

솔잎에서 향미생물 활성을 갖는 Cinnamic Acid의 분리 및 동정

국주희 · 마승진 · 박근형
전남대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Cinnamic Acid with Antimicrobial Activity from Needle of *Pinus densiflora*

Ju-Hee Kuk, Seung-Jin Ma and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

The EtOAc extracts from needles of *Pinus densiflora* showed antimicrobial activities against bacteria, yeast and fungi. The antimicrobial principle was successively purified by solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. The active substance was further purified by HPLC using C_{18} column. The active substance was identified as *trans*-cinnamic acid by MS, 1H -NMR and ^{13}C -NMR. The amount of cinnamic acid was 9.27 μ g per gram of fresh needle of *Pinus densiflora*.

Key words: needle of *Pinus densiflora*, antimicrobial activity, cinnamic acid

서 론

부패 및 병원성 미생물에 의한 피해는 여러 분야에서 직면하고 있는 심각한 문제이며 이러한 유해미생물의 증식을 억제시키기 위한 항균제로 주로 인공합성품이 사용되고 있으나, 경우에 따라 그 안전성이 문제로 제기되고 있다^(1,2). 따라서 안전성에 문제가 없는 천연의 향미생물 활성물질의 개발이 요구됨에 따라 우리나라에서 자생하고 있는 식물자원을 대상으로 향미생물 활성물질을 찾으려는 시도가 계속되고 있다⁽³⁻¹⁰⁾.

소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini)는 소나무과(Pinaceae)에 속하는 상록 교목^(11,12)으로 전국의 산지에 자생하고 있다. 솔잎은 간장질환, 위장질환, 신경계질환, 순환기계질환, 피부질환 등의 치료에 효과가 있다고 알려져 있으며^(13,14) 솔잎의 기능성에 관해서는 김 등⁽¹⁵⁾이 솔잎 첨가식이 지질대사에 미치는 영향을, 강 등⁽¹⁴⁾은 솔잎 추출물이 항변이원성과 항산화 효과가 있음을 보고하였으며, 이⁽¹⁶⁾는 솔잎 중의 항산화성 물질의 존재와 항산화활성에 대해 보고하였으며, 부 등⁽¹⁷⁾은 솔잎으로부터 프리 라디칼 소거작용이 뛰어난 항산화 성분을 분리한 바 있다.

솔잎은 옛부터 건강식품, 차 등으로 이용되어 왔으며⁽¹⁸⁾ 현재도 한방과 식품분야에서 여러가지 형태의 제품으로 활발히 이용⁽¹⁹⁾되고 있으나 일부 약리학적, 영양학적인 측면외에 항산화 활성물질에 대하여 보고가 되어 있을 뿐 솔잎에 포함된 향미생물 활성물질에 대한 연구는 없는 상태이었다.

이에 우리나라 자생식물에 함유된 향미생물 활성물질을 식품보존제 및 유용항균제로 이용하기 위한 연구의 일환으로 솔잎에 포함된 향미생물 활성물질의 탐색을 시도하여 솔잎 추출물에서 향미생물 활성물질의 존재를 확인하고 활성물질의 분리를 시도하였다. 그 결과, 극성이 다른 두종의 물질이 존재함이 확인되어 이 중 극성이 높고 다량 함유된 활성물질을 분리하여 이 물질이 benzoic acid임을 보고하였다⁽²⁰⁾.

본 연구에서는 보다 극성이 낮은 활성물질을 분리하고 이 활성물질의 본체구명을 하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

전라남도 장성군 북이면 수성리에서 자라고 있는 소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini)에서 5월 초순에 잎을 채취하여 이 중 10 kg (수분함량 50.4%)을

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Kwangju 500-757, Korea

수분함량 8.1%까지 실온에서 건조한 후 분쇄(SM 2000, Retsch, Germany)하여 시료로 사용하였다.

활성물질의 정제 및 분리

활성물질의 추출과 정제는 전보⁽²⁰⁾의 방법에 의하였다. 즉, 분쇄한 솔잎을 *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH)로 순차추출한 후 활성이 인정된 EtOAc 추출물을 *Escherichia coli* ATCC 10536와 *Streptococcus mutans* ATCC 25175를 대상으로 한 생물검정법⁽²¹⁾(paper disc방법)을 지표로 하여 solvent fractionation, *n*-hexane-EtOAc 혼합용매계에 의한 분획, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, recrystallization 등으로 순차 정제하였다.

활성물질의 분리는 재결정과정에서 침상결정을 제외한 여액을 1% acetic acid (AcOH)-MeOH (40:60, v/v) 용매계를 이용한 Delta-PAK C₁₈ column (1.9×30.0 cm)의 HPLC를 실시하여 분당 9 mL로 용출(Model 510 solvent delivery system, Waters)분획 하였으며, 검출은 UV detector (254 nm, Model 486 absorbance detector, Waters)를 이용하였다.

활성물질의 구조확인

정제된 활성물질의 구조확인을 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 기기분석을 통해 실시하였다. MS분석은 직접주입장치가 장착된 mass spectrometer (JMS-AX 505 WA, Jeol, Japan)를 이용하여 이온화(70 eV), ion source temperature 200°C의 조건으로 EI-MS분석하였다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR분석은 FT-NMR spectroscopy (Unity Plus-300, 300 MHz, Varian, USA)를 사용하여 분석하였고 용매는 CDCl₃를 사용하였으며, 내부표준물질로 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였다.

항미생물 활성 측정

항미생물활성의 검정은 paper disc (φ 8 mm, Whatman)방법⁽²¹⁾으로 측정하였다. 먼저 pour-plate method⁽²²⁾에 의해 45°C로 조절된 멸균배지 15 mL에 전배양액 0.1 mL를 micro pipette을 이용하여 무균적으로 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 9.0 cm 인 petri dish에 붓고 굳혔다. 여기에 시료의 일정 상당량을 적하하여 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85% 식염수(75 μL)로 확산시켜 세균은 37°C 또는 30°C에서 16시간, 효모는 30°C에서 16시간 그리고 곰팡이는 30°C에서 48시간 배양하여 paper disc 주위에 나타나는 생육저해환의 크기(mm)로 활성의 정도를 측정하였다. 검정미생물

중 정제과정에 사용한 *E. coli*는 Nutrient 배지(Difco), *S. mutans*는 BHI배지(Difco)를 사용하여, 37°C에서 24시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다. 그리고 기타 미생물의 배지 조성파 배양은 전보⁽²⁰⁾의 방법으로 하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리

솔잎(10 kg, 수분함량 50.4%)의 EtOAc추출물에 항미생물활성이 인정되자, *E. coli*와 *S. mutans*를 대상으로 한 생물검정법을 지표로 silica gel adsorption column chromatography, *n*-hexane-EtOAc 혼합용매계에 의한 분획, Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 순차 정제하여 결정상의 물질 6.707 g을 얻었다. 이어 *n*-hexane으로 재결정을 유도하여 다량 함유된 benzoic acid의 일부를 백색 침상결정으로 침전시켜 제외시킨 상등액을 AcOH-MeOH 용매계를 이용한 reverse phase column (Delta-PAK C₁₈)의 HPLC를 실시하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 retention time (*t_r*) 15.3분과 21.4분에 peak를 나타내 분리가 이루어졌다. *t_r* 15.3분의 물질은 benzoic acid로 확인되었으며 *t_r* 21.4분의 획분을 농축하였더니 백색의 결정상물질이 얻어졌다. 이 물질의 항미생물 활성을 Table 1에 나타냈으며, 이 활성물질의 분리과정과 각 과정에서 얻어진 활성획분의 함량을 Fig. 2에 나타냈다.

분리된 물질의 구조확인

분리된 활성물질을 EI-MS 분석을 한 결과 Fig. 3과

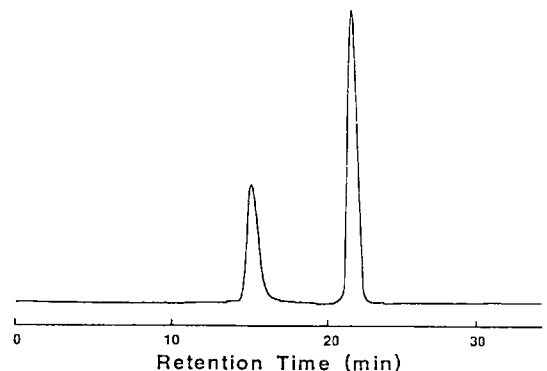


Fig. 1. HPLC chromatogram of active substances from needle of *Pinus densiflora*. Column: Delta-PAK C₁₈; mobile phase: 1% AcOH-MeOH (40:60, v/v).

Table 1. Antimicrobial activities of isolated *trans*-cinnamic acid from needle of *Pinus densiflora*

Microorganisms	Clear zone (mm)	
	0.5 mg/disc	1 mg/disc
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5638	12	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	13	14
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10	11
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	9	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1628	9	10
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	-	9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	9	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	12	15
<i>Aspergillus parasiticus</i> KCTC 6170	10	12

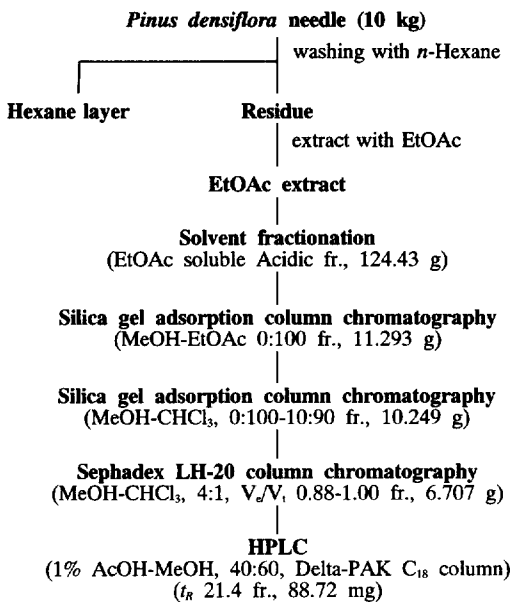


Fig. 2. Isolation procedures for antimicrobial substances from needle of *Pinus densiflora*.

같이 molecular ion (M^+)이 m/z 148에, 147이 base peak로 나타났으며, 특징적인 fragment ion이 m/z 131 ($M-17$), 103 ($M-45$), 77 ($M-71$)에 나타났다. 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과, cinnamic acid의 가능성(NIST entry No. 7861)이 시사되었다.

이어서 NMR분석을 시도하였다. $CDCl_3$ 를 용매로 사용하여 1H -NMR을 실시한 결과(Fig. 4), δ 6.47 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-2'), 7.41 (3H, m, H-3,5, H-4), 7.56 (2H, m, H-2,6), 7.80 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-1')에서 proton이 관찰되어 2개의 benzene ring proton (δ 7.41, 7.56)

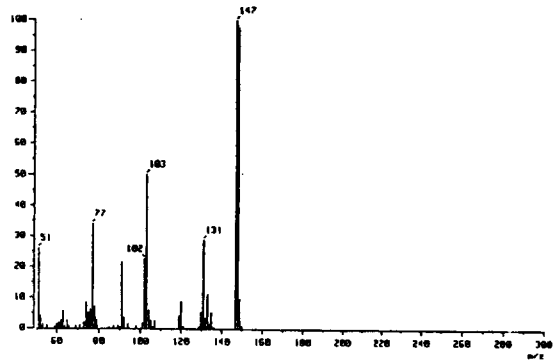


Fig. 3. Direct-EL-mass spectrum of the active substance from needle of *Pinus densiflora*.

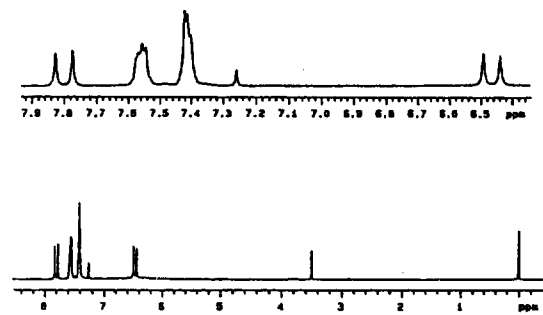


Fig. 4. 1H -NMR spectrum of the active substance from needle of *Pinus densiflora*.

과 2개의 olefinic proton (δ 6.47, 7.80)이 인정되었다. 또한 δ 6.47 및 7.80에서 관찰되는 olefinic signal의 coupling constant가 16.1 Hz인 사실에서 *trans*형임을 확인하였다.

한편 ^{13}C -NMR을 실시한 결과(Fig. 5), δ 117.34 (C-2'), 128.37 (C-2, 6), 128.98 (C-3, 5), 130.74 (C-4), 134.10 (C-1), 147.05 (C-1'), 172.07 (C-3')의 위치에서 carbon의 존재를 확인하였다. 그리고 이들 spectra는 Aldrich library spectra의 cinnamic acid (2, 1043 C)와

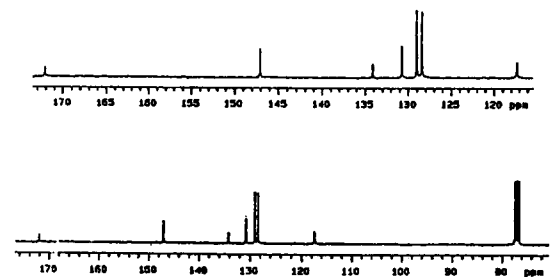


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectrum of the active substance from needle of *Pinus densiflora*.

일치하였다.

이상의 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 분석에서 얻어진 결과로부터 솔잎에서 분리된 향미생물 활성물질은 *trans*-cinnamic acid로 동정되었으며, cinnamic acid는 솔잎 생체중량 g당 9.27 µg 정도 함유되어 있었다.

이상의 연구결과, 솔잎의 향미생물활성은 benzoic acid와 함께 cinnamic acid가 공존하여 발견되고 있음이 규명되었으며, 솔잎 및 솔잎 추출물은 향미생물 활성을 갖는 기능성 소재로서 이용가능성이 강력히 시사되었다.

요 약

소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini) 잎의 EtOAc 추출물이 세균, 효모, 곰팡이에 대하여 향미생물활성을 나타냈다. 활성물질은 solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 등에 의해 정제되고 HPLC에 의해 분리되었다. 분리된 물질은 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 기기분석에 의해 *trans*-cinnamic acid로 동정되었으며 이 물질은 솔잎 생체중량 g당 9.27 µg정도 함유되어 있었다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구원 지원을 통한 한국과학재단우수연구센터의 지원에 의한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 : 수산미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지, **26**, 261 (1994)
2. 신동화 : 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용. 식품과학과 산업, **23**, 68 (1990)
3. 김선재, 박근형 : 식물성 김치재료 추출물의 향미생물 효과. 한국식품과학회지, **27**, 216 (1995)
4. 박승우, 우철주, 정신교, 정기택 : 환삼덩굴의 용매분획

5. 정대균, 유리나 : 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, **27**, 1035 (1995).
6. 한지숙, 신동화 : *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과. 한국식품과학회지, **26**, 539 (1994).
7. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 자몽종자 추출물이 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skyrin 생합성에 미치는 저해효과. 한국농화학회지, **33**, 169 (1990).
8. 마승진, 고병섭, 박근형 : 두릅수피에서 향미생물활성을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 분리. 한국식품과학회지, **27**, 807 (1995).
9. 장대식, 남상해, 최상욱, 양민석 : *Chrysanthemum*속 식물의 항균성. 한국농화학회지, **39**, 315 (1996).
10. 김창진, 강병화, 유인자, 박동진, 이현선, 김영호, 유익동 : 다양한 잡초로부터 생리활성물질의 탐색. 한국농화학회지, **39**, 409 (1996)
11. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, 서울, p.63 (1982)
12. 임경채 : 조림학본론. 향문사, 서울, p.271 (1992)
13. 신민교, 정보섭 : 향약생약대사전. 영림사, 서울, p.104 (1990)
14. 강윤한, 박용곤, 오상룡, 문광덕 : 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. 한국식품과학회지, **27**, 978 (1995)
15. 김종대, 윤태현, 최 면, 임경자, 주진순, 이상영 : 솔잎 첨가식이 가 환귀의 혈청 지방질대사에 미치는 영향. 한국노화학회지, **1**, 66 (1991)
16. 이민수 : 송엽중의 항산화성 물질에 관한 연구. 한양대학교 대학원 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원 (1985)
17. 부용출, 전체옥, 오지연 : 솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리. 한국농화학회지, **37**, 310 (1994).
18. 이정숙 : 송엽과 송화의 성장에 따른 영양성분의 변화에 관한 연구. 한양대학교 대학원 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원 (1980)
19. 황수진 : 기능성음료 개발. 식품과 위생, **8**, 56 (1995).
20. 국주희, 마승진, 박근형 : 솔잎에서 향미생물활성을 갖는 benzoic acid의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, **29**, 204 (1997)
21. Zaika, L.L.: Spices and herbs. Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*, **9**, 97 (1988)
22. Harrigan, W.F. and Margaret E.M.: Laboratory methods in food and dairy. *Microbiology, Academic Press*, p. 25 (1976).

(1997년 2월 21일 접수)