



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

Vibrio 균에 대한 온주밀감 과피와
미숙감귤 과피의 antibacterial과
antibiofilm 효과

강희주

제주대학교 대학원
분자생명공학전공

2021년 06월

Vibrio 균에 대한 온주밀감 과피와
미숙감귤 과피의 antibacterial과
antibiofilm 효과

지도교수 김 재 훈

강 희 주

이 논문을 생명공학 석사학위 논문으로 제출함

2021년 06월

강희주의 생명공학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 윤노타쓰야

위 원 김 창 숙

위 원 김 재 훈



김창숙

김재훈

제주대학교 대학원

2021년 06월



MASTER'S THESIS

Antibacterial and antibiofilm effects
of mature *citrus unshiu* peel and
premature *citrus unshiu* peel in
Vibrio pathogens

Hee Joo Kang

(Supervised by professor Jae Hoon Kim)

Department of Biotechnology GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

JUNE, 2021

목차

목차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
2.1. 추출물의 제조	4
2.2. 추출물의 항산화 활성 측정	4
2.2.1. 총 폴리페놀 함량 측정	4
2.2.2. 총 플라보노이드 함량 측정	5
2.2.3. DPPH 라디칼 소거 활성 측정	5
2.3. 균주 및 배양조건	6
2.4. 추출물의 항균 활성 측정	8
2.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 측정	8
2.6. Growth Curve 측정	8
2.7. 추출물의 Biofilm 억제 활성 측정	9

2.8. 추출물의 운동성 억제 활성 측정	9
2.9. 기체-크로마토그래피 (GC-MS) 측정	10
III. 결과 및 고찰	11
3.1. 추출물의 항산화 활성	11
3.1.1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량	11
3.1.2. DPPH 라디칼 소거능 활성	11
3.2. 추출물의 항균 활성	13
3.3. MIC	15
3.4. Growth curve	17
3.5. 추출물의 Biofilm 억제 활성	19
3.6. 추출물의 Motility 억제 활성	21
3.7. 추출물의 GC-MS 성분 조성 분석	25
IV. 결론	29
V. 참고문헌	31
VI. 영문 초록	38

List of Tables

Table 1. List of the bacterial strains growth condition.	7
Table 2. Composition of MB media.	7
Table 3. Analysis condition of GC-MS.	10
Table 4. <i>In vitro</i> antioxidant activities : TPC, TFC and DPPH for the extracts of the MCU and PCU.	12
Table 5. The antimicrobial activities of MCU and PCU at different concentrations against <i>Vibrio</i> pathogens.	14
Table 6. Compounds from the extracts identified by GC-MS	27

List of Figures

Figure 1. MIC of the PCU against <i>Vibrio</i> pathogens.	16
Figure 2. Growth curves of the PCU against <i>Vibrio</i> pathogens.	18
Figure 3. Biofilm inhibition activity of the PCU at MIC concentrations against <i>Vibrio</i> pathogens.	20
Figure 4. Bacteria move by a range of mechanisms.	22
Figure 5. Swimming motility at MIC concentrations against <i>Vibrio</i> pathogens.	23
Figure 6. Swarming motility at MIC concentrations against <i>Vibrio</i> pathogens.	24
Figure 7. Representative GC-MS chromatograms for the extracts.	28

ABSTRACT

본 연구에서는 온주감귤피와 미숙감귤피를 이용하여 넙치 병원균을 억제하는 항생 물질을 조사했다. 병원균은 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri*를 사용하였다. 항산화 활성 결과, 미숙감귤피는 온주감귤피보다 높은 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 추출물의 처리 농도별 (25, 50, 100 mg/mL) 항균 활성 결과, 온주감귤피는 *V. ichthyenteri*에 100 mg/mL 집중한 경우를 제외한 모든 조건에서 유의미한 결과가 나타나지 않았다. 미숙감귤피는 각 균에서 처리 농도와 비례하여 항균 활성 효과가 나타났다. 항균 활성이 확인된 미숙감귤피를 *Vibrio* 병원균에 처리하여 MIC를 확인한 결과, *V. anguillarum* 1.8 mg/mL, *V. harveyi* 1.2 mg/mL, *V. ichthyenteri* 0.9 mg/mL로 나타났다. 미숙감귤피 MIC 농도가 처리된 각 균의 biofilm 저해 활성을 확인한 결과, *V. anguillarum*은 약한 biofilm 저해 활성이 나타났으며 *V. harveyi*와 *V. ichthyenteri*에서 우수한 biofilm 저해 활성이 나타났다. Biofilm을 형성하는데 중요한 요인인 세균의 운동성 저해를 확인한 결과, 각 균의 MIC 농도에서 swimming motility와 swarming motility가 억제되는 형태적인 변화를 확인했다. 미숙감귤피는 온주감귤피보다 *Vibrio* 병원균에서 높은 항균 효과를 보였기 때문에 각 추출물의 성분을 GC-MS로 분석하였다. 온주감귤피보다 뛰어난 미숙감귤피의 항산화, 항균 활성과, biofilm 저해, motility 저해 효과는 5-HMF와 quinic acid의 항산화와 항균 등의 다양한 생리적 활성 효과로 예상된다. 이러한 결과로, 미숙감귤피는 어류 질병 세균인 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri* 병원균의 성장과 바이오필름 형성을 저해할 수 있다. 결론적으로 미숙감귤피 추출물이 천연 항균제로 사용될 수 있어 *Vibrio* 병원균을 저해하여 넙치 폐사율을 낮출 수 있다.

I. 서론

제주 지역의 감귤 생산량은 2019년 약 631,310톤으로 주로 mandarin계의 온주 밀감이 생산되고 있다 [1]. 생산되는 대부분의 감귤류는 2020년 국내 식품산업에서 음료류의 원료로 79.6% 소비되고 있다 [2]. 그러나 과즙의 효율이 과실 무게의 약 1/2일 뿐이므로 많은 양의 과피 부산물이 발생하고 있다. 감귤류의 부산물은 가공과정뿐만 아니라 미숙감귤의 형태로도 발생한다. 제주 지역에서 감귤의 생산량 감축과 품질의 고급화를 위해 매년 8월~10월에 약 5~10만 톤 정도의 미숙감귤을 폐기하는 수상 적과를 실시하고 있으며, 폐기되는 미숙감귤 대부분이 과수원 주변 환경을 오염시키는 요인으로 작용하고 있다 [3].

이러한 감귤류는 polyphenol, vitamins, limonoids, synephrine 등의 다양한 화합물을 함유하고 있으며 [4], rutin 및 desomine과 같은 일반적인 flavonoids 및 hesperadin, naringin과 같은 citrus 특유의 flavonoids와 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin과 같은 flavonoids가 함유되어 있다 [5]. 감귤 가공 부산물인 감귤 과피에는 carotenoid, bioflavonoid, pectin 및 terpene가 함유되어 있고 [6], essential oil인 d-limonen, γ -terpinene, β -elemene, farnesene, hexadecanoic acid, α -pinene, β -myrcene, linallol 등이며 그 중 d-limonen는 감귤 과피 정유의 70~90%를 함유하고 있다 [7] 또한 감귤 미숙과는 완숙과에 비해 유기산, 식이섬유, 폴리페놀 그리고 flavonoid류인 hesperidin, naringin, rutin 등이 많이 함유되어 있고, 특히 미숙감귤 과피 중에 식이섬유, essential oil, carotenoids, flavonoids 등의 생리활성 성분이 많이 함유되어 있으며 과육보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 [8-10].

넙치는 우리나라에서 널리 알려진 어류 중 하나이며, 대표적인 양식어종이다. 통계청에 의하면 지난 2010년~2020년 10년간 어류 양식은 평균 생산량이 약 8만 톤, 생산금액은 약 8,537억 원으로 나타났다. 이 중 넙치는 전체 어류 생산량의 51.1% (41,000톤)이며, 생산금액은 약 56.9% (약 4,861억 원)으로 국내 어류 양식

산업을 대표하고 있다. 특히 제주지역은 우리나라 넙치 양식의 약 58%(평균 24,100톤) 이상을 생산하는 주요 산지이다 [11]. 그러나 세균 및 기생충 등에 의한 어류 질병의 증가는 폐사를 유발시켜 막대한 경제적인 피해를 가져오고 있다. 특히 2010년 대비 2019년 전국의 친해양식어업 생산량은 75.1% 늘었으나 동기간 중 제주의 경우 9.1%로 그쳤는데, 생산량 부진의 주원인인 넙치 폐사량 비율이 2015년도 26.0%에서 2019년 44.5%로 꾸준히 증가하고 있는 추세이다 [12]. 현재까지 주로 양식 넙치에 발생하는 세균성 질병으로는 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증 등이 알려져 있다. 이 중 *Vibrio*는 호염성 (halophilic)이며 운동성을 갖는 그람음성 간균 (rod-shaped) 세균으로 현재까지 77종의 비브리오균이 확인되었으며, 이중 12종이 인체 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 [13-15].

생물막 (Biofilm)은 고체 표면에 부착된 미생물과 미생물이 대사과정에서 분비한 세포외고분자물질 (Extracellular polymeric substances, EPS)로, 대부분의 세균은 생물막의 상태로 존재하며 세균 감염의 65%는 생물막에 기인한다 [16, 17]. 또한 biofilm 내 세균은 온도, 습도, 산도, 자외선 노출 등으로부터 보호 받는다 [18]. 특히 biofilm 내 부착된 세균은 동일한 세균이라도 부유세균 (Planktonic cells)보다 항균제 (Antimicrobials)나 항생제 (Antibiotics)에 대한 내성이 10배에서 크게는 1,000배 정도로 강하다 [19]. Biofilm 형성을 억제하는 방법에는 크게 두 가지가 있다. 첫 번째는 항균제 (양이온성 고분자, 항균성 펩타이드, 은 이온 등)를 사용하는 것이다. 항균제를 활용하는 방법은 일시적 효과가 우수하나, 시간이 지나며 항균제 자체분해가 일어나고, 환경오염을 초래할 뿐만 아니라 항균제에 대한 내성을 가지는 세균들도 생겨 큰 효과를 기대하기 어려운 부작용이 있다 [20-22]. 두 번째는 biofilm의 형성의 첫 단계인 세균의 표면 흡착을 억제할 수 있도록 표면을 poly ethylene glycol (PEG)이나 양전하와 음전하를 동시에 가지는 양성 이온 고분자, poly oxazoline, poly N-vinylpyrrolidone 등 non-biofouling 물질로 개질하는 방법이 있다 [23]. 하지만, 이 방법 또한 일부 세균이 개질된 표면에 부착되면 biofilm 형성을 억제하기는 어려운 부작용이 있다. 따라서 질병세균을 효과적으로 저해하기 위해서는 biofilm 형성을 억제하고, 항생제나 항균제 대체재로써 저해 효과가 있는 천연 유래 물질을 찾는 것이 중요하다.

따라서 본 연구에서는 온주감귤과 미숙감귤의 부산물을 이용하여 넙치에서 발생하는 어류 질병 세균 중 *Vibrio* 속인 *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*에 대한 항산화 활성 및 미생물 억제 활성, Biofilm 억제 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 추출물의 제조

제주도에서 자생한 온주감귤 과피 (Mature *Citrus unshiu* peel ; MCU)는 제주특별자치도개발공사에서 제공받았고 미숙감귤 과피 (Premature *Citrus unshiu* peel ; PCU)는 농업회사법인(주)삼원네이처에서 제공받았다. 과피를 세척하고 건조시킨 후, 분쇄하여 각각의 분쇄물을 얻었다. 건조된 각 분쇄물은 70% ethanol을 가하여 2시간동안 2,000 rpm, 25℃ 조건에서 (WIS 20R, WITEG) 추출하였다. 추출 후 여과하고 감압농축기 (hei-vap advantage, Heldolph)를 이용하여 농축시킨 후 동결건조를 통해 분말 상태로 만들어 실험에 사용하였다.

2.2. 추출물의 항산화 활성 측정

2.2.1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis assay 방법을 참고하여 측정하였다 [24]. 먼저 추출물 1,000 μ L에 4% 탄산나트륨 무수물 (Sodium carbonate Anhydrous) 1,000 μ L를 첨가하여 2분간 암반응 시킨 후, 1N Folin-ciocalteu 시약 (phosphomolybdatephosphotungstate) 50 μ L을 첨가하여 30분간 암반응 시켰다. 반응 후 96 well plate에 200 μ L씩 취하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 표준물질인 gallic acid를 사용하여 작성하였으며, g 중 mg gallic acid (GAE, mg, dry basis)으로 나타내었다.

2.2.2. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhuang 등의 방법을 참고하여 측정하였다 [25]. 먼저 추출물 100 μL 에 500 μL 의 증류수와 100 μL 의 5% NaNO_2 를 첨가하고 혼합하여 5분간 반응시켰다. 그 후 10% AlCl_3 150 μL 를 첨가하고 혼합한 후 6분간 반응시켰다. 이어서 5M NaOH 600 μL 를 첨가한 후 96 well plate에 200 μL 씩 취하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 표준물질인 quercetin을 사용하여 작성하였으며, g 중 mg quercetin (QUE, mg, dry basis)으로 나타내었다.

2.2.3. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Brand-Williams 방법을 참고하여 측정하였다 [26]. 추출물 20 μL 에 0.2 mM DPPH 용액 180 μL 를 첨가하였다. 실온에서 30분간 암반응 시킨 후, 96 well plate에 200 μL 씩 취하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 BHA (Butylated hydroxy anisole), L-Ascorbic acid를 사용하였고 반응한 결과 값을 50% 감소시키는 농도를 IC_{50} 값으로 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : Absorbance of the control

B : Absorbance of the sample

2.3. 균주 및 배양조건

실험에 사용한 어류 질병 세균은 *Vibrio anguillarum* (KCTC 2711), *Vibrio harveyi* (KCTC 12724), *Vibrio ichthyenteri* (KCTC 12725)으로 한국생물자원센터 (Korea collection for type culture)에서 분양받아 사용하였다. 각 균은 Table 1의 조건으로 생육 배양하였다. 배양에 사용된 Marine Broth (MB, Difco, USA)의 조성은 Table 2와 같다.

Table 1. List of the bacterial strains growth condition.

Bacteria	Strain No.	Gram Strain	Temperature	Medium
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711	-	25°C	Marine Broth
<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC 12724	-	25°C	Marine Broth
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	KCTC 12725	-	24°C	Marine Broth

Table 2. Composition of MB media.

Content	Amount per liter
Peptone	5.0 g
Yeast Extract	1.0 g
Ferric Citrate	0.1 g
Sodium Chloride	19.45 g
Magnesium Chloride	5.9 g
Magnesium Sulfate	3.24 g
Calcium Chloride	1.8 g
Potassium Chloride	0.55 g
Sodium Bicarbonate	0.16 g
Potassium Bromide	0.08 g
Strontium Chloride	34.0 mg
Boric Acid	22.0 mg
Sodium Silicate	4.0 mg
Sodium Fluoride	2.4 mg
Ammonium Nitrate	1.6 mg
Disodium Phosphate	8.0 mg

2.4. 추출물의 항균 활성 측정

각 균에 대한 항균 활성 효과는 paper disc method에 따라 수행하였다 [27]. 배양된 병원균은 생리식염수로 희석하여 McFarland No. 0.5 농도로 맞추어 사용하였다. 멸균된 면봉을 사용하여 희석한 균을 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말하였다. 도말한 plate에 8 mm paper disc를 올리고 추출물 희석액 (25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL)을 각 disc 에 50 μ L씩 분주하였다. 양성대조군으로는 Kim 등의 논문을 참조하여 4 mg/mL $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (Transition Metal Galium, 전이금속갈륨)을 사용하였다 [28]. 적정온도에서 48시간 동안 배양한 후 paper disc 주변에 형성된 생육 저해환을 측정하였다.

2.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 측정

추출물의 MIC는 CLSI 2012에 따라 two-fold broth dilution method를 사용하였다 [29]. MIC의 측정은 96 well plate에서 진행하였다. MB 배지에 농도별로 희석한 추출물을 (25 mg/mL ~ 0.3 mg/mL) 100 μ L 처리하였다, 그리고 각 균을 PBS에 희석하여 100 μ L씩 처리하였고, 총 볼륨이 200 μ L가 되게 하였다. 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 배양한 후 OD 600 nm에서 측정하였다.

2.6. Growth Curve 측정

각 균에 대한 살균 효과가 없는 추출물의 최소 농도를 확인하기 위해 성장곡선 분석을 수행하였다. 측정은 96 well plate에서 진행하였다. well에 추출물 희석액 100 μ L를 첨가하고, 각 균을 PBS로 (OD 600nm : 0.1) 조절한 후 100 μ L 첨

가하여 총 볼륨이 200 μ L가 되게 하였다. 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 배양하였으며 6시간 마다 OD 600 nm에서 측정하였다.

2.7. 추출물의 Biofilm 억제 활성 측정

Biofilm 억제 활성 측정 실험 방법은 *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. harveyi* and *V. anguillarim* [30-33]에 대해 수행된 방법을 참고하였다. 측정은 96 well plate에서 진행하였으며, 배양조건은 growth curve 측정 방법과 같게 수행하였다. 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간 배양된 균을 PBS로 3회 씻어냈다. 그 후 각 well에 100% methanol 200 μ L를 가하여 15분간 반응시켰다. methanol을 털어내어 완전히 건조시킨 후, 0.1% crystal violet을 각 well에 200 μ L씩 첨가하였다. 10-15분 반응 후 PBS로 3회 씻어냈다. 그 후 100% ethanol을 각 well에 200 μ L씩 첨가하여 완전히 녹여낸 후 OD 570 nm로 측정하였다. 양성대조군으로는 4 mg/mL $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 을 사용하였고, 보정 값은 MB 배지 100 μ L와 PBS 100 μ L를 함유한 well에서 흡광도를 측정하여 사용하였다.

2.8. 추출물의 운동성 (Motility) 억제 측정

Swimming 과 Swarming motility는 S Santhakumari 등과 Y Sun이 *Vibrio* 균에서 수행한 방법을 참조하여 진행하였다 [34, 35]. Swimming motility는 MB 배지에 0.3% (w/v) agar를 첨가하여 측정하였다. 온도가 50 $^{\circ}$ C로 조절된 반고체 상태의 배지에 MIC의 추출물을 첨가하여 혼합하였다. 배지를 붓고 plate 뚜껑을 열어 10-15분간 건조시킨 후, 3 μ L의 균 희석액 (OD 600nm : 0.1)을 팁으로 찔러서 접종하였다. 그 후 30 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. Swarming motility는 MB 배지에 0.5% (w/v) agar를 첨가하여 측정하였다. 온도가 50 $^{\circ}$ C로 조절된 반

고체 상태의 배지에 MIC의 추출물을 첨가하여 혼합하였다. 배지를 붓고 plate 뚜껑을 열어 10-15분간 건조시킨 후, 5 μ L의 균 희석액 (OD 600nm : 0.1)을 팁으로 찌러서 접종하였다. 그 후 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다.

2.9. 기체 크로마토그래피-질량(GC-MS) 분석

GC-MS 분석은 QP-2010(Shimadzu, Japan)을 사용하여 수행하였다. GC-MS의 분석조건은 Table 3에 따라 측정하였다. GC-MS 분석을 통하여 검출된 피크의 화합물 동정은 Willey 9 library database를 이용하여 수행하였고, library와 유사도가 75% 이상인 화합물을 동정하였다. 동정된 화합물의 성분 조성비는 피크의 intensity를 기준으로 전체 피크에서 각 피크가 차지하는 비율을 기반으로 산출하였다.

Table 3. Analysis condition of GC-MS

GC	
column	DB-5MS (30 m x 0.2mm x 0.25 μ m)
Inject mode	Splitless
Injection temperature	250 $^{\circ}$ C
Column flow	0.84 mL/min
Vaporizing chamber temperature	
	80 $^{\circ}$ C, hold 3 min
Column oven temperature	5 $^{\circ}$ C/min 140 $^{\circ}$ C 20 $^{\circ}$ C/min
Carrier gas	280 $^{\circ}$ C hold 8 min Helium
Totalflow rate	50 μ L/min
Injection rate	1 μ L
MS	
Interface temperature	280 $^{\circ}$ C
Ion source temperature	250 $^{\circ}$ C
Measurement mode	Scan
Mass range	30-600 m/z

III. 결과 및 고찰

3.1. 추출물의 항산화 활성

3.1.1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어있는 2차 대사산물로 다양한 구조와 분자량을 가진다. Phenolic hydroxy기를 가지고 있어 단백질과 같이 큰 분자와 결합할 뿐만 아니라 -OH기를 통해 수소 공여와 페놀 고리 구조의 안정화에 의해 항산화 활성을 가지며 항암 및 항균 효과 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 온주감귤피와 미숙감귤피 추출물의 생리활성을 알아보기 위해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다 (Table 4). 온주감귤피와 미숙감귤피의 총 폴리페놀 함량은 53.82 ± 0.08 , 95.59 ± 1.07 로 미숙감귤피에서 더 높은 폴리페놀 함량을 나타냈다. 또한 총 플라보노이드 함량은 온주감귤피 0.02 ± 0.0 , 미숙감귤피 0.03 ± 0.0 로 미량의 플라보노이드 함량을 나타냈다.

3.1.2. DPPH 라디칼 소거능 활성

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 비교적 안정한 free radical로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질이 있으며, 항산화 성분에 의해 환원되어 보라색의 DPPH가 무색의 diphenyl-picrylhydrazine으로 탈색된다. 이러한 원리를 이용하여 다양한 천연 물질 소재의 항산화 측정에 널리 사용되고 있다. 온주감귤피와 미숙감귤피의 DPPH IC₅₀ 값은 1259.61 ± 3.75 , 758.47 ± 7.12 로 나타났다 (Table 4). 양성대조군인 L-Ascorbic acid와 BHA는 4.89 ± 0.10 과 5.39 ± 0.14 로 나타났다.

3.1.1.과 3.1.2.의 실험 결과, 온주감귤피보다 미숙감귤피에서 높은 폴리페놀 함

량과 DPPH 라디칼 소거능 활성이 나타났다. 두 추출물에서의 총 플라보노이드 함량은 유의적인 결과가 나타나지 않았다.

Table 4. *In vitro* antioxidant activities : TPC, TFC and DPPH for the extracts of the MCU and PCU.

Sample	TPC (mg GAE ^a /g)	TFC (mg QE ^b /g)	DPPH (IC ₅₀ μg/mL)
MCU	53.82±0.08	0.02±0.0	1259.61±3.75***
PCU	95.59±1.07	0.03±0.0	758.47±7.12***
L-Ascorbic acid	-	-	4.89±0.10
BHA	-	-	5.39±0.14

^aGalic acid equivalent. ^bQuercetin equivalent. Data represent the means ± SD and are representative of three individual experiments, ^{ns}p>0.05, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

3.2. 추출물의 항균 활성

온주감굴피와 미숙감굴피 추출물의 항균 활성은 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri* 균에 대하여 측정하였다 (Table 5). 추출물은 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL로 희석하였다.

온주감굴피의 항균 활성 측정 결과, *V. anguillarum*과 *V. harveyi* 균은 모든 농도에 대해서 어떠한 억제대도 보이지 않았다. 그러나 *V. ichthyenteri* 균은 100 mg/mL에서 14.5 ± 1.4 mm의 억제대가 확인되었다. 미숙감굴피의 항균 활성 측정 결과 *V. anguillarum* 균은 25 mg/mL에서 12.8 ± 0.4 mm, 50 mg/mL 13.2 ± 0.8 mm, 100 mg/mL 13.3 ± 0.5 mm 억제대를 보였다. *V. harveyi* 균은 25 mg/mL에서 13.0 ± 0.0 mm, 50 mg/mL 13.2 ± 0.8 mm, 100 mg/mL 14.0 ± 0.6 mm의 억제대를 보였다, *V. anguillarum*과 *V. harveyi* 균은 모든 농도에서 양성대조군보다 높은 항균 활성을 보였다. *V. ichthyenteri* 균은 25 mg/mL에서 11.8 ± 3.5 mm, 50 mg/mL 19.5 ± 1.0 mm, 100 mg/mL 22.5 ± 0.5 mm의 억제대를 보였다. 25 mg/mL는 양성대조군과 유사한 항균 활성을 보였다.

항균 활성 결과, 온주감굴피를 처리하였을 때 *V. ichthyenteri* 균에 100 mg/mL의 농도로 처리한 경우를 제외한 다른 균에서 어떠한 생육 저해가 나타나지 않았다. 그러나 미숙감굴피를 처리하였을 때 모든 균에서 처리 농도에 비례하여 생육이 저해되는 결과가 나타났다.

Table 5. The antimicrobial activities of MCU and PCU at different concentrations against *Vibrio* pathogens.

<i>Vibrio</i> pathogens	Inhibition zone (mm)						
	MCU			PCU			Ga(NO ₃) ₃
	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	4 mg/mL
<i>V. anguillarum</i>	- ^a	-	-	12.8±0.4 ^{**}	13.2±0.8 ^{**}	13.3±0.5 ^{***}	11.9±0.6
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	13.0±0.0 ^{**}	13.2±0.8 ^{**}	14.0±0.6 ^{***}	11.9±0.3
<i>V. ichthyenteri</i>	-	-	14.5±1.4 [*]	11.8±3.5 ^{ns}	19.5±1.0 ^{***}	22.5±0.5 ^{***}	11.8±0.4

^anot detected. Data represent the means ± SD and are representative of three individual experiments, ^{ns}p>0.05, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

3.3. MIC

항균 활성에서 생육 저해가 확인된 미숙감굴피 추출물에 대하여 균의 성장을 억제시키는 최소저해농도를 측정하였다 (Figure 1). 미숙감굴피의 MIC를 측정하기 위해, 항균 활성 효과를 나타낸 최저 농도 25 mg/mL을 최대 농도로 하고 1/2씩 희석하여 각 균에 처리하였다. *V. anguillarum* 균의 경우 (Figure 1A), 0.391 - 1.563 mg/mL 처리 농도에서 control보다 높은 OD값이 나타났는데, 최소 억제 농도 (Subminimal inhibitory concentrations, sub-MIC) 이하의 농도는 biofilm 형성을 유도하고 그로인해 균이 성장되기 때문이다. Kaplan JB 등은 *S.aureus*에서 항생제의 sub-MIC가 biofilm 형성을 유도할 수 있으며 [36], L Zhou 등은 *G.sulfurreducens*에서 sub-mic 항생제 처리로 유도된 biofilm 형성과 그로 인한 sub-MIC의 균의 성장을 보고하였다 [37]. 또한, Wu 등은 햄스터 모델에서 *leptospiral* 감염 동안 항생제인 norfloxacin과 ciprofloxacin의 낮은 복용량이 균을 증가시켜 조직 손상 악화가 유발된다는 연구결과를 보고했다 [38]. 따라서 *V. anguillarum*에서는 1.563 mg/mL과 3.125 mg/mL 사이에 균의 성장을 억제시키는 최소 농도가 존재할 것으로 판단하였다. *V. harveyi*와 *V. ichthyoenteri* 의 경우 1.563 mg/mL이 OD 0.1과 근접한 결과를 나타내어, 0.782 mg/mL과 1.563 mg/mL 사이에 균의 성장을 억제시키는 최소 농도가 존재할 것으로 판단하였다 (Figure 1B, 1C).

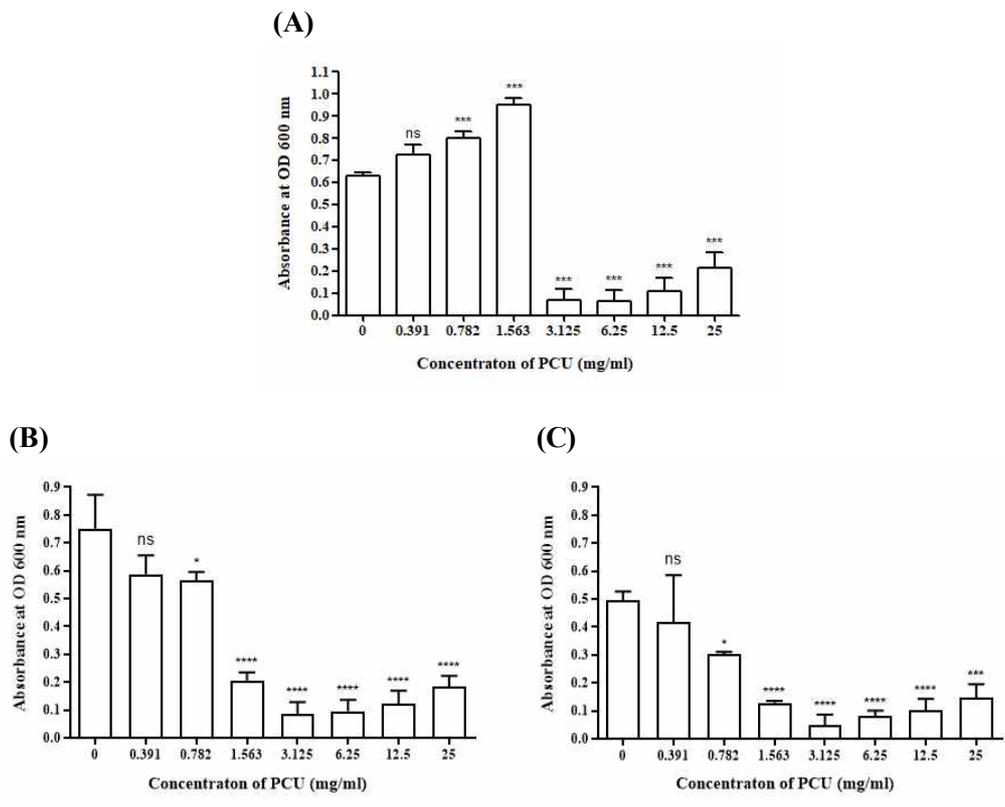


Figure 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the PCU against *Vibrio* pathogens. (A) *V. anguillarum* (B) *V. harveyi* (C) *V. ichthyoenteri*. Data represent the means \pm SD and are representative of three individual experiments, ^{ns} $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.4. Growth curve

3.3.의 결과를 바탕으로, 미숙감굴피 추출물에 대한 각 균의 정확한 MIC 판별을 위해 growth curve를 측정하였다 (Figure 2). MIC가 예상되는 구간의 농도를 0.3 mg/mL 간격으로 처리하였다. 6시간 마다 측정하여 48시간까지의 결과를 나타냈다. 그 결과 *V. anguillarum* 균은 1.5 mg/mL 처리 농도에서 control보다 높은 성장이 나타났다. 하지만 1.8 mg/mL 처리 농도에서 균의 성장을 억제시키는 최소 농도임을 확인하였다 (Figure 2A). *V. harveyi*은 1.2 mg/mL 처리 농도가, *V. ichthyenteri*균은 0.9 mg/mL의 농도가 균의 성장을 억제시키는 최소 농도임을 확인하였다 (Figure 2B, 2C).

3.3.과 3.4. 실험 결과를 통하여 미숙감굴피 처리에 대한 각 균의 MIC를 확인하였다. 각 균마다 최소로 억제된 농도를 MIC로 하고 이후의 모든 실험에 사용되었다.

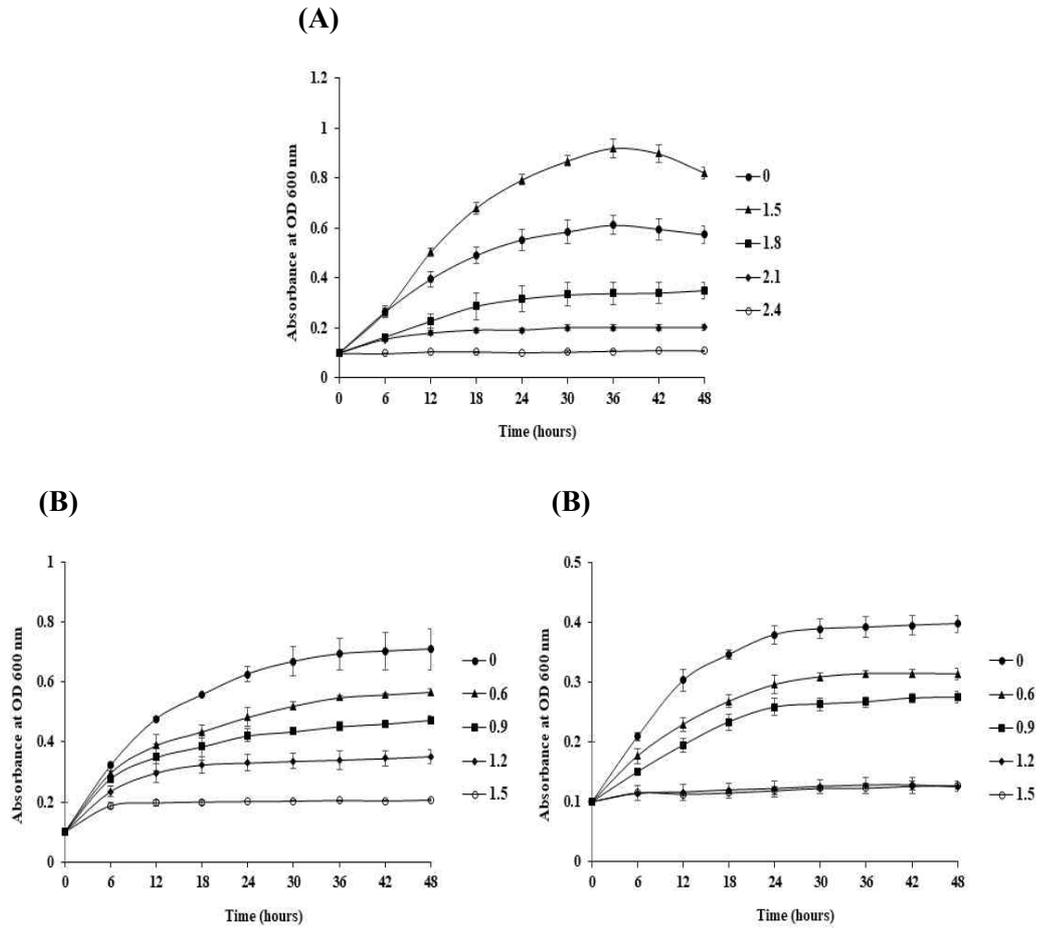


Figure 2. Growth curves of the PCU against *Vibrio* pathogens. (A) *V. anguillarum* (B) *V. harveyi* (C) *V. ichthyenteri*. Data represent the means \pm SD and are representative of three individual experiments,

3.5. 추출물의 Biofilm 억제 활성

박테리아는 biofilm이라는 고분자 matrix를 형성하면서 항생제 및 면역 방어에 대한 감수성을 감소시키며, biofilm으로부터 세포가 분산되면 2차 부위로 퍼져 감염이 악화된다. 미숙감굴피 추출물이 *Vibrio* 병원균에서 높은 항균 효과를 보였으므로, 각 균에 추출물을 처리하고 48시간 반응하였을 때, 추출물이 biofilm의 형성에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다 (Figure 3). *V. anguillarum* 균은 1.5 mg/mL에서 control 보다 큰 biofilm 형성을 나타냈으며, MIC인 1.8 mg/mL에서 약한 저해 효과가 나타났다 (Figure 3A). *V. anguillarum* 균은 성장도에 비해 전체적으로 낮은 biofilm 형성을 보였는데, Kim 등의 연구에서 균의 성장과 biofilm 형성이 특정한 패턴 없이 나타난다는 결과를 확인할 수 있었다 [28]. *V. harveyi* 균은 0.6 mg/mL에서 큰 저해 효과가 없었지만, 0.9 mg/mL에서 control 대비 약 2배의 저해효과를 나타냈다 (Figure 3B). MIC인 1.2 mg/mL에서 control 대비 약 7배의 저해 효과가 나타났다. *V. ichthyenteri* 균 또한 0.6 mg/mL의 농도에서 큰 저해 효과가 없었지만 MIC인 0.9 mg/mL에서 control 대비 약 4배의 저해 효과가 나타났다 (Figure 3C).

미숙감굴피 MIC 처리에 대한 각 균의 biofilm 억제 활성 결과, *V. anguillarum* 균은 비교적 약한 biofilm 억제 활성이 나타났다. 그러나 *V. harveyi* 균과 *V. ichthyenteri* 균에서는 각각 control 대비 약 7배, 약 4배의 biofilm 저해 효과가 나타났다.

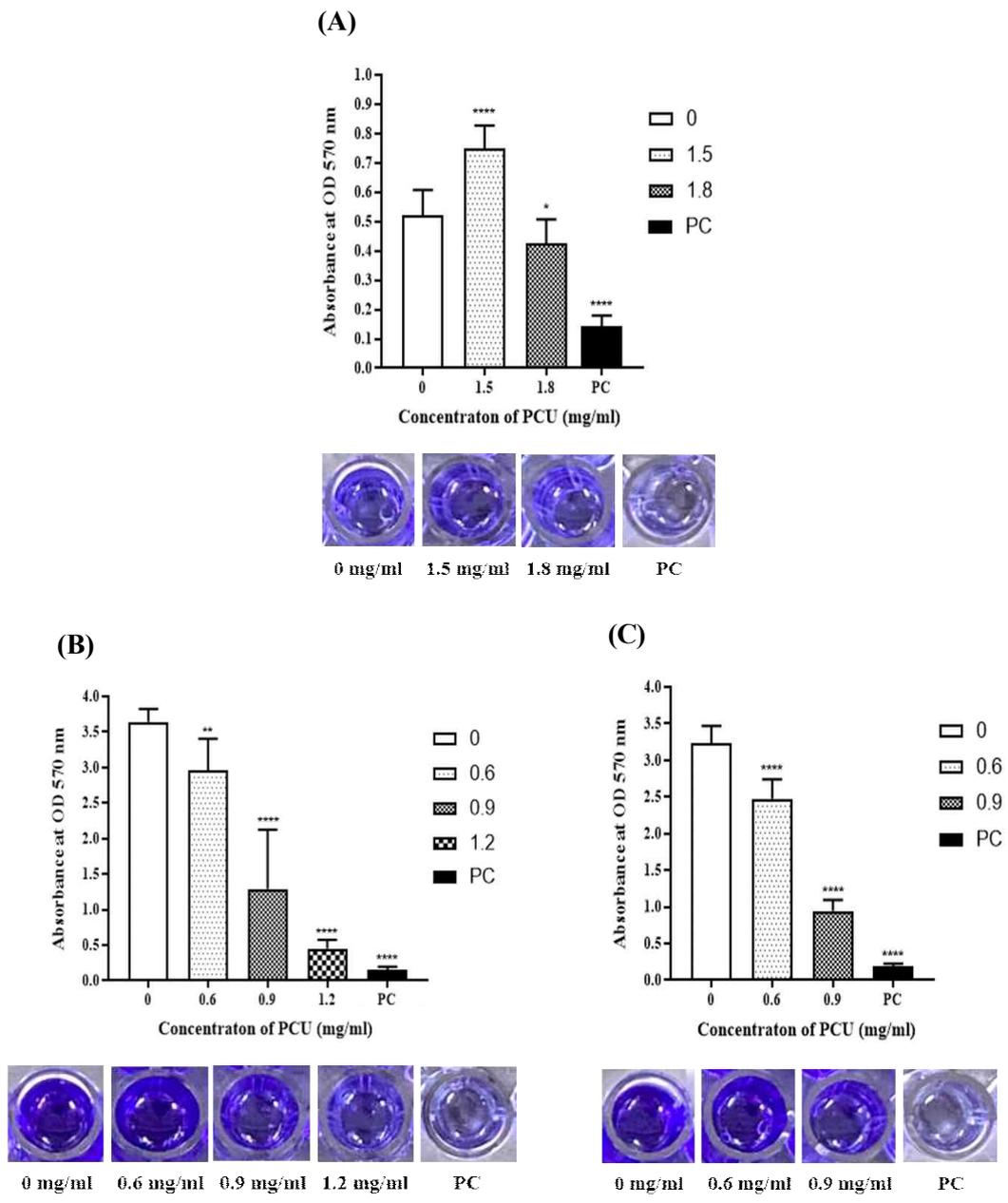


Figure 3. Biofilm inhibition activity of the PCU at MIC concentrations against *Vibrio* pathogens. (A) *V. anguillarum* (B) *V. harveyi* (C) *V. ichthyenteri*. PC (positive control) : 4 mg/mL Ga(NO₃)₃. Data represent the means ± SD and are representative of three individual experiments, ^{ns}p>0.05, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

3.6. 추출물의 Motility 억제 활성

세균의 편모운동 (flagellar movement)은 영양분이 부족하거나 부적합한 환경을 극복하기 위한 것으로 병원성에 중요한 요인으로 작용하고 있다. 세균의 flagellar movement은 swimming motility와 swarming motility로 나뉘어진다 (Figure 4). Swimming motility는 액체 속의 개별 박테리아가 움직이는 것으로, flagellum을 회전시켜 이동하는 운동을 말한다. Swarming motility는 표면을 박테리아가 무리지어 가로지르는 운동이며, flagellum을 회전시켜 이동하는 운동을 말한다 [39]. Biofilm의 형성은 세균이 유영 중 표면에 가역적으로 부착되고, 그 후 비가역적 부착으로 전환되면서 시작된다. 부착이 돌이킬 수 없게 되고 세포는 증식하여 미생물이라 불리는 작은 박테리아 집단을 형성하며 biofilm의 매트릭스 성분을 생산하기 시작한다 [40]. 따라서 motility를 저해하는 것은 biofilm 형성을 억제하는데 중요한 요인이다.

미숙감귤피 추출물에 대한 각 균의 swimming, swarming motility 저해 결과를 Figure 5, 6에 나타냈다. 추출물의 MIC 처리 결과 모든 균에서 swimming motility와 swarming motility가 감소하는 형태적인 변화를 확인하였다. 특히 *V. anguillarum* 균에서는 어떠한 motility도 나타나지 않았다.

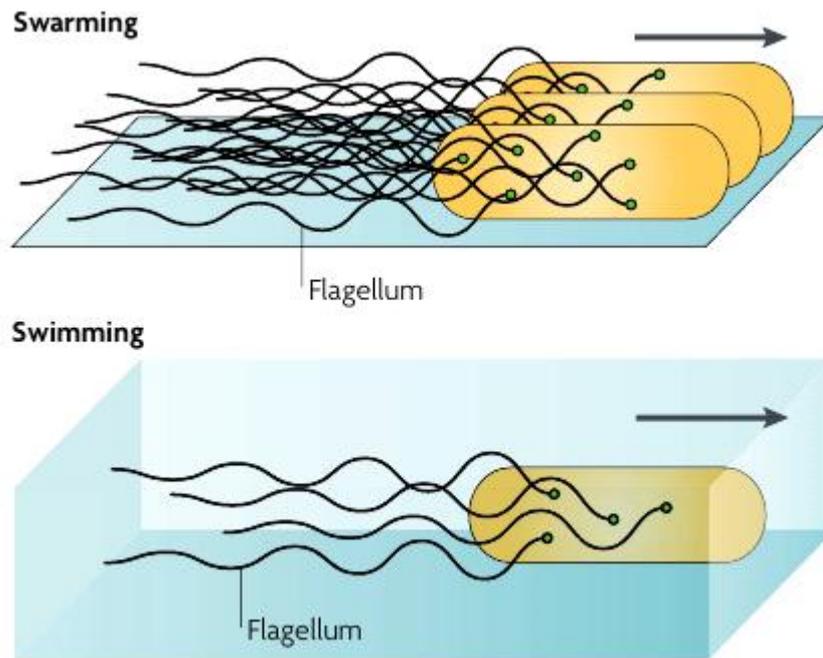


Figure 4. Bacteria move by a range of mechanisms.

(Source : A field guide to bacterial swarming motility. Daniel B. Kearns)

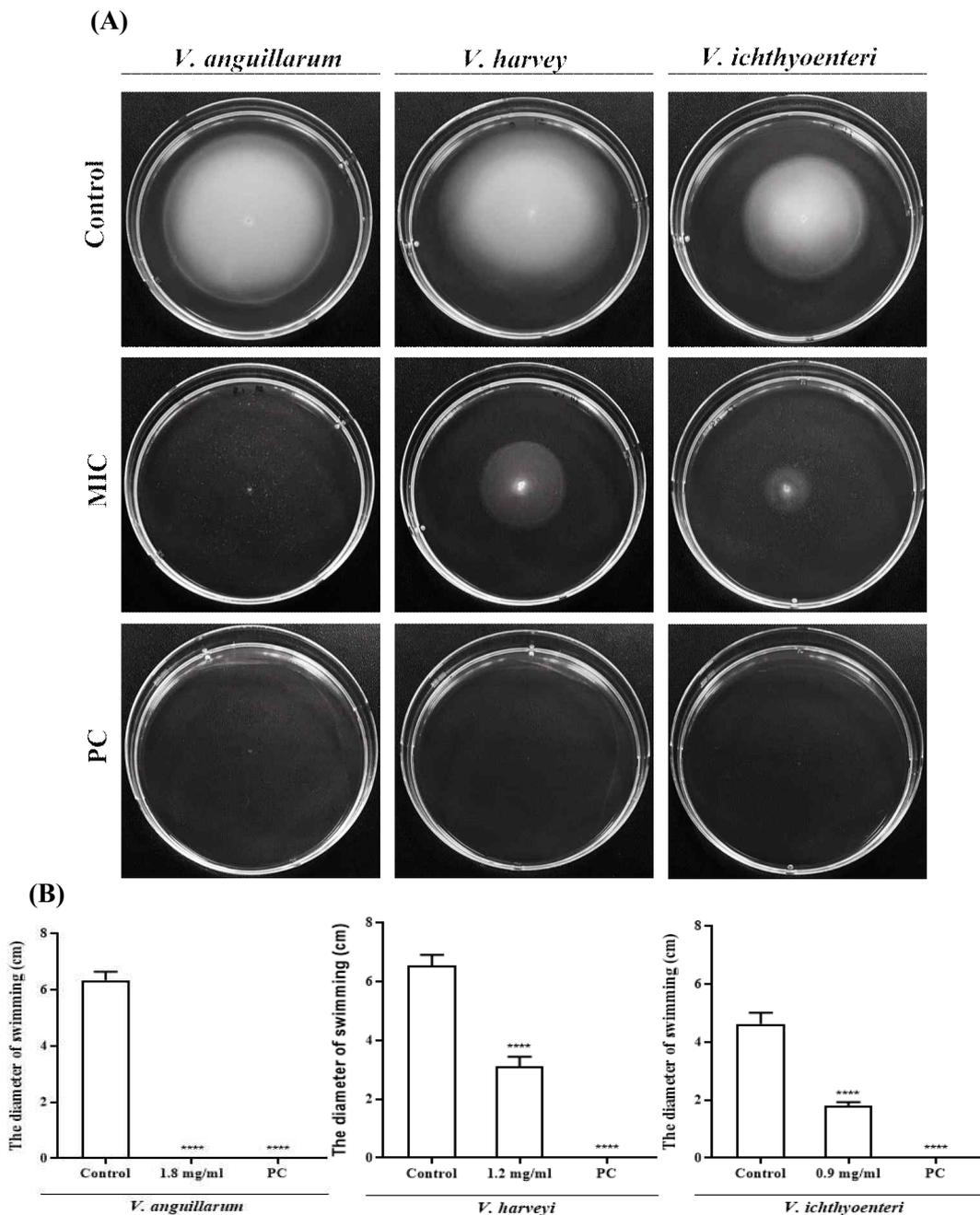


Figure 5. Swimming motility at MIC concentrations against *Vibrio* pathogens. (A) The effects of MIC concentrations of the PCU on the swimming motility. (b) Measurement of the effect of PCU on the swimming motility. PC (positive control) : 4 mg/mL Ga(NO₃)₃. Data represent the means ± SD and are representative of three individual experiments, ^{ns}p>0.05, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

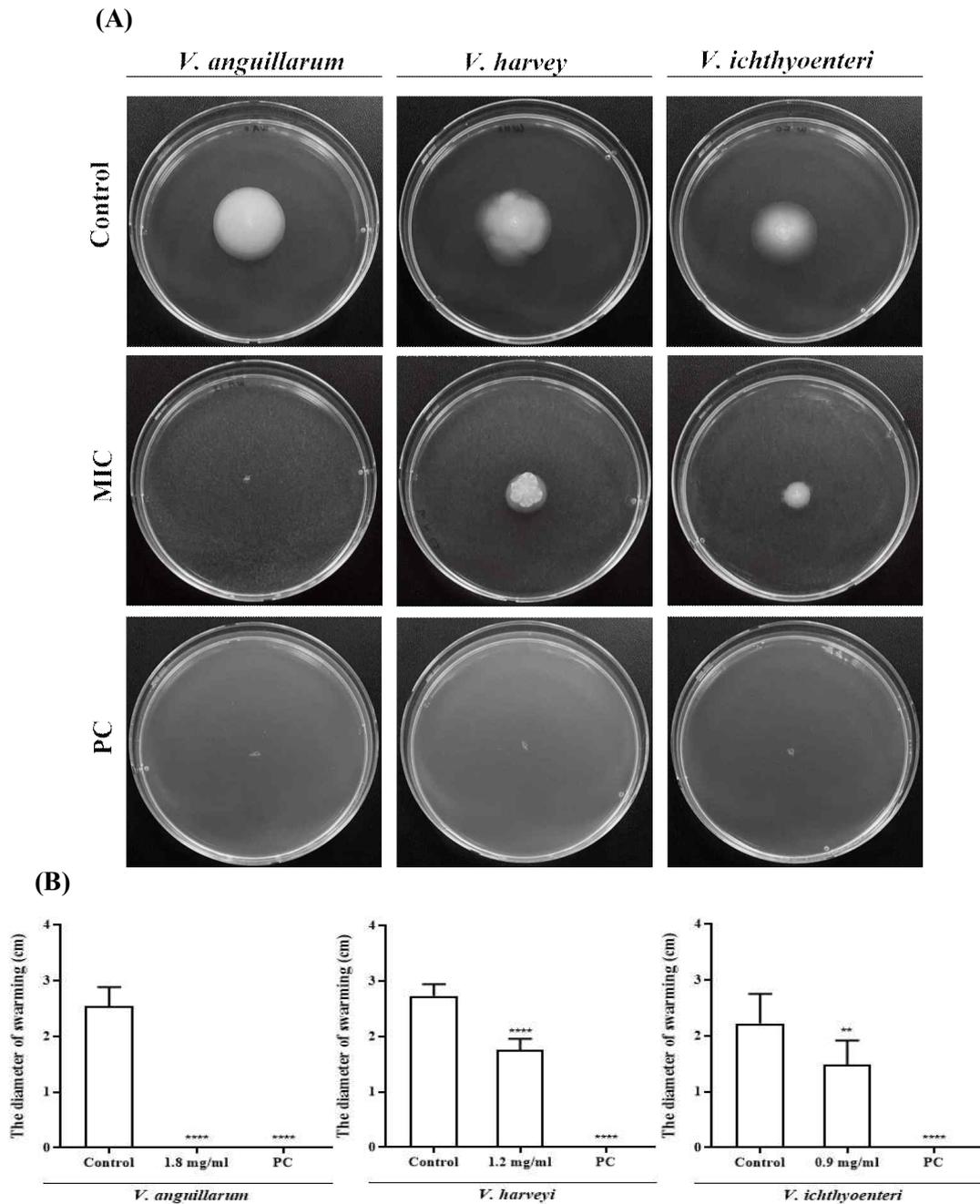


Figure 6. Swarming motility at MIC concentrations against *Vibrio* pathogens. (A) The effects of MIC concentrations of the PCU on the swarming motility. (b) Measurement of the effect of PCU on the swarming motility. PC (positive control) : 4 mg/mL $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. The diameter is presented as the mean \pm the standard deviation of three independent experiments, ^{ns} $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.7. 추출물의 GC-MS 성분 조성 분석

미숙감귤피는 온주감귤피보다 높은 폴리페놀 함량과 DPPH 활성이 나타났으며, *Vibrio* 균에서 처리 농도에 비례하여 생육을 저해시키는 결과를 나타냈다. 또한 미숙감귤피는 *Vibrio* 균의 biofilm과 motility가 억제된 결과를 나타냈다. 이렇게 다른 활성을 나타낸 미숙감귤피와 온주감귤피의 기능성 물질을 확인하기 위하여 GC-MS 분석을 진행하였다.

GC-MS를 이용한 온주감귤피와 미숙감귤피 추출물의 크로마토그램은 Figure 7에 나타내었으며, 동정한 화합물의 성분조성비는 Table 6에 나타내었다. 온주감귤피 추출물에서는 7개의 피크를 확인하였다. 주요 성분으로는 D-Tagatose 4.14%, D-Allose 2.57%, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 2,45%로 확인되었다.

미숙감귤피 추출물에서는 12개의 피크를 확인하였다. 주요 성분으로는 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde (5-HMF) 24,55%와 citraconic anhydride 14.79%로 확인되었다. 5-HMF는 식품에 널리 나타나는 물질로, 산성식품을 열처리 가공하는 과정에서 hexoses와 maillard 반응 저하를 통해 생성되는 물질이다. 5-HMF는 피부, 상기도, 눈, 피부 점막을 자극하고, 가로무늬근 (striated muscles) 과 내장을 손상시킨다. 또한 유전독성이 있으며, 단백질 내에 독소를 축적시키는 등 인간에게 미치는 해로운 특성으로 인해 꿀, 맥주 등의 일부 식품에서 5-HMF는 규격으로 제한되고 있다 [41]. 그러나 최근 연구에서 5-HMF는 천연 물질로서 항산화 효과 [41], biofilm 저해를 통한 항균 효과뿐만 아니라 [42] I형 알레르기 질환 예방 치료 [43], 낫 모양 적혈구 빈혈증 억제 [44], 간세포 보호 [45], 흑색종 세포에서 apoptosis와 G0/G1 저해를 통한 암세포증식 억제 [46] 등의 약리학적 효과도 보고되고 있다. 다른 주요 성분인 citraconic anhydride는 주로 아민 그룹의 acylation을 reversible하고 [47], 펩타이드에 선택적으로 반응하여 항원성을 보호하는데 사용되고 있다 [48]. 다음으로 높게 나타난 성분은 1-METHOXY-2-ETHOXYETHYL-1-FURAN 7.72%, quinic acid 7.61%, DIHYDRO-3-METHYLENE-2,5-FURANDIONE 6,12%, D-Allose 5.44%로 확인되었다. quinic acid는 항산화 [49], 항균 [50], 항바이러스 [51] 효과뿐만 아니라 교모세포종의 억제

[52], 자궁경부암 억제 [53], 전립선암 억제 [54], 구강암 억제 [55] 등의 약리학적 효과도 보고되었다. 흥미롭게도, 치료하기가 어려운 칸디다균에서 단일로는 항균 활성이 없지만, 항진균 화합물인 undecanoic acid와 synergetic 효과로 인해 biofilm과 독성을 억제한다고 보고되었다 [56]. D-allose는 두 추출물에서 나타난 공통물질로, 온주감귤피보다 미숙감귤피에서 약 2배정도 높게 나타났다. Eun 등은 미숙감귤의 과육에서 2.77%의 D-allose를 동정했으며, d-allose의 항산화 효과와 콜라겐 분해효소 억제 활성 효과가 있음을 보고하였다 [57].

Table 6. Compounds from the extracts identified by GC-MS. (A) MCU, (B) PCU**(A)**

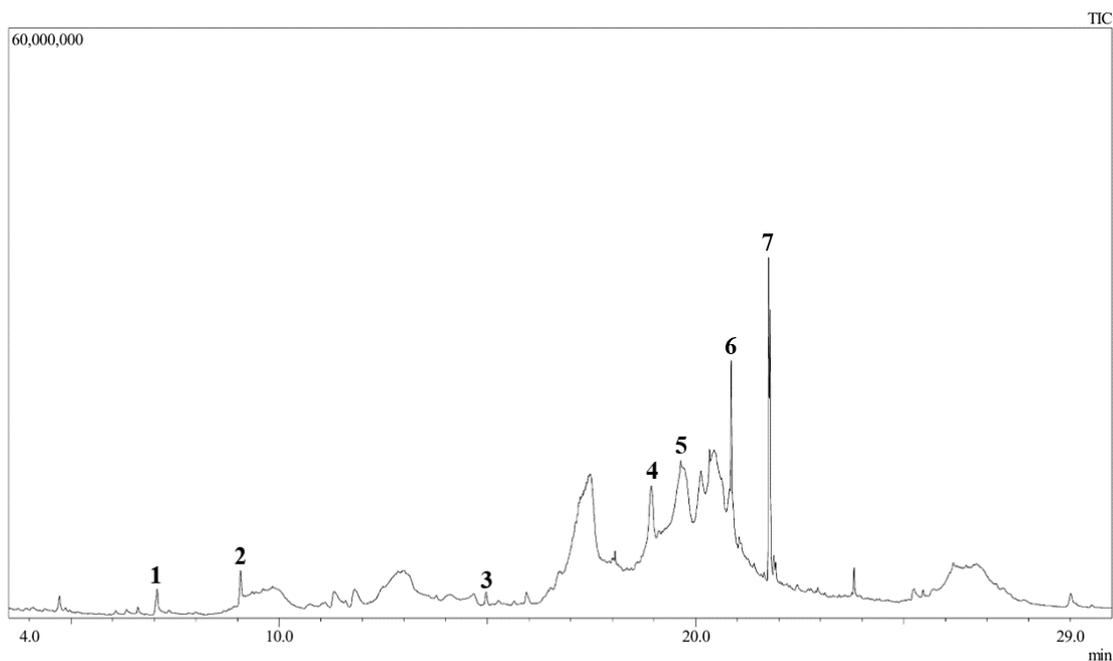
No ^a	Name	R.Time	Molecular Weight	Molecular Formular	Conc.(%)
1	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine	7.069	126	C3H6N6	2.01%
2	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	9.075	144	C6H8O4	1.13%
3	Benzaldehyde, 4-hydroxy-	14.973	121	C7H6O2	0.48%
4	D-Allose	18.943	180	C6H12O6	2.57%
5	D-Tagatose	19.681	180	C6H12O6	4.14%
6	Pentadecanoic acid	20.859	242	C15H30O2	1.94%
7	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	21.760	280	C18H32O2	2.45%

(B)

No ^a	Name	R.Time	Molecular Weight	Molecular Formular	Conc.(%)
1	Citraconic anhydride	3.771	112	C5H4O3	14.79%
2	DIHYDRO-3-METHYLENE-2,5-FURANDIONE	5.986	112	C5H4O3	6.12%
3	1-METHOXY-2-ETHOXYETHYL-1-FURAN	7.139	170	C9H14O3	7.72%
4	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	9.083	144	C6H8O4	1.74%
5	2-Acetyl-octanoic acid, ethyl ester	10.338	214	C12H22O3	1.17%
6	5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde	11.458	126	C6H6O3	24.55%
7	5H-IMIDAZOLE-4-CARBOXYLIC ACID, 5-AMINO-, ETHYL ESTER	15.883	155	C6H9N3O2	1.30%
8	Citric acid	16.617	192	C6H8O7	0.42%
9	D-Allose	17.506	180	C6H12O6	5.44%
10	Quinic acid	18.871	192	C7H12O6	7.61%
11	Hexanedioic acid, dihexyl ester	19.329	314	C18H34O4	3.51%
12	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	20.368	194	C10H10O4	3.78%

^aIdentified compound Numbers are corresponding to peak numbers in Figure 7.

(A)



(B)

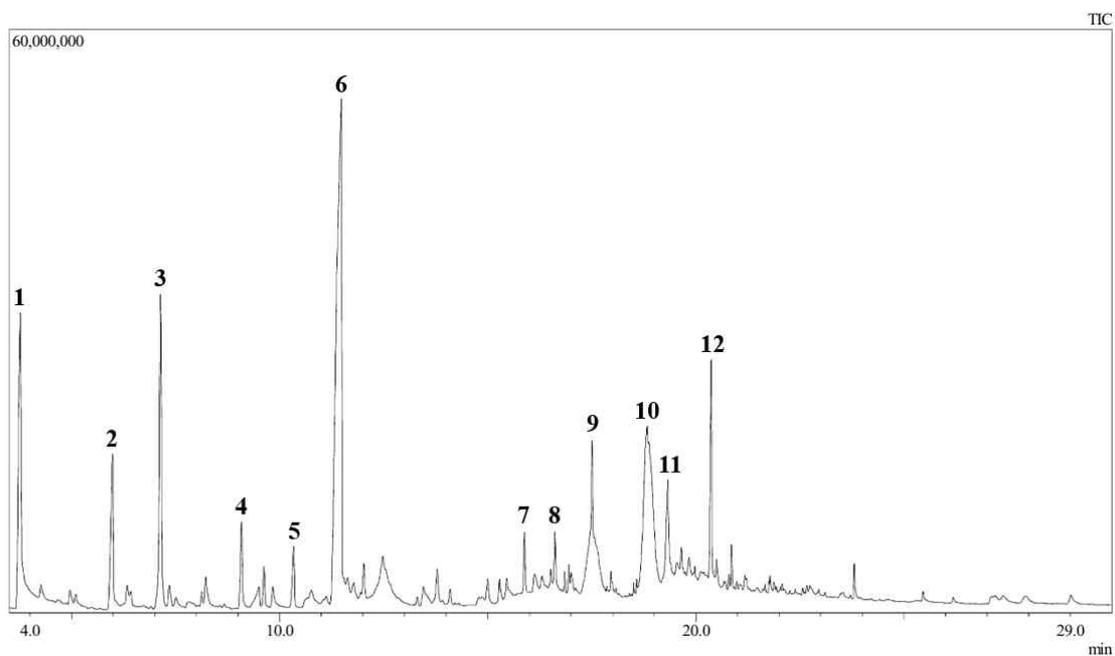


Figure 7. Representative GC-MS chromatograms for the extracts. (A) MCU, (B) PCU. Peak numbers are corresponding to the number of identified compounds in Table 6.

IV. 결론

본 연구에서는 온주감귤피와 미숙감귤피를 이용하여 넙치에 질병을 일으키는 *Vibrio* 병원균에 대한 antibacterial 및 antibiofilm 활성을 조사하였다. 병원균은 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ichthyoenteri*를 사용하였다. 온주감귤피와 미숙감귤피는 70% 에탄올로 추출되었다. 추출물에 대하여 항산화 활성을 측정한 결과 미숙감귤피에서 온주감귤피보다 높은 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인했다. 두 추출물의 플라보노이드 활성에서 유의미한 결과는 나타나지 않았다. 추출물의 처리 농도별 (25, 50, 100 mg/mL) 항균 활성 결과, 온주감귤피는 *V. ichthyoenteri*에 100 mg/mL 접종한 경우를 제외한 모든 조건에서 유의미한 결과가 나타나지 않았다. 미숙감귤피는 각 균에서 처리 농도와 비례하여 항균 활성 효과가 나타났다. 항균 활성이 확인된 미숙감귤피를 *Vibrio* 병원균에 처리하여 MIC를 확인한 결과, *V. anguillarum* 1.8 mg/mL, *V. harveyi* 1.2 mg/mL, *V. ichthyoenteri* 0.9 mg/mL로 나타났다. 미숙감귤피 MIC가 처리된 각 균의 biofilm 저해 활성을 확인한 결과, *V. anguillarum*은 약한 biofilm 저해 활성이 나타났으며 *V. harveyi*와 *V. ichthyoenteri*에서 우수한 biofilm 저해 활성이 나타났다. Biofilm을 형성하는데 중요한 요인인 세균의 운동성 저해를 확인한 결과, 각 균의 MIC에서 swimming motility와 swarming motility가 억제되는 형태적인 변화를 확인했다. 특히 약한 biofilm 저해 효과를 나타낸 *V. anguillarum*은 모든 운동성 실험에서 어떠한 형태적인 변화도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 성장 초기에 균의 가역적 부착을 방해하여 운동성을 크게 억제한 것으로 예상된다. 미숙감귤피는 온주감귤피보다 *Vibrio* 병원균에서 높은 항균 효과를 보였기 때문에 각 추출물의 성분을 GC-MS로 분석하였다. 그 결과, 온주감귤피에서 D-Tagatose, D-Allose가 나타났으며 미숙감귤피에서 5-HMF, citraconic anhydride, quinic acid가 나타났다. 온주감귤피보다 뛰어난 미숙감귤피의 항산화, 항균, biofilm 저해, motility 저해 효과는 5-HMF와 quinic acid의 항산화, 항균 등의 다양한 생리적 활성과 quinic acid와의 synergitic 효과로 예상된다.

citraconic anhydride 성분에 대해서 논문 작성 기준으로 생리적 활성과 관련된 연구된 결과가 없어, 추가적인 연구가 필요한 상황이다.

온주감귤피에 대한 항산화, 항균, 항암 등의 다양한 연구가 많이 되어있으나, 미숙감귤피에 대한 항산화, 항균 활성의 연구결과는 미미한 실정이다. 특히 미숙 감귤피에 대한 어류 질병균의 저해 활성 연구 결과는 논문 작성 기준으로 보고된 바가 없다. 본 논문은 미숙감귤피가 어류 질병 세균인 *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ichthyoenteri* 병원균의 저해와 biofilm 형성을 억제하여 내성을 유발하는 항생제의 대체재로 사용 될 수 있음을 시사한다. 또한 버려지는 온주감귤과 미숙감귤의 피를 이용하여 평균 50% 이상의 폐사율을 자랑하는 넙치 질병의 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 생각되며, 단순 재활용을 넘어 새로운 부가가치를 창출할 수 있다고 사료된다.

REFERENCES

1. 제주도. 2020.
2. 농림축산식품부. 2020. 식품산업 원료소비 실태조사
3. Kang YJ, Yang MH, Ko WJ, Park SR, Lee BG. (2005). Studies on the major components and antioxidative properties of whole fruit powder and juice prepared from premature mandarin orange. *Korean J Food Sci Technol.* 37:783-788.
4. Laura B. 1998. Polyphenols : Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition REV* 56(11) : 317-333
5. Cha JY, Kim SY, Jeong SH, Cho YS. 1999. Effects of hesperetin and narigenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *KorJ Life Science* 9:389-394
6. Moresi M, Clementi F, Rossi J, Medici R, Vinti GL. 1987. Production of biomass untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 27,37-45
7. Lota ML, Serra DR, Tomi F, Casanova J. 2001. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics Ecology* 29: 77-104
8. Park GH, Lee SH, Kim HY, Jeong HS, Kim E, Yun YW, et al. 2011. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J Food Hyg Saf.* 26:355-360.
9. Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr.* 42:278-290
10. Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, et al. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory

- activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull.* 30:772-778
11. 통계청. 2010 ~ 2020. 어류양식동향.
 12. 제주도. 2020.
 13. Oliver JD, Kaper JB. 2001. In; Doyle MP, Beuchat IR, Montville TJ, editors. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
 14. Na HY, Hong SH, Jeong KT. 2016. *Public Health Weekly Report*, Korea Center for Disease Control & Prevention. 9(9): 154-159.
 15. Thompson JR, Polz MF. 2006 *The Biology of Vibrios*. Washington D.C.: ASM Press
 16. Fergie, N., R. Bayston, J. P. Pearson, and J. P. Birchall. 2004. Is otitis media with effusion a biofilm infection *Clin. Otolaryngol.* 29: 38-46.
 17. Potera, C. 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283:1837-1839.
 18. Chung, S. K. 2005. Biofilm. *J. Rhinol.* 12: 5-9
 19. Gilbert, P., J. Das, and I. Foley 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11: 160-167.
 20. Zhang, L., D. Pornpattananangkul, C. M. J. Hu, and C. M. Huang. 2010. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr. Med. Chem.* 17: 585-594.
 21. Privett, B. J., S. M. Deupree, C. J. Backlund, K. S. Rao, C. B. Johnson, P. N. Coneski, and M. H. Schoenfisch. 2010. Synergy of nitric oxide and silver sulfadiazine against gram-negative, grampositive, and antibiotic-resistant pathogens. *Mol. Pharm.* 7: 2289-2296
 22. I. Guell, J. Cabrefiga, E. Badosa, R. Ferre, M. Talleda, E. Bardaji, M. Planas, L. Feliu, and E. 2011. Montesinos, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 2667
 23. Kim, D. H., E. S. Lim, and W. K. Cho. 2014. Design of dual functional

- surfaces: non-biofouling and antimicrobial activities. *Polym. Sci. Technol.* 25: 315-321.
24. Oliver H. Lowry; Nira J. Rosebrough; A. Lewis Farr; Rose J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265 - 275.
 25. Zhuang XP, Lu YY, and Yang GS. 1992. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herb Med.* 23:122-124.
 26. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol.* 28:25-30
 27. Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F. and Smânia Jr, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.* 38, 369-380
 28. Kim DH, Subramanian Dharaneedharan, Jang YH, MS Heo. 2016. Inhibitory Effect of Transition Metal Gallium [Ga(NO₃)₃] on Biofilm Formation by Fish Pathogens. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44(4), 535 - 539
 29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, ninth edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
 30. O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449 - 461.
 31. Pratt, L. A., and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis, and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30:285 - 293.
 32. Stepanovic, S., D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, and M. Svabic-Vlahovic. 2000. modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal

- biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40:175 - 179.
33. Croxatto, A., V. J. Chalker, J. Lauritz, J. Jass, A. Hardman, P. Williams, M. Camara, and D. L. Milton. 2002. VanT, a Homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, Regulates Serine, Metalloprotease, Pigment, and Biofilm Production in *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 184:1617-1629.
 34. S. Santhakumari et al. 2018. In vitro and in vivo effect of 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol as an antibiofilm agent against quorum sensing mediated biofilm formation of *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology* 281:60 - 71
 35. Yi Sun, Du Guo, Zi Hua, Huihui Sun, Zhanwen Zheng, Xiaodong Xia, Chao Shi. 2019. Attenuation of Multiple *Vibrio parahaemolyticus* Virulence Factors by Citral. boards and food contact surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 666 - 672.
 36. JB. Kaplan, E A. Izano, P Gopal, MT Karwacki, SH Kim, J L. Bose, KW Bayles and Alexander R. 2012. Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 2012;3:e00198 - 00112.
 37. L Zhou, T Li, Jingkun A , C Liao, Nan Li , X Wang. 2017. Subminimal inhibitory concentration (sub-MIC) of antibiotic induces electroactive biofilm formation in bioelectrochemical systems. *Water Research* 125, 280-287
 38. Wu D, Zhang W, Wang T, Lin T, Jin X, Xie X, et al. 2016. Low-dose norfloxacin and ciprofloxacin therapy worsen leptospirosis in hamster. *Microb Pathog* 102:36 - 41.
 39. DB Kearns. 2020. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8, 634 - 644.
 40. C R. Armbruster and MR. Parsekb. 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *Microbiology* 2018 Apr 24; 115(17): 4317 - 4319.

41. L Zhao, J Chen, J Su, L Li, S Hu, B Li, X Zhang, Z Xu, and T Chen. 2013. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of 5-Hydroxymethylfurfural. *J Agric. Food Chem.* 61:10604–10611
42. GA Subramenium, TK Swetha, PM Iyer, K Balamurugan and SK Pandian. 2018. 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from marine bacterium *Bacillus subtilis* inhibits biofilm and virulence of *Candida albicans*. *Microbiological Research* 207:19 - 32
43. P Yamada, M Nemoto, H Shigemori, S Yokota and H Isoda. 2011. Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from *Lycium chinense* and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells. *Planta Med.* 77, 434–440.
44. O. Abdulmalik, M. K. Safo, Q. Chen, J. Yang, C. Brugnara, K. Ohene-Frempong, D. J. Abraham and T. Asakura. 2005. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br. J. Haematol.*, 128, 552–561.
45. Wang MY, Zhao FM, Peng HY, Lou CH, Li Y, Ding X, Yu XY, Yang GM, Xu DQ, Jiang LH, Zhang X, Ye LH., Cai BC. 2010. Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed *Fructus corni* on human L02 hepatocytes. *J. Ethnopharmacol.* 130, 424–428.
46. X Ding, MY Wang, YX Yao, GY Li, BC Cai. 2010. Protective effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed *Fructus Corni* on human hepatocyte L02 injured by hydrogen peroxide and its mechanism. *J. Ethnopharmacol.* 128:373–376.
47. HBF Dixon, RN Perham. 1968. blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochem J* 109 (2): 312 - 314.
48. M.Z. Atassi, A.F.S.A. Habeeb. 1972. Reaction of proteins with citraconic anhydride. *Methods in Enzymology* Volume 25, Pages 546–553
49. RW Pero, H Lund and T Leanderson. 2008. Antioxidant Metabolism

- Induced by Quinic Acid. Increased Urinary Excretion of Tryptophan and Nicotinamide. *Phytother Res.* vol. 23 3:335-346
50. J Bai, Y Wu, X Wang, X Liu, K Zhong, Y Huang, Y Chen and H Gao. In vitro and in vivo characterization of the antibacterial activity and membrane damage mechanism of quinic acid against *Staphylococcus aureus*. 2018. *J. Food Saf.*, 2018, 38, e1241
 51. Ozcelik B, Kartal M, Orhan I. 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol.* 49: 396-402.
 52. A Murugesan, Suvi Holmstedt, KC Brown, A Koivuporras, AS Macedo, N Nguyen, P Fonte, P Rijo, O Yil-Harja and NR Candeias. Design and synthesis of novel quinic acid derivatives in vitro cytotoxicity and anticancer effect on a glioblastoma. *Future Medical Chemistry*, Nov;12(21):1891-1910
 53. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MN, Milhazes N, Borges F and Marques MPM. 2003. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure - activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg Med Chem* 2004;12:3581 - 3589
 54. L Inbathamizh and E Padmini Citeseer. 2013. Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer - a comparative pharmacokinetic approach. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 106-112.
 55. A Singh, SS Chauhan and V Tripathi. 2018. Quinic Acid Attenuates Oral Cancer Cell Proliferation by Downregulating Cyclin D1 Expression and Akt Signaling. *Pharmacognosy Magazine*, 14 (55): 14.
 56. S Muthamil, B Balasubramaniam, K Balamurugan and SK Pandian. 2018. Synergistic Effect of Quinic Acid Derived From *Syzygium cumini* and Undecanoic Acid Against *Candida* spp. *Biofilm and Virulence*. *Front.*

Microbiol. 9:2835.

57. CH Eun, MS Kang and IJ Kim. 2020. Elastase/Collagenase Inhibition Compositions of Citrus unshiu and Its Association with Phenolic Content and Anti-Oxidant Activity. Appl. Sci. 2020, 10, 4838

ABSTRACT

In this study, pathogen growth inhibitory activities were investigated in halibut using mature citrus unshiu peel (MCU) and premature unshiu peel (PCU). As pathogens, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, and *V. ichthyenteri* were used. PCU had a higher polyphenol content compared to MCU and showed better scavenging activity. The extracts were treated with various concentrations (25, 50, 100 mg/mL) to investigate the antibacterial activity. MCU did not show any significant effect except 100 mg/mL on *V. ichthyenteri*. PCU showed a dose-dependent antibacterial effect. The MIC values of PCU were determined for *V. anguillarum* at 1.8 mg/mL, for *V. harveyi* at 1.2 mg/mL, and *V. ichthyenteri* at 0.9 mg/mL. In the biofilm inhibition activity assay, MIC value of PCU showed higher inhibition activity in *V. harveyi*, and *V. ichthyenteri* than *V. anguillarum*. In motility inhibition activity assay, MIC value of PCU significantly inhibited the motility of all three *Vibrio* strains. Since PCU had a higher antibacterial effect on *Vibrio* pathogens, the components of each extract were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm and antimotility of PCU might be due to the presence of 5-HMF and quinic acid. In conclusion, PCU could be used as a natural antibiotic of *Vibrio* pathogen and decrease the mortality rate of olive flounder.

감사의 말

석사과정을 진행하면서 저의 학위논문이 마무리될 때까지 많은 분들의 도움이 있었습니다. 이 글을 통해 감사의 인사를 드리고자 합니다.

먼저 새로운 연구 방향을 제시해 주시고, 부족한 저를 아낌없이 지도해 주신 김재훈 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 바쁘신 와중에도 시간을 내주셔서 학위 논문의 심사위원이 되어주신 윤노타쓰야 교수님과 김창숙 교수님에게 감사의 말씀 전합니다.

친환경 농업연구소 217호에서 실험하시는 박사님들께도 크고 작은 도움을 받았음에 감사의 말씀을 드립니다. 많은 조언과 도움을 주신 한송이 박사님 감사드립니다. 또한 단백질공학 실험실의 이중희 박사님, 선후배님 모두 감사드립니다. 특히나 본인의 일처럼 도와주고 격려해 준 미숙이와 무한한 신뢰와 용기를 나누어준 해리에게 감사의 말을 전합니다. 그리고 가족들에게 사랑한다는 말씀 드립니다.

미처 언급하지 못했지만, 저를 아끼고 격려해 주셨던 모든 분들께도 진심으로 감사하다고 말씀을 전합니다.