KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 52, No. 1, pp. 109~112 (2020)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.1.109

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

연구노트

박테리오파지의 살균소독제 응용을 위한 안전성 평가

박도원[1] · 이영덕[2] · 박종현[1]*
[1]가천대학교 식품생물공학과, [2]서원대학교 식품공학과

Safety evaluation of bacteriophages for application as sanitizers

Do-Won Park[1], Young-Duck Lee[2], and Jong-Hyun Park[1]*
[1]*Department of Food Science and Biotechnololgy, College of BioNano Technology, Gachon University*
[2]*Department of Food Science and Enginerring, Seowon University*

Abstract To evaluate the safety of bacteriophages for application of sanitizer, endotoxin content and cell cytotoxicity of two Escherichia coli and four Staphylococcus aureus phages were determined. Endotoxin ratio was determined by the Limulus amebocyte lysate (LAL) assay as a test for representative biological endotoxin content. The average endotoxin average content of the 9 log PFU/mL lysate was 18.6 EU/mL and that of the 10 log PFU/mL lysate was 5.9 EU/mL, suggesting that the phage lysate was not suitable for clinical applications, but suitable for food pathogen control applications. To confirm the cell cytotoxicity of the phage lysates, MTT assay was performed using Raw 264.7 cells treated with 9 log PFU/mL phages. Results of the assay indicated that the phage lysates did not significantly decrease the cell viability (p>0.05). These results indicated that bacteriophages would be suitable as a food safety sanitizer.

Keywords: bacteriophage, endotoxin, LAL assay, cell cytotoxicity

서 론

국내에서 개인건강관리에 대한 관심이 높아짐에 따라 가공 식품보다 영양학적으로 우수하다고 알려진 신선식품의 소비가 증가하고 있다(Bang 등, 2011). 신선농식품은 조리 시 영양소의 손실이 일어나기 때문에 일반적으로 열처리를 하지 않고 섭취하며, 이에 따라 식중독 발생 위험이 높은 식품군으로 분류되고 있다(Ssemanda 등, 2018). 신선농식품에서의 식중독 발생을 막기 위해 화학적 살균소독제가 주로 사용되었으나 효과가 크지 않기 때문에 유기산, 천연항균제, 박테리오파지 등의 생물학적 소재들을 이용한 살균소독제들이 주목 받고 있다. 특히 박테리오파지는 특정 세균만을 숙주로 하여 용균을 일으키고 항생제 내성균에도 효과적이기 때문에 식품분야 뿐만 아니라 임상분야에서도 항생제 대체제로서 주목받고 있다(Endersen 등, 2017; Kim 등, 2015). 실제로 해외에서는 *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp와 *Salmonella enterica* 등의 식중독 세균을 제어하기 위한 박테리오파지를 제품화하여 활용하고 있으며(Moye 등, 2018), 국내에서도 박테리오파지를 이용한 사료첨가제를 통해 축산 및 수산업에서 항생제 대체제로 사용하려는 연구나 박테리오파지 유래 용균효소인 엔도라이신에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Chang 등, 2017; Lim 등, 2012).

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Sungnam 13120, Republic of Korea.
Tel: +82-31-750-5523
Fax: +82-31-750-5273
E-mail: p5062@gachon.ac.kr
Received December 27, 2019; revised January 20, 2020; accepted January 20, 2020

그러나 박테리오파지는 포유류에게 파지에 대한 항체 생성을 유도할 수 있으며(Majewska 등, 2015) 박테리오파지 용액은 대개 숙주로부터 유래한 LPS (Lipopolysaccharide)나 teichoic acid등의 내독소를 포함할 수 있다. 따라서 박테리오파지 용액의 안전성을 검증하는 단계는 중요한 과정 중 하나이며 미국 FDA에서는 박테리오파지 제품의 내독소 농도를 일정 수준을 넘지 않도록 관리하고 있으며(Cooper 등, 2016), 해외 파지 제품인 Listex™이나 SalmoFresh™ 등의 파지 제품들은 여러가지 가이드라인 및 검증법을 구축하여 FDA로부터 GRAS (Generalized Recognized as Safe)로 인증을 받고 판매하고 있다(Soni 등, 2012). 국내에서는 파지의 기초 연구 및 식품적용 연구는 활발히 이루어지고 있으나 파지 자체의 세포독성 또는 파지 용액내에 존재할 수 있는 내독소에 의한 세포독성에 대한 연구가 부족한 상황이고, 세포독성에 대한 기준점 또한 명확하지 않다.

따라서 본 연구에서는 대표적인 식중독 세균인 *E. coli*와 *S. aureus* 유래 박테리오파지 용액의 내독소 함량 측정 및 세포독성 평가 실험을 통해 박테리오파지 용액의 안전성을 확인하여 파지의 살균소독제 개발의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

박테리오파지 및 숙주 미생물 증식조건

실험에 사용할 박테리오파지 증식을 위해 *E. coli* KCCM 12410P와 *S. aureus* RN4220을 EMB agar (Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)와 Baired-Parker agar (Difco Laboratory)에 획선 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤 단일 집락을 취해 10 mM의 $CaCl_2$이 첨가된 Luria Bertani broth (LBC, Difco Laboratory) 5 mL에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 균주 100 μL와 본 실험실에서 보유중인 *E. coli* 파지 2종과 *S. aureus*

파지 4종을 1× SM buffer (10 mM $MgSO_4$, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 10진 희석하여 100 μL를 LBC soft agar (0.15% agar)에 각각 plaque assay를 수행한 뒤 24시간동안 배양하였다(Lee와 Park, 2015). 배양 후 파지의 증식과 농축은 LBC broth (10 mM $CaCl_2$ 첨가) 및 2 M NaCl이 첨가된 20% 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG 8000, Georgia Chem., Georgia, GA, USA)을 이용해 Sambrook 등에 의한 방법에 준하여 수행하였다(Sambrook와 Russell, 2001).

박테리오파지 용액의 내독소 함량 정량 분석

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/mL 농도의 용액을 만든 뒤, 용액을 희석하여 0.5, 0.25, 0.125 EU/mL의 표준농도를 만들어 표준곡선을 만들었다. 9-10 log PFU/mL 수준의 파지 용액 100 μL와 LAL 시약 50 μL를 37°C에서 10분간 배양한 뒤 37°C에서 가온해 둔 발색 기질시약 100 μL를 첨가하여 37°C에서 6분 동안 배양하고 25% 아세트산 50 μL을 첨가하여 반응을 정지시키고 자외선 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Cooper 등, 2014).

세포 배양 및 박테리오파지 용액의 세포독성 평가

박테리오파지 용액의 세포독성을 확인하기 위해 쥐의 큰포식세포인 Raw 264.7 세포를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약으로 inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA (Gibco), Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)을 사용하였다. 세포 배양은 5% 이산화탄소(CO_2) 가스가 존재하는 37°C 배양기에서 진행하였으며, 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였다. Raw 264.7 세포 1×10^4 cells/well를 96 well plate에 접종하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 20시간 배양 후 1× SM buffer에 희석된 9 log PFU/mL의 박테리오파지 용액을 처리하여 24시간 반응시켰다.

배양 후 2 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 처리한 후 37°C에서 2시간 동안 재배양하였다. 용액을 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 백분율로 계산하였다(Lehti 등, 2017).

통계처리

실험 결과는 3회 반복실험 실시를 통한 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 25.0 (Statical Package for Social, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 유의성 검정을 시행하였다($p<0.05$).

결과 및 고찰

박테리오파지 용액의 내독소 함량 조사

박테리오파지의 숙주가 되는 대부분의 병원균들은 파지에 의해서 용균되면서 인간에게 항원으로 작용할 수 있는 내독소를 남기기 때문에 박테리오파지의 식품적용뿐만 아니라 임상에서 응용할때 문제점으로 작용할 수 있다(Cooper 등, 2014; Lu와 Koeris, 2011). 따라서 박테리오파지를 배지용액에서 증식 및 농축시켰을 때 용액내에 존재할 수 있는 내독소 함량을 조사하였다. 본 연구실에서 보유하고 있는 *E. coli* phage 2종과 *S. aureus* phage 4종을 9-10 log PFU/mL 수준까지 증식, 농축시킨 뒤, 생물학적 내독소시험(LAL assay)를 진행하여 흡광도를 내독소 함량(EU/mL)로 변환시킨 결과를 Table 1에 나타내었다. 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 나타내었다($p<0.05$). 폴리에틸렌글리콜에 의한 파지 침전은, 다가 양이온 침전법(multivalent cation precipitation)으로써 분자의 크기에 따라서 침전되는 효율이 결정되는 방법이다(Branston 등, 2012). 본 실험에서 사용된 파지들은 *Caudovirales* 목에 속하는 파지들로, 대부분이 내독소인 LPS나 teichoic acid보다 비교적 큰 단백질 크기를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Aksyuk와 Rossmann, 2011; Mangoni 등, 2008; Naumova 등, 2001). 따라서 원심분리로 파지 용액이 농축됨에 따라 내독소 함량이 감소된 것은 폴리에틸렌글리콜에 의해 크기가 큰 파지들은 농축되고 크기가 작은 대부분의 내독소들은 상등액에 남게되기 때문인 것으로 예상된다.

생물학적 내독소시험법은 검출 한계점이 약 0.25 EU/mL로 매우 낮기 때문에 정확도가 높아 파지 내독소 검출법으로 많이 이용되는 방법 중 하나이며, Branston 등(2015)은 위 실험과 동일한 방식으로 파지 침전을 실시하여 생물학적 내독소시험법을 통해 내독소 함량을 조사한 결과, 88%의 내독소 함량 감소효과를 확인했으며, 현탁된 파지에 대해 2회 연속 침전을 실시한 결과, 침

Table 1. Results of quantitatvie endotoxin tests by LAL (limulus amebocyte lysate) assay

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]	*Escherichia coli*
vB_EcoM-ECP32	17.41±1.58	7.28±7.55[a]	*Escherichia coli*
vB_SauS-SAP17	14.84±2.21	4.16±0.24[a]	*Staphylococcus aureus*
vB_SauS-SAP33	21.27±1.89	5.26±1.22[a]	*Staphylococcus aureus*
vB_SauS-SAP87	23.36±0.98	6.47±1.14[a]	*Staphylococcus aureus*
vB_SauS-SAP89	15.54±3.31	3.81±0.19[a]	*Staphylococcus aureus*
1x SM buffer	1.326±0.12[b]		

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.

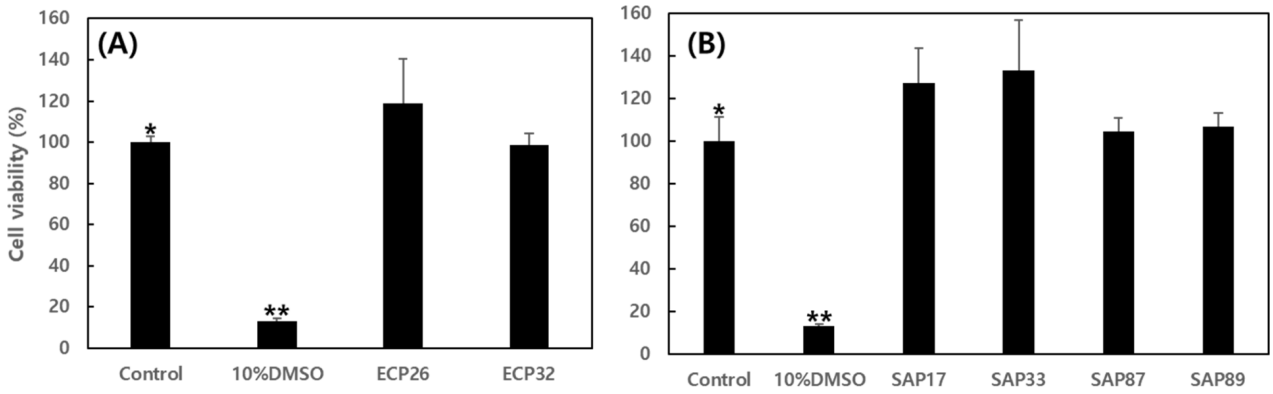

Fig. 1 Effect of bacteriophage lysate on viability of Raw 264.7 cells. (A): After pre-treatment of cells with 9 log PFU/mL *Escherichia coli* phages. (B): After pre-treatmnet of cells with 9 log PFU/mL *Staphylococcus aureus* phages. Each bar is the mean±SD for triplication experiment. *p>0.05 versus the phage pre-treatment groups. **p<0.05 versus the control and phage pre-treatment groups.

전 횟수에 비례하여 내독소가 추가적으로 감소되는 것을 확인한 바 있다. Hietala 등(2019) 또한 생물학적 내독소시험법을 이용하여 폴리에틸렌글리콜 침전이 파지 대비 내독소 함량 비율을 20배 까지 감소시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 따라서 이보다 낮은 농도의 6-7 log PFU/mL의 파지 또한 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 농축한다면 기존농도에 비해 내독소 수치가 감소할 것으로 사료된다.

내독소는 인간이 살아가는 거의 모든 환경에서 발견되며 특히 장내에 서식하는 그람음성 세균들은 매일 많은 양의 내독소를 방출하지만 건강한 사람에게는 유해성이 크지 않다(Wassenaar 와 Zimmermann, 2018). *S. aureus* 와 같은 그람양성 세균들의 세포벽에도 LPS와 마찬가지로, 내독소로 작용할 수 있는 teichoic acid가 존재하며 인간에게 면역반응을 일으킬 수 있다. Zidek 등(2010)은 *S. aureus* 유래 lipoteichoic acid (LTA)를 생물학적 내독소시험을 통해 검출하고, LTA가 면역반응을 충분히 일으킬 수 있다는 것을 세포에 LTA를 세포에 처리하여 NO 생성량을 측정하여 보고한바 있다. 실제 식품에는 높은 수준의 내독소가 포함되어 있으며 시중에서 판매하고 있는 소고기의 내독소가 50,000-75,000 EU/g, 영아용 조제유내에는 약 40,000-55,000 EU/g 정도가 검출되었다고 보고하였다(Jay 등, 1979; Townsend 등, 2007). 따라서 박테리오파지 용액에 존재하는 내독소는 식품내에 존재하는 수준의 내독소보다 현저히 낮은 농도로 존재하므로 식품내에 존재하는 병원균을 제어하기 위한 살균소독제로의 응용에는 문제가 없을 것으로 사료된다. 하지만 내독소는 아주 소량이더라도 혈관 속에서 이동하였을 때 패혈증을 일으키는 등 심각하게 작용할 수 있기 때문에 임상에서의 치료목적의 파지는 내독소 함량이 5 EU/kg 이하로 엄격히 조절되어야 하며, 본 연구에서 사용한 박테리오파지도 임상에서의 사용을 목적으로 한다면 유기용매, 투석 또는 크로마토그래피를 이용한 추가 정제 과정이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

박테리오파지 용액의 세포독성평가

인간을 비롯한 포유동물들은 태어나면서부터 다양한 박테리오파지에 노출되며, 파지는 그 자체가 캡시드라는 구조체 단백질로 존재하기 때문에 선천면역반응 뿐만 아니라 후천면역에도 관여할 수 있다(Barr, 2017). 이는 파지용액 내에 존재하는 숙주유래 내독소 뿐만 아니라 파지자체가 항원으로 작용하여 세포에 영향을 줄 수도 있다는 것을 의미한다. 따라서 대표적인 세포생존율 측정방법인 MTT 분석을 통해 *E. coli* 및 *S. aureus* 유래 파지용액 처리에 따른 세포 독성평가를 진행하였다(Fig. 1). 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 처리시에는 118%와 98%의 생존율을 보였다(p>0.05; Fig. 1A). *S. aureus* phage인 vB_SauS-SAP17, vB_SauS-SAP33, vB_Saus-SAP87, vB_Saus-SAP89 용액을 9 log PFU/mL 농도로 처리시에는 126, 132, 104%와 106%의 생존율을 보였다(p>0.05; Fig. 1B). 이는 파지 용액이 소량의 내독소 뿐만 아니라 고농도의 파지를 함유하고 있음에도 불구하고 유의할 만한 수준의 세포독성을 일으키지 않는다는 것을 나타낸다. Henein 등(2016)은 *Acinetobacter baumanni* 유래 파지용액 9 log PFU/mL 농도로 쥐유래 섬유아세포에 처리하여 생존율을 측정하였고, Lehti 등(2017)은 *E. coli* 유래 파지용액 9 log PFU/mL 농도로 인간유래 신경세포에서 생존율을 측정하였으나 본 실험과 마찬가지로 유의할 만한 수준의 세포독성이 관찰되지 않았다고 보고하였다.

박테리오파지 용액의 생물학적 내독소 시험법과 세포독성평가 실험결과를 종합해 볼 때 파지를 신선식품에 존재하는 병원균을 억제하기 위해 사용하더라도 인체에 유해하지 않을 것으로 사료된다. 지금까지 박테리오파지에 의한 세포독성 및 치명적인 면역반응에 대해서 특별하게 보고된 바는 없다(Abedon 등, 2017). 그러나 최근 연구결과에 따르면 미약하지만, 파지의 경구 투여가 파지에 특이적인 IgG, IgM, IgA와 같은 면역글로불린의 생성을 유도한다는 것이 보고되었고(Majewska 등, 2019), 용원성 박테리오파지와 같이 독소 유전자 또는 항생제 내성 유전자를 비병원성 세균에 전이시킬 수 있는 파지들의 존재가 꾸준히 보고되고 있다(Lu 와 Koeeris, 2011; Tozzoli 등, 2014). 반면 국내에서 이루어진 파지 특성분석 및 식품적용 연구에 비해서 파지의 안전성에 대한 연구는 매우 부족하다. 그러므로 본 연구를 기초로 하여 동물모델 실험과 분자생물학적 연구가 추가적으로 이루어져야 된다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 6종의 *E. coli* 및 *S. aureus* 유래 박테리오파지 용액에 존재하는 내독소 함량 조사와 파지의 세포독성 여부에 대해 평가하였다. 대표적인 생물학적 내독소 시험법인 LAL assay을 시행하여 9-10 log PFU/mL 농도의 내독소 함량을 확인한 결과, 파지의 임상적용에는 부적합한 수치이나 식품에 존재하는 병원균의 살균 목적의 사용에는 매우 유해하지 않은 수치임을 확

인할 수 있었다. 박테리오파지 용액의 세포독성평가를 확인하기 위해 MTT 분석을 시행하여 세포 생존율을 확인하였다. *E. coli* 파지 용액과 *S. aureus* 파지 용액 처리군 모두에서 98% 이상의 생존율이 관찰되어 파지용액에 존재하는 내독소 및 파지가 세포 독성을 유발하지 않는다는 것을 확인하였다. 그러므로 일반적인 방법으로 증폭, 농축한 파지 용액은 인체에 대한 유해성이 적으며 식품에 살균소독제로 적용하더라도 문제가 없을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부(고부가가치 식품기술개발, 과제번호: 117060033HD020)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

Abedon ST, Garcia P, Mullany P, Aminov R. Editorial: Phage therapy: Past, present and future. Front. Microbiol. 8: 981 (2017)

Aksyuk AA, Rossmann MG. Bacteriophage assembly. Viruses 3: 172-203 (2011)

Bang J, Kim H, Kim H, Beuchat LR, Ryu JH. Combined effects of chlorine dioxide, drying, and dry heat treatments in inactivating microorganisms on radish seeds. Food Microbiol. 28: 114-8 (2011)

Barr JJ. A bacteriophages journey through the human body. Immunol. Rev. 279: 106-122 (2017)

Branston S, Stanley E, Keshavarz-Moore E, Ward J. Precipitation of filamentous bacteriophages for their selective recovery in primary purification. Biotechnol. Progr. 28: 129-136 (2012)

Branston SD, Wright J, Keshavarz-Moore E. A non-chromatographic method for the removal of endotoxins from bacteriophages. Biotechnol. Bioeng. 112: 1714-1719 (2015)

Chang Y, Kim M, Ryu S. Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils. Food Microbiol. 68: 112-120 (2017)

Cooper CJ, Denyer SP, Maillard JY. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. Lett. Appl. Microbiol. 58: 118-22 (2014)

Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics. Front. Microbiol. 7: 1209 (2016)

Endersen L, Buttimer C, Nevin E, Coffey A, Neve H, Oliveira H, Lavigne R, O'Mahony J. Investigating the biocontrol and anti-biofilm potential of a three phage cocktail against *Cronobacter sakazakii* in different brands of infant formula. Int. J. Food Microbiol. 253: 1-11 (2017)

Henein AE, Hanlon GW, Cooper CJ, Denyer SP, Maillard JY. A Partially purified *Acinetobacter baumannii* phage preparation exhibits no cytotoxicity in 3T3 mouse fibroblast cells. Front. Microbiol. 7: 1198 (2016)

Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of endo- and enterotoxins from bacteriophage preparations. Front. Microbiol. 10: 1674 (2019)

Jay JM, Margitic S, Shereda AL, Covington HV. Determining endotoxin content of ground beef by the Limulus amoebocyte lysate test as a rapid indicator of microbial quality. Appl. Environ. Microbiol. 38(5): 885-890 (1979)

Kim YG, Lee JH, Kim SI, Baek KH, Lee J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. Int. J. Food Microbiol. 195: 30-9 (2015)

Lehti TA, Pajunen MI, Skog MS, Finne J. Internalization of a polysialic acid-binding *Escherichia coli* bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells. Nat. Commun. 8: 1915 (2017)

Lim TH, Kim MS, Lee DH, Lee YN, Park JK, Youn HN, Lee HJ, Yang SY, Cho YW, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella Enteritidis* infection in chicken. Res. Vet. Sci. 93: 1173-8 (2012)

Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. Curr. Opin. Microbiol. 14: 524-31 (2011)

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Klopot A, Kazmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Makosa M, Dabrowska K. Oral application of t4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. Viruses 7: 4783-99 (2015)

Majewska J, Kazmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapala J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jedruchniewicz N, Owczarek B, Gorski A, Dabrowska K. Induction of phage-specific antibodies by two therapeutic staphylococcal bacteriophages administered per os. Front. Immunol. 10: 2607 (2019)

Mangoni ML, Epand RF, Rosenfeld Y, Peleg A, Barra D, Epand RM, Shai Y. Lipopolysaccharide, a key molecule involved in the synergism between temporins in inhibiting bacterial growth and in endotoxin neutralization. J. Biol. Chem. 283: 22907-22917 (2008)

Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing. Viruses 10 (2018)

Naumova IB, Shashkov AS, Tul'skaya EM, Streshinskaya GM, Kozlova YI, Potekhina NV, Evtushenko LI, Stackebrandt E. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardiopsis*, and chemotaxonomic perspective. FEMS Microbiol. Rev. 25: 269-283 (2001)

Sambrook, J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA (2001)

Soni KA, Desai M, Oladunjoye A, Skrobot F, Nannapaneni R. Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeriostatic GRAS antimicrobials. Int. J. Food Microbiol. 155: 82-88 (2012)

Ssemanda JN, Reij MW, van Middendorp G, Bouw E, van der Plaats R, Franz E, Muvunyi CM, Bagabe MC, Zwietering MH, Joosten H. Foodborne pathogens and their risk exposure factors associated with farm vegetables in Rwanda. Food Control 89: 86-96 (2018)

Townsend S, Caubilla Barron J, Loc-Carrillo C, Forsythe S. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. Food Microbiol. 24: 67-74 (2007)

Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, Ranieri P, Maugliani A, Caprioli A, Morabito S. Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion. Front. Cell. Infect. Mi. 4: 80-80 (2014)

Wassenaar TM, Zimmermann K. Lipopolysaccharides in food, food supplements, and probiotics: Should we be worried? Eur. J. Microbiol. Immunol. 8: 63-69 (2018)

Zdek Z, Farghali H, Kmonèkov E. Intrinsic nitric oxide-stimulatory activity of lipoteichoic acids from different Gram-positive bacteria. Nitric Oxide 23: 300-310 (2010)