미생물 식품 안전 향상을 위한 박테리오파지 함유 제형의 적용에 대한 종합적인 검토

A comprehensive review of the application strategies of bacteriophage-containing formulation for microbial food safety enhancement

지하니[1] · 박시연[1] · 김민경[1] · 정지윤[1] · 마재영[1] · 김봉선[2*] · 장윤지[1*]

Hani Ji[1], Siyeon Park[1], Jiyoon Chung[1], Minkyoung Kim[1], Jaeyoung Ma[1], Bong Sun Kim[2*], and Yoonjee Chang[1*]

국민대학교 식품영양학과[1], 서울여자대학교 식품공학과[2]

[1]Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, 02707, Republic of Korea
[2]Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul, 01797, Republic of Korea

Bong Sun Kim

Correspondence to

Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul, 01797, Republic of Korea
Tel: +82-970-7839
E-mail: rlaqhdtjs93@naver.com

Yoonjee Chang

Correspondence to

Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, 02707, Republic of Korea
Tel: +82-910-4775
E-mail: ychang@kookmin.ac.kr

서론

최근 식품 유해 미생물로 인한 사고 증가에 따라 전세계적으로 6억 건 이상의 식중독 사고가 발생하고 420,000명이 사망한 것으로 보고되었다[1]. 식중독 환자의 발생으로 약 1,100억 달러에 달하는 경제적 손실이 발생하여 이에 따라 미생물 식품 사고 예방 및 관리를 강화하고 있다[1,2]. 또한, 미생물 오염은 식품 고유의 향미, 질감, 외관 및 영양학적 변성을 일으켜 식품의 유통기한을 단축시킬 뿐만 아니라 소비 심리에도 영향을 미쳐 식품 산업 내 경제 손실의 주요 원인이다[3,4]. 따라서 식품 산업 내 미생물 안전성을 확보하고 경제 손실을 막기 위하여 항균 관련 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 주로 항생제, 소독제 및 방부제와 같은 화학적 처리법과 초음파, 열, 냉동 및 감마선 조사와 같은 물리적 처리법이 사용되어 왔다[5,6]. 그러나 과도한 화학 항균제 사용은 화학 반응으로 발생하는 부산물과 잔류물의 환경 오염 문제 및 인체에 영향을 미치는 유해한 부작용 등의 보고가 있다[7]. 또한 항생제 내성 세균의 발생 건수가 급진적으로 증가하고 있어 화학적 처리법의 안전성에 대한 우려가 제기되고 있다[8]. 물리적 항균법인 초음파, 열 및 냉동 처리는 식품의 조직에 영향을 주고, 감마선 처리는 식품 마이크로바이옴에 영향을 주기 때문에 다양한 식품군에 적용하기 어렵다는 한계점이 있다[9,10]. 따라서 최근 식품 산업에서 주목하는 친환경, 인체 안전 등의 목표에 따라 타깃하는 특정 세균만을 효과적으로 사멸할 수 있는 친환경 항균제에 대한 연구가 필요한 실정이다.

기존에 보고된 화학적, 물리적 항균 방법의 문제점을 보완할 수 있는 친환경 생물

방제제로 박테리오파지가 주목받고 있다[8]. 박테리오파지는 숙주 세균만을 특이적으로 사멸하여 항생제 내성 박테리아에 대한 강력한 감염성과 높은 가격 경쟁력으로 농식품 산업 등에서 유망한 생물학적 방제제로 인식된다[11,12]. 그러나 이러한 강점에도 불구하고 박테리오파지는 단백질 구조로 구성되어 다양한 환경 요인(온도, pH 및 습도 등)에 대해 낮은 안정성을 나타내므로 장기 보관 및 적용 다양성이 제한된다는 한계점이 있다[13]. 따라서 최근 여러 식품 등 환경에서의 효과적인 적용을 위한 제형화 연구가 활발하게 수행되고 있다[14].

박테리오파지 기반의 제형은 크게 필름과 분말 형태로 분류된다. 필름의 제조 방식은 용매 캐스팅, 침지, 분무, 도포, 그리고 다층 필름으로 나뉘고 분말 제형은 분무 건조와 동결 건조 방식으로 이루어진다. 박테리오파지 함유 필름과 분말은 고유의 특성과 장점으로 인해 다양한 식품군에 항균제로 적용이 가능하다[15]. 이와 같은 제형화 연구는 박테리오파지의 생존력을 증진시키고 효과적인 항균 효과를 제공함으로써, 다양한 식품 특성에 적합한 안전 관리를 수행하기 위한 필수 전략이다[12,16].

각종 식품의 고유 특성에 따라 다양한 박테리오파지 제형이 맞춤형으로 적용 가능하며, 미생물 안전성을 효과적으로 증진하므로 미래 식품안전산업을 견인할 차세대 친환경 항균제로 주목받고 있다[14]. 본 논문에서는 최근 연구된 미생물 식품 안전을 강화하기 위한 다양한 박테리오파지 기반 제형의 개발 현황 및 적용 사례에 대한 연구 동향을 분석하고자 하였다.

본론

1. 박테리오파지 제형화 전략 개발 필요성

박테리오파지는 세균을 특이적으로 감염하는 바이러스로, 지구상의 다양한 환경에 10^{32} 종류 이상 널리 분포한다[17]. 박테리오파지는 유전물질(DNA 또는 RNA)을 함유한 단백질 코팅으로 둘러싼 형태의 음이온성 머리인 캡시드(capsid)와 숙주 세균의 세포막을 인식하고 흡착할 수 있는 양이온성 꼬리 섬유로 구성되어 있다[18,19]. 박테리오파지는 꼬리 섬유에 존재하는 수용체 결합 단백질(receptor-binding proteins)을 사용하여 숙주 세균의 표면 구조에 특이적으로 결합(specific binding)하고 내부로 DNA를 주입하여 숙주 내부에 수십에서 수천개의 복제된 박테리오파지를 형성하고, 이 과정 중 숙주 세균이 용해되고 방출되며 숙주를 사멸한다[20]. 또한 미국 식품의약국에서 안전성을 인증 받아 2006년에 GRAS(generally recognized as safe)에 등재되었고 무색 무취의 장점이 있어 식품 적용에 적합하며, 화학 및 합성 항균제보다 천연 항균제를 선호하는 소비자들의 수요까지 충족할 수 있는 유망한 항균 소재이다[21,22].

하지만 상기와 같은 좋은 특성을 보유함에도 불구하고, 온도, pH 및 습도 등 다양한 환경 스트레스 요인에 의해 단백질이 변성될 경우, 박테리오파지는 항균 활성 및 생존력 유지가 어렵다는 적용상의 한계점이 있다[23]. 그래서 이를 보완하는 방안으로 박테리오파지를 가혹한 환경 스트레스로부터 보호하는 제형화 연구의 필요성이 대두되고 있다[24]. 박테리오파지 제형화 전략을 적용할 경우, 함유된 박테리오파지를 안정적으로 보관하고 운반할 수 있게 하여 저장성과 편리성을 향상시키고, 기대 농도의 박테리오파지 전달을 통해 일관된 품질 유지 및 효과적인 항균 효과를 제공하여 식품산업 내 적용 가능성을 확장할 수 있다[25,26]. 따라서 적용하고자 하는 식품 종류에 적합한 박테리오파지 제형화 연구의 필요성이 대두되고 있다.

2. 박테리오파지 함유 필름 제형화

2.1. 식품 산업 내 박테리오파지 필름 제형화 연구 현황

식품 산업 내 필름은 합성 수지 소재 및 천연 소재(탄수화물, 단백질, 지질)를 이용하여 가열, 압축 성형, 건조 등의 공정을 통해 형성된 얇은 층을 말한다[27]. 최근 액티브 및 친환경 포장에 대한 관심이 높아지면서 천연 소재 기반 필름 연구가 활발히 이루어지고 있다[28]. 액티브 필름은 미

생물 오염 차단, 물리적 충격 방지, 수분 및 가스(C_2H_4O, O_2, CO_2 등) 투과성 조절 등 통상적으로 한 가지 이상의 기능을 지니고 있는 포장재로 제품의 유통 및 저장 안정성에 중요한 역할을 한다[29,30]. 친환경 필름은 천연 고분자인 단백질(유청 단백질, 젤라틴 등), 지질(천연 왁스, 파라핀 등), 다당류(키토산, 전분 등)등을 이용하여 다양한 성형 공정을 거쳐 얻은 얇은 막을 의미한다[29,30,31]. 기존의 연구에서 주로 보고된 항균 기능성 소재들은 식품의 향, 색도 등의 감각 특성에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있어 무색 무취의 항균 소재인 박테리오파지를 이용한 항균 필름 연구가 주목받고 있다[29].

박테리오파지를 함유한 필름은 식품 표면에 부착하여 적용했을 때, 우수한 항균능을 보이는 친환경 기능성 소재이다[32]. 필름이 물체 표면에 직접 닿아 있어 접촉 표면적을 높이며, 이 때 다량의 박테리오파지가 방출되어 식품 표면에서 강한 항균 활성을 보인다[33]. 식품 적용 박테리오파지 필름은 박테리오파지의 생존율 및 방출량을 높이기 위해 천연 고분자를 사용하여 용매 캐스팅, 침지, 분무, 도포와 같은 공정 과정을 거쳐 캡슐화(phage encapsulation)한다[34,35]. 최근에는 박테리오파지 캡슐화 필름을 채소류, 과일류, 육류 등과 같은 식품에 적용한 항균 필름 연구가 증가하고 있다[36,43,44].

2.2. 용매 캐스팅 필름

용매 캐스팅 방법을 이용한 박테리오파지 필름은 높은 온도에서 고분자와 가소제를 극성 또는 비극성 용매에 용해시키고 냉각한 후 박테리오파지를 첨가하여 기판에 붓고, 성형 및 건조 과정을 거쳐 만든 필름이다[36,37]. 선행 연구에서 박테리오파지를 함유한 필름을 용매 캐스팅 기법으로 제작하였을 때, 대조군에 비해 필름의 기계적 특성에 영향이 없었으며, 박테리오파지가 높은 생존률로 남아 있어 우수한 항균 활성을 보였음을 확인하였다[28,36,38](Table 1). Tomat 등에 따르면 유청 단백질과 글리세롤을 3:1로 혼합한 용매 캐스팅 필름 내 6종의 박테리오파지 칵테일은 4℃에서 5주 동안 7-log PFU/mL로 생존력이 유지되었고, 육류에 적용 시 4℃에서 4-log PFU/mL이 방출되는 것을 확인하였다[39]. 또한, Weng 등에 따르면 박테리오파지 phiIPLA-RODI를 함유한 젤라틴 필름을 치즈에 적용했을 때, 6일 동안 2-log CFU/mL 이상의 황색포도상구균 사멸능이 유지됨을 확인했다[40]. 따라서 높은 생존 및 방출이 어려운 박테리오파지를 용매 캐스팅으로 제작하여 육류, 치즈 등 수분 함량이 높은 식품 환경에 적용한다면 효과적인 항균 활성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

이외에도 하이드로겔 기반 소재를 이용하여 제작한 필름은 뛰어난 수분 흡수력과 함께 박테리오파지의 효과적인 내장 및 방출 메커니즘을 제공한다[41]. Kim 등의 연구에 따르면, κ-카라기난과 곤약 글루코만난 필름을 가교결합하여 제작한 필름 내 박테리오파지 PBSE191은 생 닭고기 표면의 살모넬라균에 대해 25℃에서 3시간, 4℃에서는 48시간 이상 항균 효과(1-log CFU/g)가 지속됨을 확인하였다[42]. 이와 같은 결과는 하이드로겔 필름이 수분을 흡수하면서 팽창하고, 박테리오파지를 방출하는 독특한 기능을 통해 항균 효과를 발휘함을 시사한다[42]. 따라서 이러한 필름은 육류 제품의 드립 발생 및 세균 오염 문제를 효과적으로 제어할 수 있는 새로운 방안이 될 것으로 기대된다.

2.3. 침지 코팅 필름

침지 방식 필름은 액상 기반 코팅 용액에 식품을 침지하여 표면에 형성되는 얇은 막을 말한다[45]. 이 방식은 단순한 공정으로 다양한 형태의 식품 표면에 적용하여 효과적으로 층을 형성할 수 있다는 장점이 있으며, 선행 연구에 따르면 박테리오파지 함유 침지 필름 제조 시, 박테리오파지의 안정성이 향상되었다고 보고되었다[45,46,47](Table 2). Sezer 등의 연구에서는 딸기에 살모넬라균을 호스트로 하는 3종의 박테리오파지 칵테일(1:1:1, v/v)을 4가지 소재(농축 유청 단백질, 카복시메틸셀룰로스, 키토산 및 알긴산나트륨)에 첨가 후, 항균 효과를 4℃에서 5일동안 측정하였다[47]. 농축 유청 단백질 코팅(10%, w/w)의 경우 3.1-log CFU/g, 키토산(2%, w/w)은 2.0-log CFU/g, 알긴

Table 1. Examples of the various application with bacteriophage-based solvent casting film in food

Classification of methods	Applied food	Polymer materials	Phage (host genus)	Observations	References
Solvent casting	Meat	Whey protein concentrate	DT1 to DT6 (*E. coli*)	• More than 10^5 PFU/mL of phage particles were released from the WPC films into the aqueous medium at 4℃ until 48 h. • Phage cocktail containing WPC films significantly inhibited *E. coli* DH5α and *E. coli* O157:H7 STEC to non-detectable levels.	Tomat et al., 2019
	Cheese pieces	Gelatin	phiIPLA-RODI (*S. aureus*)	• Gelatin film containing phages showed antimicrobial activities producing 5-log CFU/mL reduction in a liquid medium. • Reduction in the count of *S. aureus* was observed in the cheese wrapped with the gelatin film containing phages (4-log CFU/g).	Weng et al., 2021
	Fresh raw beef	Gelatin-protocatechuic acid (PCA)	JN01 (*E. coli*)	• The release of phage JN01 from gelatin-PCA films was indicated to 3.89-log PFU/cm^2 in 5 min and increased to 4.72-log PFU/cm^2 until 11 h. • Gelatin-PCA films combined with phages exhibited antibacterial effects, resulting in a bacterial reduction of 0.88-log CFU/g at 5 days and 0.8-log CFU/g at 7 days.	Li et al., 2022
	Fresh chicken breast fillets	κ-carrageenan/konjac glucomannan	PBSE191 (*S. Enteritidis*)	• The PBSE191-loaded CGHS40 film showed 1-log CFU/g inhibition within 24 h, and effect lasted more than 96 h. • Phage rapidly released from the film reached 3.7×10^7 PFU/g.	Kim et al., 2023
Multilayer film	Chicken meat	Chitosan/alginate	MET S1-001 (*S. Enteritidis*)	• The multilayer chitosan/alginate film demonstrated antimicrobial effects, resulting in 1.1, 1.1, and 1.0-log CFU/cm^2 of reduction after 1, 3, and 5 days of inoculation.	Tidim et al., 2024
	Chicken breast filets	Whey protein concentrate/pullulan composite and poly (lactic acid)	A511 (*L. monocytogenes*)	• 30PLA/70WP phage-containing bilayer film showed that 4.59-log PFU/cm^2 of phage was released from the film on chicken breast at 4℃ after 1 h. • Bilayer film treatment containing phages exhibited a lower 1.83-log CFU/cm^2 of reduction, compared to phage-free film treatment on chicken breast at 4℃.	Kamali et al., 2022

산나트륨(1.25%, w/w)은 1.9-log CFU/g, 카복시메틸셀룰로스(1%, w/v)는 1.4-log CFU/g의 균 감소 결과를 보여 침지 필름의 우수한 항균 효과를 확인하였다[47]. 또한, 불규칙한 식품 표면에 접촉 표면적을 높여줄 수 있어 멜론, 딸기, 상추와 같은 과채류에 적용이 용이하다. Kim 등의 연구에 따르면 달걀 껍질에서 살모넬라균을 제어하기 위해 폴리비닐알코올(10%, w/v)을 이용하여 박테리오파지 침지 코팅을 적용하였다[12]. 이는 코팅 직후 1-log CFU/film의 살모넬라균의 감소를 보였으며, 24시간 동안 2-log CFU/film 이상의 항균 효과를 보였다[12]. 이처

럼 침지 필름 방식은 기존의 널리 사용되던 평판 필름의 한계점을 뛰어넘어 다양한 식품 형태에 적용이 용이하다.

2.4. 분무 코팅 필름

분무 코팅 필름은 코팅액이 노즐을 통해 분사되어 미세한 에어로졸로 식품 표면에 코팅하여 형성되는 막을 뜻한다[48]. 이 방식은 적은 양의 코팅액을 사용해 얇은 막을 형성할 수 있는 장점이 있으며, 선행 연구에 따르면 박테리오파지를 함유한 분무 코팅 필름 내에서 박테리오파지가 안정하게 생존한다고 보고되었다[48,49](Table 2). Huang 등의 연구에 따르면 박테리오파지 분무와 침지의 코팅액 사용량을 비교한 결과, 분무 코팅이 적은 양으로 동일한 항균 효과를 보였으므로, 식품 적용 시 경제성이 높을 것으로 예상된다[48]. Huang 등의 연구에 따르면 시금치에 박테리오파지 분무 코팅이 UV-A(32 W/m^2)에서 안정성을 확인하였다[49]. 분리 유청 단백질과 폴리도파민 혼합액을 시금치에 분무 코팅 하여 코팅 처리하지 않은 대조군과 비교 했을 때 대조군의 경우 6-log PFU/mL, 코팅의 경우 0.8-log PFU/mL의 박테리오파지 사멸을 확인 할 수 있었다[49]. 이러한 결과는 분무 코팅 필름이 박테리오파지

Table 2. Examples of the various application with bacteriophage-based coating film in food

Classification of methods	Applied food	Polymer materials	Phage (host genus)	Observations	References
Dip coating	Fish food	Whey protein isolate (WPI)	T7 (*E. coli*), *Vibrio* phage (*Vibrio* spp.)	• T7 and *Vibrio* phages in a saline environment, dip coating resulted in a release of 0.7-log PFU/pellet of phages after 2 h.	Huang et al., 2019
	Strawberry	Whey protein concentrate (WPC)	Cocktail: F5-4 (*S.* Enteritidis), L2-1 (*S.* Typhimurium), and ICB1-1 (*S.* Typhimurium)	• WPC showed the strongest antibacterial effect, achieving a 3.1-log CFU/g reduction in *Salmonella* on strawberries over 5 days at 4°C. • CMC coating had the lowest efficacy (1.4-log CFU/g reduction), while chitosan and sodium alginate coatings demonstrated 1.9 and 2.0-log CFU/g reductions, respectively.	Sezer et al., 2022
	Strawberry	Carboxymethyl cellulose (CMC)			
	Strawberry	Chitosan			
	Strawberry	Sodium alginate			
	Eggshell	Poly vinyl alcohol	PBSE191 (*S.* Enteritidis)	• The coated eggshells were incubated at 37 °C for 24 h. • About 1-log CFU anti-*Salmonella* effect after 0 h compared to those without coating and 2-log CFU reduction after 24 h.	Kim et al., 2022
Spraying coating	Fish food	Whey protein isolate (WPI)	T7 (*E. coli*), *Vibrio* phage (*Vibrio* spp.)	• T7 and *Vibrio* phages in a saline environment, spray coating resulted in a release of 0.5-log PFU/pellet of phages after 2 h.	Huang et al., 2019
	Spinach	Whey protein isolate (WPI) and Polydopamine (PDA)	T7 (*E. coli*)	• The phage coating with WPI showed 3.3-log PFU/mL reduction, the phage coating with PDA showed 1.8-log PFU/mL reduction, and the combination of PDA and WPI-glycerol decreased 0.8-log PFU/mL reduction.	Huang et al., 2020
Spreading coating	Cheese	Whey protein isolate (WPI)	A511 (*L. ivanovii*)	• The A511-containing WPI led 1.06-log CFU/g reduction of *L. monocytogenes* within 16 days.	García-Anaya et al., 2023

안정성을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 선행 연구들에 따르면 파지 분무 코팅 필름은 식품에 적용 시 소량으로도 높은 박테리오파지 안정성을 보인다.

2.5. 도포 코팅 필름

도포 코팅 필름은 스프레더(평판 도말봉, 바코터, 브러시 등)를 이용하여 물체 표면에 코팅되어 형성되는 막을 의미한다[50,51,52,53]. Mayra 등에 따르면, 평판 도말봉을 사용하여 분리 유청 단백질(5%, w/v)을 도포 코팅한 치즈는 4°C에서 16일동안 1.06-log CFU/g의 리스테리아균에 대해 항균 효과를 보였다[51](Table 2). 도포 코팅 필름은 표면에 밀착하여 적용할 수 있다는 장점이 있어, 다층 필름 제작 시에도 이용되고 있다[52,54]. 다만, 도포 코팅 필름을 식품에 직접적으로 적용한 연구는 부족한 실정이므로 향후 관련 연구가 확대되어야 한다고 사료된다.

2.6. 다층 필름

다층 필름은 용매 캐스팅, 침지, 분무 또는 도포 등의 다양한 공정을 통해 최소한 두 층으로 이루어진 하나의 필름을 말한다[55]. 다층 필름은 단일 필름들의 정전기적 결합, 수소 결합, 소수성 결합을 통해 하나의 필름으로 제작한다[56]. 다층 필름은 단일 필름과 비교하였을 때, 단단한 경도, 높은 장벽 특성(가스 투과, 습기 차단), 그리고 복합 기능성 다중 층을 가지며 박테리오파지 생존력을 높여준다[57](Table 1). Kamali 등의 연구에 따르면 폴리락트산(poly lactic acid, 다층 필름의 30%, w/w) 필름을 제조한 후 유청 단백질, 풀루란, 그리고 박테리오파지 A511 혼합 용액(다층 필름의 70%, w/w)을 상위층에 분주하여 다층 필름을 제작하였다[58]. 이렇게 제작된 박테리오파지 혼합 다층 필름은 30일동안 박테리오파지의 생존력을 유지하며, 닭가슴살에 적용 시 4°C에서 1시간 후 63%의 박테리오파지(4.59-log PFU/cm^2)가 방출된 것을 확인하였다[58]. 따라서 식품에 적용한 다중 필름은 박테리오파지 생존과 방출에 뛰어난 효과를 보이며, 다기능 포장 필름으로 식품 적용성이 우수할 것으로 기대된다[59].

3. 박테리오파지 함유 분말 제형화

3.1. 식품 산업 내 분말 제형화 연구 현황

분말은 분무와 동결 등을 이용한 건조 과정을 통해 수분이 제거된 작은 입자로 만들어진 미립자 상태의 고형물이다[60]. 분말은 액체보다 무게가 가볍고 부피가 작아 저장 및 운송 비용을 절감할 수 있으며, 액체 제품의 수분 함량을 감소시켜 제품의 미생물 안정성을 보장하는데 사용된다[26,60]. 식품 산업에서의 박테리오파지 분말 제형은 주로 박테리오파지 생존력 및 효과적인 항균 효과를 확보하기 위해 제형화한다. 박테리오파지 분말화 공정에서는 높은 박테리오파지 생존률을 유지하기 위해 다양한 보호제로써 당류(트레할로스, 슈크로스, 락토오즈, 만니톨 등)와 단백질류(류신, 글루타민산, 아스파라진산, 아르기닌, 트레오닌 등)를 주로 사용하고 있다. 최근에는 이러한 보호제와 박테리오파지를 함유한 분말을 분말형 분유, 우유, 고기에 적용한 항균소재 파우더 연구가 증가하고 있다[16,61].

3.2. 동결 건조 분말

박테리오파지 동결 건조 분말은 −80°C 냉동조건에서 급속 냉동한 후, 동결건조기를 이용하여 −50°C 이하의 진공 냉동 조건에서 수분을 제거하여 만들어진 고체 분말이다[62]. 최근의 선행 연구에서는 박테리오파지의 동결 건조 분말화 시, 높은 보존력과 항균 활성을 확인하였다[63,64](Table 3). 또한, Imm 등의 연구에 따르면 5% (w/v) 콜라겐 펩타이드와 1% (w/v) 트레할로스가 함유된 박테리오파지 SG01 동결 건조 분말이 4°C와 25°C의 유통 및 저장 조건에서 4주간 높은 생존능을 유지하며, 분말형 조제분유에 적용하였을 때, 6시간 동안 사카자키균에 대해 높은 항균 활성(최대 4-log CFU/mL)을 보였다[16]. 이러한 연구 결과는 낮은 수분 환경에 적용이 어려웠던 박테리오파지도 보호제를 사용하여 동결 건조할 경우, 분유와 같은 건조한 식품 환경에서도 효과적으로 적용할 수 있음을 시사한다.

3.3 분무 건조 분말

박테리오파지 분무 건조 분말은 65℃ 이상의 열풍 조건에서 액상 혼합물(용액, 현탁액 등)을 분무하여 수분을 제거하여 만든 고체 분말이다[65]. Tabare 등에 따르면 박테리오파지 LUZ19의 분말화는 International Conference on Harmonization (ICH)의 저장 조건(최대 40℃, 상대습도 75%)에서까지도 최소 12개월 이상 높은 박테리오파지 생존능을 유지하였다[66]. 또한, Lin 등의 연구에 따르면 8 mg/mL의 락토오스와 8 mg/mL의 류신을 첨가한 박테리오파지 PEV20 분말이 25℃에서 12개월 이상 보관해도 높은 박테리오파지 생존능을 유지함을 확인하였다[67]. Chang 등에 따르면 90% (w/w) 락토오스와 10% (w/w) 류신이 함유된 박테리오파지 분말은 20℃, 상대습도 60%의 저장 환경에서 12개월 동안 높은 생존능이 유지됨을 확인하였다[68]. 선행 연구들을 통해 박테리오파지 분무 건조 분말은 식품 유통 저장 중 미생물 안정성을 확보하는 데 기여할 수 있을 것으로 판단된다. Choi 등에 따르면 11%(w/w) 말토덱스트린과 4%(w/w) 트레할로스가 함유된 박테리오파지 T4 분말은 25℃, 상대습도 26% 조건에서 42일 동안 박테리오파지 생존능이 유지됨을 확인할 수 있었으며, 우유와 고기에 적용 시 25℃에서 48시간 동안 약 3-log CFU/mL의 대장균 감소 효과를 보였다[69](Table 3). 따라서 박테리오파지 분무 건조 분말은 우유와 고기를 비롯한 식품 환경에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

요약

본 총설에서는 식품의 미생물 안전성을 확보하기 위하여 친환경 생물 방제제인 박테리오파지의 안정성(stability)을 향상시킬 수 있는 제형화 전략에 관한 최신 연구 동향을 조사하였다. 특히, 최근 5년간 발표된 박테리오파지 함유 필름 및 분말의 제형화 방법과 적용 식품 및 제어 세균을 정리하였다. 다양한 제형화 전략 적용을 통해 박테리오파지의 생존률과 방출력이 조절되었으며, 식품 적용 시 효과적인 항균 효과를 나타내었다. 박테리오파지 함유 필름 제형화 방법에는 용매 캐스팅, 침지, 분무, 도포 및 다층 방법이 있고, 분말 제형화는 동결 건조 및 분무 건조가 사용된다. 특히, 용매 캐스팅으로 제작한 박테리오파지 함유 필름은 수분 함량이 높은 식품에 적용하기 용이하며, 육류 제품의 드립 발생 및 미생물 오염 문제를 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 기대된다. 침지 방식 필름은 다양한 형태의 식품에 적용이 용이하고, 분무 코팅은 적은 양의 코팅액을 사용하므로 경제적이다. 또한 도포 코팅은 다양한 식품 표면에 적용이 가능하고, 다층 필름은 다기능의 포장 필름으로 활용되어 다양한 식품에 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 마지막으로 동결건조 분말화를 통해 낮은 수분 함량의 건조 식품까지 박테리오파지의 적용 가능성이 확장되었으며, 분무 건조 분말화는 우유 및 육류 제품 같은 다양한 식품 환경에 활용될 것으로 기대된다. 이러한 연구는 식품 안전을 향상시킬 수 있는 새로운

Table 3. Examples of the various application with bacteriophage-based powder in food

Classification of methods	Applied food	Polymer materials	Phage (host genus)	Observations	References
Freeze-dried	Powdered infant formula	Collagen peptide/trehalose	SG01 (*C. sakazakii*)	• The phage SG01 remained stable in phage powder for up to 4 weeks at 4℃ and 25℃. • The phage powder was effective to reduce in powdered infant formula within 6 h.	Imm et al., 2023
Spray drying	Skimmed milk and beef	Maltodextrin/trehalose	T4 (*E. coli*)	• The phage T4 powder containing 11% (w/w) maltodextrin and 4% (w/w) trehalose in skimmed milk showed a reduction of approximately 4-log CFU/mL within 24 h at 25℃.	Choi et al., 2023

전략을 제공하며, 향후에는 앞선 제형뿐만 아니라 더욱 다양한 형태의 제형화를 통하여 여러 식품에 활발히 적용할 수 있도록 하는 노력이 필요할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. WHO. (2024, January 10). Estimating the burden of foodborne diseases. Retrieved from https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-disease

2. Qian, C., Murphy, S.I., Orsi, R.H., Wiedmann, M., How can AI help improve food safety?. *Annu. Rev. Food Sci. T.*, **14**, 517-538 (2023).

3. Hue, V.T., Long, N.M., Linh, T.T., Anh, D.N., Khanh, H.N., Thuy, M.N.T., Dinh, T.C., Food poisoning: A case study in Vietnam. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.*, **7**, 100295 (2022).

4. Lee, C., Kim, H., Ryu, S., Bacteriophage and endolysin engineering for biocontrol of food pathogens/pathogens in the food: Recent advances and future trends. *Crit. Rev. Food Sci.*, **63**, 8919-8938 (2023).

5. Micciche, A.C., Rubinelli, P.M., Ricke, S.C., Source of water and potential sanitizers and biological antimicrobials for alternative poultry processing food safety applications. *Front. Sustain. Food Syst.*, **2**, 82 (2018).

6. Ban, G.H., Kim, S.H., Kang, D.H., Park, S.H., Comparison of the efficacy of physical and chemical strategies for the inactivation of biofilm cells of foodborne pathogens. *Food Sci. Biotechnol.*, **32**, 1679-1702 (2023).

7. Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., Langsrud, S., Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Res. Int.*, **45**, 532-544 (2012).

8. Wu-Wu, J.W.F., Guadamuz-Mayorga, C., Oviedo-Cerdas, D., Zamora, W.J., Antibiotic resistance and food safety: Perspectives on new technologies and molecules for microbial control in the food industry. *Antibiot.*, **12**, 550 (2023).

9. Starek, A., Kobus, Z., Sagan, A., Chudzik, B., Pawłat, J., Kwiatkowski, M., Terebun, K., Andrejko, D., Influence of ultrasound on selected microorganisms, chemical and structural changes in fresh tomato juice. *Sci. Rep.*, **11**, 3488 (2021).

10. Verde, S.C., Silva, T., Matos, P., Effects of gamma radiation on wastewater microbiota. *Radiat. Environ. Bioph.*, **55**, 125-131 (2016).

11. Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E., Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host microbe*, **25**, 219-232 (2019).

12. Kim, S., Chang, Y., Anti-Salmonella polyvinyl alcohol coating containing a virulent phage PBSE191 and its application on chicken eggshell. *Food Res. Int.*, **162**, 111971 (2022).

13. Ranveer, S.A., Dasriya, V., Ahmad, M.F., Dhillon, H.S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D.V., Khedkar, G.D., Raposo, A., Han, H., Puniya, A.K., Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *NPJ Sci. Food*, **8**, 1 (2024).

14. Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A., Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application. *Expert Rev. Anti-Infe.*, **17**, 583-606 (2019).

15. Costa, M.J., Pastrana, L.M., Teixeira, J.A., Sillankorva, S.M., Cerqueira, M.A., Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives. *Viruses*, **15**, 1271 (2023).

16. Imm, S., Chang, Y., Evaluation of the biocontrol potential of a collagen peptide/trehalose-based *Cronobacter sakazakii* phage powder in rehydrated powdered infant formula. *Food Res. Int.*, **173**, 113257 (2023).

17. Chaudhary, V., Kajla, P., Lather, D., Chaudhary, N., Dangi, P., Singh, P., Pandiselvam, R., Bacteriophages: A potential game changer in food processing industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1-25 (2024).

18. Ouyang, R., Ongenae, V., Muok, A., Claessen, D.,

Briegel, A., Phage fibers and spikes: A nanoscale Swiss army knife for host infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, **77**, 102429 (2024).

19. Zyman, A., Górski, A., Międzybrodzki, R., Phage therapy of wound-associated infections. *Folia microbiol.*, **67**, 193-201 (2022).

20. Kamiński, B., Paczesny, J., Bacteriophage challenges in industrial processes: A historical unveiling and future outlook. *Pathogens*, **13**, 152 (2024).

21. Gu Liu, C., Green, S.I., Min, L., Clark, J.R., Salazar, K.C., Terwilliger, A.L., Kaplan, H.B., Trautner, B.W., Ramig, R.F., Maresso, A.W., Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *mBio*, **11**, 10-1128 (2020).

22. Kang, J., Chang, Y., Characterization of a *Vibrio parahaemolyticus*-targeting lytic bacteriophage SSJ01 and its application in artificial seawater. *Food Sci. Biotechnol.*, 1-11 (2023).

23. Malik, D.J., Sokolov, I.J., Vinner, G.K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G.T., Clokie, M.R.J., Garton, N.J., Stapley, A.G.F., Kirpichnikova, A., Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interfac.*, **249**, 100-133 (2017).

24. Alves, D., Cerqueira, M.A., Pastrana, L.M., Sillankorva, S., Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Res. Int.*, **128**, 108791 (2020).

25. Singh, L.S., Nano-emulsion encapsulation for the efficient delivery of bacteriophage therapeutics. *Biologicals.*, **85**, 101725 (2024).

26. Gonzalez-Menendez, E., Fernandez, L., Gutierrez, D., Rodriguez, A., Martinez, B., Garcia, P., Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLoS One.*, **13**, 1-14 (2018).

27. Laftah, W.A., Rahman, W.A.W.A., Preparation and characterization of hybrid composite film based on synthetic and natural materials. *Polytech.*, **2**, 51-61 (2019).

28. Dang, X., Du, Y., Wang, X., Engineering eco-friendly and biodegradable biomass-based multifunctional antibacterial packaging films for sustainable food preservation. *Food Chem.*, **439**, 138119 (2024).

29. García-Anaya, M.C., Sepúlveda, D.R., Zamudio-Flores, P.B., Acosta-Muñiz, C.H., Bacteriophages as additives in edible films and coatings. *Trends Food Sci. Tech.*, **132**, 150-161 (2023).

30. Abdollahzadeh, E., Nematollahi, A., Hosseini, H., Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends Food Sci. Tech.*, **110**, 291-303 (2021).

31. Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W., Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci.*, **59**, 2467-2480 (2019).

32. Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., Sip, A., Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments. *Microorganisms*, **8**, 1764 (2020).

33. Gouvêa, D.M., Mendonça, R.C.S., Soto, M.L., Cruz, R.S., Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT-Food Sci. Technol.*, **63**, 85-91 (2015).

34. Radford, D., Guild, B., Strange, P., Ahmed, R., Lim, L.T., Balamurugan, S., Characterization of antimicrobial properties of *Salmonella* phage Felix O1 and *Listeria* phage A511 embedded in xanthan coatings on poly (lactic acid) films. *Food Microbiol.*, **66**, 117-128 (2017).

35. Vonasek, E., Le, P., Nitin, N., Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, **37**, 7-13 (2014).

36. Paidari, S., Zamindar, N., Tahergorabi, R., Kargar, M., Ezzati, S., Shirani, N., Musavi, S.H., Edible coating and films as promising packaging: A mini review. *J. Food Meas. Charact.*, **15**, 4205-4214 (2021).

37. López-de-Dicastillo, C., Settier-Ramírez, L., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., López-Carballo, G., Development of biodegradable films loaded with phages with anti*listerial* properties. *Polymers*, **13**, 327 (2021).

38. Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., Koocheki, A., Development of whey protein

concentrate/pullulan composite films containing bacteriophage A511: Functional properties and anti-*listerial* effects during storage. *Food Packag. Shelf Life*, **33**, 100902 (2022).

39. Tomat, D., Soazo, M., Verdini, R., Casabonne, C., Aquili, V., Balagué, C., Quiberoni, A., Evaluation of an WPC edible film added with a cocktail of six lytic phages against foodborne pathogens such as enteropathogenic and shigatoxigenic *Escherichia coli*. *LWT-Food Sci. Technol.*, **113**, 108316 (2019).

40. Weng, S., López, A., Sáez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., Díaz, M., Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, **121**, 107666 (2021).

41. Kim, H.Y., Chang, R.Y.K., Morales, S., Chan, H.K., Bacteriophage-delivering hydrogels: Current progress in combating antibiotic resistant bacterial infection. *Antibiot.*, **10**, 130 (2021).

42. Kim, S., Kim, B.S., Bai, J., Chang, Y., Antibacterial κ-carrageenan/konjac glucomannan-based edible hydrogel film containing *Salmonella* phage PBSE191 and its application in chicken meat. *LWT-Food Sci. Technol.*, **180**, 114707 (2023).

43. Li, Y.X., Zhong, C., Zhang, H.Z., Zhao, Y.Y., Shu, M., Wu, G.P., Effectiveness of bacteriophage JN01 incorporated in gelatin film with protocatechuic acid on biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 in beef. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **57**, 3503-3514 (2022).

44. Song, H.G., Choi, I., Lee, J.S., Chang, Y., Yoon, C.S., Han, J., Whey protein isolate coating material for high oxygen barrier properties: A scale-up study from laboratory to industrial scale and its application to food packaging. *Food Packag. Shelf Life.*, **31**, 100765 (2022).

45. Tang, X., Yan, X., Dip-coating for fibrous materials: Mechanism, methods and applications. *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **81**, 378-404 (2017).

46. Huang, K., Nitin, N., Edible bacteriophage based antimicrobial coating on fish feed for enhanced treatment of bacterial infections in aquaculture industry. *Aquaculture*, **502**, 18-25 (2019).

47. Sezer, B., Tayyarcan, E.K., Boyaci, I.H., The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of *Salmonella* in strawberries. *Food Control*, **135**, 108812 (2022).

48. Aziz, F., Ismail, A.F., Spray coating methods for polymer solar cells fabrication: A review. *Mat. Sci. Semicon. Proc.*, **39**, 416-425 (2015).

49. Huang, K., Nitin, N., Food-grade microscale dispersion enhances UV stability and antimicrobial activity of a model bacteriophage (T7) for reducing bacterial contamination (*Escherichia coli*) on the plant surface. *J. Agr. Food Chem.*, **68**, 10920-10927 (2020).

50. Kitano, T., Maeda, Y., Akasaka, T., Preparation of transparent and conductive thin films of carbon nanotubes using a spreading/coating technique. *Carbon*, **47**, 3559-3565 (2009).

51. García-Anaya, M.C., Sepulveda, D.R., Rios-Velasco, C., Acosta-Muñiz, C.H., Incorporation of A511 bacteriophage in a whey protein isolate-based edible coating for the control of *Listeria* monocytogenes in cheese. *Food Packag. Shelf Life.*, **37**, 101095 (2023).

52. Tampau, A., González-Martínez, C., Vicente, A.A., Chiralt, A., Enhancement of PLA-PVA surface adhesion in bilayer assemblies by PLA aminolisation. *Food Bioprocess Tech.*, **13**, 1215-1228 (2020).

53. Liu, X., Peng, H., Zhang, T., Wang, K., Dong, Y., Wang, K., Zhan, X., Liu, Y., Li, Y., Li, J., One-step brush-coating strategy for low-haze and water-resistant transparent wood films. *Prog. Org. Coat.*, **185**, 107912 (2023).

54. Anukiruthika, T., Sethupathy, P., Wilson, A., Kashampur, K., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C., Multilayer packaging: Advances in preparation techniques and emerging food applications. *Compr. Rev. Food. Sci. F.*, **19**, 1156-1186 (2020).

55. Alias, A.R., Wan, M.K., Sarbon, N.M., Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, **136**, 108875 (2022).

56. Tidim, G., Guzel, M., Soyer, Y., Erel-Goktepe, I., Layer-by-layer assembly of chitosan/alginate thin films containing *Salmonella enterica* bacteriophages for antibacterial applications. *Carbohydr. Polym.*, **328**, 121710 (2024).

57. Alias, A.R., Wan, M.K., Sarbon, N.M., Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, **136**, 108875 (2022).

58. Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., Koocheki, A., Poly (lactic acid) and whey protein/pullulan composite bilayer film containing phage A511 as an anti-*Listerial* packaging for chicken breast at refrigerated temperatures. *LWT-Food Sci. Technol.*, **170**, 114085 (2022).

59. Wang, Q., Chen, W., Zhu, W., McClements, D.J., Liu, X., Liu, F., A review of multilayer and composite films and coatings for active biodegradable packaging. *NPJ Sci. Food*, **6**, 18 (2022).

60. Her, J.M., Development of novel spray freeze-drying method for value-added coffee powder preparation. *Korean J. Food Preserv.*, **28**, 99-106 (2021).

61. Choi, I., Lee, J. S., Han, J., Maltodextrin-trehalose miscible system-based bacteriophage encapsulation: Studies of plasticizing effect on encapsulated phage activity and food application as an antimicrobial agent. *Food Control*, **146**, 109550 (2023).

62. Kang, J.R., Kim, G.M., Shin, J.H., Anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Aloe saponaria* Haw grown in Namhae. *Korean J. Food Preserv.*, **29**, 1189-1200 (2022).

63. Śliwka, P., Skaradziński, G., Dusza, I., Grzywacz, A., Skaradzińska, A., Freeze-drying of encapsulated bacteriophage T4 to obtain shelf-stable dry preparations for oral application. *Pharmaceutics*, **15**, 2792 (2023).

64. Zheng, H., Devitrification of lyoprotectants: A critical determinant for bacteriophages inactivation in freeze-drying and storage. *Food Res. Int.*, **173**, 113307. (2023).

65. Oh, S.H., Sim, W.S., Kim, S.I., Park, K.H., Cho, H.H., Effect of drying temperature on particle morphology in spray drying. *Trans. Korean Soc. Mech. Eng. B.*, 1720-1722 (2020).

66. Tabare, E., Glonti, T., Cochez, C., Ngassam, C., Pirnay, J.P., Amighi, K., Goole, J., A design of experiment approach to optimize spray-dried powders containing *Pseudomonas aeruginosa Podoviridae* and *Myoviridae* bacteriophages. *Viruses*, **13**, 1926 (2021).

67. Lin, Y., Chang, R.Y.K., Britton, W.J., Morales, S., Kutter, E., Li, J., Chan, H.K., Storage stability of phage-ciprofloxacin combination powders against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *Int. J. Pharm.*, **591**, 119952 (2020).

68. Chang, R.Y.K., Wallin, M., Kutter, E., Morales, S., Britton, W., Li, J., Chan, H.K., Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *Int. J. Pharm.*, **560**, 11-18 (2019).

69. Choi, I., Lee, J. S., Han, J., Maltodextrin-trehalose miscible system-based bacteriophage encapsulation: Studies of plasticizing effect on encapsulated phage activity and food application as an antimicrobial agent. *Food Control*, **146**, 109550 (2023).