

## 전통장류에서 박테리오파지를 이용한 *Bacillus cereus*의 제어

김 광 표

전북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

### I. Introduction

*Bacillus cereus*는 식품에서 유래하여 diarrhea 또는 emetic syndrome을 야기하는 병원성 세균으로, 식품 유래 감염 원인균 중 1-20%를 차지하는 것으로 알려져 있다 (Kramer and Gilbert, 1989). 이에 따라 유럽에서는 다양한 식품에서 *B. cereus*를  $10^{4.5}$  CFU(colony forming unit)/g으로 제한하고 있고(EFSA, 2005), 국내에서도 최근 전통 발효식품에서  $10^4$  CFU/g 이하의 수준으로 유지하는 법안이 통과되어 시행되고 있다(KFDA, 2007). 그럼에도 불구하고 *B. cereus*는 자연계에 매우 널리 분포되어 있고(Jeong, 2008), 또한 다양한 antibacterial agent에 저항성을 보이는 포자를 형성하므로 식품에서의 제어에 어려움이 있다.

박테리오파지는 세균만을 감염시키는 세균성 바이러스이다. 내성균의 증가와 새로운 mode of action을 가지는 항생제 개발의 어려움은 다른 paradigm의 antibacterial agent를 요구하고 있으며, 이에 따라 박테리오파지 및 파지 유전자원을 이용한 유해균의 제어에 많은 관심이 집중되고 있다. 특히 최근 미국 FDA가 특정 박테리오파지(P100 포함)를 GRAS로 지정하고 이에 대한 식품에서의 이용을 허가했는데 이는 비록 특정 박테리오파지에 제한되기는 하지만

antibacterial agent로써 파지의 유용성과 안전성을 인정했다는 점에서 박테리오파지의 식품에의 적용연구에 매우 중요한 전기를 제공한 것으로 사료된다 (FDA, 2006).

본 연구에서는 유용 microflora의 지속적인 배양이 요구되는 전통 발효식품에서 박테리오파지를 이용하여 유해 세균인 *B. cereus*만을 특이적으로 제어하는 데 목표가 있다. 이를 위해 다양한 전통 발효 식품에서 *B. cereus*를 사멸시키는 박테리오파지를 분리했고, morphological characterization 및 restriction enzyme digestion 등을 통해 이들을 분류했다. 또한 host range 분석, genomic analysis 및 액체배지에서 *B. cereus*의 증식 저해능을 확인함으로써 분리된 박테리오파지들의 antimicrobial agent로써의 가능성을 확인했다. 식품에 박테리오파지의 적용은 두 가지 접근법을 시도했는데 첫째, 청국장을 발효식품의 model로 이용한 식품 처리 실험에서 박테리오파지를 이용하여 *B. cereus*를 효과적으로 제어할 수 있는 방법과 둘째, 벧짚에서 *B. cereus*-free starter culture의 개발에 박테리오파지의 이용 가능성을 모색했다.

## II. Results and Discussion

### 1. 전통발효식품에서 *B. cereus* 특이적인 박테리오파지의 분리 및 특성분석

### 2. 분리된 박테리오파지의 특성분석

대량생산(>10<sup>11</sup> PFU[plaque forming unit]/ml)과 순수분리(CsCl-gradient ultracentrifugation)를 통해 준비된 박테리오파지를 TEM(transmission electron microscopy)

Table 1. 전통장류에서 *B. cereus* 박테리오파지의 prevalence

Food Type	Number of Samples	Number of Positives	Percent Positives
Doen-jang (D)	11	7	63.6
Cheong-guk-jang (C)	3	3	100.0
Me-ju (M)	6	0	0.0
Go-chu-jang (G)	5	2	40.0
Jang-a-ji (J)	22	7	31.8
Total	47	19	40.4

다양한 전통장류 (된장, 청국장, 고추장 및 장아찌) 및 메주 가루에서 *B. cereus*를 사멸하는 박테리오파지를 분리했다(Table 1). 메주 가루를 제외한 모든 종류의 식품(32-100%) 에서 박테리오파지가 분리되었는데 이러한 결과는 전통 발효식품이 *B. cereus* 박테리오파지의 훌륭한 분리원이며 또한 역설적으로 전통 식품에 *B. cereus*의 오염이 매우 빈번함을 대변한다.

(그림 1) 및 restriction enzyme digestion 분석을 통해 Myoviridae로 분류하였다. 더 나아가 genome sequencing 과 bioinformatic analysis를 통해 분리된 박테리오파지가 알레르기를 일으키는 유전자나 독소성분 유전자 등의 유해 유전자와 유전적으로 연관관계를 가지는 유전자를 보유하지 않고 있음을 확인했다(그림 2). 또한 파지가 coding하고 있는 primase, exonuclease 및 polymerase 등의 분석을 통해 분리된

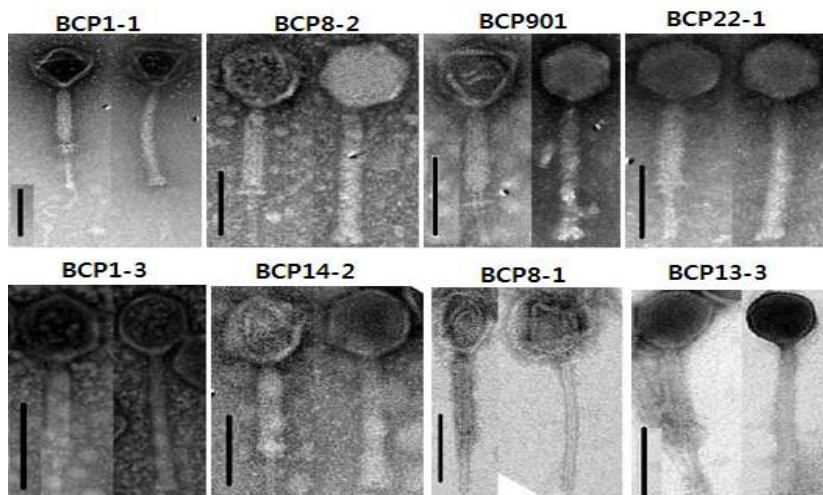


그림 1. 분리된 *B. cereus* 박테리오파지의 TEM 사진(size bar, 100 nm)

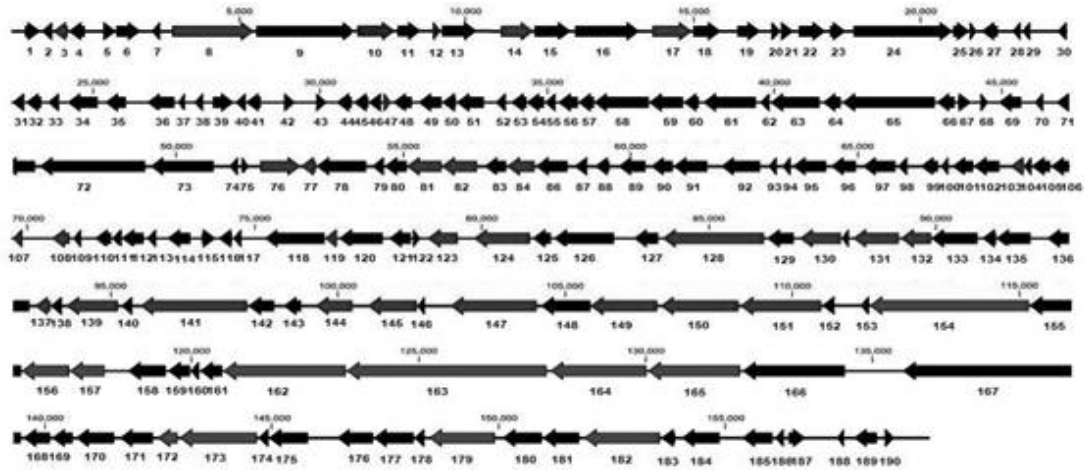


그림 2. BCP8-2의 genome 분석

박테리오파지가 Myoviridae 중에서도 SPO1 group에 속함을 확인할 수 있었다(data not shown).

SPO1 group에 속하는 박테리오파지는 lysogenic lifecycle을 가지지 못하는 “strictly virulent“ 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 식품에서 이용할 수 있는 박테리오파지로 좋은 연구 대상이 되고 있다(Klumpp et al., 2010).

### 3. 전통발효식품에서 박테리오파지를 이용한 *B. cereus*의 제어

#### 3.1. *B. subtilis*를 이용한 청국장 제조에서 *B. cereus*의 제어

식품에 박테리오파지 적용실험을 하기 전에 액체 배지에서 박테리오파지를 이용한 *B. cereus*의 증식 저해 실험은 박테리오파지가 MOI(multiplicity of infection) 의존적으로 매우 효과적으로 저해할 수 있음을 확인했다(data not shown). 식품에서의 효율을 확인하기 위해 *B. subtilis*와 *B. cereus*를 함께 접종한 콩에서 유해균(*B. cereus*)의 증식 저해를 확인했는데, 유용균 *B. subtilis*의 증식에는 영향을 미치지 않았으나 *B. cereus*는 검출수준<math>10^1</math> CFU/g에서 검출되지 않았다. 재미있는 것은 *B. cereus*의 효과적인 증식저해가 divalent cation( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  또는  $Ca^{2+}$ )

의 존재하에서 만 가능하다는 것이다. Monovalent cation( $Na^+$ )의 존재하에서도 *B. cereus* 제어효과는 있었으나( $p < 0.05$ ) divalent cation보다는 적었다(그림 3).

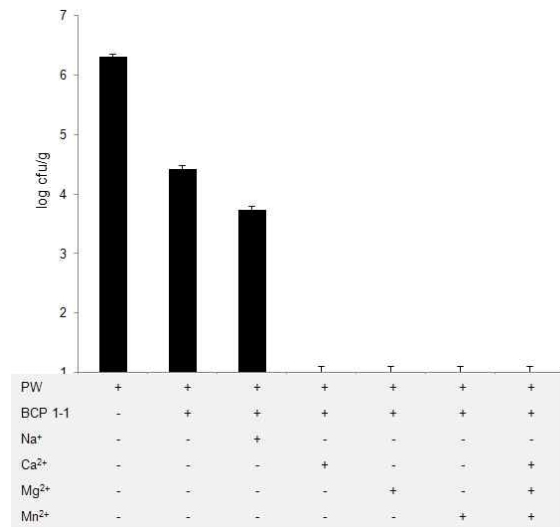


그림 3. 청국장 제조에서 박테리오파지를 이용하여 *B. cereus*를 제어할 때 cation의 중요성

#### 3.2. 박테리오파지 adsorption study

파지의 infection cycle 중 어디에서 divalent cation이 필요한지를 확인하기 위해 adsorption study를 수행했는데, 그 결과에서 monovalent cation은 영향이

없으나 divalent cation이 큰 영향을 끼치고 있음을 확인하였다(그림 4).

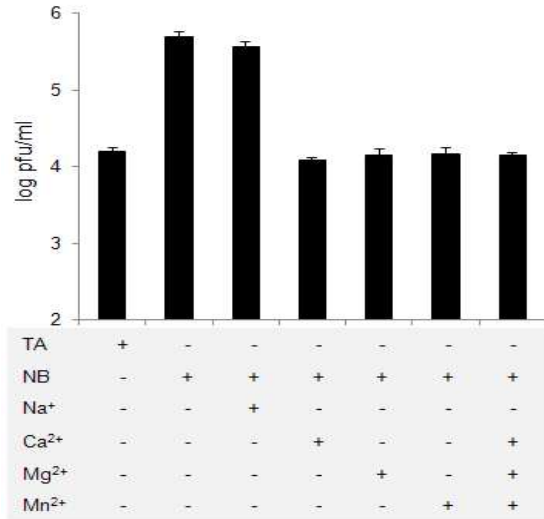


그림 4. 박테리오파지의 adsorption에서 cation의 역할규명

#### 4. 박테리오파지를 이용한 *B. cereus* free starter culture의 개발 연구

분리된 박테리오파지를 이용하여 벧짚에서 전통 발효식품용 *B. cereus*-free starter culture의 개발을 시도하였다(그림 5). 시도한 모든 벧짚 샘플들은 모두 *B. cereus*가 오염되어 있었고, 증식 과정 중 매우 높은 농도로 그 수가 증가했다( $10^{5-6}$  CFU/ml)(data not shown). 자연에 있는 *B. cereus*가 오염된 샘플에 박테리오파지를 처리했을 때 몇몇 샘플에서 총균수에는 영향을 미치지 않으나 유해균인 *B. cereus*가 발견되지 않았는데( $<10^1$  CFU/ml) 이러한 결과는 전통 발효식품을 위한 *B. cereus*-free starter culture의 개발 가능성을 보여주는 것이다.

- (1) *Bacillus cereus*(BC)가 오염된 원재료의 수집
- (2) 적당한 배지(콩물 등)를 이용한 미생물 증식 및 BC의 분리
- (3) 이미 보유하고 있는 broad host range phage를 이용한 BC 저해능 확인
- (4) 제어되지 않는 BC를 대상으로 새로운 phage의 분리 및 특성 분석
- (5) 다양한 phage의 조합을 이용하여 타겟 원재료에서 BC를 사멸
- (6) 파지가 처리된 BC-free 샘플을 대량 증식
- (7) Customized BC-free starter culture의 완성 및 실용화 실험

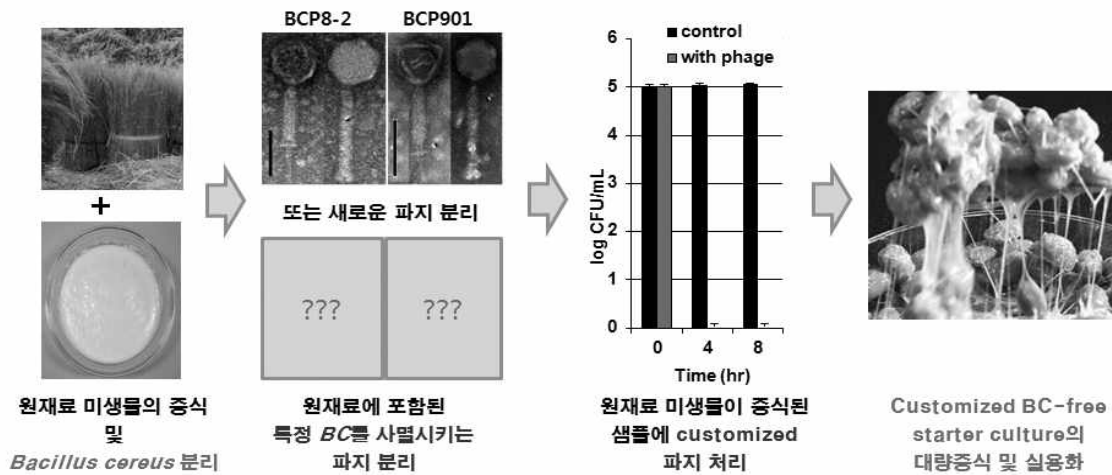


그림 5. Customized *B. cereus*-free starter culture의 개발(concept)

### III. Conclusion

본 연구에서는 전통발효식품에서 박테리오파지를 이용하여 *B. cereus*를 제어하고자 하는 연구를 수행하였다. 식품(청국장)에 직접 처리하는 방법과 *B. cereus*-free starter culture를 개발하는 방법 등 2가지 접근법에서 모두 그 가능성을 확인할 수 있었고 더 중요한 것은 박테리오파지의 숙주 특이성에 의해 다른 microflora에는 영향이 거의 없었다는 것이다. 이러한 결과는 유용한 미생물의 지속적인 배양이 요구되는 발효식품에서 박테리오파지를 이용한 유해균의 제어가 가능함을 보여 주는 의미가 크다고 할 것이다. 다음의 연구 주제로는 분리된 박테리오파지의 *in vitro* 및 *in vivo* 독성 시험 등이 필요할 것으로 사료된다.

### IV. 참고 문헌

1. Kramer, J. M., Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, in: M. P. Doyle (Eds.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, pp. 21 - 70
2. Korea Food and Drug Administration. 2007. A notice of amendment of Korea food standard. Available from: <http://www.kfda.go.kr/>
3. EFSA, (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* another *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175, 1 - 48.
4. Food and Drug Administration, 2006. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. *Federal Register* 71, 47729 - 47732.
5. Jeong, D.Y. 2008. Monitoring of *Bacillus cereus* in traditional fermented soybean products (Gochujang, Doenjang, Cheonggukjang) and its reduction trials. Thesis. Jeonbuk National University, Jeonju, Korea
6. Klumpp, J., Lavigne, R. M., Loessner, M. J., Ackermann, H. W. 2010 The SPO1-related bacteriophages. *Arch. Virol.* 155, 1547-1561