pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 5, pp. 430~439 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.5.430

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식중독 미생물의 biofilm 형성에 대한 계피, 정향 및 레몬그래스 정유의 억제 효과

김형은[1] · 김용석[2]*
[1]한국식품산업클러스터진흥원, [2]전북대학교 식품공학과

Inhibitory Effects of Cinnamon, Clove and Lemongrass Essential Oils against Biofilm Formation by Food Poisoning Bacteria

Hyeong-Eun Kim[1], Yong-Suk Kim[2]*
[1]*Business Investment Support Department, The Food Industry Promotional Agency of Korea, Iksan, Korea*
[2]*Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju, Korea.*

(Received September 30, 2021/Revised October 18, 2021/Accepted October 18, 2021)

ABSTRACT - Essential oils with excellent antibacterial activity were used to study the inhibitory effect against the six types of food poisoning biofilms formed on the surfaces of polyethylene (PE) and stainless steel (SS) that are widely used for food processing instruments and containers. The antibacterial activity of 20 kinds of essential oils was tested using the disk diffusion method. The result showed the degree of antibacterial activity in the following order: cinnamon> clove> lemongrass> peppermint> pine needle (highest to lowest). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamon and clove oil were in the range of 0.63-1.25 mg/mL and 1.25-2.50 mg/mL, respectively. The MIC and MBC of lemongrass oil were 1.25-2.50 mg/mL and 2.50-5.00 mg/mL, respectively, showing slightly less antibacterial activity. Although the preventive effect of three types of essential oils on the biofilm formation differed slightly depending on food poisoning bacteria, PE, and SS, it was found that the precoating of 0.5% cinnamon, clove, and lemongrass oil on the PE and SS affects the formation of biofilm. Increased essential oil concentration significantly inhibited the biofilm formation for all food poisoning bacteria (P<0.05), and biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were not formed when treated with 0.5% cinnamon and clove oil. The elimination effect of food poisoning bacteria biofilms formed on the surfaces of PE and SS differed depending on the type of food poisoning bacteria. Still, the biofilm elimination effect increased as the essential oil concentration increased, and the biofilm elimination rate of clove oil was generally high. Therefore, this study found that the cinnamon and clove essential oils (0.5%) are suitable natural materials that effectively prevent, inhibit, and remove the biofilms formed by the food poisoning bacteria on the surfaces of polyethylene and stainless steel.

Keywords: Biofilm, Essential oil, Cinnamon, Clove, Lemongrass, Food poisoning bacteria

Biofilm은 물질의 표면에 부착된 미생물이 그 표면에 번식하면서 세포 외 다당류(extracellular polymeric substance, EPS)를 생산하고, 이것을 매개로 인접한 세균이 응집하고 한 덩어리가 되어 고체나 생체 표면에 세균이 막(film)을 형성하는 상태를 가리킨다[1-4]. EPS는 glycocalyx(탄수화복합물질)라고 알려져 있는 polysaccharide, proteins, phospholipids, teichoic acid 및 nucleic acid와 다른 중합체들이 가수분해되어 구성되어 있다[5-8].

식품가공 기구 및 용기 등 식품접촉표면에 형성된 biofilm은 식품가공공정이나 조리 시에 식중독 세균의 중요한 저장소 역할을 하며, biofilm 내부의 세균들은 저항성의 증가로 세척에 의해 제대로 제거되지 않고 재증식하여 식품의 안전에 큰 위험요소가 될 수 있다[1,5]. Biofilm 속에 존재하는 세균들은 성장속도, 세포벽의 구조 및 조성, 면역학적 성질, 효소활성 및 항균제에 대한 감수성 등이 일반 부유 세균(planktonic cell)과는 매우 다르다[8]. 이는 탄수화복합물질(glycocalyx)이나 biofilm에 의해 그 속에 존재하

*Correspondence to: Yong-Suk Kim, Department of Food Science & Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea
Tel: +82-63-270-2567; Fax: +82-63-270-2572
E-mail: kimys08@jbnu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

는 미생물이 위생세제, 항생물질 및 항체의 공격에 영향을 받지 않거나 적게 받게 하는 방패 역할을 함으로써 위생세제 등 항미생물질의 효력을 크게 저하시키기 때문이다[9].

식품과 접촉하는 표면의 살균·소독을 위하여 사용되는 살균소독제는 식중독 미생물의 교차오염을 줄일 수 있는 제어방법의 하나로 인식되면서 관련 산업체의 사용이 지속적으로 증가하고 있으나[10], 사용대상이 식품과 직접 접촉하는 기구 등이기 때문에 식품으로 이행될 가능성이 있다. 또한 최근 소비자의 건강 지향적 요구와 식품첨가물의 안전성에 대한 인식이 증대되어 화학적 살균제에 대한 기피현상이 일어나고 있으므로 이에 천연 항균 물질이 대안으로 떠오르고 있다.

최근에는 식물유래 정유를 활용하여 다양한 미생물의 biofilm을 제어하려는 연구가 진행되고 있다. 대표적인 예로 *Coriandrum sativum* L., *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum* 정유로 구강 *Candida albicans*의 biofilm 형성을 억제하였으며[11-13], *Curcuma longa* 정유로 *Streptococcus mutans*의 biofilm을 제어하였고[14], 식품 제조업에서 biofilm을 형성하는 *Acinetobacter, Sphingomonas, Stentrophomonas*에 thyme 정유가 anti-biofilm 효과를 나타낸다고 보고하였다[15]. 또한 1% oregano, savory 및 thyme 정유는 살구, 자두와 같은 핵과류 표면에 *Monilinia laxa*와 *Botrytis cinerea*가 형성한 biofilm제어에 효과를 나타내었다[16].

본 연구에서는 가공식품의 안전한 생산을 위하여 화학적 살균제를 대체할 수 있는 항균 작용이 우수한 식물 정유를 이용하여 식품가공 기구 및 용기에 다양하게 사용되는 재질인 polyethylene과 stainless steel 표면에 형성된 식중독 미생물의 biofilm을 억제하는 효과에 대하여 연구하였다.

Materials and Methods

식중독 미생물

식중독 미생물에 의한 biofilm 형성에 대한 억제 효과를 시험하기 위하여 전북대학교 식품공학과(Jeonju, Korea)에 보관하고 있는 Gram-positive 식중독 미생물인 *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* KCCM 11812와 Gram-negative 식중독 미생물인 *Escherichia coli* KCCM 11234, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 11862를 대상으로 하였다. 모든 시험 균주는 tryptic soy broth (TSB: Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 0.7 mL와 50% glycerol (v/v) 0.3 mL에 넣어 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다. 시험 균주는 TSB (Difco, USA) 배지를 이용하여 계대 배양하고, 30°C에서 24시간 간격으로 2차 활성화하여 실험에 사용하였다.

Polyethylene coupon 및 stainless steel coupon

실험에 사용된 식품접촉표면은 식품용 기구, 용기 및 포장에 주로 사용되는 재질인 내열성 polyethylene과 stainless steel (type 304, No.4)을 대상으로 시험하였다.

Polyethylene coupon은 13 mm diameter의 멸균된 polyethylene coverslip (Thermanox® plastic coverslip, NUNC™, Rochester, NY, USA)을 이용하였다.

Stainless steel coupon은 1×1×0.1 cm 크기로 자른 후 이물질을 제거하기 위해 아세톤에 하룻동안 담가 표면에 묻어있는 기름을 제거하였다. 그리고 stainless steel coupon을 꺼내어 sonicator (Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 1시간 정도 처리하여 표면에 부착된 세균과 이물질 등을 제거하였다. 처리된 stainless steel coupon을 흐르는 물에 3회 세척하고 다시 멸균 증류수로 1회 세척한 후 121°C에서 15 분간 멸균(Autoclave, WAC-100, DAIHAN Scientific Co., Wonju, Korea)하여 사용하였다.

정유의 항균활성 탐색

항균활성 탐색을 위해 사용한 식물유래 정유(essential oils)는 수증기 증류법으로 추출한 제품 20종(basil, cedar wood, cinnamon (bark), citronella, clary sage, clove, eucalyptus, ginger, lavender, lemon, lemongrass, lime, majoram, mandarin, mustard, peppermint, pine needle, spearmint, taragon, tea tree)을 다인솝(Cheongju, Korea)에서 구입하여 4℃에서 냉장보관하며 사용하였다.

항균활성이 높은 정유를 선발하기 위하여 disk diffusion method[17]에 따라 식물유래 정유 20종의 항균활성을 측정하였다. 각각의 식중독 미생물을 멸균된 TSB에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액 100 μL를 취하여 동일한 두께의 tryptic soy agar (TSA) 배지에 균일하게 도말하였다. 각각의 정유는 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)이 2% 첨가된 멸균증류수에 100 μg/mL의 농도로 희석한 후 20 μL를 취하여 멸균된 paper disk (8 mm, Advantec, Toyo Foshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)에 점적하여 식중독 미생물이 도말된 TSA 평판배지 위에 놓고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 항균 효과는 균주의 성장 억제대(clear zone)의 크기를 측정하여 평가하였으며, 대조구는 실험에 사용한 정유와 같은 농도로 희석한 항생제인 tetracycline hydrochloride (Duchefa biochemie, Haarlem, Netherlands)을 사용하였다. 측정 시 paper disc의 직경 8 mm를 제외하였으며, 정유의 희석액으로는 2%의 Tween 20이 첨가된 멸균증류수를 사용하였고, disc diffusion method를 통해 항균활성이 없음을 미리 확인하였다.

정유의 추출

항균활성 탐색 실험에서 6종의 식중독 미생물에 대해

우수한 항균효과를 나타낸 계피(cinnamon, 베트남산), 정향(clove, 마다카스카르산), 및 레몬그래스(lemongrass, 터키산)는 전주시(Jeonbuk, Korea)에 소재한 마트에서 구입하여 사용하였다. 수증기 증류(steam distillation)는 clevenger-type essential oil extraction apparatus (EssenLab-plus, Hanil Lab Tech Co., Ltd, Yangju, Korea)를 이용하여 3시간 동안 진행하였다. 증류에 의해 얻은 정유는 물층으로 부터 분리하여 무수황산나트륨(Na_2SO_4)을 첨가한 후 4°C에 보관하여 수분을 제거하였다. 정유는 사용하기 전까지 휘발성 성분의 휘발을 최소화하기 위하여 –40°C의 냉동고에 보관하였다.

각각의 정유는 시험을 위하여 10% (v/v) stock emulsion (10% essential oil, 88% sterilized water, 2% Tween 20; Merck)과 1%(v/v) emulsion (10% stock emulsion 및 90% sterilized water)으로 준비하였다. 준비된 정유 emulsion은 사용하기 전에 균질화를 위해 30초 동안 혼합한 후 사용하였다.

정유의 최소억제농도 및 최소살균농도 시험

정유의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 시험을 위하여 액체배지희석법(broth dilution method)[18]을 사용하였다. 즉, 각 정유의 처리농도는 최고 10 mg/mL에서부터 2배씩 희석하여 최저농도 0.078 mg/mL까지로 하였다. 시험에 사용한 식중독 미생물의 균수는 10^5 CFU/mL로 조정하여 사용하였다. MIC는 30°C에서 24시간 배양한 후 세균의 증식을 억제하는 가장 낮은 농도로 구하였으며, MBC는 세균의 증식을 완전히 억제하는 가장 낮은 농도로 선정하였다.

정유의 biofilm 형성 예방 효과

정유가 식중독 미생물의 biofilm 형성을 예방하는 효과를 시험하기 위하여 다음과 같이 수행하였다. 멸균된 polyethylene 및 stainless steel coupon에 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유를 각각 0.1%, 0.3%, 0.5% 농도로 희석하여 각각 100 μL씩 분주하였다. 상온에서 30분 동안 방치 후 분주한 각각의 정유를 제거하고 다시 30분 동안 상온에서 완전히 건조시켰다. 대조군은 정유를 첨가하지 않은 멸균 증류수를 이용하였다. 2차 활성화된 각각의 식중독 미생물을 정유로 표면이 코팅된 polyethylene 및 stainless steel coupon에 각각 100 μL씩 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. Coupon에 남아있는 부유성 미생물을 제거하기 위하여 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척하고 상온에서 30분간 건조시킨 후 형성된 biofilm을 glass bead법으로 측정하였다[19]. 즉, 각 polyethylene 및 stainless steel coupon을 5개의 glass beads (5 mm-diameter, Glastechnique Mfg., Lauda-Konigshofen, Germany)를 포함한 peptone water (0.1% peptone 및 0.02% Tween 80) 20 mL가 들어있는 50-mL polystyrene tube에 넣고 vortex mixer (Vortex-2 Genie, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)에서 2분간 진탕하였다. 진탕한 용액은 TSA plate 위에 직접 또는 0.1% peptone water에 연속적으로 희석한 후 4개의 plate당 250 μL씩 총 1 mL(검출한계 1.3 log CFU/coupon)를 도말하였다. 각각 plate는 30°C에서 24시간 배양한 후 생균수를 세어 log CFU/cm^2로 나타내었다.

정유의 biofilm 성장 억제 효과

정유가 식중독 미생물에 의해 형성된 biofilm의 성장을 억제하는 효과를 시험하기 위하여 배양된 식중독 미생물과 0.1, 0.3 및 0.5% 농도의 정유(cinnamon, clove 및 lemongrass)를 각각 50 μL씩 동시에 멸균된 polyethylene 및 stainless steel coupon에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. Coupon에 남아있는 부유성 미생물을 제거하기 위하여 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척하고 상온에서 30 분간 건조시킨 후 형성된 biofilm을 glass bead 법으로 측정하였다[19].

정유의 biofilm 제거 효과

식품접촉표면에 형성된 식중독 미생물의 biofilm을 정유가 제거하는 효과를 시험하기 위해 멸균된 polyethylene 및 stainless steel coupon에 2차 활성 된 식중독 미생물 배양액 100 μL를 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 미리 biofilm을 형성시켰다. Polyethylene 및 stainless steel coupon에 남아있는 부유성 미생물을 제거하기 위하여 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척 후 상온에서 30분간 건조하였다. 그리고 각 polyethylene 및 stainless steel coupon에 0.1%, 0.3%, 0.5% 농도의 정유를 각각 100 μL씩 분주하고 1시간 동안 상온에 방치하였다. 식물 정유를 제거하기 위하여 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척 후 다시 상온에서 표면을 건조한 후 남은 biofilm을 glass bead 법으로 측정하였다[19].

통계분석

모든 실험은 3회의 독립적인 실험을 수행하여 결과를 종합하였다. 데이터는 평균±표준오차(Standard error of mean, SEM)로 표시하였고, 각각 실험에서 얻어진 결과 값의 유의성 검증은 SAS Package (Statistical Analysis System, SAS version 9.3, SAS Institute INC, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance), Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 실시하였다($P<0.05$)[20].

Results and Discussion

식물유래 정유의 항균활성 탐색

수증기증류법으로 추출되어 시중에 판매중인 식물유래

Table 1. Antimicrobial activities of essential oils against various food poisoning bacteria by disk diffusion assay (Unit : mm)

Essential oils	Strains					
	B. cereus ATCC 13061	*L. monocytogenes* ATCC 19112	*S. aureus* KCCM 11812	*E. coli* KCCM 11234	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* Typhimurium ATCC 11862
Basil	5.00±1.00^{e}	5.33±0.58^{d}	2.67±0.58^{figh}	4.33±0.58^{c}	2.67±0.58^{fe}	2.67±1.15^{gef}
Cedar wood	1.67±0.58^{fg}	2.67±0.58^{fge}	2.33±0.58^{figh}	3.33±0.58^{cde}	1.33±0.58^{f}	2.67±1.15^{gef}
Cinnamon	17.67±0.58^{a}	16.33±1.53^{a}	16.67±0.58^{a}	22.00±1.00^{a}	20.67±1.15^{a}	17.67±1.15^{a}
Citronella	1.67±0.58^{fg}	3.33±1.15^{fdge}	2.00±1.00^{igh}	3.33±0.58^{cde}	2.00±0.00^{fe}	2.33±0.58^{gf}
Clary sage	1.33±0.58^{g}	3.67±1.15^{fdge}	3.00±1.00^{figeh}	1.67±0.58^{fg}	2.00±0.00^{fe}	2.33±1.53^{gf}
Clove	15.67±1.53^{b}	15.00±1.00^{a}	8.00±1.00^{c}	7.33±0.58^{b}	7.67±0.58^{c}	5.67±1.53^{b}
Eucalyptus	2.67±0.58^{fg}	1.67±0.58^{g}	1.67±0.58^{ih}	2.33±0.58^{efg}	1.00±0.00^{f}	2.33±0.58^{gf}
Ginger	2.00±0.00^{fg}	1.67±0.58^{g}	1.33±0.58^{i}	1.33±0.58^{g}	1.67±0.58^{fe}	1.33±0.58^{g}
Lavender	1.67±0.58^{fg}	4.67±1.53^{de}	4.00±1.00^{fde}	2.33±0.58^{efg}	2.33±0.58^{fe}	2.67±0.58^{gef}
Lemon	1.33±0.58^{g}	2.33±0.58^{fg}	3.67±1.15^{fdge}	1.67±0.58^{fg}	2.33±0.58^{fe}	3.00±1.00^{def}
lemongrass	12.33±1.53^{c}	12.33±2.52^{b}	12.33±1.15^{b}	6.67±0.58^{b}	9.67±2.52^{b}	5.33±0.58^{bc}
Lime	3.00±0.00^{fg}	3.67±0.58^{fdge}	2.33±0.58^{figh}	3.00±1.00^{de}	2.33±0.58^{fe}	2.00±0.00^{gf}
Majoram	2.00±0.00^{fg}	5.00±1.00^{d}	5.00±1.00^{d}	2.67±0.58^{ef}	4.67±0.58^{d}	4.33±0.58^{dbc}
Mandarin	2.33±0.58^{fg}	5.00±1.00^{d}	3.33±1.53^{fdgeh}	2.67±0.58^{ef}	2.67±0.58^{fe}	4.00±0.00^{dec}
Mustard	2.00±1.00^{fg}	1.67±0.58^{g}	1.67±1.15^{ih}	3.33±1.15^{cde}	2.00±1.00^{fe}	1.33±0.58^{g}
Peppermint	11.33±1.53^{c}	8.00±1.00^{c}	1.33±0.58^{i}	2.33±0.58^{efg}	2.67±1.15^{fe}	2.00±0.00^{gf}
Pine needle	9.00±1.73^{d}	4.33±2.08^{fde}	3.00±1.73^{figeh}	2.00±0.00^{efg}	3.33±0.58^{de}	2.00±0.00^{gf}
Spearmint	2.33±0.58^{fg}	2.00±0.00^{g}	2.00±1.00^{igh}	4.00±1.00^{cd}	1.00±0.00^{f}	1.33±0.58^{g}
Taragon	2.67±1.15^{fg}	5.33±0.58^{d}	3.00±1.00^{figeh}	2.33±0.58^{efg}	3.33±1.15^{de}	3.00±1.00^{def}
Tea tree	3.33±1.15^{f}	3.33±0.58^{fdge}	4.67±0.58^{de}	2.33±0.58^{efg}	4.67±0.58^{d}	5.67±0.58^{b}
Tetracycline	17.67±0.58	16.33 ± 0.58	16.00±1.00	15.00±0.00	14.33±0.58	16.67±1.15

Data represent means±standard deviations of three measurements.
Means with the different letters within a column are significant different (P<0.05).

정유 20종의 식중독 미생물에 대한 항균활성을 disk diffusion 방법으로 평가한 결과는 Table 1에 나타내었다. 모든 식중독 미생물에 대해서 cinnamon 정유가 유의적(P<0.05)으로 높은 항균활성을 나타내었다. *B. cereus* ATCC 13061과 *L. monocytogenes* ATCC 19112에 대해서는 cinnamon > clove > lemongrass > peppermint > pine needle 순으로 항균활성을 나타내었다. *S. aureus* KCCM 11812와 *P. aeruginosa* ATCC 27853에 대해서는 clove 정유보다 lemongrass 정유의 clear zone이 각각 12.33±1.15 mm 및 9.67±2.52 mm로 크게 형성되었으며, *E. coli* KCCM 11234와 *S.* Typhimurium ATCC 11862에 대해서는 clove와 lemongrass 정유에서 유사한 수준의 항균활성을 나타내었다. 식중독 미생물에서 식물유래 정유의 항균활성 시험 결과를 종합하면 cinnamon 정유는 대조군으로 사용된 항균물질인 tetracycline과 유사한 정도의 항균활성을 나타내었으며, clove 및 lemongrass 정유가 모든 균주에서 우수한 항균활성을 나타내었다. Fei 등[21]의 연구에서 *S aureus, B. subtilis* 및 *E. coli*를 대상으로 식물 정유의 항균활성을 측정한 결과 clary sage와 basil에서 높은 항균활성을 보여 본 연구결과와 다소 차이가 있었으며, spearmint와 lavender는 본 결과와 유사하게 약한 항균활성을 나타내었다. 또한 항균활성이 뛰어나다고 알려진 ginger 및 mustard 정유는 본 연구에서 사용된 식중독 미생물에는 항균작용이 뛰어나지 않은 것으로 나타났다[22].

Cinnamon, clove 및 lemongrass 정유의 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

Disk diffusion 방법을 이용한 시험에서 항균활성이 우수한 것으로 나타난 식물유래 정유 3종(cinnamon, clove, lemongrass)을 선발하여 수증기 증류법으로 정유를 추출하고 식중독 미생물의 MIC 및 MBC를 측정하였다(Table 2). Cinnamon 정유는 *B. cereus* ATCC 13061에 대해서 0.31 mg/mL으로 가장 낮은 MIC를 나타내었으나 MBC는 모든 균에서 대체로 유사하게 1.25-2.50 mg/mL을 나타내었다.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamon, clove, and lemongrass essential oils on against food poisoning bacteria (Unit : mg/mL)

Strains	Essential oils					
	Cinnamon		Clove		Lemongrass	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. cereus ATCC 13061	0.31<	1.25<	1.25<	2.50<	1.25<	2.50<
L. monocytogenes ATCC 19112	1.25<	2.50<	1.25<	2.50<	1.25<	2.50<
S. aureus KCCM 11812	1.25<	1.25<	0.63<	1.25<	1.25<	2.50<
E. coli KCCM 11234	1.25<	2.50<	1.25<	2.50<	2.50<	5.00<
P. aeruginosa ATCC 27853	0.63<	2.50<	1.25<	2.50<	2.50<	5.00<
S. Typhimurium ATCC 11862	1.25<	2.50<	1.25<	2.50<	2.50<	5.00<

Clove 정유의 MIC는 *S. aureus* KCCM 11812 (0.63 mg/mL)를 제외하고 1.25 mg/mL로 동일하였으며, *S. aureus* KCCM 11812를 제외한 모든 균에서 2.50 mg/mL의 MBC를 나타내었다. Prabuseenivasan 등[23]은 cinnamon과 clove 정유의 MIC가 *E. coli*에 대해서 >1.6 mg/mL, *P. aeruginosa*에 대해서 0.8-1.6 mg/mL 그리고 *S. aureus*에 대해서는 3.2-6.4 mg/mL을 나타내었다고 보고된 결과와 비교하였을 때 본 연구에 사용된 정유의 MIC 농도가 낮게 나타난 것을 확인하였다. Lemongrass 정유의 MIC는 1.25-2.50 mg/mL이고, MBC는 2.50-5.00 mg/mL으로 다른 정유에 비해 다소 높은 농도에서 미생물의 생육을 억제하였다. Taweechaisupapong 등[13]은 8종의 정유 중 lemongrass 정유가 *C. albicans*에 의한 biofilm 형성 억제 능력이 가장 강하였으며, MIC는 0.5 μg/mL이라고 보고하였다. 식물 정유의 종류에 따라 항균활성에 차이를 보였으나, 식중독 미생물의 종에 따른 정유의 항균활성은 차이를 나타내지 않았다.

정유의 biofilm 형성 예방 효과

Cinnamon, clove 및 lemongrass 정유로 식품접촉 표면(polyethylene 및 stainless steel)을 코팅 처리한 후 6종의 식중독 미생물을 접종하여 biofilm을 형성시켰을 때 biofilm의 형성 예방 효과를 Fig. 1에 나타내었다. 시험한 식중독 미생물 모두에서 정유의 농도가 증가할수록 biofilm 형성을 유의적으로 예방하는 것을 확인하였다(P<0.05). 정유의 농도 차이에 따른 예방효과는 현저한 것으로 나타났으며, cinnamon, clove 및 lemongrass 정유간의 biofilm 형성 예방 효과는 식중독 미생물 균주에 따라 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

B. cereus ATCC 13061은 stainless steel 표면에 비하여 polyethylene 표면에서 낮은 biofilm이 형성되었으며, 특히 0.5% cinnamon 정유를 처리한 polyethylene 표면에서 2.62±0.02 log CFU/coupon으로 유의적으로 낮은 biofilm이 형성되었다.

L. monocytogenes ATCC 19112에 대해서는 polyethylene 표면에 처리한 0.5% lemongrass 정유에 의하여 3.02±0.00 log CFU/coupon으로 biofilm 형성 예방효과가 뛰어났으며, cinnamon 및 clove 정유도 0.5% 농도에서 약 20% 이상 biofilm을 억제하는 것으로 나타났다. Blackman과 Frank[24]는 *L. monocytogenes*가 stainless steel 같은 식품 가공기구의 표면에 여러 형태의 biofilm을 형성할 수 있다고 보고하였으며, Desai 등[25]도 *L. monocytogenes*가 polyethylene 및 stainless steel 표면에서 biofilm을 형성 할 수 있다고 보고하였다.

S. aureus KCCM 11812에 대해서는 polyethylene 표면에서는 0.5% cinnamon 및 lemongrass 정유 처리에 의하여 각각 4.14±0.03 log CFU/coupon 및 4.24±0.03 log CFU/coupon으로, stainless steel 표면에서는 0.5% clove 및 lemongrass 정유 처리에 의해 각각 4.74±0.06 log CFU/coupon 및 4.56±0.02 log CFU/coupon으로 biofilm 형성 예방 효과가 뛰어난 것을 확인하였으며, lemongrass 정유의 경우 polyethylene과 stainless steel 표면 모두에서 높은 biofilm 형성 예방 효과를 나타내었다.

E. coli KCCM 11234에 대해서는 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유간의 biofilm 형성 예방효과가 농도 별로 유사하게 나타났으며 0.5% 정유에서는 polyethylene과 stainless steel 표면 모두에서 30% 이상의 biofilm 형성 예방효과를 나타내었다.

P. aeruginosa ATCC 27853에 대해서는 0.5% clove 정유 처리에 의해 polyethylene 표면에서 31.19%, stainless steel 표면에서 32.25%의 biofilm 형성 예방 효과를 나타내었으며, 0.5% cinnamon 정유 처리에 의해서도 각각 28.04% 및 29.57% 정도로 biofilm 형성 예방 효과를 보였다.

S. Typhimurium ATCC 11862에 대해서는 0.5% clove 정유 처리에 의해 polyethylene 표면에서 3.40±0.01 log CFU/coupon 및 stainless steel 표면에서 3.39±0.02 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되어 예방효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

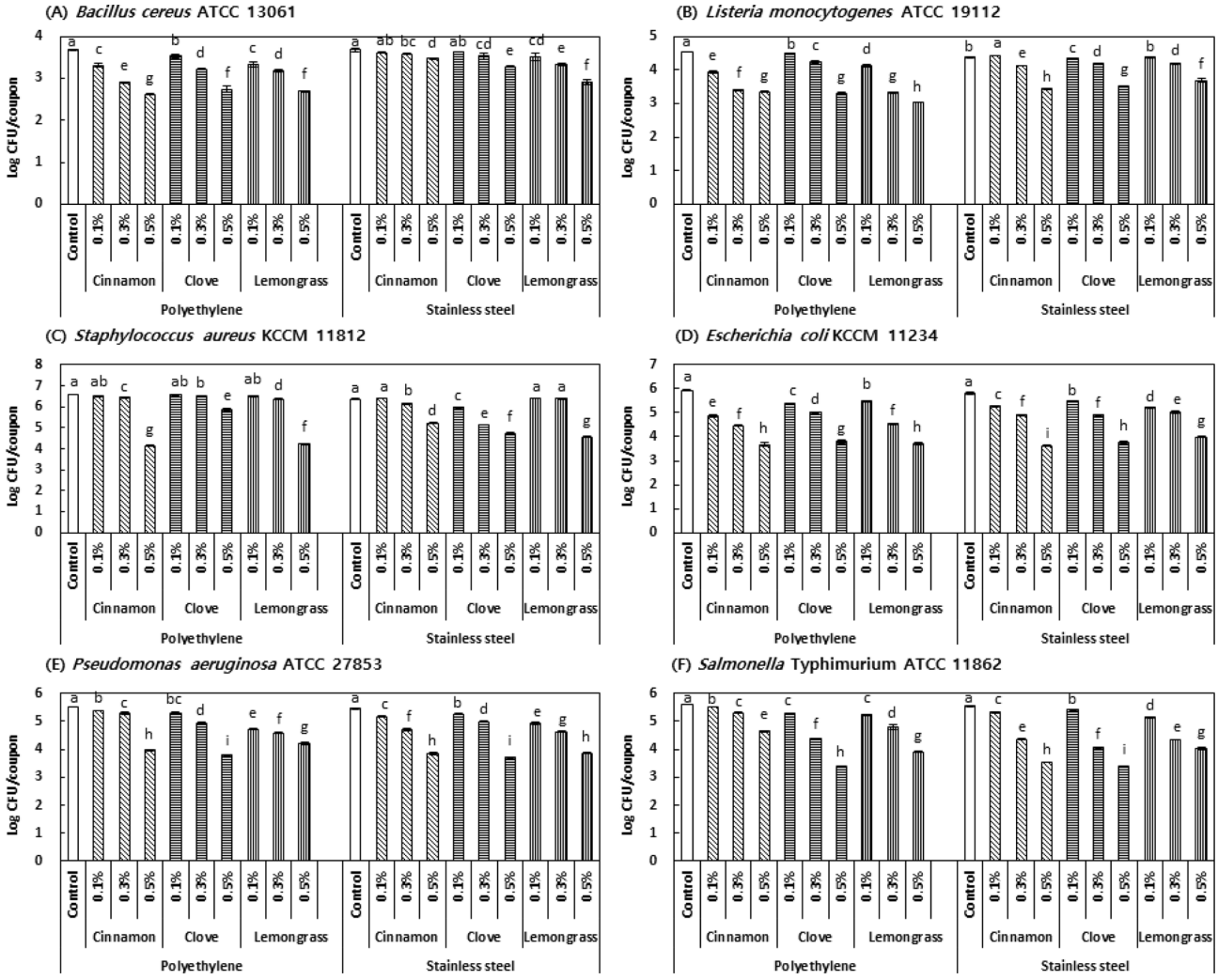

Fig. 1. Prevention effects of cinnamon, clove, and lemongrass essential oils treatment on the against biofilm formation by food poisoning bacteria on polyethylene and stainless steel coupon surface.

각각 식중독 미생물 및 식품접촉 표면에 따라 식물 정유의 biofilm 형성 예방효과는 다소 차이가 있긴 하지만, 0.5% 농도의 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유를 식품접촉 표면에 미리 코팅하였을 때 biofilm 형성에 영향을 주는 것을 확인하였다. Lee 등[14]은 강황(*Curcuma longa*)의 정유가 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 *S. mutans*에 의한 biofilm 형성을 억제하였다고 보고하였다.

정유의 biofilm 성장 억제 효과

식품접촉 표면에 6종의 식중독 미생물의 biofilm을 형성시키는 동시에 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유를 농도별로 첨가하여 그 성장을 억제하는 효과를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

B. cereus ATCC 13061에 대해서는 균만 접종한 대조구에서는 polyethylene 및 stainless steel 표면에서 각각 3.03±0.09 및 3.16±0.01 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었으나 3종 정유 처리구의 경우 biofilm 성장이 억제되었다. 특히 0.5% clove 정유와 같이 접종하였을 때 polyethylene 표면에서는 1.10±0.09 log CFU/coupon 및 stainless steel에서는 1.95±0.05 log CFU/coupon으로 biofilm 성장이 억제됨을 확인하였다. Stainless steel 표면에서는 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유 간의 유사한 효과를 나타내었다.

L. monocytogenes ATCC 19112에 대해서는 stainless steel 표면에서 0.5% cinnamon 및 clove 정유에 의해 biofilm 성장이 100% 억제되어 검출되지 않았다. 또한 polyethylene 표면에서 0.5% 농도의 cinnamon 및 clove 정유에 의해 biofilm 성장이 각각 61.31% 및 61.63% 억제되어 각각 2.35±0.03 및 2.33±0.03 log CFU/coupon을 나타내었다.

S. aureus KCCM 11812에 대해서는 정유의 농도가 증가할수록 biofilm 성장이 억제되었으며, 0.5% cinnamon과

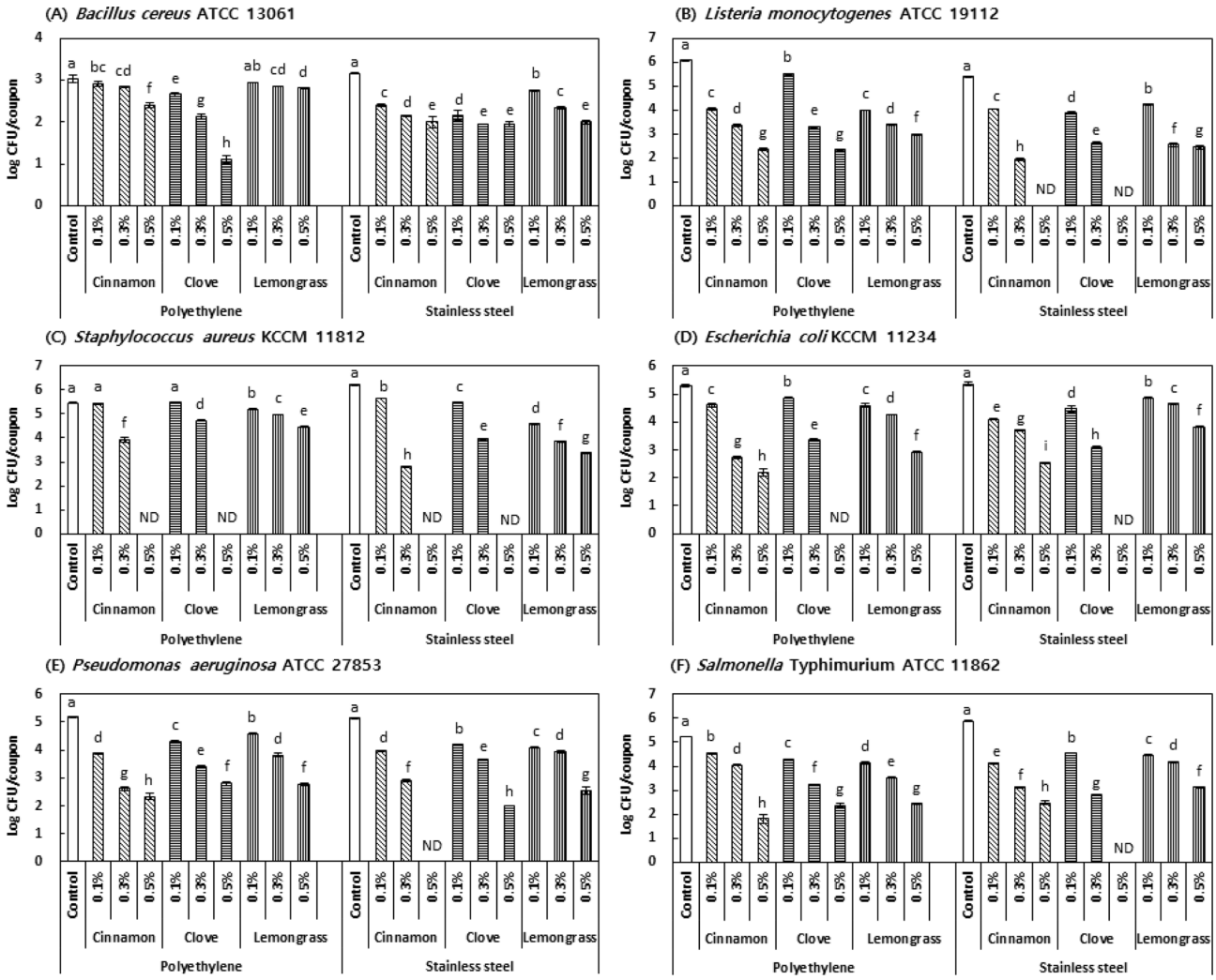

Fig. 2. Inhibition effect of cinnamon, clove, and lemongrass essential oils treatment on the against biofilm development by food poisoning bacteria on polyethylene and stainless steel coupon surface.

clove 정유 처리에 의해 polyethylene 및 stainless steel 표면에서 biofilm 성장이 100% 억제되었다. Lemongrass 정유는 처리 농도가 증가함에 따라 biofilm을 억제하였으나, 0.5% 농도에서 4.47±0.02 및 3.38±0.01 log CFU/coupon으로 0.3% 농도의 cinnamon과 clove 정유와 비슷한 효과를 보였다.

E. coli KCCM 11234에서는 0.5% 농도의 clove 정유를 첨가한 polyethylene 및 stainless steel 표면에서는 biofilm이 불검출 되었으며, 0.5% cinnamon 정유에서도 50% 이상의 biofilm이 감소되었다. Lemongrass 정유의 경우 0.3% 농도에서도 polyethylene 및 stainless steel 표면에서 각각 4.26±0.00 log CFU/coupon 및 4.65±0.02 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되어 cinnamon과 clove 정유와 비교하였을 때 biofilm 성장 억제 효과가 낮은 것으로 나타났다.

P. aeruginosa ATCC 27853에 대해서는 0.5% cinnamon 정유에 의해 stainless steel 표면의 biofilm이 불검출 되었으며, polyethylene 표면에 0.5% cinnamon 정유 처리 및 stainless steel 표면에 0.5% clove 정유 처리가 biofilm 성장 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

S. Typhimurium ATCC 11862에서도 lemongrass 정유에 비하여 cinnamon과 clove 정유가 biofilm 성장 억제에 효과적인 것으로 나타났는데, 특히 stainless steel 표면에서 0.5% clove 정유에 의해 biofilm 성장이 100% 억제되었으며, 0.5% cinnamon 정유에 의해 polyethylene 및 stainless steel에서 각각 1.81±0.18 및 2.48±0.06 log CFU/coupon으로 3 log 이상의 biofilm 성장이 억제되었다.

식중독 미생물 모두에서 식물 정유의 농도가 증가할수록 biofilm 성장을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다 (P<0.05). Cinnamon 0.5% 처리 시 stainless steel 표면에서 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 의한 biofilm 성장이 완전히 억제되었다. Clove 0.5% 처리 시 polyethylene 표면에서는 *S. aureus*와 *E. coli*에 의한 biofilm이 성장하지 않았

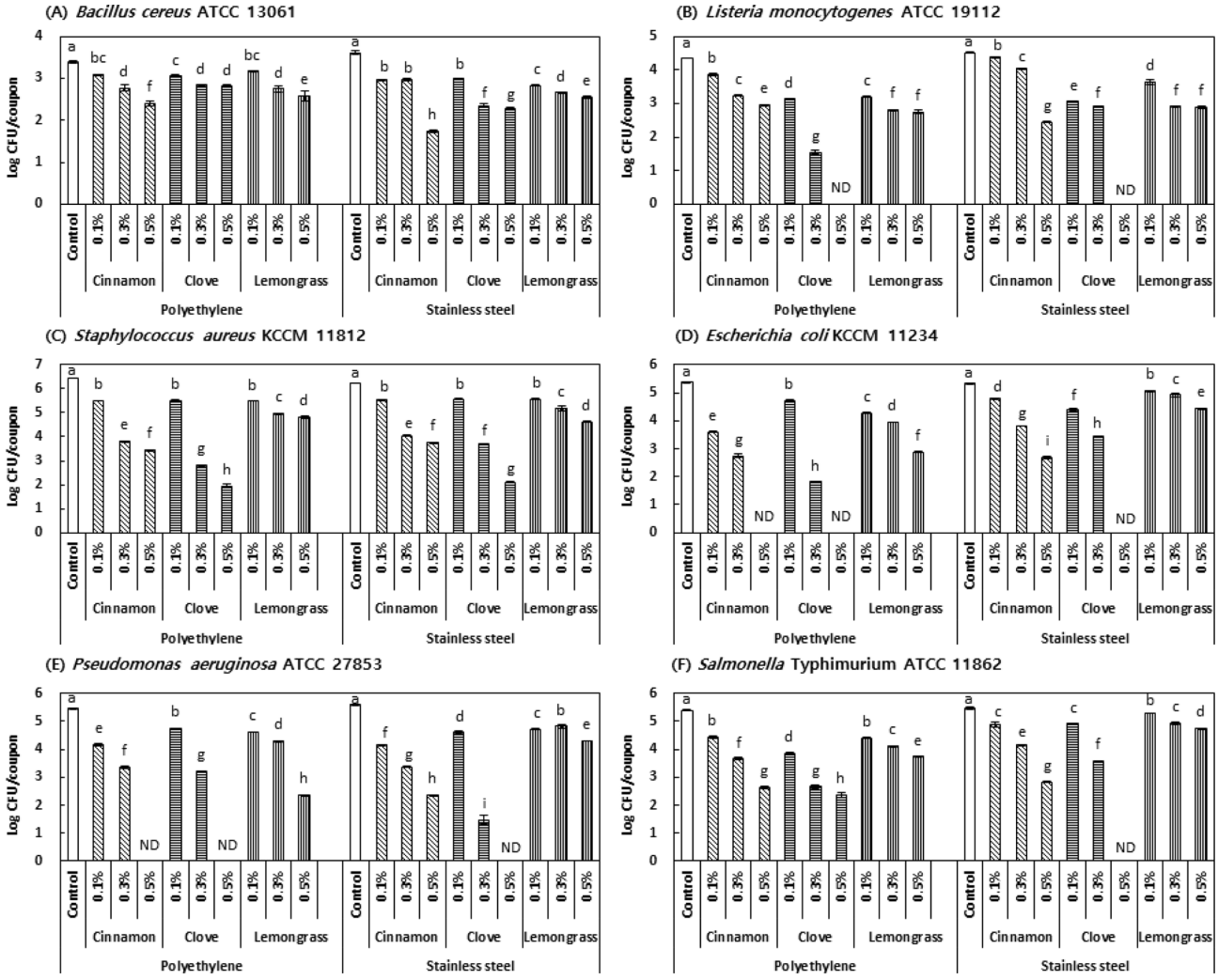

Fig. 3. Elimination effect of cinnamon, clove, and lemongrass essential oils treatment on the against biofilm formed by food poisoning bacteria on polyethylene and stainless steel coupon surface.

으며, stainless steel 표면에서는 *L. monocytogenes, S. aureus, E. coli, S.* Typhimurium에 의한 biofilm의 성장을 완전히 억제하였다. 그러나 lemongrass 정유는 cinnamon과 clove 정유에 비하여 다소 낮은 biofilm 성장 억제율을 보였다. Szczepanski와 Lipski[15]는 oregano 정유가 *Sphingomonas spec.*의 biofilm 성장을 억제하였으나 다른 미생물에 대해서는 억제 효과가 나타나지 않았으며, cinnamon 정유는 0.016% 농도에서 *Acinetobacter*의 biofilm 성장을 완전히 억제하였다고 보고하였다.

정유의 biofilm 제거 효과

6종의 식중독 미생물을 식품접촉 표면에 접종하여 biofilm을 형성시킨 후 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유를 농도별로 1시간 처리 하였을 때 biofilm의 제거 효과를 Fig. 3에 나타내었다. 식중독 미생물의 종류에 따라 차이가 있지만 정유의 농도가 증가할수록 biofilm 제거 효과는 높아졌으며, 대체로 clove 정유의 biofilm 제거율이 높은 것으로 나타났다.

B. cereus ATCC 13061은 polyethylene과 stainless steel 표면에 각각 3.40±0.03 log CFU/coupon 및 3.61±0.05 log CFU/coupon의 biofilm을 형성하였으나 정유 처리에 의해 모든 처리구에서 biofilm이 유의적으로 제거되었다(P<0.05). 특히 0.5% cinnamon 정유에 의해 polyethylene 2.40±0.05 log CFU/coupon 및 stainless steel 1.74±0.04 log CFU/coupon으로 각각 29.39% 및 51.76% 정도의 biofilm 제거율을 나타내었다.

L. monocytogenes ATCC 19112는 polyethylene과 stainless steel 표면에 각각 4.35±0.00 및 4.50±0.02 log CFU/coupon의 biofilm을 형성하였으나 0.5% 농도의 clove 정유 처리에 의해 biofilm이 100% 제거되었으며, polyethylene 표면에서 0.3% 농도의 clove정유 처리에 의해 1.54±0.06 log CFU/coupon의 biofilm이 검출되어 64.47%의 제거율을 나

타내었다. Lemongrass 정유의 경우 polyethylene과 stainless steel 표면 모두에서 0.3% 농도와 0.5% 농도간의 차이를 보이지 않았다.

S. aureus KCCM 11812는 polyethylene과 stainless steel 표면에 각각 6.45±0.00 및 6.22±0.00 log CFU/coupon의 biofilm을 형성하였으나 0.3%와 0.5% 농도의 clove 정유 처리에 의해 각각 2.82±0.02(0.3% polyethylene), 3.73±0.00 (0.3% stainless steel), 1.93±0.08(0.5% polyethylene) 및 2.10 ±0.02(0.5% stainless steel) log CFU/coupon로 biofilm이 제거되었다. 이는 0.5% 농도의 cinnamon 정유보다도 제거 효과가 높게 나타났으며, lemongrass 정유의 경우 0.5% 정유 처리 후에도 4.83±0.05 및 4.62±0.02 log CFU/coupon의 biofilm이 남아있었다.

E. coli KCCM 11234에 대해서는 polyethylene과 stainless steel 표면에 각각 5.38±0.01 및 5.33±0.01 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었고, *P. aeruginosa* ATCC 27853에 대해서는 polyethylene과 stainless steel 표면에 각각 5.47±0.01 및 5.60±0.02 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었으나, 두 미생물에서 동일하게 polyethylene 표면에서는 0.5% cinnamon 정유 처리에 의해, 식품접촉 표면에서는 0.5% clove 정유에 처리에 의해 biofilm이 100% 제거되었다.

S. Typhimurium ATCC 11862에서도 polyethylene 표면(5.40±0.02 log CFU/coupon)과 stainless steel 표면(5.48±0.05 log CFU/coupon)에 형성된 biofilm을 제거하는데 유의적인 차이(P<0.05)로 식물 정유 처리가 효과를 나타내었으며, 그 중에서도 clove 정유 처리가 biofilm 제거율이 높은 것으로 나타났다.

Oliveira 등[24]은 cinnamon과 그 주성분인 cinnamaldehyde가 stainless steel 표면의 *E. coli*와 *L. monocytogenes*의 biofilm을 효과적으로 억제하였으며, *L. monocytogenes*가 *E. coli*보다 더 내성이 강하였다고 보고하였으나, 본 연구에서는 일관된 경향은 나타나지 않았다. Kim과 Kim[25]이 6종의 식중독 미생물에 의한 biofilm 형성능을 연구한 결과에서 미생물의 종류와 polyethylene 및 stainless steel 표면에 따른 차이는 일관된 경향을 나타내지 않았다고 보고하였으며, 본 연구에서도 비슷한 경향을 나타냈다. 전체적으로 lemongrass 정유의 경우 처리 농도가 증가함에 따라 biofilm을 제거하는 효과는 증가하였으나 cinnamon과 clove 정유에 비하여 그 효과가 낮은 것으로 나타났다.

국문요약

항균활성이 뛰어난 식물 정유를 이용하여 식품가공 기구 및 용기에 다양하게 사용되는 polyethylene과 stainless steel 표면에 형성된 식중독 6종의 biofilm 형성에 대한 억제 효과를 연구하였다. 식물 정유 20종의 식중독 미생물에 대한 항균활성을 disk diffusion 방법으로 평가한 결과 cinnamon > clove > lemongrass > peppermint > pine needle 순으로 항균활성을 나타냈다. Cinnamon과 clove 정유의 최소억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)는 각각 0.63-1.25 mg/mL과 1.25-2. mg/mL의 범위를 나타냈으며, lemongrass 정유의 MIC와 MBC는 각각 1.25-2.50 mg/mL과 2.50-5.00 mg/mL로 약간 낮은 항균활성을 나타냈다. 정유 3종의 biofilm 형성 예방효과는 식중독 미생물과 polyethylene 및 stainless steel에 따라 다소 차이가 있었지만, 0.5% 농도의 cinnamon, clove와 lemongrass 정유를 식품접촉 표면에 미리 코팅하였을 때 biofilm 형성에 영향을 주는 것을 확인하였다. 정유의 농도가 증가할수록 모든 식중독 미생물에 대해서 biofilm 형성을 유의적으로 억제하였으며(P<0.05), 0.5% cinnamon과 clove 정유 처리에 의해 *L. monocytogenes* ATCC 19112와 *S. aureus* KCCM 11812의 biofilm이 형성되지 않았다. Polyethylene과 stainless steel coupon 표면에 형성된 식중독 미생물의 biofilm의 제거 효과를 측정한 결과, 식중독 미생물의 종류에 따라 차이가 있었지만 정유의 농도가 증가할수록 biofilm 제거 효과는 높아졌으며, 대체로 clove 정유의 biofilm 제거율이 높은 것으로 나타났다. 본 연구를 통하여 0.5%의 cinnamon과 clove 정유는 polyethylene과 stainless steel 표면에 식중독 미생물이 형성하는 biofilm을 예방, 성장 억제 및 제거할 수 있는 천연 소재로 적용이 가능한 것으로 나타났다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Hyeong-Eun Kim https://orcid.org/0000000299444597
Yong-Suk Kim https://orcid.org/0000000313314175

References

1. Yun, H.J., Kho, Y.L., Na, S.S., Lee, Y.W., Studies on growth and decontamination of *Listeria monocytogenes* attached to food contact surface materials. *J. Environ. Health Sci.*., **27**, 75-82 (2001).
2. Xu, H., Zou, Y.Y., Lee, H.Y., Ahn, J.H., Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *J. Food Sci.*, **75**, 580-585 (2010).
3. Choi, Y.W., Lee, H.W., Kim, S.M., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, J.M., Biofilm forming ability and production of curli and cellulose in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Korean J. Microbiol.*, **47**, 335-341 (2011).
4. Jahid, I.K., Ha, S.D., A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Sci. Biotechnol.,* **21**, 299-316 (2012).

5. Brooks, J.D., Flint, S.H., Biofilms in the food industry : problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**, 2163-2176 (2008).
6. Tarver, T., Biofilms a threat to food safety. *Food Technol.*, **63**, 46-48 (2009).
7. Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compreh. Rev. in Food Sci. Food Safety*, **2**, 22-32 (2003).
8. Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J., A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci. Technol.*, **43**, 573-583 (2010).
9. Bower, C.K., McGuire, J., Daeschel, M.A., The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Sci. Technol.*, **7**, 152-157 (1996).
10. MFDS. (2020, May 22). Ministry of Food and Drug Safety. Available from: http://www.mfds.go.kr
11. Furletti, V.F., Texixerira, I.P., Obando-Pereda, G., Mardegan, R.C., Sartoratto, A., Figueira, G.M., Duarte, R.M.T., Rehder, V.L.G., Duarte, M.C.T., Hofling, J.F., Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**, 985832 (2011).
12. Ahmad, K.M.S., Ahmad, I., Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.*, **140**, 416-423 (2012).
13. Taweechaisupapong, S., Aieamsarrd, J., Chitropas, P., Khunkitti, W., Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *South Afric. J. Botany*, **81**, 95-102 (2012).
14. Lee, K.H., Kim, B.S., Keum, K.S., Yu, H.H., Kim, Y.H., Chang, B.S., Ra, J.Y., Moon, H.D., Seo, B.R., Choi, N.Y., You, Y.O., Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J. Food Sci.*, **76**, H226-H230 (2011).
15. Szczepanski, S., Lipski, A., Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Cont.*, **36**, 224-229 (2014).
16. Lopez-Reyes, .J.G., Spadaro, D., Prelle, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits *in vivo*. *J. Food Prot.*, **76**, 631-639 (2013).
17. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., Antibiotic sensitivity testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493-496 (1966).
18. Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, **48**, 5-16 (2001).
19. Monil, A.D., Kamlesh, A.S., Ramarkrishna, N.P., Schilling, M.W., Juan, L.S., Production of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surface by essential oils. *J. Food Prot.*, **75**, 1332-1337 (2012).
20. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. 1990. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
21. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C., *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.*, **44**, 3057-3064 (2011).
22. Yoo, M.J., Kim, Y.S., Shin, D.H., Antibacterial effects of natural essential oils from ginger and mustard against *Vibrio* species inoculated on sliced raw flatfish. *Food Sci. Biotechnol*., **15**, 462-465 (2006).
23. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oil. *BMC Complement. Alt. Med.*, **6**, 39 (2006).
24. Oliveira, M.M.M., Brugnera, D.F., Nascimento, J.A., Batista, N.N., Piccoli, R.H., Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *Eur. Food Res. Technol.*, **234**, 821-832 (2012).
25. Kim, H.E., Kim, Y.S., Biofilm formation characteristics of major foodborne pathogens on polyethylene and stainless steel surfaces. *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 195-204 (2020).