pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 1, pp. 106~114 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.1.106

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

Short Communication

# 황색포도상구균 박테리오파지의 저감화를 위한 물리화학적 처리 효과

**백다윤 · 박종현 · 조성래[1] · 이영덕[2]***
가천대학교 식품생물공학과, [1]㈜파티쉐미진푸드, [2]서원대학교 식품공학과

# Effects of Physical and Chemical Treatments for Reduction of Staphylococcal Phages

Da-Yun Baek, Jong-Hyun Park, Sung-Rae Cho[1], and Young-Duck Lee[2]*
*Department of Food Science and Biotechnology, College of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam, Korea*
*[1]Patissier Mijin Food, Changwon, Korea*
*[2]Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Korea*
(Received January 30, 2019/Revised February 11, 2019/Accepted February 13, 2019)

**ABSTRACT -** The effect of physical and chemical treatments to reduce staphylococcal phages was investigated. To determine impact of physical treatment on viability of phages, two staphylococcal phages (SAP84 and SAP89) were treated with multiple heat (55°C and 60°C) and pH (pH4, 7, 10) conditions. Viability of SAP 84 was dramatically reduced at 60C and SAP 89 was completely inactivated at 60C within 25 min. Overall, the two phages were stable under all the pH conditions tested except for the SAP 89 at pH 10. Treatments, a 10% FAS (Ferrous Ammonium Sulfate) solution and various density of ethanol and sodium hypochlorite were used to reduce the two phages. SAP 84 was unstable in 50% and 70% ethanol. However, SAP 84 and SAP 89 showed high tolerance after exposure to 100 ppm of sodium hypochlorite which is known as an effective sterilizer. As soon as the two phages were treated with 10% FAS, which is used as a virucidal agent, they were inactivated and did not form any plaque. The result of this study provides additional evidence that staphylococcal phages can be controlled by various physicochemical treatments.

**Key words :** Staphylococcal phage, Physical treatments, Chemical treatments, Virucidal effects

황색포도상구균은 통성혐기성의 그람 양성세균으로 식품매개질병을 유발하는 주요 병원균 중 하나이며 장독소를 생산하며 식중독을 유발하며[1], 식중독뿐만 아니라 사망률이 높은 심장 내막염, 폐렴 등 다양한 질병을 야기한다. 이러한 황색포도상구균에 감염 시에 다양한 항생제들을 이용해 치료하지만, 황색포도상구균이 항생제에 지속적으로 노출되면 숙주에서 살아남기 위해 항생제 내성을 갖게 된다. 최근에는 페니실린 내성 황색포도상구균 (penicillin-resistant *S. aureus,* PRSA), 메티실린 내성 황색포도상구균 (methicillin-resistant *S. aureus,* MRSA)와 반코마이신 내성 황색포도상구균 (vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, VISA/vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) 등이 발견되고 있다[2,3]. 특히 황색포도상구균은 항생제 내성 관련 유전자 전이가 발생하여 내성을 가진 균들이 점차 증가했을 가능성이 높다는 연구가 보고되고 있다[4,5]. 최근에는 황색포도상구균의 다양한 항생제들에 대한 내성이 증가함에 따라 황색포도상구균 감염 시 치료 및 제어하기 위한 수단으로 박테리오파지를 이용하는 방법이 주목받고 있다[6]. 박테리오파지는 세균을 숙주로 하여 세균에 침투하는 세균성 바이러스를 칭한다. 박테리오파지는 특이적으로 특정 균에만 침투하고 용해성 박테리오파지인 경우, 숙주인 세균의 대사과정을 방해하고 용균시키는 특징이 있다[7]. 이러한 특징을 이용하여 박테리오파지는 다양한 식중독 세균의 제어와 식품과 접촉한 표면이나 기구들을 소독 및 표면에 생성된 biofilm을 제거하는 소독제로 활용되고 있다[8]. 또한, 박테리오파지를 이용하여 항생제 내성을 갖는 세균성 감염 질병의 치료를 위해 박테리오파지 치료에도 응용되고 있으며[9], 박테리오파지 치료에 대한 평가는 주로 감염균에 박테리오파지를 처리한 후 살아남은 감염균을 선택배지에서 배양하여 형성된 집

*Correspondence to: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Chungcheongbuk-do 28674, Korea
Tel: +82-43-299-8472, Fax: +82-43-299-8470
E-mail: ydlee@seowon.ac.kr

락을 계수하여 확인한다. 하지만 이러한 방법은 박테리오파지 처리 후, 잔존해있던 파지가 살아남은 병원성 균을 용균시켜서 박테리오파지의 효능이 실제보다 더 높게 측정될 가능성이 있다[10]. 따라서 이러한 가능성을 제외하고 박테리오파지에 의한 병원성 균의 실제 제어능을 측정하기 위해서는 잔존한 파지를 불활성화시킬 필요가 있다고 보고되고 있다[11]. 또한, 현재 FDA에서 식품첨가물로 허가된 *Listeria monocytogenes*를 숙주로 하는 박테리오파지 혼합액을 이용해 제어를 위해 박테리오파지 혼합액의 제어능이 과대평가되는 것을 막기 위해 박테리오파지 혼합액을 *L. monocytogenes*와 처리한 후 저감화 효과를 평가하기 전에 숙주에 부착되지 못한 박테리오파지를 제거하여야 한다고 보고하고 있다[12]. 또한, 유발효 제품의 경우에는 박테리오파지가 존재하여 유산균을 용균 시키면 발효가 진행되지 않기 때문에 박테리오파지를 제거하는 것이 유제품 관련 산업에서는 주요 문제로 인식되고 있다[13]. 이러한 박테리오파지의 저감화는 열처리, pH, 유기용매, 차아염소산나트륨, 유기산, 금속이온 또는 biocide 등 다양한 물리적 및 화학적 요인에 의해서 영향을 받는다고 보고되고 있다[14-16]. 따라서 본 연구에서는 토양에서 분리된 신규 황색포도상구균 박테리오파지 특성과 열, pH, 에탄올, 차아염소산나트륨과 ferrous ammonium sulfate를 처리하여 황색포도상구균 박테리오파지의 저감화 효과를 확인하고자 하였다.

## Materials and Methods

### 황색포도상구균 박테리오파지 분리

국내 각지의 토양 시료로부터 황색포도상구균 박테리오파지를 분리하기 위해 *S. aureus* KCTC1621, *S. aureus* KCCM 12103, *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 19095, *S. aureus* ATCC 23235 와 *S. aureus* RN 4220 총 6 주의 *S. aureus* 를 숙주균으로 사용하였다. 이 균주들은 Egg Yolk tellurite emulsion이 포함된 BPA (Baired-Parker Agar, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에 획선도말하여 37°C에서 24 시간 배양하였다. 이후 주변에 투명한 환을 형성한 단일 집락을 취하여 10 mM $CaCl_2$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 LB broth (LBC, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 5 mL에 접종하여 37°C에서 24 시간 배양한 후 실험에 사용했다. 전국 각지의 토양 시료로부터 박테리오파지를 분리하였다. 시료를 phosphate buffer saline (PBS) 용액 (10 mM $PO_4^{3-}$, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4)에 1:2 비율로 혼합하여 상온에서 150 rpm으로 2 시간 동안 진탕 시킨 후, 3000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상등액을 얻었다. 상등액을 LBC broth와 1:10 비율로 섞어 균질화하고, LBC broth에서 배양된 약 8 log CFU/mL 수준의 숙주균을 각각 100 μL 씩 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 24 시간 배양하였다. 배양액을 8000 g에서 10 분간 원심분리하고 상등액을 0.22 μm syringe filter (Millipore, MA, USA) 를 이용해 제균하였다. 제균 된 상등액을 이용하여 LBC agar에 plaque assay를 수행하고 37°C에서 24 시간 배양하였다[17]. 생성된 plaque는 형태학적인 특성에 따라 single plaque로 순수 분리하였다.

### 숙주 저해 특성

분리된 황색포도상구균 박테리오파지를 대상으로 하여 총 37 주의 황색포도상구균에 대해 숙주 저해 특성을 확인하였다. LBC broth에서 배양한 37 주의 황색포도상구균을 LBC soft agar에 분주하고 LBC agar에 중층 시킨 후 분리된 박테리오파지 용액을 10 μL씩 분주하는 spot assay를 수행 후 37°C에서 24 시간 배양한 후 plaque 형성 여부를 확인하였다.

### 형태학적 특성

형태학적 특성을 분석하기 위해서 투과 전자현미경을 이용하였다. 분리된 박테리오파지 용액을 2 M NaCl이 첨가된 20% 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 8000 (Sigma)를 이용하여 약 10 log PFU/mL수준으로 농축하여 사용하였다. 농축된 박테리오파지 용액을 25000 g, 1 시간 동안 원심분리하여 상등액을 제거하는 방법으로 한번 더 농축하였다. 농축된 박테리오파지 용액을 sodium chloride magnesium sulfate buffer (SM buffer, 10 mM $MgSO_4$, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 이용하여 수세과정을 2회반복하였다. 박테리오파지 용액을 carbon coating 된 copper grid (200 mesh, Ted Pella, Redding, USA)에 2분간 부착시키고 멸균된 distilled water로 washing 한 후 수분을 제거하였다. 그 후 동량의 2% uranyl acetate로 30 초간 staining하고 distilled water로 washing하여 실온에서 건조했다. Negative stain을 수행한 후 투과 전자 현미경 (H-7600, HITACHI, Tokyo, Japan)을 통하여 80 kV의 전압에서 30,000 배율로 관찰하였다[18].

### 황색포도상구균 박테리오파지에 대한 물리적 처리

분리된 황색포도상구균 박테리오파지를 열처리하여 물리적 처리에 의한 박테리오파지의 저감화를 평가하였다[19]. 열처리에 의한 감소 정도를 알아보기 위해 heat block (fine PCR, ALB64)를 사용하였으며, 1.5 mL micro tube에 파지 용액을 100 μL씩 담아 55 와 60°C에 각각 노출시키고 30 분 동안 5 분 간격으로 꺼내어 LBC agar에 spot assay를 수행하였다.

### 황색포도상구균 박테리오파지에 대한 화학적 처리

분리한 황색포도상구균 박테리오파지를 다양한 pH, 에

탄올, 차아염소산나트륨과 ferrous ammonium sulfate (FAS, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$)에 노출시켜 화학적 처리에 의한 박테리오파지의 감소 효과를 확인하였다. 다양한 pH에 의한 감소 정도를 알아보기 위해 염산과 수산화나트륨을 이용하여 SM buffer를 pH 4, pH 7, pH 10에 맞추어 사용하였다. 박테리오파지 용액에 의한 pH의 변화를 최소화하기 위해 각각의 pH의 SM buffer 990 μL와 황색포도상구균 박테리오파지 10 μL를 혼합하였다. 그리고 실온에 30분, 1 시간 방치한 후 LBC agar에 double layer agar법을 통한 plaque assay를 수행하였다. 유기용매인 에탄올에 의한 박테리오파지 감소 정도를 확인하기 위해 99.9% 에탄올 (GeorgiaChem, GA, USA)을 30, 50, 70%로 각각 희석한 후, 박테리오파지 용액으로 인해 에탄올의 농도가 변하지 않도록 각 농도의 에탄올 990 μL와 박테리오파지 용액 10 μL을 혼합하여 상온에서 30 분, 1 시간 동안 방치한 후 LBC agar에 spot assay 법을 수행하였다. 그리고, 차아염소산나트륨 처리의 경우는 박테리오파지 용액을 1.5 mL micro tube에 100 μL씩 담고 여기에 차아염소산나트륨을 첨가하여 최종 농도 (V/V)가 50, 100 ppm을 제조 후, 각 농도별로 10, 20, 30 분, 1 시간을 상온에서 방치한 뒤 LBC agar에 double overlay agar 법을 통한 plaque assay 법을 수행하였다[20]. 또한, FAS 처리는 박테리오파지 용액을 20%로 제조한 FAS 와 1:1 비율로 처리하여 최종 농도 (V/V)가 10% 가 되도록 하였다. 그리고 상온에서 10 분, 30 분을 처리한 후 LBC agar에 double overlay agar 법을 통한 plaque assay 법을 수행하였다.

### 통계 분석

모든 실험은 3 반복으로 측정하여 측정치를 평균값±표준편차로 나타내었으며 실험 결과의 통계적 유의성은 student's t-test로 하였으며, $P$ 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

## Results and Discussion

### 황색포도상구균 박테리오파지 분리와 특성

토양 시료로부터 황색포도상구균을 숙주로 하는 박테리오파지를 총 11 주를 분리하였다(Table 1). 분리된 박테리오파지는 SAP로 명명하였고 같은 시료로부터 여러 가지 host strain을 사용하여 분리하더라도 plaque 형태가 다른 것을 선별하여 순수 분리하였다. 분리된 박테리오파지를 이용하여 총 37 주의 황색포도상구균을 대상으로 숙주 저해 특성을 분석한 결과, 분리된 박테리오파지 중 SAP 84와 SAP 89가 다른 박테리오파지에 비해 넓은 숙주 저해 범위를 나타냈다. SAP 84의 경우 총 37 주의 황색포도상구균 중 34 균주, SAP 89는 28 개의 균주를 저해하였다 (Table 2). 또한, 형태학적 특성은 SAP 84는 *Siphoviridae*, SAP 89는 *Myoviridae* 인 것으로 확인 되었다[21] (Fig. 1). 지금까지 알려진 황색포도상구균 박테리오파지는 주로 *Siphoviridae*에 속하고 *Podoviridae* 와 *Myoviridae* 형태는 소수로 존재한다고 알려져 있다. 또한 황색포도상구균 박테리오파지는 *Mycobacterium*이나 *Pseudomonas aeruginosa*를 용균시키는 박테리오파지와는 달리 게놈 크기를 기준으로 3 가지로 분류할 수 있으며 (class I: <20 kb; class II: ≈ 40 kb, class III: >125 kb) 각각의 게놈 크기는 형태학적 분리와 관련되어 있다고 한다. *Podoviridae*는 가장 작은 크기인 class I과 관련되어 있고, *Siphoviridae*는 중간 크기인 class II, *Myoviridae*는 가장 큰 크기인 class III와 관련되어 있다고 보고되어 있다[22].

### 물리적 처리에 따른 저감화 효과

토양으로부터 분리된 신규의 황색포도상구균 박테리오파지인 SAP 84 와 SAP 89의 열처리에 따른 감소 정도를 확인하기 위해 55 와 60°C에 노출시킨 결과는 Fig. 2와 같다. SAP 84의 경우 55°C에서는 30 분간 8 log PFU/mL에서 약 2 log PFU/mL 정도가 감소한 6 log PFU/mL가 생존하였고 60°C의 경우 8 log PFU/mL에서 초반 5 분 동안 약 3 log PFU/mL이 감소하고 이후에 꾸준히 약 1 log PFU/mL씩 감소하여 30 분 후에는 약 6 log 정도가 감소한 2 log PFU/mL이 생존하였다. SAP 89의 경우, SAP 84와 달리 55°C에서 5 분 동안 약 7 log PFU/mL에서 약 4 log PFU/mL이 대폭 감소하였고 이후로 큰 차이 없이 꾸

**Table 1.** Host strain of Staphylococcal phages from soil samples

| Host strain | Name |
|---|---|
| *S. aureus* KCTC 1621 | SAP 84, SAP 86, SAP 87, SAP 88 |
| *S. aureus* KCCM 12103 | SAP 83, SAP 85 |
| *S. aureus* ATCC 13565 | SAP 82 |
| *S. aureus* ATCC 19095 | - |
| *S. aureus* ATCC 23235 | - |
| *S. aureus* RN 4220 | SAP 89, SAP 90, SAP 91, SAP 92 |

**Table 2.** Host spectrum of SAP 84 and SAP 89 isolated from *Staphylococcus aureus*

| Bacteriophage | *S. aureus* type | *S. aureus* isolated from food | Total |
|---|---|---|---|
| SAP 84 | 8[1]/9[2] | 26/28 | 34/37 |
| SAP 89 | 6/9 | 22/28 | 28/37 |

1) Number of infected strains, 2) Number of tested strains

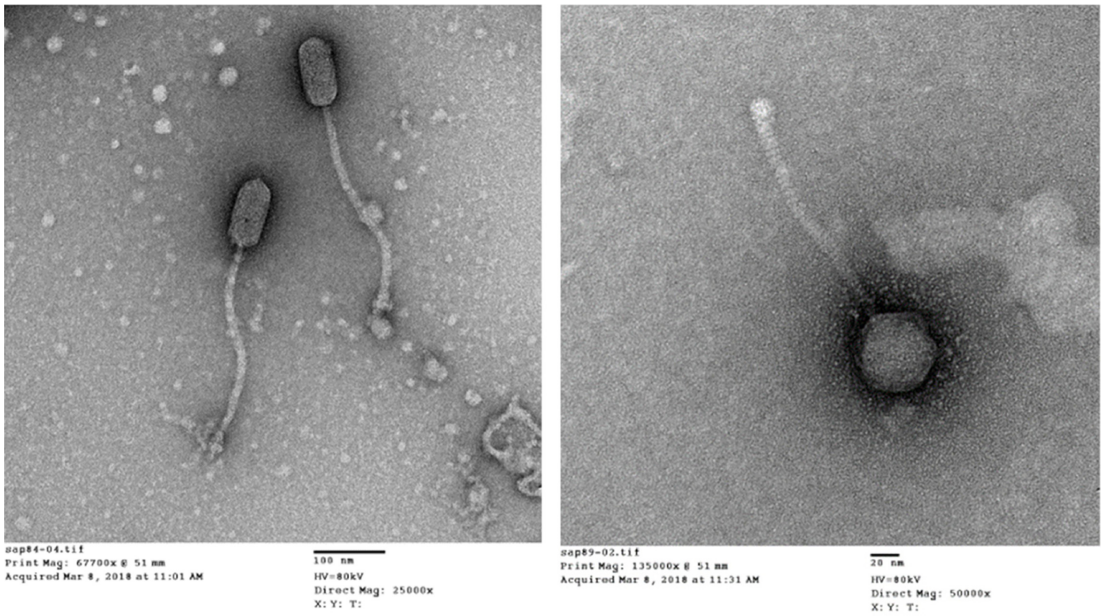


**Fig. 1.** Morphology of (A) SAP 84 and (B) SAP 89.

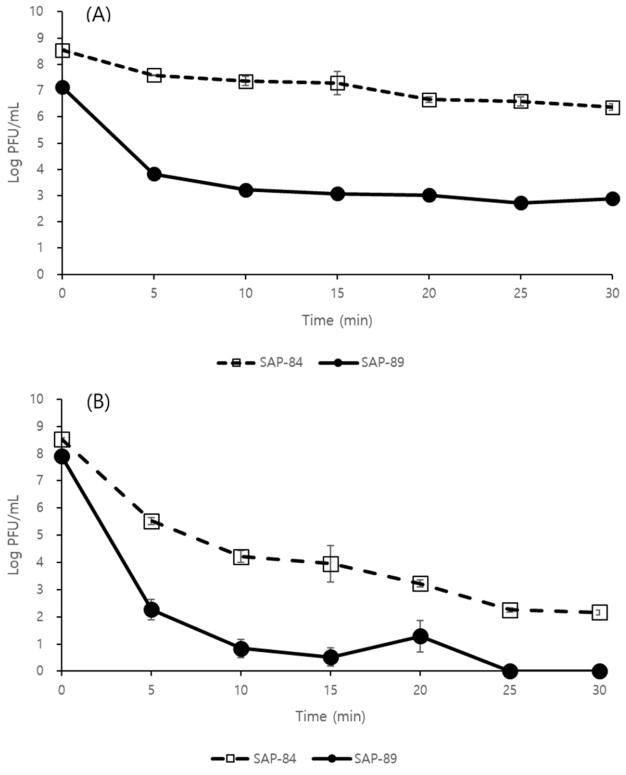


**Fig. 2.** Reduction of SAP 84 and SAP 89 at (A) 55°C and (B) 60°C. Each point is the mean of three different replicate experiments. The error bars indicate standard error of the mean. Some error bars are too small to be visible.

준히 감소하여 최종적으로 2 log PFU/mL이 생존하였다. 또한, 60°C의 경우 초기 약 7 log PFU/mL에서 5 분 동안 55°C일 때 보다 더 큰 폭인 약 5.5 log PFU/mL이 감소하였고 25 분에 완전히 사멸한 것을 볼 수 있다. 이를 통해 SAP 89의 경우 55 와 60°C의 열처리를 통해서 제어할 수 있음을 확인했다. SAP 84와 유사하게 *Siphoviridae*에 속하는 황색포도상구균 박테리오파지에 대해 열처리에 따른 제어 효과에 대한 연구에서는 SAP 84와 유사하게 50°C에서 거의 감소하지 않다가 60°C에서 시간이 지날수록 점차 감소하는 것으로 보고되어 있다[23]. 그리고, SAP 89와 유사하게 *Myoviridae*에 속하는 황색포도상구균 박테리오파지의 경우, SAP 89와 유사하게 60°C에서 짧은 시간에 급격하게 감소하는 것으로 나타났다[24]. 또한, *E. coli* O157:H7을 감염시키는 *Myoviridae*에 속하는 3 주의 coliphage와 *Siphoviridae*에 속하는 3 주의 coliphage에 열처리 후 박테리오파지 불활성화 정도를 확인한 연구에서는 6 주의 박테리오파지는 60°C에서 본 연구에 확인된 황색포도상구균 박테리오파지와 달리 매우 안정적이었다. *Siphoviridae* 인 3 주의 coliphage 중 2 주는 70°C에 10 분 노출시켰을 때 약 6 ~ 7 log PFU/mL이 감소하였으며, *Myoviridae* 인 3 주 coli phage 중 2 주는 동일 조건에서 초기에 약 8 log PFU/mL의 박테리오파지가 완전히 불활성화 된 것을 보여주었다[25]. 따라서, 본 연구에서 확인된 *Myoviridae*에 속하는 SAP 89가 *Siphoviridae*에 속하는 SAP 84보다 열처리에 취약하다는 부분과 유사한 결과로 판단된다.

### 화학적 처리에 따른 저감화 효과

SAP 84와 SAP 89의 다양한 pH 처리 시 감소 정도를 확인하기 위해 pH 4, pH 7, pH 10에 30 분, 1 시간 동안 노출시킨 결과 Fig. 3과 같다. SAP 84의 경우 pH 4, pH 7,

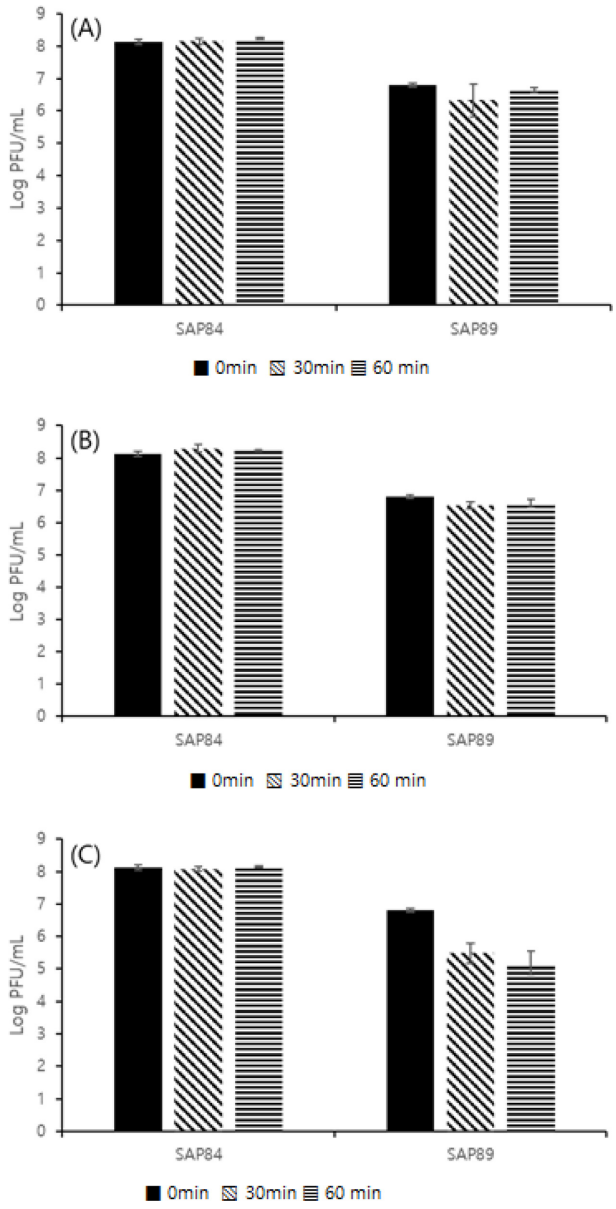


**Fig. 3.** Reduction of SAP 84 and SAP 89 under various pH conditions for 30 min and 1 h. (a) pH 4, (B) pH 7, (C) pH 10. Each point is the mean of three different replicate experiments. The error bars indicate standard error of the mean. Some error bars are too small to be visible.

pH 10에서 반응시켰을 때 오차 범위 약 0.1 log PFU/mL로 감소 정도가 거의 보이지 않았다. 따라서 SAP 84의 경우 산성에서부터 염기성 환경에서까지 모두 안정적인 것을 확인했고 pH에 의한 영향을 받지 않았다. 또한, SAP 89의 경우 pH 4와 pH 7에서는 1시간 동안 초기 6.8 log PFU/mL에서 약 0.2 ~ 0.5 log PFU/mL이 감소하여서 비교적 안정적으로 유지되었다. pH 10에서는 30 분 동안 약 1.5 log PFU/mL이 감소하였고 이후 30 분 동안은 약 0.3 log PFU/mL 정도의 감소를 보였다. 이로써 SAP 89는 산성에서 중성 환경까지는 안정적이고 염기성 환경에서는 비교적 불안정한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 젖소 분변에서 분리되었던 황색포도상구균 박테리오파지를 pH 2 ~ 10에 노출시켰을 때, 본 연구의 SAP 84와 유사하게 pH 3 ~ 12에서 안정적인 것으로 보고하였다[26]. 다른 보고에서는 황색포도상구균 박테리오파지는 37°C에서 3 시간 동안 pH 2 ~ 10에 노출시킨 결과, 본 연구의 SAP 84와 유사하게 pH 4 ~ 9에서는 안정적이었지만 pH 4 이하, pH 10 이상에서는 생존율이 최대 약 30%인 것으로 측정되었다[27]. 그리고, pH 10.5에서 생장하는 호염기성인 *Bacillus* 를 숙주로 하는 박테리오파지의 경우 pH 3 ~ 13에 40 분간 노출시킨 결과, 황색포도상구균 박테리오파지와는 달리 pH 9 ~ 12에서는 비교적 안정적이고 pH 8 이하에서는 최초 농도 약 8 log PFU/mL에서 최대 약 4 log PFU/mL로 감소하는 것으로 보고되었다. 또한 숙주균이 생장 가능한 pH 10에서는 가장 안정적인 것으로 확인하였다[28]. 또한, 해양에서 생존하는 *Vibrio alginolyticus*를 숙주로 하는 박테리오파지를 30°C에서 1 시간 동안 pH 2 ~ 11에 노출시켰을 경우, pH 5 이하와 pH 9 이상에서는 급격하게 불활성화 되는 것으로 나타났다[29].

에탄올 농도에 따른 SAP 84와 SAP 89의 저감 정도를 확인하기 위하여 30, 50, 70% 농도의 에탄올에 박테리오파지 용액을 노출시켜 30 분, 1 시간 동안 반응시켰다. 그 결과는 Fig. 4와 같다. SAP 84는 30% 에탄올에 노출되었을 때 1 시간 동안 약 2 log PFU/mL의 감소 정도를 보이며 비교적 불안정함을 보였다. 또한 50% 에탄올에서는 30 분 동안 초기 농도 약 7 log PFU/mL에서 약 3 log PFU/mL이 감소하였고 1 시간 반응 후의 박테리오파지 농도는 약 3 log PFU/mL로 50% 에탄올에 의해 총 약 4 log PFU/mL이 감소하였다. 70% 에탄올에서는 30 분 동안 약 4 log PFU/mL정도가 감소하였고 1 시간 반응 후에는 약 0.5 log PFU/mL이 감소하였다. SAP 89는 30% 에탄올에 노출되었을 때 1 시간 동안 약 0.4 log PFU/mL의 감소 정도를 보였으며, 50% 에탄올과 70% 에탄올에서는 1 시간 동안 약 1.4 ~ 1.8 log PFU/mL의 감소 정도를 보였다. SAP 84 와 비교하였을 때 SAP 89는 에탄올의 농도에 의해서 크게 영향을 받지 않았으며, SAP 84 와 SAP 89 모두 에탄올의 농도가 높아질수록 점점 불안정해진다는 것으로 나타났다. 특히 SAP 84는 70% 에탄올에서 약 4 log PFU/mL의 큰 감소를 보였으며 SAP 89 보다 에탄올에서 불안정한 것으로 확인되었다. 황색포도상구균 박테리오파지와 같이 그람양성균인 *Lactobacillus. delbrueckii, L. Helveticus,* of *L. casei* and *L. paracasei, Lactococcus lactics*와 *Streptococcus thermophilus*을 각각 감염시키는 박테리오파지를 다양한 농도의 에탄올에서 노출시킨 연구 결과의 경우, *L. delbrueckii* 박테리오파지와 *L. lactics*의 경우, 대부분 50% 이하의 에탄올에서는 99% 가 불활성화되는데 45 분 이상의 시간이

소요되었고 75%에서는 대부분 10 분 이하의 시간이 소요되었다. 그리고, 100%의 에탄올에서는 최대 25 분, 최소 1 분이 걸리는 것으로 확인되었다[30-32]. 또한, *L. helveticus* 박테리오파지의 경우, 10%의 에탄올에서는 대부분 45 분 이상의 시간이 소요되었고 50%의 에탄올에서는 10 분 이내, 75%의 에탄올에서는 모두 2 분 이내에 99% 불활성화되었다[33]. *L. casei* and *L. paracasei* 박테리오파지 2 종의 경우 50% 이하의 에탄올에서는 99%가 불활성화되는데 45 분 이상의 시간이 소요되었고 75% 이상의 에탄올 농도에서는 10 분 이내로 99%가 불활성화 되는 것으로 나타났다[34]. *S. thermophilus* 박테리오파지 5 종의 경우, 10%의 에탄올에서는 매우 안정적이었으며, 75%의 에탄올에서는 6 주 중 4 주가 30 분 이내에 모두 불활성화되었다[35]. 유산균 이외에도 다른 그람양성균인 *B. cereus*를 감염시키는 박테리오파지 4 주를 다양한 에탄올 농도에 노출시킨 연구 결과, 20%의 에탄올에서는 최대 약 2 log PFU/mL이 감소하였지만 비교적 안정적이었다. 35%의 에탄올에서는 2 종이 에탄올에 노출되자 마자 모두 불활성화가 되었고 1 주는 노출된 후 10 분 안에 불활성화 되었으며, 50%의 에탄올에서는 35%에서 불활성화 되지 않은 박테리오파지가 20분 안에 불활성화 되었음을 확인하였다[36].

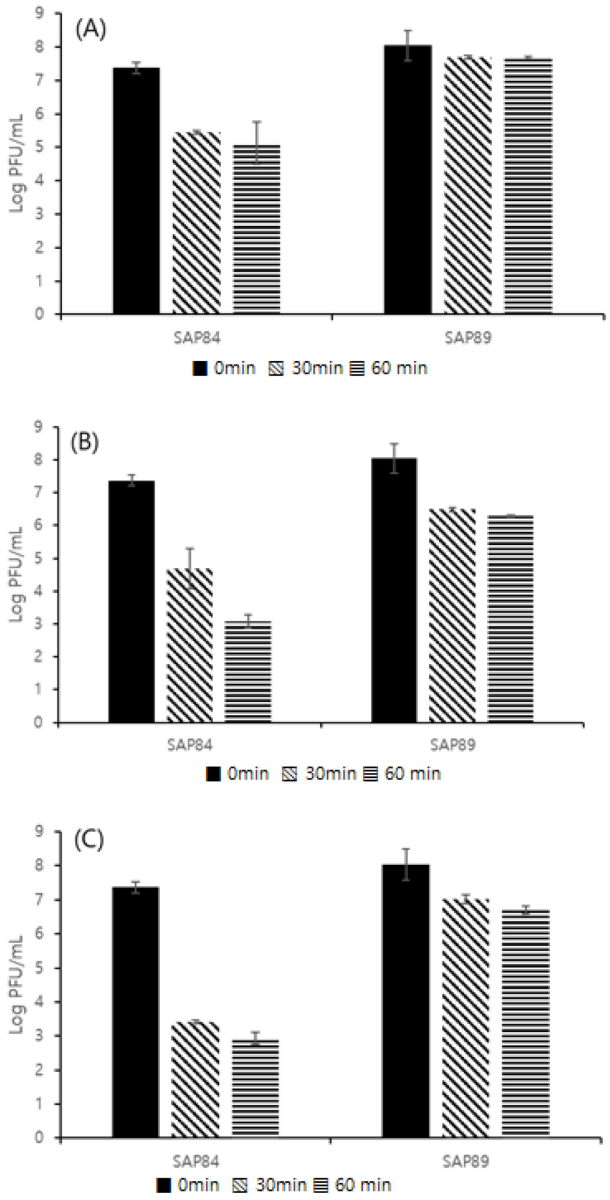


**Fig. 4.** Reduction of SAP 84 and SAP 89 under (A) 30%, (B) 50%, (C) 70% ethanol for 30 min and 1 h. Each point is the mean of three different replicate experiments. The error bars indicate standard error of the mean. Some error bars are too small to be visible.

차아염소산나트륨(NaClO)는 살균제로 흔히 사용되며 살균력은 100 ppm 농도로 희석하고 pH 8 ~ 9 로 조정한 것이 가장 살균력이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 차아염소산나트륨으로 선별된 박테리오파지를 처리했을 때 감소하는 정도를 확인하기 위해서 50 ppm, 100 ppm으로 농도를 맞춰준 차아염소산나트륨에 SAP 84 와 SAP 89를 10 분, 20 분, 30 분, 1 시간 동안 노출시켜 제어 효과를 확인하였다(Fig. 5). SAP 84의 경우는 50 ppm에서 초기

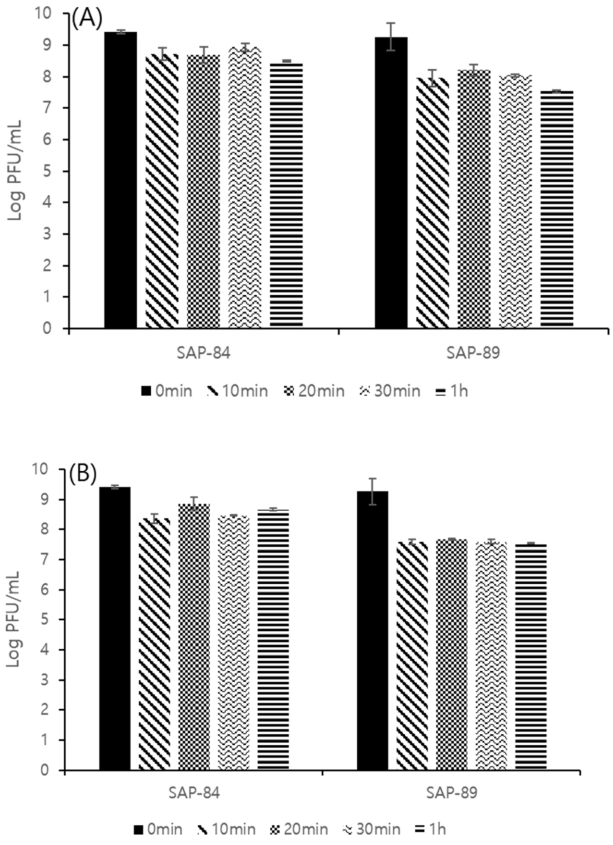


**Fig. 5.** Reduction of SAP 84 and SAP 89 to various concentrations of NaClO. (A) 50 ppm of NaClO, (B) 100 ppm of NaClO. Each point is the mean of three different replicate experiments. The error bars indicate standard error of the mean. Some error bars are too small to be visible.

**Table 3.** Viability loss of bacteriophage isolates by 10% ferrous ammonium sulfate

| host | *S. aureus* phage | Bacteriophage (log PFU/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Inoculation titer | 10% Ferrous ammonium sulfate | | |
| | | | 0 min | 10 min | 30 min |
| *S. aureus* KCTC 1621 | SAP 84 | 7.75 | - | - | - |
| *S. aureus* RN 4220 | SAP 89 | 8.18 | - | - | - |

농도 약 9 log PFU/mL에서 1 시간 동안 약 1 log PFU/mL 정도가 감소하였다. 100 ppm에서도 50 ppm 과 유사하게 1 시간 동안 약 1 log PFU/mL 정도가 감소하였다. SAP 89의 결과를 살펴보면, 50 ppm과 100 ppm 모두 초기 약 9 log PFU/mL에서 1 시간 노출 후 약 2 log PFU/mL이 감소하였다. FCV, IFV 등 다양한 바이러스를 대상으로 1 ~ 1000 ppm의 차아염소산나트륨을 3 분 이상 처리를 하였을 때 대부분 100 ppm의 농도에서 약 1 log PFU/mL 이하만 생존하고 대부분 활성을 잃었다고 보고되었다[37]. 따라서, SAP 84는 다양한 바이러스를 제거하고 살균력이 좋다고 알려진 차아염소산나트륨 100 ppm에서 상당히 안정적인 상태를 유지하는 것을 확인하였으며, SAP 89는 50 ppm 및 100 ppm의 차아염소산나트륨에 의해서 SAP 84보다 2 배의 감소도를 나타내었기 때문에 SAP 84 보다 차아염소산나트륨으로 제어가 가능한 것으로 판단된다. 본 연구와 유사하게 차아염소산나트륨에 의한 불활성화 효과를 평가한 연구가 보고되고 있다. *Lactobacillus plantarum*을 감염시키는 박테리오파지에 대해 200 ppm의 차아염소산나트륨에서는 45 분 이상 되어야 99% 가 활성을 잃었고, 400 ppm과 800 ppm 일 때는 각각 최대 5 분과 최대 2 분의 시간이 지나야 99% 가 활성을 잃는 것으로 보고하였다[38]. 또한, *Leuconostoc mesenteroides*의 박테리오파지를 200 ppm ~ 1600 ppm의 차아염소산나트륨에 노출시킨 후 99% 불활성화 연구 결과, 200 ppm과 300 ppm에서는 6 주의 박테리오파지가 99% 불활성화되는데 45 분 이상의 시간이 소요되는 것으로 나타났다. 400 ppm의 농도에서는 최소 3 분의 시간이 소요되었고 600 ppm 과 800 ppm에서는 최소 2 분 이하의 시간이 소요되었으며, 1400 ppm 이상에서는 대부분 노출되자마자 비활성화된다는 것으로 확인되었다[39]. 그리고, 시가독소를 생성하는 *Escherichia coli*에 대한 박테리오파지에 대한 연구에서는 본 연구 결과와 유사하게 50 ppm의 차아염소산나트륨에서는 2 주의 박테리오파지 모두 거의 감소하지 않았을 정도로 안정적이었나, 100 ppm의 차아염소산나트륨에서는 시간이 지날수록 점차 불활성화되었고 30 분 후에는 약 3 ~ 4 log PFU/mL가 감소하였다고 보고하였다[40].

Virucidal agent[41]로 알려진 ferrous ammonium sulfate (FAS)에 의해서 박테리오파지를 제거할 수 있을지 알아보기 위해서 20% 로 제조하여 박테리오파지와 1:1 비율로 처리하여 최종 10% FAS에 대해서 0 분, 10 분, 30 분간 처리하였다(Table 3). SAP 84의 경우는 초기 약 7 log PFU/mL에서, SAP 89는 초기 약 8 log PFU/mL에서 10% FAS 처리 직후부터 plaque를 관찰하지 못하였으며, 10% FAS에 대해서 수용액 상태에서 만난 박테리오파지는 모두 제거되는 것으로 보였다. 다른 유사한 연구에서는 FAS의 농도가 2 mM일 때 최대 약 7 log PFU/mL의 mycobacteriophage를 완벽히 불활성화 시키고 5 mM일 때는 최대 약 8 log PFU/mL의 mycobacteriophage를 완전히 불활성화 시킨다는 결과를 얻었다. 또한 FAS를 박테리오파지를 반응시키면 30 초 이내로 박테리오파지가 불활성화된다는 연구 결과가 있다[42]. 그리고, ferrous sulfate 처리에 따른 박테리오파지를 제어하는 연구 결과에서는 단독으로 37°C에서 15 분 처리하였을 때 황색포도상구균 박테리오파지와 살모넬라 박테리오파지는 완전히 불활성화되었고 *Pesudomonas* 박테리오파지는 약 1 ~ 2 log PFU/mL로 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 석류피 추출물과 함께 처리한 경우에는 황색포도상구균 박테리오파지, 살모넬라 박테리오파지와 *Pesudonomas* 박테리오파지 모두 약 11 log PFU/mL 완전히 불활성화되는 것을 확인하였다[43]. 그러므로, FAS 용액은 virucidal agent로써 박테리오파지를 완전히 불활성화시키거나 박테리오파지의 농도를 감소시킬 수 있는 화학적 처리 수단으로 처리 효과가 우수한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구에서 황색포도상구균 박테리오파지인 SAP 84와 SAP89에 대한 숙주 저해 범위와 형태학적 특성을 통해 새롭게 분리하였다. 그리고, 물리적 및 화학적 방법인 열처리, pH 처리, 에탄올 처리, 차아염소산나트륨 처리 와 FAS 처리를 통해서 황색포도상구균 박테리오파지의 저감화 효과를 확인하였다. 그 결과, SAP 84와 SAP 89 모두 화학적 처리 방법인 FAS 처리를 통해서 제어 가능함을 보여주었다. 이외에도 SAP 84는 물리적 방법인 열처리의 저감화 효과가 좋았으며 SAP 89는 화학적 방법인 에탄올 처리의 저감화 효과가 비교적 좋았다. 이를 통해서 물리적 및 화학적 방법을 통한 황색포도상구균 박테리오파지의 효과를 통해 제어 가능성을 확인하였다. 또한 본 연구를 통해서 단일 처리시 저감화 효과가 좋은 경우도 있지만 비교적 저감화 정도가 작은 경우도 살펴볼 수 있다. 이를 통해, 단일 처리 보다는 물리적 및 화학적 방법의 복합 처리가 황색포도상구균 박테리오파지를 제어하는데 더 효과적일 가능성이 있다고 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 2018년도 농림식품기술기획평가원의 연구개발비 지원(117060-3)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 국문요약

본 연구는 황색포도상구균 박테리오파지를 물리화학적 방법을 통해서 제어하기 위해 황색포도상구균을 대상으로 하는 SAP 84 와 SAP 89를 신규 분리하였다. 그리고, 황색포도상구균 박테리오파지에 대해 물리적 방법으로 55°C 및 60°C 열처리와 pH 4, pH 7, pH 10 처리하였다. 그 결과 SAP 84는 60°C에서 급격히 감소하였고 SAP 89는 60°C에서 25 분 만에 모두 활성을 잃었다. SAP 84는 pH 4 ~ 10에서 매우 안정적이었고 SAP 89는 pH 10 이상에서 비교적 불안정해지는 것을 보였다. 화학적 방법으로는 에탄올과 차아염소산나트륨 및 FAS 처리를 하였다. SAP 84가 50%, 70% 에탄올에서 급격히 감소하였다. 살균력이 좋은 100 ppm의 차아염소산 나트륨에서도 SAP 84와 SAP 89는 상당히 안정적인 상태를 유지하고 있다. Virucidal agent로 사용되는 FAS를 10% 농도로 처리하였을 때 SAP 84와 SAP 89 모두 처리 직후부터 제거되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 SAP 84와 SAP 89 모두 화학적 처리 방법인 FAS 처리를 통해서 제어 가능함을 보여주었다. 이외에도 SAP 84는 물리적 방법인 열처리의 저감화 효과가 좋았으며 SAP 89는 화학적 방법인 에탄올 처리의 저감화 효과가 비교적 좋았다. 이렇듯 물리화학적 처리방법으로 황색포도상구균 박테리오파지를 제어 가능할 것으로 사료된다.

## References

1. Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L., Dragacci, S.: *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.,* **36,** 815-836 (2012).
2. McGuinness, W.A., Malachowa, N., DeLeo, F.R.: Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J. Biol. Med.,* **90,** 269-281 (2017)
3. Franklin, D.L.: Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *J. Clin Invest*. **111**, 1265-1273 (2003)
4. Appelbaum, P.C.: The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, **12,** 16-23 (2006).
5. Wielders, C.L.C.: Evidence for in-vivo transfer of mecA DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.,* **357,** 1674-1675 (2001).
6. Kaźmierczak, Z., Górski, A., Dabrowska, K.: Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. *Viruses*, **6,** 2551-2570 (2014).
7. Sulakvelidze, A., Alavidize, Z., Morris, J.G.: JR. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 649-659 (2001).
8. Sillankorva, S.M., Oliveira, H., Azeredo, J.: Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.*, **2012,** (2012).
9. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S.: Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, **11,** 211-219 (2005).
10. Liu, H., Niu, Y.D., Li, J., Stanford, K., McAllister, T.A.: Rapid and accurate detection of bacteriophage activity against *Escherichia coli* O157:H7 by propidium monoazide real-time PCR. *Biomed Res. Int.*, **2014** (2014).
11. Liu, H., Meng, R., Wang, J., Niu, Y.D., Li, J., Stanford, K., McAllister, T.A.: Inactivation of *Escherichia coli* O157 bacteriophages by using a mixture of ferrous sulfate and tea extract. *J. Food Prot.,* **78,** 2220-2226 (2015).
12. Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P.M., Kropinski, A.M., Balamurugan, S.: Efficacy of bacteriophage LISTEX™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **167,** 208-214 (2013).
13. Müller-Merbach, M., Rauscher, T., Hinrichs, J.: Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int. Dairy J.,* **15,** 777-784 (2005).
14. Jończyk, E., Kłak, M., Miedzybrodzki, R., Górski, A.: The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiol. (Praha).,* **56,** 191-200 (2011).
15. Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C., Moineau, S.: Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.,* **171,** 41-47 (2014).
16. Branston, S.D., Stanley, E.C., Ward, J.M., Keshavarz-Moore, E.: Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **18,** 560-566 (2013).
17. Lee, Y.D., Chun, H., Park, J.H.: Characteristics and growth inhibition of isolated bacteriophages for *Enterococcus faecalis*. *Food Sci. Biotechnol.*, **23,** 1357-1361 (2014).
18. Lee, Y.D. Park, J.H.: Isolation and characterization of temperate phages in *Enterococcus faecium* from sprouts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **46,** 323-327 (2014).
19. Kim, E.J., Chang, H.J., Kwak, S., Park, J.H.: Virulence factors and stability of coliphages specific to *Escherichia coli* O157:H7 and to Various *E. coli* infection. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **26,** 2060-2065 (2016)
20. Park D.S.: Characterization of shiga toxin encoding bacteriophage and expression of non-STEC transferred shiga toxin gen. MS thesis, Gachon University, Sungnam, Korea (2018).
21. Ackermann, H.W.: Frequency of morphological phage

descriptions in the year 2000, Brief Review. *Arch. Virol.*, **146,** 843-857 (2000).
22. Deghorain, M., Van Melderen, L.: The staphylococci phages family: An overview. *Viruses,* **4,** 3316-3335 (2012).
23. Zhang, Q., Xing, S., Sun, Q., Pei, G., Cheng, S., Liu, Y., An, X., Zhang, X., Qu, Y., Tong, Y.: Characterization and complete genome sequence analysis of a novel virulent *Siphoviridae* phage against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Xinjiang, China. *Virus Genes*, **53,** 464-476 (2017).
24. Zhang, L., Bao, H., Wei, C., Zhang, H., Zhou, Y., Wang, R.: Characterization and partial genomic analysis of a lytic *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis in Mid-east of China. *Virus Genes,* **50,** 111-117 (2015).
25. Litt, P. K. & Jaroni, D.: Isolation and physiomorphological characterization of *Escherichia coli* O157:H7-infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations. *Int. J. Microbiol.,* **2017,** (2017).
26. Cui, Z., Feng, T., Gu, F., Li, Q., Dong, K., Zhang, Y., Zhu, Y., Han, L., Qin, J., Guo, X.: Characterization and complete genome of the virulent Myoviridae phage JD007 active against a variety of *Staphylococcus aureus* isolates from different hospitals in Shanghai, China. *Virol. J.*, **14,** 1-8 (2017).
27. Li, L., Zhang, Z.: Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Mol. Biol. Rep.,* **41,** 5829-5838 (2014).
28. Horikoshi, K., Yonezawa, Y.A.: Bacteriophage active on an alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Virol.,* **39,** 183-185 (1978).
29. Sasikala, D. Srinivasan, P.: Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal. *Microb. Pathog.*, **101,** 24-35 (2016).
30. Quiberoni, A., Guglielmotti, D.M., Reinheimer, J.A.: Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *Int. J. Food Microbiol.*, **84,** 51-62 (2003).
31. Ebrecht, A.C., Guglielmotti, D.M., Tremmel, G., Reinheimer, J.A., Suárez, V.B.: Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: Comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiol.,* **27,** 515-520 (2010).
32. Suarez, V.B., Reinheimer, J.A.: Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J. Food Prot.,* **65,** 1756-1759 (2002).
33. Quiberoni, A., Suarez, V.B., Reinheimer, J.A.: Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.,* **62,** 894-898 (1999).
34. Capra, M.L., Quiberoni, A., Reinheimer, J.A.: Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Lett. Appl. Microbiol.,* **38,** 499-504 (2004).
35. BINETTI, A.G., REINHEIMER, J.A.: Thermal and Chemical Inactivation of Indigenous *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages Isolated from Argentinian Dairy Plants. *J. Food Prot.,* **63,** 509-515 (2000).
36. Park, W.J.: Reduce of *Bacillus cereus* in sprouts by using bacteriophage. MS thesis, Kyungwon University, Sungnam, Korea (2012).
37. Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., Morino, H., Lee, C., Maeda, K., Araki, K., Otake, T., Kawahata, T., Shibata, T.: Evalutaion of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza vorus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol of Science*., **15**, 45-49 (2010)
38. Briggiler Marcó, M., De Antoni, G.L., Reinheimer, J.A., Quiberoni, A.: Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *J. Food Prot.,* **72,** 1012-1019 (2009).
39. Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann, H.W., Patrignani, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J.A., Quiberoni, A.: *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: Long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *Int. J. Food Microbiol.*, **177,** 81-88 (2014).
40. Lim G.Y, Park W.J, Lee Y.D, Park J.H.: Isolation and characterization of bacteriophages for the control of Shiga Toxin-producing *E. coli. Food Sci. Technol*., **50,** 594-600 (2018).
41. Oliveira, I. C., Almeida, R. C. C., Hofer, E., Almeida, P. F.: Bacteriophage amplification assay for detection of Listeria spp. using virucidal laser treatment. *Brazilian J. Microbiol.,* **43***, 1128-1136.* (2012).
42. McNerney, R., Wilson, S.M., Sidhu, A.M., Harley, V.S., al Suwaidi, Z., Nye, P.M., Parish, T., Stoker, N.G: Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res. Microbiol.,* **149,** 487-495 (1998).
43. Stewart, G.S., Jassim, S.A., Denyer, S.P., Newby, P., Linley, K., Dhir, VK.: The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.,* **84,** 777-783 (1998).