

소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 에탄올 추출물의 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균효과

임용숙[†] · 배만종* · 이신호

대구가톨릭대학교 식품공학과

*경산대학교 식품과학과

Antimicrobial Effects of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. Ethanol Extract on *Listeria monocytogenes*

Yong-Suk Lim[†], Mang-Jong Bae* and Shin-Ho Lee

Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea

*Faculty of Life Resources Engineering, Kyungsan University, Kyungsan 712-715, Korea

Abstract

To develop food preservative, antimicrobial activities of *Pinus densiflora* (PD) ethanol extract against *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* Brie I and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 were investigated. The ethanol extracts of PD showed strong antimicrobial activities on *Listeria monocytogenes*. The crude ethanol extracts of PD were further fractionated by ether, ethyl acetate and butanol. The ether fraction from ethanol extract showed the strongest antimicrobial effects on *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth containing 40 mg/mL ether fractions compared with other fractions. The effect of ethanol extract of *pinus densiflora* against *Listeria monocytogenes* culture for growth stage in tryptic soy broth at 35°C showed the strongest antimicrobial activities for lag phase. The morphological changes of the cells were observed with transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM) and the cells were injured by treatment of 40 mg/mL ethanol extract of *Pinus densiflora*.

Key words: *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. (PD) extract, antimicrobial effects, *Listeria monocytogenes*

서 론

부패 및 병원성 미생물에 의한 피해는 여러 분야에서 직면하고 있는 심각한 문제 중의 하나(1)이며 특히 *Listeria monocytogenes*(2-5)는 1980년대에 들어와 전세계에 걸쳐 집단 식중독을 일으키고 있는 병원성 식중독 세균으로 식품의 가공 및 냉장 저장 중에서도 생존, 성장하여 식중독의 발생에 관여하므로 중요한 문제점이 되고 있는 균이다. 특히 우유 관련 제품과 함께 육류, 생선 등 단백질 식품과 야채 및 각종 가공 식품에 오염되어 사람과 동물에게 유산, 패혈증 또는 화농성 뇌막염 등 Listeriosis를 일으키는 치명적인 병원성 세균으로 알려져 있다. 현재, 이러한 유해 미생물의 증식을 억제시키는 항균제로 주로 인공합성품이 사용되고 있으나, 때론 부작용을 나타내어 그 안전성이 문제가 되고 있다(6,7). 최근 소비자의 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 인공합성품의 기피 현상도 두드러지고 있어 안전성에 문제가 없는 천연 항미생물 활성물질의 개발이 요구되고 있다(8-12). 현재도 천연물(13,14)의 항균물질을 찾으려는 시도가 계속되어 오고 있

으나 아직은 빈약한 실정이다. 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)(15-21)는 소나무과(Pinaceae)에 속하는 상록 교목으로 솔잎의 성분으로는 α -pinene, β -pinene, camphene 등의 정유성분, ercetin, kaempferol 등의 flavonoid류, 수지 등이 있다. 솔잎(17-20)은 예로부터 중풍을 예방하고 간장질환, 위장질환, 신경계 질환 등에 대한 효과와 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같은 노화 관련 질환을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 항균효과 또한 뛰어난 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 천연보존료 개발의 일환으로 식품 및 식품제조환경에서 문제가 되고 있는 *Listeria monocytogenes*의 성장 억제 방안을 모색하고자 소나무 에탄올 추출물을 이용하여 식중독 세균인 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균성 여부와 농도별 성장도 검사 및 전자현미경을 통한 형태관찰 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 미국 조지아 대학 식품공학과에서

[†]Corresponding author. E-mail: jeje0103@hotmail.com
Phone: 82-53-850-3217. Fax: 82-53-850-3217

분양받은 *Listeria monocytogenes* Scott A와 *Listeria monocytogenes* Brie I 그리고, 한국중균협회에서 분양받은 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111을 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여 35°C에서 24시간 2회 계대배양하여 사용하였다.

소나무 에탄올 추출

해인사에서 채취한 소나무를 정선, 세척 분쇄하여 냉각 응축기가 설치된 삼각 플라스크에 시료와 에탄올을 1:9(W/V)의 비율로 넣고 상온에서 24시간 동안 추출한 다음, 여과시켜 얻은 액을 회전진공증발기(Heidolph WB 2000)로 최초량의 1/9로 농축하여 membrane filter(Whatman, No. 2)로 여과하고 멸균처리하여 에탄올 추출원액으로 사용하였다.

추출물의 분획

에탄올로 추출한 소나무 추출물을 methanol과 H₂O를 사용하여 녹인 후 ether 분획물, ethyl acetate 분획물 및 butanol 분획물을 사용하여 Lee와 Yim(5)의 방법에 의해 Fig. 1과 같은 방법으로 용매분획을 실시하였다.

추출물의 생육도 조사

24시간 배양한 *Listeria monocytogenes* 3균주를 소나무 에탄올 추출물을 0 mg/mL, 4 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL을 100 mL tryptic soy broth(TSB)에 접종하여 35°C에서 배양하면서 시간경과에 따른 생균수의 변화를 pour plate method (22)로 TSA에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony수를 계측하였다.

분획물의 생육도 검사

24시간 배양한 *Listeria monocytogenes* 3균주를 ether,

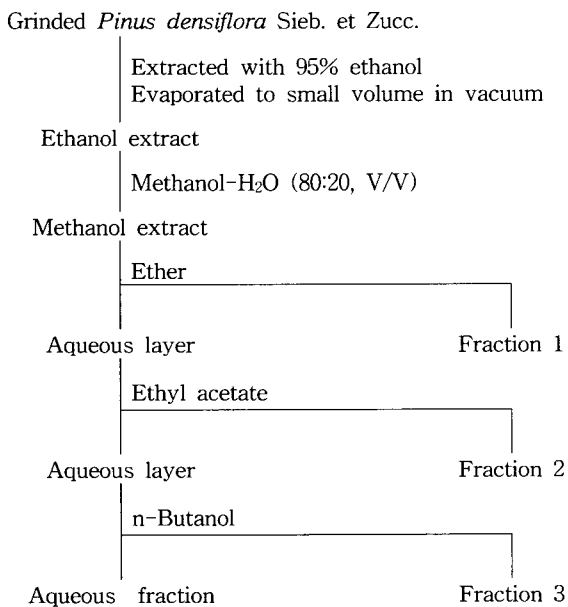


Fig. 1. Solvent fractionation from ethanol extract of *Pinus densiflora*.

ethyl acetate, butanol 분획물 40mg/mL을 100 mL tryptic soy broth(TSB)에 log 4~5 CFU/mL를 접종하여 35°C에서 12시간 배양한 후 pour plate method(22)로 TSA에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony수를 대조구와 비교하였다.

성장단계별 생육도 조사

소나무 추출물의 *Listeria monocytogenes*의 성장단계별 항균력을 조사하기 위하여 24시간 전 배양한 *Listeria monocytogenes* 3균주를 TSB에 배양하면서 4시간, 8시간, 12시간, 24시간째 각각 균주를 회수한 후 소나무 에탄올 추출물을 40 mg/mL을 100 mL TSB에 접종하여 35°C에서 3시간 배양한 후 생균수의 변화를 대조구와 비교하였다.

전자현미경에 의한 균의 형태 관찰

소나무 에탄올 추출물에 의한 세균의 손상 여부를 관찰하기 위하여 *Listeria monocytogenes* 3균주 배양액을 소나무 에탄올 추출물 40 mg/mL를 첨가시킨 100 mL TSB에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 균을 원심 분리하여, 상등액은 버리고 pellet은 0.05 M phosphate buffer(PB)에서 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 2시간 전 고정하였다. 냉장 보관된 동일한 buffer로 2~3회 세척하고 PB로 실온에서 0.5% osmium tetroxide 용액에서 1시간 후 고정을 하였다. 다시 PB로 세척한 후 2% agar로 block을 만들고 알콜 시리즈(50, 70, 80, 90, 95, 100%)를 사용하여 순차적으로 탈수시킨 다음 polybed araidite resin으로 포매하였다. 이렇게 만든 block sample을 LKB ultratome IV microtome으로 section하여 이를 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope(TEM), H-7600, Japan)으로 관찰하였다. 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope(SEM), Akashi SS-130, Japan) 관찰은 알콜로 탈수시킨 다음, isoamylacetate에 하룻밤 침지시켰다. 그 후 액체 질소를 사용하여 critical point dryer로 건조시킨 후 ion coater를 사용하여 금으로 coating시켜 SEM으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

균의 성장저해 효과

소나무 에탄올 추출물이 시험균주의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 소나무 에탄올 추출물을 농도별 0 mg/mL, 4 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL을 첨가한 TSB에 *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* Brie I, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 3균주의 소나무 에탄올 추출물 농도별 첨가에 따른 배양 시간별 성장 검사를 한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같다. *Listeria monocytogenes* 3균주의 성장 억제 정도는 균주에 따라 다소 다른 경향을 나타내었으나 4 mg/mL 첨가구는 모든 시험균주가 대조구에 비해서 전 배양기간 동안 성장 억제 경향을 나타내었으며 20 mg/mL, 40 mg/mL 첨가구는 현저한 생육 저해효과를 나타

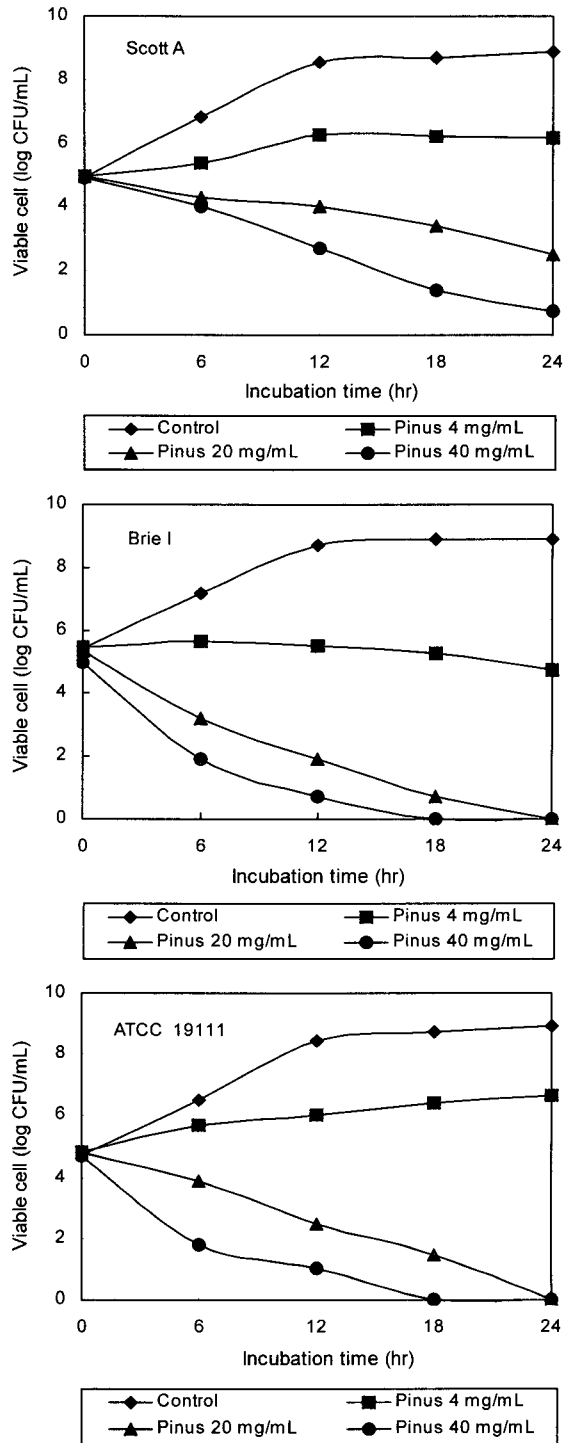


Fig. 2. Effects of ethanol extract of *Pinus densiflora* on the growth of *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth at 35°C.

냈다. 이때 첨가된 에탄올에 의한 생육저해 영향을 알아보기 위하여 실험 배지에 에탄올을 1% 첨가하여 배양한 결과 1% 에탄올에 의한 균 증식 억제현상은 나타나지 않았다. 소나무 에탄올 추출물을 다시 극성이 다른 용매 ether, ethyl acetate, butanol로 순차 분획하여 이들 각각의 분획 추출물의 항균효

과를 알아보기 위하여 분획 추출물을 TSB에 40 mg/mL 농도로 첨가하고 3균주의 *Listeria monocytogenes*를 35°C에서 12시간 배양한 후 생균수를 측정할 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 ether 분획물이 *Listeria monocytogenes* 3시험 모든 균주에 대하여 감수성은 약간 다르나 높은 항균성을 보이고 있으며 butanol 분획물은 ATCC 19111을 제외하곤 성장 억제 경향이 나타나지 않았다. 이는 균주에 따라, 분획물의 종류에 따라 항균력이 다소 상이하였으나 ether 분획물이 다른 분획물보다 시험 3균주에 대해 높은 항균력을 보였으며 ethyl acetate 분획물은 특히 ATCC 19111의 경우에 항균활성이 높게 나타났다. 천연물에서 항균성은 유효물질의 특성에 따라 용매의 추출 정도가 다른바 실험에 사용한 소나무 에탄올 추출물의 경우 항균력을 나타내는 물질은 여러 가지 물질의 복합적인 작용에 기인된다고 추정되나 유효물질이 용출되는 용매는 ether 층이 다른 분획에 비해 유효한 것으로 나타났다. 하지만 추출 성분이 어느 획분에 완전히 분리되지 않고 수개 획분에 걸쳐서 나타나기 때문에 이에 따른 좀 더 구체적인 연구가 선행되어야 할 것으로 판단되었다. 이때 첨가된 유기용매 ether, ethyl acetate 및 butanol 자체에 의한 생육저해 영향을 알아보기 위하여 실험 배지에 유기용매 ether, ethyl acetate 및 butanol을 1% 첨가하여 배양한 결과 1% ether, ethyl acetate 및 butanol에 의한 균 증식 억제현상은 나타나지 않았다. 일반적으로 ether 층에는 lipids, essential oil, 색소 등과 같은 성분이 추출되며, Lee와 Yim(4)은 오미자 추출물의 ether, ethyl acetate 및 butanol 분획물이 *Listeria monocytogenes* 3균주에 대해 강한 항균 효과가 인정되었고 보고하였다. 저온에서 성장이 가능한 식중독 병원성 미생물인 *Listeria monocytogenes*가 육이나 우유 등의 낙농제품에 오염되었을 경우 심각한 문제점을 유발시킬 수 있는 점을 고려해 볼 때 소나무 에탄올 추출물의 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 작용은 소나무 에탄올 추출물의 식품보존제로서의 사용 가능성을 확인하고 이에 대한 연구는 앞으로 좀 더 세부적인 연구가 선행되어야 할 것으로 추정되었다. 소나무 에탄올 추출물의 *Listeria monocytogenes*에 대한 항

Table 1. Effects of organic solvent fractions from ethanol extracts of *Pinus densiflora* (40 mg/mL) against *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth after 12 hours incubation at 35°C (Log No. CFU/mL)

	Incubation time (hr)	Scott A	Brie I	ATCC 19111
Control	0	4.36±0.04	4.50±0.20	4.30±0.02
	12	8.20±0.03	9.40±0.02	8.20±0.03
Ether	0	4.36±0.04	4.50±0.20	4.30±0.02
	12	3.38±0.03	5.42±0.40	0±0.02
Ethyl acetate	0	4.37±0.01	4.50±0.01	4.56±0.02
	12	8.92±0.07	8.89±0.10	5.35±0.01
Butanol	0	4.60±0.02	4.90±0.03	5.01±0.01
	12	8.62±0.03	9.51±0.07	7.11±0.04

균력이 세포의 성장 단계 중 어느 단계에서 강한가를 알아보기 위해 배양 4시간, 8시간, 12시간, 24시간째 각각 균체를 회수하여 소나무 추출물을 40 mg/mL 함유한 TSB에 접종하여 35°C에서 3시간 배양한 후 생균수의 변화를 대조구와 비교한 결과 Table 2에서 보는 바와 같다. *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* Brie I 및 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 3균주 모두 공히 4시간째 회수한 균체에서 생균수 감소 현상이 높히 확인되었으며 이는 균체의 성장 단계 중 유도기에서 대수적 증식기나 정지기보다 항균성 물질이나 외부 자극에 더욱 민감하게 작용하여 발육이 불가능하게 되어 긴 잠복기간이 필요하다고 판단되었으며 또한 소나무의 항균력이 강하게 영향을 미쳐 접종균 중 약간의 변이균이 증식하여 균의 성장이 억제 혹은 사멸하는 현상을 나타내었다고 추정되었다. 유도기는 세포가 발육을 재개할 수 있는 농도에 도달할 때까지 효소나 중간대사물질이 축적되는 시기로 소나무 추출물의 항균성물질에 의해 대사효소의 활성 억제, 단백질 합성 등에 영향을 미쳐 정상적인 세포로 성장하지 못하고 균의 성장 저해 효과가 나타난다고 판단되었다.

세포의 형태변화

소나무 에탄올 추출물을 40 mg/mL 첨가시킨 TSB에서 *Listeria monocytogenes*를 증식시켰을 경우 대조구에서는 미생물의 증식이 급격히 일어났으나 첨가구의 경우 미생물의 뚜렷한 감소 현상이 일어나는 것을 알 수 있었으며 이를 통하여 소나무 추출물이 *Listeria monocytogenes* 3균주에 대한 항균작용은 초기 접종 균주량에 비해 균이 감소되는 것으로 보아 균의 성장 억제라기보다는 살균에 기여한다는 것을 알 수 있었다. 살균에 관여하는 기작을 확인하고자 균체의 표면을 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Listeria monocytogenes* Scott A의 경우 대조구의 균체표면은 매끈하고 손상의 흔적이 없으나 처리구의 균체의 표면은 손상되었거나 형태가 이상을 일으킨 모습을 볼 수 있었으며 다른 2균주 *Listeria monocytogenes* Brie I과 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111도 같은 경향을 나타내었다. 이는 소나무 에탄올 추출물 40 mg/mL 첨가량에 의해 *Listeria*

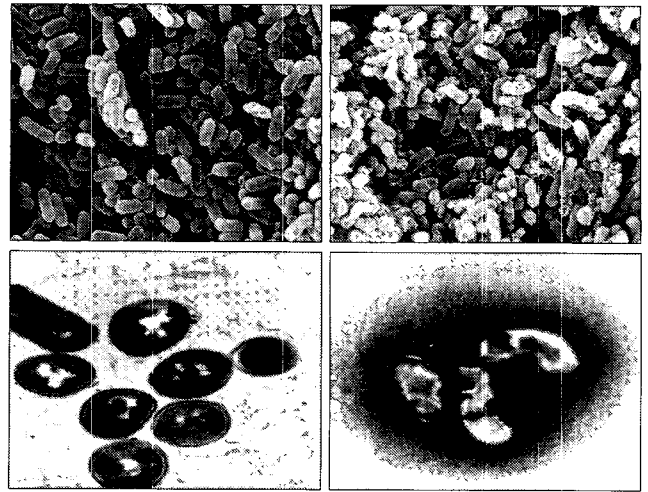


Fig. 3. Electron micrographs of *Listeria monocytogenes* Scott A.

A: Control (ethanol).

B: Ethanol extract of *Pinus densiflora* (40 mg/mL).

monocytogenes 균체에 이상을 일으키고 있음을 보여주고 있으며 Yim(3)이 오미자 에탄올 추출물 처리에 의해 *Listeria monocytogenes*의 세포막이 파괴되어 내용물이 유출되는 현상과 유사한 경향을 나타냈다.

요 약

소나무를 95% 에탄올로 추출하여 얻은 추출물을 40 mg/mL 첨가하였을 때 *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* Brie I, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 3균주의 성장이 억제되었으며 이를 다시 용매별로 순차 분획한 후 3균주에 대한 증식저해효과는 특히 ether 분획물이 높게 나타났다. 소나무 추출물 40 mg/mL 첨가에 의해 *Listeria monocytogenes* 3균주 모두 균체의 성장 단계 중 유도기인 4시간째 회수한 균체에서 높은 생균수 감소 현상이 확인되었다. 전자현미경으로 확인한 균체의 형태는 대조구의 균체표면은 매끈하고 손상의 흔적이 없으나 처리구의 균체의 표면은 손상되었거나 형태가 이상을 일으킨 모습을 볼 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1997년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다

문 헌

1. Kwak YS, Yang JY, Lee KS. 1993. Screening of herb drugs showing antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms. *J Food Hygiene and Safety* 8: 141-145.
2. Hefnawy YA, Moustafa SI, Marth EH. 1993. Sensitivity of

Table 2. The effect of ethanol extract of *Pinus densiflora* (40 mg/mL) against *Listeria monocytogenes* culture for growth stage in tryptic soy broth at 35°C (Log No. CFU/mL)

Growth stage (hr)	Incubation time (hr)	Scott A	Brie I	ATCC 19111
4	0	4.48±0.03	4.50±0.04	4.65±0.04
	3	0±0.02	2.26±0.04	2.00±0.07
8	0	4.44±0.03	4.93±0.02	4.96±0.02
	3	1.00±0.04	5.00±0.05	3.72±0.05
12	0	6.01±0.02	6.11±0.02	6.00±0.02
	3	4.04±0.01	6.80±0.04	5.29±0.05
24	0	6.22±0.02	6.02±0.05	5.89±0.03
	3	3.41±0.03	5.69±0.04	6.53±0.01

- Listeria monocytogenes* to selected spiced. *J Food Prot* 56: 876-878.
3. Yim YS. 1997. Effects of *Schizandra chinensis* extracts on the growth of *Listeria monocytogenes*. *PhD Thesis*. Catholic University of Taegu-Hyosung.
 4. Lee SH, Yim YS. 1997. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 442-447.
 5. Lee SH, Yim YS. 1998. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganisms. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 27: 239-243.
 6. Lim CM, Kyung KH, Yoo YJ. 1987. Antimicrobial effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Korean J Food Sci Technol* 19: 53-54.
 7. Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB. 1995. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 293-298.
 8. Park UK, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 91-96.
 9. Han BJ, Woo SK, Shin HK. 1995. Effects of the water extract of akebia (*Akebia quinata* Decaisne) on the growth of *Clostridium perfringens* and some intestinal microorganisms. *J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 633-638.
 10. Shin HK, Shin OH, Koo YJ. 1992. Effects of potato protein on the growth of *Clostridium perfringens* and other intestinal microorganisms. *J Appl Microbiol Biotechnol* 20: 249-258.
 11. Choi JS, Park SH, Kim IS. 1989. Studies on the active principles of wild vegetables on biotransformation of drug. *J Pharm (Korean)* 20: 117-122.
 12. Kang SK, Sung NK, Kim YD, Shin SC, Seo JS, Choi KS, Park SK. 1994. Screening of antimicrobial activity of leaf mustard (*Brassica Juncea*) extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23: 1008-1115.
 13. Oh YA, Choi KH, Kim SD. 1997. Changes in enzyme activities and growth of lactic acid bacteria in pine needle added kimchi during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 9: 75-85.
 14. Oh YA, Sae KY, Kim SD. 1997. Quality of pine needle added kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 9: 51-56.
 15. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
 16. Boo YC, Jean CO, Oh JY. 1994. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from pine needles as an antioxidative principle. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 37: 310-314.
 17. Lee YH, Shin YM, Cha SH, Chio YS, Lee SY. 1996. Development of the health foods containing the extract from *Pinus strobus* leave. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 379-383.
 18. Kim IK, Shin SR, Chung JH, Youn KS, Kim KS. 1997. Changes on the components of dongchimi added ginseng and pine needle. *Korean J Food Sci Technol* 9: 153-160.
 19. Oh YA, Choi KH, Kim SD. 1998. Changes in enzyme activities and population of lactic acid bacteria during the kimchi fermentation supplemented with water extract of pine needle. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 244-251.
 20. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 367-373.
 21. Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, Sung SK. 1998. Effect of hot water extracts of *salvia miltiorrhiza*, *Prunus persoca stokes*, *Angelica gigas nakai* and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 399-405.
 22. Vanderzant C, Splittstoesser DF. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. American Health Association. p 80.

(2001년 7월 28일 접수; 2002년 3월 6일 채택)