pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 6, pp. 488~492 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.6.488

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

나이신과 박테리오파지의 병용처리에 의한 *Staphylococcus aureus*의 제어 효과

김선규[1,2] · 문기성[1,2*]
[1]한국교통대학교 생명공학전공
[2]한국교통대학교 4D융합기술연구소

Control Effect of *Staphylococcus aureus* by Co-Treatment of Nisin and a Bacteriophage

Seon-Gyu Kim[1,2] and Gi-Seong Moon[1,2*]
[1]*Major of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea*
[2]*4D Convergence Technology Institute, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea*

(Received October 7, 2021/Revised November 22, 2021/Accepted December 6, 2021)

ABSTRACT - One of the well characterized bacteriocins, nisin, shows strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. This study evaluated the synergistic effect of commercial nisin and SAP84 bacteriophage on *S. aureus*. Nisin showed antimicrobial activity against *S. aureus* KCTC 3881 in a dose-dependent manner. Eighteen IU/mL of the nisin decreased 4.03 Log CFU/mL of the strain in MRS broth after six hours compared with the controlled subject. On the other hand, the same dose of the nisin decreased 5.54 Log CFU/mL when co-treated with 0.1 MOI of the bacteriophage SAP84. Furthermore, the combination of nisin and SAP84 was successfully applied for controlling the *S. aureus* strain in lettuce.

Key words: Nisin, Bacteriophage, *Staphylococcus aureus,* Antimicrobial activity, Synergistic effect

나이신(nisin)은 유산균이 생산하는 대표적인 박테리오신으로서 현재 천연보존제로 상업화되어 전세계적으로 사용되고 있다. 유산균이 생산하는 박테리오신은 안전성이 확보되고 열안정성이 좋으며 광범위 항균활성을 나타내기 때문에 산업적 적용성이 우수하다. 유산균 생산 박테리오신은 크게 네 개의 그룹으로 나뉘는데 나이신은 class I (lantibiotics)에 속하며 번역 후 수식과정을 거치는 것이 특징이다[1].

나이신은 상기의 장점으로 지금까지 많은 연구들이 수행되었고 *in vitro*, *in situ*, 그리고 *in vivo* 실험에서 그 항균효과가 검증되었다. 또한 대표적인 나이신인 나이신A의 항균활성 및 항균스펙트럼을 향상시키기 위해 유도체(derivatives)가 개발되었으며 특히 나이신V (M21V)는 병원성 세균인, hVISA (heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*), *Clostridium difficile* ribotype 027, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* 등에 대한 항균활성이 나이신A 보다 향상되었다[2].

박테리오파지(혹은 줄여서 파지라고도 함)는 다양한 환경의 특정 숙주 박테리아를 감염시키는 바이러스로서 그 활용도가 크며 특히, 인체 감염, 유전자 치료, 식품 안전, 식물 감염, 백신 등의 많은 분야에서 활발한 연구가 진행되고 있다[3]. 식품 안전과 관련해서는 몇몇 박테리오파지 제품 즉, ListShield™ (*Listeria monocytogenes* 억제)[4], EcoShield™ (*Escherichia coli* O157:H7 억제)[5], Salmonelex™ (*Salmonella* 억제)[6] 등이 식품에서 각각의 식중독균을 제어하기 위한 목적으로 개발되어 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받아 판매되고 있다.

박테리오파지는 단독 처리보다 다른 항균물질과의 병용처리를 통하여 항균 시너지 효과를 기대할 수 있다. Kim과 Moon 등의 보고에 의하면 박테리오파지의 단독 처리보다 유기산 (젖산, 구연산)과의 병용처리 시 대장균 억제 효과가 훨씬 더 크게 나타났으며[7] 또한 Kim 등의 보고에

*Correspondence to: Gi-Seong Moon, Major 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

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의하면 *S. aureus*의 제어를 위해서는 박테리오파지 단독처리 보다는 박테리오신과의 병용처리가 효과적임이 확인되었다[8].

본 연구에서는 *S. aureus* 특이 박테리오파지와 상업화된 대표적 박테리오신인 나이신의 병용처리에 의한 *S. aureus*의 효율적 제어 효과를 검증하였다.

Materials and Methods

S. aureus 박테리오파지 SAP84 증식

S. aureus 박테리오파지 SAP84는 가천대학교 식품생물공학과에서 분양받아 사용하였다. SAP84의 증식을 위해서 *S. aureus* KCTC 3881 균주와 SAP84를 2.5:1의 비율로 MRS broth (BD, Sparks, MD, USA)에 접종한 다음 37°C에서 6시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 4°C에서 6,500×g로 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 멤브레인 필터(0.45 μm; Agela Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)로 여과하였다. 펩톤 수(0.1%, w/v)로 10진 희석한 여과액(10 μL)은 *S. aureus* KCTC 3881이 접종된 MRS agar plate (BD)에 점적하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 용균반(plaque)을 계수하였고 PFU (plaque forming units)/mL로 나타내었다.

나이신의 항균활성

상업적으로 판매되는 나이신 제품(Galacin Nisin 101, Galactic, Belgium)을 활용하여 MRS broth (BD) 5 mL에 최종 활성농도가 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125 IU/mL이 되도록 첨가한 다음 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 6 Log CFU/mL이 되도록 접종한 후 37°C에서 정치배양하였다. 배양하면서 경시적으로(0, 3, 6시간) 시료를 취해 펩톤수(0.1%, w/v)로 10진 희석한 다음 MRS agar plate (BD)에 도말하여 균수를 계수하였으며 CFU/mL로 나타내었다. 항균활성의 유무는 대조구(나이신 무첨가)와의 균수 차이로 판단하였다.

나이신과 박테리오파지 SAP84의 병용처리

MRS broth (BD) 5 mL에 최종 활성농도가 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125 IU/mL이 되도록 나이신을 첨가한 다음 박테리오파지 SAP84를 최종농도 0.1 MOI (multiplicity of infection)가 되도록 첨가하였다. 여기에 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 6 Log CFU/mL이 되도록 접종한 후 37°C에서 정치배양하였다. 균의 계수는 상기의 방법과 동일하다.

주사전자현미경 관찰

나이신과 박테리오파지의 병용처리에 의한 세포의 상태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경 사진 촬영을 진행하였다. 즉, 나이신(18 IU/mL)과 박테리오파지 SAP84 (0.1 MOI)가 첨가된 MRS broth (BD)에 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 최종농도 6 Log CFU/mL이 되도록 접종한 후 37°C에서 6시간 배양하였다. 이후 배양액 20 μL를 취해 16,000×g에서 1분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 여기에 에탄올(50-100%)을 첨가하여 탈수과정을 거친 후 멤브레인 필터(0.45 μm; Agela Technologies Inc.)에 점적하여 주사전자현미경(JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan) 관찰을 하였다.

신선농식품(양상추) 적용시험

나이신과 박테리오파지의 병용처리가 실제 식품에서도 *S. aureus*의 생육저해에 효과를 발휘하는지 확인하기 위하여 양상추를 시험대상으로 선정하였다. 양상추를 흐르는 물에 30초간 세척하고 70% EtOH에 15분간 침지하여 소독하였다. 이후 클린벤치에서 양상추를 적정 크기(2 cm×2 cm)로 절단하고 30분간 UV처리 하에 건조하였다. 여기에 하룻밤 배양한 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 5 Log CFU되게 접종한 후 37°C에서 2시간 건조하여 실험에 사용하였다. 즉, 전처리한 건조 양상추를 상기 농도의 나이신과 박테리오파지 SAP84 혼합액 2 mL에 침지하여 1시간 동안 상온 방치 후 양상추를 무균적으로 회수하여 펩톤수가 담긴 튜브에 넣고 현탁 후 균수를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복실험을 진행하여 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS ver. 25 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통계분석에 이용하였다. 일원분산분석(one-way ANOVA)으로 유의성을 검증하였으며, Duncan's multiple range test ($P<0.05$)로 사후검정하였다.

Results and Discussion

나이신의 항균활성

나이신의 농도 증가에 따라 *S. aureus* KCTC 3881 균주의 생균수는 감소하였으며 농도의존적 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 다만, 낮은 농도(1.125와 2.25 IU/mL)에서는 대조구 대비 큰 차이가 나타나지 않았다. 나이신 처리 후 3시간이 경과하였을 때 가장 높은 농도인 18 IU/mL에서는 대조구 대비 1.97 Log CFU/mL의 균수 감소가 있었으며 6시간이 경과하였을 때 4.03 Log CFU/mL의 균수 감소가 관찰되었다. 상대적으로 낮은 농도(9, 4.5 IU/mL)의 나이신 처리 후 6시간이 경과하였을 때는 대조구 대비 각각 3.03과 0.82 Log CFU/mL의 균수 감소가 확인되었다.

나이신과 박테리오파지 SAP84의 병용처리

나이신과 박테리오파지의 병용처리에 의한 *S. aureus*

KCTC 3881 균주의 억제 상승효과를 검증하기 위하여 박테리오파지 SAP84의 농도(0.1 MOI)를 고정하고 나이신의 농도를 달리하면서 경시적으로 생균수를 측정하였다(Fig. 2). SAP84의 농도를 0.1 MOI로 고정한 것은 선행연구에 기초하여 결정하였다[8]. 박테리오파지 SAP84 단독 처리 시 대조구 대비 3시간 경과 시 1.44 Log CFU/mL의 균수가 감소하였고 6시간 경과 시 2.28 Log CFU/mL의 균수가 감소하였다. 이는 박테리오파지 SAP84 단독으로도 *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대한 제어능이 있음을 의미한다. 그러나 박테리오파지와 함께 나이신이 첨가될 경우 그 억제능이 더 크게 증가하였다. 즉, 박테리오파지 SAP84에 나이신 18 IU/mL가 첨가될 경우 대조구 대비 5.54 Log CFU/mL의 균수 감소가 관찰되었다. 이는 나이신 18 IU/mL을 단독처리 한 결과(4.03 Log CFU/mL 감소) 보다도 1.51 Log CFU/mL이 더 감소한 수치이다.

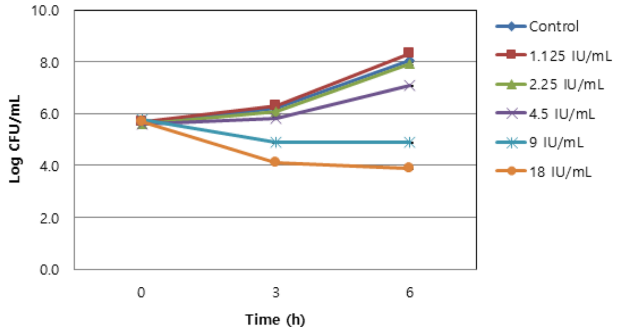

Fig. 1. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 by nisin. Data are provided as the mean value±SD, measured in triplicate.

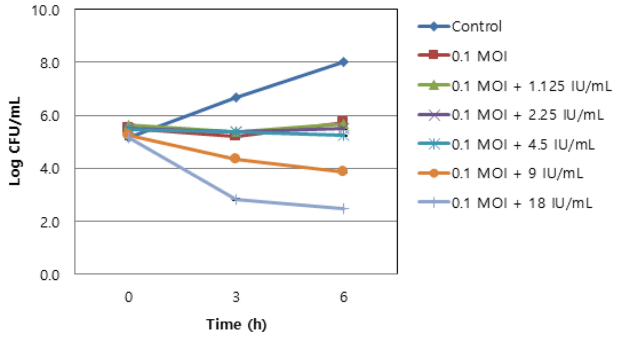

Fig. 2. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 by combinations of SAP84 and nisin. Data are provided as the mean value±SD, measured in triplicate.

유사한 연구로서 Duc 등도 *S. aureus*를 제어할 수 있는 박테리오파지를 닭 등으로부터 분리한 후 단독 혹은 나이신과의 병용처리 결과 효과적으로 *S. aureus* 세포와 생물막(biofilm)을 억제함을 확인하였다[9]. 최근에는 기존의 항생제와 박테리오신을 병용처리하여 그 항균효과를 극대화하는 연구도 활발하다. Angelopoulou 등(2020)의 연구에 의하면 모유로부터 유래한 다제 내성 *S. aureus* (MDRSA; multi-drug resistant *S. aureus*) 분리주의 생물막을 억제하는데 나이신과 vancomycin을 병용처리는 것이 단독처리보다 효과적임이 확인되었다[10].

주사전자현미경 관찰

나이신과 박테리오파지의 병용처리에 의한 세포의 상태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경 사진 촬영을 진행하였다. 그 결과 대조구(무처리)의 경우 *S. aureus*의 전형적인 형태인 포도알 모양이 관찰된 반면 나이신(18 IU/mL)과 박테리오파지 SAP84 (0.1 MOI)를 처리한 세포의 경우 비정형의 모양과 파쇄된 세포찌꺼기의 응집체가 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 나이신과 박테리오파지의 엔도라이신이 세포막과 세포벽을 파괴한 결과로 추론된다.

Jensen 등의 연구에서 *S. aureus*가 나이신에 노출되면 탈분극(depolarization)이 일어나 빠르게 죽는 것으로 확인되었다[11]. 이를 분석하기 위해 초고해상도의 현미경(super-resolution structured illumination microscopy)과 투과전자현미경(transmission electron microscopy)이 사용되었으며 나이신 처리 시 *S. aureus*의 세포막이 파괴되는 것은 물론 DNA 응축도 관찰되어 나이신이 *S. aureus*의 염색체 복제와 분리에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.

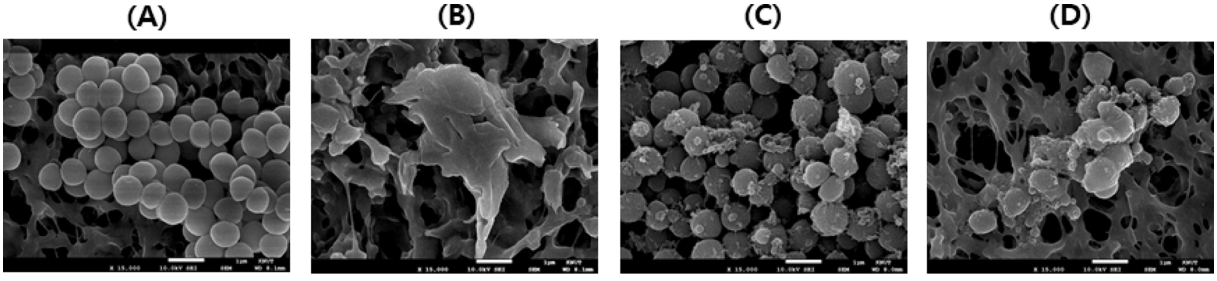

Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 treated with combination of SAP84 and nisin. (A) Control (no treatment); (B) Treatment of 18 IU/mL of nisin; (C) Treatment of 0.1 MOI of SAP84; (D) Treatment of combination of 0.1 MOI of SAP84 and 18 IU/mL of nisin.

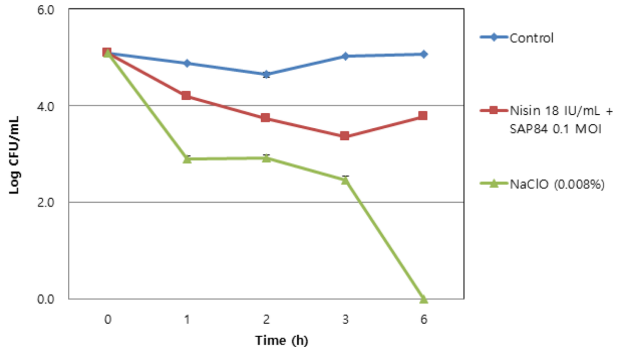

Fig. 4. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 in lettuce by combination of SAP84 and nisin. Data are provided as the mean value±SD, measured in triplicate.

신선농식품(양상추) 적용시험

선행연구의 방법[12]을 참고하여 *S. aureus* KCTC 3881 균주를 양상추에 인위적으로 접종한(5 Log CFU) 후 나이신(18 IU/mL)과 박테리오파지 SAP84 (0.1 MOI)를 병용처리한 결과 3시간까지 생균수가 감소하는 경향을 보이다가 6시간째 다소 증가하였다. 즉, 5.08 Log CFU/mL의 생균수로 시작하여 1-3시간 경과 시 각각 4.19, 3.73 및 3.36 Log CFU/mL의 생균수를 보였으며 6시간 경과 시 3.77 Log CFU/mL의 생균수를 보였다. 대조구로 사용한 차아염소산나트륨(NaClO, 0.008%)은 상기 병용처리 보다 효과가 우수하였으며 6시간째는 *S. aureus* KCTC 3881 균주가 검출되지 않았다(Fig. 4). 사용한 농도에서 나이신과 박테리오파지 SAP84 병용처리가 차아염소산나트륨의 항균효과 보다는 다소 낮게 나타났지만 이는 사용 농도의 조정으로 해결 가능하며 무엇보다 차아염소산나트륨이 가지는 화학합성품에 대한 소비자들의 부정적인 인식을 감안한다면 상기의 병용처리 방법은 이를 대체할 만한 근거를 가진다고 판단된다.

나이신은 천연보존제로서 식품 중 병원성 세균(*L. monocytogenes*와 *S. aureus* 등)을 효과적으로 억제하는데 크게 기여할 수 있다. 그럼에도 불구하고 나이신 펩타이드의 생화학적 특성으로 인해 특정 식품 환경(예, 중성 혹은 알칼리 pH)에서는 그 효과가 저감될 수 있다[13]. 그러한 단점의 보완과 제어 효과의 향상을 위하여 다른 항균물질과의 병용처리에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Narimisa 등은 인체 감염에서 문제가 되는 지속생존세포(persister cell)의 효과적인 억제 방법으로 항생제와 나이신의 조합을 제시했다[14]. 즉, 고농도의 항생제 처리 조건에서 *L. monocytogenes* 균주는 높은 지속생존 세포 생성능을 보였으며 항생제와 나이신 조합은 이를 효과적으로 억제하였다. 또한 저온살균 우유에서의 미생물학적 안전성을 보장하기 위하여 나이신과 라이소자임을 처리한 결과 총균수, 포자형성세균, 저온균 수에서 감소가 확인되었고 둘의 병용처리에서 상승효과가 관찰되었으며 저장기간도 연장되었다[15]. 나이신과 박테리오파지의 병용처리도 병원성 세균을 억제하기 위한 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 상업적으로 판매되는 박테리오파지 P100과 Nisaplin® (나이신의 상표명)의 병용처리는 콜슬로(coleslaw)에 인위적으로 오염시킨 *L. monocytogenes* ScottA 균주를 효과적으로 억제하였다[16]. 이상과 같이 항균물질의 병용처리는 낮은 농도로 병원성 세균을 효과적으로 억제할 수 있고 병원성 세균의 내성 발현 기회를 줄일 수 있으므로 전략적 제어방법으로 활용 가능하다.

본 연구에서는 *S. aureus*의 효율적인 제어를 위한 방법으로 나이신과 박테리오파지를 병용처리하였고 그 결과 단독으로 처리하는 것 보다 *S. aureus*를 효과적으로 억제함을 확인하였고 향후 식품에서의 *S. aureus* 제어제 개발 시에 기초자료로 활용 가능하리라 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(과제번호 117060033HD040)의 지원을 받아 수행되었습니다. 또한 부분적으로 2021년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2021R1A6A1A03046418)의 지원을 받아 수행되었습니다. *S. aureus* 박테리오파지 SAP84는 가천대학교 식품생물공학과 박종현 교수님으로부터 분양 받았으며 이에 감사드립니다.

국문요약

대표적인 상업화된 박테리오신인 나이신은 *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*와 같은 병원성 세균에 대해 강력한 항균 활성을 보인다. 본 연구에서는 시판되는 나이신 제품을 박테리오파지 SAP84와 함께 병용처리했을 때 *S. aureus* 억제에 대한 상승효과에 대하여 평가했다. *S. aureus* KCTC 3881 균주에 대해 나이신은 농도의존적으로 생균수를 감소시켰으며 18 IU/mL의 나이신은 대조구와 비교하여 6시간째에 4.03 Log CFU/mL의 균수가 감소된 반면, 동일 용량의 나이신이 박테리오파지 SAP84 (0.1 MOI)와 병용처리 되었을 때 5.54 Log CFU/mL의 생균수 감소가 관찰되었다. 또한 나이신과 SAP84의 조합은 양상추에서 *S. aureus* 균주를 효과적으로 제어하는데 성공적으로 적용되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Seon-Gyu Kim https://orcid.org/0000000308027788
Gi-Seong Moon https://orcid.org/0000000330335250

References

1. Singh, V.P., Recent approaches in food bio-preservation – a review. *Open Vet. J*., **8,** 104-111 (2018).
2. Field, D., Quigley, L., O'Connor, P.M., Rea, M.C., Daly, K., Cotter, P.D., Hill, C., Ross R.P., Studies with bioengineered Nisin peptides highlight the broad-spectrum potency of Nisin V. *Microb. Biotechnol.,* **3,** 473-486 (2010).
3. Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., Balcão, V.M., Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.,* **212-213**, 38-58 (2018).
4. Sarhan, W.A., Azzazy, H.M., Phage approved in food, why not as a therapeutic? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.,* **13**, 91-101 (2015).
5. Ferguson, S., Roberts, C., Handy, E., Sharma, M., Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157: H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage,* **3**, e24323 (2013)
6. Soffer, N., Abuladze, T., Woolston, J., Li, M., Hanna, L.F., Heyse, S., Charbonneau, D., Sulakvelidze, A., Bacteriophages safely reduce *Salmonella* contamination in pet food and raw pet food ingredients. *Bacteriophage,* **6**, e1220347 (2016).
7. Kim, S.G., Moon, G.S., Synergistic inhibition of *Escherichia coli* by a combination of bacteriophage and organic acid. *J. Food Hyg. Saf.,* **34**, 591-594 (2019).
8. Kim, S.G., Lee, Y.D., Park, J.H., Moon, G.S., Synergistic inhibition by bacteriocin and bacteriophage against *Staphylococcus aureus*. *Food Sci. Anim. Resour.,* **39**, 1015-1020 (2019).
9. Duc, H.M., Son, H.M., Ngan, P.H., Sato, J., Masuda, Y., Honjoh, K.I., Miyamoto, T., Isolation and application of bacteriophages alone or in combination with nisin against planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **104**, 5145-5158 (2020).
10. Angelopoulou, A., Field, D., Pérez-Ibarreche, M., Warda, A.K., Hill, C., Ross, R.P., Vancomycin and nisin A are effective against biofilms of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human milk. *PLoS One,* **15**, e0233284 (2020).
11. Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., Leisner, J.J., Nisin damages the septal membrane and triggers DNA condensation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.,* **11**, 1007 (2020).
12. Yun, B., Lee, H.S., An, H.M., Kim, W.I., Kim, H.Y., Han, S., Kim, H.J., Ryu, J.G., Kim, S.R., Effect of chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatment on the reduction of foodborne pathogen in Korean chive. *J. Food Hyg. Saf*., **32**, 154-162 (2017).
13. Ibarra-Sánchez, L.A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M.J., Karam, L., Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *J. Dairy Sci.,* **103**, 2041-2052 (2020).
14. Narimisa, N., Sadeghi Kalani, B., Mohammadzadeh, R., Masjedian Jazi, F., Combination of antibiotics-nisin reduces the formation of persister cell in *Listeria monocytogenes*. *Microb. Drug Resist.,* **27**, 137-144 (2021).
15. Saad, M.A., Ombarak, R.A., Abd Rabou, H.S., Effect of nisin and lysozyme on bacteriological and sensorial quality of pasteurized milk. *J. Adv. Vet. Anim. Res.,* **6**, 403-408 (2019).
16. Lewis, R., Bolocan, A.S., Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C., The effect of a commercially available bacteriophage and bacteriocin on *Listeria monocytogenes* in coleslaw. *Viruses,* **11**, 977 (2019).