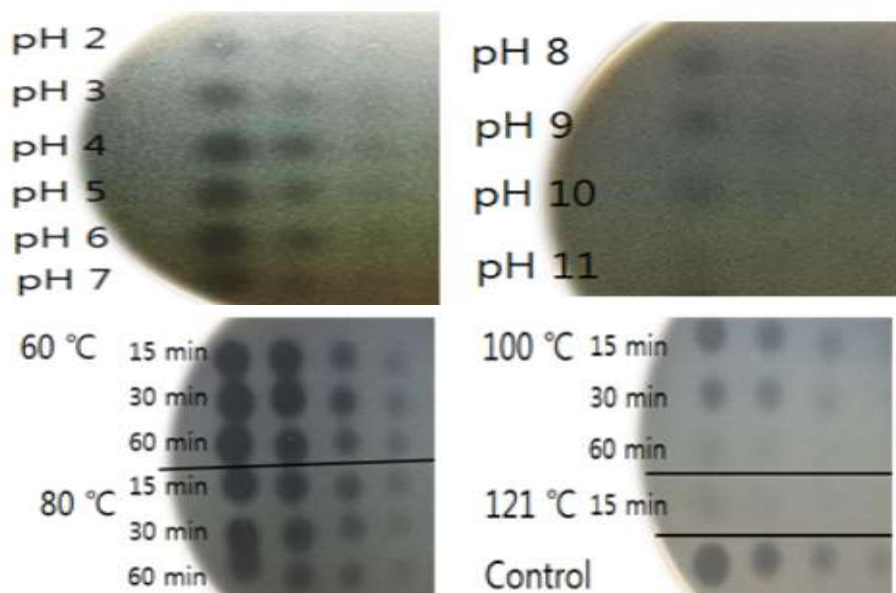
○ *L. lactis* #9-2 균주의 박테리오신 부분정제액을 대상으로 pH, 온도, 유기용매 및 효소에 대한 안정성을 확인한 결과, pH 3.0-6.0, 100°C 30분, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 아세트니트릴, lipase, α -amylase 등에 내성을 보임



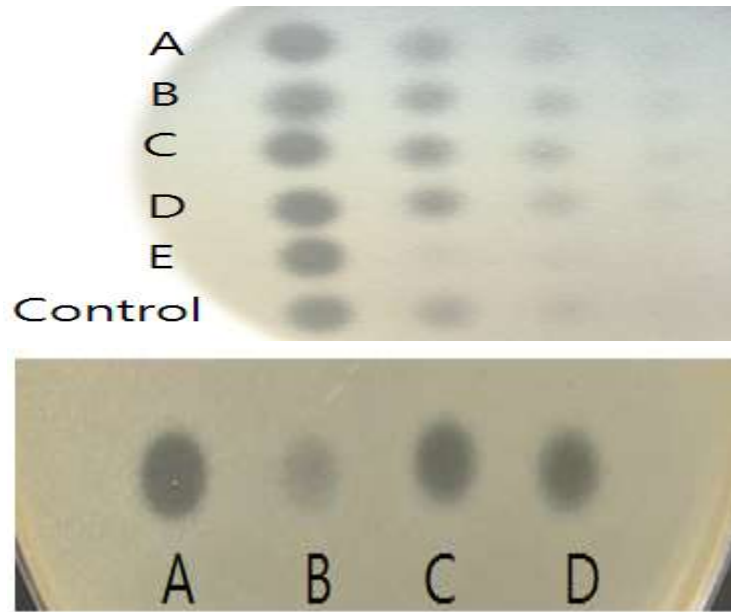
[그림] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 균주의 박테리오신 생산 최적배양조건

[표] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 박테리오신 부분 정제액의 안정성

Treatments	Time (min)	Residual activity (AU/mL)
Control (no treatment)		4,000
Heat (°C)		
60	15	4,000
	30	4,000
	60	4,000
80	15	4,000
	30	4,000
	60	4,000
100	15	4,000
	30	2,000
	60	500
121	15	500
Solvent		
Methanol		4,000
Ethanol		4,000
Acetone		4,000
Acetonitrile		4,000
Chloroform		4,000



[그림] *Lactococcus lactis* #9-2(CJNU 3001) 균주 박테리오신 부분 정제액의 pH (위) 및 열 (아래) 안정성

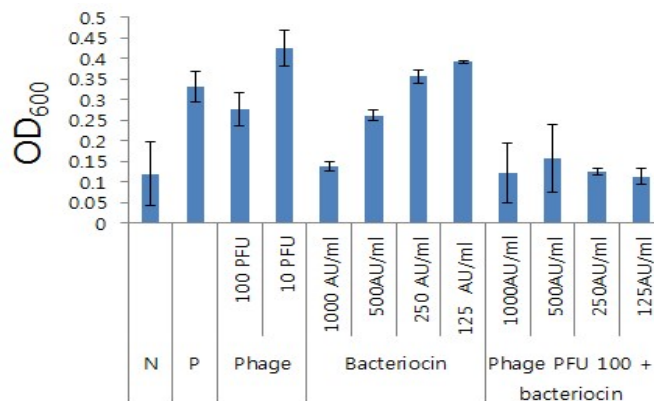
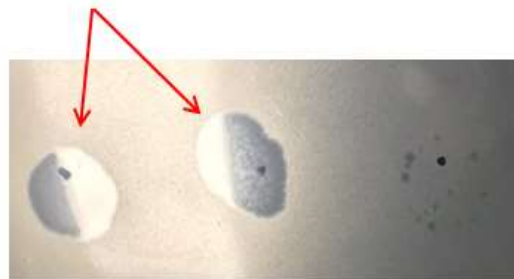


[그림] *L. lactis* #9-2(CJNU 3001) 균주의 부분 정제 박테리오신의 유기용매 안정성(위; A: 메탄올; B: 에탄올; C: 아세톤; D: 아세토니트릴; E: 클로로포름) 및 효소 안정성(아래; A: 무처리; B: protease; C: lipase; D: α -amylase)

16장. 박테리오파지와 박테리오신의 복합처리를 통한 항균력 평가

- *E. coli* 박테리오파지 ECP27의 용균반을 확인하기 위해 한천확산법을 이용하였음
- 5mL LB top agar(0.7% agar 포함)에 *E. coli* DH5 α 을 1% 접종하여 잘 섞은 후 LB 고체배지 위에 깔아줌. 박테리오파지가 포함된 용액을 10배씩 계대 희석하여 그 위에 10 μ l를 점적함. 이후 용균반 및 파지 수를 확인하였음
- 96well에 *L. lactis* #9-2 박테리오신 부분정제액(125-1000 AU/mL)과 박테리오파지 ECP27(100PFU, 10PFU)을 각각 첨가함. 병용처리 조건으로 박테리오파지 ECP27 100PFU에 *L. lactis* #9-2 박테리오신(125-1000 AU/mL)을 농도별로 첨가하였음. 이후 1% *E. coli* DH5 α 가 접종된 LB broth 200 μ l를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양 후 흡광도(OD₆₀₀)를 측정함
- *E. coli* 박테리오파지 ECP27에 의해 형성된 용균반(plaque)을 확인하였음
- *L. lactis* #9-2 박테리오신과 ECP27 박테리오파지의 병용처리에 의해 *E. coli* DH5 α 가 억제되는 경향을 보이고 있으나 산에 의한 항균활성이 의심되어 추가 시험이 필요함

ECP27 plaque (용균반)

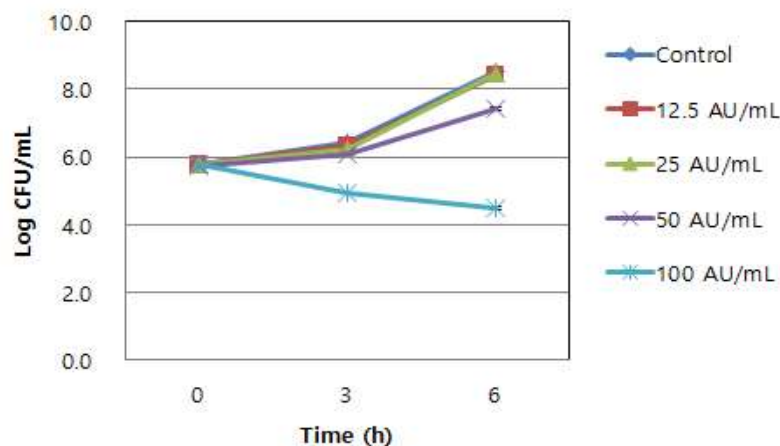


[그림] *E. coli* 박테리오파지 ECP27에 의해 형성된 용균반(plaque)(위) 및 *L. lactis* #9-2 박테리오신과 ECP27 병용처리에 의한 *E. coli* DH5 α 억제효과(아래)

17장. 혼합액(박테리오신+엔도라이신 or 박테리오파지)의 항균력 평가

1절. *L. lactis* CJNU 3001(*L. lactis* #9-2와 동일 균주)유래 박테리오신의 *S. aureus* KCTC 3881에 대한 항균력

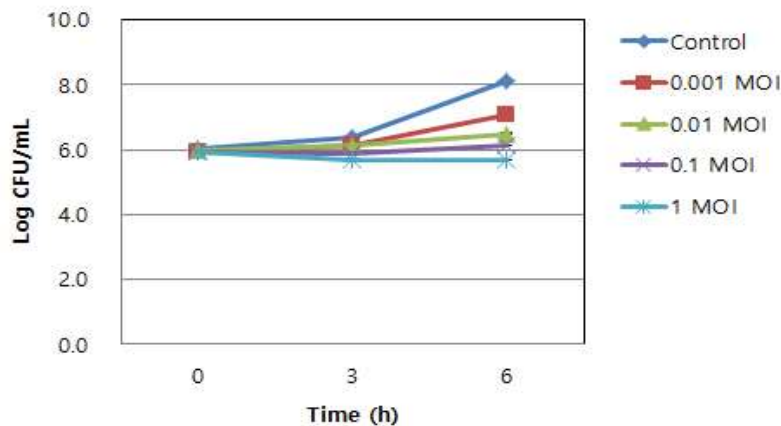
- MRS broth(Difco) 5mL에 박테리오신을 최종농도 100, 50, 25, 12.5 AU/mL 되도록 첨가함
- 박테리오신을 첨가한 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL 되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함.
- 경시 적으로(0, 3, 6시간) 500 μ l씩 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 첨가된 박테리오신의 농도가 증가함에 따라 *S. aureus* KCTC 3881의 생균수가 감소됨을 확인함



[그림] *L. lactis* CJNU 3001 균주 생산 박테리오신(부분정제액)의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균효과

2절. 박테리오파지 SAP84의 *S. aureus* KCTC 3881에 대한 항균력

- MRS broth(Difco) 5mL에 박테리오파지를 최종농도 1, 0.1, 0.01, 0.001 MOI(multiplicity of infection) 되도록 첨가함
- 박테리오파지를 넣은 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881을 최종 농도 1×10^6 CFU/mL 되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함
- 경시적으로(0, 3, 6시간) 500 μ l씩 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 박테리오파지의 농도가 증가함에 따라 *S. aureus* KCTC 3881의 생균수가 감소됨을 확인함

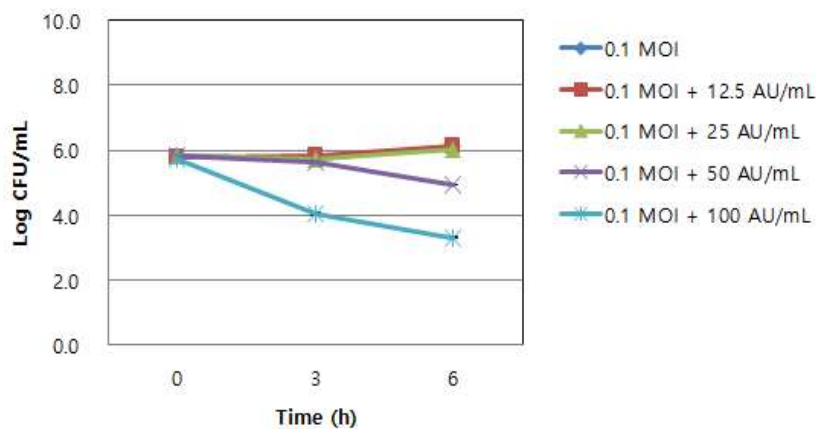


[그림] 박테리오파지 SAP84의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균효과

3절. *L. lactis* CJNU 3001 박테리오신과 박테리오파지 SAP84의 병용 처리

- MRS broth(Difco) 5mL에 박테리오신을 최종농도 100, 50, 25, 12.5 AU/mL 되도록 첨가함

- 박테리오신을 넣은 MRS broth에 박테리오파지를 최종농도 0.1 MOI 되도록 첨가함
- 박테리오신과 박테리오파지를 넣은 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함
- 경시적으로(0, 3, 6시간) 500 μ l씩 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 박테리오신 단독처리 시 50, 100 AU/mL에서 각각 7.4, 4.5 log CFU/mL의 생균수를 나타내었지만 박테리오파지 0.1 MOI의 혼합처리 시 4.9, 3.3 log CFU/mL의 생균수를 나타내어 단독처리보다 혼합처리에서 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생육 억제효과가 더 우수하였음.



[그림] *L. lactis* CJNU 3001 균주 생산 박테리오신과 박테리오파지 SAP84 병용처리에 의한 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생육 억제효과

4절. 재조합 엔도라이신(SAP8 유래)의 *S. aureus* KCTC 3881에 대한 항균력

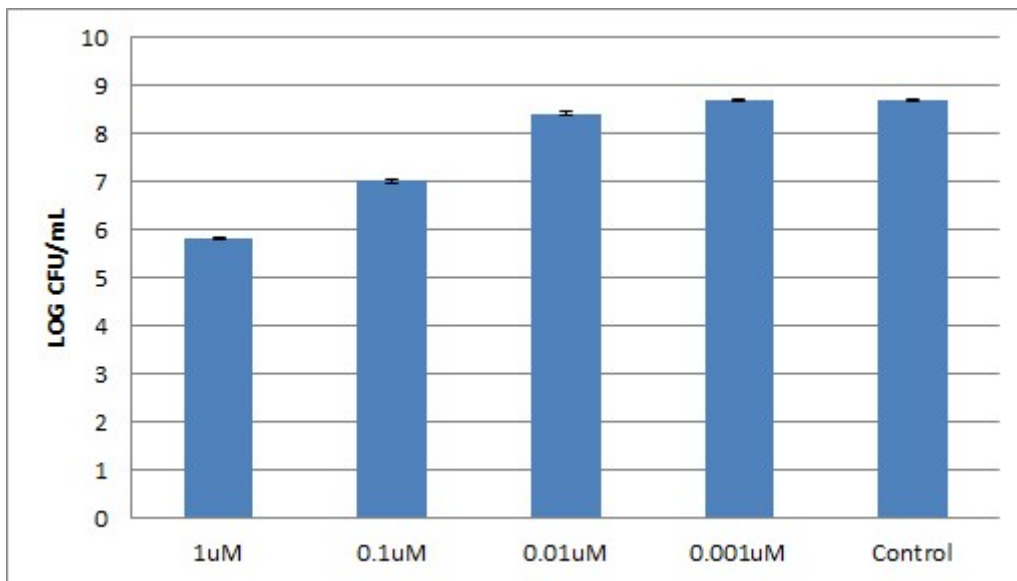
- MRS broth(Difco)에 *S. aureus* KCTC 3881을 접종하여 흡광도(OD₆₀₀) 0.5가 되도록 배양한 후 배양액을 5mL 취하여 5000rpm, 10분, 4°C조건으로 원심분리함. 상등액을 제거하고 Reaction

buffer(pH 8.0; Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5M, CaCl₂ 1mM) 5mL을 넣어 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거함. 위와 같은 방법으로 2번 세척 후 남은 균체를 Reaction buffer 450 μl로 녹임

○ 96well에 최종농도 1, 0.1, 0.01, 0.001 μM 되도록 재조합 엔도라이신(가천대 제작)을 10 μl 넣고, 희석된 균 90 μl를 넣은 후 30°C, 30분 정치 배양함. 배양 후 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함

○ 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μl씩 3반복 점적함. 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄

○ 실험 결과, 재조합 엔도라이신의 농도가 증가함에 따라 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생균수가 감소됨을 확인함



[그림] 재조합 엔도라이신의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균효과

5절. 재조합 엔도라이신 활성 조건에서의 *L. lactis* CJNU 3001 박테리 오신의 활성

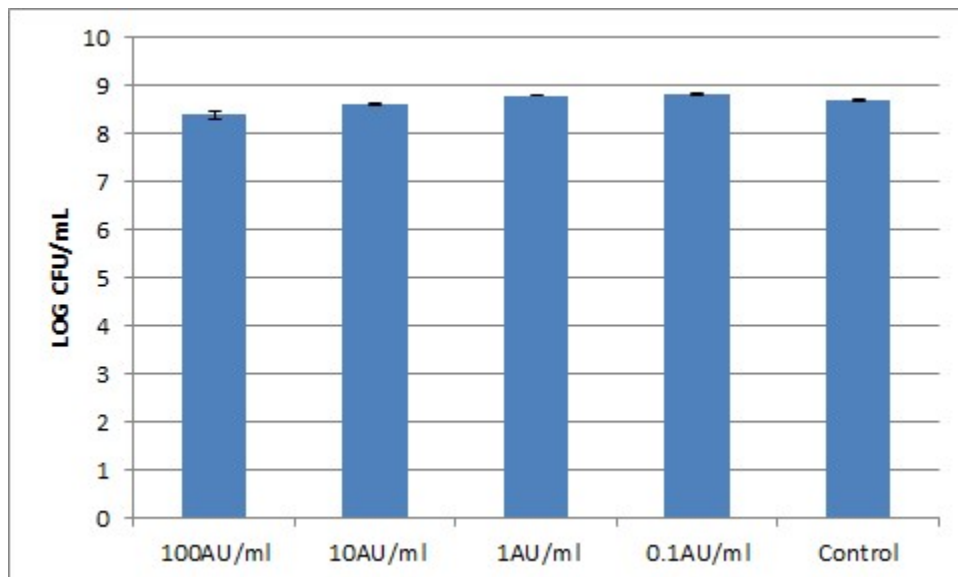
○ MRS broth(Difco)에 *S. aureus* KCTC 3881을 접종하여 흡광도(OD₆₀₀) 0.5가 되도록 배양한 후 배양액을 5mL 취하여 5000rpm, 10분, 4°C조건으로 원심분리함. 상등액을 제거하고 Reaction

buffer(pH 8.0; Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5M, CaCl₂ 1mM) 5mL을 넣어 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거함. 위와 같은 방법으로 2번 세척 후 남은 균체를 Reaction buffer 450 μl로 녹임

○ 96well에 최종농도 100, 10, 1, 0.1 AU/mL 되도록 박테리오신을 10 μl 넣고, 희석된 균 90 μl를 넣은 후 30°C, 30분 정치 배양함

○ 배양 후 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 한 후 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μl씩 3반복 점적함. 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄

○ 실험 결과, 상기의 조건에서는 박테리오신의 항균활성이 관찰되지 않음.



[그림] 재조합 엔도라이신 활성조건에서의 *L. lactis* CJNU 3001 박테리오신의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균효과

6절. 재조합 엔도라이신과 *L. lactis* CJNU 3001 박테리오신 병용처리에 의한 *S. aureus*의 항균효과

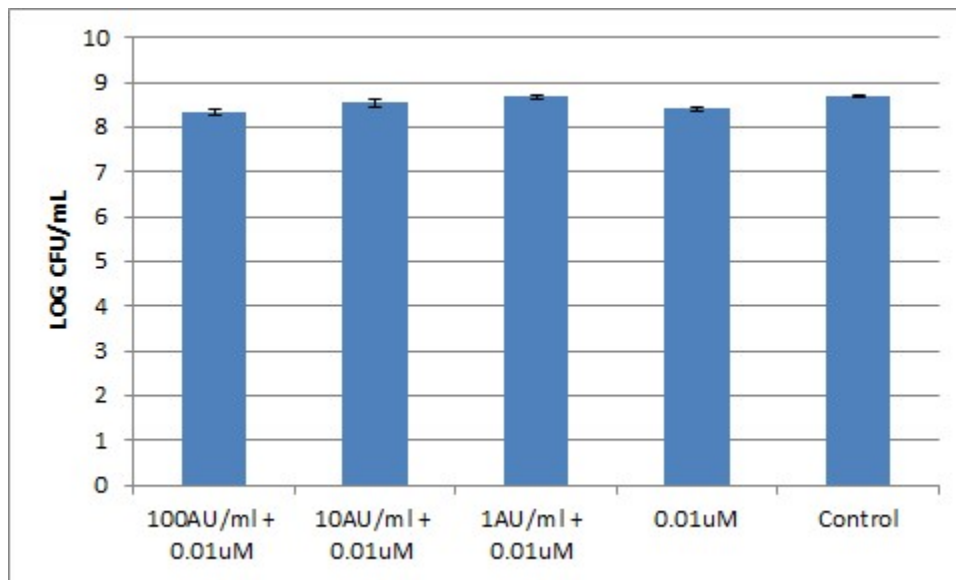
○ MRS broth(Difco)에 *S. aureus* KCTC 3881을 접종하여 흡광도(OD₆₀₀) 0.5가 되도록 배양한 후 배양액을 5mL 취하여 5000rpm, 10분, 4°C조건으로 원심분리함. 상등액을 제거하고 Reaction buffer(pH 8.0; Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5M, CaCl₂ 1mM) 5mL을 넣어 5000rpm, 10분,

4°C 원심분리 후 상등액을 제거함. 위와 같은 방법으로 2번 세척 후 남은 균체를 Reaction buffer 450 μ l로 녹임

○ 96well에 최종농도 0.01 μ M 되도록 재조합 엔도라이신을 10 μ l 넣은 후 박테리오신을 최종농도 100, 10, 1 AU/mL 되도록 10 μ l 넣고, 희석된 균 80 μ l를 넣은 후 30°C, 30분 정치 배양함

○ 배양 후 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 한 후 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄

○ 실험 결과, 상기의 조건에서는 *S. aureus* KCTC 3881 균주 억제 관련 재조합 엔도라이신과 박테리오신의 상승효과가 나타나지 않음



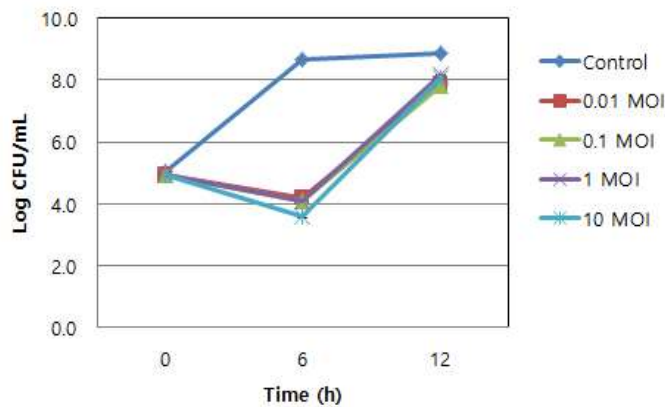
[그림] 재조합 엔도라이신과 *L. lactis* CJNU 3001 박테리오신의 병용처리에 의한 *S. aureus* KCTC 3881 균주 생육억제 효과

7절. 박테리오파지 ECP27의 *E. coli*에 대한 항균효과

○ LB broth(Difco) 5mL에 박테리오파지를 최종농도 10, 1, 0.1, 0.01 MOI 되도록 첨가함

○ 박테리오파지를 넣은 LB broth에 37°C, 12시간, 200rpm 진탕 배양한 *E. coli* DH5 α 를 최종농도 1×10^5 CFU/mL되도록 접종 후 37°C, 200rpm 진탕 배양함

- 경시적으로(0, 6, 12시간)으로 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 LB 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 6시간째에는 첨가된 박테리오파지의 농도가 증가함에 따라 *E. coli* DH5 α 의 생균수가 더 감소하는 양상을 보였으나 12시간째에는 생균수가 다시 회복되었음.

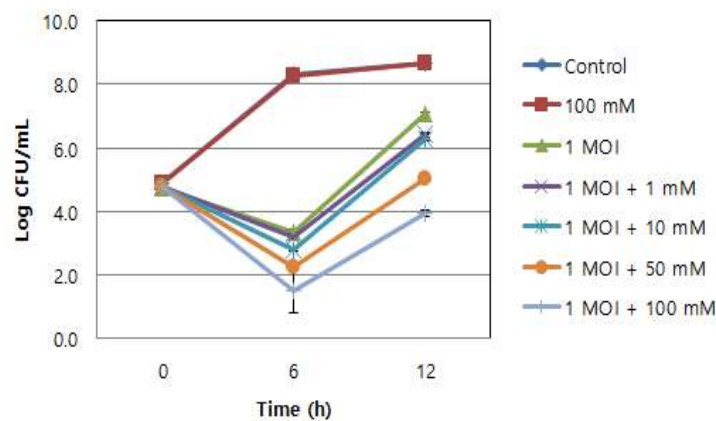


[그림] 대장균 박테리오파지 ECP27 농도에 따른 *E. coli* DH5 α 생균수 변화

8절. 박테리오파지 ECP27과 CaCl₂ 병용처리에 의한 *E. coli* DH5 α 항균효과

- LB broth(Difco) 5mL에 박테리오파지를 최종농도 1 MOI 되도록 넣음
- 박테리오파지를 넣은 LB broth에 CaCl₂ 를 최종농도 1, 10, 50, 100mM 되도록 넣음
- 박테리오파지와 CaCl₂ 를 넣은 LB broth에 37°C, 12시간, 200rpm 진탕 배양한 *E. coli* DH5 α 를 최종농도 1x10⁵ CFU/mL되도록 접종 후 37°C, 200rpm 진탕 배양함
- 경시적으로(0, 6, 12시간)으로 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함

- 평판계수법을 이용하여 LB 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, CaCl₂ 단독처리 시 억제효과가 나타나지 않았음. 하지만 박테리오파지와 CaCl₂의 혼합처리 시 CaCl₂의 농도에 비례해 *E. coli* DH5 α 의 생장이 억제되었음. 이 결과는 박테리오파지 활성에 CaCl₂가 중요함을 의미함

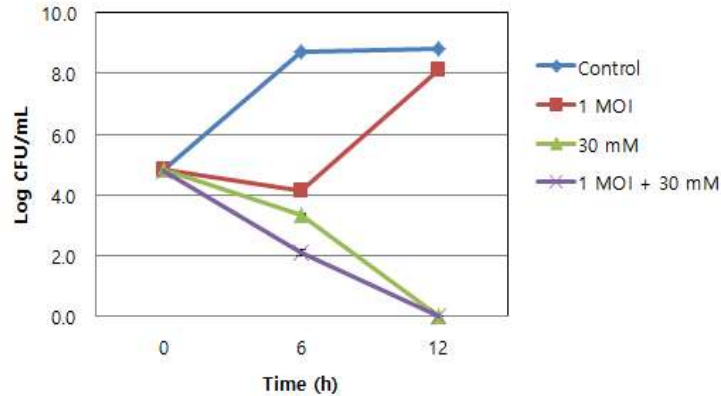


[그림] 대장균 박테리오파지 ECP27과 CaCl₂ 병용처리에 의한 *E. coli* DH5 α 생균수 변화

9절. 박테리오파지 ECP27과 젖산 병용처리에 의한 *E. coli* 항균효과

- LB broth(Difco) 5mL에 박테리오파지를 최종농도 1 MOI 되도록 넣음
- 박테리오파지를 넣은 LB broth에 젖산을 최종농도 30mM 되도록 넣음
- 박테리오파지와 젖산을 넣은 LB broth에 37°C, 12시간, 200rpm 진탕 배양한 *E. coli* DH5 α 를 최종농도 1x10⁵ CFU/mL되도록 접종 후 37°C, 200rpm 진탕 배양함
- 경시적으로(0, 6, 12시간) 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 LB 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함

- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 박테리오파지 단독처리 시 6시간째 4.1 log CFU/mL의 생균수가 확인되었고 젖산 단독처리 시 동시간대에 3.3 log CFU/mL의 생균수가 확인된 반면 병용처리 시 2.1 log CFU/mL의 생균수가 확인되어 *E. coli* DH5 α 생육억제 상승효과가 확인되었음.

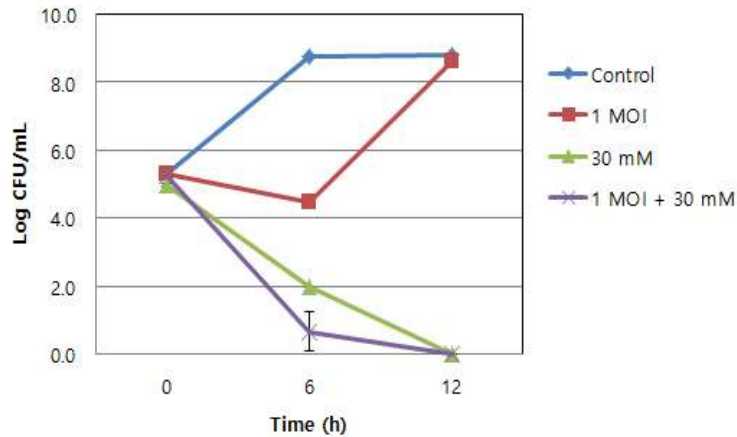


[그림] 대장균 박테리오파지 ECP27과 젖산 병용처리에 의한 *E. coli* DH5 α 생균수 변화

10절. 박테리오파지 ECP27과 구연산의 병용처리에 의한 *E. coli* 항균 효과

- LB broth(Difco) 5mL에 박테리오파지를 최종농도 1 MOI 되도록 넣음
- 박테리오파지를 넣은 LB broth에 구연산을 최종농도 30mM 되도록 넣음
- 박테리오파지와 구연산을 넣은 LB broth에 37°C, 12시간, 200rpm 진탕 배양한 *E. coli* DH5 α 를 최종농도 1×10^5 CFU/mL되도록 접종 후 37°C, 200rpm 진탕 배양함
- 경시적으로(0, 6, 12시간) 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 LB 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정지 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄

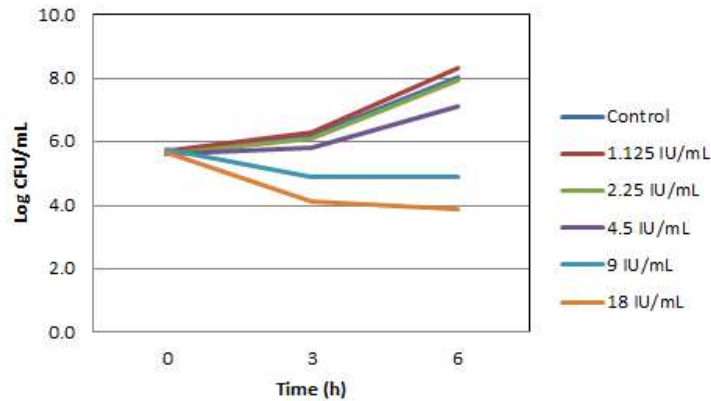
○ 실험 결과, 박테리오파지 단독처리 시 6시간째 4.4 log CFU/mL의 생균수가 확인되었고 구연산 단독처리 시 동시간대에 2.0 log CFU/mL의 생균수가 확인된 반면 병용처리 시 0.6 log CFU/mL의 생균수가 확인되어 *E. coli* DH5 α 생육억제 상승효과가 확인되었음.



[그림] 대장균 박테리오파지 ECP27과 구연산 병용처리에 의한 *E. coli* DH5 α 생균수 변화

11절. 상업용 박테리오신인 나이신(nisin)의 *S. aureus* 항균활성

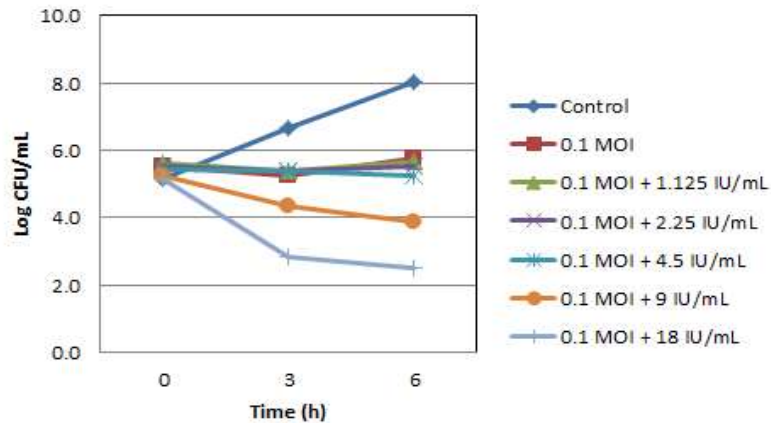
- MRS broth(Difco) 5mL에 나이신을 최종농도 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125 IU/mL 되도록 넣음
- 나이신을 넣은 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1x10⁶ CFU/mL 되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함
- 경시적으로(0, 6, 12시간) 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 나이신의 농도가 증가함에 따라 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생균수가 감소됨을 확인함.



[그림] 나이신에 의한 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생육억제 효과

12절. 나이신과 박테리오파지 SAP84의 병용처리에 의한 *S. aureus* 항균효과

- MRS broth(Difco) 5mL에 나이신을 최종농도 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125 IU/mL가 되도록 넣음
- 나이신을 넣은 MRS broth에 박테리오파지 SAP84를 최종농도 0.1 MOI 되도록 넣음
- 나이신과 박테리오파지를 넣은 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함
- 경시적으로(0, 6, 12시간) 500 μ l씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 나이신과 박테리오파지의 병용처리에서 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균 활성 상승효과가 나타남

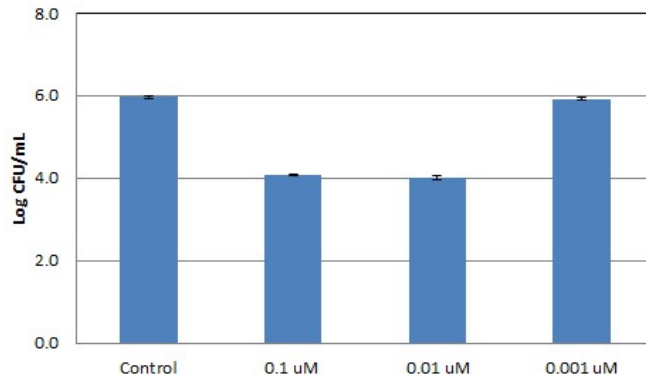


[그림] 나이신과 박테리오파지 SAP84 병용처리에 의한 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생육억제 효과

13절. 특정 pH(6.0)에서의 재조합 엔도라이신(SAP8 유래)과 나이신의 항균활성

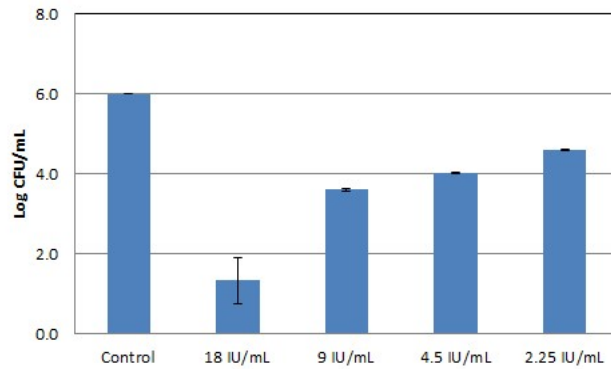
- pH6.0 3차 증류수 5mL에 재조합 엔도라이신을 최종농도 0.1, 0.01, 0.001 uM 되도록 넣음
- 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거함
- 제거한 상등액만큼 pH6.0 3차 증류수 넣고 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거하는 세척과정을 2회 반복함
- 남은 균체에 제거한 상등액만큼 pH6.0 3차 증류수를 넣고 현탁함
- 재조합 엔도라이신을 넣은 pH6.0 3차 증류수에 현탁한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 30°C에서 정치 배양함
- 충분한 반응이 일어나도록 3시간 후에 500ul씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함

- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 재조합 엔도라이신의 농도 0.01uM 이상에서 항균활성이 나타남.



[그림] pH 6.0 조건에서 재조합 엔도라이신의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균활성

- 또한 나이신을 넣은 pH6.0 3차 증류수에 상기의 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 30°C에서 정치 배양함
- 충분한 반응이 일어나도록 3시간 후에 500ul씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 $10 \mu\text{l}$ 씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 첨가된 나이신의 농도에 따라 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생균수가 감소됨을 확인함.

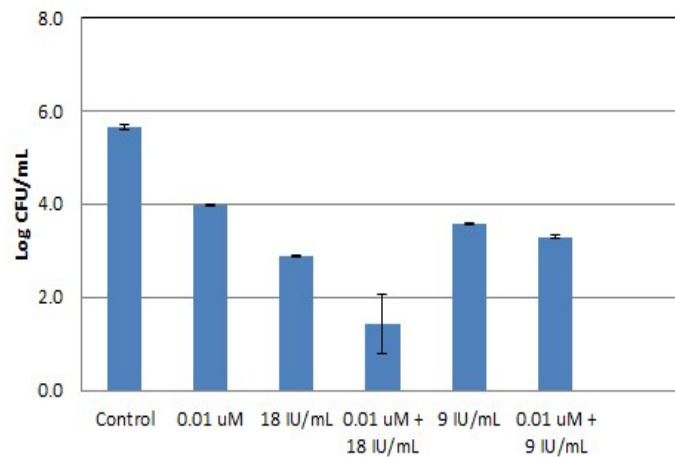


[그림] pH 6.0 조건에서 나이신의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균활성

14절. pH6.0에서의 재조합 엔도라이신과 나이신의 병용처리 효과

- pH6.0의 3차 증류수 5mL에 재조합 엔도라이신을 최종농도 0.01uM 되도록 넣음
- 엔도라이신을 넣은 pH6.0 3차 증류수에 나이신을 최종농도 18, 9 IU/mL 되도록 넣음
- 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거함
- 제거한 상등액만큼 pH6.0 3차 증류수 넣고 5000rpm, 10분, 4°C 원심분리 후 상등액을 제거하는 세척과정을 2회 반복함
- 남은 균체에 제거한 상등액만큼 pH6.0 3차 증류수를 넣고 현탁함
- 엔도라이신과 나이신을 넣은 pH6.0 3차 증류수에 현탁한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 30°C에서 정치 배양함
- 충분한 반응이 일어나도록 3시간 후에 500ul씩 취하여 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10ul씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄

○ 실험 결과, 나이신 단독처리 시 9, 18 IU/mL 농도에서 각각 3.59, 2.88 log CFU/mL의 생균수를 보인 반면 재조합 엔도라이신(0.01uM 농도)과 병용처리 시 각각 3.29, 1.43 log CFU/mL의 생균수를 나타내어 나이신 18 IU/mL 농도에서 *S. aureus* 생육억제 상승효과가 확인되었음



[그림] pH 6.0 조건에서 재조합 엔도라이신과 나이신의 병용처리에 의한 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 항균효과

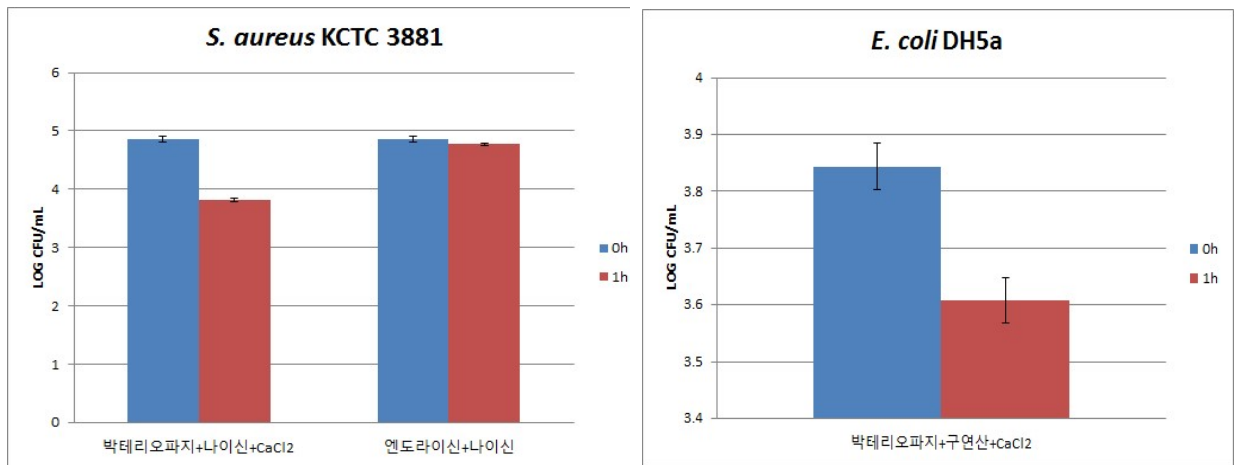
15절. 항균활성 혼합액의 신선농식품 적용

- 양상추를 흐르는 물에 30초 세척하고 EtOH 70%로 15분간 담가 소독함
- 2cmX2cm로 양상추를 자르고 Clean bench 에서 앞뒤면 모두 각각 30분간 UV처리 하여 건조함
- Overnight culture한 *S. aureus* KCTC 3881, *E. coli* DH5 α 균주를 양상추에 10⁵ CFU되게 접종함. 접종 후 37°C에서 2시간 건조 후 실험에 사용하였음
- 건조된 양상추를 박테리오파지 ECP27과 구연산, CaCl₂ 혼합액, 나이신과 박테리오파지 SAP84 혼합액, 나이신과 엔도라이신 혼합액 각각 2mL에 침지처리하여 일정시간(1시간)동안 상온에서 반응시킴
- 반응이 완료된 양상추를 0.1% 펩톤수 1mL이 담긴 tube에 담고 tip을 이용해 파쇄한 후 볼텍

싱을 이용하여 충분히 유리시킴. 이후 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함

○ 평판계수법을 이용하여 MRS, LB 고체배지에 10ul씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양 함

○ 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄.

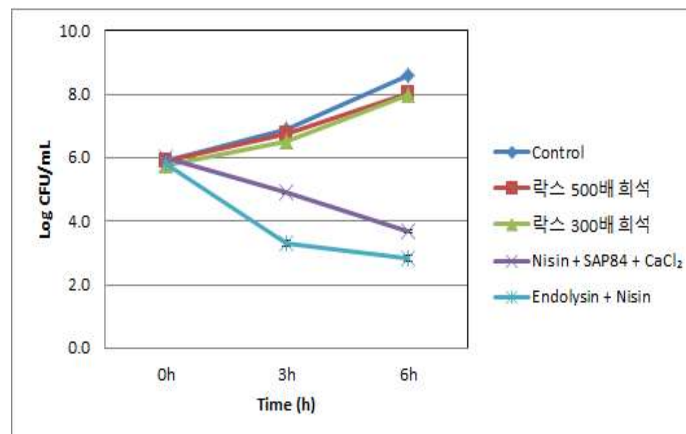


[그림] 양상추에서 항균활성 혼합액의 항균효과

18장. 항균활성 혼합액과 기존 위생처리제(차아염소산나트륨) 비교 평가

- * 0.01 uM endolysin + 18 IU/mL nisin
- * 1×10^5 PFU/mL SAP84 + 18 IU/mL nisin + 10 mM CaCl_2
- * 차아염소산나트륨 300배, 500배 희석액

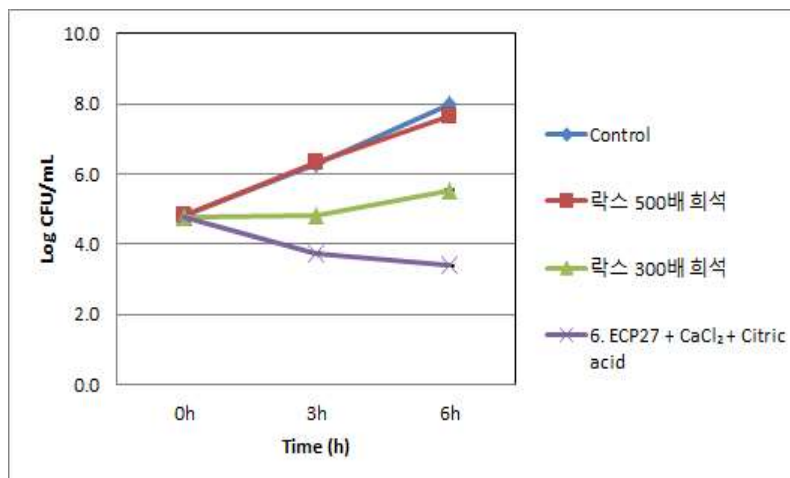
- MRS broth(Difco) 5mL에 엔도라이신과 나이신을 최종농도 0.01 uM, 18 IU/mL 되도록 넣음
- MRS broth(Difco) 5mL에 박테리오파지와 나이신, CaCl_2 를 최종농도 1×10^5 PFU/mL, 18 IU/mL, 10 mM 되도록 넣음
- MRS broth(Difco) 차아염소산나트륨을 최종농도 300배, 500배 희석되도록 넣음
- Endolysin + Nisin, SAP84 + Nisin + CaCl_2 , 차아염소산을 넣은 각각의 MRS broth에 37°C, 12시간 정치배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 1×10^6 CFU/mL되도록 접종 후 37°C에서 정치 배양함
- 경시적으로(0, 3, 6시간) 500 μ l씩 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 하고, 평판계수법을 이용하여 MRS 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 혼합액의 항균활성이 차아염소산나트륨에 비해 우수함.



[그림] 항균활성 혼합액의 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 항균효과

- * 1×10^5 PFU/mL ECP27 + 30mM Citric acid + 10 mM CaCl_2
- * 차아염소산나트륨(락스) 300배, 500배 희석액

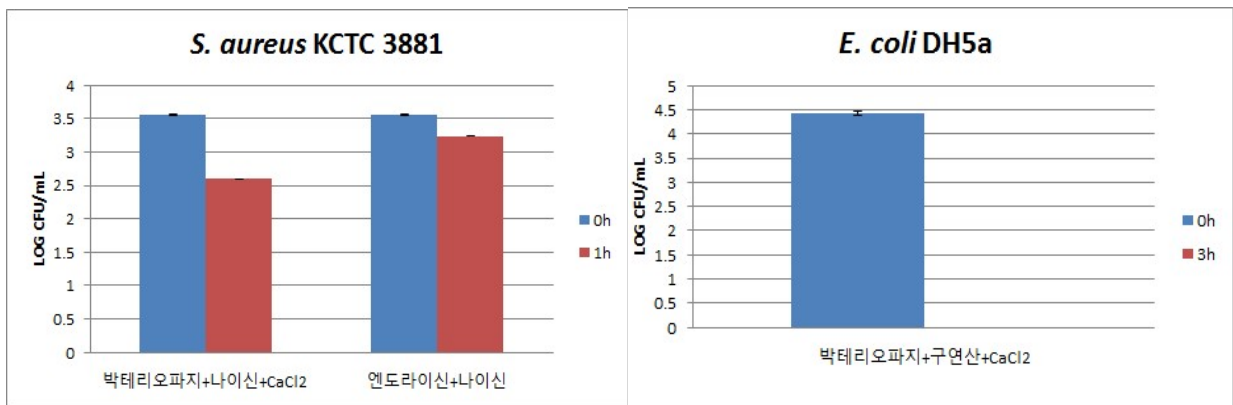
- LB broth(Difco) 5mL에 박테리오파지, 구연산, CaCl_2 를 최종농도 1×10^5 PFU/mL, 30 mM, 10 mM 되도록 넣음
- LB broth(Difco) 차아염소산나트륨을 최종농도 300배, 500배 희석되도록 넣음
- 박테리오파지+구연산+ CaCl_2 , 차아염소산을 넣은 각각의 MRS broth에 37°C, 12시간 200rpm 진탕 배양한 *E. coli* DH5 α 균주를 최종농도 1×10^5 CFU/mL되도록 접종 후 37°C, 200rpm에서 진탕 배양함
- 경시적으로(0, 3, 6시간) 500 μ l씩 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 LB 고체배지에 희석액을 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37°C에서 정치 배양함
- 37°C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄
- 실험 결과, 혼합액의 항균활성이 차아염소산나트륨에 비해 우수함.



[그림] 항균활성 혼합액의 *E. coli* DH5 α 균주에 대한 항균효과

19장. 항균활성 혼합액 현장적용

- 실험용 테이블 위(2cmX2cm 면적)를 70% EtOH을 이용해 살균함
- Overnight culture한 *S. aureus* KCTC 3881, *E. coli* DH5 α 균주를 테이블 위에 10⁵ CFU되게 도포함. 도포 후 실온에서 2시간 방치 후 실험함
- 테이블 위에 박테리오파지 ECP27과 구연산, CaCl₂ 혼합액, 나이신과 박테리오파지 SAP84 혼합액, 나이신과 엔도라이신 혼합액(제 III 혼합제) 100 μ l씩 처리 한 후 일정시간(1시간 혹은 3시간)동안 방치시킴
- 이후 테이블 위를 스왑(swap)하여 0.1% 펩톤수 1mL이 담긴 tube에 넣어 불텍싱함. 이후 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 계대희석 함
- 평판계수법을 이용하여 MRS, LB 고체배지에 10 μ l씩 3반복 점적함. 이후 37 $^{\circ}$ C에서 정치 배양함
- 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 CFU/mL로 환산한 뒤 그래프로 나타냄



[그림] 항균활성 혼합액의 현장적용 시험

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표달성도

세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
(주관기관) 위생처리제와 검출 키트의 상용화 및 국내외 인증과 마케팅 방안	국내외 박테리오파지관련 위 생처리제와 검출키트 동향	100	-국내 박테리오파지 관련 기술조사 및 해외 관련 기술 동향 보고
	국내외 인증을 위한 방안	100	-검출키트에 대한 인증을 위한 기초 데이터 확립
	박테리오파지기반의 위생처 리제 제품화	100	-제품규격, 포장, 디자인, 사용규격, 유통에 대한 기술확립
	기업 선호도 조사	100	-110여개 식품 유형별 업체 설문 조사 완료
	제품화를 위한 기반 구축	100	-키트 제품의 생산을 위한 기반 구축완료 및 시제품 생산완료 -위생처리제 생산을 위한 공정 개선 및 기반 구축 및 생산효율 검증 -위생처리제 대량화를 위한 공정구축
2종의 식중독 세균 검출 키 트 검증	100	-황색포도상구균 검출용 PhageAmp-SA 키트 제작 및 성능 평가 -2종에 대한 특이적인 증균배지 개발 완료 -검사단계별 분리배양 이후 박테리오파지 기반 세균 동정 키트 PhageID 개발 및 성능 평가 -배지, PCR 등 기존 검출법 대비 성능 데이터 비교	
(제1협동) 박테리오파지 및 Endolysin을 활용한 위생처리제 개발	2 종 식중독 세균에 대한 신규 박테리오파지 분리와 특성 분석	100	-신규 박테리오파지에 대해 각 식중독 세균 대상 3주 이상 분리 -형태학적 특성, 숙주저해 범위 분석

	위생처리 방법에 따른 박테리오파지 안정성	100	-화학적, 물리적 처리에 대한 박테리오파지 안전성 평가
	바이오필름 형성 조건 수립 및 제어	100	-박테리오파지를 이용한 바이오필름 제어 효과 확인
	분리된 박테리오파지에 대한 분자 생물학적 연구	100	-박테리오파지 DNA, protein에 대한 특성 분석
	2 종의 식중독 세균에 대한 생육 억제 특성	100	-각 식중독 세균에 대한 박테리오파지 및 혼합액에 의한 생육 억제 평가
	Endolysin에 분리와 위생처리제로써 효과	100	-Endolysin의 cloning과 정제된 endolysin에 대한 위생처리제 효과
	박테리오파지 위생처리제 혼합액 제조 및 평가	100	-혼합 박테리오파지의 제조와 식품 적용을 통한 위생처리제로서의 효과 평가
	위생처리제의 제품화 지원	100	-제품화를 위한 공정 지원
(제2협동) 박테리오파지 기반 신속식중독균 검출 키트 개발과 Validation	신규 및 기 박테리오파지의 Virucidal agent의 생육특성 변화	100	-박테리오파지의 virucidal agent에 대해 조건에 따른 생존율 평가 및 숙주에 미치는 영향 분석
	기 구축된 2종의 식중독 세균에 대한 각각의 박테리오파지 카테일 조제를 위한 기초연구	100	-박테리오파지 혼합액 제조와 감염 특성 및 phage amplification을 위한 조건 확립
	박테리오파지 유전체에 대한 생물정보학적 특성분석	100	- 박테리오파지 유전체의 생물정보학 특성 분석
	Phage amplification을 기반으로 하는 검출법 확립	100	-Phage amplification 기반 검출법 개발
	박테리오파지 안전성평가	100	-박테리오파지의 안전성 분석
	Endolysin 정제 강화	100	-Endolysin의 정제 완료
	Phage amplification 기반 식중독 검출 키트 제품화 지원	100	-개발 제품 protocol 검증 및 수정

(제3협동) 유산균 기반의 복합 위생처리제 개발과 제품화 지원	기 구축된 유산균적용과 신 규 유산균의 분리와 동정	100	-신규유산균에 대한 분리 동정 완료
	유산균유래 항균물질에 대한 항균력 및 박테리오신 분리	100	-항균특성과 박테리오신 분리
	유산균과 박테리오신의 안정 성	100	-외부 조건에 따른 박테리오신 의 안정성 평가
	박테리오파지와의 복합처리	100	-박테리오파지와 복합처리 효과 확인
	박테리오신과 Endolysin혼합 액(제III 혼합제)에 대한 평 가	100	-Endolysin과의 혼합액에 대한 제어 효과 분석
	기존위생처리제와 항균활성 비교평가	100	-유기산 등과 혼합처리를 통한 항균 효과 증대 효과 평가

2절. 관련분야 기여도

세부과제명	세부연구항목	국내 외 기술개발 현황	우월성	기여도
위생처리제 와 검출키트 의 상용화 및 국내외 인증과 마케팅 방안 (주 관기관)	박테리오파지 기반의 식중 독 검출 키트 상품화	-국내외에 박테리오파 지 기반의 검출 제품을 개발하려는 논문이 증 가 추세 -인체 및 동물에 위해 가 되는 세균에 대한 검출키트는 개발이 되 어 있는 상태임	-본 과제를 통 해 식중독균 검 출을 목표로 개 발된 키트는 특 허등록을 마친 상태이며 해외 에서도 식중독 균에 대한 키트 는 실적이 없는 상태임	-박테리오파지를 기반 으로 하는 식중독 검출 키트를 개발하여 박테 리오파지를 응용하는 산업에 기여함
	박테리오파지 기반 식중독 균 동정 키트 개발	-박테리오파지를 이용 한 세균동정기법 활용 은 연구실 수준 이용에 그치며 상품화 된 제품 은 전무함	-분리 식중독 균의 동정에 박 테리오파지를 활용한 제품은 최초 개발한 것 으로 판단 -기존 생화학 적 동정 대비 더 효율적이며,	-전통적인 생화학적 동 정법에 최근 분자생물 학적 방법을 이용하는 추세에서 보다 융합된 방법인 박테리오파지 기반기술이 확립

			PCR 대비 부가적인 비용, 인력훈련 등이 불필요함.	
	박테리오파지 생산 공정 구축	-박테리오파지 생산 공정은 치료용 또는 사료첨가용으로 개발되어져 있음.	-기존 박테리오파지 생산 공정은 고가의 분리, 정제 장치가 필요함에 비해 본 과제를 통해 개발된 공정은 효율성이 우수함	-박테리오파지를 활용하는 비용을 낮출 수 있는 공정을 개발함으로써 관련 산업에 적용할 수 있는 기반이 됨.
제1협동기관	기 구축된 박테리오파지 라이브리강화 및 위생처리제로써 기초 연구	-기존에 박테리오파지에 대한 연구가 활발해지고 있으며, 이들을 활용한 위생처리제로 적용을 위한 연구 수행 중	-본 연구를 통해 신규 박테리오파지를 활용하여, 차별화된 박테리오파지 이용 신규의 위생처리제 개발	-새롭게 분리된 박테리오파지는 우리나라 생물자원으로 활용가능하며, 추후 연구에도 활용 가능함.
	박테리오파지에 대한 분자생물학적 특성 연구 및 위생처리제 응용 연구	-최근 박테리오파지에 대한 분자생물학적 특성이 박테리오파지 응용을 위한 기초 연구임 -위생처리제로 응용을 위해 다양한 방법이 시도되고 있음	-박테리오파지에 대해 DNA, protein 수준에서의 분석을 통해 신규 박테리오파지의 특성 확인함. -위생처리제로 효과 분석을 위해 바이오필름 제어 및 농산물 등에 실제 적용 실험을 수행함.	-박테리오파지의 분자생물학적 기초 특성 분석을 통해 학문적 성과 확보 및 산업화를 위한 기본 결과 확보함. -농산물 및 식품의 경우 바이오필름 형성에 의해 위생처리제 효과가 낮아짐으로, 박테리오파지를 통한 제어를 통해 효과적으로 식중독 세균 제어 가능함.
	박테리오파지 및 endolysin의 위생처리제 확립과 현	-해외에서 박테리오파지 유래 endolysin의 위생처리제, phage therapy에 활용 중임	-신규 박테리오파지로부터 endolysin을 cloning 및	-국내외 시장에 개발된 박테리오파지 기반의 위생처리제는 경쟁력과 차별화된 제품화가 가

	장 평가		expression을 통해 분리함.	<p>능함.</p> <p>-분리된 신규 endolysin을 식품 산업 이외에도 항생제 내성 세균 치료제로 접목이 가능함.</p>
제2협동기관	Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출을 위한 연구	-국내외에서 박테리오파지를 이용한 검출 키트 개발 연구가 진행 중임.	-본 연구를 통해 보다 편이성을 갖는 phage amplification법 기반의 키트 개발을 수행함	-국내외 식중독 세균 검출을 위한 phage amplification 키트가 미개발인 상황에서 본 연구를 통해 경쟁력 있는 검출 키트 개발이 가능함
	박테리오파지 용균효소 정제와 Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 연구	-Endolysin의 활용을 위해서 정제방법 등이 제안되고 있음.	-Endolysin에 대해 보다 높은 수준의 정제를 수행함.	-추후 정제된 endolysin은 항생제 내성 세균 치료제로 활용이 가능할 것으로 사료됨.
	Phage amplification 기반의 식중독 세균 검출 키트 확립 및 현장 평가와 박테리오파지의 안전성 분석	<p>-Phage amplification법 기반의 연구는 일부 수행 중이나 산업화는 매우 미흡함.</p> <p>-박테리오파지의 활용이 증대됨에 따라 안전성에 대한 평가가 필요함.</p>	<p>-본 연구 과제를 통해 Phage amplification법 기반의 검출 키트를 개발하였음.</p> <p>-박테리오파지에 대해 LPS, 세포수준에서의 평가 완료함.</p>	<p>-Phage amplification 검출키트의 산업화 기반을 마련하였함.</p> <p>-추후 해당 기술을 기반으로 통해 국내외에 다양한 검출 키트의 상용화가 가능할 것으로 판단됨.</p>
제3협동기관	유산균과 유산균 유래 항균물질에 대한 연구	-유산균과 이들이 생산하는 항균물질에 대해 국내외에서 활발하게 연구가 수행 중임	-신규의 유산균과 항균물질에 대한 분리를 수행함.	-국내외에서 유산균 관련 연구가 활발한 상황이지만, 유산균 시장의 확대에 의해 지속적인 연구 개발이 필요함.
	유산균과 박	-유산균과 박테리오파	-본 연구를 통	-기존에 박테리오파지

	<p>테리오신의 안정성 평가와 복합처리를 통한 항균력 강화</p>	<p>지에 대해 혼합 처리에 대한 연구는 국내외에서 다소 미흡한 상황임.</p>	<p>해 유산균과 박테리오파지 혼합처리를 통한 식중독 세균 제어 상승효과를 확인함.</p>	<p>및 유산균 단독 처리를 통한 식중독 세균 제어보다 우수한 제어 기술일 것으로 사료됨. -또한, 본 기술을 통해 개발된 위생처리제는 기존에 화학적 처리제를 대체할 수 있는 제품화가 가능하며, 차별성과 경쟁력을 확보하고 있는 것으로 판단됨.</p>
--	--------------------------------------	--	--	---

4. 연구결과의 활용 계획 등

1장. 박테리오파지 기반의 식중독 세균 검출 키트개발

1절. 장출혈성대장균(O157, Non-O157 group) 검출 키트의 개선 및 성능향상

1. 장출혈성 대장균을 검출을 목적으로 하는 박테리오파지의 신규 분리를 통한 키트 성능 개선
2. 키트 프로토콜의 간편화 작업을 통해 업그레이드 키트 버전 제작
3. 제작된 시제품을 배포하여 고객사용 유도 캠페인 및 데이터 축적

2절. 황색포도상구균 검출키트의 개선 및 성능향상

1. 황색포도상구균 검출 제품의 식품유형 제조업체에 시제품 배포하여 검출된 균에 대해 동정결과 보완
2. Microval 인증을 위한 추가 결과데이터를 확보하여 제출 서류 완비한 후 제출
3. 새로 개발된 황색포도상구균 선택증균배지(SEB)를 추가연구를 통해 특허출원 계획 및 환경모니터링 스왑제품으로 출시할 수 있고 매출을 기대할 수 있으며 기존 환경 식중독 검사 제품군과 연계해서 홍보예정

박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트에 대한 SWOT 분석

<p>S 강점(Strength)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특히, 국내 및 세계 최초 사례 - 바이오필름을 형성 후에도 검출 가능 - Specificity, Sensitivity가 높다 - Host range가 넓게 Cocktail을 구성 - 생균에 대해서만 결과를 얻을 수 있어 PCR 대비 우수 - 별도의 장비가 필요없이 검출키트만으로 가능 - 세균성 식중독 검사 요구도 및 빈도 증가 	<p>W 약점(Weakness)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 검출 방법에 대한 우려감 - 검출 키트의 국제 인증이 없음. - 황색포도상구균 검출의 경우 검사 단계가 5단계로 복잡하며 증균 이후 17시간 걸리는 문제점. - 보관 안정성에 대한 데이터 부족 - 기술논문 및 영업 Reference에 대한 부족으로 영업 상황이 약함
<p>O 기회(Opportunity)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 자체기술개발에 의한 제품화로 얻는 장점 극대화 (가격구조, 유통구조에 대한 영향이 적다) - Phagetying 기법을 활용한 검출 키트는 경쟁자가 국내 및 해외에도 없음 - 제품 성능 향상을 통한 해외시장 확장 기회 - 기 개발된 대상 병원체 이외에도 추가적으로 제품 라인 확장 가능 - Phagetying 모델과 타 검출 방법의 융합 가능성 	<p>T 위협(Threat)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 박테리오파지 안정성에 대한 인식 문제 - 해외시장과 달리 국내의 소규모 시장 - 식품첨가물 인증의 어려움 - 관련 시장 확대로 해외 신생 경쟁사 출현 가능성 - 국내 인증시스템의 부재로 인한 영업상황 어려움

[그림] 박테리오파지를 이용한 식중독 세균 검출 키트에 대한 SWOT분석

3절. 박테리오파지 기반의 세균동정 키트 PhageID 키트개발

1. *Escherichia coli* O157 검출 PhageID 키트 개발에 기존 개발된 PhageID 기법 활용 예정
2. 현재 검사법의 확인단계로 사용 중인 생화학적 동정기법, 분자생물학적 동정기법처럼 사용할 수 있도록 박테리오파지 기반 동정기법 제안 및 홍보
3. 식품위해사고를 주요하게 일으키는 리스테리아 모노사이토제네스에 대한 PhageID 키트 개발
4. 국내 유발 주요 식중독균(장염비브리오, 캄필로박터, 바실러스 세레우스 등)에 대한 PhageID 키트개발을 통해 공정 중 사멸한 식중독 균 또는 식중독균의 생리적 특징으로 유발되는 혼동을 최소화 할 수 있도록 추가연구 및 제품 개발

2장. 박테리오파지를 활용한 농산물 위생처리제 개발

1절. 장출혈성 대장균, 황색포도상구균 제어용 박테리오파지 신규 혼합액 개발

1. 현재 개발된 3종 이외에 추가 후보 박테리오파지 선별하여 제품화
2. 보관온도 안정성, 유통안정성 성능평가 결과를 제품 개발에 활용
3. 농산물 살균기능 이외 항산화 기능, 갈변억제기능 등의 성분과 시너지 연구

2절. 위해세균 제어용 박테리오파지의 타 산업군으로 응용 가능성 연구 확대

1. 사료첨가제에 장출혈성 대장균 제어 박테리오파지의 제형 개발 및 상품화 추진
2. 황색포도상구균 제어용 개인위생용 살균제 개발 및 적용법 연구
3. 박테리오파지를 활용한 기술 적용 시 제형에 따른 기반기술의 추가 연구 (액상적용, 분말적용)
4. 축산식품에 대한 박테리오파지 활용 제품 연구
5. 농산물의 Pre-harvest와 Post-harvest 단계별 위해 세균 제어 제품 개발 연구

박테리오파지 기반의 위생처리제에 대한 SWOT 분석

<p>S 강점(Strength)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오(생물, 비화학적) 살균제로 안전성 확보 - 농산물에 존재하는 세균에 대한 선택적 제어 가능 - 바이오필름이 많은 농산물에 대해서도 살균 효과 - 유통과정 중 지속적인 제어 효과 가능(1주일) - 기존살균제와 병합 처리가 가능하며 적용 방식이 용이 	<p>W 약점(Weakness)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 박테리오파지 자체에 대한 안전성 데이터 미비 - 소비자에 대한 인식이 약함 - 가열 공정이 있는 농산물에 대한 부적합성 - 박테리오파지의 카테고리 종류가 필요
<p>O 기회(Opportunity)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신선농식품에 대한 수요 증가에 따른 산업 확대 - 소비자 및 생산자로부터 화학적 살균제 기피에 따른 기회 - 농산물을 처리하는 살균제로 국내 최초 개발됨 	<p>T 위협(Threat)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 박테리오파지 안전성에 대한 인식 약함 - 해외시장과 다르게 국내에서는 시장이 소규모 - 식품첨가물 인증에 어려움

[그림] 박테리오파지 기반의 위생처리제에 대한 SWOT분석

3장. 국내외 시장 진입 및 확대 방안

1절. 제품성능 향상

1. 제품의 검사 절차 간소화와 검사 속도(24~30시간) 단축을 통한 황색포도상구균 검출 키트 완성도 향상
2. 부가적으로 개발된 황색포도상구균 선택증균배지를 활용하여 환경에서 검출용 스왑키트 개발을 통한 매출화 기대
3. 제품의 보관온도 및 유통기한 Validation 실시
4. 국내 식품첨가물 살균 한시 기준 인증 완료

2절. 제품 인증

1. 박테리오파지 기반 위생처리제의 식품첨가물 살균한시기준 인증 완료
2. 식중독균 검출 키트 논문에 대한 국내 및 국외 발표
3. MicroVAL(식품에 대한 신속검출 기법의 국제적 인증) 인증

3절. 국내 및 국외 매출확대

1. 국내 및 국외 제품 홍보를 위한 전시회 참여 (KoreaLAB 참가)하여 제품 발표
2. 관공서, 대기업의 식품위생 담당 세미나 개최
3. 해외 검사키트 홍보사이트에 제품 등록, 소개영상 제작

4절. 제품 확대

1. 박테리오파지 기반 검출키트 대상 병원체를 국내에서 시장성이 높은 순서로 개발 (바실러스 세레우스, 살모넬라, 리스테리아 등)

2. 동정키트의 수입대체로 인한 매출확대

5절. 해외수출

1. 유럽 제품 인증을 통한 동남아, 일본, 중국 등 아시아 시장 수출계획
2. 유럽 및 북미로 수출 계획

붙임. 참고문헌

1. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154: 245–251 (2003).
2. Derda R, Lockett MR, Tang SK, Fuller RC, Maxwell EJ, Breiten B, Cuddemi CA, Ozdogan A, Whitesides GM. Filter-based assay for *Escherichia coli* in aqueous samples using bacteriophage-based amplification. *Anal. Chem.* 85: 7213–7220 (2013).
3. De Siqueira R, Dodd C, Rees C. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 259–262 (2006).
4. Dini C, Urraza PJ. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *J. Appl. Microbiol.* 109: 873–887 (2010).
5. Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Application of a novel immunomagnetic separation–bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in food. *Int. J. food microbiol.* 85: 63–71 (2003).
6. Garrido-Maestu A, Fuciños P, Azinheiro S, Carvalho C, Carvalho J, Prado M. Specific detection of viable *Salmonella Enteritidis* by phage amplification combined with qPCR (PAA-qPCR) in spiked chicken meat samples. *Food control.* 99: 79–83 (2019).
7. Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, Quiberoni ADL. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol.* 2: 282 (2012).
8. Hendrix RW. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 506–511 (2003).
9. Jassim S, Griffiths M. Evaluation of a rapid microbial detection method via phage lytic amplification assay coupled with Live/Dead fluorochromic stains. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 673–678 (2007).
10. Kim EJ, Lee H, Lee JH, Ryu S, Park JH. Morphological features and lipopolysaccharide attachment of coliphages specific to *Escherichia coli* O157: H7 and to a broad range of *E. coli* hosts. *Appl. Biol. Chem.* 59: 109–116 (2016).
11. Lee YD, Park JH. Characterization and application of phages isolated from sewage for

- reduction of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm. *LWT–Food Sci. Technol.* 60: 571–577 (2015).
12. Lienemann T, Kyyhkynen A, Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A. Characterization of *Salmonella Typhimurium* isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiol.* 15: 131 (2015).
 13. Lim GY, Park DW, Lee YD, Park JH. Isolation and characterization of bacteriophages for the control of Shiga Toxin–producing *E. coli*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 594–600 (2018).
 14. Ly–Chatain MH, Moussaoui S, Vera A, Rigobello V, Demarigny Y. Antiviral effect of cationic compounds on bacteriophages. *Front. Microbiol.* 4: 46 (2013)
 15. McNerney R, Wilson S, Sidhu A, Harley Va, Al Suwaidi Z, Nye P, Parish T, Stoker N. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 149: 487–495 (1998).
 16. Oliveira I, Almeida RCdC, Hofer E, Almeida PF. Bacteriophage amplification assay for detection of *Listeria* spp. using virucidal laser treatment. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1128–1136 (2012).
 17. Park DJ, Drobniewski F, Meyer A, Wilson S. Use of a phage–based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. *J. Clin. Microbiol.* 41: 680–688 (2003).
 18. Patel J, Sharma M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J Food Microbiol.* 139: 41–47 (2010).
 19. Raya RR, Varey P, Oot RA, Dyen MR, Callaway TR, Edrington TS, Kutter EM, Brabban AD. Isolation and characterization of a new T–even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6405–6410 (2006).
 20. Stewart GS, Jassim SA, Denyer SP, Newby P, Linley K, Dhir VK. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.* 84: 777–783 (1998).
 21. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents.*

Chemother. 45: 649–659 (2001).

22. Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. *Cell*. 168: 186–199. e12 (2017).