

용균성 박테리오파지에 의한 *Cronobacter sakazakii*와 *Salmonella enterica* Typhimurium의 생육저해

이영덕^{1,2} · 박종현^{1*}

¹경원대학교 식품생물공학과, ²고려대학교 생명과학대학

Virulent Bacteriophage for Growth Inhibition of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* Typhimurium

Young-Duck Lee^{1,2} and Jong-Hyun Park^{1*}

¹Department of Food and Biotechnology, Kyungwon University

²Division of Life Sciences, College of Life Science and Biotechnology, Korea University

Abstract *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* Typhimurium are hazardous pathogens, especially for ready-to-eat foods. For control of pathogens, the virulent bacteriophages were isolated, identified, and applied to infant formula milk and vegetable juice. The phages were isolated from swine feces and identified by morphology and molecular characteristics. ES2 phage for *C. sakazakii* and ST2 phage for *S. enterica* Typhimurium were identified as *Myoviridae* and *Siphoviridae*, respectively. Their burst sizes were 52±5 PFU/cell for ES2 phage and 21±3 PFU/cell for ST2 phage after latent period of 30-40 minutes. ST2 phage showed higher heat stability at 60°C than ES2 phage. ES2 phage held the growth of *C. sakazakii* until 6 hr after which the number decreased when applied to the infant formula milk and vegetable juice. ST2 phage also showed growth inhibition so that the number of *S. enterica* Typhimurium decreased. Therefore, virulent bacteriophages might be an agent for the growth inhibition of *C. sakazakii* and *S. enterica* Typhimurium in such the ready-to-eat foods.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enterica* Typhimurium, virulent bacteriophage, infant formula milk, vegetable juice

서 론

식품에 의해 기인되는 질병 발생은 매년 전 세계적으로 매우 심각하고 주요한 사망의 원인이 되기도 한다. 근래에 GMP, HACCP 등 현대의 발전된 기술을 도입하여 관리하고 있지만 식인성 질병의 발생이 계속하여 증가 되고 있다. 한국에서의 주된 식중독 세균으로는 pathogenic *E. coli*, norovirus, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* 등으로 보고되고 있다(1). 그리고 최근에 새롭게 출현한 *Cronobacter* spp.는 해외인론으로부터 2004년에 제기되었고, 국내에서 2006년도에 상당히 커다란 사회적 관심과 파장을 일으키게 되었다. 특히 이 세균이 많이 오염되는 조제분유 등은 면역력이 완성되지 못한 영유아의 주된 영양원이라는 점에서 관심의 대상이 되었다. 그리고 우리나라 모유 수유율은 매년 큰 폭으로 감소하여 90%가 넘는 영유아들이 오로지 영유아 식품에 의존해 영양분을 섭취하게 되므로 영유아 식품에 대한 주의 깊은 품질관리 및 안전성 관리가 요구되고 있다. 분말 조제분유는 비살균제품이기 때문에 이들 세균에 의한 오염 가능성은 항상 존재하고 있다.

FAO/WHO 보고서(2)에서는 조제분유에서 검출되는 미생물의 존재와 그로 인한 질병의 위해도에 따라 Category A, B, C로 분류하였다. 즉, Category A는 오염된 조제분유가 역학적으로나 미생물학적으로 명확하게 영유아의 질병을 일으킨 것으로 확인된 *S. enterica*, *Cronobacter* spp.균으로 위해도가 가장 큰 세균들이다.

Cronobacter spp.는 조제분유 혹은 유아식에서 주로 검출되는 것으로 알려져 있으나 그 외에도 토양, 쥐, 파리, 우유분말공장, 초콜릿공장과 가정집 등 주변환경에서 자주 검출되는 미생물로 보고되었으며 식품공장을 포함한 다양한 인공 환경에서도 분리되었다(3,4). *Cronobacter* spp.는 유아에게 치명적인 영향을 주는 급성 기회 감염균으로 주로 생후 1개월 이내의 신생아, 조산아, 저체중아, 유아에게서 수막염, 패혈증, 신생아 괴사성 장염 등의 질병을 일으키는 것으로 알려졌다(3,5). 매우 드물게 감염되지만 이 세균에 감염된 영유아의 치사율이 33-80% 이상인 것으로 보고되어 매우 치명적인 세균으로 간주되고 있다(6). *Cronobacter* spp.는 원래 *Enterobacter sakazakii*로 명명되어 오다가 Iversen 등(7)에 의하여 *Cronobacter* spp.로 개명하도록 제안되었다. 국제기구인 International Commission for Microbiological Specification for Food(ICMSF)에서는 *Cronobacter* spp.를 한정된 사람들에게 매우 위험하며 만성 혹은 장기간 생명을 위협한다고 보고하였으며 많은 전문가들의 의견을 수렴하기 위하여 FAO/WHO는 영유아용 분말식품에 대한 특별한 관리를 하도록 권고하고 있다(2). 이러한 조제분유, 이유식과 더불어 선식 또한 유아의 성장기용 영양식으로 사용되고 있어 *Cronobacter* spp.의 제어가 시급한 것으로 사료된다. 그러나 이 *Cronobacter* spp.의 제어의 어려움은 건조,

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea
Tel: 82-31-750-5523
Fax: 82-31-750-5273
E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr
Received December 14, 2010; revised January 25, 2011; accepted February 21, 2011

열, 자외선, 삼투압, 저영양 상태 및 살균 소독제 등에 저항성을 가지고 있다는 것이다. *Cronobacter* spp.를 제어하기 위해서 가장 손쉬운 열처리 제어법이 많이 연구되어 왔다(8-10). 이러한 연구의 가장 큰 특징은 *Cronobacter* spp. 각각의 종류에 따라 열에 대한 내성이 아주 다양하여 $D_{58^{\circ}\text{C}}$ 이 9.9분의 열저항성을 가지고 있는 균주도 있으나 대부분의 균주는 72°C의 15초 살균조건에서 8 log unit 이상이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 WHO는 조제분유를 70°C 이상의 열수로 환원하면 *Cronobacter* spp.를 불활성화할 수 있다고 제안하였다(11).

또 다른 위해성이 큰 세균인 *S. enterica*는 전 세계적으로 발생되는 주된 식중독 세균으로 많은 연구와 관리의 대상이 되고 있는 세균이다. 이 세균에 의하여 오염된 날고기, 가공육, 계란, 우유, 새우, 초콜릿 등으로부터 감염되는 것으로 알려져 있다. 최근에는 이러한 육류 식품뿐만 아니라 신선 편의식품과 즉석섭취 농산 식품에 의해서도 빈번히 살모넬라 식중독(salmonellosis)이 일어나고 있다(12). 이러한 식품에의 오염은 가공 중에서 부적절한 조리, 교차 오염 등으로 가장 빈번히 일어나는 것으로 알려져 있다(13). 조제분유의 *S. enterica* 오염은 많은 감염질환 발생에 관여되어 있는 것으로 보고되어 있다(14-16). *Cronobacter* spp.와 비슷하게 비교적 낮은 수준으로 감염된 조제분유라 하여도 역학적으로, 미생물학적으로 이들 질환과 직접 연결되어 있는 것으로 보인다. 그러나 다행스러운 것은 *Cronobacter* spp. 등의 다른 *Enterobacteriaceae*와는 다르게 *S. enterica*는 조제분유에서는 많이 검출되지는 않는 것으로 보인다(17).

이들 세균을 제거하는 방법은 열처리나 화학적 살균소독제 등이 사용되어 왔으나 그 효과가 식품에서는 크지 않은 것으로 알려져 있다. 아울러 소비자는 가능하면 최소의 열처리 등의 가공을 원하므로 새로운 천연 식품보존 및 살균제의 개발이 요구되고 있다. 이에 따라서 천연항균제, 박테리오파지, endolysin 등이 새롭게 제안되고 있다. 그 중 박테리오파지는 세균만을 감염시키는 선택성을 가지고 있고 식품 및 자연 환경 속에 아주 많이 분포하고 있으므로 잘 활용하면 훌륭한 식중독 세균 천연제어 방법이 될 수 있으리라 사료된다(18). 실제로 *S. enterica* (19,20), *Campylobacter* spp.(21), *S. aureus*(22)와 *Cronobacter* spp. (23) 등의 식중독 세균 제어를 위하여 박테리오파지가 활용되고 있다. 최근에는 미국 FDA에서 닭고기 등의 즉석섭취 식품에 *Listeria monocytogenes* 파지의 실용화가 승인(www.ebfoodsafety.com)되었고, *E. coli*와 *S. enterica* 제어 파지 제품이 승인되어 활용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 조제분유에서 가장 큰 병원성 세균으로 알려진 *S. enterica* Typhimurium과 *Cronobacter sakazakii*에 작용하는 박테리오파지를 분리하고 이들 식품에 적용하여 활용이 가능한지를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 사용 균주

시료는 경기도 소재의 돼지 농장들로부터 분변시료를 채취한 후 실험실에서 -80°C에 보관 후 용균성 박테리오파지의 분리에 사용하였다. *C. sakazakii* ATCC 29544와 *S. enterica* Typhimurium ATCC 12023을 DFI agar(Oxoid, Hampshire, UK)와 XLD agar(Oxoid)에 각각 평판 희석하고 37°C에서 배양한 후 단일 집락을 Luria Bertani broth(Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에 접종하고 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 배양된

균주를 10 mM CaCl₂(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 LB broth(LBC)에 접종한 후 동일한 조건으로 배양하고 실험에 사용하였다.

박테리오파지의 분리

돼지 분변 시료를 취해 균질화한 후 LBC broth에서 전 배양된 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 약 7-8 log CFU/mL 수준의 배양액을 균질화한 시료에 첨가한 후 24시간 동안 150 rpm으로 37°C에서 교반하며 배양하였다. 그리고 10,000×g에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 취해 0.22 μm syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 제균한 후 제균액을 double overlay agar법을 통한 플라크 분석을 수행하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 분석을 통해 생성된 플라크의 크기, opaque 정도 등의 형태학적인 특성에 따라 단일 플라크를 취해 다시 플라크 분석을 하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 용균성 파지의 증식과 농축은 Sambrook 등에 의한 방법(24)에 준하여 수행하였다.

속주저해범위 분석

순수 분리된 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium의 용균성 파지를 대상으로 하여 *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 등의 식중독 세균과 본 연구팀에서 분리, 동정하여 보유하고 있는 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium를 대상으로 host spectrum을 spot assay를 수행하여 확인하였다. 다양한 식중독 세균들은 tryptic soy broth(Difco)에서 3회 이상 계대 배양한 후 LBC broth에 접종한 후 0.1 mL을 취해 LBC soft agar에 분주하고 LBC agar 위에 증충하였다. 그리고 용균성 파지 용액 10 μL를 분주한 후 37°C에서 24시간 배양하고 plaque 형성 여부를 확인하였다.

분리 파지의 형태학적 특성 및 구조 단백질 분석

분리된 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium 용균성 파지의 형태학적 특성을 분석하기 위해 투과전자현미경을 사용하여 검정하였다. PEG 8000(Sigma)을 이용해 약 10-11 log PFU/mL 수준으로 농축된 파지를 2% uranyl acetate를 이용하여 negative stain을 수행한 후 80 kV 하에서 투과 전자 현미경을 통해 형태학적 특성을 확인하였다. 구조 단백질을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 농축된 파지용액 15 μL와 6×sample buffer를 혼합한 후 100°C에서 가열한 후 SDS-PAGE를 수행하고 coomassie blue 염색법으로 염색한 후 15% methanol과 10% acetic acid를 혼합한 탈색액으로 탈색한 후 단백질 패턴을 확인하였다.

파지 DNA 추출과 제한 효소 절단 패턴

농축된 파지용액을 20 μg/mL의 DNase와 RNase(Sigma)를 처리한 후 약 15분 동안 37°C에서 배양하고 10 mg/mL proteinase K(Sigma)와 150 μL lysis buffer(0.5 M EDTA, 10% SDS, 1 M Tris(pH 8.0))을 첨가하였다. 그리고 65°C에서 30분 동안 반응하고 700 μL phenol:chloroform:isoamyl alcohol(Sigma)을 첨가한 후 10분 동안 17,000×g에서 원심분리를 수행하였다. 그리고 상등액을 취해 chloroform:isoamyl alcohol을 첨가하고 동일하게 원심분리를 수행한 후 상등액을 취해 ethanol로 침전하고 수세한 후 증류수로 현탁하고 -80°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 제한 효소의 절단 패턴은 제한효소에 특성에 맞게 실험을 수행하였으며, 실험 후 절단된 DNA의 패턴은 agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였다.

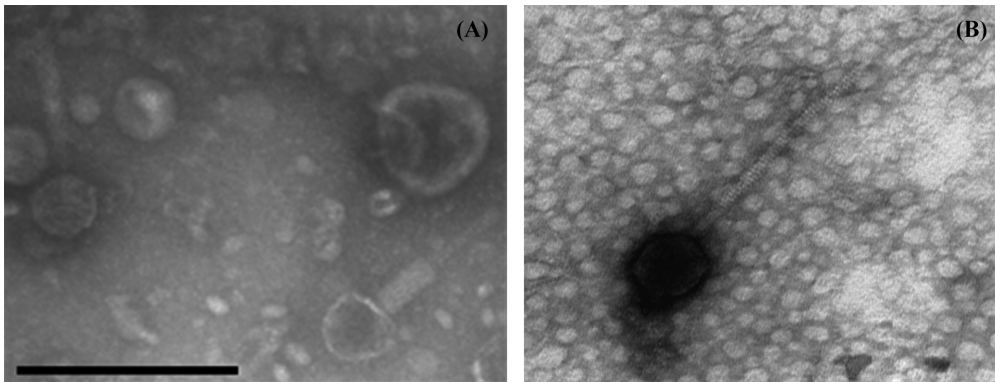


Fig. 1. Electron micrograph of (A) ES2 phage of *C. sakazakii* and (B) ST2 phage of *S. enterica* Typhimurium. (scale bar: 200 nm)

One step growth curve 및 열안정성

One step growth curve는 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 각각 LBC broth에서 정상기까지 배양한 후 분리된 virulent phage 용액을 MOI(multiplicity of infection)가 약 0.1 수준으로 접종한 후 흡착을 위해 약 10분 동안 배양한 후 10,000×g에서 10분 동안 원심 분리를 수행한다. 그리고 pellet을 새로운 LBC broth로 현탁한 후 37°C에서 배양하면서 5분 간격으로 시료를 채취하여 방출된 파지 양을 double agar overlay 방법으로 수행하여 확인하였다. 분리된 용균성 파지를 45, 50, 60°C에 노출시키고 처리 시간에 따라 희석하여 plaque assay를 수행한 후 플라크를 확인하였다.

분리 파지를 이용한 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium의 제어

*C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 각각 LB broth에서 대수 증식기까지 배양하고, 배양액을 50 mL의 LBC broth에 각각 접종하고 MOI가 약 0.1 수준으로 ES2 파지와 ST2 파지를 각각 접종한 후 37°C에서 200 rpm으로 교반하여 배양하면서 시간에 따른 생육 저해 정도를 흡광도를 측정하여 확인하였다. 또한 실제 식품에 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium이 오염되어 있을 경우에 생육 억제 효과를 확인하기 위해 시판하는 채소 주스와 조제 분유 중 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium이 검출되지 않은 분유를 이용하여 조제한 후 실험에 사용하였다. 조제분유와 채소 주스 시료에 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 약 4 log CFU/mL 수준으로 각각 접종한 후 ES2 파지와 ST2 파지를 각각 접종(MOI=1) 후 37°C에서 배양하면서 시간에 따른 생육수를 10진 희석법에 따라 DFI agar(Oxoid)와 XLD agar(Oxoid)에 각각 도말한 후 24시간 이후에 계수하였다.

결과 및 고찰

용균성 박테리오파지 분리와 숙주작용범위 분석

다양한 돼지 농장으로부터 얻은 10개의 돼지 분변 시료로부터 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium의 용균성 파지를 분리하였다. 분리된 5개의 파지 중에서 가장 플라크가 선명한 2개의 파지를 *C. sakazakii*는 ES2 파지와 *S. enterica* Typhimurium은 ST2 파지라고 명명하였다. 분리된 ES2 파지와 ST2 파지의 형태학적 특성을 투과 전자 현미경을 통해 확인한 결과 ES2는 *Myoviridae* family, ST2는 *Siphoviridae* family에 속하는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 이 ES2와 ST2에 대한 숙주작용 범위를 분석한 결과, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 등의 서로 다른 식중독 세균에 대해서는 감염하지 않음을 확인할 수 있었

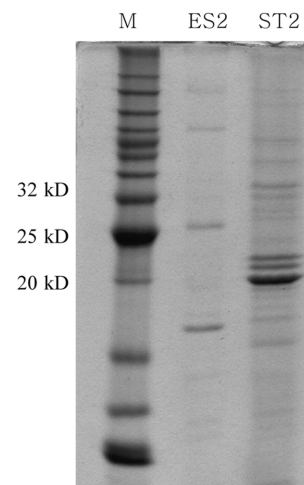


Fig. 2. SDS-PAGE analysis for structural protein pattern of ES2 phage of *C. sakazakii* and ST2 phage of *S. enterica* Typhimurium.

다. 또한 본 연구팀에서 보유하고 있는 17주의 *C. sakazakii*와 20주의 *S. enterica* Typhimurium의 분리균들을 대상으로 host spectrum을 확인한 결과, ES2 파지는 9주의 *C. sakazakii*, ST2 파지는 12주의 *S. enterica* Typhimurium을 용해시켰다(자료 미제시). 최근 다양한 식중독 세균들에 대한 virulent phage에 대한 보고가 되고 있으며, 이를 이용해 식중독 세균의 제어에 응용하려는 연구가 많이 진행되고 있다. *C. sakazakii*의 경우 Kim 등이 sewage 시료로부터 *C. sakazakii*의 용균성 파지를 분리, 보고하였으며, *S. enterica*의 경우 연구 역사가 오래되었고 다양하게 연구되고 있는 만큼 다양한 종류의 용균성 파지들이 보고 되고 있으며, phage therapy, *S. enterica*의 검출 등 여러 방면에서 응용되고 있다(23,25).

분리된 용균성 파지의 구조 단백질과 제한효소 절단 패턴 및 전자현미경 검정

분리된 ES2 파지와 ST2파지의 구조 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과와 제한 효소를 이용한 각각의 DNA의 절단 패턴을 확인한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3과 같다. 그 결과 ES2와 ST2는 서로 전혀 다른 구조 단백질을 가지고 있는 것으로 제한 효소를 이용한 DNA 절단 패턴 역시 서로 상이하게 나타나는 것으로 확인되었다. 이는 전자 현미경을 이용한 형태학적 특성을 확인했을 때 *Myoviridae* family와 *Siphoviridae* family로 서로 다른 family에 속하고 있어 다른 구조 단백질과 DNA 염기서열을 보유하고 있는 것으로 판단된다.

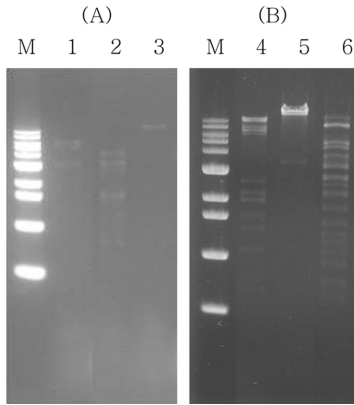


Fig. 3. Restriction enzyme digestion patterns of (A) ES2 phage of *C. sakazakii* and (B) ST2 phage DNA of *S. enterica* Typhimurium. Lane 1, EcoRV; Lane 2, HpaI; Lane 3, NdeI; Lane 4, BglIII; Lane 5, BamHI; Lane 6, NcoI. M, 1 kb DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea)

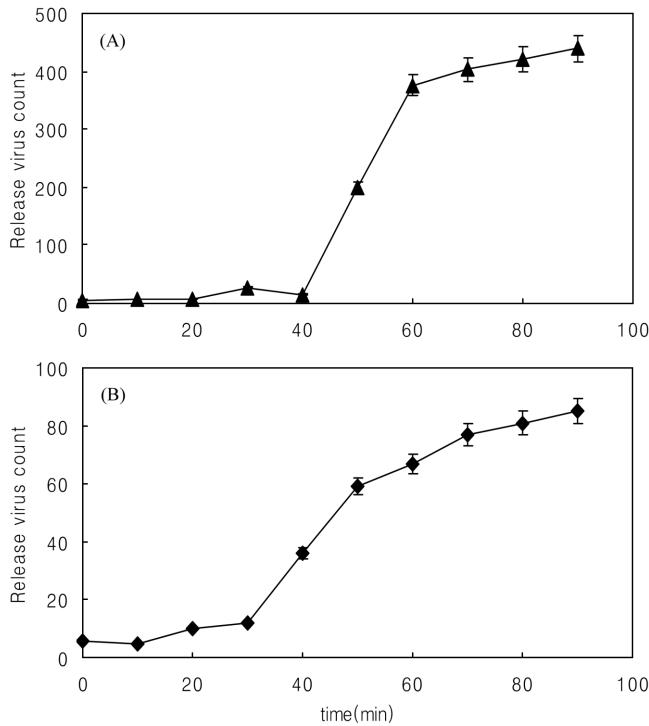


Fig. 4. One step growth of (A) *C. sakazakii* ES2 phage and (B) *S. enterica* Typhimurium ST2 phage.

One step growth curve 및 열안정성

분리된 ES2파지와 ST2파지에 대한 one step growth에 대한 실험을 수행한 결과는 Fig. 4와 같다. ES2의 경우 latent period는 약 40분 정도였으며, ST2는 약 30분 정도를 나타냈으며, burst size는 ES2는 약 52±5 PFU/cell, ST2는 약 21±3 PFU/cell로 확인되었다. 또한 45, 50, 60°C에 따른 열안정성을 확인한 결과는 Fig. 5와 같으며, 45와 50°C의 경우 100분 동안 노출되었을 때 ES2와 ST2 파지 모두 안정한 것으로 나타났다(자료 미제시). 하지만 60°C의 경우는 ST2 파지의 경우 100분 동안 안정한 것으로 나타났다, ES2 파지는 30분 이후부터는 확인되지 않았다. 따라서 ST2 파지가 ES2 파지에 비해 열안정성이 높은 것을 알 수 있었다.

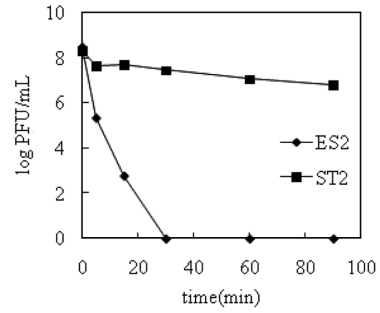


Fig. 5. Stability of ES2 phage of *C. sakazakii* and ST2 phage of *S. enterica* Typhimurium to heat treatment at 60°C.

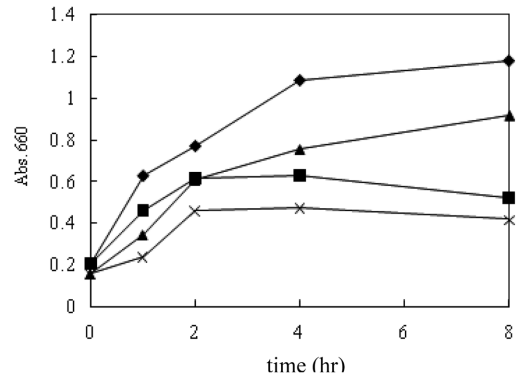


Fig. 6. Growth inhibition of *C. sakazakii* and *S. enterica* Typhimurium with each phage. ◆, *C. sakazakii*; ▲, *S. enterica* Typhimurium; ■, *C. sakazakii* with ES2 phage; ×, *S. enterica* Typhimurium with ST2 phage

분리 용균파지를 이용한 C. sakazakii와 S. enterica Typhimurium의 생육저해

돼지 분변으로부터 분리한 ES2 파지와 ST2 파지를 이용하여 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium에 대한 생육 억제 효과를 확인하기 위해 LBC broth에서 흡광도를 측정하여 확인한 결과는 Fig. 6과 같다. 그 결과 용균성 파지를 접종하지 않았을 경우는 *C. sakazakii*는 흡광도 값이 약 1.2, *S. enterica* Typhimurium은 약 0.9 수준까지 증가하였으나, ES2와 ST2를 각각 접종하였을 경우는 흡광도 값이 약 0.4-0.5 수준으로 나타나 생육이 억제 혹은 사멸하는 현상을 알 수 있었다.

그리고 시판 중인 채소 주스와 조제분유를 이용하여 분리된 용균성 파지에 의한 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium의 제어 효과를 확인하고자 하였다(Fig. 7). 그 결과 조제분유의 경우 초기에 약 2 log CFU/mL에서 8시간 이후에 *C. sakazakii*는 약 7 log CFU/mL, *S. enterica* Typhimurium은 약 6 log CFU/mL 수준으로 증가되는 것으로 나타났으며, ES2 파지와 ST2 파지를 각각 처리했을 경우는 *C. sakazakii*는 초기 2 log CFU/mL 수준을 유지하고 있었으며, *S. enterica* Typhimurium은 검출되지 않았다. 또한 채소 주스의 경우 초기에 약 4 log CFU/mL에서 9 시간 이후에는 약 6 log CFU/mL로 증가하였으나, ES2 파지와 ST2 파지를 각각 첨가하였을 때는 *C. sakazakii*는 조제분유와 마찬가지로 초기 균수를 유지하였으며, *S. enterica* Typhimurium은 초기에 비해 약 2 log CFU/mL이 감소되었음을 확인할 수 있었다. Kim 등 (23)은 sewage 시료로부터 *C. sakazakii*의 용균성 파지를 분리하여 분유에 적용하여 다양한 온도에 따른 *C. sakazakii*의 감소 효

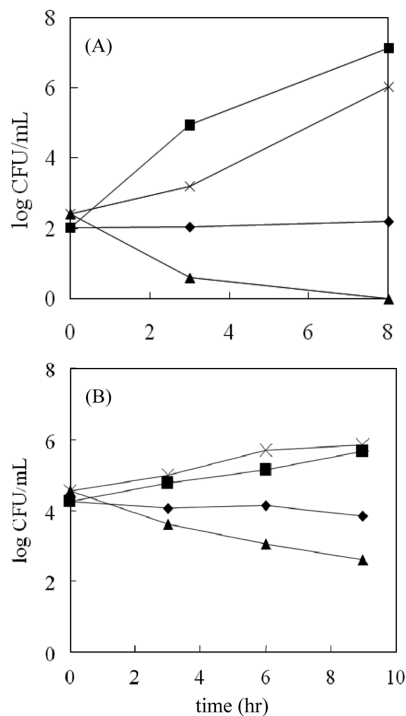


Fig. 7. Viability of *C. sakazakii* and *S. enterica* Typhimurium with each phage in (A) infant formula milk and (B) vegetable juice. ■, *C. sakazakii*; ×, *S. enterica* Typhimurium; ◆, *C. sakazakii* with ES2 phage; ▲, *S. enterica* Typhimurium with ST2 phage

과를 확인하였다. 또한 *S. enterica* Typhimurium의 virulent phage를 이용하여 양계장 등에 분무하는 방법으로 통해 *S. enterica*를 제어하는 연구, 돼지, 가금류 등에 phage를 투여하여 *S. enterica*를 저감화하는 효과 등 활발하게 진행되고 있다(26-29).

박테리오파지는 세균만을 감염시키고 사멸시키며 우리의 식품에 아주 폭넓게 분포하고 있다고 알려져 있다(18). 이러한 파지는 세균들이 형성하는 생체막(biofilm)까지 침투할 수 있어서 식품에의 적용이 제한되고 있다. 특히 *Salmonella*(19,20), *Campylobacter*(21), *C. sakazakii*(23) 등에서의 응용이 시도되고 있다. 최근에는 미국의 FDA에서는 즉석섭취 닭고기에서의 *L. monocytogenes* 제어를 위하여 박테리오파지 제품이 상용(www.ebfoodsafety.com)으로 판매, 허가하였고 동물용 식품생산을 위한 박테리오파지 anti-*E. coli*와 anti-*Salmonella* 파지 제품(www.omnilytics.com)들이 생산되고 있다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 ES2 파지와 ST2 파지를 이용해 추가적으로 다양한 식품에 적용을 통해 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 제어에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

즉석 편이식품에서 위해도가 가장 큰 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium을 박테리오파지로 제어하기 위하여 용균성 박테리오파지를 분리, 동정하였고 조제분유와 채소 주스에 이들 세균에 적용하여 그의 효과를 분석하였다. 박테리오파지는 돼지 분변에서 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium균을 용해시키는 박테리오파지를 분리하였고 현미경과 그의 특성을 분석, 동정하였다. *Cronobacter*에 작용하는 ES2 파지와 *Salmonella*의 ST2 파지는 형태학적 특성이 각각 *Myoviridae*와 *Siphoviridae*로 각각 동정되었

으며 제한효소지도와 SDS-PAGE 분석에 의하여 서로 다른 파지임을 확인하였다. ES2 파지의 경우 latent period는 약 40분 정도였으며, ST2 파지는 약 30분 정도를 나타냈으며, burst size는 ES2 파지는 약 52±5 PFU/cell, ST2 파지는 약 21±3 PFU/cell로 나타났다. 열안정성은 60°C에서 ST2 파지의 경우 100분 동안 안정한 것으로 나타났으나, ES2 파지는 30분 이후부터는 확인되지 않았다. 따라서 ST2 파지가 ES2 파지에 비해 열안정성이 높은 것을 알 수 있었다. 이 분리 파지를 조제분유와 채소 주스에 직접 적용한 효과는 ES2에 의한 *Cronobacter* 제어는 접종 후 6시간까지는 균수가 일정하게 유지하였고 균의 증식을 일어나지 않는 것으로 나타났다. ST2 파지에 의한 *Salmonella*는 생육저해가 잘 일어나 접종시간이 지남에 따라 균수가 감소하는 것을 확인하였다. 그러므로 *C. sakazakii*와 *S. enterica* Typhimurium의 생육저해는 이들 용균성 박테리오파지를 활용하여 가능한 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 농림기술관리센터의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부로 이에 감사 드립니다(108147-02-1-SB010).

문 헌

- Korea Food & Drug Administration. <http://www.kfda.go.kr>. Accessed Dec. 18, 2009.
- CAC. Proposed draft revision of the recommended international code of practice for foods for infants and children. Available at: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh37/fh3704e.pdf>. Accessed Dec. 02, 2009.
- Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The Enterobacteriaceae study group, *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 569-584 (1980)
- Jung MK, Park JH. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 152-157 (2006)
- Iversen C, Forsythe SJ. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Food Sci. Technol.* 14: 443-454 (2003)
- Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 1-34 (2005)
- Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *Malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol. Biol.* 7: 64-67 (2007)
- Nzzarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 9-13 (1997)
- Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Prot.* 67: 60-63 (2004)
- Kim SH, Park JH. Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* isolates during rehydration of powdered infant formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 364-368 (2007)
- Food and Agriculture Organization-World Health Organization (FAO-WHO) *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. p38. In: *Microbiological Risk Assessment Series 10*. Geneva and Rome. WHO Press, Geneva, Switzerland (2006)

12. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 123-153 (1999)
13. Kusumaningrum HD, van Asselt ED, Beumer RR, Zwietering MH. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *J. Food Prot.* 67: 1892-1903 (2004)
14. Bornemann R, Zerr DM, Heath J, Koehler J, Grandjean M, Pallipamu R, Duchin J. An outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul in a children's hospital. *Infect. Cont. Hosp. Ep.* 23: 671-676 (2002)
15. Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV, Slutsker L. The changing epidemiology of *Salmonella*: Trends in serotypes isolated from humans in the United States 1987-1997. *J. Infect. Dis.* 183: 753-761 (2001)
16. Threlfall EJ, Ward LR, Hampton MD, Ridley AM, Rowe B, Roberts D, Gilbert RJ, Van Soneren P, Wall PG, Grimont P. Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk. *Epidemiol. Infect.* 121: 289-293 (1998)
17. Muytjens HL, Roelofs-Willemsse H, Jaspard GHJ. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 743-746 (1988)
18. Brussow A, Kutter E. *Phage Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 129-163 (2005)
19. Modi R, Hirvi Y, Hill A, Griffiths MW. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64: 927-933 (2001)
20. Whichard JM, Sriranganathan N, Pierson FW. Suppression for *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J. Food Prot.* 66: 220-225 (2003)
21. Atterbury RJ, Dillon E, Swift C, Connerton PL, Frost JA, Dodd CE. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4885-4887 (2005)
22. Martinez B, Obeso JM, Rodriguez A, Garcia P. Nisin-bacteriophage cross resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 253-258 (2008)
23. Kim KP, Klumpp J, Loessner MJ. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 195-203 (2007)
24. Sambrook, J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA (2001)
25. Kropinski AM, Sulakvelidze A, Konczy P, Poppe C. *Salmonella* phages and prophages-genomics and practical aspects. *Method Mol. Biol.* 394: 133-175 (2007)
26. Atterbury RJ, Van Bergen MA, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4543-4549 (2007)
27. Callaway TR, Edrington TS, Brabban A, Kutter B, Karriker L, Stahl C, Wagstrom E, Anderson R, Poole TL, Genovese K, Krueger N, Harvey R, Nisbet DJ. Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing Swine. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 261-266 (2011)
28. Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Sci.* 84: 1141-1145 (2005)
29. Sklar IB, Joerger RD. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *J. Food Safety* 21: 15-30 (2001)