



유산균에서 Bacteriophage의 중요성

이영덕* · 박종현

가천대학교 식품생물공학과

The Importance of Bacteriophages in Lactic Acid Bacteria

Young-Duck Lee* and Jong-Hyun Park

Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

Abstract: Lactic acid bacteria as probiotics contribute to various food and medicine industry. Recently, many groups reported effects of lactic acid bacteria are the results of *in vitro* and clinical experiments. To apply lactic acid bacteria in food and medicine industry, the genome based research might be need for understand physiological and metabolic capabilities of lactic acid bacteria in the future. Also, study of bacteriophages for stable fermentation of lactic acid bacteria have to be performed the bacteriophage molecular characterization, relation of lactic acid bacteria, bacteriophage resistant lactic acid bacteria. Therefore, these studies would provide the various functional aspects of lactic acid bacteria to improve food quality and safety in the food industry.

Keywords: lactic acid bacteria, foods, probiotics, bacteriophages

서 론

유산균은 과거부터 현재까지 오랜 시간 동안 식품 발효에 사용되어 왔으며, 발효 동안 생산되는 다양한 영양 물질, 향기 성분, 항균 물질 등 식품의 품질과 제품 수명에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). 그리고 probiotics로서 사람의 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Leroy and De Vuyst, 2004; Vyas and Ranganathan, 2012). 또한, 최근 다양한 임상 결과를 통해 probiotics와 이것들이 생산하는 bacteriocin 등의 물질들이 다양한 질환들에 대해 예방적 효과와 치료적 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Jeppsson *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2011).

현재 세계적으로 probiotics로 사용이 되고 있는 대표적인 균주로는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*

등의 유산균과 *Bifidobacterium animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* 등이 대표적으로 알려져 있다. 과거에는 이러한 probiotics를 대부분 수입하여 사용하였으며, 이러한 균주들은 서양 사람들에 비해 우리나라 사람에게는 효과가 적거나 없을 수도 있다(Ann, 2011; Mercenier *et al.*, 2003). 최근 국내 다수의 연구 기관, 대기업, 벤처 회사 등에서 발효 제품의 starter 또는 probiotics로 사용될 유산균들을 분리, 특성 분석, genome sequence, 임상 특성 등에 대한 연구가 수행되고 있다(Seo *et al.*, 2010). 또한, 발효 식품 산업과 건강기능식품 산업의 발전과 더불어 probiotics로서의 유산균들에 대해 일반 대중들의 수요가 급속하게 증가되고 있기 때문에 안전하고 우수한 생리 활성능을 갖추고 있는 probiotics의 개발이 또한 요구되고 있다(Gagga *et al.*, 2010; Guarner *et al.*, 2012).

식품 산업에 있어서 유산균을 이용한 발효 제품 생산을 위해 중요한 것은 기본적으로 발효가 효과적으로 진행되어야 하지만 다양한 원인으로 발효가 잘 이루어지지 않을 경우에는 제품의 품질이 저하되고 막대한 경제적 손실이 발생한다(de Vos, 2011; Garneau and Moineau, 2011). 이렇게 발효가 이루어지지 않는 이유는 다양하게 존재하지만, 일반적으로 유산균주 변이, 잡균에 오염, 항균 물질, 이상 풍미, 유청분리, 원유불량, bacteriophage 오염 등이 있다. 특히 bacteriophage의 오염의 경우에는 유산균 starter를 용균시켜서 발효가 이루어지지 않게 되는데, 이러한

*Corresponding author: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea.

Tel: 82-31-750-5500, Fax: 82-31-750-5501

E-mail: biophage@gachon.ac.kr

Received October 16, 2012; Revised November 29, 2012;

Accepted December 7, 2012

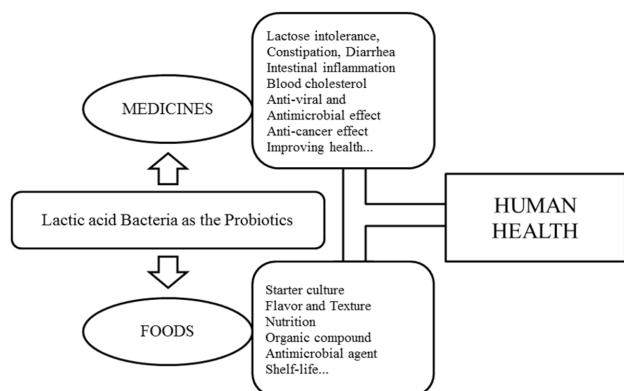


Fig. 1. Overview of the application of lactic acid bacteria in medicines and foods.

bacteriophage는 원유, 토양, 물, 작업장 등 다양한 환경에 오염되어 있어 제어가 매우 어려운 것으로 알려져 있다 (Garneau and Moineau, 2011; Marc *et al.*, 2012). 본 논문에서는 유제품 발효에 있어서 중요한 상관 관계를 가지고 있는 bacteriophage와 유산균에 대한 응용 분야와 생리적, 분자생물학적 특성에 대해 논하고자 한다.

유산균의 식품 및 의약 산업에서 응용

Probiotics로 유산균은 식품 산업과 의약 산업 분야에서 광범위하게 사용되고 있다. Probiotics로 사용되는 유산균은 다양한 효능이 보고되고 있으며 이러한 효능과 안전성을 기준으로 해서 선발되게 된다(Adams, 1999; Gagga *et al.*, 2010; Guarner *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2011). 현재까지 보고된 효능은 첫 번째로 항균 작용으로 유산균이 생육하면서 생성하는 유기산, 저급 지방산, bacteriocin 등에 의해 병원성 또는 부패 미생물에 대해 생육을 억제하게 된다. 특

히 bacteriocin은 유산균이 생성하는 대표적인 저분자 peptide 항균 물질로서 현재까지 저해 기작, 구성 성분 등에 따라 매우 많은 종류가 보고되고 있으며, 최근에는 식품안전을 위해 응용 분야가 확대되고 있다. 두 번째로 설사증과 변비 예방으로 probiotics 섭취 시에 장 통증 및 과민 반응 감소, 장내 대사 촉진 등의 효과가 있으며, 세 번째로 항암, 항종양, 항돌연변이 효과로 종양 세포의 생육 억제, 발암 물질의 불활성화 또는 합성 억제, 체내 발암물질 합성 효소 작용 억제, 유산균의 세포벽과 발암 물질 또는 돌연변이 유발원들의 흡착 등으로 가능한 것으로 알려져 있다. 네 번째로 사람의 면역과 관련된 T 세포, B 세포, macrophage, cytokine 등의 활성화를 통한 면역 증강 효과, 다섯 번째로 면역 과민 반응에 의해 나타나는 알레르기 또는 아토피에 대한 치료효과, 여섯 번째로 다양한 심혈관계의 질환에 효과가 알려져 있고 임상 실험을 통해서도 확인되었으며(Table 1, 2), 이외에도 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Collins and Gibson, 1999; Costa-Ribeiro *et al.*, 2003; de Vuyst and Leroy, 2007; Guarner *et al.*, 2012; Mercenier *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 1998; Vyas and Ranganathan, 2012). 그리고 probiotics로 사용될 유산균은 generally recognized as safe(GRAS)로 인 류가 오랜 시간 섭취해와 안전하다고 인지되고 있으나, 보다 안전한 사용을 위해서는 병원성 유발 가능성 혹은 유전자 전이 가능성 등에 대한 연구가 필요할 것이다(Adams, 1999; Gagga *et al.* 2010; Sybesma *et al.*, 2006).

현재 국내외적으로 많은 사람들이 건강에 대한 관심 증가로 인해 probiotics 관련 산업들이 지속적으로 증대되고 있는 추세이다. 세계적으로 여러 probiotics 관련 회사가 있으며 이들 회사에서는 일찍이 새로운 기능성을 가진 유산균을 발굴하여 probiotics 제품으로 개발하여 판매하고 있

Table 1. Health beneficial effects of lactic acid bacteria (Mercenier *et al.*, 2003)

Health benefit : Proposed mechanisms
Alleviation of lactose intolerance : Bacterial β -galactosidase acts on Lactose
Positive influence on intestinal flora : Lactobacilli influence activity of overgrowth flora, decreasing toxic metabolite production, Antibacterial characteristics,
Prevention of intestinal tract infections : Adjuvant effect increasing antibody production, Stimulation of the systemic or secretory immune response, Competitive exclusion, Alteration of intestinal conditions to be less favorable for pathogenicity, Alteration of toxin binding sites, Gut flora alteration, Adherence to intestinal mucosa, preventing pathogen adherence, Competition for nutrients
Improvement of the Immune system : Strengthening of non-specific defense against infection, Increased phagocytic activity of white blood cells, Increased serum IgA production, Proliferation of intra-epithelial lymphocytes, Adjuvant effect in antigen-specific immune responses, Regulation of the Th1/Th2 balance, induction of cytokine synthesis
Reduction of inflammatory or allergic reactions : Restoration of the homeostasis of the immune system, Regulation of cytokine synthesis, Prevention of antigen translocation into blood stream
Anti-colon cancer effect : Mutagen binding, Carcinogen deactivation, Alteration of activity of colonic microbes, Immune response, Influence on secondary bile salt concentration
Blood lipids, heart disease : Peptidase action on milk results in antihypertensive tripeptides (angiotensin converting enzyme inhibitors), Cell wall components act as angiotensin converting enzyme inhibitors
Urogenital infections : Adhesion to urinary and vaginal tract cells, Competitive exclusion, Inhibitor production (H_2O_2 , biosurfactants)
Infection caused by <i>Helicobacter pylori</i> : Competitive exclusion, Lactic acid production, Decreased urease activity of <i>H. pylori</i> in humans

Table 2. Recent studies on the effects of probiotics on systemic and mucosal immune function, barrier function, and metabolism (Vyas and Ranganathan, 2012)

Strain	Indication	Results
<i>L. rhamnosus</i> GG and <i>B. lactis</i> Bb12 (10Beach with inulin)	Polypectomized and colon cancer patients	Increased <i>L. rhamnosus</i> and <i>B. lactis</i> in feces, reduction in <i>C. perfringens</i> , prevents increased secretion of IL-2 in polypectomized patient, increased production of interferon - γ in cancer patients
<i>L. casei</i> Shirota	Recurrence of superficial bladder cancer	Significant reduction in primary multiple and recurrent single tumors
<i>L. casei</i> LC9018	Preventive effect on bladder cancer	Significant reduction in risk of bladder cancer
<i>L. plantrum</i> CGMCC No1258 and <i>L. acidophilus</i> La11 and <i>B. longum</i>	Cervical cancer	Reduced immunity against tumor induction
<i>L. plantrum</i> CGMCC No1258 and <i>L. acidophilus</i> La11 and <i>B. longum</i>	Barrier function and post-operative infectious complications on Colorectal cancer surgery	Improvement in the integrity of gut mucosal barrier and decrease in infectious complications
<i>L. acidophilus</i> and <i>B. bifidum</i>	Diarrhea during radiotherapy in cervical cancer	Reduction in incidence of diarrhea and better stool consistency
<i>L. rhamnosus</i> GG	Diarrhea related to chemotherapy of colorectal cancer	Patient had less grade 4 of diarrhea, less abdominal discomfort, needed less hospital care and had fewer chemo dose reduction due to bowel toxicity

Table 3. Examples of probiotic strains in products and suppliers (Guarner *et al.*, 2012)

Strain (alternative designations)	Brand name	Producer
<i>L. casei</i> DN-114 001	Actimel, Danactive	Dannon
<i>L. casei</i> F19	Cultura	Aria Foods
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>L. johnsonii</i> La 1 (Lj1)	L.C1	Nestle
<i>L. plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>L. reutri</i> DSM 17938	L. Reutri Protectis	BioGaia
<i>L. rhamnosus</i> ATCC53013 (LGG)	Vifit and others	Valio
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmeyerier
<i>S. cerevisiae</i> Iyo	DiarSafr, Ultralevure,	Wren Laboratories, Biocodex
<i>B. animalis</i> DN 173 010	Acticia	Dannon
<i>B. breve</i> Yakult	Bifience	Yakult
<i>B. infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido	Danisco
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm

으며, 현재 세계적으로 판매되고 있는 다양한 probiotics 제품은 Table 3과 같다(Guarner *et al.*, 2012). 또한 현재도 새로운 유산균들을 분리하고 다양한 효능을 확인하고 임상 실험 등을 통해 안전성과 기능성이 우수한 probiotics를 개발되고 있다. 하지만 이러한 probiotics 시장의 확대에 인해서 과학적으로 안전성이나 기능성이 입증되지 않은 제품들이 판매되고 있어서 판매 제한이나 기능성 표기 부분에 대해 제한이 이루어지고 있다. 따라서 이를 대비하기 위해서는 개발되는 probiotics로서의 유산균에 대해서 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통한 효능 확인 이외에 임상 실험 등을 통한 확인에 대한 과학적인 연구가 필요할 것이다(Seo *et al.*, 2010).

식품 산업에서 사용되는 probiotics로서의 유산균들은 주로 발효를 통한 제품으로 대표적으로, 유제품 발효에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 유산균은 과거에는 phenotype 측면에서 특성이 우수한 균주를 screening을

하면서 제품 개발을 위해 다양한 발효 조건 수립 등의 여러 과정을 거치면서 이루어졌으나(Khalid, 2012), 최근에는 유산균과 발효산물 등에 대해 분자 생물학적 측면에서 연구가 되고 있으며, 이에 따라 다양한 유산균들로부터 원하는 유산균을 효과적으로 선별할 수 있게 되었다. 또한 유산균이 보다 우수한 기능을 하도록 다양한 유전자의 도입 등을 통해 발효가 효율적으로 진행되도록 동시에 기능성이 강화된 제품 생산이 가능하게 되었다(Fang and O'Toole, 2009; McGratha *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2009). 이러한 유산균을 이용해 제품을 생산하는데 있어서 올바른 발효가 진행되기 위해서는 다양한 요인이 존재하지만, 발효 유제품에 있어 품질을 결정하는 것은 starter로 사용될 유산균이다. Starter로 사용될 유산균은 유제품 발효 시 젖산 발효, 풍미 생성, 단백질 분해, 지방 분해, 알코올 발효, 항균 물질 생산 등의 기능을 한다(Khalid, 2012). 그리고 발효에 사용될 유산균은 최적 성장 온도, 젖산 생성 속도, 항균물질

생성여부, bacteriophage에 대한 저항성 등을 기준으로 선별하며, seed culture, mother culture, bulk culture의 과정을 거쳐 치즈, 요거트 등의 발효에 이용된다. 하지만, starter에 잡균 오염, 점질화, 균주 변이, 유청 분리, 원유문제, 항균 물질, bacteriophage에 오염 등 다양한 원인으로 문제가 유발되어 발효에 이상이 발생하게 된다. 특히 bacteriophage에 의한 오염은 유제품 발효에 있어서 유산균을 용균시켜 발효가 되지 않게 되기 때문에 다수의 유제품 관련 회사들에게 많은 경제적인 손실이 유발된다. Bacteriophage는 일반적으로 사용되는 원유, 물, 작업환경, 공기 등 도처에 오염원이 있기 때문에 bacteriophage에 대한 제어가 매우 까다롭다(Garneau and Moineau, 2011).

Bacteriophage 특성

자연계에 많이 존재하는 bacteriophage는 19세기 후반에 발견된 virus로서 특정 세균을 용균(lysis)시켜 사멸시키는 특징을 갖고 있어 관련 치료제로서의 연구가 활발히 진행됐었다(Casadess and D'Ari, 2002; McGrath and van Sinderen, 2007). 하지만 항생제의 발견으로 인해 연구가 지지부진해오다가 항생제 내성 세균의 출현 등의 문제로 인해 항생제 대체수단으로 다시금 활발한 연구가 진행 중에 있다(Fig. 2). Virus의 일종인 bacteriophage는 일반적으로 용균성 생활환(lytic cycle-virulent phage)과 용원성 생활환(lysogenic cycle-temperate phage)을 거치면서 증식하게 된다. 각각의 bacteriophage는 그 특성에 따라 최근 다양한 연구 분야에 응용되어 사용되고 있다.

하지만, bacteriophage의 host immune system과의 관계, lysis된 병원성 미생물의 endotoxin, gene transfer 등에 대한 문제가 남아 있으므로 안전성에 관련된 추가적인 연구 또한 진행 중에 있다(Krylov, 2001; Mazodier and Davies, 1991). 국외의 경우 이렇듯 매우 다양한 분야에 기초연구 및 응용을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 국내에서도 이와 발맞추어 점차적으로 bacteriophage에 대한

관심이 증대되고 있으며, 이를 이용하여 sanitizer 개발 또는 치료제 개발, lytic 효소의 이용, phage 복제 및 수용체 연구 등이 여러 방향에서 진행되고 있으나, 서구 선진국에 비해 활발한 연구가 되고 있지 않는 것이 현실이다.

가장 대표적인 예로 병원성 미생물의 치료제로 주로 항생제 내성 세균의 치료에 사용되는 phage therapy, 특정 단백질 또는 항체를 만들어내는 phage display, 병원성 미생물의 typing, 백신 관련 연구, bacteriophage 유전자를 이용한 lytic 효소 등의 유용 효소의 생산, 병원성 세균의 검출, 환경오염 지표, phage 유전자의 전이, phage의 숙주 특이성과 밀접한 관계를 갖는 수용체 연구, 유제품에 있어서 lactic acid bacteria의 bacteriophage 내성 균주 개발, 식품 안전을 위한 bacteriophage와 유산균의 응용 등 매우 광범위하게 이용 및 연구되고 있다(Boyd *et al.*, 2001; Campbell, 2003; Roger, 2003; Clark and March, 2006; McGrath and van Sinderen, 2007; Zhu *et al.*, 2009).

Bacteriophage에 의한 유산균에 대한 감염과 내성

유산균은 일반적으로 포자를 형성하지 않는 Gram 양성균의 통성 혐기성 세균으로 pH 5 수준에서 최적 생육을 하고, 형태학적으로는 bacilli form과 cocci form을 하고 있으며, 영양 요구성이 매우 높은 특성이 있다. 그리고, 탄수화물을 발효하며 lactic acid를 비롯해 다양한 최종 산물을 형성하며, 대표적으로 알려진 유산균으로는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 속이 있다. 또한, 유산균의 동정을 위해서 과거에는 Gram 염색, 당자화성, 형태학적 특성 등의 phenotype에 대한 실험을 통해 이루어졌으나, PCR 등 다양한 분자 생물학적 기법들이 많이 사용되고 있고 대표적으로 16s rRNA gene sequence 분석을 통해 계통도를 비교하여 동정되고 있다(Vaughan *et al.*, 2005; Khalid, 2012). 그리고 최근 들어 여러 종류의 유산균에 대한 whole genome sequence를 분석한 결과, 약 1.8-2.5 Mb 수준의 크기였으며, 약 1,500-3,000개의 단백질을

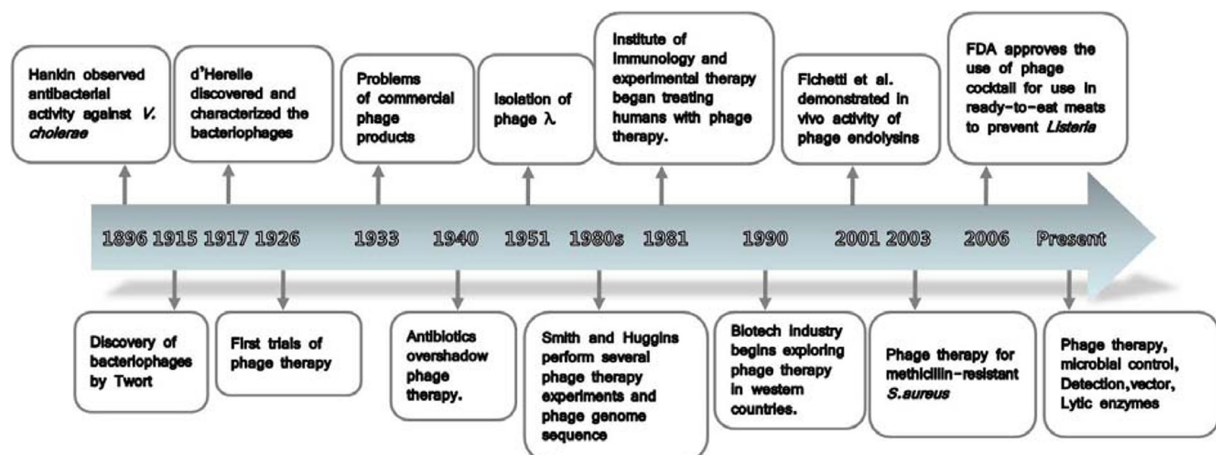


Fig. 2. Timeline of highlights in the developments of bacteriophages.

암호화하는 것으로 나타났다(Pfeiler and Klaenhammer, 2007; Zhu *et al.*, 2009). 근래에 이러한 여러 유산균들에 대한 whole genome sequence 분석이 국내를 포함해 매우 활발하게 이루어지고 있고, 이에 따라 유산균들의 대사, 생리 특성, 병원성, 항균물질 형성 특성 등에 대해 분자 수준에서 접근이 용이해지고 있으며, 이를 통해 식품산업이나 의약 산업에서 probiotics로서의 유산균에 대한 연구가 보다 활발해지고 있다. 그리고, 유산균은 plasmid와 prophage 또한 여러 형태로 보유하고 있는 것으로 보고되고 있으며, whole genome 중 약 3-10%는 prophage의 형태가 보여지는 것으로 확인되고 있다(Brissow and Hendrix, 2002). 일반적으로 bacteriophage는 미생물들의 진화와 매우 밀접한 관계를 맺고 있는 것으로 알려져 있으며, 유전자 전이, 여러 세포에 병원성 인자 보유 등 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 유산균의 genome 안에 prophage로 존재하다가 외부 다양한 환경 인자(UV, heat, antibiotics 등) 들에 의해 유도되어 temperate bacteriophage로 나와서 유산균 숙주를 재감염 시키거나 다른 유산균들을 감염하여 사멸시키기도 한다(Desiere *et al.*, 2002).

이러한 유산균 bacteriophage에 의한 감염은 다른 bacteriophage와 동일하게 용균성 생활환과 용원성 생활환을 통해 이루어진다. 용균성 생활환의 경우 bacteriophage의 세포 부착, bacteriophage DNA 주입, bacteriophage의 생합성, 합성 및 숙성, 세포 사멸 후 방출에 과정을 거쳐 이루어진다. 용원성 생활환은 bacteriophage가 DNA 주입 후 숙주세포의 genome에 끼어들어간 후 prophage 형태로 세포와 함께 증식하면서, 숙주 세포에게 bacteriophage가 보유하는 유전자가 발현되면서 다양한 병원성 요소, 대사산물 등의 phenotype을 나타내게 된다. 그리고 외부 환경 스트레스 등에 의해 temperate bacteriophage로 나오고 나서 이 후 용균성 생활환과 동일하게 진행되면서 세포를 파괴하고 밖으로 나오게 된다(McGrath and van Sinderen, 2007).

유산균 bacteriophages에 분리, genome sequence 등에 대한 연구는 1970년대 후부터 꾸준히 진행되고 있고, 최근까지 100개 이상의 genome sequence가 보고되고 있으며, 이러한 유전학적 연구를 통해 bacteriophage의 감염 또는 내성 기작, 응용, 유산균과의 관계 등이 활발하게 연구되고 있다(Desiere *et al.*, 2002; Pfeiler and Klaenhammer, 2007). 특히, 보다 안전한 발효를 위해 bacteriophage에 내성이 있는 유산균의 개발이 진행되고 있다(Moineau, 1999). 유산균이 bacteriophage에 대한 내성을 갖게 되는 방법은 bacteriophage가 유산균의 teichoic acid, lipoteichoic acid, cell wall component 등의 수용체와의 부착 저해, DNA 삽입 저해, bacteriophage 내성 plasmid, bacteriophage가 부착과 DNA 삽입 등을 정상적으로 했더라도 bacteriophage의 합성과 숙성이 되지 않는 유산형 감염, prophage를 갖는 용원 유산균은 bacteriophage들에 대한 내성이 있는 용원화에 의

한 면역이 있다. 그리고, 삽입된 bacteriophage DNA에 대해 restriction/modification(R/M) system과 clustered regularly interspaced short palindromic repeat(CRISPR) associated (CRISPR/cas) system이 있다(Hyman and Abedon, 2010; Labrie *et al.*, 2010)(Fig. 3). CRISPR/cas system은 최근에 밝혀진 세균의 면역 기작으로, 세균에게 bacteriophage 등의 외부 DNA가 들어오며 CRISPR 부분이 인지한 후 외부 DNA 조각들을 선택하여 세균의 CRISPR 부위에 삽입해 놓는다. 그리고 bacteriophage 등의 DNA가 다시 들어오게 되면 CAS protein에 의해 외부 DNA를 절단하여 외부 DNA 등에 세균이 생존할 수 있게 된다. 최근 연구에 따르면 유산균에 대한 whole genome 분석을 통해 CRISPR 부분이 존재하는 것을 확인하였으며, bacteriophage 내성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(McGrath *et al.*, 2002; Labrie *et al.*, 2010). 따라서 bacteriophage에 대한 유산균의 내성에 대한 CRISPR/cas system을 바탕으로 유산균 발효 과정에 응용하면 보다 안정적인 발효를 생산성이 높은 제품을 만들 수 있을 것이다.

유산균 발효에서 Bacteriophage의 제어

유산균에 의한 발효를 진행함에 있어 다양한 환경 요인으로부터 오염되는 bacteriophage에 대한 제어는 중요하지만 매우 어렵다. Bacteriophage의 주된 오염원은 첫 번째로 발효를 위한 물, 원유 등의 원재료 또는 유청 등의 가공 재료로 원유에서 약 9-37%로 높은 수준으로 오염되어 있어서 원유에 대한 선별과 bacteriophage의 제거가 필수적일 것이다(Madera *et al.*, 2004; del Rio *et al.*, 2007). 그리고, 두 번째로 유산균의 prophage에 의한 것으로서 prophage가 UV 조사, 열처리, 영양 고갈 등에 의해 induction되어 temperate bacteriophage로 나와서 재감염시키거나 다른 유산균에 감염되어 사멸시켜 효과적으로 발효가 진행되지 않게 된다(McGrath and van Sinderen, 2007). 최근 보고에 의하면 현재 발효에 사용되고 있는 유산균들에 대해 prophage를 확인한 결과 80% 정도가 확인되었다(Mercanti *et al.*, 2011). 하지만, 일반적으로 용원화 의한 면역에 의해 다른

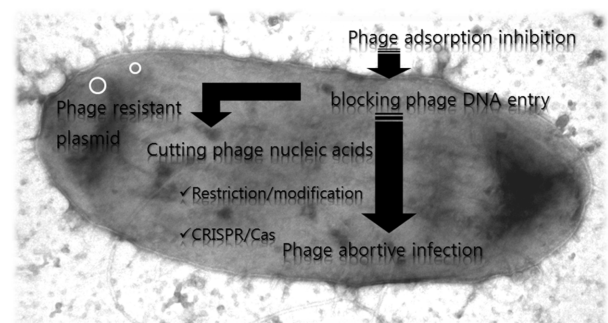


Fig. 3. Bacteriophage resistance mechanisms of lactic acid bacteria.

bacteriophage에 대한 내성이 유발되기도 하고 endolysin 등에 의해 자가소화되면서 다양한 풍미를 제공하기도 한다 (Garneau and Moineau, 2011). 세 번째로 공기와 작업장 기기 또는 환경에서 유산균의 bacteriophage의 오염이 높은 수준으로 확인되고 있어서 다양한 위생처리를 통한 bacteriophage 오염을 차단해야 한다 (Verreault *et al.*, 2011). 유제품에서 bacteriophage에 대한 확인을 위해 사용되는 방법으로는 과거에는 대표적으로 plaque assay를 통한 확인을 많이 하였으나, 최근에는 일반적으로 PCR을 이용한 방법이 편이성, 특이성, 신속성 등에 장점이 있어 많이 사용되고 있다. 하지만, PCR 법은 bacteriophage에 대한 감염 특성이나 구별이 안되기 때문에 plaque assay 등을 통해 bacteriophage 분리를 함께하는 것이 필요하다 (Clokier and Kropinski, 2009).

이렇듯 유산균들의 bacteriophage에 대한 제어를 위해 최근 다양한 방법이 제시되고 있다. 첫 번째로 위생 처리를 하는 것으로서 최근에는 하나의 제어법으로만 처리하는 것이 아니라 물리적 방법과 화학적 방법들을 복합적으로 처리해서 bacteriophage에 대한 최상의 제어효과를 이용한다. 대표적으로 pH, 온도, peracetic acid, isopropanol, sodium hypochlorite, quaternary ammonium, alkaline chloride, ethoxylated nonylphenol 등과 오존, UV 등이 있으며, 현재도 다양한 virucidal agent 들이 연구, 개발 중이며, good manufacturing practice(GMP), cleaning-in-place(CIP), sanitation standard operating procedures(SSOP) 등의 도입이 필요할 것이다 (Garneau and Moineau, 2011; Shapiro and Kushmaro, 2011). 두 번째로 원재료에 오염된 bacteriophage의 제어를 위해 열처리, 고압처리, 화학적 처리 또는 이것들의 복합 처리를 통해 가능하며, 세 번째로 starter로 사용될 유산균을 단독이 아니라 혼합 균주를 사용하거나 계속해서 교체해주는 방법, 마지막으로 bacteriophage에 대한 내성이 있는 유산균을 개발하는 방법이다. Bacteriophage 내성 유산균의 개발은 앞서 언급한 bacteriophage의 내성 기작에 기반을 두고 다양한 분자생물학적 기법을 이용하여 만들어지고 있다.

요 약

지금까지 보고된 probiotics로서의 유산균의 효과에 대해서는 임상 연구 등을 통해 많이 규명되었다. 앞으로 식품 산업에서 유산균을 이용함에 있어 보다 효과적으로 사용하기 위해서는 유산균의 genome에 기반으로 해서 생리 특성, 항균효과, 발효 특성 등을 연구하는 것이 보다 효율적일 것이다. 그리고, 이러한 유산균 발효에 있어 중요한 부분을 차지하는 bacteriophage에 대한 분자생물학적 특성에 대한 연구와 유산균과의 상관 관계, bacteriophage 내성 균주 개발 등에 대한 연구가 필요할 것이다. 하지만, 국외에

서 다양한 유산균을 이용한 의약 분야, 식품 분야 등에서 연구가 활발하게 진행되고 있으나, 국내에서는 최근 들어 유산균 관련 연구가 상대적으로 주춤하고 있는 것으로 보여진다. 따라서, 국내외적으로 건강에 대한 관심이 높아지고 있는 지금 시점에서 보다 광범위한 유산균에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2012년 정부재원(교육과학기술부)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었음 [NRF-2012-R1A6A3A01-040800].

참고문헌

- Adams MR (1999) Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **19**, 171-178.
- Ann YG (2011) Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Korean J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
- Brssow H and Hendrix R (2002) Phage genomics: Small is beautiful. *Cell* **108**, 13-16.
- Boyd EF, Brigid MD, and Bianca H (2001) Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **9**, 137-144.
- Campbell A (2003) The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 471-477.
- Casadess J and D'Ari R (2002) Memory in bacteria and phage. *Bioessays* **24**, 512-518.
- Clark JR and March JB (2006) Bacteriophages and Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **24**, 212-218.
- Clokier MRJ and Kropinski AMB (2009) Bacteriophages: Methods and protocols-isolation, characterization, and interactions. Humana Press, New York.
- Collins MD and Gibson GR (1999) Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1052S.
- Costa-Ribeiro H, Ribeiro TC, and Mattos AP (2003) Limitations of pro-biotic therapy on acute, severe dehydrating diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **36**, 112-115.
- del Rio B, Binetti AG, Martn MC, Fernandez M, Magadn AH, and Alvarez MA (2007) Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.* **24**, 75-81.
- de Vos WM (2011) Systems solutions by lactic acid bacteria: From paradigms to practice. *Microb. Cell Fact.* **30**, S2.
- de Vuyst L and Leroy F (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194-199.
- Desiere F, Lucchini S, Canchaya C, Ventura M, and Brssow H (2002) Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 73-91.
- Fang F and O'Toole PW (2009) Genetic tools for investigating the biology of commensal lactobacilli. *Front Biosci.* **1**, 3111-3127.

- Gagga F, Mattarelli P, and Biavati B (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* **31**, S15-S28.
- Garneau JE and Moineau S (2011) Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb. Cell Fact.* **30**, S20.
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Lemair T, Kaufmann P, de Paula JA, Fedorak R, Shanahan F, Sanders ME, Szajewska H, Ramakrishna BS, Karakan T, and Kim N (2012) World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**, 468-481.
- Hyman P and Abedon ST (2010) Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* **70**, 217-248.
- Jeppsson B, Mangell P, and Thorlacius H (2011) Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections. *Nutrients* **3**, 604-612.
- Khalid K (2012) An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* **1**, 1-13.
- Krylov VN (2001) Phagotherapy in terms of bacteriophage genetics: Hopes, perspectives, safety, limitations. *Genetika* **37**, 869-887.
- Kumari A, Catanzaro R, and Marotta F (2011) Clinical importance of lactic acid bacteria: a short review. *Acta Biomed.* **82**, 177-180.
- Labrie SJ, Samson JE, and Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 317-327.
- Leroy F and De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.
- McGratha S, van Sinderen D, and Fitzgerald GF (2002) Bacteriophage derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**, 3-15.
- Madera C, Monjardin C, and Suarez JE (2004) Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7365-7371.
- Marc MB, Moineau S, and Quiberoni A (2012) Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* **2**, 1-10.
- Mazodier P and Davies J (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147-171.
- McGrath S and van Sinderen D (2007) Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk.
- Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, and Quiberoni A (2011) Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 503-510.
- Mercenier A, Pavan S, and Pot B (2003) Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 175-191.
- Moineau S (1999) Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 377-382.
- Pfeiler EA and Klaenhammer TR (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 546-553.
- Reid G, Jass J, and Sebuly MT (2003) Potential uses of probiotic in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 658-672.
- Roger WH (2003) Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 506-511.
- Salminen S, Bouley C, and Boutron-Ruault MC (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**, S147-S171.
- Seo JG, Lee GS, Kim JE, and Chung M. (2010) Development of probiotic products and challenges. *KSBB J.* **25**, 303-310.
- Shapiro OH and Kushmaro A (2011) Bacteriophage ecology in environmental biotechnology processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 449-455.
- Vaughan EE, Heilig HG, Ben-Amor K, and de Vos WM (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 477-490.
- Verreault D, Gendron L, Rousseau GM, Veillette M, Masse D, Lindsley WG, Moineau S, and Duchaine C (2011) Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 491-497.
- Vyas U and Ranganathan N (2012) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Gut and beyond. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012**, 1-16.
- Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, and Sanders ME (2011) Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.* **69**, 392-403.
- Sybesma W, Hugenholtz J, de Vos WM, and Smid EJ (2006) Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 424-448.
- Zhu Y, Zhang Y, and Li Y (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 597-610.