미생물 바이오필름 제어를 위한 효소처리와 그 활용 전망

Present and Prospect of Enzyme Treatment for Microbial Biofilm Control

임은섭[1,2], 김주성[*1,2]
Eun Seob Lim[1,2], Joo-Sung Kim[*1,2]

[1]한국식품연구원, 전략기술연구본부, 소비안전연구단
[2]과학기술연합대학원대학교, 식품생명공학과

[1]Research Group of Consumer Safety, Research Division of Strategic Food Technology, Korea Food Research Institute, 245, Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55365, Republic of Korea
[2]Department of Food Biotechnology, Korea University of Science and Technology, 217, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34113, Republic of Korea

I. 서론

바이오필름은 미생물이 특정 표면에 부착하여 군집을 형성한 것으로, 자연계에서 흔히 발생하는 미생물의 생존 방식이다. 바이오필름을 형성한 식중독균은 외부의 환경으로부터 저항성을 가지게 되어 살균제를 처리하더라도 제거가 용이하지 않다. 제거되지 않고 남은 식중독균은 식기류나 가재도구, 식품 제조시설부터 최종제품에까지 오염되어 식음료류, 유제품, 육류, 신선식품등 다양한 식품산업에서 위생적인 문제를 발생시킬 수 있다(34). 실제로 많은 식중독 사고가 식중독균의 바이오필름 형성에 기인한다고 하는데, 미생물 감염 사고의 대략 80%가 바로 이 바이오필름 형성이 원인이 된다는 통계결과가 있다(30). 따라서, 식품제조시설의 표면으로부터 이러한 식중독균 바이오필름을 효과적으로 제거할 수 있는 전략이 필요하다. 바이오필름은 extracellular polymeric substances (EPS)라고 하는 끈적한 매트릭스를 가지고 있는데, 이 물질이 화학적인 살균소독제를 처리했을 때 그 효과를 저해하는 역할을 하여 미생물의 생존에 영향을 미치게 된다(22). EPS는 주로 extracellular DNA, protein, polysaccharide 등으로 구성되는데, 효소의 처리로 이 EPS 구조를 제거 또는 형성을 제어할 수 있으며, 이는 바이오필름 제어에 대안적인 방법이 될 수 있다. 따라서 본 논단에서는 효소를 이용한 바이오필름제어 연구 및 활용 전망에 대하여 기술하고자 한다.

II. 본론

1. Extracellular polymeric substances (EPS)

자연환경에서 바이오필름을 형성하는 미생물들은 스스로 extracellular polymeric substances (EPS)를 생성하는데 주로 다당류, 단백질, 핵산, 지질로 구성되어있다. 이들은 바이오필름의 구조안전성을 부여하고, 표면에의 부착을 매개하며, 끈적한 삼차원의 다형질 중합체를 만들

* Corresponding author: Joo-Sung Kim
Korea Food Research Institute
245, Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-Gun, Jeollabuk-do, Republic of Korea
T: +82-63-219-9266 F: +82-63-219-9876 E: jskim@kfri.re.kr

어 바이오필름 구조를 형성한다(그림 1). 미생물들은 이 EPS 매트릭스에 둘러싸여 있으며, 이로 인해 숙주의 면역력이나 항생제 및 살균소독제 등으로부터 보호를 받는다(9).

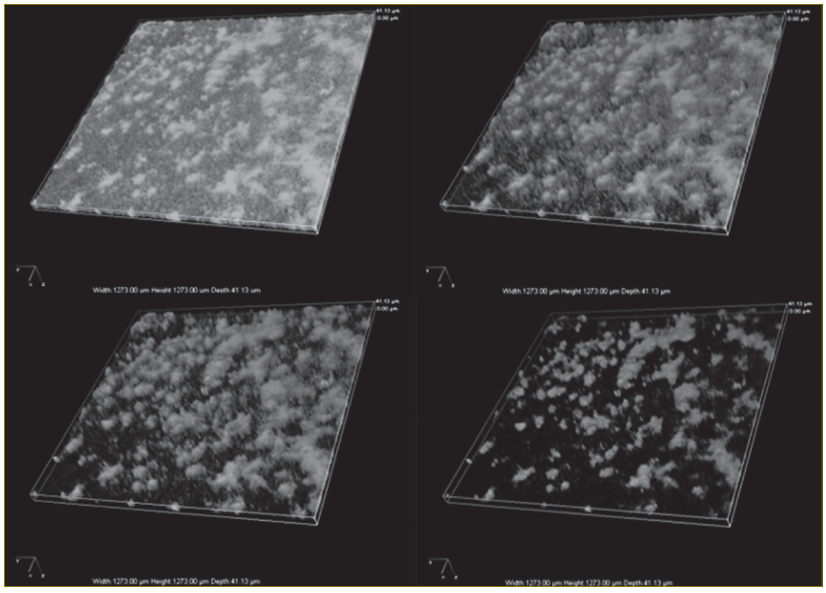

그림 1. 스테인레스 스틸 표면에 형성한 *Escherichia coli* O157:H7 바이오필름의 공초점현미경 이미지

2. 효소처리

이렇게 미생물을 둘러싸고 보호하는 EPS를 타깃으로 하는 효소들은 바이오필름으로부터 미생물의 제거를 용이하게 한다(8). 항바이오필름 용도의 효소를 사용한 연구는 최근 몇년간 증가하였고, 산업적으로 성공적으로 적용되었다(35, 37). 미생물 제어에 이용되는 효소는 항미생물 효소와 항바이오필름 효소로 나눌 수 있다. 항미생물 효소는 세포막의 구성성분을 분해하는 효소로 직접적으로 세포를 죽이는 작용을 한다. 항바이오필름 효소는 항쿼럼센싱 효소, EPS분해 효소로 나뉜다. 항쿼럼센싱 효소는 미생물 세포간 커뮤니케이션인 쿼럼센싱과 관련된 물질을 분해하는 역할을 하고, EPS분해 효소는 바이오필름 주 구성요소인 EPS를 분해하는 역할을 하며, 다시 핵산 분해 효소, 다당체 분해 효소, 단백질 분해 효소로 나뉜다(그림 2).

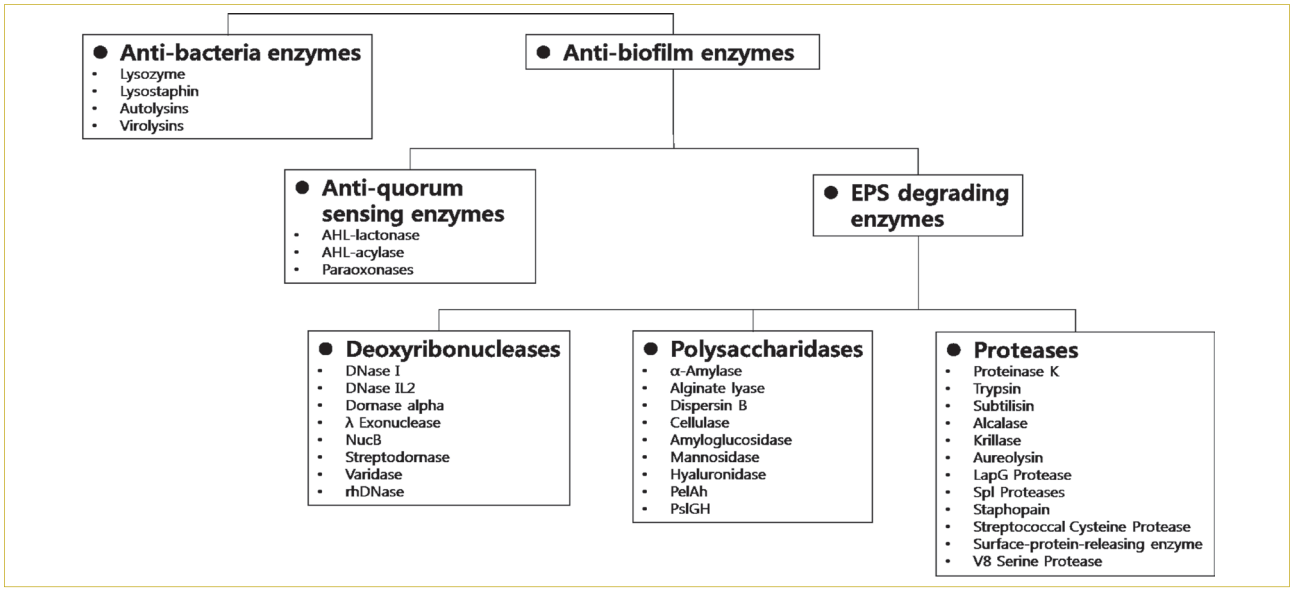

그림 2. 미생물 및 바이오필름 제어 효소의 분류

2-1. Deoxyribonucleases

많은 바이오필름에서 세포밖 DNA (Extracellular DNA)는 골격구조의 역할을 하며, 미생물의 부착, 응집, 수평적 유전자전달의 역할을 한다(1, 7, 14, 27, 39). 다양한 핵산 분해효소의 항바이오필름 효과는 다음 표와 같다(표 1).

2-2. Proteases

세포밖 단백질은 EPS의 주요 구성성분으로 미생물의 EPS 유지와 수정에 중요한 역할을 한다(16, 42). 또한, DNA결합 단백질(DNABPs), 아밀로이드계 단백질(FA/ALPs), 그 외에 바이오필름 관련 단백질들(Baps)은 부착 표면에서 미생물의 생존, EPS의 구조적 부착 그리고 전반적인 바이오필름의 물리적 안정성에 중대한 역할을 한다(12, 21). 따라서, 이러한 세포밖 단백질에 대한 효소분해는 상당한 미생물 저감 가능성을 가지고 있다. 다양한 단백질 분해효소의 항바이오필름 효과는 다음 표와 같다(표 2).

표 1. 항바이오필름에 적용되는 Deoxyribonucleases

Enzymes	Applied strains	Functions	References
DNase I	*Acinetobacter baumannii*	생성된 바이오필름 분해	(36)
DNase I	*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(19)
DNase I	*Enterococcus faecalis*	바이오필름 형성 방지	(38)
DNase I	*Escherichia coli*	생성된 바이오필름 분해	(36)
DNase I	*Haemophilus influenzae*	생성된 바이오필름 분해	(36)
DNase I	*Klebsiella pneumoniae*	생성된 바이오필름 분해	(36)
DNase I	*Listeria monocytogenes*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(26)
DNase I	*Pseudomonas aeruginosa*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(36, 39)
DNase I	*Staphylococcus aureus*	생성된 바이오필름 분해	(36)
DNase	*Staphylococcus haemolyticus*	생성된 바이오필름 분해	(10)
NucB	*Staphylococcus aureus*	생성된 바이오필름 분해	(32)
DNase I	*Vibrio cholerae*	생성된 바이오필름 분해	(31)
DNase I	*Vibrio parahaemolyticus*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(18)
DNase I	*Aspergillus fumigatus*	생성된 바이오필름 분해	(29)

표 2. 항바이오필름에 적용되는 Proteases

Enzymes	Applied strains	Functions	References
Proteinase K	*E. coli* O157:H7	생성된 바이오필름 분해	(6)
Proteinase K	*Listeria monocytogenes*	부착 방지/생성된 바이오필름 분해	(26)
Metalloprotease	*Listeria monocytogenes*	바이오필름 형성 저해	(24)
Trypsin	*Pseudomonas aeruginosa*	생성된 바이오필름 분해	(3)
Protease	*Pseudomonas fluorescens*	생성된 바이오필름 분해	(25)
Proteinase K	*Pseudomonas putida*	생성된 바이오필름 분해	(11)
Proteinase K	*Staphylococcus aureus*	생성된 바이오필름 분해	(18, 33)
Proteinase K	*Salmonella* Enteritidis / *Salmonella* Typhimurium	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(18)
Proteinase K	*Vibrio parahaemolyticus*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(18)

2-3. Polysaccharidases

대부분의 바이오필름은 세포밖 다당체를 주요 EPS구성 성분으로 한다(2, 9, 40). 이들은 구조적 안정성, 물리적, 화학적 위해요소로부터의 보호, 부착, 응집, 건조 저항, 영양부족시 영양분 제공 등의 다양하면서도 중요한 역할들을 한다(9, 23). 이러한 중요성에 기인하여 이들을 타깃으로한 다양한 효소를 이용한 바이오필름 제어연구가 수행되어왔다. 다양한 다당체 분해효소의 항바이오필름 효과는 다음 표와 같다(표 3).

2-4. 시너지

여러 연구들에 의해서 효소의 조합 또는 항생제와의 병합처리가 바이오필름 제어에 효과적임이 증명되었다(15, 28, 41). 또한, 효소와 다른 효소를 이용한 병합처리 또한 효과적임이 증명되었다. 예를 들어 *Acinetobacter baumannii* 바이오필름에 대하여 DNase I 과 항생제인 ampicillin을 각각 단일처리 하였을 때는 0.1 log CFU/well 미만의 저감효과가 발생하였지만, 이를 함께 처리하였을 때는 1.0 log CFU/well 정도의 저감효과가 발생하여 1.0 log CFU/well 정도의 시너지 저감효과가 발생하였다(36). 또한, 주요한 식중독균인 *Salmonella* Typhimurium 바이오필름에 대하여 proteinase K 와 sodium hypochlorite을 각각 단일 처리하였을 때 1.1과 1.5 log CFU/cm^2 의 저감효과가 발생하였지만, 두 처리를 연속적으로 병합처리 하였을 때는 3.4 log CFU/cm^2 의 저감효과가 발생하여 0.8 log CFU/cm^2 의 시너지 저감효과가 발생하였다(18). 다양한 병합처리에 의한 항바이오필름 시너지 효과는 다음 표와 같다(표 4).

표 3. 항바이오필름에 적용되는 Polysaccharidases

Enzymes	Applied strains	Functions	References
Dispersin B	*Escherichia coli*	바이오필름 형성 저해	(13)
Alginate lyase	*Pseudomonas aeruginosa*	Alginate 분해 / 생성된 바이오필름 분해	(4, 20)
α-mannosidase, β-mannosidase	*Pseudomonas aeruginosa*	생성된 바이오필름 분해	(3)
Pectin esterase, pectin lyase, cellulase	*Pseudomonas fluorescens*	생성된 바이오필름 분해	(28)
amyloglucosidase	*Salmonella* Typhimurium	바이오필름 형성 저해	(18)
α-amylase	*Staphylococcus aureus*	바이오필름 형성 저해/ 생성된 바이오필름 분해	(5)
Dispersin B	*Staphylococcus epidermidis*	생성된 바이오필름 분해	(17)
amyloglucosidase	*Vibrio parahaemolyticus*	바이오필름 형성 저해	(18)

표 4. 항바이오필름에 적용되는 효소와 다른 제어방법의 병합처리를 통한 시너지 효과

Treatment	Applied strains	Synergistic effects	References
DNase I + Ampicillin	*Acinetobacter baumannii*	1.0 log/well	(36)
DNase I + Ampicillin	*E. coli*	0.7 log/well	(36)
Glucose oxidase+ lactoperoxidase	*Pseudomonas aeruginosa*	1.7 log	(15)
Alginate lyase + tobramycin	*Pseudomonas aeruginosa*	Complete elimination	(20)
Cellulase + pronase	*Pseudomonas fluorescens*	1.35 log/cm^2	(28)
Glucose oxidase+ lactoperoxidase	*Pseudomonas fluorescens*	0.8 log	(15)
Proteinase K + Sodium hypochlorite	*Salmonella* Typhimurium	0.8 log/cm^2	(18)
Glucose oxidase+ lactoperoxidase	*Staphylococcus aureus*	0.7 log	(15)
Glucose oxidase+ lactoperoxidase	*Staphylococcus epidermidis*	0.5 log	(15)

III. 결론

최근 식품산업계에서 발생하는 식품위생관련 이슈들의 원인이 바이오필름과 연관성이 있음이 상당부분 밝혀지면서, 미생물의 바이오필름 형성기작과 이를 제어하기 위한 연구들이 지속되어 왔다. 그 중 하나의 전략으로 효소를 이용한 방법이 제시되고 있으며, 연구적으로, 산업적으로도 활발히 활용되어오고 있다. 효소를 이용하는 방법은 크게 미생물 자체를 사멸시키는 방법, 쿼럼센싱을 방해하는 방법, 바이오필름 구성성분인 EPS를 분해하는 방법 세가지가 있으며, 이 중에서 EPS를 분해하는 방법은 기존에 다른 미생물 제거법과 병행하여 큰 시너지효과를 보이는 연구결과들이 다수 발표되어왔다. 이러한 효소를 이용하는 방법은 바이오필름을 제거할 수 있는 친환경적이며 효과적인 대체법으로 사용될 수 있다. 최근 합성미생물학의 발전은 더욱 좋은 활성을 가지는 효소를 더 저렴한 비용으로 생산할 수 있게 하였으며, 다양한 종류의 효소 조합 및 다른 살균소독제와의 조합을 통한 시너지 연구는 바이오필름 분해 효소의 활용범위와 효과를 크게 개선시킬 것으로 기대된다. 또한 식품환경 표면의 효소를 이용한 코팅기술은 새로운 바이오필름 형성 억제 기술이 될 수 있다. 이러한 다양한 연구로 효소를 활용한 바이오필름제어는 그 관심과 효용성이 크게 증가하였다고 할 수 있다.

참고 문헌

1. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Advances in Applied Microbiology (Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.), pp 1 – 40 1st Ed.(2014).

2. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. PLoS One. 8, e67950 (2013).

3. Banar M, et al. Evaluation of Mannosidase and Trypsin Enzymes Effects on Biofilm Production of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wound Infections. PLoS One. 11, e0164622 (2016).

4. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2355 – 9 (1994).

5. Craigen B, Dashiff A, Kadouri DE. The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms. Open Microbiol. J. 5, 21 – 31 (2011).

6. Cui H, Ma C, Lin L. Co-loaded proteinase K/thyme oil liposomes for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on cucumber. Food Funct. 7, 4030 – 4040 (2016).

7. Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. Environ. Microbiol. Rep. 5, 778 – 786 (2013).

8. Fleming D, Rumbaugh K. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. Microorganisms. 5, 15 (2017).

9. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623 – 633 (2010).

10. Fredheim EGA, et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J. Clin. Microbiol. 47, 1172 – 1180 (2009).

11. Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. Mol. Microbiol. 75, 815 – 826 (2010).

12. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiol. Rev. 39, 649 – 669 (2015).

13. Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, Romeo T. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. J. Bacteriol. 187, 382 – 7 (2005).

14. Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG. Life after death: the critical role of extracellular DNA in

microbial biofilms. Lett. Appl. Microbiol. 57, 467–475 (2013).

15. Johansen C, Falholt P, Gram L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3724–8 (1997).

16. Kaplan JB. Biofilm Dispersal : Mechanisms , Clinical Implications, and potential therapeutic uses. J. Dental Research 89, 205–218 (2010).

17. Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2633–6 (2004).

18. Kim M, Lim E, Kim J. Enzymatic inactivation of pathogenic and nonpathogenic bacteria in biofilms in combination with chlorine. J. Food Prot. 82, 605–614 (2019).

19. Kim S, Park C, Lee E, Bang W, Kim Y, Kim J. Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. Food Control. 71, 94–100 (2017).

20. Lamppa JW, Griswold KE. Alginate Lyase Exhibits Catalysis–Independent Biofilm Dispersion and Antibiotic Synergy. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 137–145 (2013).

21. Lasa I, Penadés JR. Bap : A family of surface proteins involved in biofilm formation. Research in Microbiology 157, 99–107 (2006).

22. Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food–industry. Biofouling. 26, 421–431 (2010).

23. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. Microbiol. Spectr. 3, 1191–1200 (2015).

24. Longhi et al. Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. Microbial Pathogenesis. 45, 45–52 (2008).

25. Molobela IP, Cloete TE, Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. African J. Microbiol. Res. 4, 1515–1524 (2010).

26. Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre–existing biofilms. Int. J. Food Microbiol. 187, 26–32 (2014).

27. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit. Rev. Microbiol. 41, 341–352 (2015).

28. Orgaz B, Neufeld RJ, SanJose C. Single–step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. Enzyme Microb. Technol. 40, 1045–1051 (2007).

29. Rajendran R, et al. Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms. Eukaryot. Cell. 12, 420–429 (2013).

30. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 14, 491–509 (2015).

31. Seper A, et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. Mol. Microbiol. 82, 1015–1037 (2011).

32. Shields RC, et al. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis. PLoS One. 8, e55339 (2013).

33. Shukla SK, Rao TS. Dispersal of Bap–mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. J. Antibiot. (Tokyo). 66, 55–60 (2013).

34. Srey S, Jahid IK, Ha SD. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control. 31, 572–585 (2013).

35. Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. Biomed Res. Int. 2013, 150653 (2013).

36. Tetz G V, Artemenko NK, Tetz V V. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 1204–1209 (2009).

37. Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. Biotechnol. J. 8, 97–109 (2013).

38. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, HancockLE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. J. Bacteriol. 190, 5690-5698 (2008).

39. Whitchurch CB. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. Science 295, 1487-1487 (2002).

40. Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming H-C. [25] Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, pp 302-314(2001).

41. Yamasaki M, Ogura K, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. A Structural Basis for Depolymerization of Alginate by Polysaccharide Lyase Family-7. J. Mol. Biol. 352, 11-21 (2005).

42. Zhang X, Bishop PL. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. Chemosphere 50, 63-69 (2003).