



## 유제품 발효를 위한 박테리오파지의 제어

이영덕<sup>1\*</sup> · 박종현<sup>2</sup>

<sup>1</sup>서원대학교 식품공학과, <sup>2</sup>가천대학교 식품생물공학과

## Control of Bacteriophages for Fermentation of Dairy Products

Young-Duck Lee<sup>1\*</sup> and Jong-Hyun Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Engineering, School of Convergence Bioscience and Technology, Seowon University, Cheongju, 361-742, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Sunghnam 461-701, Korea

**Abstract:** Lactic acid bacteria as probiotics contribute to various food and medicine industries. Recently, many effects of lactic acid bacteria have been reported by the results of *in vitro* and clinical experiments. In dairy industry, bacteriophages for lactic acid bacteria are threats because bacteriophage contamination can still occur nowadays leading to reduce product quality. Therefore, biocontrol of bacteriophages in dairy products might be very important. Recently, physical and chemical methods for inactivation of bacteriophages have been developed in dairy industry and laboratory. Therefore, This study provides the various treatments for inactivation of bacteriophages in dairy industry.

**Keywords:** bacteriophage, control, dairy product, sanitation

### 서 론

발효 식품은 인류가 오랜 시간 경험을 바탕으로 만들어진 최고의 식품으로 알려져 있으며, 최근 발효 식품의 건강에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 유산균은 식품 발효 동안에 다양한 영양 물질, 향기 성분, 항균 물질 등 식품의 품질과 제품 수명에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 프로바이오틱스(Probiotics)로서 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등의 다양한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Leroy and De Vuyst, 2004; Vyas and Ranganathan, 2012). 그리고, 최근 다양한 임상 결과를 통해 다양한 질환들에 대한 예방적 효과와 치료적 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Jeppsson *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2011). 이러한 유산균들은 우리나라를 포함한 아시아에서는 김치와 같은 절임

채소, 간장 등의 장류 발효 제조에 사용되어 왔으며, 서구에서는 주로 우유 등의 발효를 통한 치즈, 요구르트 등의 유제품에 많이 사용되어 왔다. 특히, 아시아의 경우는 다양한 유산균에 의한 김치 등의 발효 식품이 다양하게 생산되어 왔으나, 관련된 미생물 개량 기술과 발효 식품에서 유산균의 역할들에 대한 연구가 유제품 관련 발효 식품에 비해 다소 미흡하다(de Vos, 2011; Garneau and Moineau, 2011). 이에 따라, 최근 발효 식품에서의 유산균총의 역할과 천이에 대한 연구와 유산균 개량 등에 대한 연구가 국내에서도 활발하게 수행되고 있다. 서구의 경우, 오랜 시간 유제품과 관련 발효 식품에 대한 지속적인 연구를 통해 과학적으로 유산균의 기능과 역할을 규명해 왔다(Adams, 1999; Gagga *et al.*, 2010; Guarner *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2011). 특히, 유제품 발효는 소비자의 기호가 다양화되면서 우수한 맛과 향기를 주는 새로운 균주의 개발은 더욱 중요시되고 있다. 과거에는 시행오차를 거쳐 균주가 선발, 이용되었지만, 이제 유가공산업은 분석생화학이나 발효기술을 포함해 첨단미생물학을 이용하고 있다. 분자생물학 및 유전자기술의 등장은 발효유나 치즈의 생산에 있어 유산균의 역할을 이해하고 연구하는데 큰 역할을 담당하게 되었다. 이에 따라 다양한 유산균들로부터 원하는 유산균을 효과적으로 선별할 수 있게 되었다. 또한 유산균이 보다 우수한 기능을 하도록 다양한 유전자의 도입 등을 통해 발효가 효

\*Corresponding author: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Engineering, School of Convergence Bioscience and Technology, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea.  
Tel: 82-43-299-8472, Fax: 82-43-299-8107  
E-mail: ydlee@seowon.ac.kr  
Received December 17, 2013; Revised January 6, 2014;  
Accepted January 9, 2014

율적으로 진행됨과 동시에 기능성이 강화된 제품 생산이 가능하게 되었다(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). 이러한 유산균을 이용해 제품을 생산하는데 있어서 올바른 발효가 진행되기 위해서는 다양한 요인이 존재하지만, 발효 유제품에 있어 품질을 결정하는 것은 starter로 사용될 유산균이다(Khalid, 2012). 하지만, starter에 잡균 오염, 점질화, 균주 변이, 유청 분리, 원유 문제, 항균 물질, 박테리오파지에 오염 등 다양한 원인으로 문제가 유발되어 발효에 이상이 발생하게 된다. 특히 박테리오파지에 의한 오염은 유제품 발효에 있어서 유산균을 용균시켜 발효가 되지 않게 되기 때문에 다수의 유제품 관련 회사들에게 많은 경제적인 손실이 유발된다(Garneau and Moineau, 2011). 따라서, 본 고에서는 유제품 발효를 위한 유산균에 대한 박테리오파지의 물리적, 화학적 제어 방법 등에 대해 확인하고자 하였다.

### 박테리오파지의 유산균 발효에 영향

박테리오파지는 세균을 감염시켜 사멸시키는 바이러스로서 20세기 초반에 분리되어 감염성 질환의 치료제로서 관련 연구가 진행되다가, 부작용과 항생제의 개발 등으로 인해 연구가 주춤하였다. 하지만, 박테리오파지에 대한 기초 연구는 꾸준히 진행되어 왔으며, 최근 항생제 내성 세균에 대한 치료제 또는 식품, 축산식품 등에 위생 처리제 등 이외 다양한 분야에서 응용 가능성이 확인되면서 다시 주목을 받고 있다(Casadesús and D'Ari, 2002; McGrath and van Sinderen, 2007). 박테리오파지는 일반적으로 용균성 생활화와 용원성 생활화를 거치면서 증식하게 된다. 용균성 생활화는 박테리오파지가 세균을 감염시킨 후 유전자 전달 등이 없이 세균만을 사멸시키면서 밖으로 빠져 나오게 된다. 반면에 용원성 생활화를 거치는 동안 박테리오파지 유전자를 세균의 유전체에 삽입시킨 뒤 prophage 형태로 존재하면서 세균에게 독소 생성, 대사 산물 형성 등의 표현형을 나타낸다. 그리고, UV, 항생제, 열처리 등에 노출되면서 세균으로부터 박테리오파지 유전자가 나와서 용균성 생

활화를 거치면서 세균을 사멸시키며 나오게 된다. 그리고, 유산균의 경우 다양한 prophage를 여러 형태로 보유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 유산균 유전체에서 약 3~10%는 prophage가 차지하는 것으로 확인되었다. 이러한 prophage는 유산균의 유전체에 존재하다가 외부 환경 스트레스에 의해 유도되어 용원성 박테리오파지로 나와서 유산균 숙주를 감염시켜 효과적으로 발효가 진행이 어렵게 되기도 한다(Desiere *et al.*, 2002; Pfeiler and Klaenhammer, 2007). 그리고, 유제품 발효를 위한 물, 원유 등의 원재료 또는 가공 재료에 약 9~37%의 박테리오파지가 오염되어 있는 것으로 보고되고 있기 때문에, 재료에 대한 박테리오파지의 관리 없이는 발효가 진행되기 어려울 것이다(Madera *et al.*, 2004; del Rio *et al.*, 2007). 또한, 작업장의 기기 또는 공기 중으로부터 박테리오파지가 오염되어 있을 때도 발효에 문제가 발생하기도 한다(Verreault *et al.*, 2011). 따라서, 오염된 박테리오파지의 제어가 유제품 발효에 있어서는 매우 중요한 요소 중에 하나이기 때문에, 많은 식품과학자와 연구소, 기업 등에서 박테리오파지의 제어를 위한 다양한 연구를 수행해 중에 있다.

### 열처리를 통한 박테리오파지 제어

미생물의 제어를 위한 물리적 방법으로 가장 간단하고 조작이 쉬운 것은 열처리를 이용하는 방법으로, 이를 통해 유제품에 존재하는 다양한 부패 세균, 병원성 세균 그리고 박테리오파지의 제어에 사용되고 있다. 일반적으로 박테리오파지는 열처리를 받을 경우 형태가 변하면서 capsid가 파괴되면서 DNA가 용출되면서 불활성화되는 것으로 알려져 있다(Guglielmotti *et al.*, 2012). 대체적으로 유산균의 박테리오파지는 내열성이 있는 것으로 보고되어 있으며, 유산균의 박테리오파지는 열에 노출되었을 때 다양한 양상으로 생육 특성의 차이를 나타낸다(Quiberoni *et al.*, 1999; Binetti and Reinheimer, 2000; Suárez and Reinheimer, 2002; Guglielmotti *et al.*, 2012; Briggiler Marcó *et al.*, 2009). 몇몇 연구자들은 skim milk에 오염된 박테리오파지에 대해 63°C, 72°C, 90°C에서 내열성 특성을 확인한 결과 각각의 박테리오파지에 따라 다른 것을 확인하였다. 또한, 72°C에서의 저

Table 1. Time necessary to reach 99% inactivation of phages

Phage	Host	Concentration			
		10 %	50%	75%	100%
021-4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	>45 min	18 min	1.5 min	>45 min
0BJ		45 min	3.5 min	1.8 min	1.8 min
001		>45 min	>45 min	18.5 min	19.0 min
046	<i>Lactococcus lactis</i>	>45 min	>45 min	>45 min	24.3 min
YAB		>45 min	>45 min	7.6 min	1.8 min
Cb1/342	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	>45 min	>45 min	>45 min	24.9 min
FAGK2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	>45 min	11.4 min	41.6 min	5 min
MLC-A	<i>Lactobacillus paracasei</i>	>45 min	>45 min	1.8 min	>45 min

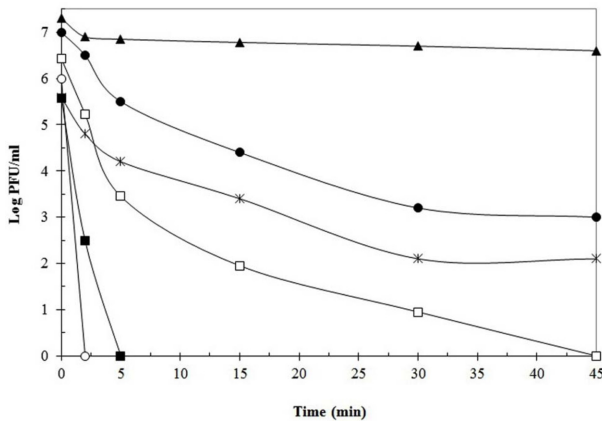


Fig. 1. Thermal destruction kinetics of phages Ib3 (□), LL-H (■) (*Lactobacillus delbruekii*), FAGK1 (▲), ATCC8014-B1 (●) (*Lactobacillus plantarum*), 021-5 (○), and 0BJ (\*) (*Streptococcus thermophilus*), at 72°C.

감화 효과를 확인한 결과 45분 이후에도 초기와 유사한 생육을 나타낸 박테리오파지도 있었으나, 5분만에 모두 사멸되는 박테리오파지도 보고되었다(Fig. 1).

International Dairy Federation에서는 유산균의 박테리오파지의 완전한 제거를 위해 90°C에서 15분 동안 처리해야 완벽하게 불활성화시킬 수 있는 것으로 보고하고 있다(Svensson and Christiansson, 1991). 하지만, 고온 열처리를 할 경우 유제품에 갈변 반응이나 풍미에 나쁜 영향을 미칠 수 있으므로 주의가 필요할 것으로 보인다.

### 고압처리를 통한 박테리오파지 제어

고압처리를 통한 제어 방법으로 앞서 열처리에 의한 제어 방법의 단점을 대체할 수 있는 것으로 알려져 있다. 최근 고압 처리를 통한 미생물 제어가 매우 활발하게 진행 중에 있으나, 박테리오파지에 대한 연구는 아직은 시작 단계에 있다. Mercanti 등은 유산균의 박테리오파지에 약 100 MPa로 고압 처리를 1회에서부터 5회까지 처리한 후 저감화 효과를 확인한 결과, 1회 처리 후에는 대체적으로 효과가 낮았으나, 3회 처리 후부터는 2~5 log PFU/mL의 감소 효과를 나타냈다(Capra *et al.*, 2009b, Guglielmotti *et al.*, 2012). 또한, 5회 처리했을 때에는 약 0~3 log PFU/mL로 저감화할 수 있는 것으로 나타났다. 이 외에 광촉매 반응을 이용한 UV와 TiO<sub>2</sub>, filter sterilization 등이 박테리오파지를 제어하기 위한 방법으로 적용되고 있다.

### 화학적 처리를 통한 박테리오파지 제어

화학적 제제를 이용하는 방법으로는 ethanol, isopropanol, sodium hypochlorite, quaternary ammonium chloride, peracetic acid 등이 사용되고 있다. Ethanol과 isopropanol은 대

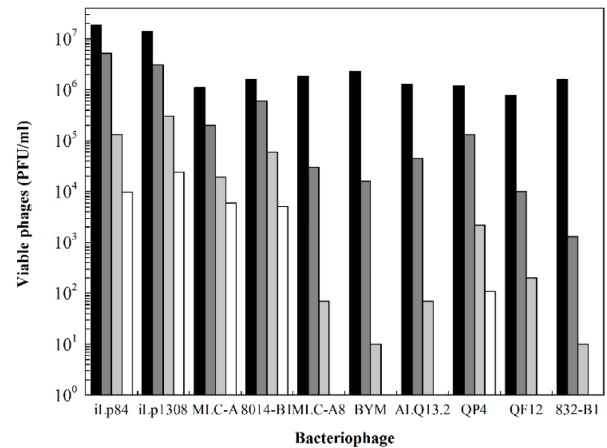


Fig. 2. Viability of dairy bacteriophages after multi high-pressure treatments at 100MP.

표적인 알코올계 biocide로 다양하게 응용되고 있으나, 박테리오파지의 경우 저농도 처리에는 일반적으로 저감화 효과가 거의 없는 것으로 보고되었다(Guglielmotti *et al.*, 2012). 하지만, 50% 이상의 고농도 처리에는 저감화 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 장시간 처리할 때보다 효과적인 것으로 알려져 있다.

Sodium hypochlorite의 경우 ethanol과 유사하게 고농도로 장시간 처리함에 따라 감소하는 것으로 알려져 있으며, 대체적으로 100~200 ppm으로 5~30분 동안 처리했을 때 불활성화 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 하지만, 몇몇 유산균 박테리오파지들은 800~1200 ppm으로 45분 정도 처리해야 불활성화되는 것으로 보고되어 있다(Campagna *et al.*, 2014). 특히 sodium hypochlorite는 박테리오파지의 tail을 응집시키거나, capsid의 형태를 변화시켜 박테리오파지 DNA가 방출되는 것을 막기 때문으로 알려져 있다. Peracetic acid는 대체적으로 박테리오파지를 불활성화하는데 좋은 화학처리제로 알려져 있으며, acetic acid나 hydrogen peroxide와 혼합처리할 때 우수한 synergy 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Garneau and Moineau, 2011). 특히, acetic acid와 혼합처리하는 현재 유제품 산업과 CIP(cleaning in place)에 다양한 미생물의 제어를 위해 사용되고 있으며, 금속성 재질, 피부에 직접 접촉 시는 부식을 유발하지만, 처리하고 몇 분 후면 잔류 물질이 사람에게 독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다(Cords *et al.*, 2001). 또한, 넓은 온도 범위와 pH에서도 우수한 작용을 하는 것으로 보고되었다. 이 외에도 Quaternary ammonium compound, peroxide, chlorine dioxide, ethoxylated nonylphenol 등과 더불어 새로운 virucidal agent들이 개발되어 유산균 박테리오파지의 제어를 위해 응용되고 있다(Campagna *et al.*, 2014). 결과적으로 박테리오파지의 제어를 위해서는 최근에는 물리적, 화학적 위생처리법들의 복합처리를 통한 저감화가 우선적으로 필요할 것이다. 그리고, 추가적으로 효과적인 유제품 발

효를 위해 starter로 사용될 유산균을 단독이 아니라 혼합 균주를 사용 혹은 계속해서 교체거나 박테리오파지에 대한 내성이 있는 유산균을 사용하여 유제품을 생산이 필요할 것이다.

## 요 약

최근 유산균을 이용한 다양한 발효 식품들이 연구, 개발되고 있으며, 유산균 발효 식품은 건강 증진 측면에서 효용성을 인정받아 전세계 인구가 섭취하고 있다. 이러한 유산균 발효 식품에 있어서 성공적인 제품 생산을 위해 박테리오파지의 중요도가 지속적으로 증대되고 있다. 특히, 발효 식품들 중 유제품에 대한 박테리오파지의 여러 가지 제어 연구가 다수 수행되었으며, 물리적, 화학적 위생처리를 하거나 각각의 방법을 혼합하여 유제품 발효를 보다 성공적으로 수행하도록 하여 왔다. 또한, 최근에는 국내에서도 GMP(Good Manufacturing Practice), CIP, SSOP(Sanitation Standard Operating Procedures) 등을 유제품 생산 공장에 적용하여 보다 효과적인 유제품 생산을 도모하고 있다.

## 참고문헌

- Adams MR (1999) Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **19**, 171-178.
- Binetti AG and Reinheimer JA (2000) Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J. Food Prot.* **63**, 509-515.
- Briggiler Marc M, De Antoni G, Reinheimer JA, and Quiberoni A (2009) Thermal, chemical and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *J. Food Prot.* **72**, 1012-1019.
- Capra ML, Patrignani F, Quiberoni A. delL., Reinheimer, JA, Lanciotti R, and Guerzoni ME (2009). Effect of high pressure homogenization on lactic acidbacteriophages and probiotic bacteriophages. *Int. Dairy J.* **19**, 336-341.
- Campagna C, Villion M, Labrie SJ, Duchaine C, and Moineau S (2014) Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* **3**, 41-47.
- Casades J and D'Ari R (2002) Memory in bacteria and phage. *Bioessays* **24**, 512-518.
- 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.
- Desiere F, Lucchini S, Canchaya C, Ventura M, and Brsow H (2002) Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 73-91.
- Cords BR, Dychdala GR, Richter FL, Marth EH, and Steele JL (2001) Cleaning and sanitizing in milk production and processing, In: Marth, E.H., Steele, J.L. (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*, 2nd edition. CRC Press, Minnesota, USA, pp. 547-586.
- 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.
- 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.
- Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, and Quiberoni Adel L (2012) Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbiol.* **11**, 282.
- Jeppsson B, Mangell P, and Thorlacius H (2011) Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections. *Nutrients* **3**, 604-612.
- Kumari A, Catanzaro R, and Marotta F (2011) Clinical importance of lactic acid bacteria: a short review. *Acta Biomed.* **82**, 177-180.
- 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.
- 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.
- McGrath S and van Sinderen D (2007) Bacteriophage: Genetic 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.
- Pfeiler EA and Klaenhammer TR (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 546-553.
- Quiberoni A, Surez VB, and Reinheimer JA(1999). Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.* **62**, 894-898.
- Reid G, Jass J, and Sebulsky MT (2003) Potential uses of probiotic in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 658-672.
- 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.
- Salminen S, Bouley C, and Boutron-Ruault MC (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**, S147-S171.
- Surez VB and Reinheimer JA (2002). Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J. Food Prot.* **65**, 1756-1759.
- Svensson V and Christiansson A. (1991). Methods for phage monitoring. *Bull. Int. Dairy Fed.* **263**, 29-39.
- 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.