

박테리오파지 기반의 천연 식품첨가용 항균제 개발

유레카 프로젝트

지도교수명: 장윤지 교수님

팀원명: 강진희, 김미진, 김재영, 박시윤, 임세빈, 최유리



목차

Table of contents

- ▣ 식중독 발생으로 인한 식품 안전 문제 대두
- ▣ 항생제 내성균과 슈퍼박테리아
- ▣ 박테리오파지란 무엇인가?
- ▣ 박테리오파지의 장점

식중독 발생으로 인한 식품 안전 문제 대두

식중독(*foodborne illness*)과 식중독균(*food poisoning bacteria*)

- 식중독

: 식품의 섭취에 관련하여 인체에 **유해한 미생물 또는 유독물질**에 의해 발생한 것으로 판단되는 독소형질환

- 식중독균

: 황색포도상구균, 장염비브리오, 살모넬라, 바실러스 세레우스, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 병원성대장균 O157 등



식중독 발생으로 인한 식품 안전 문제 대두

식중독 사례

리스테리아균 식중독



포도상구균 식중독



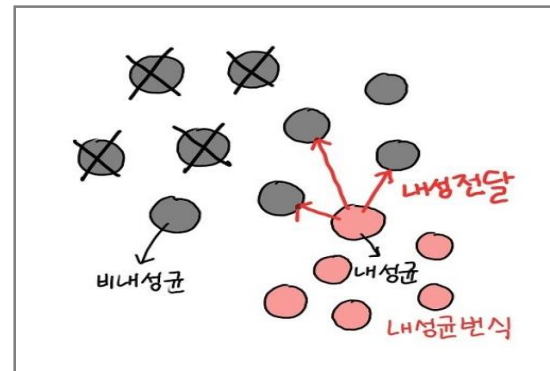
클로스트리디움균 식중독



항생제의 내성균과 슈퍼박테리아

항생제(antibiotics)와 항생제 내성균(antibiotics-resistant)

- 항생제: 세균을 죽이거나 세균의 성장을 억제하는 제재
- 항생제 종류 : 베타락탐계, 페니실린계, 모노박탐계, 카바페넴 등
- 항생제 내성균
: 미생물이 항생제에 노출되어도
항생제에 저항하여 생존할 수 있는 약물 저항성을 가진 세균
(항생제의 공격에 살아남기 위한 세균의 생존 전략)



항생제의 내성균과 슈퍼박테리아

항생제 내성균 발생의 심각성

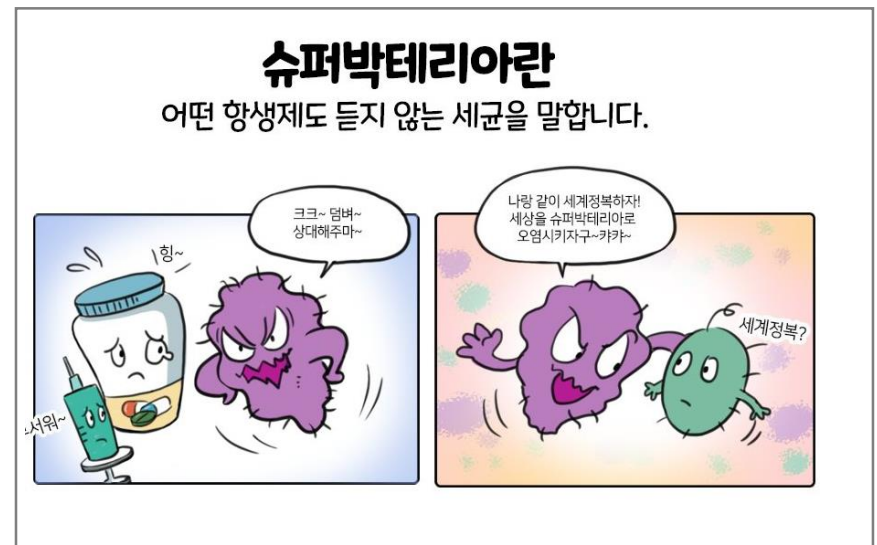
- 전세계적으로 항생제 내성 사망자: **약 연간 70만명**
- 2050년, 암 사망자보다 많은 1,000만명이 항생제 내성으로 사망 예측
(출처: 영국 '2019 항생제 내성균 보고서')



항생제의 내성균과 슈퍼박테리아

슈퍼박테리아(superbacteria)

- 슈퍼박테리아(superbacteria)의 출현 도래
= 다제내성균(multidrug-resistant bacteria)
- 여러 항생제를 써도 **내성이 생겨 살아남은 균주**
- 다양한 공중보건학적 문제를 유발



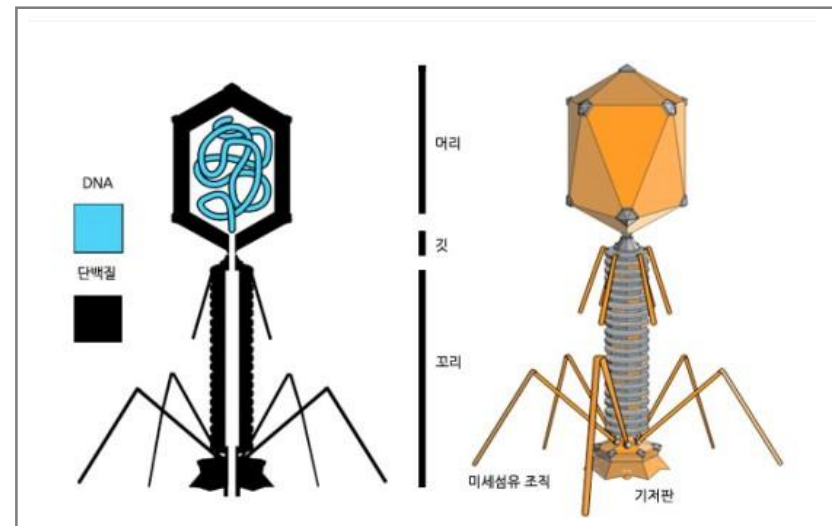
박테리오파지란 무엇인가?

박테리오파지의 정의와 구조

- '세균'을 의미하는 'bacteria' + '먹는다'를 의미하는 'phage'

→ 세균을 먹는(죽이는) 바이러스

- 박테리오파지의 구조
: 머리 + 몸통 + 꼬리



박테리오파지란 무엇인가?

박테리오파지의 활용

식품첨가제



표면살균제



의약품



박테리오파지의 장점

박테리오파지의 장점

- 광범위한 **다양성** (ubiquitous microorganism)
- 세균 **특이성** (high host specificity)
- **저비용** 개발 가능 (low-cost)
- **2차 감염, 내성, 부작용 감소** (low-side effect)

박테리오파지 장점

박테리오파지를 활용한 제품

SalmoFresh™

Salmonella enterica



EcoShield™

Escherichia coli

EcoShield™

- ▶ Natural product that contains three different bacteriophages isolated from the environment
- ▶ The preparation specifically targets a foodborne bacterium called *Escherichia coli* O157:H7
- ▶ Applying EcoShield™ to various ready-to-eat foods significantly reduces (usually by 99-100%) their contamination with this potentially deadly bacterium



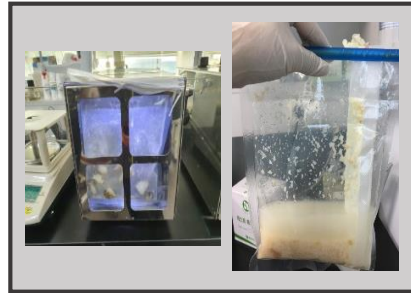
ListShield™

Listeria monocytogenes

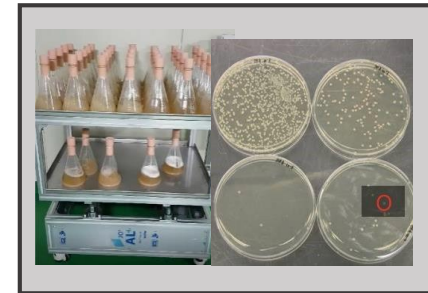




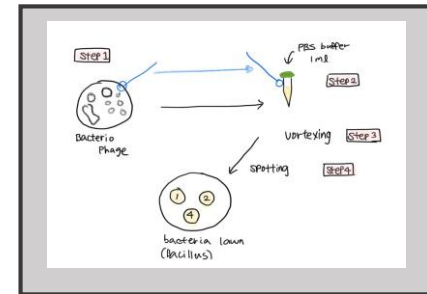
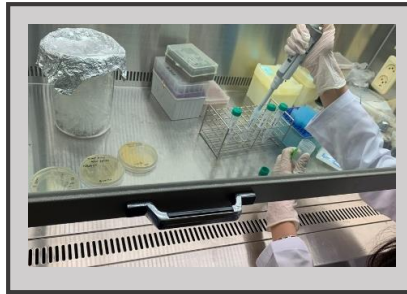
Sampling



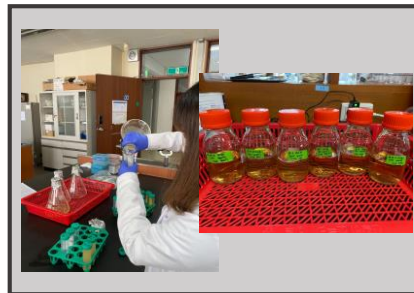
Enrichment



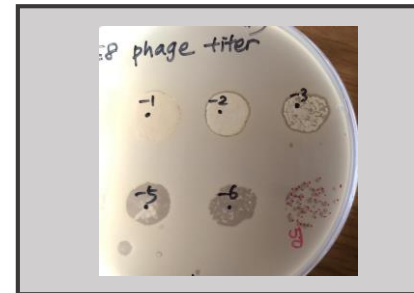
Bacteriophage isolation



Purification



Propagation



Phage stock preparation

실험 기구

인큐베이터



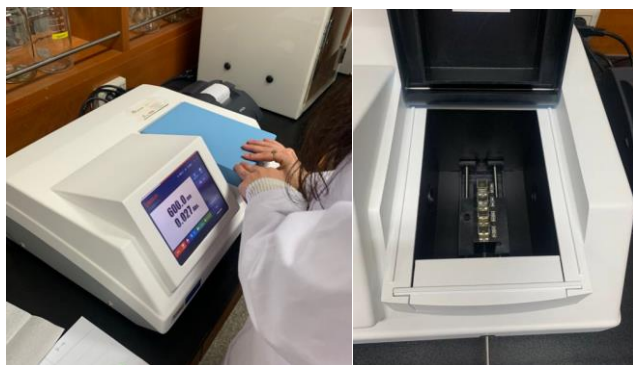
용기 내 일부
온도를 높인 후,
다른 부분과 온도
차이를 이용하여
미생물과 생물을
생육하는 기기

원심분리기



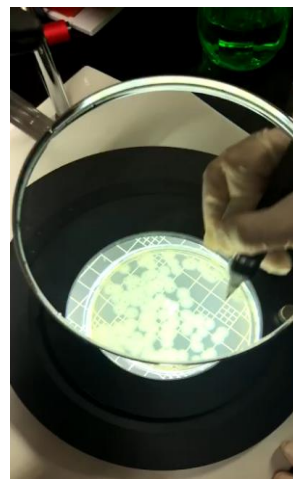
원심력을 이용하여
성분이나 비중이
다른 물질들을
분리·정제·농축하는 기기

흡광도 측정기



흡광도: 시료에 빛을 쏘였을 때 투과율의 음의
상용로그값
흡광도를 측정하는 기기

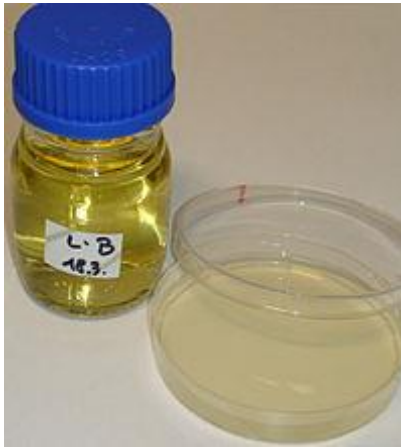
Colony counter



세균이 형성한
콜로니의 개수를
측정하는 기기

실험 시료

- LB배지



박테리아 생장에 주로 사용되는 배지로,
미생물이 성장하는데 필요한
효모추출물, 트립톤, 염화나트륨이
첨가되어 있음
액체배지, 고체배지 모두 제조 가능하며
고체배지로 만들 경우
한천(agar)을 첨가함

- PBS



phosphate buffer saline의 약자로,
생리 식염액만으로는 그 생명을 오래
유지할 수 없는 생물 또는 조직이나
기관의 부유액으로서 이용

실험 과정

<Phage characterization>

:박테리아 생장 억제 능력 확인

1. Bacteria lawn preparation

: LB soft agar 6 ml + 균 100 μ l 혼합 -> overlay

2. 앞서 준비한 plate에 준비한 phage stock B-1, B-2, B-4를 infection

→ 결과: B-4 phage 항균능력이 가장 우수



<phage infection>

실험 과정

<Bacterial growth inhibition test>

1. LB배지 20 ml + *Bacillus cereus*균 200 μ l 혼합 → incubation
2. B-1, B-2, B-4 phage를 ①용액에 M.O.I 1이 되도록 주입
(M.O.I: multiplicity of infection=PFU/CFU)
3. 혼합 용액 1 ml씩을 이용하여 흡광도 측정
4. 혼합 용액을 계속 배양하며 1시간마다 흡광도 재측정



<인큐베이팅>



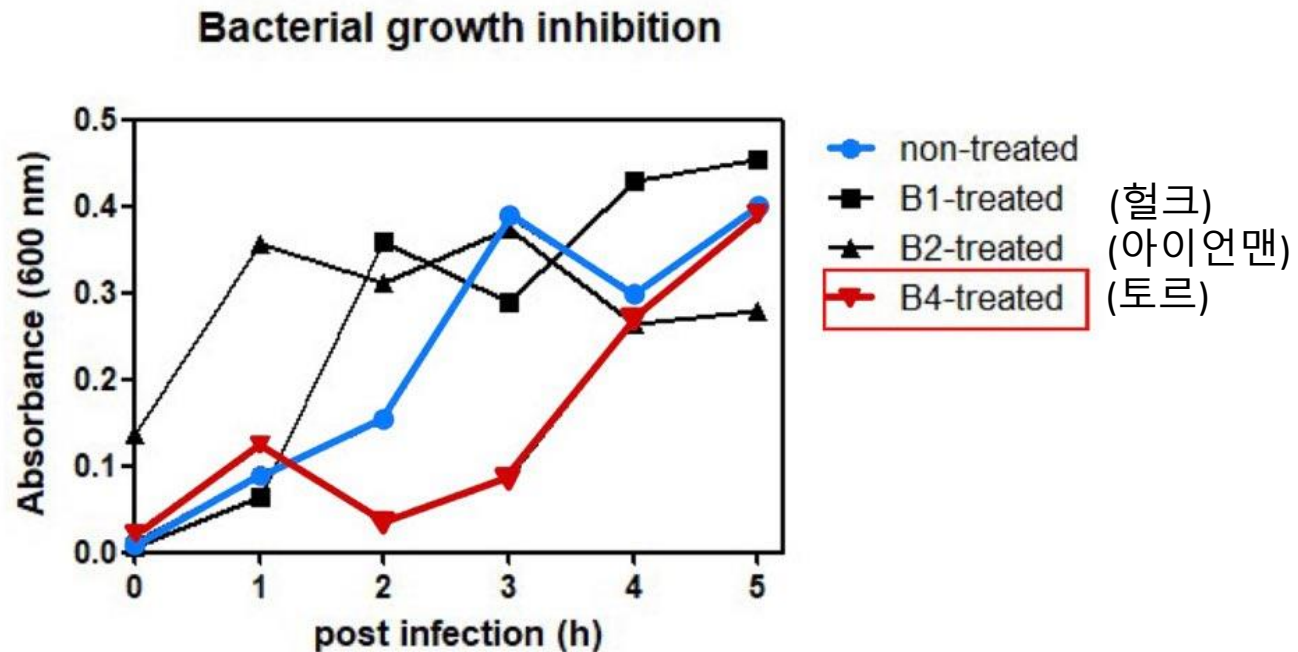
<혼합 용액 1ml 준비>



<흡광도 측정>

실험 결과

<Bacterial growth inhibition test 결과>



→ 결과: B-4 phage 항균능력이 가장 우수

B-4 phage 별칭: 토르(Thor)

→ Food application 실험에 Thor phage 이용

실험 과정 및 결과

<Host range test>

: 세가지 phage의 숙주 생장 저해 범위 확인

1. *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *L. innocua*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. sakazakii* 균주들을 각각 overlay 후 phage B-1, B-2, B-4를 spotting assay -> incubation
2. Phage가 특정 균 생장을 억제하는지 확인

균주	B-1 phage (헬크)	B-2 phage (아이언맨)	B-4 phage (토르)
<i>B. cereus</i>	+	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>C. sakazakii</i>	-	-	-

+: phage plaque O

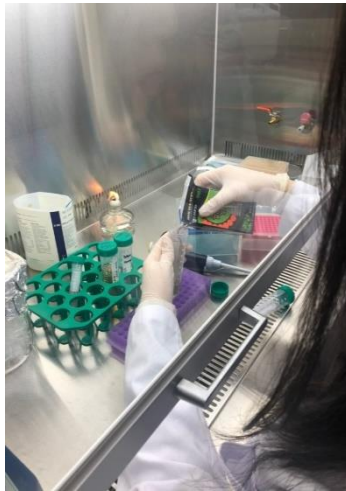
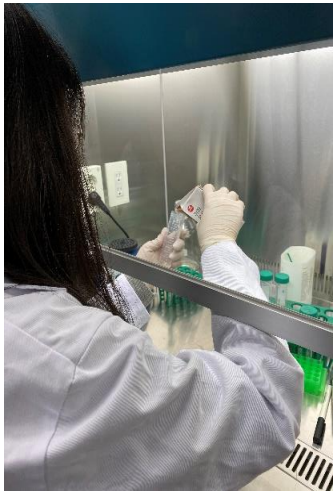
-: phage plaque X

실험 과정

<Food application>

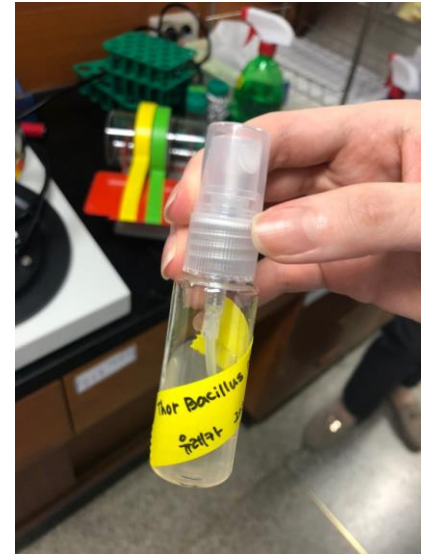
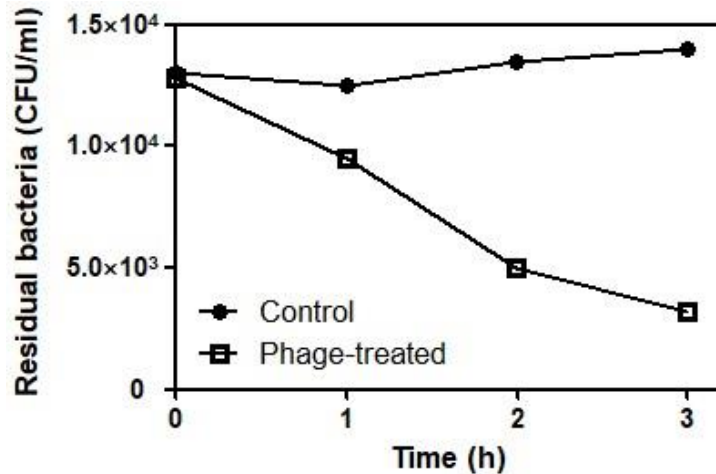
:실제 식품에 phage 용액 처리 후 항균 능력 확인

1. '검은콩 검은참깨 두유' 20 ml 2개에 10^4 CFU/ml씩 균 접종 후, pre-incubation
2. '검은콩 검은참깨 두유' 20 ml 2개 중 1개는 phage (10^4 PFU/ml, 10 ml)주입 (Phage 처리균)
3. 또 다른 '검은콩 검은참깨 두유' 20 ml 1개는 LB배지 동량 주입 (Control균)
4. Phage 처리균과 Control균 원액과 희석액을 배지에 **spreading**



실험 결과

<Food application 결과>



→ 결과: 식품에서 명확한 항균능력을 지님
우유 내에서 phage 처리 3시간 이내
80% 이상의 세균 사멸 확인

<Thor, *Bacillus cereus*-targeting phage
살균제 제조 성공 (spray type)>

→ 일반적으로 식품 내 phage 처리 시 M.O.I 1000이상의 phage를 처리하는데,
본 연구에서는 M.O.I 1 처리만으로 본 효과를 확인하여 상당히 그 효과가
강하였다고 판단되며, 향후 보다 높은 수준의 M.O.I로 phage를 처리한다면
항균 효과가 극대화될 것으로 기대함.

고찰 및 의의

- **실험 주제:** 박테리오파지를 기반으로 한 천연 식품첨가용 항균제 개발

- 고찰

우리가 섭취하는 우유는 주로 살균과정을 거친 무균식품이지만, 실제 젖소에서 나온 우유는 세균에 오염되기 쉬운 식품이다. 우유 살균과정에 박테리오파지를 이용한 항균제의 사용가능성을 확인하였다.

- 의의

실제로 국내의 식품산업에서 가축사료에 박테리오파지를 사용하는 등 박테리오파지의 사용이 증가하고 있는 추세이다. 이러한 박테리오파지에 대해 공부하고 실제로 이의 특성을 활용한 항균제를 실제로 제작해보며 식품에 적용하는 데에 의미가 있었다.



Thank you for listening!