

## 광귤 추출물의 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균 메커니즘 및 샐러드 세척 효과

지윤미<sup>1</sup> · 배지윤<sup>1</sup> · 김충환<sup>2</sup> · 오세욱<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국민대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>(주)서울식연

## Antibacterial Mechanism and Salad Washing Effect of Bitter Orange Extract Against *Salmonella* Typhimurium

Yoon-Mi Ji<sup>1</sup>, Ji-Yun Bae<sup>1</sup>, Chung-Hwan Kim<sup>2</sup>, Se-Wook Oh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Seoul Food R&D Co., Ltd., Seongnam, Korea

(Received March 22, 2024/Revised May 29, 2024/Accepted June 5, 2024)

**ABSTRACT** - In this study, the antibacterial activity and mechanisms of bitter orange extract, a natural antibacterial agent, were investigated, with a focus on its potential application in washing water for controlling *Salmonella* Typhimurium contamination of salad, a ready-to-eat food. The minimum inhibitory concentration (MIC) of bitter orange extract against *S. Typhimurium* was determined using the broth dilution method. Subsequently, *S. Typhimurium* was exposed to various concentrations of bitter orange extract (1/16 MIC-2 MIC) and growth curves were measured. Following treatment with bitter orange extract, we investigated its antibacterial mechanism by measuring intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, alterations in membrane potential and integrity, and nucleic acid leakage in *S. Typhimurium*. Additionally, salads artificially contaminated with *S. Typhimurium* were treated with different concentrations of bitter orange extract using the dipping method for various durations to assess the reduction effect. The MIC of bitter orange extract against *S. Typhimurium* was 195.313 mg/L, and bacterial growth was completely inhibited at a concentration of 1 MIC. Furthermore, an increase in bitter orange extract concentration correlated with elevated intracellular ROS levels, membrane potential disruption, membrane damage, and nucleic acid release. Importantly, salads treated with bitter orange extract exhibited a significant reduction in *S. Typhimurium* counts compared to the control, and prolonged treatment times resulted in further reductions in bacterial counts. Bitter orange extract was more effective than sodium hypochlorite and can be used as a safer salad wash. These findings indicate the potential treatment of salads to prevent foodborne illnesses.

**Key words:** *Salmonella* Typhimurium, Bitter orange extract, Natural antibacterial agent, Antibacterial mechanism

건강한 삶의 영위와 영양가 높은 식품에 대한 소비자의 요구가 증가함에 따라 신선한 과일과 채소의 소비는 1980년대 이후로 크게 증가하였다. 하지만 샐러드와 같은 신선 식품은 병원성 미생물을 제거하기 위한 가열 단계 없이 소비되는 경우가 많기 때문에 식중독 발생 가능성이

높다<sup>1)</sup>. 식품의약품안전처가 2019년 발표한 자료에 따르면<sup>2)</sup> 최근 5년간 발생한 병원성대장균 식중독 원인 식품의 29%는 채소류로 밝혀졌다. 또한 미국 질병통제예방센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)<sup>3)</sup>에 따르면 2017년부터 2020년 동안 발생한 식중독 원인 식품 중 과일과 채소는 각각 22건, 20건으로 가장 많았다. 이는 총 식중독 발생 건수의 32.31%를 차지한다.

*Salmonella* Typhimurium은 그람음성의 무포자 간균으로 전 세계적으로 가장 빈번한 식품 매개 질병인 살모넬라증의 원인이다<sup>4)</sup>. 살모넬라증은 주로 동물성 식품으로부터 기인한다고 알려져 있으나, 신선한 과일 및 채소와 관련된 여러 발병 사례 또한 보고됐다<sup>5)</sup>. 특히 *S. Typhimurium*은

\*Correspondence to: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, 02727, Korea  
Tel: +82-2-910-5778; Fax: +82-2-910-5249  
E-mail: swoh@kookmin.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.

물로 쉽게 전파되기 때문에<sup>6)</sup> 수확, 유통, 조리 과정에서 적절한 관리와 교차오염의 방지가 이뤄지지 않는다면 샐러드 및 신선한 채소류에서 *S. Typhimurium*에 대한 감염이 발생할 가능성이 크다.

차아염소산나트륨(NaClO)은 경제적인 이점으로 인해 현재 전 세계에서 가장 많이 사용되는 과일 및 채소류의 주요한 상업적 살균 소독제이다<sup>7)</sup>. 하지만 차아염소산나트륨과 같은 염소계 살균제의 주요한 단점은 불쾌한 맛과 냄새가 발생한다는 것과, 잔류염소가 유기물과 반응하여 트리할로메탄, 할로아세트산과 같은 발암물질을 생성할 위험성이 존재한다는 것이다<sup>8,9)</sup>. 이러한 합성 살균제에 대한 소비자의 부정적인 인식으로 인해, 식품 산업에서는 보다 안전하면서 살균 효과가 뛰어난 천연 항균제의 개발이 진행되고 있다<sup>10)</sup>.

감귤류의 추출물은 병원성 미생물의 성장과 생존을 제어하기 위해 식품 가공에서 광범위하게 사용되는 천연 항균제이다<sup>5)</sup>. 그 중, 광귤(*Citrus aurantium*)은 항암, 항비만, 항불안 등의 생물학 및 약리학적 활성을 가지고 있어<sup>11)</sup> 복통 및 구토 등 다양한 질병의 치료에 유용하게 사용되어 왔다<sup>12)</sup>. 또한 다양한 병원성 세균에 대해 항균 활성을 나타낸다. Degirmenci 등<sup>13)</sup>은 페이퍼 디스크 확산법으로 광귤 추출물이 *Escherichia coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*에 대해 항균 활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한 Sandra 등<sup>14)</sup>은 광귤 추출물이 퀴럼 센싱을 억제해 *Campylobacter jejuni*의 운동성과 생물막 형성을 감소시킨다고 하였다.

따라서 본 연구는 샐러드에 존재할 수 있는 *S. Typhimurium*을 제어하기 위한 새로운 천연 항균제의 개발을 목표로, 광귤 추출물을 천연 항균제로 사용하였다. 광귤 추출물이 *S. Typhimurium*을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하기 위해 *S. Typhimurium*에 대한 광귤 추출물의 항균 활성을 평가하였다. 또한 광귤 추출물을 처리하였을 때 *S. Typhimurium*에 나타나는 세포막 손상, 세포 내 ROS의 생성, 세포 막전위 변화를 확인하여 광귤 추출물의 구체적인 항균 메커니즘을 연구하였다. 이후 광귤 추출물을 실제 식품인 샐러드의 세척수로 적용하여 항균 효과를 검증하였다.

## Materials and Methods

### 사용 균주

*S. Typhimurium* ATCC 14028, 43971 및 19585은 -80°C에서 50% (v/v) glycerol stock에 보관 중인 균주를 사용하였다. 실험 시작 전, *S. Typhimurium*을 tryptic soya broth (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK)에 접종하고 37°C에서 9시간 동안 배양한 후, 새로운 TSB에 9시간 더 배양하였다. *S. Typhimurium*의 세 균주를 1 mL씩 혼합하여 8,000 ×g

에서 15분간 원심분리한 후, 0.85% (w/v) NaCl (saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 재현탁하여 최종 농도를 1.07×10<sup>8</sup> CFU/mL로 설정하였다.

### 최소 억제 농도 분석

*S. Typhimurium*에 대한 광귤 추출물의 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)는 Andrews<sup>15)</sup>의 실험방법에 수정을 거쳐 액체배지 희석법으로 확인하였다. 96-well microplate (SPL, Pocheon, Korea)의 첫 번째 줄에 2배 농도의 TSB 100 μL를 분주하고, 나머지 well에는 TSB 100 μL를 분주하였다. 그런 다음, 광귤 추출물(Seoul Food R&D Co., Ltd., Seongnam, Korea) 100 μL를 첫 번째 줄부터 이배열 직렬 희석하였다. 그 후 *S. Typhimurium* (1.07 × 10<sup>8</sup> CFU/mL)를 모든 well에 20 μL 접종하고 37°C에서 16시간 배양하였다. 0시간과 16시간에 대한 흡광도를 595 nm 파장에서 분광광도계(Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA)로 측정하였다. 아래의 식을 활용하여 그 차이가 0.05 미만에 해당하는 최소 농도를 MIC로 결정하였다.

### 광귤 추출물을 처리한 *S. Typhimurium*의 성장곡선 분석

성장곡선 분석은 Han 등<sup>16)</sup>의 실험 방법을 일부 수정하여 실행했다. TSB에 광귤 추출물을 희석하여 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC의 항균용액을 제조하였다. 96-well microplate에 제조한 항균 용액 200 μL를 분주한 후, *S. Typhimurium* (1.07 × 10<sup>8</sup> CFU/mL) 40 μL를 접종하였다. 대조군은 saline을 사용하였다. 분광광도계(Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 37°C에서 16시간 동안 595 nm 파장의 흡광도 값을 1시간마다 연속적으로 측정하였다.

### 세포 내 ROS 수준 분석

세포 내 활성산소 수준 분석은 Han 등<sup>17)</sup>의 실험 방법을 일부 수정하여 실행하였다. *S. Typhimurium* (1.07 × 10<sup>8</sup> CFU/mL)을 다양한 농도(1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC)의 광귤 추출물로 37°C에서 15분간 처리하였고, 같은 조건에서 saline으로 처리한 균을 대조군으로 설정하였다. 이후 처리한 균 1 mL을 최종 농도 5 μM의 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 함께 37°C에서 60분간 암반응시켰다. 이후 8,000×g에서 5분간 4°C에서 원심분리하고 saline으로 2회 세척하였다. 침전물을 saline 1 mL로 재현탁한 후, 200 μL을 96-well black microplate (SPL, Pocheon-si, Korea)로 옮겼다. Microplate reader (Varioskan™ LUX multimode microplate reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를

사용하여 활성화 파장 495 nm, 방출 파장 520 nm에서 형광 값을 측정하였다.

### 막 손상도 분석

막 손상도 분석은 Tyagi 등<sup>18)</sup>의 PI 흡수 분석법에 수정하여 실행하였다. 앞선 조건에서 광균 추출물을 농도별로 처리한 균 1 mL과 saline으로 처리한 균 1 mL에 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich)의 최종 농도가 3.0  $\mu$ M이 되도록 첨가하였다. 실온에서 15분간 암반응시킨 후, 8000 $\times$ g에서 5분간 4°C에서 원심분리하고 saline으로 2회 세척하였다. 침전물을 saline으로 재현탁한 후, 200  $\mu$ L을 96-well black microplate로 옮겼다. 활성화 파장 493 nm, 방출 파장 680 nm에서 microplate reader (Varioskan™ LUX multimode microplate reader, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 형광 값을 측정하였다.

### 핵산 누출량 분석

핵산 누출량 분석은 Han 등<sup>17)</sup>의 실험 방법을 일부 수정하여 실행했다. 앞선 조건에서 광균 추출물을 농도별로 처리한 균 1 mL과 saline으로 처리한 균 1 mL을 4000 $\times$ g에서 10분간 4°C에서 원심분리하였다. 상층액 200  $\mu$ L을 96-well microplate로 옮긴 후 분광광도계(Multiskan SkyHigh, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

### 막 전위 변화 분석

막 전위 분석은 Hyun 등<sup>19)</sup>의 실험 방법을 일부 수정하여 실행하였다. 앞서 언급한 조건에서 광균 추출물을 농도별로 처리한 균 1 mL과 saline으로 처리한 균 1 mL에 bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3), Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 첨가하여 최종 농도가 1  $\mu$ g/mL이 되도록 하였다. 37°C에서 15분간 암반응시킨 후, 8000 $\times$ g에서 5분간 4°C에서 원심분리하고 saline으로 2회 세척하였다. 침전물을 saline으로 재현탁한 후, 200  $\mu$ L을 96-well black microplate로 옮겨 활성화 파장 488 nm, 방출 파장 525 nm에서 microplate reader (Varioskan™ LUX multimode microplate reader, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 형광 값을 측정하였다.

### 샬러드 세척수르써 광균 추출물의 적용 가능성 평가

샬러드 10 g에 *S. Typhimurium* ( $1.07 \times 10^8$  CFU/mL) 100  $\mu$ L를 인위적으로 접종한 후, 실온에서 1시간 동안 건조시켰다. 이후 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC의 농도의 광균 추출물에 0분, 5분, 15분, 30분의 처리시간 동안 샬러드를 침지 방법으로 처리했다. 대조군은 saline에 같은 시간 동안 침지 처리하였다. 처리한 샬러드는 saline으로 옮겨 Pulsifier II (microgen Bioproducts, Camberley,

UK)로 30초 동안 균질화를 진행했다. 균질화한 시료를 십진희석하여 xylose lysine deoxycholate agar (XLD, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종해 37°C에서 16시간 배양한 후, *S. Typhimurium*의 콜로니 수를 계수하였다.

### 통계 분석

모든 실험은 3회 반복되어 수행되었으며 측정값은 평균  $\pm$ 표준편차로 표시하였다. SPSS software (Statistical Package for Social Sciences; v.25.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 모든 매개변수에 대해 <0.05의 P값에서 분산 분석을 사용하여 유의미한 차이를 평가하였다.

## Results and Discussion

### 광균 추출물의 항균 활성

액체배지 희석법으로 확인한 *S. Typhimurium*에 대한 광균 추출물의 최소 억제 농도는 195.313 mg/L이었다. Sutar 등<sup>12)</sup>에 따르면, 광균 추출물의 화학적 구성 요소는 페놀 화합물과 테르페노이드, 비타민, 미네랄 등이며, 이중 가장 주요한 구성 요소는 테르페노이드 계열인 리모넨(limonene)이다. O'Bryan 등<sup>20)</sup>에 따르면 *S. Typhimurium*에 대한 limonene의 최소 억제 농도는 10000 mg/L으로 본 연구에서 나타난 광균 추출물의 최소 억제 농도인 195.313 mg/L보다 훨씬 높은 농도이다. 따라서 limonene보다 광균 추출물의 항균력이 더 강함을 알 수 있다. Freeman 등<sup>21)</sup>은 당귤(*Citrus sinensis*)에서 발견되는 페놀성 화합물 간의 시너지 효과를 산소 라디칼 흡광도법을 활용하여 확인하였다. 이를 통해서 limonene 단독 사용 시의 항균력보다 광균 추출물의 항균력이 더 강한 것은 광균 내 다양한 화합물 간의 시너지 효과로 인한 것임을 짐작해 볼 수 있다.

Fig. 1은 16시간 동안 1시간 마다 595 nm에서 흡광도를 측정하여 나타낸 *S. Typhimurium*의 성장곡선이다. 성장곡선 분석을 통해 다양한 광균 추출물 농도에서 *S. Typhimurium*의 성장이 얼마나 저해되는지 확인하고자 하였다. 박테리아의 성장은 유도기, 대수기, 정지기, 사멸기를 거쳐 일어난다<sup>22)</sup>. 대조군과 1/16 MIC, 1/8 MIC 및 1/4 MIC를 처리한 *S. Typhimurium*은 약 1시간의 유도기가 지난 후 대수기에 진입하였다. 1/2 MIC를 처리한 *S. Typhimurium*의 유도기는 약 2시간으로 더 낮은 농도로 처리한 시료에 비해 지연된 것을 확인할 수 있었다. 반면 1 MIC와 2 MIC를 처리한 *S. Typhimurium*은 16시간이 지난 후에도 대수기에 진입하지 않아 *S. Typhimurium* 성장이 완전히 억제된 것을 확인하였다. 광균 추출물을 처리한 모든 처리구의 *S. Typhimurium* 성장 최대값은 대조군보다 감소하였다. 이러한 결과는 광균 추출물의 농도가 증가할수록 *S. Typhimurium*의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다. Dhakal 등<sup>23)</sup>이 다양한 염소 농도에서 수

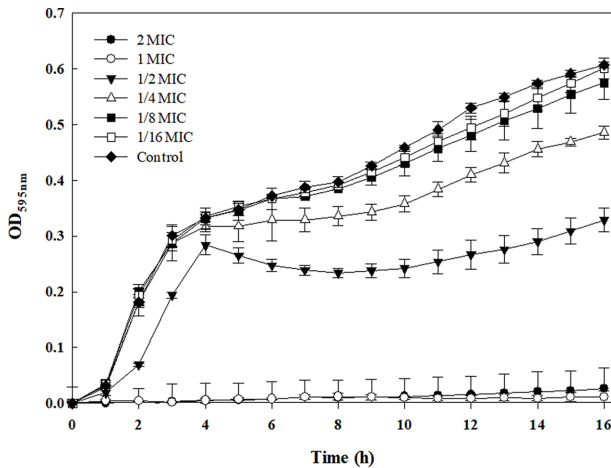


Fig. 1. Growth curve analysis of *S. Typhimurium* with various concentrations of bitter orange extract.

행한 *S. Typhimurium* 성장곡선 또한 염소의 농도가 증가할수록 유도기가 지연되고 성장이 억제되는 동일한 양상을 보였다.

**광굴 추출물이 세포 내 활성산소종 생성에 미치는 영향**

CM-H<sub>2</sub>DCFDA는 세포의 원형질막을 자유롭게 통과해 세포질에서 가수분해되어 카르복실산염 음이온 형태인 dichlorofluorescein (DCFH)가 된다. 세포 내에 ROS가 존재하게 되면 DCFH는 산화가 되어 형광 생성물인 fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. DCF는 495 nm에서 활성화가 되면 520 nm에서 형광을 방출해 세포 내 ROS 수준을 측정할 수 있다<sup>24</sup>). 자유 라디칼 및 기타 활성산소종은 산화 대사의 부산물로 세포 내에서 지질 과산화와 유전적 돌연변이를 일으켜 세포 사멸을 유도한다<sup>25</sup>). 따라서 항균제가 세포 내의 ROS를 증가시킬수록 항균 효과가 크다.

CM-H<sub>2</sub>DCFDA를 사용해 측정한 세포 내 ROS 수준 측정 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 1 MIC의 광굴 추출물을 처리한 균의 상대 형광 강도(relative fluorescence unit, RFU)는 1.76±0.03 RFU로 대조군 0.24±0.01 RFU와 비교했을 때 유의적인 차이가 있었다(*P*<0.05). 또한 2 MIC의 광굴 추출물을 처리한 균은 3.36±0.04 RFU으로 1 MIC로부터 ROS 생성이 큰 폭으로 증가하였다. 따라서 광굴 추출물 농도가 증가할수록 *S. Typhimurium* 세포 내 ROS 생성이 증가하여 더욱 강력한 항균 효과를 발휘한다. 본 연구 결과와 일치하게, Lu 등<sup>26</sup>)의 연구에서도 광굴 추출물을 처리한 Hep3B 세포의 ROS 생성이 농도 의존적으로 크게 증가하였다.

Azhdarzadeh 등<sup>27</sup>)의 조사에 따르면, 광굴 추출물의 주요 성분은 테르페노이드 중에서도 리모넨과 리나롤인 것으로 나타났다. Liu 등<sup>28</sup>)의 연구에서 리모넨은 *Saccharomyces*

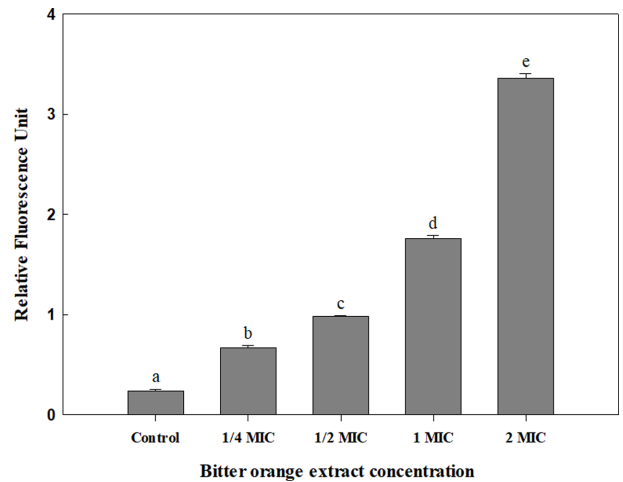


Fig. 2. Effect of bitter orange extract on intracellular ROS production in *S. Typhimurium*, different lowercase letters indicate significant differences (*P*<0.05) in relative fluorescence unit.

*cerevisiae*에서 ROS를 생성하여 DNA 손상을 유발하고 세포막 무결성 손상을 일으킨다고 하였다<sup>29</sup>). 또한 Su 등<sup>30</sup>)의 연구에서는 *Shigella sonnei*에 처리한 리나롤의 농도가 증가함에 따라 세포 내 ROS 수준이 증가하였다. 따라서 광굴 추출물의 성분인 리모넨과 리나롤에 의해 *S. Typhimurium* 세포 내 ROS 생성이 유도됨을 짐작할 수 있다.

**광굴 추출물이 세포막 손상에 미치는 영향**

PI는 원형질막이 손상된 세포 내로 들어가 DNA와 결합하여 적색 형광을 방출하므로, 형광 광도는 세포막의 손상 정도와 세포의 사멸 정도를 반영한다<sup>31</sup>). 1 MIC의 광굴 추출물을 처리한 균은 15.56±0.08 RFU로 1.53±0.10 RFU인 대조군에 비해 상대 형광 강도가 약 10배 높았다

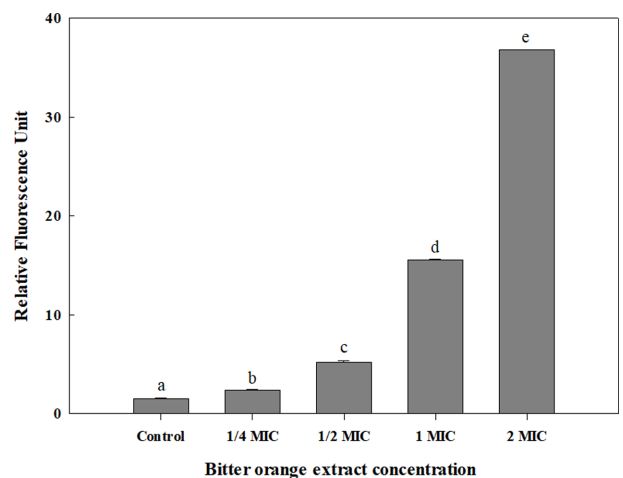
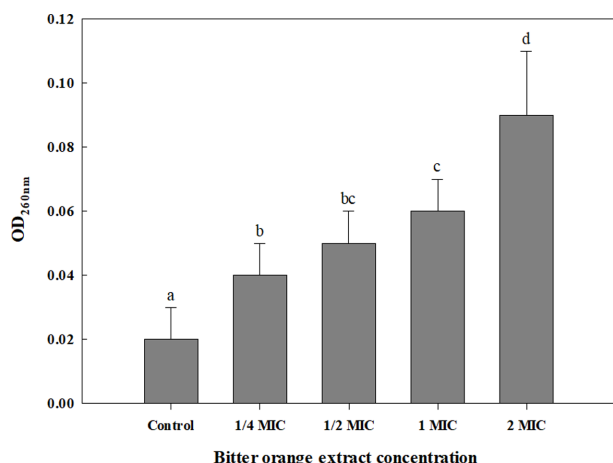


Fig. 3. Effect of bitter orange extract on membrane damage in *S. Typhimurium*, different lowercase letters indicate significant differences (*P*<0.05) in relative fluorescence unit.

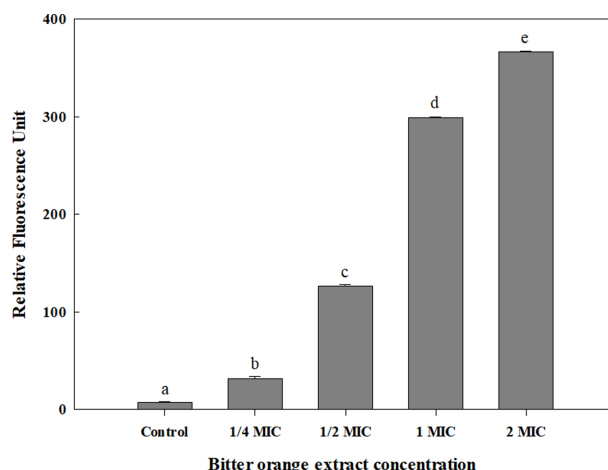


**Fig. 4.** Effect of bitter orange extract on release of nucleic acids in *S. Typhimurium*, different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) in OD<sub>260nm</sub>.

(Fig. 3). 또한 1 MIC부터 상대 형광 광도는 크게 증가해 2 MIC의 광굴 추출물을 처리한 균의 형광 강도는  $36.78 \pm 0.06$  RFU로 나타났다. 따라서 광굴 추출물의 처리 농도가 높아질수록 *S. Typhimurium*의 세포막 손상도가 증가하였다.

광굴 추출물이 세포막을 손상시킨다는 것은 핵산 누출량 측정을 통해서도 알 수 있었다. 세포 내 성분이 누출되는 것은 세포막 분자 조직의 교란과 가장 직접적으로 관련되며, 세포막 손상 정도는 누출된 성분의 양으로 평가할 수 있다<sup>32)</sup>. 따라서 세포 내 성분 중 하나인 핵산의 누출량을 측정함으로써 세포막의 손상 정도를 알아보고자 하였다. 1 MIC의 광굴 추출물을 처리한 *S. Typhimurium*의 핵산 누출량을 나타내는 흡광도 값은 260 nm에서  $0.06 \pm 0.01$ 이며, 대조군은  $0.02 \pm 0.01$ 으로 약 3배 차이가 나타났다(Fig. 4). 광굴 추출물의 농도가 높아질수록 흡광도가 유의미하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 따라서 농도 의존적으로 세포막의 손상도가 증가하여 핵산 누출량이 증가함을 알 수 있다.

이러한 결과는 다른 연구들에서도 유사하게 보고되었다. Han 등<sup>16)</sup>에 따르면 광굴 추출물에 함유된 리모넨은 세포벽과 세포막을 파괴하여 단백질과 핵산을 누출시키고 ATP 합성을 억제하여 궁극적으로 세포 사멸을 일으킬 수 있다고 하였다. 또한 Hashemi 등<sup>33)</sup>은 광굴 추출물 중 페놀 화합물의 항균 메커니즘이 인지질 세포막을 공격하여 세포질의 투과성과 누출을 증가시키는 것이라고 하였다. Liu 등<sup>34)</sup>의 연구에서도 *Pseudomonas aeruginosa*에 처리한 리나롤의 농도가 높아질수록 핵산 누출량이 증가하였다. 따라서 리모넨, 리나롤, 페놀 화합물이 세포막 손상을 유발하는 광굴 추출물의 주요 성분이며, 이로 인해 *S. Typhimurium*의 사멸이 초래된다는 결론을 내릴 수 있다.



**Fig. 5.** Effect of bitter orange extract on membrane potential in *S. Typhimurium*, different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) in relative fluorescence unit.

#### 광굴 추출물이 막 전위 변화에 미치는 영향

DiBAC<sub>4</sub>(3)은 전압 민감형 형광 염료로 막 전위 측정을 위해 사용된다<sup>35)</sup>. 음이온 전하를 띠는 DiBAC<sub>4</sub>(3)는 세포의 극성 내막을 통과할 수 없는 친유성 염료이다. 하지만 탈분극이 일어나면 막 전위가 감소해 수동적 확산으로 세포 내로 이동해 양전하를 띤 단백질과 소수성 영역에 결합하여 형광을 방출한다<sup>36)</sup>. 따라서 DiBAC<sub>4</sub>(3)의 상대 형광 광도는 세포막의 손상도에 따른 막 전위의 변화를 알 수 있는 척도로 사용될 수 있다.

DiBAC<sub>4</sub>(3)로 측정된 막 전위의 변화는 Fig. 5에 나타났다. 대조군의 상대 형광 광도는  $7.66 \pm 0.09$  RFU, 1 MIC를 처리한 균은  $298.74 \pm 0.91$  RFU으로 유의적인 차이가 있었다( $P < 0.05$ ). 또한 상대 형광 광도는 1 MIC부터 크게 증가하여, 2 MIC를 처리한 균은  $366.47 \pm 0.52$  RFU로 나타났다. 광굴 추출물의 농도 의존적으로 상대 형광 광도 또한 유의미하게 증가하였다. 정상적인 세포막은 일정한 전위를 유지하지만, 세포막이 손상되거나 투과도가 증가하면 급격한 이온 변화로 탈분극이 일어나 막 전위가 감소한다<sup>37)</sup>. 따라서 광굴 추출물을 처리한 균에서 증가된 상대 형광 광도는 *S. Typhimurium*의 세포막이 손상되어 막 전위가 감소했음을 의미한다.

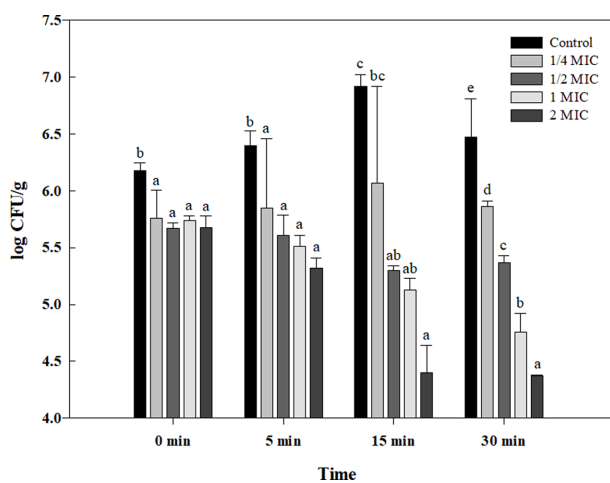
광굴 추출물의 성분인 리모넨과 리나롤은 세포의 막 전위 변화를 일으켜 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려졌다. Liu 등<sup>35)</sup>의 연구에 따르면, *P. aeruginosa*에 MIC 농도의 리나롤을 처리했을 때, 막 전위가 감소하여 세포막 탈분극이 유발되었다. 이는 리나롤이 세포 내 ROS 생성을 촉진하여 미토콘드리아의 기능 손상을 초래하고 결과적으로 막 전위 붕괴와 세포 사멸로 이어진다는 것을 시사한다<sup>38)</sup>. 또한 Han 등<sup>39)</sup>의 연구에서는 리모넨을 처리한 *S. aureus*의 막 전위가 감소하였다. 이러한 리나롤과 리모넨의 막

전위 변화 유도는 광굴 추출물의 항균 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. Lee 등<sup>40)</sup>의 연구에서도 광굴 추출물 처리가 간세포 암종에서 미토콘드리아 막 전위를 크게 감소시켜 세포 사멸을 유도함을 보고했으며, 이는 본 연구 결과와 유사하다.

#### 샐러드 세척수로서 광굴 추출물의 적용 가능성 평가

광굴 추출물이 세척수로 사용될 때, 샐러드에 존재할 수 있는 식중독균에 대한 항균 효과를 확인하기 위한 실험을 수행했다. *S. Typhimurium* ( $1.07 \times 10^8$  CFU/mL) 100  $\mu$ L 접종한 샐러드를 농도별(1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC) 광굴 추출물 세척수에 각각 시간별(0, 5, 15, 30분)로 침지 처리하여 *S. Typhimurium* 저감화 정도를 확인했다. 모든 처리 시간에서 saline에 침지한 대조군에 비해 광굴 추출물 세척수에 침지한 처리구는 세균수가 유의미하게 감소했다(Fig. 6). 또한 1 MIC와 2 MIC 농도의 광굴 추출물 세척수에 0분, 30분 동안 침지한 샐러드의 세균 수의 차이는 약 0.98 log CFU/g, 1.31 log CFU/g으로 30분 동안 *S. Typhimurium* 수가 지속적으로 감소한 것을 알 수 있다. 이로써 광굴 추출물이 실제 식품인 샐러드에서 *S. Typhimurium* 감소에 효과가 있음을 확인했다. 이는 식품에서 *S. Typhimurium*로 인한 식중독을 억제하는데 잠재적인 적용 가능성을 나타낸다.

Takeuchi 등<sup>41)</sup>에 따르면, *E. coli* O157:H7이 접종된 양상추를 200 mg/L의 차아염소산나트륨으로 5분간 처리했을 때 0.7-1.0 log CFU의 세균 수 감소가 나타났다. 또한 Kondo 등<sup>42)</sup>은 자른 양상추를 200 mg/L의 차아염소산나트륨에 3회 세척하였을 때, 토착 세균 수가 0.9 log CFU 감소했다고 하였다. Gurtler<sup>44)</sup>의 조사에 따르면 20-600 mg/L



**Fig. 6.** Reduction effect of bitter orange extract on *S. Typhimurium* inoculated in salads by concentration (1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC) and time (0, 5, 15, 30 min), different lower-case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) in log CFU/g of *S. Typhimurium*.

의 차아염소산나트륨으로 신선 농산물을 30초에서 10분 동안 처리했을 때, *S. Typhimurium* 및 *E. coli*, *Listeria monocytogenes*와 같은 중온성 박테리아의 감소는 0.5-2.0 log CFU로 평균 감소율은 1.24 log CFU이었다. 본 연구에서 1/4 MIC-2 MIC 농도(50-390 mg/L)의 광굴 추출물로 5분에서 15분 동안 처리했을 때, *S. Typhimurium*의 감소는 0.55-2.52 log CFU로 나타났으며, 평균 감소율은 1.26 log CFU로 나타났다. 따라서 광굴 추출물은 차아염소산나트륨과 비교하였을 때, 균주와 식품에 따라 유사하거나 더 강한 항균 활성을 보임을 알 수 있다. 이는 광굴 추출물이 샐러드 세척에 있어 차아염소산나트륨을 대체할 수 있는 잠재력이 있음을 시사한다.

## Conclusions

본 연구는 *S. Typhimurium*에 대한 광굴 추출물의 항균 활성 및 항균 메커니즘을 탐구하였다. 광굴 추출물의 최소 억제 농도는 195.313 mg/L으로 *S. Typhimurium*의 세 가지 균주에서 모두 효과적인 항균 활성을 보였다. 또한 광굴 추출물은 세포 내 ROS를 증가시켜 세포막 손상 및 투과성 증가를 유발하고, 이는 막 전위 변화와 세포 내 물질 누출을 초래하여 세포 사멸을 일으키는 항균 메커니즘을 가진다. 마지막으로 광굴 추출물을 실제 식품인 샐러드 세척수로 적용하는 실험을 통해, 광굴 추출물이 식품에서 *S. Typhimurium*에 대한 잠재적인 억제제로 사용될 수 있음을 확인하였다. 이러한 광굴 추출물의 항균 활성은 이전 연구에서 보고된 차아염소산나트륨과 비교했을 때 유사하거나 더 강한 것으로 나타났다. 천연 항균제인 광굴추출물은 차아염소산나트륨 사용 시 발생하는 주요 문제점인 잔류염소로 인한 발암물질 생성 위험이 없어 소비자들에게 안전한 식품을 제공할 수 있다. 이는 광굴 추출물이 차아염소산나트륨의 단점을 극복하면서도 효과적인 항균 활성을 갖는 샐러드 세척수가 될 수 있음을 시사한다. 따라서 광굴 추출물은 샐러드와 같은 가열하지 않고 섭취하는 생채소의 세척수로 활용되어 식중독의 발생을 미연에 방지하는데 기여할 수 있다.

## 국문요약

본 연구에서는 천연 항균제인 광굴 추출물의 항균 활성과 항균 메커니즘을 조사해 즉석섭취식품인 샐러드에서 *Salmonella Typhimurium*을 제어하기 위한 세척수로서 적용 가능성을 평가하였다. 액체배지희석법으로 *S. Typhimurium*에 대한 광굴 추출물의 최소 억제 농도(MIC)를 구했다. 그런 다음 다양한 농도(1/16 MIC-2 MIC)에 해당하는 광굴 추출물에 *S. Typhimurium*을 접종하고 성장곡선을 분석해 대조군과 성장값을 비교하여 항균 활성을 확인하였다.



광굴 추출물을 처리한 후, *S. Typhimurium*의 세포 내 활성산소종 수준과 막 전위 및 손상도의 변화, 핵산 누출량을 측정하여 광굴 추출물의 항균 메커니즘을 확인하였다. 최종적으로 *S. Typhimurium*을 인위적으로 접종한 샐러드에 다양한 농도의 광굴 추출물을 다양한 시간 동안 침지 방법으로 항균 처리하여 저감화 효과를 확인했다. *S. Typhimurium*에 대한 광굴 추출물의 MIC는 195.313 mg/L으로, 1 MIC와 2 MIC의 광굴 추출물은 *S. Typhimurium*의 성장을 완전히 억제하였다. 광굴 추출물의 처리농도가 높아질수록, 세포 내 ROS 수준과 막 전위, 막 손상도 그리고 핵산 방출량은 증가하였다. 마지막으로, 세척수인 광굴 추출물의 농도가 높고 처리 시간이 길수록 샐러드의 *S. Typhimurium*의 수가 감소하였다. 따라서 광굴 추출물은 *S. Typhimurium*를 효과적으로 제어할 수 있음을 입증했다. 광굴 추출물은 차아염소산나트륨과 비교하였을 때 효과적인 항균 활성을 보이며 안전한 샐러드 세척수로 사용될 수 있다. 이는 샐러드와 같은 식품에서 광굴 추출물이 식중독 발생을 미연에 방지하는데 기여할 수 있음을 시사한다.

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

### ORCID

Yoon-Mi Ji <https://orcid.org/0009-0005-0947-3597>  
 Ji-Yun Bae <https://orcid.org/0009-0006-9334-1286>  
 Chung-Hwan Kim <https://orcid.org/0009-0009-4962-6155>  
 Se-Wook Oh <https://orcid.org/0000-0002-8580-6032>

### References

- Carstens, C.K., Salazar, J.K., Darkoh, C., Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Front. microbiol.*, **10**, 2667 (2019).
- Ministry of Food and Drug Safety, (2024, January 11). Beware of food poisoning with pathogenic *E. coli* in summer. Retrieved from [https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/boardDetail.do?menu\\_no=2859&bbs\\_no=bbs082&ntctxt\\_no=1074833&menu\\_grp=MENU\\_NEW05](https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/boardDetail.do?menu_no=2859&bbs_no=bbs082&ntctxt_no=1074833&menu_grp=MENU_NEW05)
- Centers for Disease Control and Prevention, (2024, January 11). Summary of Possible Multistate Enteric (Intestinal) Disease Outbreaks in 2017-2020. Retrieved from <https://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/php/data-research/summary-2017-2020.html>
- Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Hirt, H., The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One*, **3**, e2279 (2008).
- Karabiyıklı, Ş., Değirmenci, H., Karapınar, M., Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Sci. Technol.*, **55**, 421-425 (2014).
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., Tandoi, V., *Salmonella* in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. *Food Res. Int.*, **45**, 587-602 (2012).
- Arienzo, A., Gallo, V., Tomassetti, F., Antonini, G., Implication of Sodium Hypochlorite as a Sanitizer in Ready-to-Eat Salad Processing and Advantages of the Use of Alternative Rapid Bacterial Detection Methods. *Foods*, **12**, 3021 (2023).
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J., Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5022-5028 (2005).
- Hua, G., Reckhow, D.A., Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Res.*, **41**, 1667-1678 (2007).
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.G., Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **54**, 625-644 (2014).
- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., Rastrelli, L., An overview on *Citrus aurantium* L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 7864269 (2018).
- Periyanyagam, K., Dhanalakshmi, S., Karthikeyan, V., Magesh, M., Antibacterial activity of *Citrus aurantium* leaf essential oil against *S. aureus* and MRSA. *J. Drug Discov. Ther.*, **2**, 54-60 (2014).
- Değirmenci, H., Erkurt, H., Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. *LWT-Food Sci. Technol.*, **126**, 109273 (2020).
- Castillo, S., Heredia, N., Arechiga-Carvajal, E., García, S., Citrus extracts as inhibitors of quorum sensing, biofilm formation and motility of *Campylobacter jejuni*. *Food Biotechnol.*, **28**, 106-122 (2014).
- Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, **48**, 5-16 (2001).
- Han, Y., Sun, Z., Chen, W., Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, **25**, 33 (2019).
- Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljević, V., Cullen, P. J., Bourke, P., Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 450-458 (2016).
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., Mukhopadhyay, K., Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One*, **10**, e0121313 (2015).
- Hyun, J.E., Moon, S.K., Lee, S.Y., Antibacterial activity and mechanism of 460-470 nm light-emitting diodes against pathogenic bacteria and spoilage bacteria at different

- temperatures. *Food Control*, **123**, 107721 (2021).
20. O'Bryan, C.A., Crandall, P. G., Chalova, V.I., Ricke, S.C., Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J. Food Sci.*, **73**, M264-M267 (2008).
  21. Freeman, B.L., Eggett, D.L., Parker, T.L., Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *J. Food Sci.*, **75**, C570-C576 (2010).
  22. Bačun-Družina, V., Butorac, A., Mrvčić, J., Landeka Dragičević, T., Stehlik-Tomas, V., Bacterial stationary-phase evolution. *Food Technol. Biotechnol.*, **49**, 13-23 (2011).
  23. Dhakal, J., Sharma, C.S., Nannapaneni, R., McDaniel, C.D., Kim, T., Kiess, A., Effect of chlorine-induced sublethal oxidative stress on the biofilm-forming ability of *Salmonella* at different temperatures, nutrient conditions, and substrates. *J. Food Prot.*, **82**, 78-92 (2019).
  24. Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L.M.P.E., Szczepanowska, J., Koopman, W.J., Wieckowski, M.R., Quantifying ROS levels using CM-H<sub>2</sub>DCFDA and HyPer. *Methods*, **109**, 3-11 (2016).
  25. Ghosh, R., Hoque, N., Shanta, M.A., Nasrin, N., Asaduzaman, M., Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of different fractions of *Citrus aurantifolia* peel. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, **19**, 161-168 (2020).
  26. Lu, K.H., Lee, H.Y., Chu, Y.L., Ho, C.T., Sheen, L.Y., Bitter orange peel extract induces endoplasmic reticulum-mediated autophagy in human hepatoma cells. *J. Funct. Foods*, **60**, 103404 (2019).
  27. Azhdarzadeh, F., Hojjati, M., Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutr. Food Sci. Res.*, **3**, 43-50 (2016).
  28. Liu, J., Zhu, Y., Du, G., Zhou, J., Chen, J., Response of *Saccharomyces cerevisiae* to D-limonene-induced oxidative stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 6467-6475 (2013).
  29. Thakre, A., Zore, G., Kodgire, S., Kazi, R., Mulange, S., Patil, R., Shelar, A., Santhakumari, B., Kulkarni, M., Kharat, K., Karuppayil, S. M., Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical mycology*, **56**, 565-578 (2018).
  30. Su, R., Guo, P., Zhang, Z., Wang, J., Guo, X., Guo, D., Wang, Y., Lü, X., Shi, C., Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Shigella sonnei* and its application in lettuce. *Foods*, **11**, 3160 (2022).
  31. Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., Waterhouse, N.J., Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2016**, 087163 (2016).
  32. Fortunati, E., Bianchi, V., Plasma membrane damage detected by nucleic acid leakage. *Mol. Toxicol.*, **2**, 27-38 (1989).
  33. Hashemi, S.M.B., Amininezhad, R., Shirzadinezhad, E., Farahani, M., Yousefabad, S.H.A., The Antimicrobial and Antioxidant Effects of *Citrus aurantium* L. Flowers (Bahar Narang) Extract in Traditional Yoghurt Stew during Refrigerated Storage. *J. Food Saf.*, **36**, 153-161 (2016).
  34. Liu, X., Cai, J., Chen, H., Zhong, Q., Hou, Y., Chen, W., Chen, W., Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.*, **141**, 103980 (2020).
  35. Yamada, A., Gaja, N., Ohya, S., Muraki, K., Narita, H., Ohwada, T., Imaizumi, Y., Usefulness and limitation of DiBAC4 (3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in HEK293 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 342-350 (2001).
  36. Sträuber, H., Müller, S., Viability states of bacteria—specific mechanisms of selected probes. *Cytometry Part A*, **77**, 623-634 (2010).
  37. Novo, D.J., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., Shapiro, H.M., Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 827-834 (2000).
  38. An, Q., Ren, J. N., Li, X., Fan, G., Qu, S. S., Song, Y., Li, Y., Pan, S.Y., Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food Funct.*, **12**, 10370-10389 (2021).
  39. Han, Y., Chen, W., Sun, Z., Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. *J. Food Saf.*, **41**, e12918 (2021).
  40. Lee, S.H., Yumnam, S., Hong, G.E., Raha, S., Venkatarama Gowda Saralamma, V.V., Lee, H. J., Heo, J.D., Lee, S.J., Lee, W.S., Kim, E.H., Park, H.S., Kim, G.S., Flavonoids of Korean *Citrus aurantium* L. induce apoptosis via intrinsic pathway in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Phytother. Res.*, **29**, 1940-1949 (2015).
  41. Takeuchi, K., Frank, J.F., Penetration of *Escherichia coli* O157: H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food Prot.*, **63**, 434-440 (2000).
  42. Kondo, N., Murata, M., Isshiki, K., Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid, and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce. *J. Food Prot.*, **69**, 323-329 (2006).
  43. Gurtler, J.B., Two generally recognized as safe surfactants plus acidulants inactivate *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* in suspension or on dip-inoculated grape tomatoes. *J. Food Prot.*, **83**, 637-643 (2020).