

단일 박테리오파지를 이용한 벗짚 유래 *Bacillus cereus* free 스타터 컬처의 개발

나디카 반다라 · 정서진¹ · 정도연² · 김광표*

전북대학교 식품공학과, ¹이화여자대학교 식품영양학과, ²(재)순창발효미생물관리센터

The Use of the Pathogen-specific Bacteriophage BCP8-2 to Develop a Rice Straw-derived *Bacillus cereus*-free Starter Culture

Nadeeka Bandara, Seo-Jin Chung¹, Do-Youn Jeong², and Kwang-Pyo Kim*

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

¹Department of Nutritional Science & Food Management, Ewha Womans University

²Sunchang Research Center for Fermentation Microbes

Abstract The purpose of this study was to develop a rice straw-derived *Bacillus cereus* (*B. cereus*)-free starter culture for traditional soybean fermented products using a *B. cereus*-specific bacteriophage, BCP8-2. To determine the optimal medium that supports the growth of rice straw-derived microorganisms and BCP8-2 activity, 5 different culture media were tested. The 5% ground bean (GB) medium was selected for further study. No *B. cereus* was detected in the BCP8-2-treated rice straw in GB medium, whereas *B. cereus* at a level of 10^7 CFU/mL was recovered in the no-phage control. The total bacterial count reached approximately 10^9 CFU/mL regardless of phage addition. When the 16S rRNA sequence-based microbial community was monitored using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and pyrosequencing, a similar microbial community was observed in the phage-treated and control samples. In conclusion, we demonstrate that phage can be used to prepare a rice straw-derived *B. cereus*-free starter culture with minimal effect on natural microflora.

Keywords: *Bacillus cereus*, bacteriophage, rice straw, fermented food, starter culture

서 론

청국장, 된장 및 간장 등의 전통장류식품들은 콩을 주원료로 벗짚 등에 존재하는 미생물의 발효과정을 통해 생산된다. 벗짚에는 *Bacillus subtilis*를 포함한 많은 종류의 유용미생물이 존재하고 (1-3) 이는 콩을 이용한 국내 전통장류의 발효 및 장류의 기능성에 중요한 역할을 담당한다(2,4,5). 그러나 벗짚을 산업적으로 전통장류 발효에 직접 이용하는 것은 많은 제약이 따르는데 그 중의 하나가 유해미생물인 *B. cereus*의 벗짚 오염 문제이다. *B. cereus*는 설사와 구토를 유발할 수 있는 토양유래병원균으로, 유럽연합에서는 유제품 및 즉석편이식품에서 각각 10^4 과 10^5 CFU/g의 미생물 기준규격을 정하고 있고(6), 국내에서도 2007년 전통장류의 *B. cereus* 기준치를 10^4 CFU/g 이하로 제한하는 법령을 고시하였다.

전통장류의 *B. cereus* 오염문제에 대처하기 위해 발효 후 출성 과정에서 천연물과 주정을 첨가하거나, 또는 초고압으로 제품을 처리하는 등의 연구가 보고되었다(7,8). 그러나 이러한 방법은 발

효과정 중 증식하는 *B. cereus*가 생산하는 다양한 독소를 제거하지 못한다는 단점을 가지고 있다.

또 다른 방법으로 발효과정 중 *B. cereus*의 증식을 억제하는 유용미생물(*Bacillus* spp. 등)을 이용하는 방법이 연구되었다(8,9). 그러나 이러한 유용미생물들은 유해균에 대한 특이적 활성이 낮아 *B. cereus* 뿐만 아니라 기타 유용미생물도 함께 사멸한다는 단점을 가지고 있어 고유의 특성을 유지하면서 안전한 전통장류제품을 개발하는데 한계가 있다.

박테리오파지는 특정 세균만을 특이적으로 사멸할 수 있는 바이러스이다(10). 최근 다양한 식품(채소류, 과일류, 유제품 등)에 존재하는 다양한 유해세균(*Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* 등)을 박테리오파지를 이용하여 제어하기 위한 연구가 보고되었다(10-14). 본 연구에서는 박테리오파지 BCP8-2(15,16)를 이용하여 벗짚 유래 미생물군들 중 *B. cereus*를 선택적으로 제거한 스타터 컬처를 개발하고 이의 특성을 분석하고자 한다. 본 연구의 성공은 안전하고 전통장류 고유의 특성을 유지한 전통장류제품의 개발에 기여할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

벗짚 샘플, 미생물과 박테리오파지 증식조건

벗짚 샘플은 전라북도 순창 지역의 벼 수확 후 논에서 채취하였다. *B. cereus* JCM2152 단일균주의 증식은 호기적 조건에서 trypticase soy broth (TSB, Difco, Sparks, MD, USA)를 이용하여 37°C에서 증식하였다(16). Starter culture의 *B. cereus*와 호기성 총

*Corresponding author: Kwang-Pyo Kim, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-2570
Fax: 82-63-270-2572
E-mail: kpkim@jbnu.ac.kr
Received October 2, 2013; revised November 8, 2013;
accepted November 11, 2013

세균수는 각각 Brilliance Bacillus cereus Agar medium (Oxoid, Hampshire, UK)와 trypticase soy agar (TSA)를 이용하였다. BCP8-2는 Myoviridae에 속하며 *B. cereus* group species만을 특이적으로 제어하는 박테리오파지이다(15,16). BCP8-2의 증식은 *B. cereus* reference strain인 JCM2152를 이용하였고, BCP8-2의 single plaque 분리, polyethylene glycol (PEG)을 이용한 박테리오파지의 침전, CsCl-gradient ultracentrifugation, SM buffer를 이용한 투석 및 soft agar overlay technique은 보고된 방법을 이용하였다(15,16)

최적 배지의 선정

벗짚 유래 미생물 증식을 위한 최적 배지를 선정하기 위해 벗짚 10 g을 각각 100 mL의 증류수(distilled water, DW), rice straw extract (RE), 5% 콩 같은 물(GB), TA broth(15) 및 nutrient broth (NB; Difco)에 첨가 후 37°C에서 10시간 배양하였다. Rice straw extract (RE)는 증류수에 10% 벗짚을 넣고 autoclave 후 상등액을 이용하였고, GB의 경우 상온에서 10시간 침지한 콩의 수분을 제거하고 펄타가 있는 stomacher bag에 넣어 으갠 후(Bag-Mixer, Intescience, Saint Nom, France), 상등액을 autoclave하여 이용하였다. 이 때 TA를 제외한(TA 배지는 $MgSO_4$ 를 포함하고 있음) 모든 배지들에서 필요에 따라 $MgSO_4$ 를 첨가(0.8 mM)하여 이용하였다. 이렇게 준비된 벗짚 유래 미생물 균집은 아래 설명된 degenerating gradient gel electrophoresis (DGGE)를 이용하여 분석하였다.

또한 다양한 배지에서 BCP8-2의 활성을 측정하기 위해 *B. cereus* JCM2152를 10^7 CFU/mL 농도로 접종하고 10^7 - 10^9 PFU/mL의 농도로 BCP8-2를 첨가한 후 37°C에서 증식하면서 4시간 동안 OD₆₀₀ 및 CFU를 측정하였다.

벗짚 샘플에 BCP8-2 처리

준비된 GB에 벗짚 샘플 10g을 넣은 후 BCP8-2를 10^7 - 10^9 PFU/mL의 농도로 접종하고 37°C에서 10시간 배양하였다(Passage 1, P1). 이렇게 배양된 culture를 다시 새로운 GB에 접종(1% 또는 10% inoculum)하고 같은 조건에서 10시간 배양(P2)하였고, 이러한 과정을 P6까지 진행하였다. 각 passage 마다 샘플링을 통해 총 세균 수, *B. cereus* CFU 및 BCP8-2 PFU counting을 수행하였고, 16s rDNA 염기서열을 바탕으로 한 DGGE 및 pyrosequencing을 수행하였다(아래 참조). 이 때 박테리오파지를 넣지 않은 샘플을 control로 사용하였다.

Genomic DNA 순수분리 및 16S rDNA 유전자의 증폭

MoBio Soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 1 mL의 샘플로부터 total microbial community DNA를 분리하였다. 분리된 DNA의 농도는 Epoch Micro-Volume Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다.

DGGE를 위한 16S rDNA 유전자의 증폭과 DGGE

순수 분리된 DNA를 이용하여 16S rDNA 유전자의 V3 region을 PCR (MyCycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 이때 338f-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGGCGGGGACACTCTACGGGAGGCAGCAG (밀줄은 5' end GC clamp)와 518r-ATTACCGCGGCTGCTGG (17)을 primer로 이용하였고, PCR cycle은 hot start (94°C, 5 min), 30 PCR cycles (94°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min) 및 final exten-

sion (72°C, 10 min)으로 구성하였다. PCR product는 agarose를 이용한 전기영동법으로 확인하였고, Epoch Micro-Volume Spectrophotometer (BioTek)을 이용하여 정량하였다. 정량된 PCR product는 10-60% gradient gel과 DGGE (Cipher DGGE Electrophoresis System, C.B.S Scientific, Del Mar, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 DNA는 ethidium bromide를 이용하여 염색했고, UV를 이용하여 분석하였다.

Pyrosequencing과 bioinformatics

Multiplex Identifier (MIDs, Roche, Mannheim, Germany)를 Genome sequence FLX system (Roche)에 적용하기 위한 16S rDNA 유전자들의 single-stranded DNA library를 준비하였다. 미생물 균집 분석을 위한 pyrosequencing은 Roche GS-FLX 454 pyrosequence (Roche)을 이용하여 수행하였다(ChunLab, Inc, Seoul, Korea). 이를 통해 얻어진 16S rDNA 유전자 염기서열 정보는 다양한 번수들(minimum alignment length, 50 bp; E-value cutoffs, 0.01)을 이용하여 Ribosomal Data Project II (RDP II) database (18)와 비교 분석하였다(ChunLab).

청국장 제조

청국장 제조용 콩은 깨끗이 수세 후 24°C에서 10시간 동안 침지하였고, 이후 30분 동안 물기를 제거하여 준비하였다. 이렇게 준비된 콩 100 g을 삼각 플라스크에 넣고 30분 동안 autoclave 후 50°C까지 냉각하였다. 스타터 컬처(또는 *B. subtilis* KACC10113, 10^8 CFU/mL) 1 mL를 넣고 50°C에서 48시간 배양하였다. 총 균수와 *B. cereus* CFU를 각각 TSA (Difco)와 Brilliance Bacillus cereus agar base (Oxoid)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Starter culture 제조를 위한 최적 배지 및 최소 박테리오파지 농도의 선정

벗짚 유래 *B. cereus* free 스타터 컬처를 만들기 위해 본 연구에서는 BCP8-2를 이용하였는데, BCP8-2는 전통장류에서 분리된 Myovirus로 *B. cereus* group spp.에만 특이적으로 작용하는 것으로 보고되었다(15). 벗짚유래 미생물과 박테리오파지 BCP8-2의 증식을 위한 최적 배지의 선정은 3가지 기준에 의해 결정하였다. 먼저 벗짚 배양(P1) 후 미생물균집 분석은 16S rDNA 염기서열에 기반한 DGGE를 이용하였고, 총 세균 수를 측정하였으며, 다양한 배지에서 host strain에 대한 BCP8-2의 활성을 분석하였다. DGGE 분석에서는 순창군의 서로 다른 5개의 행정구역에서 수거된 벗짚 샘플 미생물을 5종류의 배지를 이용하여 배양하였고, 미생물 균집 DNA 분리 후 이를 이용해 증폭한 16S rDNA를 이용하였다. 각각의 샘플에서 서로 다른 DGGE 패턴이 확인되었는데(data not shown), 전체적으로 TA와 TSB에서 상대적으로 많은 밴드를 형성하였고 DW와 RE의 밴드수가 상대적으로 적었으며, GB는 밴드수에서 중간 정도를 나타냈다(Fig. 1A). 총 세균 수 또한 일반적으로 TSB, TA, GB, RE, DW의 순서로 높았다(Fig. 1B). 이러한 결과들은 모든 5개의 벗짚 샘플들에서 비슷하였는데(data not shown) 이는 각 배지들의 영양성분 조성 및 농도 등에 기인한 것으로 사료된다.

다양한 배지에서 박테리오파지 BCP8-2의 활성 분석은 BCP8-2의 host strain인 *B. cereus* JCM2152를 이용하였는데, DW를 제외한 4종류 배지들에서 모두 *B. cereus*를 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1C). 이 때 $MgSO_4$ 가 첨가되지 않은 RE,

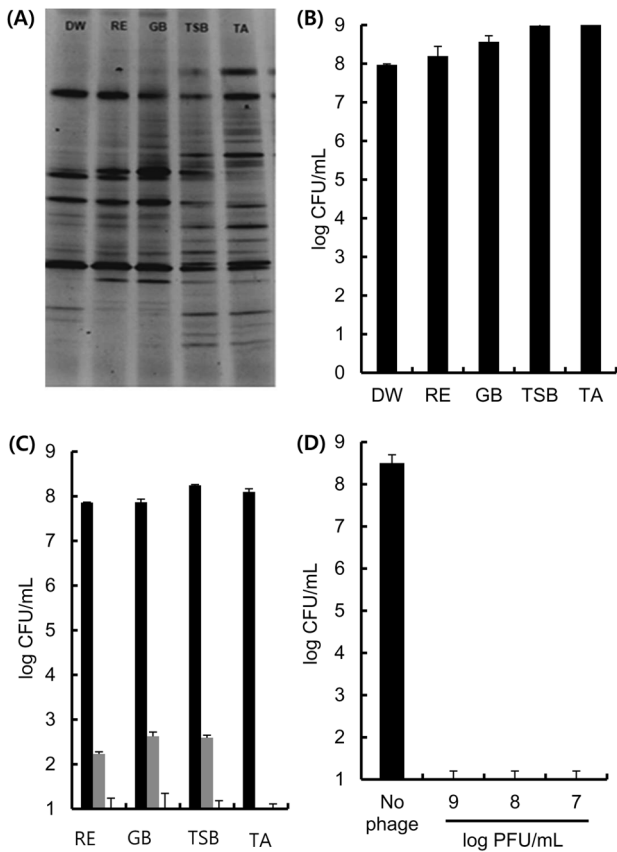


Fig. 1. Medium determination for preparation of rice straw-derived starter culture. (A) Microbial community analysis of rice straw-derived starter culture using DGGE. Five rice straw samples were used and one of representative results is shown. (B) Total microbial counts in rice straw-derived starter culture. (C) Activity of *B. cereus*-specific bacteriophage BCP8-2 against *B. cereus* JCM2512 using GB supplied with $MgSO_4$. Different media with (the third column, white) or without (the second column, gray) $MgSO_4$ were inoculated with *B. cereus* JCM2512 (10^7 CFU/mL) and BCP8-2 was added or not added (the first column, black) at 10^9 PFU/mL. *B. cereus* was counted after 2 hr incubation by plating method. In the case of TA, no extra $MgSO_4$ was added, since TA itself contains $MgSO_4$. (D) Control of *B. cereus* JCM2512 in GB supplied with $MgSO_4$ in presence of different concentrations of BCP8-2. Different concentrations of BCP8-2 (10^7 , 10^8 or 10^9 PFU/mL) was co-incubated with *B. cereus* JCM2512 (10^7 CFU/mL) in GB. *B. cereus* was counted after 6 h incubation by plating method.

GB, TSB의 경우 *B. cereus*가 검출 가능 농도 이상으로 검출되었는데(Fig. 1C), 이는 BCP8-2의 활성이 divalent cation에 의존한다는 이전의 연구 결과와 일치한다(15). 이러한 결과들과 더불어 준비된 볏짚 유래 미생물이 증식한 culture와 이를 이용한 청국장 제조 후 이에 대한 약식 관능평가에서는 GB가 가장 좋은 것으로 확인되어(data not shown) 이후 모든 연구에서 $MgSO_4$ 가 첨가된 GB를 사용하였다.

볶짚 유래 스타터 컬처에 사용할 최소 박테리오파지 농도를 결정하기 위해, 다양한 농도(10^7 - 10^9 PFU/mL)의 BCP8-2에 의한 *B. cereus* 제어능 시험을 $MgSO_4$ 가 첨가된 GB에서 실시하였는데, 가장 낮은 농도(10^7 PFU/mL)에서도 높은 제어능을 확인할 수 있었다(Fig. 1D). 이러한 결과는 GB를 이용한 볏짚 시험에서도 확인되었다(Fig. 2). 또한 PEG를 이용한 박테리오파지 침전 후 CsCl

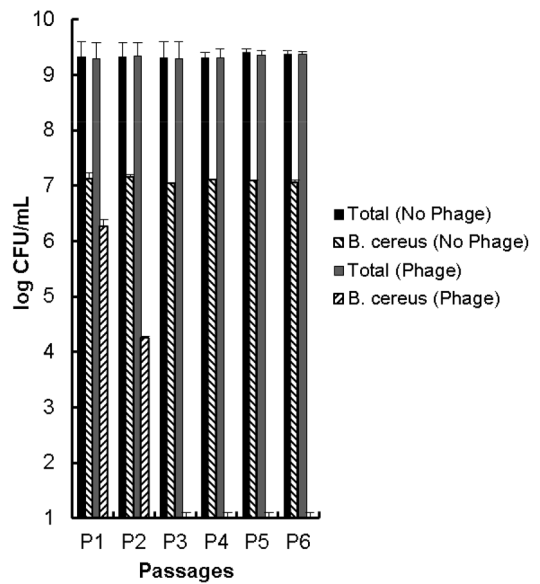


Fig. 2. Development of *B. cereus* free starter culture derived from rice straw. Ten percent of rice straw and BCP8-2 (10^7 PFU/mL) were added to GB supplied with $MgSO_4$ and incubated for 10 h at $37^\circ C$ to make P1, followed by plating and enumeration of total bacterial and *B. cereus* counts. In order to prepare P2, GB was inoculated with P1 (1% inoculum) and incubated as above. Same protocol was used to prepare P3 to P6.

gradient ultracentrifugation과 투석 처리를 거친 BCP8-2는 PEG 침전 후 이용된 BCP8-2와 *B. cereus* 제어에서 차이를 보이지 않았다(data not shown).

박테리오파지를 이용한 볏짚 유래 *B. cereus* free 스타터 컬처의 개발

순창군의 서로 다른 지역에서 수집된 8개의 볏짚 샘플들을 대상으로 연구를 진행하였다. 다양한 농도(10^7 - 10^9 PFU/mL)의 BCP8-2 처리와 상관없이 GB에서 배양된 8개의 볏짚 샘플들은 모두 10^9 CFU/mL 이상의 총 세균 수를 보였고, 이들 중 박테리오파지를 처리한 1개의 샘플에서 *B. cereus*가 검출되지 않음을 확인하였다(Fig. 2). 이에 반해 박테리오파지를 처리하지 않은 샘플들에서는 모두 약 10^7 CFU/mL 수준의 *B. cereus*가 검출되었고(Fig. 2), 박테리오파지를 처리한 나머지 7개 샘플에서도 같은 수준의 *B. cereus*가 검출되었다(data not shown). 연구의 재연성을 확보하기 위해 같은 눈에서 수거한 볏짚 샘플을 2반복 이상으로 실시하였는데 1개의 볏짚 샘플에서만 반복적으로 *B. cereus*가 제거된 스타터 컬처를 제작할 수 있었다. 이러한 결과들은 볏짚들이 매우 높은 빈도로 *B. cereus*에 오염되어 있음을 확인한 결과이며, 또한 박테리오파지를 이용하여 유해균만을 특이적으로 제어하는 것이 가능함을 보여준다.

특이한 것은 BCP8-2 처리와 상관없이 모든 P1 샘플에서 *B. cereus*가 검출(10^6 CFU/mL 수준)되었으나 박테리오파지를 처리한 1종류의 샘플에서는 P3부터 *B. cereus*가 검출되지 않았다는 것이다(Fig. 2). 이는 BCP8-2 내성 *B. cereus*가 passage를 지남에 따라 희석되었다기 보다는(내성균에 의한 희석 효과라면 10시간 배양 후 *B. cereus*가 높은 수준으로 증식해야 함), 볏짚에 존재하는 *B. cereus*가 포자상태로 존재하다가 서서히 영양세포로 전환되었고 이들이 BCP8-2에 의해 사멸된 것으로 사료된다. 모든 결과에

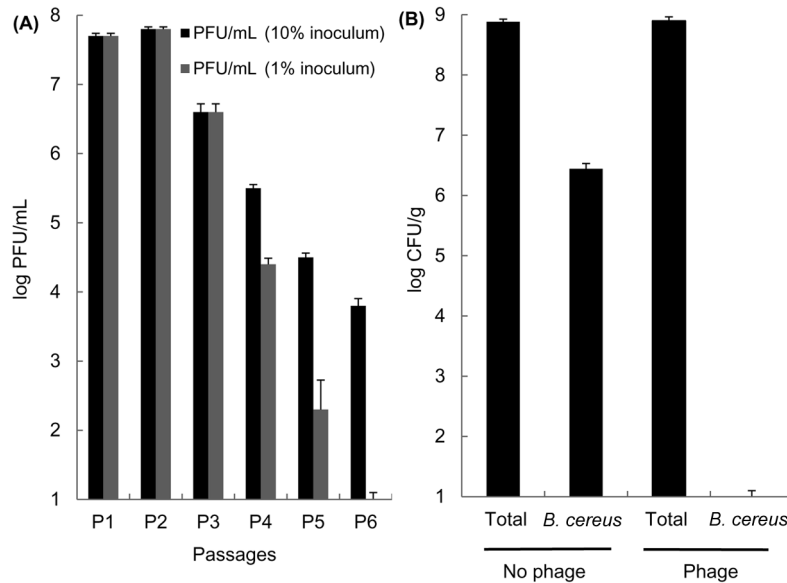


Fig. 3. Characterization of starter cultures. (A) PFU counts against *B. cereus* JCM2152 in different starter cultures. (B) Total and *B. cereus* counts of cheonggukjang made with P6 cultures either BCP8-2 treated or no phage treated.

서 1% (Fig. 2) 또는 10% inoculum (data not shown)에서는 차이를 나타내지 않았다.

식품에서 박테리오파지를 이용한 *B. cereus*의 제어 연구는 다른 유해균들에 비해 상대적으로 미미하다(10-14). 최근 Lee 등(19)은 으깬 감자에서 *B. cereus*를 박테리오파지를 이용하여 제어하는 것이 가능함을 보였고, 더 나아가 박테리오파지에 의한 *B. cereus* 증식 제어능이 배양 온도(25°C 이상)와 박테리오파지 농도 (10^8 PFU/g)에 의존함을 확인하였으며 이는 본 연구의 결과들과 일치하였다.

벗짚 유래 스타터 컬처의 BCP8-2 농도와 이를 이용한 청국장 특성 분석

스타터 컬처의 BCP8-2 농도는 P2까지는 10^7 PFU/mL를 유지하다 P3부터 급격히 감소하기 시작하였다(Fig. 3A). 이는 스타터 컬처의 *B. cereus* 농도와도 상관관계가 있는 것으로 사료된다(Fig. 2). 즉, P2까지는 BCP8-2 처리군에서도 *B. cereus*가 검출되었는데, 이러한 host가 1% 또는 10% inoculum으로 희석한 후에도 박테리오파지의 농도를 유지하는데 도움을 주었을 것으로 사료된다. BCP8-2의 농도는 P3 이후 지속적으로 감소하였고, 특히 1% inoculum이 이용된 passage의 경우 P6에서 BCP8-2의 활성이 더 이상 확인되지 않았다(Fig. 3A). 즉, BCP8-2 처리군에서 *B. cereus*가 P3부터 제거되었고, 이에 따라 BCP8-2의 농도가 passage가 늘어남에 따라 희석되어 감소한 것으로 생각된다.

식품에서 유해균 제어를 위한 박테리오파지의 이용은 미국 FDA가 *Listeria monocytogenes* 사멸을 위한 박테리오파지(P100)를 GRAS로 지정한 후 많은 나라에서 허용되었다(20). 최근 캐나다와 호주 등에서는 박테리오파지의 효용성을 인정하면서, 최종 제품에는 박테리오파지의 활성이 검출되지 않아야 하는 processing aid로 지정하였다. 그러므로 본 연구에서 최종 제품에 박테리오파지의 활성이 남아있지 않다는 것은 이를 이용한 장류제품의 개발 및 활용 가능성을 보여주는 것이므로 매우 중요하다.

벗짚 유래 스타터 컬처를 이용한 청국장의 제조에서 BCP8-2를 처리하지 않은 컬처의 경우 10^6 CFU/mL 수준의 *B. cereus*가 검출되었으나, BCP8-2 처리군(P6)의 스타터에서는 *B. cereus*가 검

출되지 않았다(Fig. 3B). 이에 반해 총 균 수는 두 샘플에서 모두 10^9 CFU/mL 수준을 유지하였다(Fig. 3B). 현재 실험실에서는 BCP8-2를 처리한 스타터 컬처를 이용한 다양한 장류를 개발하고 이들 제품의 기능성을 포함한 특성분석을 진행하고 있는데, 청국장을 이용한 예비 결과들에 의하면 벗짚 청국장과 유사한 관능적 특성을 확인할 수 있었다(data not shown).

벗짚 유래 스타터 컬처의 미생물 군집 분석

벗짚 유래 스타터 컬처의 미생물 군집을 분석하기 위해 16S rDNA 염기서열을 바탕으로한 DGGE와 pyrosequencing을 실시하였다. 16S rDNA 유전자를 기반으로 한 DGGE는 식품 및 식품 관련 생태계의 미생물군을 분석하는데 유용하게 이용되고 있다(21). DGGE를 이용한 P1 샘플의 분석 결과 박테리오파지 처리군과 미처리군 사이에 유사한 banding pattern을 확인할 수 있었고(Fig. 4A), 또한 몇몇 밴드들에서 band intensity의 차이를 확인할 수 있었다. 이러한 banding pattern은 P1에서 P6까지 유사하게 유지되었는데 이는 계대 배양에 따른 미생물의 군집이 일정하게 유지됨을 암시한다.

Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석 결과에서도 BCP8-2 처리군과 미처리군 사이의 유사한 군집을 확인할 수 있었다. 미처리군(P3)의 경우 전체 relative abundance의 91%를 *Enterobacter* spp. (79%)와 *Escherichia* spp. (12%)가 차지하였고, BCP8-2 처리군의 경우에도 *Enterobacter* spp. (70%)와 *Escherichia* spp. (22%)가 92% 차지하였다. 이외의 미생물군으로는 *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp., *Erwinia* spp. 등이 공통으로 확인되었는데, 박테리오파지 처리군과 미처리군 사이에 relative abundance (%)에서는 약간의 차이를 보였다(Fig. 4B). *B. cereus*의 경우 BCP8-2 미처리군(P3)에서 0.32%의 relative abundance를 나타내었으나, BCP8-2 처리군의 경우 검출되지 않았다. *B. cereus* group spp.를 제외한 *Bacillus* spp.는 BCP8-2 미처리군에서 *B. pseudomycoloides*가 0.02% 수준으로 검출되었으나 BCP8-2 처리군에서는 발견되지 않았다. 이러한 패턴은 P6 샘플에서도 유사하였다(data not shown).

DGGE와 pyrosequencing 방법은 모두 16S rDNA sequence를

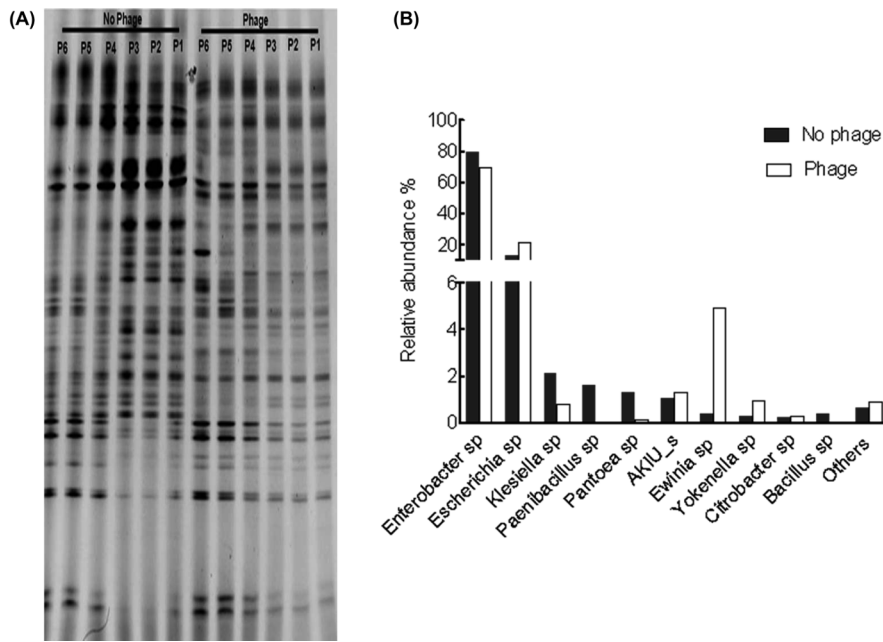


Fig. 4. Microbial community analysis of phage-untreated and -treated starter cultures. (A) DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments using rice straw derived starter cultures in different passages. (B) Relative abundance (%) of the bacterial species in rice straw derived starter cultures in passage 3.

PCR을 통해 증폭하고 이들의 패턴을 분석한다는 점에서 유사하나 DGGE의 단일 밴드가 단일 미생물종을 의미하지는 않는다(21)는 점에서 분석에 주의가 필요하다. 그럼에도 불구하고 Hong 등 (3)은 볏짚과 이를 이용하여 생산된 청국장장의 미생물 군집이 매우 유사하다는 결과를 DGGE를 이용하여 보고하였다. 본 연구에서는 DGGE의 각 밴드가 어떤 미생물인지를 확인하지 않았으므로 pyrosequencing의 결과와 직접 비교하는 것은 불가능하다. 그러나 적어도 박테리오파지 처리군과 비처리군 사이에서 DGGE banding pattern이나 pyrosequencing에서 미생물 profile이 비슷하며 이러한 결과들이 passage 증가에도 유지된다는 점은 본 연구주제에서 매우 중요한 결과라고 할 것이다.

Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석에 따르면 볏짚은 다양한 종류의 *Bacillus* spp.를 포함하는 것으로 알려져 있고(1,3) 볏짚을 이용한 메주와 된장의 제조 과정 중 relative abundance가 증가하는 것으로 보고되었다(1). 본 연구에서는 BCP8-2 처리군(P3와 P6)에서 *Bacillus* spp.가 검출되지 않았다. 이에 반해 BCP8-2 처리 스타터 컬처(P6)를 이용한 청국장장의 예비 특성분석은 볏짚을 이용한 전통 청국장장과 유사한 관능적 특성을 보이는 것으로 분석되었다. 이에 대한 정확한 설명은 청국장 중의 미생물 군집 분석 등의 특성분석을 통해 확인될 수 있을 것이고 이는 현재 본 실험실에서 진행 중이다.

요 약

본 연구는 목적은 단일 박테리오파지를 이용하여 볏짚으로부터 *B. cereus*가 제거된 스타터 컬처를 개발하는 것이다. 다양한 배지 가운데 5% 콩 같은 물(GB)이 볏짚 미생물의 증식과 박테리오파지 BCP8-2의 활성에 적합한 배지로 선정되었다. GB를 이용하여 다양한 볏짚 샘플과 BCP8-2를 함께 처리한 결과 모든 샘플들에서 총균수는 10^9 CFU/mL 수준으로 동일하였고, *B. cereus*의 경우 BCP8-2를 처리하지 않은 샘플에서 10^7 CFU/mL까지 증식하였고, 박테리오파지 처리군에서는 검출되지 않음을 확인하였

다. 샘플에 존재하는 미생물 군집을 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 한 DGGE와 pyrosequencing을 통해 분석한 결과 BCP8-2 처리군과 미처리군 사이에 매우 유사한 미생물 군집을 확인하였고, 더 나아가 계대 배양에 따른 미생물 군집이 안정적으로 유지됨을 확인했다. 이러한 결과들은 볏짚 등에서 특정 박테리오파지를 이용하여 특정 유해균을 제거한 컬처의 개발이 가능함을 보여주는 것이고, 안전한 전통장류의 생산에 기여할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품개발사업(과제번호 112108-2)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Kim YS, Jeon DY, Hwang YT, Uhm TB. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J. Microbiol.* 47: 275-280 (2011)
- Weber S, Stubner S, Conrad R. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1318-1327 (2001)
- Hong SW, Lim IK, Kim YW, Shin SM, Chung KS. Denaturing gradient gel electrophoresis and culture-based analysis of the bacterial community in Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food from Gangwon province. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 515-520 (2013)
- Kubo Y, Rooney AP, Tsukakoshi Y, Nakagawa R, Hasegawa H, Kimura K. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6463-6469 (2011)
- Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. Biological activities of Cheonggukjang prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 936-941 (2000)
- Anonymous. Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* another *Bacillus* spp. in foodstuffs. The EFSA

- Journal. 175: 1-48 (2005)
7. Yang SK, Kim JJ, Kim SJ, Oh SW. Synergistic effect of grapefruit seed extract, EDTA and heat on inactivation of *Bacillus cereus* spore. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1469-1473 (2011)
 8. Lee NH, Jo EJ, Oh SW, Hong SP. Study on the hurdle technique for the reduction of *Bacillus cereus* spores in Doenjang and Gochujang. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41: 1842-1846 (2012)
 9. Lee NK, Park JW, Cho JJ, Kim BY, Kwon KO, Hahm YT. Isolation of *Bacillus* spp. from Cheonggukjang and its antagonistic effect against *Bacillus cereus*. Korean J Food Sci. Technol. 40: 669-673 (2008)
 10. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Curr. Pharm. Biotechnol. 11: 58-68 (2010)
 11. Magnone JP, Marek PJ, Sulakvelidze A, Senecal AG. Additive approach for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* spp. on contaminated fresh fruits and vegetables using bacteriophage cocktail and produce wash. J. Food Prot. 76: 1336-1341 (2013)
 12. Tomat D, Mercanti D, Balagu C, Quiberoni A. Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. Lett. Appl. Microbiol. 57: 3-10 (2013)
 13. Zhang H, Wang R, Bao H. Phage inactivation of foodborne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken. Poultry Sci. 92: 211-217 (2013)
 14. Orquera S, Gözl G, Hertwig S, Hammerl J, Sparborth D, Joldic A, Alter T. Control of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophages. J. Mol. Genet. Med. 6: 273-278 (2012)
 15. Bandara N, Jo J, Ryu S, Kim KP. Bacteriophages BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. Food Microbiol. 31: 9-16 (2012)
 16. Shin H, Bandara N, Shin E, Ryu S, Kim KP. Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901. Res. Microbiol. 162: 791-797 (2011)
 17. Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700 (1993)
 18. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucl. Acids Res. 37: D141-D145 (2009)
 19. Lee WJ, Billington C, Hudson JA, Heinemann JA. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. Lett. Appl. Microbiol. 52: 456-464 (2011)
 20. Food and Drug Administration. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: bacteriophage preparation. 21 CFR Part 172.785. Fed. Regist. 71: 47729-47732 (2006)
 21. Danilo E. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. J. Microbiol. Methods 56: 297-314 (2004)