

Tuberostemonine에 의한 *Staphylococcus aureus*의 생물막 억제 효과

염수진¹ · 김승민² · 권준혁¹ · 정희곤^{1,*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과, ²한국방송통신대학교 자연과학대학 생활과학부

Inhibitory effects of tuberostemonine on *Staphylococcus aureus* biofilm

Su Jin Yum¹, Seung Min Kim², Jun Hyeok Kwon¹, and Hee Gon Jeong^{1,*}

¹Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

²Department of Human Ecology, Korea National Open University

Abstract Antibiotic resistance is a serious problem to food safety as well as human healthcare. To avoid this, there are several approaches for a new class of antibiotic agents that target only production of virulence factors such as biofilm without bacterial growth defect. The objective of this study was to investigate the antibiofilm activity of tuberostemonine in *Staphylococcus aureus*. Tuberostemonine significantly reduced the biofilm formation (26.07-47.02%) in the crystal violet assay whereas there were no effect on *S. aureus* growth. The dispersion in preformed biofilm was also observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Quantification real-time PCR revealed that the *icaA* and *agrA* expression having an important role in biofilm production of *S. aureus* were strongly affected with tuberostemonine. These results suggest that tuberostemonine has potential for controlling biofilm formation and dispersion by effect on virulence regulation of *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, tuberostemonine, biofilm, antibiofilm agent, food-borne pathogen

서 론

식품으로 인한 질병이나 위해는 과학과 식품 안전 관련 기술의 발달에도 불구하고 전 세계적으로 꾸준히 일어나고 있으며, 특히 식중독의 발병은 식생활 패턴의 변화, 기후 변화, 면역력이 약화된 노령 인구의 증가 등으로 인해 꾸준히 증가하고 있다 (Newell 등, 2010). 이러한 식중독의 원인에는 물리적, 화학적, 생물학적 위해인자들이 있으며, 이중 생물학적 위해인자에 의한 발생은 전체의 식중독의 52%를 차지할 정도로 높은 비율을 차지한다 (Dewey-Mattia 등, 2018). 특히 pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* 등 식중독균들(food-borne pathogenic bacteria)은 대표적인 생물학적 위해인자로서 식중독 유발의 주요 원인이므로, 이들에 대한 제어 기술 개발이 지속적으로 필요하다 (Jung 등, 2016).

세균에 의해 합성되는 생물막(biofilm)은 항생제를 포함한 다양한 환경적 스트레스에 저항하는 기작의 일환으로 세균이 세포 외부에 합성하는 구조체이다. 다당류(polysaccharide)를 주성분으로 다양한 단백질과 핵산, 지방 및 복잡한 단당류 등을 재료로 이용하여 합성되며 (Vu 등, 2009), 주변 영양 성분, 세균 흡착 표면 특성, 온도, pH 등 환경적 요인이 생물막 형성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Götz, 2002). 특히 식중독균이 생물막을 합성할

경우 항생제를 포함한 다양한 항균물질들과 기타 제어 기술들의 효과가 현저히 감소되기 때문에 (Rodríguez-Martínez와 Pascual, 2006), 최근 생물막의 합성을 저해하거나 형성된 생물막을 분해하는 기술과 관련된 연구들이 진행되고 있다.

식중독균이 환경에서 추구하는 궁극적인 목표는 개체 증식(multiplication)이며 숙주에 병을 일으키는 것은 개체 증식 과정에서 발생하는 부수적인 현상이다. 지금까지의 식중독균에 대한 제어 기술은 대부분 생장을 저해하고 사멸시키는 것을 주요한 목표로 온도, 삼투압, pH, 자외선, 산화스트레스, 항균물질 등을 식중독균에 처리하는 방식으로 발전해 왔다 (Gurunathan 등, 2012; Ross 등, 2003; Zhang 등, 2019). 그러나 식중독균의 생물막이 형성되어 있거나 적절한 제어 기술이 적용되지 못할 경우 오히려 스트레스에 대한 내성(resistance)이 발생할 수 있어 이에 대한 특별한 주의를 요한다. 특히 항생제 내성(antimicrobial resistance) 발생은 식품안전뿐만 아니라 국민 보건상의 커다란 문제를 야기할 수 있어 심각한 문제로 여겨진다. 따라서 내성 발생 가능성을 최소화하기 위해 식중독균의 생장을 저해하지 않는 반면, 발병 및 환경적 스트레스에 대한 저항과 관련된 인자들의 생산만을 제어하는데 기반을 둔 새로운 식중독균 제어 기술의 개발이 주목받고 있다 (Andries 등, 2005; Van Hung와 Morita, 2005).

본 연구의 목적은 식중독균의 생물막 저해효과가 있으나 생장에는 영향이 없어 내성의 발생 가능성이 적은 물질을 발굴하는 것이다. 이를 위해 대표적 식중독균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 생장과 생물막에 대한 tuberostemonine (C₂₂H₃₃NO₄)의 효과를 규명하였다. Tuberostemonine은 'Baekbu'로 알려진 식물인 *Stemona tuberosa*과 *Stemona sessifolia*의 뿌리에서 발견된 alkaloids 구조의 독성이 없는 천연화합물질로서 전통적으로 중국을 포함한 동아시아 지역에서 약재로 소비되어왔다. 이성질체로

*Corresponding author: Hee Gon Jeong, Ph. D., Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
Tel: +82-42-821-6726

E-mail: jeonghg@cnu.ac.kr

Received March 22, 2022; revised April 5, 2022;

accepted April 5, 2022

는 tuberostemonine, tuberostemonine A, neotuberostemonine 등이 있으며 이들의 항염, 면역조절, 친식 억제, 살충 등의 효과가 보고된 바 있다(Brem 등, 2002; Greger, 2019; Jang 등, 2014; Jung 등, 2016).

*S. aureus*은 자연계에 널리 분포되어 있는 대표적인 식중독균으로 환경뿐만 아니라 인간의 신체 중 피부, 비강, 인후두부, 털 등에도 존재하며, 조직 감염이나 수술 후 창상 감염 등을 일으키거나 장독소를 생산하는 능력이 있다(Fetsch와 Johler, 2018). *S. aureus*에 의해 형성된 생물막은 다양한 환경적 스트레스에 저항성이 강해 식품의 생산 및 조리 시설, 장비 등에서의 제거가 어렵다(Di Ciccio 등, 2015). 특히 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)는 지역 환경과 병원에서 검출된 *S. aureus* 중 높은 비율을 차지하고 있으며, 이들은 미생물 자체의 항생제 내성 증가뿐만 아니라 내성 인자의 전이와 같은 문제를 야기한다(da Cunha 등, 2020).

본 연구에서는 MRSA에 대한 tuberostemonine의 항균 및 생물막 저해효과를 평가하였다. 항균활성은 planktonic culture를 통해 확인되었으며, 생물막 형성 저해와 분해 효과는 crystal violet과 confocal laser scanning microscopy를 통해 확인되었다. 또한 tuberostemonine의 항생물막 활성화와 작용기작에 대한 이해를 위하여 tuberostemonine처리 후 유전자 발현 정도를 평가하였다. 본 연구에서 개발된 tuberostemonine를 활용한 식중독균 제어 기술은 생물막이 형성된 경우에 한계가 있었던 기존 식중독균 제어 기술과 함께 활용 시에 *S. aureus*에 의해 발생할 수 있는 다양한 식품안전관련 문제 예방 및 해결 방안이 될 수 있으리라 기대된다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 임상검체에서 동정된 표준균주인 methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 25923 (MRSA)으로 Luria-Bertani (LB, Difco Inc., Detroit, MI, USA)배지에서 37°C의 호기적 조건으로 배양되었다. 항균효과 실험에서 *S. aureus* ATCC 25923는 8시간 진탕배양(200 rpm) 되었으며, 항생물막 실험에서 생물막 형성을 위해 24시간 정지배양 되었다. 생물막 저해효과 탐색은 1% glucose (Dextrose Glucose, Difco Inc., Detroit, MI, USA)를 첨가한 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Inc., Detroit, MI, USA) 배지에서의 배양을 통해 확인하였다(Shrestha 등, 2016).

Tuberostemonine stock solution

Tuberostemonine은 ChemFaces Biochemical Co., Ltd, (Wuhan, China)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 녹여 10 mM stock (2% final DMSO concentration)을 만든 후 -20°C에서 보관하며 실험에 사용되었다.

S. aureus ATCC 25923 생장에 대한 tuberostemonine의 효과 측정

S. aureus ATCC 25923는 LB 배지에서 흡광도(O.D._{600 nm}) 값 0.8 (log phase, 9.03×10⁸ CFU/mL)까지 배양되었다. DMSO(대조군) 또는 다양한 농도의 tuberostemonine (실험군, 50-200 μM)는 균주 배양액에 첨가되었다. 배양액의 흡광도 값은 UV/VIS spectrophotometer (1510 Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 2시간 간격으로 측정되었다.

Tuberostemonine의 *S. aureus* 생물막 형성 억제 효과 측정

S. aureus ATCC 25923의 생물막 형성 억제 효과는 crystal violet assay법을 통해 확인하였다(Meng 등, 2016). *S. aureus*는 1% glucose를 첨가한 TSB에 접종 후 37°C에서 16시간 동안 pre-culture하였다. 배양액(1.20×10⁵ CFU/mL)은 천연화합물이 5 μL씩 분주된 96 well-plate (96 well cell culture plates, SPL Life Sciences Co., Ltd., Pocheon, Korea)에 각 well 마다 195 μL씩 접종 되었으며, 생물막 형성을 위해 37°C에서 24시간 동안 정지 배양되었다. 액체 배지 제거 후 각 well은 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) buffer로 3회 세척하였다. 형성된 생물막은 60°C에서 10분간 건조하여 고정되었으며, 1.5% crystal violet (B11602, YD Diagnostics Co., Yongin, Korea) 첨가 후 clean bench (CHC-777A2, CHC LAB, Daejeon, Korea)에서 30분 동안 염색되었다. 염색에 이용된 잔여 crystal violet 제거를 위해 PBS buffer로 3회 세척되었으며, 생물막 형성량은 95% ethanol (200 μL, Samchun, Pyongtak, Korea)로 10분간 용해 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 측정을 통해 정량하였다.

Tuberostemonine 처리에 따른 생물막 분해 효과 측정

Tuberostemonine의 생물막 분해 효과를 측정하기 위하여, crystal violet assay방법과 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM, LSM5 live configuration variotwo VRGB, Zeiss, Jena, Germany)을 통해 3차원적으로 관찰하였다. Crystal violet assay를 위해 *S. aureus*는 형성 저해 효과 측정과 동일하게 1% glucose를 첨가한 TSB 배지에서 16시간 동안 pre-culture하였다. 배양액 (1.20×10⁵ CFU/mL)은 96 well-plate에 195 μL씩 분주 하였으며, 37°C에서 24시간 동안 배양을 통해 생물막을 형성하였다. 형성된 생물막에 DMSO와 tuberostemonine을 각 5 μL씩 분주 후 37°C에서 3시간 동안 처리하였다. 이후 상층액은 제거되었으며 PBS buffer로 세척과 60°C에서 10분간 건조과정을 통해 고정 되었다. 생물막은 1.5% crystal violet를 이용하여 30분간 염색되었다. 염색에 이용된 crystal violet를 제거하기 위하여 PBS buffer로 세척되었으며, 생물막은 95% ethanol (200 μL)로 10분간 용해 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 측정하였다.

CLSM을 통한 tuberostemonine의 처리 농도별 생물막 분해 효과 측정을 위하여, 1% glucose가 첨가된 TSB 배지에서 배양된 균액(1.20×10⁵ CFU/mL)은 35×10 mm의 tissue culture dish (confocal dish, SPL Life Sciences Co., Ltd., Pocheon, Korea)에 2 mL씩 분주되었다. 각 균액은 37°C에서 24시간 동안 배양해 생물막을 형성하였다. 이후 DMSO (대조군)와 tuberostemonine (실험군, 0.1-200 μM)을 형성된 생물막에 분주 후, 3시간 동안 37°C에서 처리되었다. 분해된 생물막은 FilmTracer™ LIVE/DEAD biofilm viability kit (Invitrogen, Carlsbad, Canada)를 이용하여, propidium iodide (PI)과 SYTO 9으로 암실에서 30분 동안 염색되었다. 이후 CLSM (LSM 880, Carl-Zeiss)을 이용하여 488 nm의 excitation wavelength에서 생물막의 이미지를 얻었으며 정량 분석 하였다.

RNA 분리 및 qRT-PCR

Tuberostemonine의 처리가 생물막 형성과 분해에 미치는 영향을 확인하기 위하여, *S. aureus* ATCC 25923에 DMSO와 tuberostemonine (50 μM)을 3시간 동안 처리한 후, RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 RNA를 순수 분리 하였다. cDNA는 cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 합성되었으며, SsoAdvanced

Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 quantitative real-time PCR (qRT-PCR, CFX connect Optics Module, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 증폭되었다. 그 결과는 CFX manager software 3.1 (Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 분석되었다(Jeon 등, 2019; Yu 등, 2018). 이를 위해 각 유전자의 특이적 primer들이 사용되었다(16S rRNA gene_F; 5'-GGG ACC CGC ACA AGC GGT GG-3', 16S rRNA gene R; 5'-GGG TTG CGC TCG TTG CGG GA-3', *agrA* F; 5'-TGA TAA TCC TTA TGA GGT GCT T-3', *agrA* R; 5'-CAC TGT GAC TCG TAA CGA AAA-3', *icaA* F; 5'-CTG GCG CAG TCA ATA CTA TTT CGG GTG TCT-3', *icaA* R; 5'-GAC CTC CCA ATG TTT CTG GAA CCA ACA TCC GAC CTC CCA ATG TTT CTG GAA CCA ACA TCC) (Dotto 등, 2021; Lee 등, 2015; Nguyen 등, 2021). 모든 샘플은 3반복 실험하였으며, 이전 연구에서 보고한 바에 따라 각 유전자 발현 정도는 tuberostemonine이 처리되지 않은 샘플의 GAPDH 발현을 측정하여 internal control로 보정하여, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법으로 분석되었다(Livak와 Schmittgen, 2001).

통계분석

모든 실험은 3반복 수행되었으며, 결과값은 statistical analysis system (SAS, version 9.4) 프로그램의 ANOVA (one-way analysis of variance)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서의 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

Tuberostemonine처리에 따른 *S. aureus*의 성장 억제 효과 측정

Tuberostemonine의 *S. aureus* 성장에 대한 영향을 확인하였으며, 농도는 유사 천연물의 항균효과를 분석한 선행연구를 고려하여 결정되었다. DMSO 첨가 그룹과 다양한 농도의 tuberostemonine (50-200 μM)가 처리된 *S. aureus* 배양액의 흡광도 ($\text{O.D.}_{600\text{ nm}}$)를 8시간 동안 측정된 결과, 실험군과 대조군 흡광도 사이에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과는 tuberostemonine의 planktonic culture 상태의 *S. aureus*의 성장에는 영향을 미치지 않음을 의미한다.

Tuberostemonine의 생물막 형성 억제 효과

*S. aureus*의 생물막은 다양한 환경에 대한 내성 획득에 기여함으로써, 유제품, 육류, 즉석식품 등 식품 표면에서 *S. aureus*의 성장에 기여하여 위생적 문제를 야기한다(Lee 등, 2013). 실험 목적에 따라 *S. aureus* 생물막에 대한 tuberostemonine의 형성 저해 효과를 확인하기 위해 *S. aureus*와 DMSO 또는 tuberostemonine을 함께 24시간 배양한 후 형성된 생물막을 정량하였다(Fig. 2). 대조군인 DMSO 그룹에서의 흡광도($\text{O.D.}_{595\text{ nm}}$) 값은 1.69 ± 0.31 였으나, 다양한 농도의(5-200 μM) tuberostemonine의 처리 그룹의 흡광도 값은 각기 1.22 ± 0.12 , 1.24 ± 0.01 , 1.25 ± 0.12 , 1.00 ± 0.24 , 0.09 ± 0.06 로 처리된 tuberostemonine에 의해 농도 의존적으로 감소되었다($p < 0.05$).

Tuberostemonine과 유사한 isoquinoline alkaloids 구조로 식물 유래 화합물인 berberine은 quorum sensing (QS) 신호 분자인 N-butanyl-L-homoserine lactone (C4-HSL)가 있을 때 65.50-60.74% 생물막 형성을 감소시켰을 뿐 아니라, 성장에는 영향을 주지 않고 세포 부착 억제, 정족수 감지 억제제를 통한 extracellular

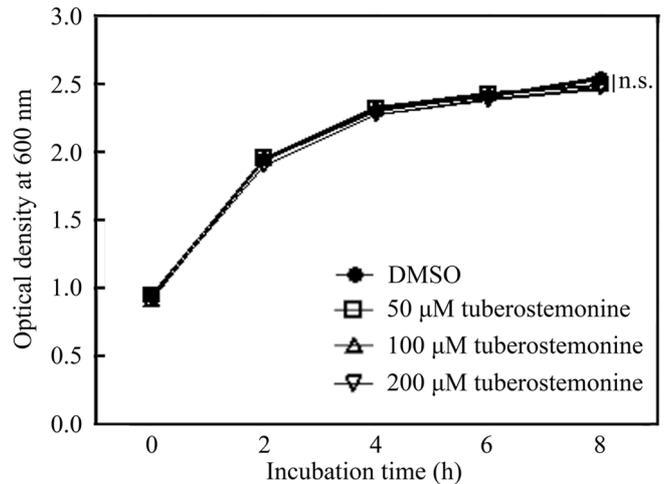


Fig. 1. Effect of tuberostemonine on *S. aureus* growth. *S. aureus* was incubated at 37°C for 16 h and subcultured in 20 mL of LB broth media until its optical density ($\text{O.D.}_{600\text{ nm}}$) reached 0.8. Then, growth of the *S. aureus* group and the *S. aureus* added with from DMSO (control) and tuberostemonine (50-200 μM) were identified by measuring their optical density every 2 h until 8 h after tuberostemonine treatment (n.s.; not significant).

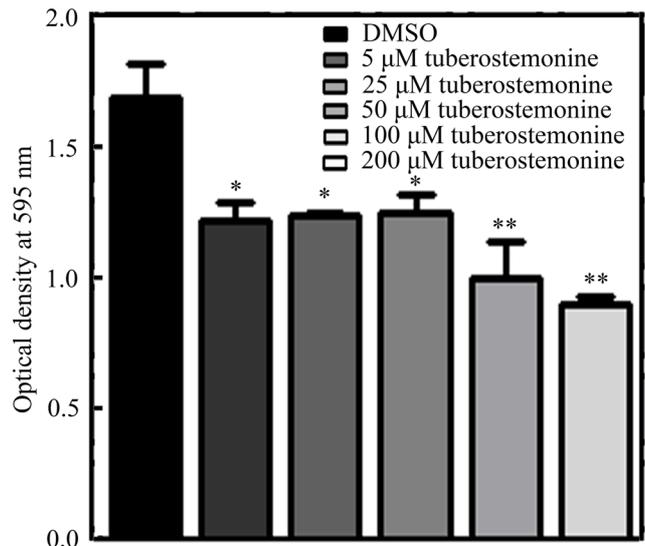


Fig. 2. Inhibitory activities of tuberostemonine against *S. aureus* biofilm formation. *S. aureus* cells were incubated with DMSO or tuberostemonine (5-200 μM) for 16 h. The formed-biofilms were stained with 1.5% crystal violet. Measured values represent the means for triplicate wells and error bars indicated range. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

polymeric substances (EPS) 생성 저해, 대사활동 감소를 통해 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Salmonella typhimurium*의 형성된 성숙한 생물막의 양을 감소시킨다고 보고된 바 있다(Aswathanarayan와 Vittal, 2018). 선행연구의 천연화합물과 유사하게 본 결과에서 tuberostemonine의 *S. aureus* 생물막 형성에 대한 저해 효과가 나타난 것으로 보아 alkaloids 구조를 가지는 berberine과 유사하게 QS 기작을 통해 생물막 억제 효과를 나타냈을 것으로 추측된다. 따라서 추가적으로 생물막 분해 효과 및 기작에 대한 실험을 수행할 필요가 있다고 판단되었다.

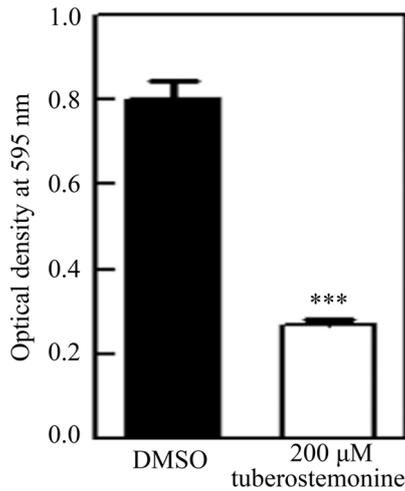


Fig. 3. Effect of tuberostemonine on biofilms pre-formed by *S. aureus*. Biofilms were formed at 37°C for 24 h, and these were treated with DMSO or tuberostemonine (200 μ M) for 3 h. The biofilms were stained with 1.5% crystal violet. Measured values represent the means for triplicate wells and error bars indicated range. *** p <0.001.

Tuberostemonine의 생물막 분해 효과

형성된 생물막에 대한 tuberostemonine의 분해 효과는 crystal violet 염색법과 CLSM 이미지 분석을 통해 확인되었다. *S. aureus*에 DMSO가 처리된 그룹에서의 crystal violet 염색 용액의 흡광도는 0.80 ± 0.04 로 나타났으며, 200 μ M tuberostemonine 처리군은 대조군에 비하여 약 0.53 (66.25%) 감소하여 유의적 수준의 생물막 분해 효과가 확인되었다(p <0.001, Fig. 3).

농도별 tuberostemonine (0-200 μ M)의 생물막 분해 효과를 CLSM 이미지 분석을 통해 확인하였을 때, 초기 생물막 내 온전한 *S. aureus* 세포는 녹색 형광을 냈으며 0.1-5 μ M 처리시 유의적 감소는 관찰되지 않았다. 그러나 25 μ M 부터 농도 의존적

으로 생물막 손상으로 인한 유의적 형광의 감소(약 43.35-68.80%)가 관찰 되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 tuberostemonine 처리가 이미 형성되어 있는 *S. aureus* 생물막 구조를 파괴함을 의미한다.

Curcumin은 큰뿌리줄기 그룹으로 강황속(*Curcuma*)으로 분류되는 *Curcuma aromatica* 등 약용식물에 많이 함유되어 있으며(*C. aromatic*, *C. longa*, *C. caesia* 등), 선행연구에서 항균, 항염, 항바 이러스, 항진균, 항암, 항경련 등의 효과가 보고된 바 있다(Jeber와 Tawfeek, 2013). 그 중 *C. longa* (turmeric)와 *C. caesia* (black turmeric)에서 추출된 alkaloid 계열의 물질은 *S. aureus*와 *B. subtilis*의 성장에는 영향없이 생물막 개시 관련 유전자(*lasI*와 *rhlA*)의 발현 저해(down-regulation)를 통해 생물막 형성 저해와 생물막 분해 효과만을 나타낸 바 있다(Jain와 Parihar, 2018; Rudrappan와 Bais, 2008). 본 연구의 tuberostemonine은 *C. longa*과 *C. caesia*와 동일한 alkaloid 계열의 구조로서 선행연구와 유사하게 QS의 제어 기작을 통해 pathogenic bacteria에 대한 내성발생 가능성이 적은 잠재적인 생물막 제거물질로서 이용될 수 있을 것으로 보인다.

생물막 형성 및 분해 관련 유전자 발현에 미치는 영향

*S. aureus*의 생물막 형성 및 분해에 대한 분자수준에서의 작용 기작에 대해 알아보기 위해 *icaA*와 *agrA*의 발현에 대한 tuberostemonine의 영향을 확인하였다. DMSO 처리 그룹에 비하여 tuberostemonine처리 시 *S. aureus*의 *icaA*의 발현은 DMSO 처리하였을 때보다 0.42배 저하되었으나, *agrA* 유전자는 3.12배 현저하게 증가되었다(p <0.05, Fig. 5).

생물막의 형성에는 EPS matrix의 생성이나 QS의 발현 조절자(response regulator) 등이 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Dotto 등, 2021; Lee 등, 2015). 특히 *S. aureus*의 다당류 구성 성분인 polysaccharide intracellular adhesion (PIA)는 세포 부착(cell adhesion)과 관련된 *ica* operon에 의해 합성되어 생물막 형성 및 부착에 주요 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Yu 등, 2012). *S. aureus*와 *ica* operon은 *icaABCD* cluster와 *icaR*로 구성되어 있으며, 그 중 *icaA*와 *icaD* (intercellular adhesion A and B)

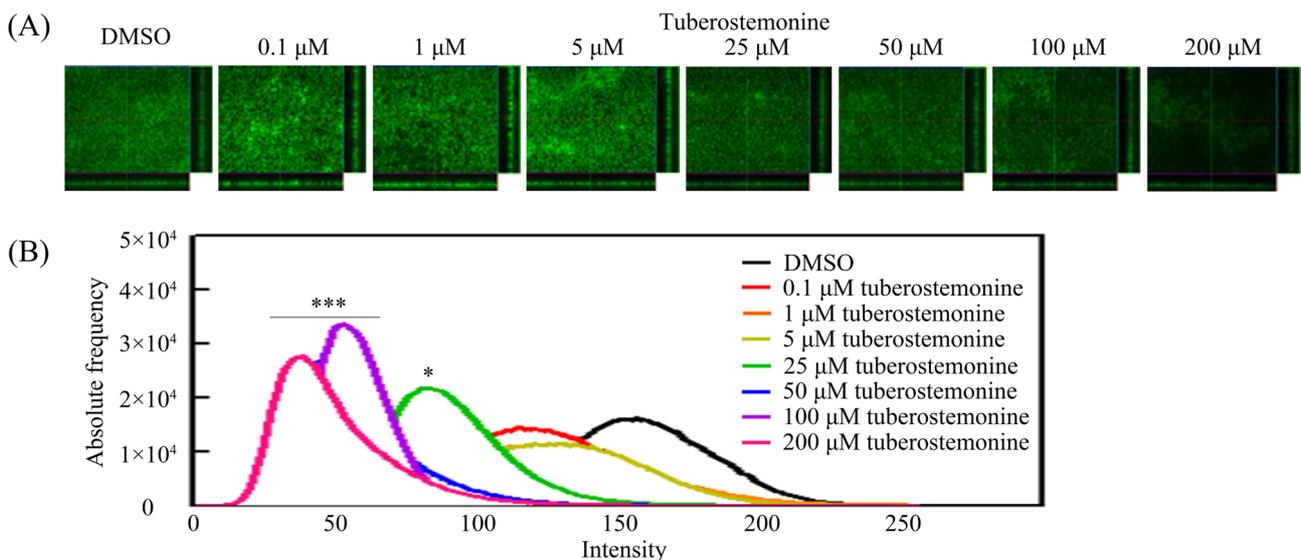


Fig. 4. Confocal laser scanning microscopy images of *S. aureus* biofilms after tuberostemonine treatment. Biofilm of *S. aureus* were treated with tuberostemonine at 37°C for 3 h. Confocal images of biofilms were analyzed using LSM to quantify biomass after DMSO or tuberostemonine treatment (0.1-200 μ M). (A) Confocal microscopy images of Live/Dead staining of biofilms dispersed by tuberostemonine. (B) Biovolume determined from biofilm structures as depicted in Fig. 4A. * p <0.05, *** p <0.001.

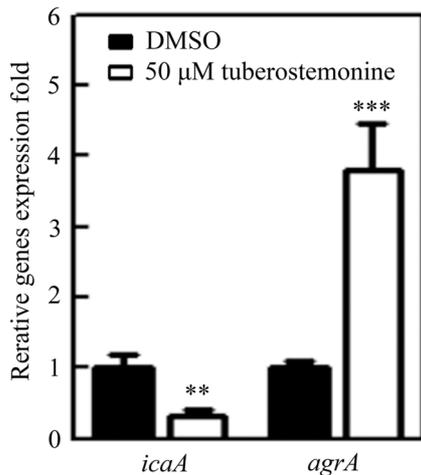


Fig. 5. Effect of tuberostemonine on the relative expression levels of *icaA* and *agrA* in *S. aureus*. The values were mean±standard deviation of three repeated processes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

는 생물막 내 세균 세포를 둘러싼 세포 외 다당류(exopolysaccharide matrix)의 주요 성분으로서 N-acetylglucosamin을 포함한 PIA의 합성에 필수 유전자로 알려져 있다(Gad 등, 2009; Yu 등, 2012). *agr* system은 Staphylococci의 중요한 global regulation cascade의 구성요소로서, *agrA*는 *psm* operon의 발현을 조절하여 세포내 cAMP 증가와 세포 외 단백질분해효소(extracellular protease) 분비 촉진을 통해 생물막의 분리 및 생물막 분해와 관련이 있다고 알려져 있다(Tan 등, 2018). *icaA*와 *agrA*는 N-acetyl glucosaminyl transferase 및 *Staphylococcus* spp.의 autoinducing peptide 전사를 유도하는 *ica* operon과 *agr*의 QS 기작에 의해 *S. aureus*의 생물막에 영향을 미친다(Aubourg 등, 2022; Dotto 등, 2021; Jiang 등, 2018). 따라서 반응 조절에 따라 *icaA*의 하위 조절(down regulation)은 생물막 형성 관련 유전자의 발현을 저해해 생물막의 감소를 유도하며, *agrA*의 하위 조절은 생물막 분해 저해를 통해 생물막 형성량이 증가하는 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 2020; Tan 등, 2018).

퀸산(quinic acid)은 식물에서 광범위하게 존재하는 유기산으로 항산화, 항돌연변이, 항염과 같은 효과가 보고된 바 있는데, 선행 연구에서 *S. aureus* ATCC 29213 (MRSA, 1×10^5 CFU/mL)에 퀸산을 3시간 처리하였을 때, 생물막 형성 시 *agrA* 발현을 활성화해 생물막 저해 효과가 나타났다(Bai 등, 2019). 또한 꼭두서니의 뿌리추출물인 alizarin은 방향족 유기화합물로, *S. aureus* ATCC 6538 (MSSA)에 alizarin (20 μg/mL)을 2시간 처리하였을 때, *icaA* 발현에는 영향을 미치지 않았으나, *agrA*의 발현은 억제된 것으로 나타났다(Lee 등, 2016). 본 연구에서 tuberostemonine처리 시 *S. aureus* 생물막 형성에 중요한 역할을 수행하는 유전자 발현 조절 체계인 *icaA* 유전자 발현 감소와 *agrA* 유전자 발현 증가를 통해 생물막 합성 및 분해 효과를 나타내는 것으로 보아, tuberostemonine은 *S. aureus*의 다양한 유전자 발현 조절의 상위 과정에 특이적으로 관여하는 것으로 사료되며, 다른 선행연구에서의 천연 화합물들과 같이 항생물막 효과를 가지는 것으로 보여진다.

식품 산업 분야에서 식중독균을 제어하는 방법으로는 물리적, 화학적, 효소적 방법이 있는데, 그 중 화학적 방법이 가장 많이 이용된다(Meireles 등, 2016; Pisoschi 등, 2018). 하지만, 화학적 방법의 지속적 사용은 인체내 잔류로 인해 면역 과민 반응과 장기 손상 등의 부작용 발생의 우려가 있어 천연화합물을 통한 제

어에 대한 요구가 높아지고 있다(Yum 등, 2017). 생물막은 항균제를 포함한 다양한 식중독균 제어 방법들의 효과를 감소시켜 식품 안전 및 공중보건에 위협을 증대시킨다. 따라서 인체에 유해성이 적은 천연화합물을 이용한 식중독균의 항생물막 연구는 식품 안전성 향상 및 국민 건강 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 선행 연구에서 tuberostemonine과 같은 alkaloid 천연화합물인 Bacoside A는 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*의 성숙된 생물막의 EPS의 손실과 생물막 기층(substratum)의 분리를 통한 분해 효과가 확인되었지만, 그 기작에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 식물 유래 천연화합물인 tuberostemonine이 대표적 식중독균인 *S. aureus* 생물막에 대한 형성 저해 및 분해 효과를 가지는 것이 확인되었으며, 그 기작 규명을 위해 필수적인 후속 연구를 위한 결과들을 얻을 수 있었다.

식중독균의 생장이 아닌 발병관련 유전자의 발현 저해를 통해 내성 발생 위험을 최소화한 선행 연구들과 마찬가지로(Hung 등, 2005; Mizar 등, 2018; Nait Chabane 등, 2014), 본 연구에서 규명된 물질은 내성의 문제가 심각한 MRSA에 대해 성장 저해 효과가 없음이 확인되어 내성 발생 가능성을 최소화할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서, tuberostemonine이 *S. aureus*를 제어할 수 있는 다른 방법과 함께 이용될 경우 식품 가공 및 보존과정에서 안전성 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요약

본 연구는 *S. aureus*에 대한 tuberostemonine의 항균 및 항생물막 효과에 대하여 확인하였다. *S. aureus*에 대한 tuberostemonine의 성장 저해 효과가 없음을 확인하였으나, crystal violet 염색법과 CLSM 이미지 측정을 통해 tuberostemonine이 유의한 *S. aureus* 항생물막 효과 가지는 것을 알 수 있었다. *S. aureus*의 생물막 형성과 분해 관련 유전자인 *icaA*와 *agrA*의 발현은 tuberostemonine을 처리하였을 때 유의미하게 각각 감소 또는 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 생물막 형성 저해 및 분해 효과가 확인된 천연화합물인 tuberostemonine은 *S. aureus*의 내성 발생 위험이 적은 새로운 항생물막제제로서 사용가능 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 한국연구재단(NRF-2019R1F1A1059458)과 충남대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307: 223-227 (2005)
- Aswathanarayan JB, Vittal RR. Inhibition of biofilm formation and quorum sensing mediated phenotypes by berberine in *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *RSC Adv.* 8: 36133-36141 (2018)
- Aubourg M, Pottier M, Léon A, Bernay B, Dhalluin A, Cacaci M, Torelli R, Ledormand P, Martini C, Sanguinetti M. Inactivation of the response regulator AgrA has a pleiotropic effect on biofilm formation, pathogenesis and stress response in *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiol. Spectr.* 10: e01598-01521 (2022)
- Bai JR, Wu YP, Elena G, Zhong, Gao KH. Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv.* 9: 3938-3945 (2019)

- Brem B, Seger C, Pacher T, Hofer O, Vajrodaya S, Greger H. Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloids a source of potent natural insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6383-6388 (2002)
- da Cunha MG, Sardi JdCO, Freires IA, Franchin M, Rosalen PL. Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geopropolis. *Microb. Pathogenesis* 139: 103855 (2020)
- Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR Surveill. Summ.* 67: 1-11 (2018)
- Di Ciccio P, Vergara A, Festino AR, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control* 50: 930-936 (2015)
- Dotto C, Lombarte Serrat A, Ledesma M, Vay C, Ehling-Schulz M, Sordelli DO, Grunert T, Buzzola F. Salicylic acid stabilizes *Staphylococcus aureus* biofilm by impairing the *agr* quorum-sensing system. *Sci. Rep.-UK* 11: 1-14 (2021)
- Fetsch A, Johler S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 5: 88-96 (2018)
- Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, Abd El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* 3: 342-351 (2009)
- Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43: 1367-1378 (2002)
- Greger H. Structural classification and biological activities of *Stemona* alkaloids. *Phytochem. Rev.* 18: 463-493 (2019)
- Gurunathan S, Han JW, Dayem AA, Eppakayala V, Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomed.* 7: 5901-5914 (2012)
- Hung DT, Shakhnovich EA, Pierson E, Mekalanos JJ. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310: 670-674 (2005)
- Jain A, Parihar D. Antibacterial, biofilm dispersal and antibiofilm potential of alkaloids and flavonoids of *Curcuma*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16: 677-682 (2018)
- Jang JE, Kil YS, Park RH, Oh S, Kim HK, Jeong MG, Seo EK, Hwang ES. Suppression of IL-2 production and proliferation of CD4+ T cells by tuberostemonine O. *Chem. Biodivers.* 11: 1954-1962 (2014)
- Jeber ZK, Tawfeek FK. Effect of turmeric oil on reproductive efficiency of adult male rats exposed to potassium dichromate. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* 3: 52-58 (2013)
- Jeon DY, Yum SJ, Seo DW, Kim SM, Jeong HG. Leaf-associated microbiota on perilla (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) cultivated in South Korea to detect the potential risk of food poisoning. *Food Res. Int.* 126: 108664-108674 (2019)
- Jiang Q, Jin Z, Sun B. MgrA negatively regulates biofilm formation and detachment by repressing the expression of *psm* operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microb.* 84: e01008-01018 (2018)
- Jung KH, Kil YS, Jung J, Park S, Shin D, Lee K, Seo EK, Bae H. Tuberostemonine N, an active compound isolated from *Stemona tuberosa*, suppresses cigarette smoke-induced sub-acute lung inflammation in mice. *Phytomedicine* 23: 79-86 (2016)
- Kim YJ, Yu HH, Park YJ, Lee NK, Paik HD. Anti-biofilm activity of cell-free supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* against *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 1854-1861 (2020)
- Lee JH, Kim YG, Lee K, Kim SC, Lee J. Temperature-dependent control of *Staphylococcus aureus* biofilms and virulence by thermoresponsive oligo (N-vinylcaprolactam). *Biotechnol. Bioeng.* 112: 716-724 (2015)
- Lee JH, Kim YG, Ryu SY, Lee J. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 6: 1-11 (2016)
- Lee JY, Wang HJ, Shin DB, Cho YS. Antibiotic resistance and bacterial biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains isolated from various foods. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 41: 96-104 (2013)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25: 402-408 (2001)
- Meireles A, Borges A, Giaouris E, Simões M. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Res. Int.* 86: 140-146 (2016)
- Meng Y, Hou X, Lei J, Chen M, Cong S, Zhang Y, Ding W, Li G, Li X. Multi-functional liposomes enhancing target and antibacterial immunity for antimicrobial and anti-biofilm against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceut. Res.* 33: 763-775 (2016)
- Mizar P, Arya R, Kim T, Cha S, Ryu KS, Yeo WS, Lee SS. Total synthesis of Xanthoangelol B and its various fragments: toward inhibition of virulence factor production of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Chem.* 61: 10473-10487 (2018)
- Nait Chabane Y, Mlouka MB, Alexandre S, Nicol M, Marti S, Pestel-Caron M, Dé E. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* 14: 1-7 (2014)
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 139: 3-15 (2010)
- Nguyen PT, Nguyen MT, Bolhuis A. Inhibition of biofilm formation by alpha-mangostin loaded nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Saudi. J. Biol. Sci.* 28: 1615-1621 (2021)
- Pisoschi AM, Pop A, Georgescu C, Turcuş V, Olah NK, Mathe E. An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur. J. Med. Chem.* 143: 922-935 (2018)
- Rodríguez-Martínez JM, Pascual A. Antimicrobial resistance in bacterial biofilms. *Rev. Med. Microbiol.* 17: 65-75 (2006)
- Ross AS, Saulnier G, Newell J, Isaacson D. Current source design for electrical impedance tomography. *Physiol. Meas.* 24: 509 (2003)
- Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1955-1962 (2008)
- Shrestha L, Kayama S, Sasaki M, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, Koizumi K, Tatsukawa N, Yu L, Takeda K. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Med. Microbiol. Immunol.* 60: 148-159 (2016)
- Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM, Li S. Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. *Front. Microbiol.* 9: 55 (2018)
- Van Hung P, Morita N. Physicochemical properties and enzymatic digestibility of starch from edible canna (*Canna edulis*) grown in Vietnam. *Carbohydr. Polym.* 61: 314-321 (2005)
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14: 2535-2554 (2009)
- Yum SJ, Kim SM, Yu YC, Jeong HG. Inhibition of growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* by corosolic acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 146-150 (2017)
- Yu YC, Yum SJ, Jeon DY, Jeong HG. Analysis of the microbiota on lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in South Korea to identify foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1318-1331 (2018)
- Yu D, Zhao L, Xue T, Sun B. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR*-dependent manner. *BMC Microbiol.* 12: 1-12 (2012)
- Zhang Y, Gao T, Kang S, Sillanpää M. Importance of atmospheric transport for microplastics deposited in remote areas. *Environ. Pollut.* 254: 112953-112957 (2019)