

매실박 메탄올 추출물의 항균 특성

하명희¹ · 박우포² · 이승철³ · 허호진 · 조성환[†]

경상대학교 식품공학과 및 농업생명과학연구원, ¹진주보건대학 피부미용과,
²마산대학 식품과학부, ³경남대학교 식품생명공학부

Antimicrobial Characteristic of Methanolic Extracts from *Prunus mume* Byproducts Against Food Spoilage Microorganisms

Myung-Hee Ha¹, Woo-Po Park², Seung-Cheol Lee³, Ho-Jin Heo
and Sung-Hwan Cho[†]

Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Cosmetology, Jin Ju Health College, Jinju 660-757, Korea

²Division of Food Science, Masan College, Masan 630-729, Korea

³Department of Food and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

The antimicrobial properties of methanolic extracts (PML) from *Prunus mume* byproducts after liquor manufacturing were measured using various putrefactive and food spoilage microorganisms. PML showed remarkable antimicrobial effects against various putrefactive and food spoilage microorganisms when used at 500 g/mL. The antimicrobial properties were stable for 30 min at 100°C and at pH 3-11. PML seems to be a natural antimicrobial agent with high effectiveness, and shows both thermal and pH stability. In addition, the mode of antimicrobial action suggests that the active components may synergistically perturb microbial membrane functions.

Key words : antimicrobial properties, *Prunus mume* byproducts, methanolic extracts, thermal and pH stability

서론

유기산, 당분, 무기성분 등을 함유하고 있는 매실(*Prunus mume*)은 장미과 낙엽활엽교목의 일종이며, 한방과 민간에서 뿌리, 잎, 꽃, 미숙과실(청매)을 건위, 지갈, 지리, 거담, 주독 해독, 피로회복, 진통, 각기병, 살균, 구토, 해열, 발한, 및 구충 등의 효과를 나타내는 한약재로 이용하고 있다(1,2). 또한, 섬유소와 무기질이 풍부하고 구연산을 비롯한 유기산이 다량 함유된 알칼리성 식품으로 간기능 회복, 당뇨병 개선, 항암작용, 순환기 질환 예방 등의 효과가 새로이 발표되었다(3). 아울러, 매실추출물의 항균 및 항산화 효과에 대한 식품 및 화장품의 적용효과들(4-8)이 꾸준히 발표

되어 오고 있다. 우리나라의 경우, 매실은 1998년에 6,784톤이 생산되었으나, 매실음료의 성공 및 그 영양성이 폭넓게 알려지면서 1999년부터 급격히 재배량이 증가하여 2002년에는 17,857톤의 매실이 생산되었다. 매실은 생식보다는 가공하여 이용하고 있으며, 생산된 매실의 가공 현황을 보면 10,684톤(전체 대비 60%)이 음료용, 5,000톤(전체 대비 28%)이 주류제조용으로 이용되었다. 최근, 매실은 주류가공 후에도 씨를 포함한 부산물 즉, 매실박이 약 20% 가량 발생되어, 2002년 경우에는 3,000톤 이상이 폐기되었다. 본 연구자들은 매실의 추출물의 항균활성(9,10)과, 매실주 제조 후 발생하는 매실박 추출물의 항산화 활성을 보고한 바 있다(11-13). 따라서, 본 연구에서는 전보(10)에서 확인된 매실추출물의 항균작용을 토대로 하여, 매실주 제조 후 발생하는 가공 부산물(매실박)의 이용성 다양화를 위한 연구의 일환으로 그 메탄올 추출물로부터 항균특성을 구명

[†]Corresponding author. E-mail : sunghcho@gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

하는 기초연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

매실박 메탄올 추출물의 제조

본 실험에 사용한 매실박은 (주)무학에서 생산하는 매실주(매실마을)를 제조 후 발생한 매실 부산물을 건조하여 이용하였다. 즉, 매실 부산물을 각각 40, 50, 60, 70, 80°C에서 4-9일간 건조한 후, 믹서기(Mixer MC-811C, (주)노비타, 한국)로 분쇄하여 65 mesh 체를 통과시킨 분말로 제조하였다. 매실박 분말 10 g에 메탄올 100 mL을 가하여 shaking incubator(상온, 100 rpm)에서 24시간 추출한 후, Whatman nylon membrane filter (0.2- μ m, Millipore filtration kit, Millipore Co., Bedford, UK)를 사용하여 여과하였다. 잔사물에 다시 100 mL의 메탄올을 가하여 같은 방법으로 여과액을 회수한 후, 1차 여과액과 합친 후 rotary evaporator (Eyela N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 35°C에서 농축하여 매실박 메탄올 추출물(Methanolic extracts of *Prunus mume* after liquor manufacturing : PML)을 조제하여 실험에 사용하였다.

항균력 시험균주

본 실험에서 PML의 항균력 검색을 위해 사용한 균주들은 일반적으로 곡류가공식품, 낙농가공식품, 육가공식품, 수산가공식품 및 기타 발효식품의 변질에 관여하는 부패미생물인 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Fusarium* sp. 등으로서 경상대학교 식품공학과에서 보관중이거나 한국중균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다. 곰팡이는 potato dextrose agar, 세균은 brain heart infusion agar (BHIA) 또는 tryptic soy agar (TSA) 등의 사면배지에 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

항균력 검사

항균력 시험은 여러 농도(50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL, 300 μ g/mL, 500 μ g/mL 및 1,000 μ g/mL 농도)의 PML로 포화시킨 paper disk를 brain heart infusion agar plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disc 확산법(14)을 이용하였다. 즉 tryptic soy agar의 사면에 배양된 공시균주 1 백금이를 취하여 10 mL tryptic soy broth에 접종하고 30°C에서 24 시간 배양한 후, 일정농도로 희석한 후 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5-8 mm BHIA 배지 표면에 접종하고 도말봉으로 균일하게 도포한 다음, 멸균된 10 mm filter paper disc(Whatman No.2)를 무처리구인 대조구를 별도로 하고,

PML 일정량을 각각 phosphate buffer로 희석시켜 PML의 농도가 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL, 300 μ g/mL, 500 μ g/mL 및 1,000 μ g/mL가 되도록 조절한 매실박 메탄올추출물 용액에서 침지 포화시킨 멸균된 10 mm filter paper disc(Whatman No. 2)를 BHIA배지위에 올려놓고, 30°C에서 48시간동안 배양한 후, disc 주위의 생육저해환의 직경을 측정하여 항균성을 비교하였다.

매실박 메탄올추출물의 미생물 생육저해 농도곡선 측정

매실박 메탄올추출물을 membrane filter(0.2 μ m)로 제균시키고, tryptic soy broth (TSB)에 여러 가지 농도단위로 첨가한 후, 각 공시 균주의 slant에서 배양된 균주 1 백금이를 취하여 10 mL tryptic soy broth에 접종, 30°C에서 24시간 동안 배양시키고, 이 배양액 0.1 mL를 취해 다시 10 mL TSB에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 배양액 0.1 mL를 여러 농도(100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL)의 매실박 메탄올추출물이 함유된 TSB배지에 접종한 후 배양하였다. 메탄올 추출물을 첨가 농도별 항균효과는 미생물의 생육정도를 UV-visible spectrometer(620 nm)로 흡광도를 측정하고, 매실박 메탄올추출물을 넣은 TSB를 blank로 사용하였다. 이와 같은 실험 결과를 이용하여 공시균주에 대하여 매실박 메탄올추출물의 생육억제를 확인하기 위하여 생육저해 농도곡선을 측정하였다.

PML의 열 및 pH 안정성 조사

PML를 처리한 대상식품의 식품공정상 열 및 pH 조건에서도 항균효과를 기대할 수 있는 열 및 pH 안정성을 확인하고자, PML의 열 및 pH 안정성을 다음과 같이 측정하였다. 이때 사용한 공시균주는 공시균주중, PML에 대한 항균성이 가장 낮고, 내구성이 가장 큰 *Klebsiella pneumoniae*를 선발하여 실험을 실시하였다. 먼저, 항균활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여, PML용액을 100°C에서 5분, 10분, 20분 및 30분 동안 열처리한 후, 시료용액으로 사용하였다. 즉, 살균 냉각한 potato dextrose agar 또는 tryptic soy agar 표면에 1,000 μ g/mL PML농도의 시험용액에 침지한 disc를 올려놓고, paper disc 확산법(12)으로 대조구와 같이 *Klebsiella pneumoniae*의 생육저해환을 측정 비교하였다. 또한 pH별 완충용액으로 PML의 pH를 3에서 11까지 조정하고 20 μ L씩을 채취하여, 배지위에 일정간격으로 위치한 paper disc에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 다음, 열안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정·비교하였다.

PML처리에 의한 미생물 세포의 전자 현미경학적 형태변화 조사

항균력이 뛰어난 PML의 처리로 인한 미생물의 세포형태 및 기능성 변화를 알아보기 위하여, 미생물에 PML을 처리하고 주사전자현미경(SEM : Scanning electron microscope, DS-130C ISI ABT)을 이용하여, Bendayan의 방법(15)에 준

하여 처리전후의 미생물 세포 구조를 관찰하였다. 이때 공시균주로는 최근 식품위생상 문제가 되고 있는 *Salmonella choleraesuis* 및 *Listeria monocytogenes*를 사용하였다. 즉, 주사전자현미경(SEM : Scanning electron microscope)의 조직표본 제작은 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde용액으로 4℃에서 2-4시간 동안 전고정하였다. 그리고 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 4℃에서 2시간 동안 후, 고정하였으며, 고정이 끝난 재료는 0.1 M phosphate buffer로 세척하고 ethanol을 이용하여 실온에서 15분 간격으로 단계별로 탈수하였다. 탈수된 조직은 critical point dryer로 건조 시킨 후, ion sputter를 이용하여 gold ion particle을 두께 20 nm로 피막을 입힌 후, 주사전자현미경(SEM : DS-130C, ISI ABT)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

매실박 메탄올추출물의 항균효과

매실가공제품을 제조 할 때 생산되는 부산폐기물인 매실박 메탄올추출물(PML)의 항균력을 측정 한 결과는 Fig. 1 및 Table 1과 같다. 즉, Fig. 1에서 보는 바와 같이 식품변패균주인 *Bacillus cereus* 및 *Fusarium sp.*를 brain heart infusion agar상에 접종하여 PML의 항균성을 검토한 결과, Gram양성균인 *Bacillus cereus*는 150 µg/mL, 곰팡이인 *Fusarium sp.*의 경우, 500 µg/mL 이상의 농도를 접종, 처리한 paper disc주위에는 균의 증식이 억제되어 clear zone을 형성함으로써, PML의 뚜렷한 항균력을 확인할 수 있었다. 아울러, 식품변패미생물중 분류별로 해당 공시균주에 대한 PML의 항균력을 동일한 방법으로 실험하여 공시균주의 생육저해환을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 즉, Table 1에서 보는 바와 같이, 매실박 메탄올추출물은 미생물의 종류에 따라

Table 1. Comparison of the growth inhibition zone diameter(mm) inhibited by different concentration of methanolic extracts (PML) from the fruit of *Prunus mume* after liquor manufacturing to the paper disc

Microorganism	Concentration (µg/mL)			
	0	250	500	1,000
<i>Bacillus cereus</i>	-	15	18	25
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	14	17	22
<i>Salmonella epidermidis</i>	-	16	20	27
<i>Krebsiella pneumoniae</i>	-	11	13	15
<i>Fusarium sp.</i>	-	12	15	18

- : No Inhibition.

다소 항균력의 차이를 나타내기는 하였으나, 공시균주에 대해 뚜렷한 생육저해환을 보여 주어 광범위한 항균력을 나타내었고, 모든 공시균주에 대하여 농도가 증가함에 따라 항균력이 증가하고 있음을 알 수 있었다. 미생물 종류별

로는 곰팡이보다 Gram(+)균과 Gram(-)균에 대해 더욱 강력한 효과를 나타내었다. 특히, *Salmonella epidermidis* 에서 생육저해환의 크기는 250 µg/mL에서 16 mm, 500 µg/mL에서 20 mm, 1,000 µg/mL에서 27 mm로 측정되어 강력한 항균력을 나타내었다.

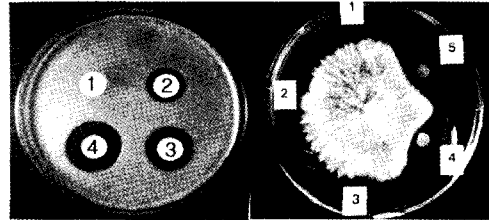


Fig. 1. Growth curve of *Bacillus cereus*(Left) and *Fusarium sp.*(Right) on the brain heart infusion agar added with different concentration of methanolic extracts (PML) from the fruit of *Prunus mume* after liquor manufacturing to the paper disc.

(Left)1 : Control, 2 : 150 µg/mL, 3 : 300 µg/mL, 4 : 500 µg/mL of PML. (Right)1 : Control, 2 : 50 µg/mL, 3 : 150 µg/mL, 4 : 500 µg/mL, 5 : 1,000 µg/mL of PML.

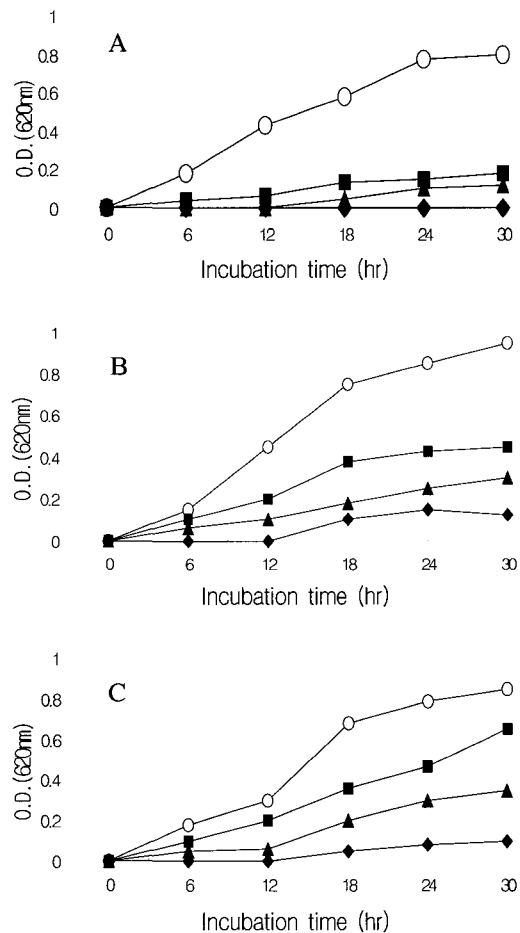


Fig. 2. Microbial growth curve in the medium containing methanolic extracts (PML) from the fruit of *Prunus mume* after liquor manufacturing.

A: *Bacillus cereus* B: *Krebsiella pneumoniae* C: *Fusarium sp.*
○: Control, ■: 100 µg/mL, ▲: 250 µg/mL, ◆: 500 µg/mL.

매실박 메탄을 추출물의 미생물 생육저해 농도곡선

매실박 메탄을추출물의 공시균주의 생육억제를 확인하기 위하여 측정한 생육저해 농도곡선은 Fig. 2와 같다. 즉, *Bacillus cereus*에서는 100 µg/mL 이상에서 생육이 완전히 억제되는 것으로 나타났으며, *Krebsiella pneumoniae*과 *Fusarium* sp. 에서는 250-500 µg/mL 이상에서 크게 생육이 억제되는 것으로 나타났다. 이 결과는 paper disc 확산법의 실험결과와 일치하는 것으로, 매실박 메탄을 추출물의 항균성을 확인할 수 있었다.

PML 함유 항균물질의 열 및 pH 안정성

PML 함유 항균물질의 열 및 pH의 안정성을 측정한 결과는 Fig. 3(Left) 및 Fig. 3(Right)과 같다. 즉, 열안정성 실험결과는 Fig. 3(Left)에서 보는 바와 같이, PML 용액을 100°C에서 5분, 10분, 20분 및 30분 동안 열처리한 후, *Krebsiella pneumoniae*와 함께 배양한 결과, 100°C에서 30분 동안 열처리에서도 PML의 항균력에 거의 변화가 없는 것으로 나타나, PML 함유 항균성분은 열에 대하여 상당히 안정한 물질임을 알 수 있었다. 아울러, PML 함유 항균성분의 pH 안정성은 Fig. 3(Right)에서 보는 바와 같이 넓은 pH범위(pH 3-11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH 안정성을 보였다. 이상의 결과를 요약하면, PML 함유 항균성분은 높은 온도와 광범위한 pH범위(pH 3-11)에서 동일한 생육저해환을 보였다. 이와같은 결과에서, 공시균주중, PML에 대한 항균성이 가장 낮고, 내구성이 가장 큰 *Krebsiella pneumoniae*에 대한 뚜렷한 PML의 열 및 pH 안정성을 확인할 수 있어, 넓은 생육 범위의 미생물에 대한 항균효과를 기대할 수 있다.

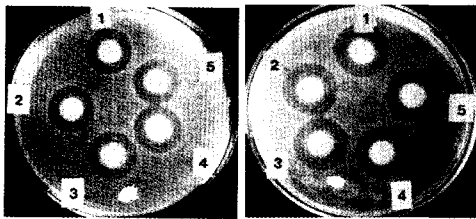


Fig. 3. Thermal(Left) and pH(Right) stability of PML on the growth inhibition of *Krebsiella pneumoniae*.

(Left) 1) not heat-treated, 2) 5 min-treated, 3) 10 min-treated, 4) 20 min-treated, 5) 30 min-treated at 100°C to PML.
(Right) 1) pH 3.0, 2) pH 5.0, 3) pH 7.0, 4) pH 9.0, 5) pH 11.0.

전자현미경을 이용한 PML처리 전후의 미생물 세포조직 및 세포형태변화

500 µg/mL의 PML용액으로 처리한 균체세포 및 포자를 처리하지 않은 대조구와 함께 전자현미경검정시료로 조제하여 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. 즉, Fig. 4의 *Salmonella choleraesuis*나 Fig. 5의 *Listeria monocytogenes*에서 보는 바와 같이 SEM에 의한 시료 촬영결과, PML처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막 파괴로 인하여 세포

형태의 변화가 뚜렷하게 관찰되었다. PML용액에 처리한 미생물 균체세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포막의 기능이 상실되는 것을 알 수 있었고, 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 세포막의 삼투조절기능의 상실로 인하여 사멸균체수가 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 미생물 균체세포에 대한 PML의 항균작용이 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서, 부패성 및 병원성 균주의 오염 가능성이 있는 식품을 PML로 예방처리함으로써, 변패성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변패현상을 억제할 수 있을 것으로 추정되었다.

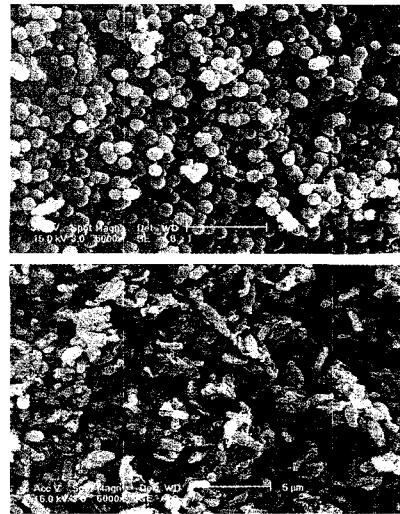


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *Salmonella epidermidis* not-treated(control : top) and treated with PML(500 µg/mL : bottom). (Magnification : x 15,000).

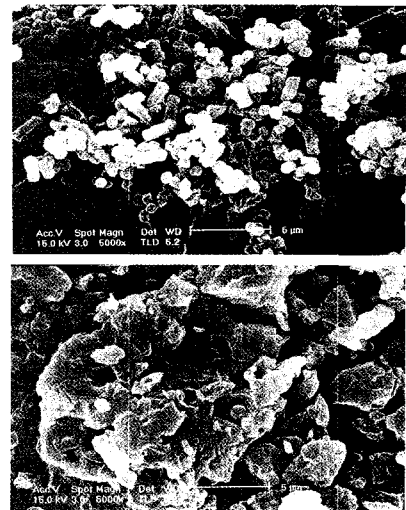


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *Listeria monocytogenes* not-treated(control : top) and treated with PML(500 µg/mL : bottom). (Magnification : x 15,000)

요 약

매실박 메탄올 추출물의 항균력을 조사한 결과, 500 µg/mL 이상의 농도에서 뚜렷한 항균활성을 보였고, 광역의 변태성 미생물들에 대하여 항균활성을 나타내었다. 또한, 매실박 메탄올추출물의 항균물질은 높은 온도(100°C)에서 30분 동안 안정하였으며, 넓은 범위의 pH(3-11)에서 안정성을 나타냈다. 따라서 매실박 메탄올 추출물의 항균물질은 항균활성이 높고, 항균 spectrum이 광범위할 뿐 아니라, 높은 온도 및 넓은 범위의 pH에 안정하여 이상적인 천연 항균제로서의 개발가능성을 제시하였다. 아울러, 매실박 메탄올 추출물의 주요 항균작용은 세포막 perturbation에 기인한 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 안덕균 (1998) 한국본초도감. (주)교학사, p.739
- 이상인 (1975) 본초학. 경희대학교 의과대학 한의학부 본초학교실. 의약사, p.157
- 장상문, 최정, 김종완, 박병윤, 박선동 (1996) 한약자원 식물학. 학문출판(주), p.427
- Bae, J.H., Kim, K.J., Kim, S.M., Lee, W.J. and Lee, S.J. (2000) Development of the functional beverage containing the *Prunus mume* extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 32, 713-719
- Kim, B.J., Kim, J.H., Kim, H.P. and Heo, M.Y. (1997) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidant activity and free radical scavenging activity. Int. J. Cosmet. Sci., 19, 299-307
- Kim, Y.D., Kang, S.H. and Kang, S.K. (1996) Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 25, 695-700
- Lee, E.H., Nam, E.S. and Park, S.I., (2002) Characteristics of curd yogurt from milk added with *maesil*(*Prunus mume*). Korean J. Food Sci. Technol., 34, 419-424
- Lee, Y.W. and Shin, D.H. (2001) Bread properties utilizing extracts of mume. Korean J. Food Nutr., 14, 305-310
- 하명희, 정준호, 조성환 (2004) 매실추출물처리기가 병원성 및 부패성 미생물 세포막의 기능성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회 정기총회 및 학술발표회. 발표초록집 p.437, P10-108, Jeju. Korea
- Ha, M.H., Park, W.P., Lee, S.C., Choi, S.G. and Cho, S.H. (2006) Antimicrobial characteristic of *Prunus mume* extract. Korean J. Food Preserv., 13, 198-203
- Jo, S.C., Nam, K.C., Min, B.R., Ahn, D.U., Cho, S.H., Park, W.P. and Lee S.C. (2005) Antioxidant activity of a methanolic extract from *Prunus mume* byproduct in cooked chicken breast meat. J. Food Sci. Nutr., 10, 311-315
- Jo, S.C., Nam, K.C., Min, B.R., Ahn, D.U., Cho, S.H., Park, W.P. and Lee, S.C. (2006) Antioxidant activity of *Prunus mume* extract in cooked chicken breast meat. Int. J. Food Sci. Technol., 41, 15-19
- Kim, T.K., Cha, M.R., Kim, S.J., Jeon, K.I., Park, H.R., Park, E. and Lee, S.C. (2005) Antioxidative activity of methanol extract from *Prunus mume* byproduct. Cancer Prev. Res., 10, 251-256
- Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J. Appl. Bacteriol., 68, 307-310
- Bendayan, M. (1984) Proein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications and limitations. J. Elect. Microsc. Tech., 1, 243-270

(접수 2007년 1월 5일, 채택 2007년 3월 30일)