

ORIGINAL ARTICLE

천연물 성분을 이용한 환경 유해미생물의 biofilm 생성 저해능 비교에 관한 연구

강은진 · 박지현 · 진슬 · 김영록 · 도형기 · 양웅석¹⁾ · 이재용²⁾ · 황철원³⁾*

한동대학교 생명과학부, ¹⁾포항노다지마을(주), ²⁾경운대학교 항공신소재공학과, ³⁾한동대학교 GLS학부,

Comparison of *In vitro* Anti-Biofilm Activities of Natural Plant Extracts Against Environment Harmful Bacteria

Eun-Jin Kang, Ji Hun Park, Seul Jin, Young-Rok Kim, Hyung-Ki Do, Woong-Suk Yang¹⁾,
Jae-Yong, Lee²⁾, Cher-Won Hwang³⁾*

Department of Life-Science, Handong Global University, Gyeongbuk 37554, Korea

¹⁾ Nodaji R&D Center, Nodaji Co., Ltd., Pohang, Gyeongbuk 37927, Korea

²⁾ Department of Advanced Aerospace Materials Engineering, Kyungwoon University, Gyeongbuk 39160, Korea

³⁾ Global Leadership School, Handong Global University, Gyeongbuk 37554, Korea

Abstract

In this study, we investigated the *in vitro* anti-biofilm activities of plant extracts of chives (*Allium tuberosum*), garlic (*Allium sativum*), and radish (*Raphanus sativus L.*) against environment harmful bacteria (gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli O157:H7*). In the paper disc assay, garlic extracts exhibited the highest anti-biofilm activity. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of all plant extracts was generally higher for gram-negative bacteria than it was for gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria were more resistant to plant extracts. The tetrazolium dye (XTT) assay revealed that, each plant extract exhibited a different anti-biofilm activity at the MIC value depending on the pathogen involved. Among the plant extracts tested, garlic extracts (fresh juice and powder) effectively reduced the metabolic activity of the cells of food-poisoning bacteria in biofilms. These anti-biofilm activities were consistent with the results obtained through light microscopic observation. Though the garlic extract reduced biofilm formation for all pathogens tested, to elucidate whether this reduction was due to antimicrobial effects or anti-biofilm effects, we counted the colony forming units of pathogens in the presence of the garlic extract and a control antimicrobial drug. The garlic extract inhibited the *E. coli O157:H7* biofilm effectively compared to the control antimicrobial drug ciprofloxacin; however, it did not inhibit *S. aureus* biofilm significantly compared to ciprofloxacin. In conclusion, garlic extracts could be used as natural food preservatives to prevent the growth of foodborne pathogens and elongate the shelf life of processed foods.

Key words : Biofilm inhibition, Anti-microbial activity, Natural materials, Environment harmful bacteria, Plant extracts

Received 13 December, 2018; Revised 15 January, 2019;
Accepted 22 January, 2018

*Corresponding author: Cher-Won Hwang, Global Leadership School, Handong Global University, Pohang 37554, Korea
Phone: +82-54-260-1304
E-mail: chowon@handong.edu

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

Biofilm은 고체 표면에 부착된 미생물과 미생물이 분비한 중합체(EPS; Extracellular Polymeric Substances)의 결합층이다(Kim et al., 2009; Kim et al., 2011).

특히 Biofilm은 숙주의 면역체계, 건조, 항생제, 소독제 등으로부터 박테리아를 보호하고, 강하게 부착되어 있으므로 제거가 어려워 인간이나 가축에게 해가 되며(Jacques et al., 2010), 식품가공환경에서 유해 미생물의 저장소와 같은 역할을 함으로서 환경 보건 상 매우 큰 문제를 야기 할 수 있다. biofilm으로 둘러 싸여져 부착한 세균들은 동일한 균주라 할지라도 부유 상태의 세균보다 항생물질에 대한 저항성이 500배에서 1,000배 정도 더 강한 것으로 나타나며(Choi and Hwang, 2005), 치료를 요하는 세균감염증의 60% 이상이 biofilm 형성과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다(Choi and Hwang, 2005).

대표적인 식중독 유발 미생물로 그람양성균인 *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*와 그람음성균인 *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli O157:H7* 등의 병원균은 대부분 biofilm을 형성할 수 있으며, 식품 등에 강하게 부착한다(Bridier et al., 2015). 이러한 이유로, 식품의 가공 및 보존에 큰 문제가 되고 있다. 최근 식품첨가물은 합성 보존제 보다는 천연 물질을 선호하는데 이는 합성 보존제를 지속적으로 사용할 경우 체내에 축적되어 만성 독성, 발암성, 돌연변이 유발 등의 문제를 일으킬 수 있기 때문이다(Lee et al., 2011). 천연 물질로서 가장 연구가 활발한 물질들은 식물로부터 온 것으로 식물에는 많은 약효 뿐 아니라 항균활성을 가지고 있으며(Mitra and Jens, 2016), 뛰어난 항균활성을 가지는 식물은 biofilm 생성을 저해할 가능성을 내포하고 있다(Niu and Gilbert, 2004; Mitra and Jens, 2016).

Choi and Hwang(2005)의 연구에서는 한국산 무가 항균활성 및 항진균 활성이 있고, 이는 화장품 보존제로 사용되는 메틸파라벤과 유사한 수준이라고 보고하고 있다. Lee et al.,(2011)의 연구에 의하면 마늘과 부추의 항균성이 우수함을 알 수 있다. 하지만 천연 항균물질로 상업화된 제품은 거의 없으며 anti-biofilm에 대한 연구가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 포항노다지마을(주)에서 친환경으로 직접 생산한 농산물 부추, 마늘,

무 등 3종류의 생즙과 분말을 이용하여, 식품 등에 발생할 수 있는 병원균의 anti-biofilm 활성 테스트를 수행함으로써 biofilm 생성 저해능을 비교 연구하였으며, 이를 평가하기 위하여 paper disc assay, MIC assay, XTT assay, Colony Forming Unit (CFU)비교, 현미경 관찰 등의 방법을 사용하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물 추출물 제조

식물 추출물의 제조는 Lee et al.,(2011)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 본 연구에서 사용된 부추, 마늘, 무는 농업회사법인 포항노다지마을(주)에서 친환경으로 직접 생산한 원료를 깨끗이 수세하고 멸균한 분쇄기로 분쇄하였다. 수율을 높이기 위해, 1차 분쇄한 분쇄물 30 mL에 증류수 15 mL (부추: 약 37 - 38 g, 마늘: 약 40 - 41 g, 무: 약 33 - 34 g)를 첨가하여 homogenizer를 이용하여 2차 분쇄하였다. 그 후, 10,000 rpm, 30분간 원심분리한 상등액을 Whatman No.1 페이퍼로 필터한 여과액을 100% 추출물로 사용하였다. 또한, 추출물을 동결건조기를 실시하여 동결건조 된 분말을 사용하였다. 3가지 식물 추출물은 사용 전까지 -20℃에 보관하였고, 각 추출물의 농도별 희석액은 멸균된 증류수를 사용하여 1/2씩 희석하여 제조하였다.

2.2. 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 식중독을 일으키는 대표적인 병원균으로서 그람 양성균으로는 *S. aureus* (ATCC25923), 그람 음성균으로는 *S. typhimurium* (ATCC 13311)과 *E. coli O157:H7* (ATCC 43894)을 사용하였다. 균주배양을 위해 Mueller Hinton Broth (Difco, USA)와 Bacto agar (Difco, USA)를 구입하여 MHB와 MHA로 사용하였다. 이하 *E. coli O157:H7*은 *E. coli* 로 사용한다.

2.3. 항균 활성 측정

부추, 마늘, 무의 추출물과 분말에 대한 항균 활성을 측정하기 위하여 paper disc assay 방법을 사용하였고 방법은 다음과 같다. 식물추출물은 추출물을 100%로 하여 2배(50%)희석하였고, 분말은 증류수를 이용하여 분말을 0.25 g/mL 농도로 맞추고 2배(0.125 g/mL)희석

하여 사용하였다. MHB 에 log phase로 12시간 동안 배양된 각각의 bacterial suspension을 1×10^6 CFU/mL로 조정 후, 100 μ l 를 Mueller Hinton agar plate에 멸균한 면봉으로 도말하였다. 지름이 8 mm인 멸균된 paper disc를 배지에 깔고, 식물 추출물을 50 μ l 씩 흡수시킨 후, 37°C에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 투명한 생육 저해환의 지름을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 대조구는 시료와 동일한 양의 ciprofloxacin (1 mg/mL)을 사용하였다. 각 실험은 세 번씩 수행하였고, clear zone size를 측정하여 평균을 내었다.

2.4. 최소 생육 저해 농도

MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute 가이드라인에 따라 two-fold broth dilution method를 사용하였다(CLSI, 2006). 각각의 균주를 MHB 배지에 1×10^6 CFU/mL로 조절한 후 실험에 사용하였고, 96-well microplate에 100 μ l씩 첨가하였다. 1/2씩 농도별로 희석한 식물 추출물(추출물 : 100% - 0.78%, 분말 : 250 mg/mL - 1.96 mg/mL) 100 μ l를 각 well에 차례대로 첨가하여 총 볼륨이 200 μ l가 되게 하였다. Plate에 뚜껑을 덮어 건조되지 않도록 하고, 37°C에서 24시간 배양하였다(Niu and Gilbert, 2004). 양성대조구로서는 식물 추출물 대신 100 μ l ciprofloxacin (1 mg/mL)을 사용하였으며, 음성대조구로서는 식물 추출물 대신 100 μ l DDW와 bacteria solution대신 100 μ l MHB를 사용하였다. 배양 후, 40 μ l MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) (0.2 mg/mL)를 각 well에 첨가하여 15분간 상온에서 배양하였다. Bacteria가 성장하였으면 pink-red color가 나타나고, bacteria의 생장이 식물 추출물에 의해 저해되었으면 pink-red color가 나타나지 않으므로 색의 변화가 없는 최소 농도를 MIC로 확정하였다(Mitra and Jens, 2016). 각 실험은 세 번씩 수행하였다.

2.5. 바이오필름 대사활성 저해 측정

본 실험에 앞서, 바이오필름 항부착활성 실험을 수행하여 균 생육 농도가 50% 이상의 저해율을 나타낸 식물 추출물(MIC 농도)만을 선별하여 사용하였다. 바이오필름의 대사활성 저해율은 XTT reduction assay를 수행하여 측정하였다. 100 μ l 식물 추출물(MIC 농도)를

96-well plate에 넣고, 100 μ l 1×10^6 CFU/mL 균액을 각 well에 첨가하여 총 양이 200 μ l가 되도록 하였다. 양성대조구는 식물 추출물 대신 100 μ l ciprofloxacin (0.00125 mg/mL; MIC value)를 사용하였으며, 음성대조구로는 100 μ l MHB를 사용하였다. 영점으로는 균을 접종하지 않은 200 μ l의 MHB를 사용하였다. Plate는 bacteria cell이 표면에 부착하여 biofilm 형성이 되도록 하기 위해 shaking 없이 37°C에서 24시간 배양되었다. 배양 후, 96-well의 내용물을 제거하고 약하게 부착된 cell들을 제거하기 위하여 PBS로 3번 washing하였다. XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxamide)를 PBS에 1 mg/mL이 되게 녹이고, filter 후 -80°C에 보관하였다. Menadione은 아세톤에 1 mM가 되게 녹이고 각 실험 전에 즉시 filter하였다. XTT/menadione 시약의 working solution은 12.5 : 1의 비율로 실험 전에 fresh하게 제조하였다. Washing 후에, PBS 100 μ l를 96-well plate의 각 well에 첨가하고, 13.5 μ l XTT/menadione mixture를 각 well에 첨가하였다. Plate를 부드럽게 한번 흔든 후, 호일로 감싸 암소가 되게 하여 37°C에서 2 - 3시간 배양하였다. Absorbance를 492 nm의 파장에서 측정하였다. 각 실험은 세 번씩 수행하였고, 저해율을 아래와 같이 계산하였다(Mitra and Jens, 2016).

Percentage Inhibition

$$= \frac{[OD_{\text{Negativecontrol}} - OD_{\text{Experimental}}]/OD_{\text{Negativecontrol}}}{\times 100}$$

2.6. 현미경 관찰

식물 추출물의 biofilm저해활성을 현미경 관찰을 통해 살펴보았으며, Bridier et al.,(2015) 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 수행하였다. Round cover glass slide (ϕ 12 mm)를 24-well polystyrene plate의 각 well에 올리고, 균 배양액 100 μ l (10^6 CFU/mL)와 100 μ l 식물 추출물(MIC농도, $2 \times$ MIC 농도)을 첨가하였다. 식물 추출물은 항부착 실험에서 균 생육 농도가 50% 이상의 저해도를 나타낸 식물 추출물을 사용하였으며, 양성대조구와 음성대조구는 앞의 실험과 동일하게 수행하였다. 뚜껑을 덮고 37°C에서 24시간 배양 후 1/20 Giemsa (Sigma, Switzerland) 용액(v/v)으로 20분간 상온에서

염색하였다. Stained glass piece를 slide 위에 올리고, 형성된 biofilm을 광학현미경 40배율로 관찰하였다.

2.7. Biofilm 내 생균수 측정

Biofilm 감소가 항균 효과에 인한 것 인지, anti-biofilm 효과인지 알기 위하여 마늘과 anti-biofilm 효능이 없다고 알려진 ciprofloxacin을 추가해 균 biofilm을 키워 CFU을 비교하였다. *E. coli*와 *S. aureus*는 MIC 절반 농도의 마늘 추출액을 첨가해서 5 mL MHB에 37°C로 24시간동안 배양했다. CFU 비교는 planktonic biofilm CFU와 biofilm 만의 CFU를 비교했다. Planktonic biofilm CFU 측정 경우 tube를 PBS로 3번 씻어내고 4번째 PBS를 넣어준 후 1분 동안 vortex와 sonication을 진행해준다. 이후 다시 1분 동안 vortex를 진행해준다(Mandakhalikar et al., 2018). Biofilm만의 CFU 경우 PBS 1분 동안 vortex와 sonication을 진행하고 다시 1분 동안 vortex를 진행해준다. Planktonic biofilm의 CFU와 biofilm의 CFU는 MHA배지에서 배양 후 counting을 진행했다. 각 실험은 세 번씩 수행하였고, biofilm내의 생균수 비율을 아래와 같이 계산하였다. 마늘을 ciprofloxacin으로 교체해 MIC 절반 농도에서 같은 실험을 반복했다.

$$\text{Biofilm proportion percentage} = [\text{CFU}_{\text{biofilm}} / (\text{CFU}_{\text{biofilm}} + \text{CFU}_{\text{planktonic}})] \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균 활성

본 연구에서 선택한 식용식물들의 항균활성을 알아보기 위해 paper disc 실험을 수행하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Paper disc assay 결과, 무 추출물을 제외한 추출물에서 강한 항균활성이 나타났다. *S. aureus*에 대한 100% 마늘 추출물의 inhibition zone 크기는 평균 39 mm로서, 양성대조구(ciprofloxacin 1 mg/mL, 37.2 mm) 대비 4.8% 증가하였다. 추출물 중에서는 마늘이 가장 강한 항균활성을 나타냈고, 다음으로 부추, 무의 순서였다. 마늘 추출물은 다른 두 식물에 비해 추출물과 분말 모두 증류수와 추출물 또는 분말을 섞은 수용액 solution에서 더 강한 항균활성을 보였다.

Table 1. Antimicrobial activities (inhibition zone diameter) of the plant extracts against 3 foodborne pathogens

Microorganism	Vegetables	Concentration	Clear zone (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive control	1 mg/mL	37.2 (100%)
	Chives juice	100%	27.7 (74.5%)
		50%	21.5 (57.8%)
	Garlic juice	100%	39.0 (104.8%)
		50%	28.0 (75.3%)
	Radish juice	100%	8.3 (22.3%)
		50%	- (0%)
	Chives powder	0.25 g/mL	9.2 (24.7%)
		0.125 g/mL	- (0%)
	Garlic powder	0.25 g/mL	24.0 (64.5%)
		0.125 g/mL	16.8 (45.2%)
	Radish powder	0.25 g/mL	9.9 (26.6%)
0.125 g/mL		- (0%)	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Positive control	1 mg/mL	45.5 (122.3%)
	Chives juice	100%	27.3 (73.4%)
		50%	19.0 (51.1%)
	Garlic juice	100%	35.7 (96.0%)
		50%	30.3 (81.5%)
	Radish juice	100%	- (0%)
		50%	- (0%)
	Chives powder	0.25 g/mL	10.0 (26.9%)
		0.125 g/mL	- (0%)
	Garlic powder	0.25 g/mL	27.3 (73.4%)
		0.125 g/mL	22.2 (59.7%)
	Radish powder	0.25 g/mL	9.0 (24.2%)
0.125 g/mL		- (0%)	
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Positive control	1 mg/mL	39.0 (104.8%)
	Chives juice	100%	20.3 (54.6%)
		50%	17.2 (46.2%)
	Garlic juice	100%	28.0 (75.3%)
		50%	24.7 (66.4%)
	Radish juice	100%	- (0%)
		50%	- (0%)
	Chives powder	0.25 g/mL	8.75 (23.5%)
		0.125 g/mL	- (0%)
	Garlic powder	0.25 g/mL	21.0 (56.5%)
		0.125 g/mL	14.7 (39.5%)
	Radish powder	0.25 g/mL	9.2 (24.7%)
0.125 g/mL		- (0%)	

Positive control is ciprofloxacin

Table 2. MIC value of different plant extracts against 3 foodborne pathogens

Plants	Extracts	MIC value concentration (mg/mL, % for juice)		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli O157: H7</i>
Garlic	juice	3.125%	6.25%	12.5%
	powder	15.625mg/mL	7.812mg/mL	15.625mg/mL
Chives	juice	12.5%	25%	25%
	powder	62.5mg/mL	62.5mg/mL	62.5mg/mL
Radish	juice	25%	50%	100%
	powder	15.625mg/mL	31.25mg/mL	31.25mg/mL

Kim and Park(1995)은 본 결과에서 나타난 것과 같이 젖산균인 *Lactobacillus mesenteroides*에 대해 마늘이 부추에 비해 높은 항균력을 나타낸다는 유사한 경향을 보고하였다. 그러나 Lee et al.(2004)은 미호기성 균주인 *Campylobacter* 6종에 대해 마늘보다 부추가 높은 항균력을 나타낸다고 보고하였다. 따라서 항균활성을 보여주는 식품소재 및 성분은 사용한 균종의 특성 뿐 아니라 배양 조건 등의 환경적인 요인에 의해 활성의 발현 정도가 달라질 수 있음을 알 수 있다(Lee et al., 2011). 분말 성분의 항균활성은 마늘, 무, 부추의 순서로 나타났다. 무 추출물은 *S. aureus*에 대해서만 항균활성을 보이는 반면에, 분말은 모든 균에 대해 clear zone을 형성하였다. 이는 무가 수분을 다량 함유하고 있기 때문에 농축된 분말 성분에 비해 추출물에서 항균활성이 낮은 것으로 판단된다. 각 식물추출물의 항균활성은 농도 의존적으로 증가했고, 일반적으로 그람 음성균인 *S. typhimurium*과 *E. coli*에 비해 그람 양성균인 *S. aureus*에 더 효과적이었다. 이러한 결과는 마늘과 부추가 그람음성균보다 그람양성균에 대하여 생육억제효과가 더 우수하다는 Lee 등의 연구결과와 유사한 것이다(Lee et al., 2011).

3.2. 최소 생육 저해 농도

본 실험에서 사용된 식물 추출물의 항균활성 효과에 기인하여 이들의 MIC 농도 측정결과를 Table 2에 나타내었다. Paper disc assay결과와 유사하게 마늘 추출물이 부추와 무에 비해 가장 낮은 MIC 농도를 나타내었다. 마늘 분말 성분의 MIC값은 *S. typhimurium*에서는 7.81 mg/mL이었으며 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해서는 15.625 mg/mL를 나타내는 등 부추 분말, 무 분말에 비해 2 - 4배 정도 낮은 값을 나타내었다. 무의 추출물은

MIC 농도가 25 - 100%로 부추, 마늘 추출물에 비해 낮은 항균활성을 나타냈다. 하지만 무 분말은 MIC 농도가 15.625 - 31.25 mg/mL로서 부추 분말보다 더 낮은 농도에서 균의 생육을 저해하였다.

*S. typhimurium*에 대한 마늘 분말의 MIC (7.81 mg/mL) 경우를 제외하고는 모든 식물 추출물은 그람 음성균인 *S. typhimurium*과 *E. coli*보다 그람 양성균인 *S. aureus*에서 더 낮은 MIC 농도를 나타냈다. 이것은 그람 음성균의 세포외막의 구조적 특성이 항균물질에 저항성을 갖기 때문으로 여겨진다(Mitra and Jens, 2016).

3.3. Biofilm 대사활성 저해 (XTT reduction assay)

Biofilm 대사활성 저해평가를 위해 각 균에 대한 항부착 활성(Crystal Violet assay)을 테스트하였으며, 8시간 동안 배양했을 때 biofilm부착 저해능이 50% 이상인 식물 추출물만을 선별하여 XTT reduction assay를 수행하였다. Fig. 1의 결과에서와 같이 식물 추출물은 *S. aureus*에서 42.2 - 93.6%, *S. typhimurium*에서 29.1 - 88.3%, *E. coli* 에서 91.0 - 96.7%를 나타내는 등 대사활성을 대체적으로 잘 저해하였다. 식물 추출물 중에서, 마늘 추출물과 분말 성분은 모든 균에서 50% 이상의 저해율을 나타내며 효과적으로 cell의 대사활성을 감소시켰다. *S. aureus*의 경우, 마늘 분말이 97.6%의 저해율을 나타내어 가장 효과가 좋았고, 다음으로 마늘 추출물(73.3%), 부추 추출물(42.4%)의 순서였다. *S. typhimurium*에서는 부추 추출물(88.3%)이 가장 강력한 항바이오필름 활성을 나타냈고, 다음으로 마늘 추출물(78.4%), 마늘 분말(72.6%)의 순서로 저해능을 나타내었다. 무 추출물은 29.1%의 저해율만을 나타내는 등 anti-biofilm 활성이 현저히 떨어졌다. *E. coli*에서는 다른 균주에 비해

식물 추출물의 저해 효과가 모두 90% 이상으로서 상대적으로 높게 나타났다. 이는 *E. coli*에 식물 추출물 대신 배지를 첨가한 음성대조구에서 균이 매우 빠르게 많이 증식하였고, 균에 대한 식물 추출물의 MIC농도가 다른 균주에 비해 매우 높기 때문에 형성된 biofilm에 비해 제거효율이 상대적으로 높은 것으로 사료된다. 이와 같이 식물 추출물의 anti-biofilm 활성은 균에 따라 다르게 나타났다. Mitra and Jens(2016)의 연구에서는 biofilm 대사활성의 감소가 추출물의 항균 및 anti-biofilm활성 뿐 아니라, 영양분과 산소의 공급이 결여되기 때문으로 보고하기도 하였다.

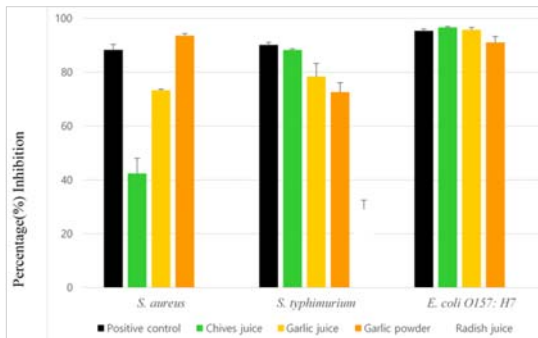


Fig. 1. Effect of different plant extracts on biofilm formation (growth and development).

3.4. 현미경 관찰

식물 추출물의 biofilm 저해 효과가 실제로 영향을 미치는지 알아보기 위해 현미경 관찰을 수행하였으며, 결과를 Fig. 2 - 4에 나타내었다.

현미경 관찰 결과는 XTT reduction assay결과와 매우 유사하게 나타났다. Fig. 2에 나타난 것과 같이 MIC 농도일 때 마늘 분말은 마늘 추출물에 비해 *S. aureus*의 biofilm 형성에 더 큰 저해활성을 나타냈다. 또한 MIC 농도를 2배로 하였을 때, 마늘 분말은 양성대조구인 ciprofloxacin보다 더 뛰어난 제거 효과를 나타내었다. Fig. 3의 *S. typhimurium*에서는 부추 추출물이 가장 뛰어난 anti-biofilm 활성을 나타낸 것을 관찰 할 수 있었고, *S. aureus*와 달리 마늘 추출물이 마늘 분말보다 더 효과적이었다. MIC농도에서 부추 추출물은 마늘 추출물과 비슷한 수준으로 저해하는 것처럼 보이나 MIC의 2배 농도에서는 부추 추출물이 더 뛰어난 활성을 나타냈고, 이

는 양성대조구 MIC의 2배 농도와 비슷한 수준이었다. Fig. 4의 *E. coli*의 경우에는 음성대조구에서 biofilm 형성이 상당히 많은 것을 알 수 있었고 다른 2 균주에 비해 각 식물 추출물의 저해 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다. 이는 앞서서도 언급했다시피, *E. coli*에 대한 식물 추출물의 MIC 농도가 높아 anti-biofilm 물질이 더 많을 것으로 생각되며, 음성대조구에서 biofilm이 많이 형성되었기 때문에 상대적인 제거능이 뛰어난 것으로 나타났다.

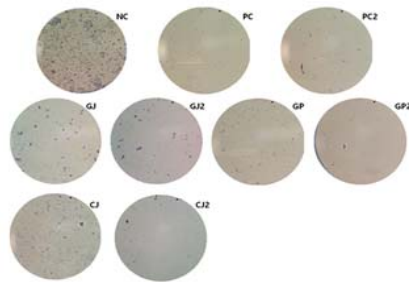


Fig. 2. Microscopic visualization of effect of different plant extracts on biofilm formation by *S. aureus* (growth and development). NC, negative control (non-treated slides); PC, positive control (ciprofloxacin at MIC); PC2(ciprofloxacin at $2 \times$ MIC); GJ, garlic juice at MIC; GJ2, garlic juice at $2 \times$ MIC; GP, garlic powder at MIC; GP2, garlic powder at $2 \times$ MIC; CJ, chives juice at MIC; CJ2, chives juice $2 \times$ MIC. Magnification, $\times 40$.

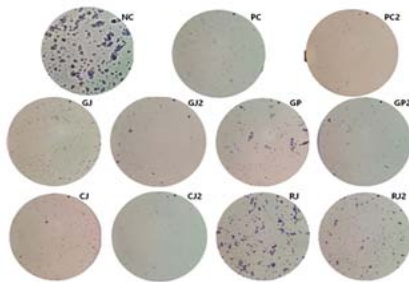


Fig. 3. Microscopic visualization of effect of different plant extracts on biofilm formation by *S. typhimurium* (growth and development). NC, negative control (non-treated slides); PC, positive control (ciprofloxacin at MIC); PC2(ciprofloxacin at $2 \times$ MIC); GJ, garlic juice at MIC; GJ2, garlic juice at $2 \times$ MIC; GP, garlic powder at MIC; GP2, garlic powder at $2 \times$ MIC; CJ, chives juice at MIC; CJ2,

chives juice 2 × MIC; RJ, radish juice at MIC; RJ2, radish juice at 2 × MIC. Magnification, × 40.

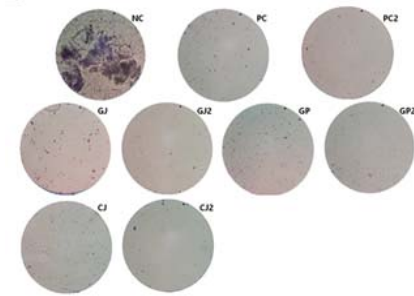


Fig. 4. Microscopic visualization of effect of different plant extracts on biofilm formation by *E. coli* O157:H7 (growth and development). NC, negative control (non-treated slides); PC, positive control (ciprofloxacin at MIC); PC2(ciprofloxacin at 2 × MIC); GJ, garlic juice at MIC; GJ2, garlic juice at 2 × MIC; GP, garlic powder at MIC; GP2, garlic powder at 2 × MIC; CJ, chives juice at MIC; CJ2, chives juice 2 × MIC. Magnification, × 40.

3.5. Biofilm안에 생균 CFU 비교

마늘 추출물의 그람 양성균과 음성균에 대한 biofilm 대사 활성의 감소가 anti-biofilm활성에 의한 것인지 확인하기 위해 그람 음성균으로 *E. coli*, 그람 양성균으로 *S. aureus*균을 사용하여 생균수를 비교 실험한 결과를 Fig. 5에 나타내었으며, 마늘 추출물을 첨가한 *E. coli*의 총 생균수는 5.6×10^9 CFU/mL이며, biofilm를 형성한 생균수는 4.5×10^7 CFU/mL로 0.8%가 biofilm을 형성하였으며, 99.2%는 biofilm을 형성하지 못하였다. 또한 양성 대조구인 ciprofloxacin을 첨가한 경우 *E. coli*의 총 생균수는 9.0×10^8 CFU/mL이며, biofilm를 형성한 생균수는 4.5×10^7 CFU/mL로 5.0%가 biofilm을 형성하였으며, 95%는 biofilm을 형성하지 못하였다. 따라서, 마늘 추출물은 ciprofloxacin 보다 biofilm 형성을 억제하는 경향을 확인 할 수 있었다. 그리고 *S. aureus* 경우 마늘 추출물을 첨가한 후 총 생균수가 2.7×10^9 CFU/mL인 반면에, biofilm를 형성한 생균수는 5.9×10^7 CFU/mL로 2.2%가 biofilm을 형성하였고 97.8%는 biofilm을 형성하지 못하였다. Ciprofloxacin 첨가했을 때 *S. aureus* 총 생균수는 1.6×10^9 CFU/mL인 반면에, biofilm를 형성한 생균수는 2.5×10^6 CFU/mL로 0.2%

가 biofilm을 형성하였으며, 99.8%가 biofilm을 형성하지 못하는 것으로 확인하였다 (Figure 5).

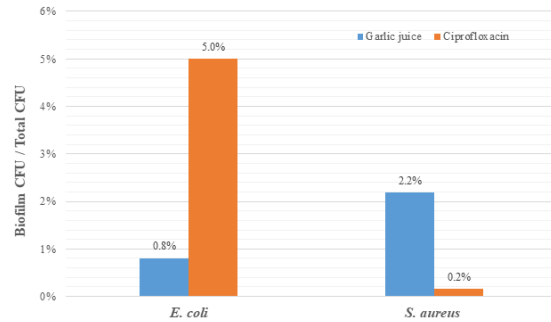


Fig. 5. The value of biofilm proportion percentage on garlic juice against environment harmful bacteria.

마늘 추출물을 첨가했을 때 *E. coli*의 biofilm의 형성은 저해되었지만 *S. aureus*의 biofilm저해에는 크게 영향을 주지 못했다. 마늘 추출액을 첨가했을 때 *Pseudomonas aeruginosa* 같은 그람 음성균에 대한 quorum sensing에서 아실호모세린락톤(acyl homoserine lactones)을 분비하고, 그람 음성균의 biofilm 형성 작용을 억제한다(Harjai et al., 2010). 그람 음성균에 대한 quorum sensing에서 알리신의 억제 효과는 아실화된 호모세린 락톤 동족 수용체의 결합을 조절하거나, AHL의 형성을 억제하거나 혹은 quorum sensing 유전자의 발현을 억제 할 수도 있다(Lihua et al., 2013). 알리신이 biofilm 형성 작용에서 acylated homoserine lactone 경로에 영향을 끼치는 것이라면, 본 실험에서 *S. aureus*의 biofilm형성이 마늘 추출액에 의해 억제 되지 않은 점을 설명 할 수 있다. 알리신은 그람 양성균에서는 acylated homoserine lactone이 발견 되지 않으며, 그렇기 때문에 그람 양성균의 biofilm 형성 작용은 억제하지 못하는 것이다(Biswa and Doble, 2013).

4. 결론

뛰어난 항균활성을 가지는 식물은 biofilm 저해할 가능성을 포함하고 있으나, 천연 항균물질로 상업화된 상품은 거의 없으며 anti-biofilm에 대한 연구가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식물 추출물들의 anti-biofilm 활성 테스트를 수행함으로써 천연 보존제와 식품

첨가물로서의 가능성을 검토하였다. 이를 위해 paper disc assay, MIC assay, XTT assay, 현미경 관찰, Colony forming unit (CFU)비교 등의 방법을 사용한 결과는 다음과 같다.

1. Paper disc assay 결과 무 추출물을 제외한 추출물에서 *S. aureus*에 대한 100% 마늘 추출물의 inhibition zone 크기는 평균 39 mm로서, 양성대조구(ciprofloxacin 1 mg/mL, 37.2 mm) 대비 4.8% 증가하여 가장 강한 항균활성이 나타났다.

2. MIC 농도 측정결과 마늘 분말 성분의 MIC값은 *S. typhimurium*에서는 7.81 mg/mL이었으며 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해서는 15.625 mg/mL를 나타내는 등 부추 분말, 무 분말에 비해 2 - 4배 정도 낮은 값을 나타내었다.

3. XTT assay결과 식물 추출물은 *S. aureus*에서 42.2 - 93.6%, *S. typhimurium*에서 29.1 - 88.3%, *E. coli*에서 91.0 - 96.7%를 나타내는 등 대사활성을 대체적으로 잘 저해하였다.

4. 현미경 관찰 결과 MIC 농도일 때 마늘 분말은 마늘 추출물에 비해 *S. aureus*의 biofilm 형성에 더 큰 저해활성을 나타냈다. 또한 MIC 농도를 2배로 하였을 때, 마늘 분말은 양성대조구인 ciprofloxacin보다 더 뛰어난 제거 효과를 나타내었다. *S. typhimurium*에서는 부추 추출물이 가장 뛰어난 anti-biofilm 활성을 나타낸 것을 관찰할 수 있었고, *S. aureus*와 달리 마늘 추출물이 마늘 분말보다 더 효과적이었다. MIC농도에서 부추 추출물은 마늘 추출물과 비슷한 수준으로 저해하는 것처럼 보이나 MIC의 2배 농도에서는 부추 추출물이 더 뛰어난 활성을 나타냈고, 이는 양성대조구 MIC의 2배 농도와 비슷한 수준이었다. *E. coli*의 경우에는 음성대조구에서 biofilm 형성이 상당히 많은 것을 알 수 있었고 다른 균주에 비해 각 식물 추출물의 저해 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

5. 마늘 추출물의 biofilm 형성 억제효과는 *E. coli* 경우 biofilm를 형성한 생균수는 4.5×10^7 CFU/mL로 0.8%가 biofilm를 형성하였으며, 99.2%는 biofilm를 형성하지 못하였다. 또한 양성대조구인 ciprofloxacin을 첨가한 경우 *E. coli*의 총 생균수는 9.0×10^8 CFU/mL이며, biofilm를 형성한 생균수는 4.5×10^7 CFU/mL로 5.0%가 biofilm를 형성하였으며, 95%는 biofilm를 형성하지 못하였다. 따라서, 마늘 추출물은 ciprofloxacin보다 biofilm 형성을 억제하는 경향을 확인 할 수 있었다.

그리고 *S. aureus* 경우 마늘 추출물을 첨가한 후 총 생균수가 2.7×10^9 CFU/mL인 반면에, biofilm를 형성한 생균수는 5.9×10^7 CFU/mL로 2.2%가 biofilm를 형성하였고 97.8%는 biofilm를 형성하지 못하였다. Ciprofloxacin 첨가했을 때 *S. aureus* 총 생균수는 1.6×10^9 CFU/mL인 반면에, biofilm를 형성한 생균수는 2.5×10^6 CFU/mL로 0.2%가 biofilm를 형성하였으며, 99.8%가 biofilm를 형성하지 못하는 것으로 확인하였다

이상에서와 같이 본 연구를 통하여 국내 식용식물의 항균활성 및 anti-biofilm 활성을 비교한 결과 환경유해 미생물균인 식중독균에 대해 biofilm 형성과 생장을 잘 저해함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 마늘과 부추 등을 식품 가공 시스템에서 식중독균의 성장을 막고 가공식품의 유통기한을 연장시키는 데 이용될 수 있는 천연 식품 첨가제로서 활용할 수 있을 것으로 생각하며, 우리 농산물의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구 사업이며 (2017 R1D1A1B03032867) 또한 이 논문의 작성과 실험 재료를 제공한 사회적기업 농업회사법인 포항노다지마을(주)에 감사드립니다.

REFERENCES

- Biswa, P., Doble, M., 2013, Production of acylated homoserine lactone by gram positive bacteria isolated from marine water, FEMS Microbiol Letters, 343(1), 34-41.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naitali, M., Briand, R., 2015, Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens, Food Microbiology, 45(B), 167 - 178.
- Choi, Y. H., Hwang, C. Y., 2005, The biological properties of Korean radish (*Raphanus sativus* L.) and its seed protein as a natural preservative: The influences on antigenotoxicity and cytotoxicity, Korean journal of Life Science, 15(4), 561-565.
- CLSI., 2006, Methods for dilution antimicrobial

- susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard (seventh ed.) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA M7 - A7.
- Harjai, K., Kumar, R., Singh, S., 2010, Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 58(2), 161-168.
- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y. D. N., 2010, Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Animal Health Research Reviews, 11(2), 97-121.
- Kim, J. Y., Yoo, H. L., Lee, Y. D., Park, J. H., 2011, Detection of bacillus cereus group from raw rice and characteristics of biofilm formation, The Korean Journal of Food and Nutrition, 24(4), 657-663.
- Kim, S. H., Chon, H. T., Lee, J. U., 2009, Removal of dissolved heavy metals through biosorption onto indigenous bacterial biofilm developed in soil, Economic and Environmental Geology, 42(5), 435-444.
- Kim, S. J., Park, K. H., 1995, Antimicrobial activities of the extracts of vegetable *Kimchi* stuff, Korean Journal of Food Science and Technology, 27(2), 216-220.
- Lee, C. F., Han, C. K., Tsau, J. L., 2004, In vitro inhibitory activity of Chinese leek extract against *Campylobacter* species. International Journal of Food Microbiology, 94(2), 169-174.
- Lee, E. H., Jang, K. I., Bae, I. Y., Lee, H. G., 2011, Antibacterial effects of Leek and Garlic Juice and Powder in mixed strains system, Korean Journal of Food Science and Technology, 43(4), 518-523.
- Lihua, L., Jianhuit, W., Jialini, Y., Yayin, L., Guanxin, L., 2013, Effects of allicin on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors, Polish Journal of Microbiology, 62(3), 243-251.
- Mandakhalikar, K. D., Rahmat, J. N., Chiong, E., Neoh, K. G., Shen, L., Tambyah, P. A., 2018, Extraction and quantification of biofilm bacteria: Method optimized for urinary catheters. Scientific Reports, 8(1), doi:10.1038/s41598-018-26342-3.
- Mitra, M. B., Jens, R., 2016, Antibiofilm activity of essential oils, and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms, Food Control, 61, 156-164.
- Niu, C., Gilbert, E. S., 2004, Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure, Applied and Environmental Microbiology, 70, 6951-6956.
-
- 강은진, 한동대학교 생명과학부 연구원
kejin0410@hanmail.net
 - 박지현, 한동대학교 생명과학부 대학원생
21732004@handong.edu
 - 진슬, 한동대학교 생명과학부 석사과정
21200747@handong.edu
 - 김영록, 한동대학교 생명과학부 박사과정
fred87@nate.com
 - 도형기, 한동대학교 생명과학부 교수
hkdo@handong.edu
 - 양용석, 포항노다지마을(주) 연구소장
yangws91@naver.com
 - 이재용, 경운대학교 항공신소재공학과 교수
geoblue@ikw.ac.kr
 - 황철원, 한동대학교 GLS학부 교수
chowon@handong.edu