pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 6, pp. 591~594 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.6.591

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

박테리오파지와 유기산의 병용처리에 의한 효율적인 대장균 생육 억제

김선규 · 문기성*
한국교통대학교 생명공학전공

Synergistic Inhibition of *Escherichia coli* by a Combination of Bacteriophage and Organic Acid

Seon-Gyu Kim, Gi-Seong Moon*
Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea

(Received December 1, 2019/Revised December 2, 2019/Accepted December 4, 2019)

ABSTRACT - Some strains of *Escherichia coli* are categorized as pathogenic bacteria and alternative antimicrobials including bacteriophages for controlling these bacteria have been studied. In this study we screened antimicrobial candidates that present synergistic inhibition of the growth of *E. coli* DH5α as a model when co-treated with the bacteriophage ECP27 to target the bacteria. As candidates, $CaCl_2$, lactic acid, and citric acid were tested. $CaCl_2$ showed a synergistic inhibition against the strain by dose-dependent manner at 6 h of incubation but the viable cell count was recovered at 12 h. However, lactic acid and citric acid at 30 mM concentration showed synergistic inhibitions at 6 h of incubation and cleared the viable cells of *E. coli* DH5α at 12 h when co-treated with the bacteriophage even though lactic acid or citric acid alone was effective. Therefore, co-treatment using the bacteriophage and organic acids such as lactic acid and citric acid can be a solution for synergistic inhibition of the growth of *E. coli*.

Key words : Synergistic inhibition, *Escherichia coli*, Bacteriophage, Lactic acid, Citric acid

식중독을 일으키는 병원성 세균에 감염될 경우 구토, 설사, 복통 및 발열 등의 증상이 나타난다[1]. 이러한 식중독을 일으키는 대표적인 병원성 세균으로는 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* 등이 있다[2]. 병원성 대장균은 유아에게 설사를 유발하며, 많은 양의 병원성 대장균에 노출될 경우 성인에서도 장염, 전염성 설사 등을 유발할 수 있다[3]. 병원기전, 발병 양상에 따라 장출혈성 대장균(EHEC), 장병원성대장균(EPEC), 장독소원성대장균(ETEC), 장침습성대장균(EIEC), 장부착성대장균(EAEC)으로 분류 된다[3]. 병원성 대장균은 갈은 쇠고기(ground beef), 요거트, 샐러드용 채소 등 다양한 식품에서 발견 된다[4,5]. 병원성 대장균의 감염 치료제는 주로 항생제(antibiotics)가 사용되는데 항생제 노출빈도의 증가 등으로 인해 항생제 내성균이 출현하게 되었다[6-8]. 따라서 이러한 항생제 내성 문제를 해결하기 위한 새로운 병원성 미생물 제어법이 필요한 실정이다. 박테리오파지(bacteriophage)는 세균 숙주 특이적으로 작용하기 때문에 인체에 유해하지 않고 해당 병원성 세균만을 억제할 수 있어 기존의 항생제 대체제로 많은 관심을 받고 있다[9-12]. 또한 박테리오파지는 항생제 대체제 외에 병원성 세균의 신속검출법 등에도 활용되고 있어 그 가치가 상승하고 있다[13]. 본 연구에서는 직접적인 병원성 대장균 대상 시험에 앞서 비병원성 대장균(*E. coli* DH5α)을 모델로 사용하여 박테리오파지(ECP27)의 항균활성을 확인하였으며 더 나아가 $CaCl_2$ 및 유기산(젖산, 구연산)과의 병용처리를 통하여 항균 상승효과가 있음을 검증하였다.

*Correspondence to: Gi-Seong Moon, Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
Tel: 82-43-820-5251, Fax: 82-43-820-5272
E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

Materials and Methods

대장균 박테리오파지 ECP27 증식

대장균 박테리오파지 ECP27은 가천대학교에서 분양받아 사용하였다. ECP27의 증식을 위해서 *Escherichia coli* DH5α를 LB (Luria-Bertani) broth (BD, Sparks, MD, USA)에 ECP27과 2.5:1의 비율로 접종하고 37°C에서 6시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 4°C에서 8000 rpm으

로 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 멤브레인 필터(0.45 μm; Agela Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)로 여과하였다. 여과액을 펩톤 수(0.1%, w/v)로 십진 희석하여 *E. coli* DH5α가 접종되어 있는 LB 고체배지 위에 점적하여 37°C에서 24시간 배양한 후 용균반(plaque)을 계수하였고 PFU(plaque forming units)/mL로 나타내었다.

박테리오파지 ECP27의 *E. coli* DH5α 생육억제

하룻밤 배양한 *E. coli* DH5α를 5 mL의 LB broth에 대략 1.0 × 10^5 CFU/mL되도록 접종한 다음, ECP27을 0.01, 0.1, 1, 10 MOI (multiplicity of infection)가 되도록 각각 접종한 후 경시적(0, 6, 12시간)으로 *E. coli* DH5α의 콜로니를 LB 고체배지 상에서 계수하였고 CFU(colony forming units)/mL로 나타내었다.

박테리오파지 ECP27과 $CaCl_2$의 생육억제 상승효과

박테리오파지 ECP27과 $CaCl_2$의 병용처리가 *E. coli* DH5α의 생육억제에 상승효과를 발휘하는지 확인하기 위하여 *E. coli* DH5α를 5 mL의 LB broth에 대략 1.0 × 10^5 CFU/mL되도록 접종한 다음, ECP27을 1 MOI가 되도록 접종하였다. 접종액에 $CaCl_2$의 농도를 달리하여 첨가(1, 10, 50, 100 mM)한 후 경시적(0, 6, 12시간)으로 *E. coli* DH5α의 생균수를 측정하였다.

박테리오파지 ECP27과 유기산(젖산, 구연산)의 생육억제 상승효과

박테리오파지 ECP27과 젖산(lactic acid)의 병용처리가 *E. coli* DH5α의 생육억제에 상승효과를 발휘하는지 확인하기 위하여 *E. coli* DH5α를 5 mL의 LB broth에 대략 1.0 × 10^5 CFU/mL되도록 접종한 다음, 30 mM의 젖산을 첨가한 후 경시적(0, 6, 12시간)으로 *E. coli* DH5α의 생균수를 측정하였다. 또한 식품에의 적용 용이성을 위하여 젖산 대신 동일한 농도의 구연산을 첨가한 후 경시적으로 *E. coli* DH5α의 생균수를 측정하였다.

Results and Discussion

대장균 박테리오파지 ECP27 증식

E. coli DH5α를 LB broth에 ECP27과 2.5:1의 비율로 접종하고 37°C에서 6시간 동안 진탕배양한 후 배양액을 이용하여 증식된 박테리오파지를 계수한 결과 1.8 × 10^9 PFU/mL로 나타났다(Fig. 1).

박테리오파지 ECP27의 *E. coli* DH5α 생육억제

ECP27의 *E. coli* DH5α 생육 저해 결과는 Fig. 2와 같다. 대조구(무처리구)의 경우 초기 *E. coli* DH5α의 수가 5.0 Log CFU/mL를 보였으나 6시간 및 12시간 이후에는 각

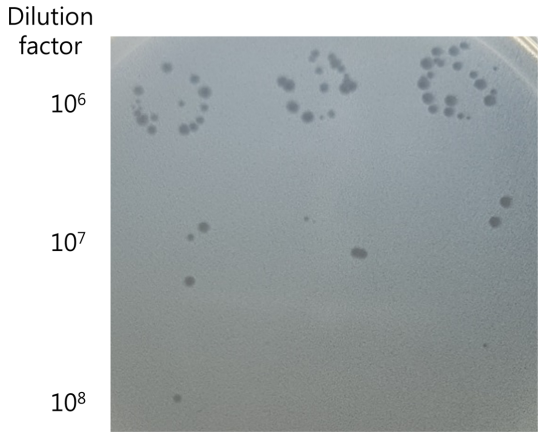

Fig. 1. Plaques produced by bacteriophage ECP27 against *Escherichia coli* DH5α.

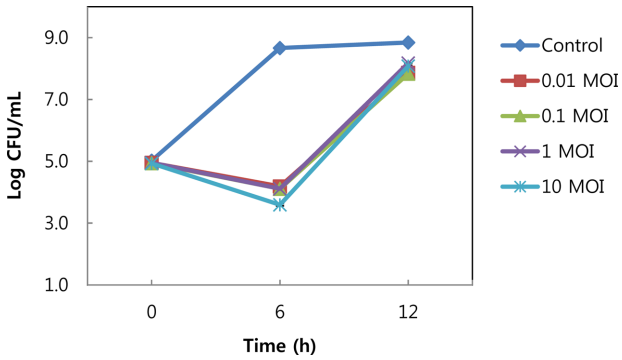

Fig. 2. Growth inhibition of *Escherichia coli* DH5α cultured with the bacteriophage ECP27 ranging from 0.01-10 MOI. The test was triplicated and the average values are represented with standard deviations.

각 8.7과 8.8 Log CFU/mL로 나타났다. 반면, ECP27을 처리한 경우 초기에 4.9-5.0 Log CFU/mL을 보였고 6시간째 3.6-4.2 Log CFU/mL로 균수가 감소되어 농도 의존적인 경향이 나타났다. 그러나 12시간째는 다시 균수가 회복되어 ECP27을 처리한 경우에도 7.8-8.2 Log CFU/mL의 균수가 확인되었다. 즉, 사용한 박테리오파지 ECP27의 농도에서는 *E. coli* DH5α의 완전 제거에는 한계가 있었다.

박테리오파지 ECP27과 $CaCl_2$의 생육억제 상승효과

E. coli DH5α에 대한 ECP27의 생육억제 효과를 상승시키기 위하여 ECP27 1 MOI를 기준으로 $CaCl_2$의 농도를 달리하여 첨가한 후 *E. coli* DH5α의 생균수 추이를 관찰하였다(Fig. 3). 결과적으로 ECP27과 $CaCl_2$ 병용처리는 배양 6시간째에 $CaCl_2$ 농도 의존적으로 *E. coli* DH5α의 생육억제에 상승효과가 나타났다. 즉, $CaCl_2$ 독자적으로는 *E. coli* DH5α에 대한 생육억제 효과가 전혀 나타나지 않은 반면, ECP27 1 MOI와 $CaCl_2$ 100 mM의 병용

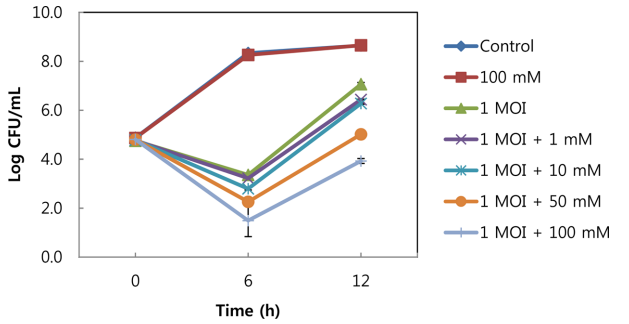

Fig. 3. Synergistic growth inhibition of *Escherichia coli* DH5α by a combination of the bacteriophage ECP27 (1 MOI) and $CaCl_2$ (1-100 mM). The test was triplicated and the average values are represented with standard deviations.

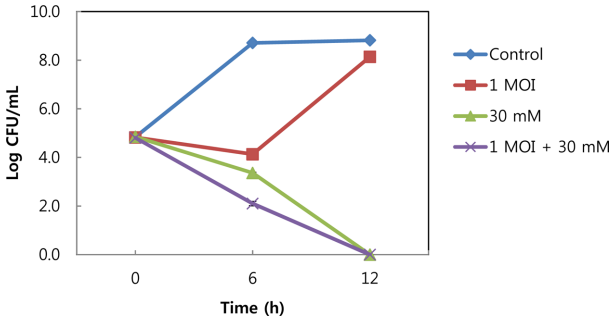

Fig. 4. Synergistic growth inhibition of *Escherichia coli* DH5α by a combination of the bacteriophage ECP27 (1 MOI) and lactic acid (30 mM). The test was triplicated and the average values are represented with standard deviations.

처리는 ECP27 1 MOI 단독처리와 비교했을 때 2.1 Log CFU/mL의 생균수 차이가 확인되었다. 그러나 ECP27과 $CaCl_2$ 병용처리 역시 사용한 농도에서는 12시간째 생균수가 다시 회복되는 양상을 보여 *E. coli* DH5α의 완전 제거에는 한계가 있었다.

박테리오파지 ECP27과 유기산(젖산, 구연산)의 생육억제 상승효과

E. coli DH5α에 대한 ECP27의 생육억제 효과를 상승시키기 위하여 유기산(젖산, 구연산)을 적용하였다(Fig. 4, 5). 적용 결과 6시간 째 젖산과 구연산 모두 ECP27과 상승효과가 나타났으며 사용한 30 mM 농도에서 젖산 보다 구연산의 효과가 더 우수하였다. 특히 앞의 $CaCl_2$와는 달리 12시간 후에는 시료에서 *E. coli* DH5α가 검출되지 않아 완전 제거가 확인되었다. 또한 젖산과 구연산 독자적으로도 12시간 경과 후에는 *E. coli* DH5α가 검출되지 않을 정도로 강력한 항균력을 가지고 있었다. 따라서 박테리오파지와 유기산을 병용처리할 경우 대장균의 생육을 짧은 시간에 효율적으로 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

박테리오파지를 활용하여 다양한 항균물질과의 병용처리를 통해 효과적으로 병원성 세균들을 억제하려는 연구가 다수 진행되었다. Yeh 등(2018)은 갈은 소고기에 *Salmonella* 균주를 인위적으로 오염시킨 후 자외선, 유기산, 박테리오파지를 단독 혹은 병용 처리하여 그 효과를 비교하였다[14]. 이 연구에서 박테리오파지와 자외선을 병용처리했을 때 갈은 소고기에 오염된 *Salmonella* 균주를 효과적으로 제어하는 것으로 확인되었다. Valério 등(2017)은 *E. coli*의 생육을 제어하기 위해 박테리오파지와 항생제의 병용처리를 시도하였는데, 그 결과, 두 항균물질의 병용처리는 상승효과를 유발하였으며 그 효과는 표적 박테리아의 항생제 내성 유무, 항생제의 작용기작(살균 혹은 정균)에 따라 다르게 나타났다[15]. Komora 등(2019)은 우유 속에 오염된 *Listeria monocytogenes*의 생육 억제를 위해 비

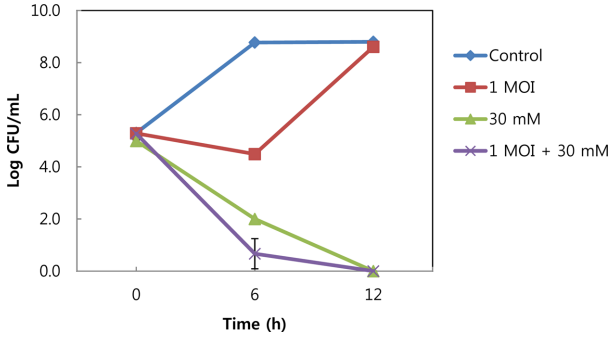

Fig. 5. Synergistic growth inhibition of *Escherichia coli* DH5α by a combination of the bacteriophage ECP27 (1 MOI) and citric acid (30 mM). The test was triplicated and the average values are represented with standard deviations.

가열 접근법으로 고압, 페디오신(박테리오신), 박테리오파지의 병용 처리를 시도하였는데 냉장온도에서 *L. monocytogenes* 균주가 재증식하는 것을 방지하였다. 그러나 각각의 인자를 개별적으로 처리하였을 때는 재증식을 방지하지 못했다[16]. 이처럼 항균인자를 독자적으로 사용하는 것 보다는 병용 처리했을 때 그 효과가 우수하다는 것은 많은 연구를 통해서 증명되었으며 본 연구에서 수행된 박테리오파지와 유기산의 병용처리는 오염된 표적 대장균 균주를 완전히 제거시키는 효과를 기대할 수 있기 때문에 그 활용도가 크다고 할 수 있다.

Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호 117060033HD040). 또한 대장균용 박테리오파지 ECP27을 분양해준 가천대학교 식품생물공학과 박종현 교수님께 감사드립니다.

국문요약

일부 대장균 균주는 독성을 가지고 있으며 이들을 제어하기 위해 박테리오파지와 같은 대체 항균물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 *E. coli* DH5α 균주를 모델로 이 균주의 생육을 억제하는 박테리오파지 ECP27과 병용처리했을 때 상승효과를 나타낼 수 있는 항균물질을 탐색하였다. 후보물질로는 $CaCl_2$, 젖산, 구연산이 사용되었다. $CaCl_2$의 경우 6시간째 농도 의존적으로 생육억제 상승효과가 나타났으나 12시간째 *E. coli* DH5α의 생균수가 회복되는 추세를 보였다. 그러나 30 mM 농도에서 젖산과 구연산은 박테리오파지 ECP27과 병용처리 했을 때 *E. coli* DH5α의 생육저해에 대하여 6시간째 상승효과를 보였으며 12시간째 생균수가 검출되지 않았다. 또한 젖산과 구연산을 단독으로 처리했을 때 12시간째 *E. coli* DH5α의 생균수가 확인되지 않아 독자적으로도 항균력이 우수하였다. 따라서 박테리오파지와 유기산을 병용처리하는 것은 대장균의 생육을 효과적으로 억제하는 좋은 전략이 될 수 있을 것이다.

References

1. Saxena, T., Kaushik, P., Mohan, M.K., Prevalence of *E. coli* O157: H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **82,** 249-264 (2015).
2. Farber, J.M., Sanders, G.W., Johnston, M.A., A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* **52,** 456-458 (1989).
3. Nataro, J.P., Kaper, J.B., Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11,** 142-201 (1998).
4. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., Sulakvelidze, A., Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **74,** 6230-6238 (2008).
5. Zhao, T., Zhao, P., West, J.W., Bernard, J.K., Cross, H.G., Doyle, M.P., Inactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in rumen content or feces-contaminated drinking water for cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **72,** 3268-3273 (2006).
6. Dixon, B., Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM news.* **66,** 264 (2000).
7. Jack, A.H., Robert G.A., Carlos, F.A., Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discov. Today.* **5,** 195-204 (2000).
8. Yoo, Y.A., Kim, M.S., Kim, K.S., Park, S.H., Jung, S.K., Antimicrobial resistance and implicated genes of *E. coli* isolated from commercial and cooked foods in Seoul. *J. Food Hyg. Saf.* **25,** 220-225 (2010).
9. Fischetti, V.A., Exploiting what phage have evolved to control gram-positive pathogens. *Bacteriophage.* **1,** 188-194 (2011).
10. Kaźmierczak, Z., Górski, A., Dąbrowska, K., Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. *Viruses.* **6,** 2551-2570 (2014).
11. Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., Qimron, U., Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112,** 7267-7272 (2015).
12. Burrowes, B., Harper, D.R., Anderson, J., McConville, M., Enright, M.C., Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **9,** 775-785 (2011).
13. Kunisaki, H., Tanji, Y., Intercrossing of phage genomes in a phage cocktail and stable coexistence with *Escherichia coli* O157:H7 in anaerobic continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85,** 1533-1540 (2010).
14. Yeh, Y., de Moura, F.H., Van Den Broek, K., de Mello, A.S., Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. *Meat Sci.* **139,** 44-48 (2018)
15. Valério, N., Oliveira, C., Jesus, V., Branco, T., Pereira, C., Moreirinha, C., Almeida, A., Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. *Virus Res.* **240,** 8-17 (2017).
16. Komora, N., Maciel, C., Pinto, C.A., Ferreira, V., Brandão, T.R.S., Saraiva, J.M.A., Castro, S.M., Teixeira, P., Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure, pediocin PA-1 and bacteriophage P100. *Food Microbiol.* **86,** 103315 (Epub)