

솔잎착즙액의 발효에 따른 기능성 효과

박 가 영 · 리 홍 선 · 황 인 덕 · † 정 현 숙

조선대학교 자연과학대학 생명공학과

(접수 : 2006. 7. 12., 게재승인 : 2006. 10. 13.)

The Functional Effects of Fermented Pine Needle Extract

Gayoung Park, Hongxian Li, Indeok Hwang, and Hyeonsook Cheong†

Department of Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity control,

Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea

(Received : 2006. 7. 12., Accepted : 2006. 10. 13.)

Pine needle (*Pinus densiflora* sieb, et zucc) extract has been used to improve cardiovascular disorders, detoxification of nicotine, the infirmities of age and curing diseases of unidentified symptoms. It has various useful components including amino acids, vitamin C, terpenoids and chlorophyll. In this study we have identified 8 different yeast strains that are developed spontaneously causing self fermentation in the extract. The self-fermented pine extract (SFPE) inhibited the growth of some bacterial strains like *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. The SFPE (0.2 $\mu\text{l/ml}$ ~0.3 $\mu\text{l/ml}$) showed 90% NBT superoxide scavenging activities which is similar for all tested samples of different ages. The 7 years old SFPE (0.15 mg/ml and 0.3 mg/ml) caused relaxation of spontaneous contraction and relaxation rhythm of thoracic arterial tissues from rat. Therefore, SFPE has useful effects such as antibacterial, antioxidant and improved blood circulation and could be a good source of functional food development.

Key Words : Pine needle extract, self-fermentation, antibacterial activity, antioxidant, improved blood circulation

서 론

최근 식생활수준의 향상과 식생활의 다양한 변화와 더불어 인간의 음식섭취에 대한 욕구는 영양과 에너지 측면 뿐만 아니라 기호성 향상과 생체의 항상성 유지 및 생리 기능 조절 작용까지 신경을 쓰고 있다. 특히 인간의 노화 및 만성적인 질병을 일으키는 원인을 억제하거나 치유하기 위해 천연물로부터 유래하는 생리활성을 나타내는 기능성 식품의 개발에 대한 연구가 다양하게 보고되고 있다 (1). 천연물질 및 생약은 인체 내에서 식균 작용을 활성화하고, 항체의 생성을 촉진시키며, 체내 생화학적 수치들을 정상화하는 등, 질병에 대한 방어력을 증가시켜 만성질환을 예방하고 치료할 수 있도록 하며, 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역기능을 정상화시킴으로서 치료에 사용되기도 한다(2). 소나무 (*Pinus densiflora* sieb, et zucc)는 중국

이나 일본, 한국 등 전 아시아 지역의 임야에서 널리 자생하며, 솔잎은 예로부터 약리적 효능이 있어 장수와 건강을 위해 식용되어 왔으며, 오늘날 부가가치와 응용가치가 매우 높은 천연물로 알려져 있다(3-4).

솔잎의 활성 성분이며 휘발성 향생물질인 테르펜 (terpene)은 솔잎에 약 7-12% 가량 들어있고 다량의 이소프렌으로 구성되어 모노테르펜 (monoterpene), 세퀴테르펜 (sequiterpene), 디테르펜 (diterpene)이라고 불린다. 또한 솔잎은 항균, 항암, 혈압 강하, 호르몬 분비촉진, 항산화 그리고 심혈관계질환 예방 등과 같은 독특한 약리작용 효과가 있어(5-9), 아로마테라피 (aromatherapy)에 사용되기도 하고, 필수아미노산 8종을 포함해 단백질 구성 아미노산 16종을 풍부하게 함유하고 있기 때문에 신체의 성장, 활력 증강에 효과가 크며 혈액의 흐름을 좋게 하고 호르몬 분비를 왕성하게 하는 특성을 가지고 있어 노화방지와 고지혈증 및 콜레스테롤 저하에 뛰어난 효과를 나타낸다(10). 솔잎의 유효성분 중에서 비타민 C는 혈액 정화 및 항피혈병성, 스트레스에 대한 저항력을 가지고, 탄닌 (tannin)은 소화기의 기능을 돕는다. 그리고 엽록소 (chlorophyll)는 축적된 콜레스테롤을 감소시키고, 테르펜은 불포화지방산, 동맥경화의 원인이 되는 콜레스테롤을 용해시켜 혈액순환을 촉진시킨다. 또한 α -pinene, β -pinene,

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, College of Natural Science, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea

Tel : +82-62-230-6667, Fax : +82-62-224-6678

E-mail : hscheong@chosun.ac.kr

camphene, phellandrene, borneol 등의 정유를 0.3-1.3% 함유하고 있고(10), 폴리페놀류를 함유하고 있어서 항암 및 심장혈관계 질환을 감소시키는 효능을 가지고 있다(11). Eucalyptol 같은 테페노이드는 염증과 통증을 감소시킨다고 보고되었으며, 백혈병에 효능이 있는 것으로 보고되었다(12, 13). 식물에서 phenolic acids, stibenes, tannins과 같은 폴리페놀류와 플라보노이드 성분은 세균의 감염과 암 그리고 심장질환을 예방하고 감소시키는 물질임이 밝혀졌다(14, 15). *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 등 음식물로 감염되는 균은 설사, 이질, 결핵 그리고 폐렴 등을 유발하며(16-19), 때로는 치료를 위하여 사용하는 음료나 약이 오히려 소화기 장애를 일으킬 수 있다. 식물에서 추출한 천연물은 이러한 부작용이 적으며 특별히 술잎 추출물은 *Bacillus subtilis*, *Salonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*와 같은 세균의 성장을 저해한다(10, 20, 21). 이와 같은 술잎의 생리화학적 효과 및 최근 소비자들의 식품 첨가물의 안정성에 대한 인식이 증가함에 따라 합성보존료가 아닌 천연물에 존재하는 항균성 물질을 이용하여 식품보존을 대체 하려는 시도가 지속되어 왔으며, 건강기능성식품의 원료 및 음료개발 그리고 식품첨가제에도 많이 사용되고 있다(22, 23).

본 연구에서는 술잎 착즙액의 유효성분을 분석하고 저온 분리한 상정액으로 자체발효를 유도하였으며, 자체발효 중에 나타나는 미생물을 분리 동정하여 발효액의 생리적 및 약리적 변화를 비교하였다. 또한 항균, 항암 및 항산화 효능을 측정하였으며 전기 생리학적 실험을 통하여 술잎발효액이 쥐의 혈관수축 이완에 미치는 효과를 분석하여 기능성 식품으로 개발할 수 있는 가능성을 타진하였다. 술잎 착즙액의 자체발효에 우세한 이들 미생물을 이용하여 차후에 발효기간을 단축시키고 효능을 증대할 수 있는 가능성을 찾고자 한다. 또한 혈관이완 활성을 살펴봄으로써, 심근경색이나 뇌경색과 같은 혈관 수축으로 발생된 질환 및 고혈압치료 등에 활용될 가능성을 살펴보고자 하였으며, 천연 기능성 식품으로서의 응용가능성을 타진하고자 한다.

재료 및 방법

술잎착즙액 (PNE)과 술잎발효액 (SFPE) 제조

술잎은 아황산가스의 오염을 최소화하기 위해 해발 350 m 이상에서 자란 청정지역의 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만을 선별하였다. 술잎의 불순물이 녹아 나오도록 흐르는 물에 담근 후, 맑은 물이 나올 때까지 3-4회 세척하고 다시 솥을 우려낸 물로 1회 세척한다. 술잎 표면의 수분을 완전히 탈수 한 뒤 착즙기로 분쇄하여 착즙하였으며, 술잎 착즙액을 PNE (Pine Needle Extract)라 하고, 착즙된 술잎액을 4℃에서 섬유소 층과 상정액으로 저온 분리하여, 상정액만을 모아 상온에서 발효시킨 술잎 발효액을 SFPE (Self-Fermented Pine Needle Extract)라 하였다.

구성성분분석

일반성분 분석은 AOAC 방법에 준하여 실시하였다. 수

분은 적외선 수분측정장치를 이용하여, 105℃에서 가열 건조하여 무게 변화가 없는 상태를 수분 함량으로 결정하였으며, 조회분은 회화로에서 550℃에서 회화하여 무게 변화가 없는 상태를 회분 함량으로 결정하였다. 조지방은 지방 추출 장치를 (Soxhlet 원리; Petroleum ether로 추출) 이용하여 지방 추출 후, 칭량하여 그 무게를 조지방 함량으로 결정하였고, 조단백질은 시료를 황산, 분해 촉진제 등과 함께 가열하여 완전 분해 후, 증류장치를 이용해 질소량을 측정하고, 측정된 질소 함량은 단백 계수를 적용하여 단백질로 환산하여 단백질 함량을 정하였다. 엽록소분석을 위해 엽록소의 추출은 85% 아세톤으로 녹색이 없어질 때까지 추출하여 일정량으로 정용하고 이중 일부를 분획여두 (separating funnel)에서 에테르로 지용성 성분을 분획하여 에테르층은 물층을 통과시켜 아세톤을 제거하였다. 이 과정을 5-10회 반복하여 완전히 아세톤을 제거한 에테르층만을 모아 무수 아황산 나트륨으로 탈수시키고, 흡광 광도계로 엽록소의 양을 측정 하였으며, 이때 파장은 660 및 642.5 nm에서 측정하여 총 엽록소, 엽록소 a, 엽록소 b 함량을 산출하였다. 특수성분 및 미량성분분석으로 비타민 C는 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNP) 비색법은 5% 메타인산으로 추출하여, water bath에서 비색 반응 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며 HPLC 측정은, 5% 메타인산으로 추출한 후, 헥산으로 비극성 성분을 제거한 후 분석하였다. 이동상은 acetonitrile 30%, 0.05M KH₂PO₄ 70% isocratic으로 유속은 1 mL/min, column은 NH₂ column, 254 nm UV detector로 검출하였다. 구성아미노산측정은 적정량의 시료를 6 N HCl로 110℃ 항온기에서 22시간 동안 가수분해한 후, 여과 한 여액을 감압농축하여 염산을 제거하고, 증류수로 2-3회 수세하여 감압 농축하였고, 농축분은 pH 2.2 sodium citrate buffer에 정용하여 아미노산 분석기로 분석하였으며, 무기성분은 회화한 시료를 1 : 1, 1 : 3 염산 용액으로 건고시켜 안정화한 다음, 증류수로 적정량으로 정용하여, Atomic Absorption Spectrophotometer로 각 원소에 대해서 측정하였다.

술잎 발효균 분리 및 동정

SFPE의 발효가 진행됨으로써 변화하는 균의 양상을 확인하기 위하여 각 발효액을 500배 희석하여 GPYA배지에 도말하고 28℃에서 3일 경과 후, 콜로니의 모양을 형태학적으로 확인하였다. 이때 최종적으로 확인된 술잎 발효균을 여러 배지 (GPYA, Yeast malt broth, Bennett's broth, Nutrient agar, Nutrient agar + SFPE 25%)에 분주하여 28℃에서 배양함으로써 술잎 발효균이 잘 자라는 배지를 선택하였고, SFPE를 25% 첨가한 Nutrient agar에 PNE와 SFPE를 도말하여 37℃와 28℃에서 성장하는 정도를 비교하였다. SFPE에 존재하는 술잎 발효균을 동정하기 위하여 멸균한 SFPE를 25% 첨가 (5000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상정액만을 분리)한 Nutrient agar (peptone 5 g/L, beef extract 3 g/L) 배지에 SFPE를 도말한 후 배양하였다. 생성된 술잎 균주의 단일 콜로니를 선택하여 액체배지에 계대배양 하고, genomic DNA를 분리한 후, 26S rDNA D1/D2 region을 증폭하여 확인하였다. genomic DNA와

universal primer (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', 5'-GGTCCGIGTTTCAAGACGG-3')를 사용하여 이전에 알려진 조건(24)에 따라 PCR을 수행하여 5'-partial 26S rRNA (rRNA coding gene)를 증폭하였다. 증폭된 partial 26S rRNA는 PCR product purification kit (Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였다. 염기서열 결정은 Genetic analyzer 310 (Perkin-Elmer 사)을 이용하였으며 염기서열의 분석은 주로 CLUSTALW 프로그램, PHYLIP 프로그램 및 자체 개발한 프로그램을 사용하였다.

항균활성 측정

SFPE의 항균력은 디스크 확산법(25)에 의해 측정하였다. SFPE 1 (Self-fermented pine needle extract 1 year old), SFPE 4 (Self-fermented pine needle extract 4 years old), SFPE 7 (Self-fermented pine needle extract 7 years old)년의 시료를 5,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 사용하였다. 각 시료를 paper disk에 40 μ l, 80 μ l를 적신 후 *E. coli* (KTCC1932), *Bacillus subtilis* (ATCC6633)를 도말한 Nutrient agar (beef extract 3 g, peptone 5 g, bacto agar 15 g/l L)위에 올려놓고 37°C에서 배양하면서 발육저지환의 크기를 측정하였으며, *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P)는 SFPE1과 SFPE 7년의 시료를 각각 40 μ l와 120 μ l를 paper disk에 분주하여 37°C에서 배양하면서 발육저지환의 크기를 측정하였다.

항산화 활성 측정

항산화 활성은 NBT법에 의하여 시료의 Superoxide anion radical 소거능력을 측정하였다. 이 분석법은 Xanthine/xanthine oxidase system에 의해 발생하는 superoxide anion radical을 항산화제가 제거시키는 정도를 확인하는 실험으로써 Nitro Blue Tetrazolium (NBT)의 감소 정도를 통하여 항산화능력을 측정한다. 50 mM KH_2PO_4 와 50 mM KOH를 동량 섞어 만든 시약에 15 mM Na_2EDTA 를 넣어 완충액을 만든다. 15 mM Na_2EDTA 가 포함된 완충액을 96-웰 플레이트에 20 μ l를 넣는다. 각 웰에 0.6 mM NBT 50 μ l를 첨가하고, 3 mM Hypoxanthine 30 μ l를 첨가한 후, SFPE 1, SFPE 4, SFPE 7를 각 농도별로 증류수에 희석한 시료를 50 μ l 첨가하고, 1 unit의 Xanthine oxidase 50 μ l를 첨가하여 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 5분 단위로 측정하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \frac{C - S}{C} \times 100$$

S : 실험구의 흡광도

C : 시료용액대신 50 mM potassium phosphate buffer를 넣은 경우의 흡광도

혈관이완 활성에 관한 전기생리학적 분석

SFPE의 혈관이완반응을 확인하기 위해 체중 150~200 g의 흰쥐를 pentobarbital-Na (40 mg/kg, i.p.)로 마취한 후 회복하여 흉부대동맥을 적출하였다. 적출한 혈관은 실온에서 95% O_2 와 5% CO_2 로 포화된 Krebs-Ringer 용액 (NaCl 112

mM, KCl 5 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, calcium disodium ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) 0.026 mM, CaCl_2 2.5 mM, glucose 11.5 mM, pH 7.4)이 든 준비용기 속에서 혈관 내 혈액을 제거하고 미세가위를 이용하여 주위조직을 깨끗이 박리한 후 5 mm 길이의 ring 형태의 혈관절편들을 만들었다. 이 절편들을 37°C에서 95% O_2 와 5% CO_2 로 포화된 Krebs-Ringer 용액이 들어있는 15 ml 용량의 수직형 실험 용기에 옮겨 한쪽 단은 근육 고정기에 반대 단은 근수축 변환기 (force transducer, Grass FT03)에 연결하여 생리적 기록기에서 등장성 수축을 기록하였다. Bath액은 20분 간격으로 새로운 영양액으로 갈아주었으며 피동장력 (passive tension)이 3 g이 되게 절편의 길이를 늘려 주었다. 이후 1시간 정도 회복시킨 후 실험을 시행하였다(26). 수축을 유도한 뒤 SFPE를 첨가하여 등장성 수축을 기록해 혈관 이완 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

솔잎착즙액 (PNE)의 유용구성성분

솔잎 착즙액은 엽록소 a와 b를 100 g당 40.8 mg을 함유하였고, 동결건조를 했을 경우에는 178.5 mg의 높은 비율로 함유하고 있으며, 착즙액의 비타민 C 함량은 100 g당 349.0 mg이고, 동결건조를 하였을 경우 569.8 mg를 함유하고 있어서(Table 1A), 고기능성 식품으로 개발가능성을 모색할 수 있었다. 동결건조한 솔잎착즙액의 엽록소를 시금치와 비교해보았을 경우, 시금치의 엽록소 a는 82.15 mg/100g, 엽록소 b는 25.27 mg/100g인 것에 대하여 약 1.7배 높은 함량을 나타내었다(27). 또한 솔잎 착즙액이 함유하고 있는 비타민 C의 함량을 산지별로 시판중인 녹차와 비교해 본 결과, 솔잎 착즙액은 녹차 산지 중에서 가장 높은 비타민 C 함량을 보였던 보성의 257 mg/100g보다 약 1.4배 높은 함량이었다고, 동결건조를 한 솔잎 착즙액의 경우 약 2.2배 높은 비율로 비타민 C를 함유하고 있었다(28). 더불어 솔잎의 유효성분 중 비타민C는 α -tocopherol의 지질과산화 억제작용을 돕는 water-soluble peroxidation chain-breaking antioxidant로써 작용하며 이것은 구리 이온과 결합하여 효소 불활성화를 일으켜 ROS (relative oxygen species)의 활성을 억제하는 역할을 하므로(29) 솔잎은 혈액정화 및 항피혈병성, 스트레스에 대한 저항력에 대한 효과가 있을 것으로 여겨지며 특히 엽록소 또한 그 함유량이 높아 콜레스테롤 감소, 당뇨 등에 효과적일 것이라 생각된다. 솔잎 착즙액과 솔잎 착즙액을 동결 건조하여 필수아미노산을 포함한 기타 구성아미노산의 함량을 분석한 결과, Cystein은 100 g당 1.36 g, Lysine은 0.84 g, Proline은 0.83 g, Aspartic acid는 0.82 g(Table 1B) 등 우리 몸의 구성성분이 되는 필수아미노산을 풍부하게 함유하고 있으므로 항산화성유지에도 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

솔잎 발효균 분리 동정 및 배양

솔잎 자체 발효에 관여하는 솔잎 발효균을 분리 및 동

정하기 위하여 SFPE를 발효시키기 시작한 연도 별로 분리하여 존재하는 균주를 확인한 결과 *Pichia galeiformis*, *Candida boidinii*, *Pichia species*, *Candida species1*, *Candida species2*, *Candida ooidensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida karawaiewii*와 같은 8종의 균주를 확인할 수 있었다. 또한, SFPE의 발효가 진행됨으로써 달라지는 8종의 균의 양상을 확인해 보자면, 최근 2005년도에 발효시킨 SFPE 1에서는 *Pichia galeiformis*, *Candida boidinii*, *Pichia species*, *Candida species1*, *Candida species2*, *Candida ooidensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida karawaiewii*의 8종의 균이 모두 발견되었지만, 2004년에 발효를 시작한 SFPE 2, 2003년에 발효를 시작한 SFPE 3, 2002년에 발효를 시작한 SFPE 4에서는 균의 종류에 따라 발효액의 환경이 변화함에 따라 달라지는 양상을 확인할 수 있었다. 하지만, *Candida species2*를 다른 7종의 *Pichia galeiformis*, *Candida boidinii*, *Pichia species*, *Candida species1*, *Candida ooidensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida karawaiewii*균과 비교하였을 때, 우위적으로 콜로니가 많았을 뿐만 아니라, 2003년의 SFPE 3에서까지 균의 존재를 확인할 수 있었다 (Table 2A). 발효의 최종단계에서 스크린한 *Candida species2*를 GPYA, Yeast malt broth, Bennett's broth, Nutrient

agar, Nutrient agar + SFPE 25% 배지에서 배양 시켜 관찰한 결과 전반적으로 GPYA 배지에서 균주들이 잘 자랐으며 Nutrient 배지에서는 잘 자라지 않았다. 하지만 SFPE를 25% 첨가한 Nutrient agar에서 균주의 생장률이 좋아 특히적으로 솔잎의 성분을 주성분으로 사용하여 생장을 한다는 결과를 알 수 있었다(Table 2B-C). 또한, 생리학적·형태적인 분석을 위해 유사성이 가장 높은 *Candida ernobii*와 비교실험을 수행한 결과 형태적으로 모양은 구형이었다.

솔잎 발효균의 선발 과정을 통하여 선발된 *Candida species2*는 *Candida ernobii* NRRL Y-17782T 및 *Candida karawaiewii* NRRL Y-17784T와 26S rRNA D1/D2 domain에서 모두 2개의 염기서열의 차이만 보였다. 또한 *Pichia holstii* NRRL Y-2155T와 4개의 염기서열 차이를 보였고, 그 외 *Candida ishiwadae* NRRL Y-17654T와 11개의 염기서열 차이를 보여(Fig. 1), 앞으로 발효균과 기존의 미생물과의 생리·생화학적인 작용과 효율을 비교하고자 한다. PNE에 솔잎 발효 균주를 첨가함으로써, 앞선 실험에 의해 여러 효능이 입증된 좋은 SFPE로 단기간에 만들 수 있다는 가능성은 한국의 전통발효식품에서 그 예를 찾아볼 수 있다. 한 가지 비슷한 예로써 우리나라의 대표적인 조미식품인 간장의 발효에 관여하는 *Pediococcus halophilus*,

Table 1. compositions of pine needle extract (General compositions and chrolopyhll & vitamin C contents in pine needle extract by A.O.A.C. method. B. Amino acid contents in pine needle extract and freeze dried power of pine needle extract by amino acid analyser)

A.

	pine needle extract(%)	P.powder(%)
Crude Lipid	2.49±0.126	6.91±0.073
Crude Protein	3.35±0.015	11.92±0.812
Moisture	68.88±0.416	3.70±0.102
Crude Ash	1.01±0.041	1.01±0.041
Carbohydrate	4.20±0.375	14.22±1.208

	pine needle extract(mg/100g)	P.powder(mg/100g)
Chlorophyll	Chlorophyll a	108.0±0.126
	Chlorophyll b	70.5±0.812
Vitamin C	oxidative vitamin c	180.4±0.416
	reductive vitamin c	389.4±0.416

B.

Amino acids	Molecular Weight	P.powder (g/100 g)	PNE (g/100 g)
Aspartic acid	133.10	0.82	0.30
Threonine	119.12	0.39	0.14
Serine	105.09	0.34	0.13
Glutamic acid	147.13	0.55	0.21
Proline	115.13	0.83	0.33
Glycine	75.02	0.49	0.18
Alanine	89.09	0.58	0.22
Valine	117.15	0.67	0.25
Cystein	240.30	1.36	0.51
Methionine	149.21	not detected	not detected
Isoleucine	131.17	0.58	0.22
Leucine	131.17	0.58	0.22
Phenylalanine	165.19	0.12	0.06
Tyrosine	181.19	0.13	0.07
Histidine	155.15	0.50	0.31
Lysine	146.19	0.84	0.12
Ammonium chloride	53.49	0.10	0.06
Arginine	174.20	0.49	not detected

P. powder : freeze dried powder of pine needle extract, PNE : pine needle extract

*Zygosaccharomyces rouxii*와 *Torulopsis versatilis*, *Candida etchellsii*를 고정화시켜 column형 발효조를 이용하여 간장 발효기간을 단축시키는 연구를 시도한 바 있다(30). 따라서 향후에는 술잎 발효 균주를 이용해 발효 기간을 단축시킬 수 있으며 SFPE의 상품화와 대량생산 가능성을 연구하고자 한다.

Table 2. Growth condition and media screening for culturing isolated yeast strains from self-fermented pine needle extract (SFPE) (A. Cell lines come out according to self fermentation procedure of pine needle extract from 1 year to 4 years. B. Condition and isolated yeast strains from SFPE grown in different media. GPYA showed best growth than other media. No colony could be obtained from nutrient agar media, however, colony could be seen in nutrient agar media supplied with 25% SFPE. C. Screening medium and culture condition of microorganism for self fermentation from pine needle extract)

A.

Cell line	Years	SFPE 1	SFPE 2	SFPE 3	SFPE 4
<i>Pichia galeiformis</i>		18	0	0	0
<i>Candida boidinii</i>		5	3	0	0
<i>Pichia sp.</i>		3	0	0	0
<i>Candida sp1.</i>		18	0	6	0
<i>Candida sp2.</i>		27	14	43	0
<i>Candida ooidensis</i>		0	79	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		13	16	0	0
<i>Candida karawaiewii</i>		28	0	0	0

SFPE 1: Self-fermented pine extract 1 year old; SFPE 2: Self-fermented pine needle extract 2 years old; SFPE 3: Self-fermented pine needle extract 3 years old; SFPE 4: Self-fermented pine needle extract 4 years old

B.

cell	Medium					
	GPYA	YM	BA	nutrient agar	nutrient agar + SFPE 25%	
<i>candida sp.1,2</i>	+++	+++	+++	-	+++	
<i>Candida ernobii</i> (Control)	+++	++	++	-	++	

C.

source	Medium	Culture condition - 2 days	
		37 °C	28 °C
SFPE	Nutrient agar + Autoclaved SFPE (25%)	-	+
	Nutrient agar	-	-

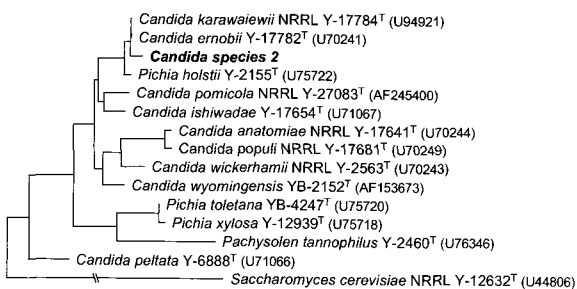
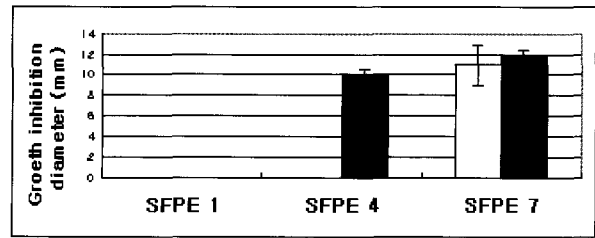
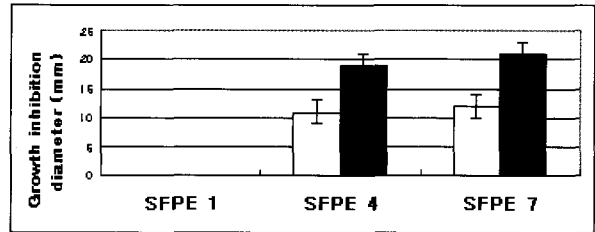


Figure 1. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the positions of strains 2 and some other related taxa, Gen Bank accession number. Scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

A. *E. coli*



B. *Bacillus subtilis*



C. *Staphylococcus aureus*

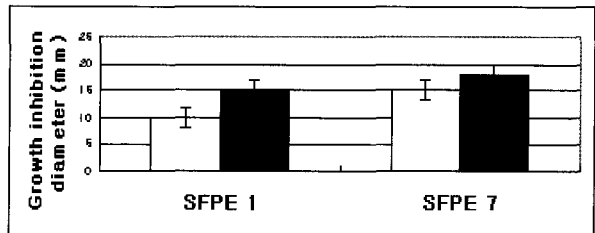


Figure 2. The antibacterial activity of self fermented pine needle extract (SFPE) tested on paper disc. A. Effect of SFPE on *E. coli* was increased with increase in self-fermentation period and dose. Treatment (40 µl white bar and 80 µl black bar) B. Effect of SFPE on *Bacillus subtilis* was increased with increase in self-fermentation period and dose. Treatment (40 µl white bar and 80 µl black bar) C. Effect of SFPE on *Staphylococcus aureus* was increased with increase in self-fermentation period and dose. Treatment (40 µl white bar and 120 µl black bar). SFPE 1: Self-fermented pine extract 1 year old; SFPE 4: Self-fermented pine needle extract 4 years old; SFPE 7: Self-fermented pine needle extract 7 years old. Treatment (40 µl white bar and 120 µl black bar).

술잎발효액의 항균활성

SFPE의 항균활성을 측정한 결과, SFPE 1의 경우 40 µl와 80 µl를 처리하였을 때는 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*에 대해서 모두 활성을 나타내지 않았다. SFPE 4는 *E. coli*의 경우 40 µl를 처리하였을 때는 활성을 나타내지 않았지만, 80 µl의 경우에는 약 10 mm의 발육저지환을 형성하였다. 또한 *Bacillus subtilis*에서는 40 µl 처리시 11 mm, 80 µl 처리시 19 mm의 발육저지환을 형성함으로써 활성을 나타내었다. 또한 SFPE 7은 *E. coli*의 경우 40 µl를 처리하였을 때는 11 mm를, 80 µl를 처리하였을 때는 12 mm의 활성을 보였고, *Bacillus subtilis*에서는 40 µl 처리시 12 mm, 80 µl 처리시 21 mm의 발육저지환을 형성하였다. *Staphylococcus aureus*의 경우에는 SFPE 1은 40 µl 처리시 10 mm, 120 µl 처리시 15 mm의 발육저지환을 형성한 반면, SFPE 7의 경우에는 40 µl 처리시 15 mm, 120 µl 처리시 18 mm의 발

육지환을 형성하였다. 전반적으로 SFPE는 *E. coli*, *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서 항균활성을 가지고 있는데, 특히 *Bacillus subtilis*에 대해서 높은 항균활성을 확인하였다. 또한 SFPE 1에서 SFPE 4, 7로 발효가 진행됨에 따라 항균활성이 높아짐을 본 실험을 통하여 짐작할 수 있었다(Fig. 2). 더불어 *Staphylococcus aureus*의 경우 식품 독성 유발균의 일종으로써 SFPE를 합성방부제 대신 천연방부제로써 사용할 수 있는 가능성에 대해서 기대해 볼 수 있다. 특히 합성방부제를 사용할 수 없는 두유, 우유 등의 제조과정이나 유통 중 잘못 또는 소비자의 음용 후 보관 잘못으로 인한 제품 변질을 최소화할 수 있는 방안으로도 기대된다(31). 솔잎의 항균성 물질을 이용하여 식품보존을 대체 하려는 시도가 지속되어 왔으며, 건강기능성식품의 원료 및 음료개발 그리고 식품첨가제로서의 방향성에 대해서도 타진해 봐야 할 것이다(22, 23).

항산화 활성

SFPE의 항산화 활성능력을 측정하기 위하여 NBT 방법에 의하여 Superoxide anion radical 소거능력을 측정한 결과 SFPE 1, 4, 7 모두 항산화능력이 높음을 확인 하였다. SFPE 1, 4, 7을 0.025 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도로 처리하였을 경우 SFPE 1은 37.5%, SFPE 4는 34%, SFPE 7은 33%의 NBT scavenging 의 활성을 보여주었고, 0.15 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도로 처리 하였을 경우에는 SFPE 1은 75%, SFPE 4는 77.8%, SFPE 7은 78%의 NBT scavenging 활성을 보여주었다. 또한 0.2 $\mu\text{l/ml}$ -0.3 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서는 SFPE 1, 4, 7이 약 90%에 달하는 NBT scavenging 의 활성을 보여주었다(Fig. 3). 이런 결과로 SFPE의 항산화 활성 능력을 확인 할 수 있었다. 활성 산소의 연쇄반응으로 효소 불활성, 세포노화, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중, 암 등의 질병을 유발하게 만드는 데(25, 32), 이들 성인병에 대한 치료는 한계가 있으므로 항산화 효과가 풍부한 SFPE의 생체조절 기능에 대한 효과를 병행하는 방법 등을 다양하게 검토해야 할 것을 실험을 통하여 확인하였다.

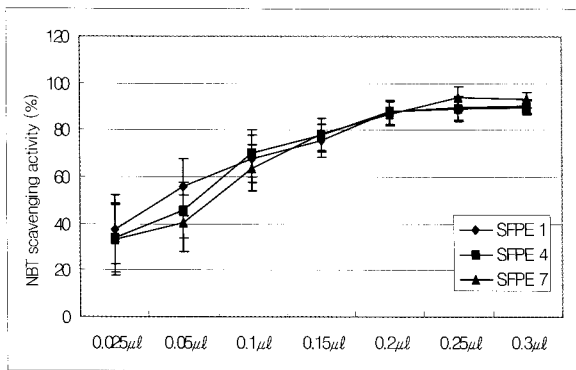


Figure 3. NBT superoxide scavenging activities of self-fermented pine needle extract (SFPE 1, 4 and 7). NBT superoxide scavenging activities of SFPE 1, 4 and 7 (0.2 $\mu\text{l/ml}$ ~0.3 $\mu\text{l/ml}$) showed 90% activities which is similar to all samples of different ages.

SFPE의 혈관이완 활성

SFPE의 혈관이완활성을 확인하기 위해 흰쥐의 흉부대동

맥 혈관절편을 이용하였다. 수축성 물질인 Phenylephrine (PE) (10^{-6} M)으로 유발된 수축반응에 대해 SFPE를 0.15 mg/ml을 첨가하였을 때 반응이 나타났으며, 다시 수축되었다가 0.3 mg/ml을 첨가하였을 때 혈관이 다시 이완된 것을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 그리고 SFPE의 혈관이완반응은 ATP-민감성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide (10^{-5} M)을 전 처리하였을 때 차단되었다. Glibenclamide (GLY)란 ATP sensitive K^+ channel (K_{ATP})를 통한 전류의 흐름과 여러 K^+ channel 개방제의 작용을 상경적으로 차단하는 K^+ channel 차단제로서(33), 이는 SFPE의 혈관 이완작용이 세포막 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화시켜 이루어짐을 시사한다 (Fig. 4B). 혈관평활근의 긴장도는 혈관평활근 세포막전위 차이에 의하기 때문에 세포막간의 이온채널의 변화는 직접적인 이완작용의 설명을 가능케 해준다. 혈관평활근의 세포막전위는 주로 Ca^{2+} 과 K^+ 이온의 유입과 유출에 의하여 좌우된다. 혈관긴장도는 막전위에 의해 조절되며 막전위 증가시 전압에 의존하는 Ca^{2+} channel인 Voltage Operated Channel (VOC)을 통하여 Ca^{2+} 이 유입되어 세포질내 Ca^{2+} 이 증가한다. 이러한 Ca^{2+} 의 증가로 수축성 단백질이 활성화되어 수축이 초래되며 이는 전기기계적으로 일치를 보인다. 한편 K^+ channel은 활성화시 세포막의 과분극을 초래하여 VOC를 통한 Ca^{2+} 의 유입이 억제되어 혈관이완을 초래한다. 이는 혈관긴장도를 조절하는데 있어 중요한 내인성 혈관이완기전이라고 한다(34). 이러한 결과에서 SFPE가 혈관이완에 미치는 효과는 임상적으로 심근경색이나 뇌경색과 같은 혈관 수축으로 발생된 질환치료 등에 실제로 활용될 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다(35).

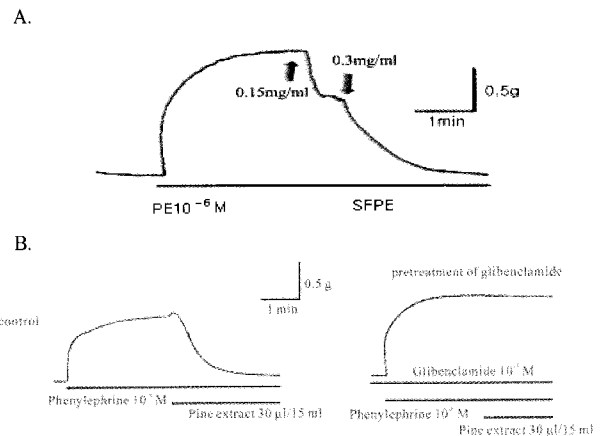


Figure 4. Relative effect of self fermented pine needle extract (SFPE) on thoracic arterial tissues from Rat A: The aortic system of rat was induced contraction using phenylephrine (PE) 10^{-6} M and showed relaxative response to 7 years old self fermented pine needle extract (SFPE 7) 0.15 mg/ml and 0.3 mg/ml treatment. B: glibenclamide (10^{-5} M) blocked the SFPE 7 induced attenuation causing ATP sensitive K^+ channel inhibition.

요 약

솔잎추출액 (PNE)은 엽록소 함유량(40.8 mg/100 g)이 높고 비타민 C도 다량함유 (149 mg/100 g)하고 있어 기능성

식품으로 개발가능성이 높으며, 술잎 발효액은 향미가 좋아지고 기능성이 높아져서 고부가가치가 크므로 발효의 조건과 활성도를 조사 분석하여 고기능성 술잎발효액(SFPE)을 개발하고자 하였다. 술잎자체발효(SFPE)에 관여하는 균을 발효단계에 따라 분리, 선별하고 동정하였다. GPYA배지에서 발효균을 스크린하여 *Pichia galeiformis*, *Candida boidinii*, *Pichia species*, *Candida species1*, *Candida species2*, *Candida ooidensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida karawaiewii*를 선별하였으며, 발효가 진행됨에 따라 2년차에는 *Candida boidinii*, *Candida species2*, *Candida ooidensis*, *Saccharomyces cerevisiae*가 선별되었고, 3년차에는 *Candida species1&2*가 선별되어 *Candida species2*가 우점종으로 나타났다. 그러나 발효 4년차에는 어떤 균도 선별되지 않았다. *Candida species2*는 *Candida ernobii*와 99.65%의 homology를 보였다. *E. coli*, *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서 SFPE를 농도별로 처리하였을 때 높은 항균활성을 확인하였다. SFPE 1, 4, 7의 항산화 활성은 0.025 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도로 처리하였을 경우 SFPE 1, 4, 7이 약 34.8%의 NBT scavenging의 활성을 보여주었고, 0.2 $\mu\text{l/ml}$ ~0.3 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서는 SFPE 1, 4, 7이 약 90%에 달하는 NBT scavenging의 활성능력을 확인할 수 있었다. 또한 전기생리학적 실험을 통하여 술잎발효액이 쥐의 혈관수축 이완에 미치는 효과를 분석한 결과 Phenylephrine (PE) (10^{-6} M)으로 유발된 수축반응에 대해 SFPE를 0.15 mg/ml과 0.3 mg/ml을 첨가하였을 때 혈관이 다시 이완되었으며, ATP 민감성 K^+ 채널 억제제인 glibenclamide (10^{-5} M)을 처리하였을 때 SFPE 7 효과가 나타나지 않은 것으로 보아 SFPE의 혈관 이완작용이 세포막 ATP-민감성 K^+ 통로를 활성화시켜 이루어짐을 확인하였다.

감 사

이 논문은 2002년도 조선대학교 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cho, Y. J. and W. N. Hou (2005), Effects of Dietary Bong-ip(*Morus alba* L.), Gam-chei(*Glycyrrhizae glabra*), Sol-ip(*Pinus densiflora*) and Dang-gi(*Angelica gigas*) on Serum Composition in Rats, *KOREAN J. FOOD CULTURE* **1**, 123-129.
2. Lee, M. K., G. P. Choi, L. H. Ryu, G. Y. Lee, C. Y. Yu, and H. Y. Lee (2004), Enhanced Immune Activity and Cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. Extracts against Human Cell Lines, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **1**, 36-42.
3. Sung, K. C. (2004), Characteristics and Analysis of Natural Pine-Needles Extract, *J. Korean Oil Chemists' Soc.* **4**, 320-326.
4. Lee, H. J., C. B. Cui, H. T. Choi, S. H. Kim, Y. A. Ham, D. S. Lee, and S. S. Ham (2005), Quality Characteristics of the Vaporized Liquid of Water-boiled Pine Needle, *Korean J. Food Preserv.* **2**, 107-111.
5. Thuneberg, L. (1982), Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemakers, *Adv Anat Embryol Cell Biol.* **71**, 1-130.
6. Sander, K. M. (1996), A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract, *Gastroenterology* **111**, 492-515.
7. Tokutomi, N., H. Maeda, Y. Tokutomi, D. Sato, M. Sugita, S. Nishikawa, S. Nishikawa, J. Nakao, T. Imamura, and K. Nishi (1995), Rhythmic Ca^{2+} currents and physiological roles of the intestinal *c-kit*-positive cells, *pnugers Archiv.* **431**, 169-177.
8. Thomsen, L., T. L. Robinson, J. C. Lee, L. A. Ferraway, M. J. Hughes, D. W. Andrews, and J. D. Huizinga (1998), Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current, *Nat Med.* **4**, 848-851.
9. Ward, S. M., A. J. Burns, S. Torihasi, and K. M. Sanders (1994), Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in murine mutants. *J Physiol.* **480**, 91-97.
10. Kim, Y. S. and D. H. Shin (2005), Volatile components and antibacterial effects of pine needle(*Pinus densiflora* S and Z.) extracts, *Food microbiology* **22**, 37-45.
11. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html> (2005)
12. Moteki, H., H. Hibasami, Y. Yamada, H. Katsuzaki, K. Imai, and T. Komiya (2002), Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line, *Oncology Reports* **9**, 757-760.
13. Kim, M. J., Y. J. Kim, H. J. Park, J. H. Chung, K. H. Leem, and H. K. Kim (2006), Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells, *Food and Chemical Toxicology* **44**, 898-902.
14. <http://www.organicashitaba.com/pc.html/> (2003)
15. Jerez, M., Selga, A., Sineiro, J., Torrens, J.L., Nez, M.J., (2005), A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition, *Food Chemistry*, Article in press.
16. Dupont, S., N. Caffin, B. Bhandari, and G. A. Dykes (2006), In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria, *Food Control* **17**, 929-932.
17. Lee, W. C., T. Sakai, M. J. Lee, M. Hamakawa, S. M. Lee, and I. M. Lee (1996), An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan, *Food Microbiology* **29**, 141-148.
18. Tsen, H. Y., H. H. Hu, J. S. Lin, C. H. Huang, and T. K. Wang (2000), Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular sub-typing methods, *Food Microbiology* **17**, 143-152.
19. Miwa, N., A. Kawamura, T. Masuda, and M. Akiyama (2001), An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology* **64**, 361-366.
20. Jeon, H. J., K. S. Lee, and Y. J. Ahn (2001), Growth-inhibiting effects of constituents of *Pinus densiflora* leaves on human intestinal bacteria, *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 403-407.
21. Koukos, P. K., K. I. Papadopoulou, D. T. Patiaka, and A. D. Papagiannopoulos (2000), Chemical composition of essential oils from needles and twigs of balkan pine(*Pinus peuce Grisebach*) grown in northern Greece, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1266-1268.
22. Choi, M. Y., E. J. Choi, E. Lee, T. J. Rhim, B. C. Cha, and H. J. Park (1997), Antimicrobial Activities of Pine Needle(*Pinus densiflora* sieb, et zucc.) Extract, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 293-297.
23. Kim, D. S., K. Y. Kim, and K. B. Lee (2002), Separation and Purification of Polyphenols from Pine Needle, *Korean Journal of Food Preservation* **9**, 74-77.
24. Yoon, J. H., S. T. Lee, S. B. Kim, W. Y. Kim, M. Goodfellow, and Y. H., Park (1997), Restriction fragment length polymorphisms analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains, *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 111-114

25. Han, S. H., N. R. Y. Woo, S. D. Lee, and M. H. Kang (2006), Antioxidative and Antibacterial Activities of Endemic Plants Extracts in Korea, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **1**, 49-55.
26. Hong, Y. G., M. S. Yang, and Y. B. Park (2005), Effect of Cumambrin A on the Relaxation of Rat Aorta, *Kor. J. Pharmacogn.* **1**, 17-20.
27. Lee, M. H., J. S. Han, and N. Kozukue (2005), Changes of Chlorophyll Contents in Spinach by Growth Periods and Storage, *Korean J. Food Cookert Sci.* **21**, 339-345
28. Kim, B. S., W. M. Yang, and J. Choi (2002), Comparison of Caffeine, Free Amino Acid, Vitamin C and Catechins Content of Commercial Green Tea in Bosung, Sunchon, Kwangyang, Hadong, *J. Kor. Tea Soc.* **8**, 55-62.
29. Yu, B. P. (1994), Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol Rev.* **74**, 139-162.
30. Ryu, B. H., K. J. Cho, Y. J. Chae, and S. H. Jin (1993), Continuous Rapid Fermentation of Soy Sauce by Immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 Using Column Type Reactor, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 366-372.
31. Cho, K. H. and S. G. Park (2005), Antibacterial Effects on *Bacillus Stearothermophilus* by Adding Natural Grapefruit Seed Extracts in Soymilk, *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **16**, 139-143.
32. Yoo, J. H., J. Y. Cha, Y. K. Jeong, K. T. Chung, and Y. S. Cho (2004), Antioxidative Effects of Pine (*Pinus densiflora*) Needle Extracts, *J. Life Sci.* **14**, 863-867.
33. Ko Suk Tai (2001), Influence of Cromakalim, K⁺ Channel Opener, and Glibenclamide, K⁺Channel Blocker, on Intestinal Movements in Rabbit, *The Journal of Applied Pharmacology* **9**, 237-243.
34. Okabe, K., K. Kitimura, and H. Kuriyama (1987), Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery, *Pflugers Arch.* **409**, 561-568.
35. Kim, H. H., N. H. Cho, W. G. Kim, S. J. Lee, I. D. Yu, D. K. Ahn, and H. Y. Choi (2003), Vasodilation Effect of Drypetes Rhizoma and It's Various Fractions on Isolated Rat Thoracic Aorta and Abdominal Aorta, *Kor. J. Herbology* **1**, 127-131.