

식품 유래 Biofilm 형성 유산균에 대한 대항(*Eisenia bicyclis*) 유래 Nanoparticle의 Biofilm 형성 저해

오도경 · Fazlurrahman Khan¹ · 박슬기² · 조두민³ · 조경진 · 정금재 · 심연주 · 최정미⁴ · 운재호⁵ · 김영목*

국립부경대학교 식품공학과, ¹국립부경대학교 수산과학연구소, ²한국식품연구원 스마트제조사업단, ³국립해양생물자원관, ⁴다인소재 솔루션센터, ⁵국립강릉원주대학교 해양식품공학과

Inhibition of Food-derived Lactic Acid Bacterial Biofilm Formation Using *Eisenia bicyclis*-derived Nanoparticles

Do Kyung Oh, Fazlurrahman Khan¹, Seul-Ki Park², Du-Min Jo³, Kyung-Jin Cho, Geum-Jae Jeong, Yeon-Ju Sim, Jeong Mi Choi⁴, Jae-Ho Woon⁵ and Young-Mog Kim*

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

¹Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Smart Food Manufacturing Project Group, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Republic of Korea

³National Marine Biodiversity Institute of Korea, Seocheon 33662, Republic of Korea

⁴Solution Center., Dynesoe Co., Ltd., R&D Center, Yongin 16827, Republic of Korea

⁵Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Republic of Korea

Lactic acid bacteria (LAB) growth in processed meat products produces slime. In this study, 10 different biofilm-forming LAB, including *Leuconostoc mesenteroides*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella viridescens*, and *Latilactobacillus sakei*, were isolated from various meat products and identified based on 16S rRNA gene analysis. To inhibit biofilm formation by LABs, *Eisenia bicyclis* methanolic extract (EB) and ethyl acetate soluble fraction (EA) were used as antibacterial and antibiofilm agents, respectively. Furthermore, EA and EB were employed to synthesize gold nanoparticles (AuNPs) such as EB-AuNPs and EA-AuNPs, which could serve as antibiofilm agents against the isolated LAB. These findings demonstrate that EA, EB-AuNPs, and EA-AuNPs exhibit significant antibacterial activity against the isolated LAB. Furthermore, EB-AuNPs reduced *L. citreum* biofilm production, whereas EA-AuNPs inhibited *L. mesenteroides* and *L. brevis* biofilm formation. The current results suggest that EB-AuNPs and EA-AuNPs can be used as nanomaterials to inhibit LAB that form biofilms on meat products.

Keywords: Biofilm, *Eisenia bicyclis*, Gold nanoparticle, Lactic acid bacteria

서론

유산균은 다양한 균주가 보고되어 있으며, 이는 프로바이오틱스 뿐만 아니라 발효 식품의 스타터 등 다양한 식품 산업에서 많이 사용되고 있다(Holzappel and Wood, 2014). 또한 bacteriocin을 생산하여 병원성 미생물의 저해 등의 방부 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(Alakomi et al., 2000; De Vuyst and Leroy,

2007). 그러나 일부 유산균은 육가공 식품의 유통과정 중 성장하여 slime 등의 바이오 필름형성에 의해 품질 저하를 초래하는 것으로 보고되어 있다(Alakomi et al., 2000). 육가공품의 품질 저하와 관련이 있는 것으로 보고되는 유산균은 내열성을 갖는 *Weissella viridescens* 및 *Leuconostoc* spp.로 알려져 있으며 유산균 성장에 의해 신맛, pH 저하, 가스 및 점액 생성 등이 발생하여 문제가 되고 있다(Korkeala et al., 1988; Bjorkroth et al.,

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: ymkim@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0129>

Korean J Fish Aquat Sci 57(2), 129-136, April 2024

Received 12 March 2024; Revised 27 March 2024; Accepted 3 April 2024

저자 직위: 오도경(대학원생), Fazlurrahman Khan(교수), 박슬기(연구원), 조두민(연구원), 조경진(대학원생), 정금재(대학원생), 심연주(대학원생), 최정미(부장), 운재호(교수), 김영목(교수)

1998; Samelis et al., 2006; Gounadaki et al., 2008; Han et al., 2011; Padilla-Frausto et al., 2015).

이로 인해 지방의 산화, 육색 변화 등이 발생하여 품질 저하로 인해 육가공 제품의 선도가 떨어지게 된다(Chenoll et al., 2007). 따라서, 육가공품의 유통과정 중 slime 등의 바이오 필름을 생성할 수 있는 유산균을 제어하기 위한 기술의 개발이 필요하다. 우리나라에서는 육가공품을 햄류, 소시지류, 베이컨류로 분류하며 육가공품에서의 미생물 성장을 억제하기 위해 소브산(sorbic acid)이 사용되고 있으며 이는 2.0 g/kg 이하로 사용이 제한되어 있다(MFDS, 2024). 미생물 기준 규격은 식품 공전에 따라 엄격히 관리되고 있음에도 불구하고 육가공품의 유통 중 형성되는 미생물에 의한 문제가 발생되고 있다(Chenoll et al., 2007; MFDS, 2024). 따라서 소비자들에게 안전하고 신선한 제품을 제공하기 위해 유통기한 연장 및 미생물 생육 억제를 위한 식품 포장재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Biswas et al., 2022).

최근 식품 포장 재료로 사용되는 나노 입자(NPs)는 우수한 항균활성 및 biofilm 제어 활성이 보고되어 있다(Anvar et al., 2019; Paidari and Ibrahim, 2021; Ahari et al., 2022). 식품의 품질과 안전성 증가를 위해 NPs를 포장재에 사용 시, 산소 투과성을 낮출 뿐만 아니라 부패 유발 미생물 억제를 통해 유통기한 연장이 가능한 것으로 보고되어 있다(Omerović et al., 2021). 특히, gold nanoparticle (AuNPs)는 우수한 생체 적합성 및 낮은 독성을 나타내며 우수한 항균 및 항산화 활성을 가지므로 화장품, 의약 등 다양한 산업에서 사용되어져 왔다(Corti and Holliday, 2004; Hashmi and Hutchings, 2006; Lakshmeesha Rao et al., 2017). 최근 연구에 따르면 AuNPs는 우수한 항균활성 뿐만 아니라 병원성 미생물이 형성하는 biofilm 제어에 대한 많은 연구가 보고되고 있다(Zawrah et al., 2011; Vijayan et al., 2014; Shamailla et al., 2016; Ramasamy et al., 2017).

대황(*Eisenia bicyclis*)은 갈조류로 phlorotannins와 같은 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 항균, 항염 및 항암 효과 등의 기능성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(Ermakova et al., 2013; Kwon et al., 2013; Menshova et al., 2014). Eom et al. (2013)에 따르면 대황 추출물에서 분리된 phlorotannin은 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대해 우수한 항균활성이 보고되어 있으며, 또한 streptomycin-resistant *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성도 우수한 것으로 보고되어져 있다(Kim et al., 2018). 그러나 우수한 항균활성을 갖는 대황 추출물을 이용한 biofilm 제어에 대한 연구는 미미한 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 biofilm이 형성된 육가공품에서 유산균을 분리 및 동정하여 이의 biofilm 형성능을 확인하였다. 또한 이를 제어하기 위해 우수한 항균활성이 보고된 대황 MeOH 추출물(methanolic extract, EB) 및 EtOAc 분획 추출물(ethyl acetate soluble-fraction, EA)과 gold nanoparticle (AuNPs)을 합

성하여 소시지에서 분리된 유산균의 biofilm 제어 가능성에 대해 확인하였다. 이를 통해 대황 추출물-gold nanoparticle (EB-AuNPs, EA-AuNPs)을 이용한 식품 포장재의 적용 가능성에 대해 확인하고자 한다.

재료 및 방법

대황 추출물 제작

실험에 사용된 대황(*E. bicyclis*)은 2022년 2월에 울릉도에서 생산된 건물 상태의 시료를 울릉도물(Ulleungdo, Korea)에서 구매하였으며, 40 mesh 이하로 분쇄하여 실험에 사용하였다. 분쇄된 *E. bicyclis* 1 kg은 methanol (MeOH; Daejung Chemical & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea) 6 L를 이용하여 60°C에서 2회 추출 진행하였다. *E. bicyclis* MeOH extract를 이용한 liquid-liquid extract 실험방법은 Eom et al. (2012)에 따라 실험을 진행하였다. MeOH extract는 evaporation 후 2.0 L의 water (Daejung Chemical & Metals Co. Ltd.)에 녹여 n-hexane (Daejung Chemical & Metals Co. Ltd.), dichloromethane (DCM; Daejung Chemical & Metals Co. Ltd.), ethyl acetate (EtOAc; Daejung Chemical & Metals Co. Ltd.), 그리고 n-butanol (BuOH; Daejung Chemical & Metals Co. Ltd.) 순서대로 추출을 진행하였다. *E. bicyclis* 분획 추출물은 rotary evaporator를 이용한 농축 후 -80°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

대황 유래 추출물을 이용한 AuNPs 제조

E. bicyclis MeOH 추출물(EB) 및 EtOAc 분획 추출물(EA)을 이용한 gold nanoparticles (AuNPs) 제작은 선행 연구에서 기술된 것과 같이 진행하였다(Oh et al., 2024). EB 및 EA는 각각 deionized water에 25% (w/v)의 농도로 충분히 녹인 후 원심 분리(10,000 rpm, 10분) 후 상등액을 사용하였다. 또한 1 mM gold (III) chloride trihydrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 60°C deionized water에 녹인 후 NaOH를 이용하여 pH를 9.0으로 맞춰주었다. 이후, EB 및 EA를 한 방울씩 떨어뜨려 시료 색이 노란색에서 와인색으로 변하는 시점을 종말점으로 하여 합성하였다. 또한, 흡수 스펙트럼에 따른 합성 확인을 위해 microplate reader (Synergy HTX; Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 10분마다 200–700 nm의 흡광도를 측정하였다.

합성된 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs의 특성 분석을 위해 particle size analyzer를 이용한 크기 및 제타 전위를 확인하였으며, 구조 분석을 위해 X-ray diffraction (XRD), fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), 및 field emission transmission electron microscopy (FE-TEM)을 진행하였다. 합성된 AuNPs의 성분 분석은 energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS)을 통해 확인하였다.

육가공 제품에서의 유산균 분리 및 동정

Biofilm이 형성된 육가공 제품은 (주)다인소재(Seoul, Korea)에서 전달받아 실험에 사용하였다. 시료 4종(프레스햄, 후랑크 소시지 및 비엔나소시지)에서 유산균을 분리하기 위해 시료 25 g을 멸균된 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2)를 이용하여 10배 희석 후 stomacher (Interscience, St. Nom, France)를 이용해 2분간 균질화하였다. 균질화 된 시료는 멸균된 PBS를 이용하여 희석 후 bromocresol purple (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) 0.002% (w/v)가 첨가된 deMan Rogosa Sharpe medium (MRS; Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하였다. 30°C에서 24–48시간 배양 후 유기산 등의 생성에 의해 콜로니 주변이 노란색으로 변하는 단일 콜로니를 선별 및 분리하였다. 분리된 유산균은 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 16S rRNA 분석을 위해 universal primer 인 27 F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') 및 1492 R (5'-GGTACCTTGTACGACTT3')을 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. PCR product는 (주)바이오닉스(Bionics, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석 후 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 염기서열의 상동성 비교를 통해 동정하였다.

분리된 유산균의 생육 확인 및 biofilm 형성

분리된 유산균 10종을 이용하여 30°C에서 배양하였을 때 성장 정도 및 배양시간에 따른 biofilm 형성 가능성에 대해 분석하고자 하였다. MRS broth에서 30°C, 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도 0.05가 되게 MRS broth를 이용하여 희석 후 96-plate well plate에 접종하여 24–96시간 배양하였다. 24시간 배양 후 유산균의 생육 확인을 위해 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Biofilm 형성능 확인을 위해 24시간 마다 96-well plate에서 배양액 제거 후 증류수를 이용하여 2회 세척 및 30분간 건조하였다. Biofilm 염색을 위해 0.1% crystal violet (Sigma Aldrich)을 각 well에 분주 후 30분간 염색 후 염색약을 제거하고 증류수를 이용한 세척 및 건조를 진행하였다. 이후 각 well에 95% EtOH 분주 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항균 활성 실험

EB 및 EA와 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs의 분리된 유산균 10종에 대한 항균활성은 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 실험을 통해 확인하였다(Quave et al., 2008). 각각의 시료는 2,048–4 µg/mL의 농도로 two-fold dilution method로 분석하였으며, 유산균은 10⁴–10⁵ CFU/mL의 농도로 96-well plate에 접종하였다. 30°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도 측정 및, 미생물이 증식하지 않은 농도를 최소저해농도로 설정하였다.

Biofilm 생성 저해 실험

유산균이 형성하는 biofilm에 대한 저해 활성을 확인하기 위해 overnight culture된 유산균을 희석하여(OD_{600 nm}=0.05) 96-well plate에 분주하였다. EB, EA, EB-AuNPs 및 EA-AuNPs는 각 균주에 대한 MIC를 바탕으로 최대 2,048 µg/mL 이하의 농도로 처리 후 30°C에서 24 또는 96시간 배양하였다. 96-well plate에 형성된 biofilm을 염색하기 위한 방법은 분리된 유산균의 biofilm 형성 실험과 동일하게 진행하였다. Biofilm 저해율은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Biofilm inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD of untreated sample}) - (\text{OD of treated sample})}{\text{OD of untreated sample}} \times 100$$

통계

본 연구에서 수행한 모든 실험은 3회 반복 실험하여 결과 값을 mean ± SD로 나타내었다. 실험 결과들의 유의성 검정을 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 수행하였다. 통계 프로그램은 SPSS 27 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

유산균 분리 동정 결과

실험에 사용된 육가공 제품에서 분리된 유산균 10종에 대한 동정 결과는 Table 1에 나타내었다. 분리된 유산균의 16S rRNA는 NCBI blast를 통해 분석하였으며, *Leuconostoc mesenteroides* 4종, *Lactocaseibacillus paracasei* 1종, *Levilactobacillus brevis* 1종, *Lactiplantibacillus plantarum* 1종, *Leuconostoc citreum* 1종, *Weissella viridescens* 1종 및 *Latilactobacillus sakei* 1종으로 확인되었다. *L. mesenteroides*, *L. plantarum* 및 *L. sakei*는 다양한 연구에 의해 slime에 의한 biofilm이 형성된 소시지에서 확인 되었다(Chenoll et al., 2007; Padilla-Frausto et al., 2015). 또한 *Leuconostoc* spp. 및 *W. viridescens*는 우수한 내열성을 갖는 유산균으로 육가공품의 가열공정에서도 생존하여 육가공품 품질 저하의 주요 원인균으로 알려져 있다(Kamenik et al., 2015; Padilla-Frausto et al., 2015). *L. paracasei*는 exopolysaccharide (EPS)를 형성하는 대표적인 유산균으로 식품 산업에서 starter로 주로 사용되는 것으로 알려져 있다(Bengoa et al., 2023). 따라서 본 연구에서 분리된 10종의 유산균은 대부분 소시지의 유통과정에서 성장하여 품질 저하를 발생할 수 있으므로, 제어 방법의 개발이 필요한 유산균으로 확인되며 이를 S1-S10으로 명명하여 실험에 사용하였다.

분리된 유산균의 생육 및 biofilm 형성 능력

유산균 S1-S10의 생육 확인을 위해 600 nm에서 흡광도 측정

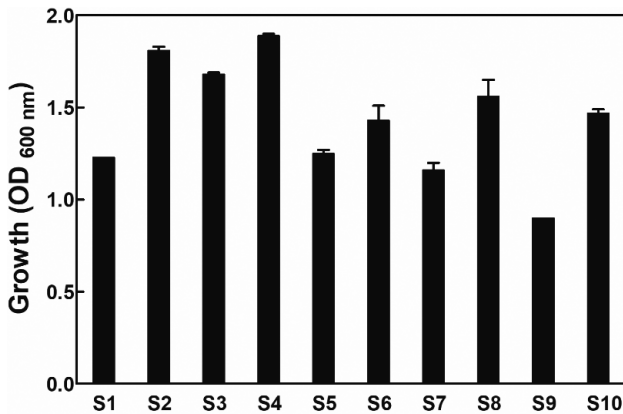


Fig. 1. Absorbance measurement after culturing isolated lactic acid bacteria for 24 h. S1, *Leuconostoc mesenteroides*; S2, *Lactiacaseibacillus paracasei*; S3, *Levilactobacillus brevis*; S4, *Lactiplantibacillus plantarum*; S5, *L. mesenteroides*; S6, *L. mesenteroides*; S7, *Leuconostoc citreum*; S8, *Weissella viridescens*; S9, *L. mesenteroides*; S10, *Latilactobacillus sakei*.

을 진행했으며, biofilm 형성 능력에 대해 확인하기 위해 crystal violet을 이용한 염색법을 이용하였다. 실험 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었다. 24시간 배양된 유산균의 흡광도는 0.90–1.89로 모든 균주가 24시간 내에 성장하는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 그러나 biofilm 형성능은 생육과 달리 분리 균주에 따라 형성 정도의 차이가 있는 것으로 보였다. Crystal violet으로 염색된 biofilm을 570 nm에서 흡광도 측정 결과 24시간 배양된 S1, S3, S8 및 S10은 biofilm 형성능이 우수한 것으로 확인되었다. S1은 2.28 ± 0.02 , S8은 2.47 ± 0.01 로 확인되었으며, S3 및 S10은 5배 희석하였을 때 1.47 ± 0.02 및 1.05 ± 0.05 로 나타났다 (Fig. 2A). 또한 S4, S6 및 S9는 0.61 ± 0.02 , 0.69 ± 0.02 , 0.47 ± 0.01 로 나타났다. 그러나 S2, S5 및 S7 균주는 24시간

배양 시 biofilm이 약하게 형성되는 것으로 보여 48시간, 72시간 및 96시간까지 배양 후 형성된 biofilm을 확인하였다 (Fig. 2B). S2는 24시간 배양 시 흡광도 0.29 ± 0.06 에서 96시간 배양 시 0.78 ± 0.08 로 확인되었으며, S5는 0.20 ± 0.02 에서 0.37 ± 0.01 , S7은 0.21 ± 0.02 에서 0.64 ± 0.06 으로 흡광도가 높아지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다양한 육가공품에서 분리된 유산균의 유전적인 다양성에 의해 biofilm 형성 정도에 대한 차이가 나타나는 것으로 보여진다 (Lebeer et al., 2007; Leroy et al., 2009).

따라서 육가공품에서 분리된 유산균 10종의 biofilm 배양 시간은 다음과 같이 진행하였다. S1, S3, S4, S6, S8, S9 및 S10 균주는 24시간으로 선정하였으며, S2, S5 및 S7 균주는 96시간 배양 조건으로 biofilm 저해 실험에 사용하였다.

분리 유산균에 대한 MIC 결과

본 연구에 사용된 대항 추출물(EB 및 EA)과 이를 이용하여 AuNPs와 합성한 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs는 선행연구를 통해 병원성 미생물에 대해 우수한 biofilm 저해능이 확인되었다 (Oh et al., 2024). 따라서 이를 이용하여 유산균 제어 가능성에 대해 확인하고자 하였다. 합성된 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs는 각각 154.74 nm 및 165.04 nm의 크기로 확인되었으며, 530 nm 및 590 nm에서 흡광도가 확인되었다. 또한 XRD, FT-IR 및 FE-TEM을 이용한 구조 분석 및 EDS 분석을 통해 gold nanoparticle의 합성을 확인하였다 (Oh et al., 2024).

EB, EA, EB-AuNPs 및 EA-AuNPs를 이용하여 S1-S10에 대한 MIC 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험 결과 EB는 모든 균주에 항균활성을 나타내지 않았으며, EA는 S3, S7-10 균주에 대해 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 MIC를 나타냈다. EB-AuNPs의 항균활성은 S3 및 S9에서 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 나타났으며, S1, S4 및 S10에 대해 1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 항균활성이 확인되었다. EA-AuNPs는 S3 및 S10 균주에 대해 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 항균활성을 나타냈다. 이를 통해 EB를 제외

Table 1. Lactic acid bacteria isolated from meat products

Source	Strain No.	Identification by 16S rRNA gene sequence	
		Identified strains	Similarity (%)
Pressed ham	S1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain 4409	99.86
	S2	<i>Lactiacaseibacillus paracasei</i> strain V4904	99.79
Frank sausage	S3	<i>Levilactobacillus brevis</i> strain 2033	99.65
	S4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 16408	99.93
	S5	<i>L. mesenteroides</i> strain 4409	100.00
Vienna sausage-1	S6	<i>L. mesenteroides</i> strain LACT06	99.86
	S7	<i>Leuconostoc citreum</i> strain WiKim0101	99.65
	S8	<i>Weissella viridescens</i> strain 7985	99.93
Vienna sausage-2	S9	<i>L. mesenteroides</i> strain S-31	100.00
	S10	<i>Latilactobacillus sakei</i> strain 1909	100.00

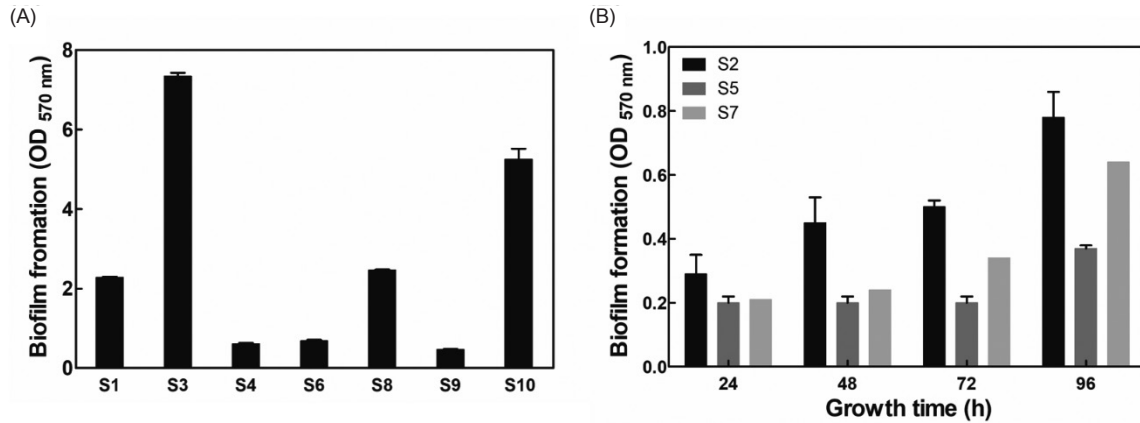


Fig. 2. Biofilm forming ability of isolated lactic acid bacteria. A, Absorbance of biofilm formed at 24 h; B, Absorbance of biofilm formed over 24–96 h; S1, *Leuconostoc mesenteroides*; S2, *Lactocaseibacillus paracasei*; S3, *Levilactobacillus brevis*; S4, *Lactiplantibacillus plantarum*; S5, *L. mesenteroides*; S6, *L. mesenteroides*; S7, *Leuconostoc citreum*; S8, *Weissella viridescens*; S9, *L. mesenteroides*; S10, *Lactobacillus sakei*.

한 모든 시료는 S3 및 S10에 대해 항균활성이 있음을 확인하였으며, EA 및 EB-AuNPs는 S9에 대해 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

유산균은 bacteriocin을 형성하는 균주로 알려져 있어 이를 이용한 병원성 미생물에 대한 항균활성에 관한 연구는 많이 보고되어져 있다(Nebbia et al., 2020; Mokoena et al., 2021). 또한 식품에서 biofilm 형성 및 품질 저하 등을 초래하는 유산균에 대한 특성 분석에 대한 연구는 보고되어 있으나 이러한 유산균을 제어하는 방법은 거의 보고된 바 없다(Chenoll et al., 2007; Han et al., 2011; Kameník et al., 2015). 따라서 본 연구에서 사용된 대항 추출물 및 EB-AuNPs, EA-AuNPs는 육가공품에서 품질 저하를 발생하는 유산균에 대한 제어 가능성이 있는 것으로 보인다.

Table 2. Antibacterial activity of *Eisenia bicyclis* extracts (EB and EA) and gold-nanoparticle (AuNPs) derivatives against isolated lactic acid bacteria

Strain No.	EB	EA	EB-AuNPs	EA-AuNPs
S1	ND*	ND	1,024	ND
S2	ND	ND	ND	ND
S3	ND	2,048	2,048	2,048
S4	ND	ND	1,024	ND
S5	ND	ND	ND	ND
S6	ND	ND	ND	ND
S7	ND	2,048	ND	ND
S8	ND	2,048	ND	ND
S9	ND	2,048	2,048	ND
S10	ND	2,048	1,024	2,048

*ND, Not determined.

대항 추출물 및 AuNPs을 이용한 유산균 biofilm 저해 결과

유산균이 형성하는 biofilm에 대한 저해 활성 실험 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대항 추출물인 EB 및 EA는 분리된 유산균이 형성하는 biofilm에 대한 저해활성을 나타내지 않았다. EB-AuNPs는 S8이 형성하는 biofilm을 2,048 µg/mL의 농도에서 67.51%, 1,024 µg/mL의 농도에서 61.96% 저해하는 것이 확인되었다(Fig. 3A). EA-AuNPs는 S1의 biofilm에 대해 2,048 µg/mL에서 58.55%, S3에서는 1,024 µg/mL에서 79.99% 저해하는 것으로 나타났으며, S10은 2,048 µg/mL에서 85.93%, 1,024 µg/mL에서 59.68%의 우수한 저해활성이 확인되었다(Fig. 3B).

따라서 본 연구에서 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs에 의해 biofilm 생성이 저해된 유산균은 *Leuconostoc mesenteroides* (S1 및 S10), *Levilactobacillus brevis* (S3) 및 *Leuconostoc citreum* (S8)으로 확인되었다. *L. mesenteroides*는 내열성에 의해 육가공품에서 biofilm을 형성하는 주요 원인균으로 많은 연구에서 보고되어 있다. *L. brevis* 및 *L. citreum*은 우수한 biofilm을 형성하는 유산균으로 발효 소시지, 김치 등 다양한 발효 식품에서 확인된다(Landeta et al., 2013; Lee et al., 2021).

따라서 본 연구에서 사용된 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs를 이용하여 육가공품에서 분리된 유산균이 형성하는 biofilm 저해 활성을 확인할 수 있었으며, 이는 육가공품의 부패 방지를 위한 포장재 등에 적용하여 사용 가능할 것으로 보인다.

본 실험 결과 육가공품에서 형성하는 biofilm을 형성하는 유산균 10종을 분리 및 동정하였다. 분리된 유산균 10종은 S1-S10으로 명명하였으며, 이를 이용하여 biofilm 형성 가능성에 대해 확인하였다. 대항 추출물(EB, EA) 및 EB-AuNPs, EA-AuNPs를 이용하여 분리된 유산균에 대한 항균활성을 확

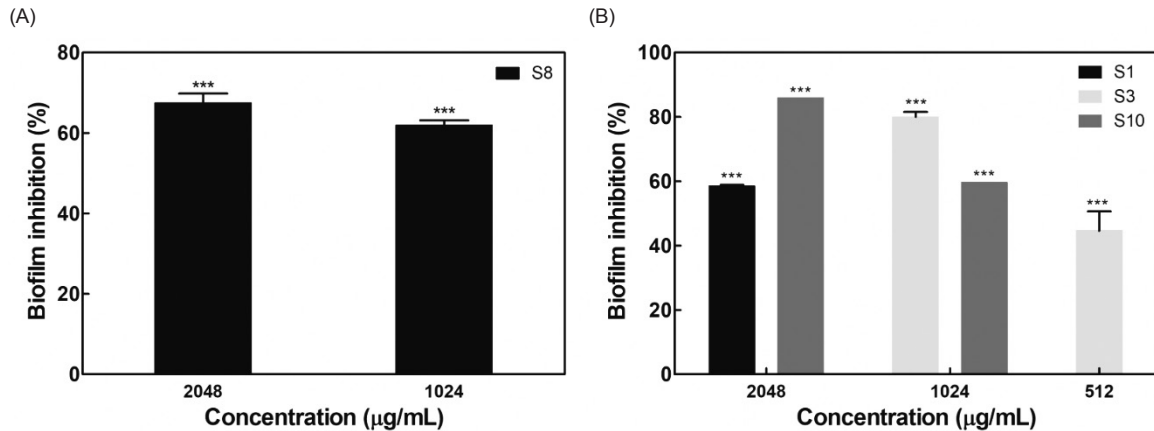


Fig. 3. Biofilm inhibition of isolated lactic acid bacteria. A, Biofilm inhibition results of EB-AuNPs; B, Biofilm inhibition results of EA-AuNPs; S1, *Leuconostoc mesenteroides*; S3, *Levilactobacillus brevis*; S8, *Weissella viridescens*; S10, *Latilactobacillus sakei*. ***Denotes significant difference at $P < 0.001$.

인하였으며, biofilm 저해 활성에 대한 실험 결과 *Leuconostoc mesenteroides* (S1 및 S10), *Levilactobacillus brevis* (S3) 및 *Leuconostoc citreum* (S8)의 biofilm에 대한 저해활성이 확인되었다. 이를 통해 EB-AuNPs 및 EA-AuNPs는 육가공품에서 문제가 되는 biofilm을 형성하는 유산균 제어가 가능할 것으로 보이며 이는 식품 포장재의 소재로써 적용 및 품질 유지에 도움이 될 것으로 보인다.

사 사

이 논문은 2024년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2021R1A6A1A03039211, 2022R1A2B5B01001998).

References

- Ahari H, Fakhraabadi-pour M, Paidari S, Goksen G and Xu B. 2022. Role of AuNPs in active food packaging improvement: A review. *Molecules* 27, 8027. <https://doi.org/10.3390/molecules27228027>.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K and Helander I. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 66, 2001-2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>.
- Anvar A, Haghghat Kajavi S, Ahari H, Sharifan A, Motallebi A, Kakoolaki S and Paidari S. 2019. Evaluation of the antibacterial effects of Ag-TiO₂ nanoparticles and optimization of its migration to sturgeon caviar (Beluga). *Iran J Fish Sci* 18, 954-967. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.118074>.
- Bengoa AA, Dueñas MT, Prieto A, Garrote GL and Abraham AG. 2023. Exopolysaccharide-producing *Lactocaseibacillus paracasei* strains isolated from kefir as starter for functional dairy products. *Front Microbiol* 14, 1110177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1110177>.
- Biswas R, Alam M, Sarkar A, Haque MI, Hasan MM and Hoque M. 2022. Application of nanotechnology in food: Processing, preservation, packaging and safety assessment. *Heliyon* 8, e11795. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11795>.
- Bjorkroth K, Vandamme P and Korkeala H. 1998. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl Environ Microbiol* 64, 3313-3319. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3313-3319.1998>.
- Chenoll E, Macián M, Elizaquível P and Aznar R. 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: Population analysis by rDNA-based methods. *J Appl Microbiol* 102, 498-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x>.
- Corti CW and Holliday RJ. 2004. Commercial aspects of gold applications: From materials science to chemical science. *Gold Bull* 37, 20-26. <https://doi.org/10.1007/BF03215513>.
- De Vuyst L and Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 194-199. <https://doi.org/10.1159/000104752>.
- Eom SH, Kim DH, Lee SH, Yoon NY, Kim JH, Kim TH, Chung YH, Kim SB, Kim YM, Kim HW, Lee MS and Kim YM. 2013. *In vitro* antibacterial activity and synergistic antibiotic effects of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res* 27, 1260-1264. <https://doi.org/10.1002/ptr.4851>.
- Eom SH, Lee SH, Yoon NY, Jung WK, Jeon YJ, Kim SK, Lee MS and Kim YM. 2012. α -Glucosidase- and α -amylase-inhibitory activities of phlorotannins from *Eisenia bicyclis*.

- J Sci Food Agric 92, 2084-2090. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5585>.
- Ermakova S, Men'shova R, Vishchuk O, Kim SM, Um BH, Isakov V and Zvyagintseva T. 2013. Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Res* 2, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.10.002>.
- Gounadaki AS, Skandamis PN, Drosinos EH and Nychas GJE. 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol* 25, 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.001>.
- Han Y, Jiang Y, Xu X, Sun X, Xu B and Zhou G. 2011. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci* 88, 682-688. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.029>.
- Hashmi ASK and Hutchings GJ. 2006. Gold catalysis. *Angew Chem Int Ed* 45, 7896-7936. <https://doi.org/10.1002/anie.200602454>.
- Holzappel WH and Wood BJ. 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Wiley-Blackwell, New York, NY, U.S.A.
- Kameník J, Dušková M, Šedo O, Saláková A, Pavlík Z, Zdráhal Z and Karpíšková R. 2015. Lactic acid bacteria in hot smoked dry sausage (non-fermented salami): Thermal resistance of *Weissella viridescens* strains isolated from hot smoked dry sausages. *LWT-Food Sci Technol* 61, 492-495. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.012>.
- Kim HJ, Dasagrandhi C, Kim SH, Kim BG, Eom SH and Kim YM. 2018. *In vitro* antibacterial activity of phlorotannins from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* against streptomycin-resistant *Listeria monocytogenes*. *Indian J Microbiol* 58, 105-108. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0693-x>.
- Korkeala H, Suortti T and Mäkelä P. 1988. Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *Int J Food Microbiol* 7, 339-347. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90060-8).
- Kwon TH, Kim TW, Kim CG and Park NH. 2013. Antioxidant activity of various solvent fractions from edible brown alga, *Eisenia bicyclis* and its active compounds. *J Food Sci* 78, C679-C684. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12109>.
- Lakshmeesha Rao B, Gowda M, Asha S, Byrappa K, Narayana B, Somashekar R, Wang Y, Madhu LN and Sangappa Y. 2017. Rapid synthesis of gold nanoparticles using silk fibroin: characterization, antibacterial activity, and anticancer properties. *Gold Bull* 50, 289-297. <https://doi.org/10.1007/s13404-017-0218-8>.
- Landeta G, Curiel JA, Carrascosa AV, Muñoz R and De Las Rivas B. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Sci* 95, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.meat-sci.2013.05.019>.
- Lebeer S, Verhoeven TL, Perea Vélez M, Vanderleyden J and De Keersmaecker SC. 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 73, 6768-6775. <https://doi.org/10.1128/AEM.01393-07>.
- Lee SJ, Jeon HS, Yoo JY and Kim JH. 2021. Some important metabolites produced by lactic acid bacteria originated from kimchi. *Foods* 10, 2148. <https://doi.org/10.3390/foods10092148>.
- Leroy S, Lebert I, Chacornac JP, Chavant P, Bernardi T and Talon R. 2009. Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *Int J Food Microbiol* 134, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.012>.
- Menshova RV, Ermakova SP, Anastuyuk SD, Isakov VV, Dubrovskaya YV, Kusaykin MI, Um BH and Zvyagintseva TN. 2014. Structure, enzymatic transformation and anticancer activity of branched high molecular weight laminaran from brown alga *Eisenia bicyclis*. *Carbohydr Polym* 99, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.037>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2024. Food Code. Retrieved from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC> on Jan 24, 2024.
- Mokoena MP, Omatola CA and Olaniran AO. 2021. Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules* 26, 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>.
- Nebbia S, Lamberti C, Lo Bianco G, Cirrincione S, Laroute V, Coccagn-Bousquet M, Cavallarin L, Giuffrida MG and Pessione E. 2020. Antimicrobial potential of food lactic acid bacteria: Bioactive peptide decrypting from caseins and bacteriocin production. *Microorganisms* 9, 65. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010065>.
- Oh D, Khan F, Park SK, Jo DM, Kim NG, Jung WK and Kim YM. 2024. Antimicrobial, antibiofilm, and antivirulence properties of *Eisenia bicyclis*-extracts and *Eisenia bicyclis*-gold nanoparticles towards microbial pathogens. *Microb Pathog* 188, 106546. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106546>.
- Omerović N, Djisalov M, Živojević K, Mladenović M, Vunduk J, Milenković I, Knežević NŽ, Gadjanski I and Vidić J. 2021. Antimicrobial nanoparticles and biodegradable polymer composites for active food packaging applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20, 2428-2454. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12727>.
- Padilla-Frausto J, Cepeda-Marquez L, Salgado L, Iturriaga M and Arvizu-Medrano S. 2015. Detection and genotyping of *Leuconostoc* spp. in a sausage processing plant. *J Food Prot* 78, 2170-2176. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-192>.

- Paidari S and Ibrahim SA. 2021. Potential application of gold nanoparticles in food packaging: a mini review. *Gold Bull* 54, 31-36. <https://doi.org/10.1007/s13404-021-00290-9>.
- Quave CL, Plano LR, Pantuso T and Bennett BC. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 118, 418-428. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.005>.
- Ramasamy M, Lee JH and Lee J. 2017. Development of gold nanoparticles coated with silica containing the antibiofilm drug cinnamaldehyde and their effects on pathogenic bacteria. *Int J Nanomedicine* 12, 2813-2828. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132784>.
- Samelis J, Björkroth J, Kakouri A and Rementzis J. 2006. *Leuconostoc carnosum* associated with spoilage of refrigerated whole cooked hams in Greece. *J Food Prot* 69, 2268-2273. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2268>.
- Shamaila S, Zafar N, Riaz S, Sharif R, Nazir J and Naseem S. 2016. Gold nanoparticles: An efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials* 6, 71. <https://doi.org/10.3390/nano6040071>.
- Vijayan SR, Santhiyagu P, Singamuthu M, Kumari Ahila N, Jayaraman R and Ethiraj K. 2014. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, *Turbinaria conoides*, and their antimicrofouling activity. *Sci World J* 2014, 938272. <https://doi.org/10.1155/2014/938272>.
- Zawrah M, El-Moez S and Center D. 2011. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *Life Sci J* 8, 37-44.