

Verification of Antimicrobial Activities of Various Pine Needle Extracts against Antibiotic Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*

Nam-Young Kim, Min-Kyung Jang, Myung Je Jeon, Dong-Geun Lee, HyeJi Jang, Seung Woo Lee, Mihyang Kim¹, Sung Gu Kim² and Sang-Hyeon Lee*

Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

²Bioport Korea Co., Marine Bio-industry Development Center, Ilkwang-myeon, Kijang-gun, Busan 619-912 Korea

Received March 20, 2010 / Accepted April 13, 2010

We investigated antimicrobial activities of various pine (*Pinus densiflora*) needle extracts against antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Hot water extract showed the highest antimicrobial activity against normal and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), however, it exhibited no antimicrobial activity against penicillin resistant *S. aureus* (PRSA). Hot water-hexane (HWH), hot water-ethanol (HWE), hexane, and ethanol extracts showed antimicrobial activity against *S. aureus*, PRSA and MRSA. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of HWH, HWE, hexane, and ethanol extracts were 0.05, 0.05, 0.5 and 5 mg/ml, respectively, and HWH and HWE extracts showed the strongest antimicrobial activity among these extracts. Antimicrobial activities of pine needle extracts were stable after heating at 121°C for 20 min. These results suggested that pine needle extracts can be used as an effective natural antimicrobial agent for food and medical industries.

Key words : Antimicrobial activity, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), penicillin resistant *Staphylococcus aureus* (PRSA), pine needle

서 론

국가 경제의 급속한 성장에 따른 경제·사회적 환경의 변화와 생활 방식의 변화로 최근 국민 식생활 수준이 향상되었다. 특히, 식품 산업이 발달함에 따라 식품의 유통 및 저장과정에서 발생하기 쉬운 식품의 부패나 변질의 원인이 되는 미생물의 증식을 억제하기 위한 연구가 계속되고 있다[3,11].

식품의 변질을 방지하기 위한 방법으로 가열처리나 레토르트(retort) 등의 살균기술을 이용한 물리적인 방법과 식품의 저장 및 유통과정 중에 부패 및 변질을 일으키는 미생물을 사멸시키거나 증식을 억제시키는 식품보존제를 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있으나, 이러한 방법들은 식품의 영양성분 파괴 및 품질저하 등을 유발하는 단점을 가지고 있다. 식품보존제는 화학합성 보존제와 천연물로부터 항균성 물질을 분리하여 이용하는 천연 보존제로 나눌 수 있으며, 이 중 화학합성 보존제는 장기간 섭취할 경우 이들이 체내에 축적되면서 돌연변이나 기형을 유발하는 등의 안전성 문제가 있기 때문에 인체에 해가 적은 천연물로부터 항균성 물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있다[27,32]. 천연 항균물질에는 전통적으로 사용해 온 소금, 식초 등 일반 식품소재 외에도 동·식물 및 미생물 등에서 유래한 것들도 많이 보고되고 있다[6]. 현재

상품화되어 있거나 항균성이 알려진 천연물질로는 계란에 함유된 conalbumin, avidin, 우유의 lactoferrin 및 발효유의 bacteriocin과 같은 단백질이 있다[1,2,4,12,28]. 식물에 존재하는 항균물질의 대부분은 alkaloid, flavonoid, terpenoid, phenolic compound, quinone 및 volatile oil 등의 이차대사 산물이거나 그 유도체들로 알려져 있으며, 이들 항균물질은 추출 용매에 따라 항균활성에 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다[21,24].

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 황색색 색소를 생성하고 용혈성을 가지며 coagulase를 생성하는 종으로, 농양이나 창상감염 등의 피부감염, 골관절염, 폐렴, 패혈증, 독소쇼크증후군 등을 일으키는 병원성이 높은 유해세균으로 알려져 있다[15]. 1940년대 초반에 황색포도상구균 감염증의 치료를 위해 항균력이 우수한 penicillin, methicillin 등의 항생제를 사용하여 왔으나, 1940년대에 후반에 일부 황색포도상구균이 penicillin에 대하여 내성을 나타내기 시작하였다. 1950년대에 들어와서는 tetracycline, chlororamphenicol 및 erythromycin에 대하여 내성을 나타내는 황색포도상구균이 출현하였으며, penicillin에 대하여 내성을 나타내는 황색포도상구균에 효과적으로 작용하는 항생제인 methicillin이 사용된 지 2년 후인 1961년에는 영국에서 methicillin에 대하여 내성을 나타내는 methicillin 내성 황색포도상구균(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)이 보고되었다[10]. 그 이후 MRSA의 출현빈도는 계속 증가하고 있으며, MRSA 감염증으로 인한 사망자의 비율 또한 1993년에 12%에서 2002년에 66%로 급증하였다. MRSA

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

는 일반 황색포도상구균과 달리 methicillin에 내성을 지닐 뿐만 아니라 cephalosporin, ampicillin, nafcillin 등과 같은 β -lactam 계열 항생제를 비롯하여 aminoglycoside 및 macrolides 계열의 항생제에 대해서도 내성을 지니고 있어 MRSA 감염증 치료에 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다[15].

우리나라에서는 1980년대에 들어서면서 여러 병원에서 MRSA의 존재를 보고하고 있고 황색포도상구균의 methicillin에 대한 내성률은 약 50%로 매우 높으며, 대부분의 대학병원과 종합병원에서 분리되는 내성균주 중 황색포도상구균이 차지하는 비율이 70~80%에 이르는 실정이다[19]. 최근 들어 항생제 내성 균주의 발생에 관한 우려가 없으면서 항생제를 대신할 수 있는 천연물질을 이용한 항균활성물질의 개발이 활발히 진행되고 있으며, 녹차[33], 단삼[25], 가자[14], 갯[16], 자초[30] 등이 항생제 내성균주에 대해 항균력을 나타낸다고 보고되었다.

소나무(*Pinus densiflora*)는 상록성 침엽수로서 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 지역의 임야에 널리 자생하고 있어, 저비용으로 손쉽게 솔잎을 얻을 수 있는 장점이 있다. 예로부터 솔잎은 말려서 가루로 만들어 떡과 같은 음식을 만들 때 첨가하거나 차나 한증욕의 재료로 사용하는 등 민간에서 널리 사용되어져 왔다[27]. 솔잎에 함유되어 있는 flavonoid, alkaloid, lignan, 유기산류 등은 혈청 콜레스테롤 저하효과[23], 항당뇨 효과[20], 지질저하 및 항산화효과[5], 항균 효과[29]가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 솔잎 추출물을 첨가한 돈육 patty의 품질 특성[26], 솔잎 발효액의 첨가에 의한 전병의 저장성 향상[7] 및 솔잎즙을 첨가한 우육포의 저장 중 품질변화 방지[13] 등 솔잎의 식품첨가제로서의 기능에 관한 연구가 보고되어 있다.

본 연구에서는 식품에 합성 보존제를 첨가함에 따른 소비자들의 건강에 대한 우려를 극복하고 문제점을 보완하며 식품의 저장기간 및 상품성을 동시에 확보할 수 있는 천연물 유래의 식품보존제 및 항생제 대체 소재의 개발에 활용할 수 있도록 다양한 추출방법에 의해 확보된 솔잎 추출물들의 황색포도상구균 및 MRSA에 대한 항균활성을 검증하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

항균활성 측정에는 그람양성 대표세균인 *B. subtilis* (ATCC 6633), 그람음성 대표세균인 *E. coli* (KCTC 2223), 황색포도상구균(*S. aureus*) 표준균주(ATCC 33594), penicillin에 대하여 내성을 나타내는 PRSA (penicillin resistant *S. aureus*, ATCC 13301), methicillin에 대하여 내성을 나타내는 MRSA (methicillin resistant *S. aureus*, ATCC 33591, ATCC 33593)를 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양받아 사용하였다. 생장배지로는 *B. subtilis*와 *E. coli*는 Luria-Bertani

배지(LB 배지, 10 g bacto tryptone, 5 g yeast extract, 50 g NaCl, 증류수 1 l)를 사용하였고 황색포도상구균 표준균주, PRSA 및 MRSA는 nutrient 배지(30 g beef extract, 50 g peptone, 증류수 1 l)를 사용하였다.

추출물 제조

본 실험에 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 물로 세척하고 60°C에서 열풍건조한 후 믹서로 분말화하였으며, 체를 이용하여 균질한 분말시료로 만들어 추출용 시료로 사용하였다. 적송잎 추출물은 추출방법에 따라 열수hexan 추출물(Hot water-hexane, HWH), 열수에탄올 추출물(Hot water-ethanol, HWE), hexan 추출물, 에탄올 추출물, 열수 추출물로 준비하였다(Fig. 1). 열수, hexan, 에탄올 추출물들은 건조시킨 적송잎 분말 3 kg에 각각 물, hexan, 에탄올 4 l를 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 정치하여 추출하는 과정을 총 2번 반복하였다. 열수hexan, 열수에탄올 추출물은 적송잎 분말 3 kg에 물 4 l를 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 추출한 뒤 남은 잔류물을 수거해 건조시킨 후 여기에 각각 hexan 또는 에탄올 4 l를 첨가하여 60°C에서 12시간 동안 추출하였다. 모든 추출물은 여과지(Whatman No 3, England)로 여과한 다음 rotary evaporator로 60°C에서 농축한 후 동결 건조하였고 항균활성 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

항균활성 측정

추출물의 항균활성 측정은 paper disc법으로 실시하였다. 각 균주는 4 ml 액체배지에 접종하여 37°C에서 18시간씩 3회 계대 배양한 뒤 시험균 농도를 650 nm에서 optical density (O.D) 값이 0.5가 되게 한 후 agar 배지 전면에도말하고 배지 표면 위에 지름이 6 mm인 멸균 disc를 고정시켰다. 동결건조한 추출물을 최종 농도가 0.05, 0.5, 5, 50 mg/ml가 되게 dimethylsulfoxide (DMSO)로 녹이고, membrane filter (0.45 μ m)로 제균시킨 후 5 μ l씩 disc에 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 항균작용에 의해 형성된 생육저해환(clear zone)을 비교·관찰하였다.

최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

최소저해농도 측정은 paper disc법을 이용하여 수행하였다. 여과하여 제균시킨 추출물을 0.005 mg/ml에서 50 mg/ml의 범위에서 paper disc에 첨가한 후 건조시키고, 시험균을 도말한 평판배지 위에 놓은 후, 37°C에서 24시간 배양시켜 항균작용에 의해 생육저해환(clear zone)을 형성하는 최소농도를 MIC로 결정하였다.

적송잎 추출물의 열안정성 측정

적송잎 추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 50 mg/ml 농

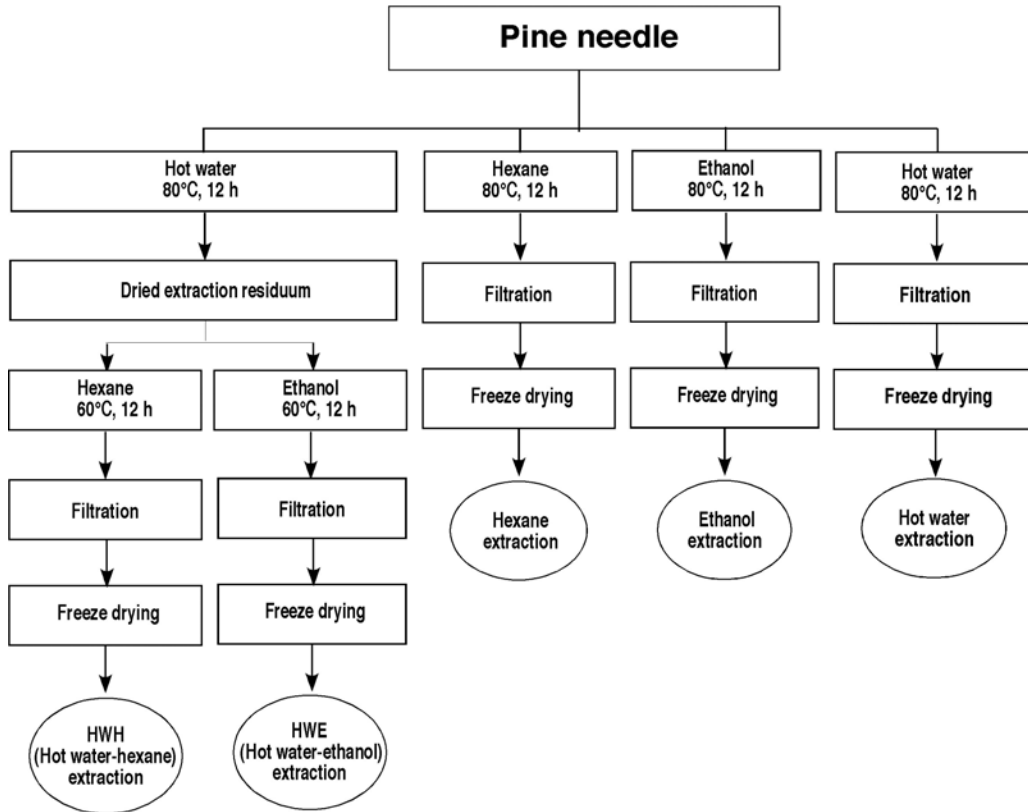


Fig. 1. Schematic diagram of the extraction processes of pine needles.

도로 희석한 시료를 80°C에서 60분, 100°C 및 121°C에서 10분 및 20분간 열처리한 후 paper disc법을 이용하여 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

추출공정에 따른 적송잎 추출물의 수율

적송잎 건조분말 시료 3 kg을 추출공정에 따라 열수헥산(HWH), 열수에탄올(HWE), 헥산, 에탄올, 열수 추출물로 제조한 결과, 에탄올 추출물이 17.6%로 가장 높은 수율을 보였고, HWH 추출물이 3.9%로 가장 낮은 수율을 나타냈다(Table 1). 또한, 헥산 추출물은 12.6%, HWE 추출물은 14.6%로 비슷한 수율을 보였으며, 열수 추출물의 경우 6.1%로 다소 낮은 수율을 보였다(Table 1). 본 연구진의 이전 연구에서도 에탄올 추출

물이 가장 높은 수율을 나타냈으며, HWH 추출물이 가장 낮은 수율을 나타냈다[18].

적송잎 추출물의 항균활성

적송잎 추출물의 항균활성을 검토하기 위해 HWH, HWE, 헥산, 에탄올 및 열수 추출물의 균주들에 대한 항균력을 측정 한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 사용한 모든 추출물들은 공통적으로 그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli*)에 대한 항균활성은 나타내지 않았고, 열수 추출물은 황색포도상구균 표준균주와 methicillin 내성균주인 MRSA에 대해서만 항균활성을 보였다. HWH, HWE, 헥산 및 에탄올 추출물들은 그람양성 대표세균인 고초균(*B. subtilis*), 황색포도상구균 표준균주 및 항생제 내성균주인 PRSA와 MRSA 모두에 대해 항균활성을 나타냈다. 적송잎 추출물 처리농도가 증가함에 따라 항균활성을 나타내는 생육저해환의 크기가 비례적으로 증가하는 것으로 보아 농도 의존적으로 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

열수 추출물의 경우는 비록 고초균과 PRSA에 대한 항균활성은 나타내지 않았지만, 황색포도상구균 표준균주와 MRSA에 대해서는 50 mg/ml의 농도에서 약 33 mm, 5 mg/ml의 농도에서 약 21 mm의 생육저해환을 보여 가장 높은 항균활성을 나타냈다(Table 2). 천연물질의 황색포도상구균 및 MRSA

Table 1. Yields(%) of various pine needle extracts

Extracts	Yields (%)
HWH	3.9
HWE	14.6
Hexane	12.6
Ethanol	17.6
Hot water	6.1

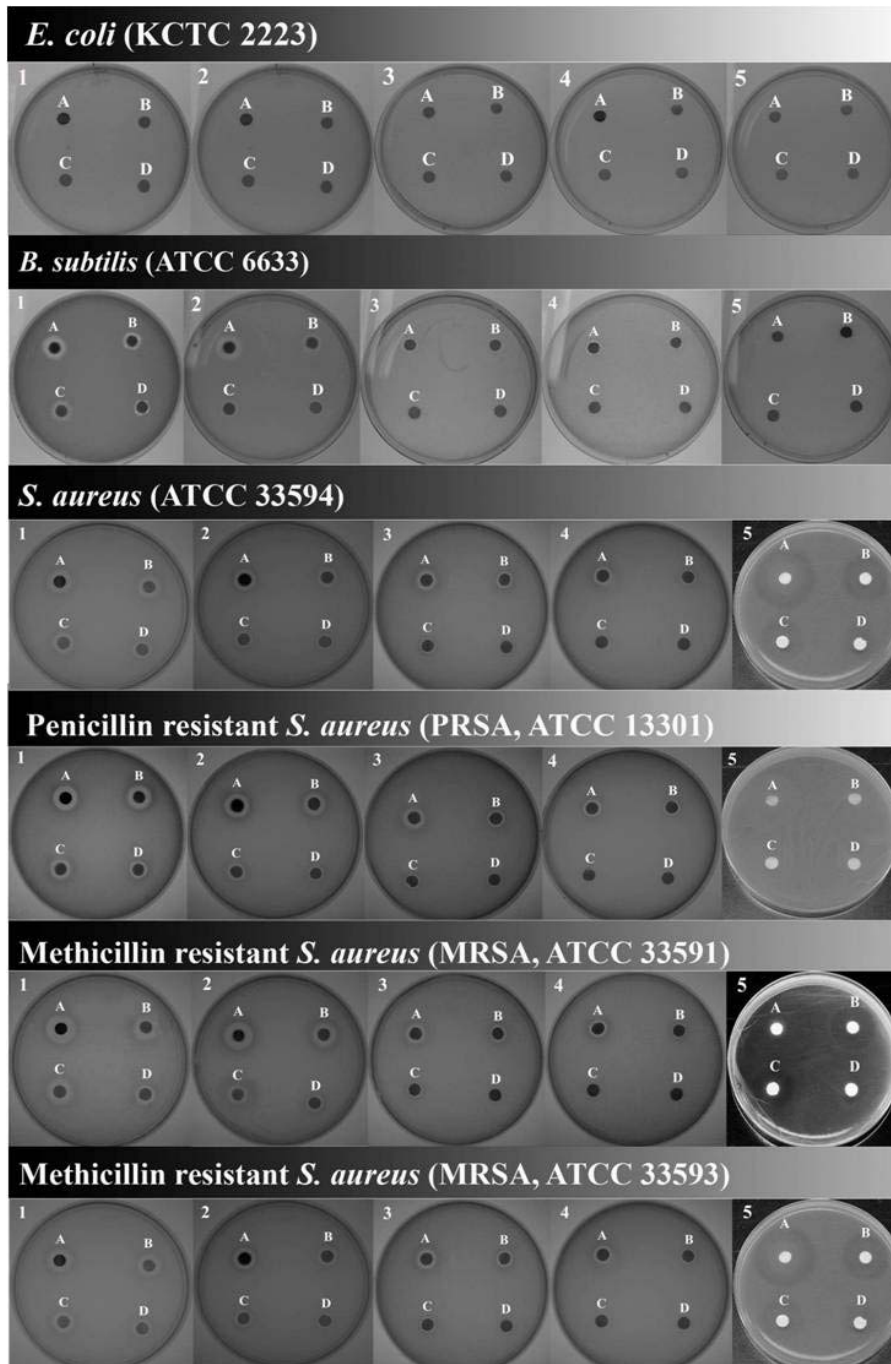


Fig. 2. Antimicrobial activities of various pine needle extracts. 1: HWH extract, 2: HWE extract, 3: hexane extract, 4: ethanol extract, 5: hot water extract, A: 50 mg/ml, B: 5 mg/ml, C: 0.5 mg/ml, D: 0.05 mg/ml.

에 대한 항균활성의 연구에 따르면 로즈마리의 메탄올 추출물은 5 mg/disc의 농도에서 17.5 mm의 생육저해환을 나타냈고 [9], 비파 잎의 에탄올 추출물은 5 mg/disc의 농도에서 16.5 mm의 생육저해환을 나타내었으며, 비파 잎 열수 추출물은 5 mg/disc의 농도에서 15 mm의 생육저해환을 나타냈다[22]. 본 연구에서의 disc당 열수추출물의 양과 생육저해환의 크기로 환산하면 0.25 mg/disc에서 33 mm, 0.025 mg/disc에서

21 mm로 로즈마리[9]와 비파추출물[22]에 비해 최소 20배, 최대 200배 이상의 높은 항균활성을 보였다. 한약재 8종의 황색 포도상구균에 대한 항균활성에 관한 연구 결과, 소목 및 오배자의 메탄올 추출물은 50 mg/ml의 농도에서 21 mm의 생육저해환을 보였고, 황금의 메탄올 추출물은 50 mg/ml 농도에서 16 mm의 생육저해환을 나타냈다[8]. 이들의 연구결과는 모두 본 연구에서 사용한 열수 추출물보다 유사하거나 낮은

Table 2. Antimicrobial activities of various pine needle extracts

Extracts	Concentrations (mg/ml)	Clear zone on plate (mm) ¹⁾					
		Strains					
		<i>E. coli</i> (KCTC 2223)	<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>S. aureus</i> (ATCC 33594)	PRSA ²⁾ (ATCC 13301)	MRSA ³⁾ (ATCC 33591)	MRSA (ATCC 33593)
HWH	50	- ⁴⁾	12.12±0.07*	13.12±0.30*	13.72±0.13*	15.32±0.33*	13.20±0.30*
	5	-	11.52±0.14*	10.52±0.27*	13.46±0.26*	12.80±0.30*	11.66±0.17*
	0.5	-	9.66±0.17*	9.32±0.17*	9.66±0.17*	10.20±0.17*	9.66±0.17*
	0.05	-	2.60±0.12*	8.66±0.17*	8.32±0.17*	7.34±0.17*	8.32±0.17*
	0.005	-	-	-	-	-	-
HWE	50	-	11.86±0.07*	12.00±0.13*	13.00±0.29*	14.12±0.52*	14.12±0.07*
	5	-	10.86±0.23*	10.8±0.21*	11.60±0.14*	11.00±0.28*	8.34±0.17*
	0.5	-	8.66±0.09*	8.00±0.08*	11.20±0.16*	9.32±0.17*	8.34±0.17*
	0.05	-	1.80±0.10*	8.66±0.17*	7.32±0.17*	8.00±0.08*	7.32±0.17*
	0.005	-	-	-	-	-	-
Hexane	50	-	8.14±0.07*	12.00±0.07*	9.32±0.24*	11.00±0.28*	10.00±0.09*
	5	-	7.00±0.09*	10.80±0.21*	7.86±0.07*	8.32±0.17*	8.14±0.06*
	0.5	-	-	8.00±0.16*	7.00±0.13*	7.20±0.10*	7.00±0.05*
	0.05	-	-	8.66±0.17*	-	-	-
	0.005	-	-	-	-	-	-
Ethanol	50	-	7.14±0.08*	8.34±0.16*	9.32±0.17*	8.32±0.17*	8.20±0.10*
	5	-	6.13±0.09*	7.00±0.19*	7.52±0.26*	7.32±0.17*	7.00±0.13*
	0.5	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-
	0.005	-	-	-	-	-	-
Hot water	50	-	-	32.00±1.73*	-	39.32±1.52*	29.20±1.53*
	5	-	-	23.32±1.15*	-	18.00±1.73*	22.00±1.00*
	0.5	-	-	16.66±0.57*	-	16.00±1.00*	16.60±0.58*
	0.05	-	-	-	-	-	-
	0.005	-	-	-	-	-	-

Five μ l of extract was used at each concentration for the determination of antimicrobial activity. Results are represented as mean \pm SEM for three samples. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post hoc test * p <0.001 compared with DMSO treated samples. ¹⁾mm: disc diameter (6 mm) was not included, ²⁾PRSA: penicillin resistant *S. aureus*, ³⁾MRSA: methicillin resistant *S. aureus*, ⁴⁾-: no clear zone was observed.

항균활성을 보였으며, 메탄올 추출물은 식품이나 의약품 소재 및 첨가물로의 사용이 엄격히 금지되어 있다.

열수 추출물을 제외한 추출물들 중에는 HWH와 HWE가 비교적 높은 항균활성을 보였다. HWH와 HWE 추출물은 50 mg/ml의 농도에서는 모두 약 13 mm의 생육저해환을 나타냈으며, 5 mg/ml의 농도에서는 모두 약 11 mm의 생육저해환을 나타냈다. 헥산 추출물은 50 mg/ml의 농도에서는 약 10 mm의 생육저해환을 나타냈으며, 5 mg/ml의 농도에서는 약 8 mm의 생육저해환을 나타냈다. 에탄올 추출물은 50 mg/ml의 농도에서 약 8 mm의 생육저해환을 나타냈으며, 5 mg/ml의 농도에서는 약 7 mm의 다소 낮은 생육저해환을 나타냈다.

본 연구팀의 이전 연구에서 적송잎에는 폴리페놀 화합물인 proanthocyanidin이 다량 함유되어 있으며, HWH 추출물이 가장 높은 항산화 활성을 보인다고 보고하였다[18]. 본 연구결과로 적송잎에 함유된 항균활성 성분이 황색포도상구균 및

항생제 내성균주인 PRSA와 MRSA에 대하여 높은 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

적송잎 추출물의 최소저해농도(MIC)

Paper disc법을 이용한 항균활성 측정결과를 바탕으로 적송잎 추출물에 감수성을 나타내었던 고초균, 황색포도상구균 표준균주 및 항생제 내성균주인 PRSA와 MRSA에 대한 최소저해농도를 측정한 결과를 Table 2에 나타냈다. HWH 추출물과 HWE 추출물의 최소저해농도는 모두 0.05 mg/ml로 추출물 중 가장 낮은 농도에서 세균의 생육을 저해하였고, 헥산 추출물과 열수 추출물은 HWH 및 HWE 추출물보다 10배 높은 농도인 0.5 mg/ml의 농도에서 세균의 생육을 저해하였으며, 에탄올 추출물은 가장 높은 농도인 5 mg/ml의 농도에서 세균의 생육을 저해하였다.

Table 3. Heat stabilities of various pine needle extracts

Extracts (50 mg/ml)	Temperature/ time (°C/min)	Clear zone on plate (mm) ¹⁾					
		Strains					
		<i>E. coli</i> (KCTC 2223)	<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>S. aureus</i> (ATCC 33594)	PRSA ²⁾ (ATCC 13301)	MRSA ³⁾ (ATCC 33591)	MRSA (ATCC 33593)
HWH	80/60	- ⁴⁾	12.12±0.32*	13.22±0.24*	13.32±0.13*	15.62±0.15*	13.20±0.21*
	100/10	-	12.23±0.05*	13.43±0.14*	13.16±0.16*	15.45±0.28*	13.24±0.14*
	100/20	-	12.53±0.19*	13.32±0.17*	13.22±0.19*	15.23±0.13*	13.16±0.17*
	121/10	-	12.60±0.17*	13.18±0.19*	13.52±0.13*	15.56±0.08*	13.30±0.19*
	121/20	-	12.17±0.21*	13.44±0.21*	13.24±0.22*	15.41±0.05*	13.53±0.24*
HWE	80/60	-	11.43±0.08*	12.20±0.22*	13.33±0.29*	14.53±0.21*	14.22±0.07*
	100/10	-	11.52±0.21*	12.14±0.15*	13.42±0.14*	14.33±0.14*	14.16±0.07*
	100/20	-	11.21±0.07*	12.32±0.11*	13.21±0.16*	14.51±0.19*	14.52±0.21*
	121/10	-	11.28±0.13*	12.54±0.07*	13.11±0.07*	14.11±0.09*	14.13±0.17*
	121/20	-	11.43±0.21*	12.11±0.09*	13.32±0.09*	14.67±0.05*	14.32±0.22*
Hexane	80/60	-	8.14±0.07*	12.22±0.09*	9.13±0.14*	11.22±0.17*	10.11±0.13*
	100/10	-	8.00±0.13*	12.36±0.21*	9.22±0.09*	11.35±0.09*	10.13±0.05*
	100/20	-	8.34±0.37*	12.22±0.07*	9.07±0.21*	11.38±0.08*	10.00±0.07*
	121/10	-	8.33±0.13*	12.37±0.22*	9.31±0.22*	11.30±0.19*	10.16±0.13*
	121/20	-	8.21±0.09*	12.29±0.19*	9.28±0.20*	11.27±0.28*	10.22±0.20*
Ethanol	80/60	-	7.67±0.07*	8.54±0.06*	9.52±0.07*	8.42±0.20*	8.22±0.12*
	100/10	-	7.88±0.16*	8.61±0.09*	9.59±0.15*	8.62±0.16*	8.10±0.18*
	100/20	-	7.66±0.21*	8.69±0.13*	9.62±0.19*	8.92±0.11*	8.20±0.11*
	121/10	-	7.80±0.15*	8.49±0.22*	9.68±0.21*	8.76±0.09*	8.31±0.09*
	121/20	-	7.59±0.09*	8.59±0.07*	9.62±0.09*	8.88±0.07*	8.35±0.07*
Hot water	80/60	-	-	30.50±0.22*	-	37.59±0.28*	27.50±1.53*
	100/10	-	-	30.77±0.30*	-	37.32±0.52*	27.88±1.00*
	100/20	-	-	31.21±0.19*	-	36.87±0.38*	26.37±0.58*
	121/10	-	-	29.55±0.19*	-	37.89±0.76*	28.57±0.68*
	121/20	-	-	30.89±0.36*	-	36.87±0.07*	27.72±0.07*

Five µl of extract was used for the determination of antimicrobial activity. Results are represented as mean±SEM for three samples. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post hoc test **p*<0.001 compared with DMSO treated samples. ¹⁾mm: Disc diameter (6 mm) was included, ²⁾PRSA: penicillin resistant *S. aureus*, ³⁾MRSA: methicillin resistant *S. aureus*, ⁴⁾-: No clear zone was observed.

적송잎 추출물의 열 안정성

대부분의 가공식품들은 기호성이나 저장성을 높이기 위해 열처리 공정을 거치는 경우가 많기 때문에 열에 안정한 항균성 식품첨가제의 개발이 필요하다. 적송잎 추출물에 함유되어 있는 항균성 물질의 열 안정성을 조사하기 위해 각각의 용매 추출물들을 열처리한 후 고초균, 황색포도상구균 표준균주 및 항생제 내성균주인 PRSA와 MRSA에 대한 생육저해환을 측정 한 결과를 Table 3에 나타냈다. 열처리 시료의 피검균에 대한 생육저해환의 크기가 대조균인 비열처리 시료의 생육저해환의 크기와 비교하여 볼 때 크기 변화가 거의 없는 것으로 보아 적송잎 추출물의 항균물질은 열에 대하여 안정한 물질임을 알 수 있었다. Kim [17] 등의 보고에 의하면 손바닥 선인장 분말을 121°C에서 15분 처리하여도 항균활성의 변화가 없었다고 하였으며, Park [31] 등은 돌산갓의 열수 추출물을 121°C에서 30분 처리하여도 항균활성에 변화가 없다고 보고하였다. 본 연구결과로 적송잎 추출물에 함유되어 있는 항균물질을 이용하여 열 안정성이 있는 항균성 식품첨가제의 개발이 가능

할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성 사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

References

1. Akashi, A. 1971. Preservative effect of egg white lysozyme of Vienna sausage. *Jap. J. Zootech Sci.* **42**, 289-295.
2. Ashton, D. H. and F. F. Busta. 1968. Relief of casein inhibition of *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium, and magnesium. *Appl. Environ. Microbiol.* **16**, 628-635.
3. Bae, J. H. 2004. Antimicrobial effect of *Pulsatilla koreana* extracts on food-borne pathogen. *Korean J. Nutr.* **37**, 655-661.
4. Bellamy, W., H. Wakabayashi, and S. Shimamura. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent anti-

- microbial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 92-105.
5. Busserolles, J., E. Gueux, B. Balasinska, Y. Piriou, E. Rock, Y. Rayssiguier, and A. Mazur. 2006. *In vivo* antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) barks in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **77**, 22-27.
 6. Cho, M. H., E. K. Bae, S. D. Ha, and J. Y. Park. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci. Ind.* **38**, 36-45.
 7. Choi, D. M., S. K. Chung, and D. S. Lee. 2007. Self life extension of steamed bread by the addition of fermented pine needle extract syrup as an ingredient. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 616-621.
 8. Choi, I., J. Y. Cho, and S. C. Lim. 2006. Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Plant Res.* **19**, 491-496.
 9. Choi, J. H., M. H. Yu, E. Y. Hwang, and I. S. Lee. 2009. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. fractions on antimicrobial activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and resistant genes regulation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 541-547.
 10. Choi, O. K., Y. C. Noh, and S. Y. Hwang. 2000. Antimicrobial activity of grape fruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J. Dietary Culture* **15**, 9-15.
 11. Chung, K. S., J. Y. Kim, and Y. M. Kim. 2003. Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 540-543.
 12. Joerger, M. C. and T. R. Klaenhammer. 1990. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticus. *J. Bact.* **172**, 6339-6347.
 13. Jung, I. C., S. P. Park, K. S. Lee, and Y. H. Moon. 2008. Changes in the quality of beef jerky containing additional pine needle or mugwort juice during storage. *J. Life Sci.* **18**, 63-68.
 14. Kang, H. M., J. S. Moon, G. C. Jang, J. M. Kim, M. D. Song, and S. Y. Yang. 2005. Antibacterial effects of *Terminalia chebula* extract against major pathogens and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bovine mastitis milk. *Korean J. Vet. Res.* **45**, 113-119.
 15. Kang, M. W. and Y. R. Kim. 1993. Infection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Chemother.* **11**, 17-26.
 16. Kang, S. K., Y. D. Kim, and S. K. Park. 1995. Effect of antimicrobial of leaf mustard (*Brassica juncea*) extract on compositions and leakage of cellular materials in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 280-285.
 17. Kim, H. N., D. H. Kwon, H. Y. Kim, and H. K. Jun. 2005. Antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var *saboten* Makino methanol extract. *J. Life Sci.* **15**, 279-286.
 18. Kim, N. Y., M. K. Jang, D. G. Lee, K. H. Yu, H. J. Jang, M. Y. Kim, S. G. Kim, B. H. Yoo, and S. H. Lee. 2010. Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts. *Nutr. Res. Pract.* **4**, 16-22.
 19. Kim, S. M., H. Lee, K. R. Peck, J. H. Song, J. W. Yang, J. H. Jin, H. J. Pai, M. D. Oh, and K. W. Choe. 1997. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from 3 different hospitals in Korea. *Korean J. Infect. Dis.* **29**, 453-462.
 20. Kim, Y. M., Y. K. Jeong, M. H. Wang, W. Y. Lee, and H. I. Rhee. 2006. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* **21**, 756-761.
 21. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 200-204.
 22. Lee, K. I. and S. M. Kim. 2009. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 267-273.
 23. Lee, Y. H., S. H. Shin, Y. S. Choi, and S. Y. Lee. 1996. Development of the health foods containing the extract from *Pinus strobus* leave. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 379-389.
 24. Mitscher, L. A., Y. H. Park, and D. Clark. 1980. Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobial isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var *Typica*. *J. Nat. Prod.* **43**, 259-269.
 25. Mok, S. J., U. Y. Park, Y. M. Kim, and D. S. Chang. 1997. Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae radix* (*Salvia miltiorrhiza*) extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 224-228.
 26. Nam, J. H., H. I. Song, C. K. Park, Y. H. Moon, and I. C. Jung. 2000. Quality characteristics of pork patties prepared with mugwort, pine needle and fatsia leaf extracts. *J. Life Sci.* **4**, 326-332.
 27. Namba, T. 1980. Colored Illustrations of WAKAN-YAKU. Vol II, pp. 82-83, Hoikusha Publishing Co., LTD, Osaka, Japan.
 28. Oram, J. D. and B. Reiter. 1968. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochem. Biophys. Acta.* **170**, 351-365.
 29. Park, H. G., M. R. Cha, J. H. Hwang, J. Y. Kim, M. S. Park, S. U. Choi, H. R. Park, and Y. I. Hwang. 2006. Antimicrobial activity of the extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. *J. Life Sci.* **16**, 989-993.
 30. Park, N. H. and S. H. Lee. 2003. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of *Vibrio*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 185-190.
 31. Park, S. K., J. R. Park, S. W. Lee, K. I. Seo, S. K. Kang, and K. H. Shim. 1995. Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard Dolsan (*Brassica juncea*). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 707-712.
 32. Park, U. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 91-96.
 33. Yeo, S. G., C. W. Ahn, I. S. Kim, Y. B. Park, Y. H. Park, and S. B. Kim. 1995. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 293-298.

초록 : 다양한 적송잎 추출물의 항생제 내성 황색포도상구균에 대한 항균활성 검증김남영 · 장민경 · 전명제 · 이동근 · 장혜지 · 이승우 · 김미향¹ · 김성구² · 이상현*(신라대학교 생명공학과, ¹신라대학교 식품영양학과, ²(주)바이오포트 코리아)

병원 내 감염의 주된 원인균으로 알려진 황색포도상구균(*S. aureus*)과 항생제 내성 황색포도상구균(PRSA, MRSA)에 대해 항균활성이 우수한 천연 항균성 물질을 검색하기 위해 적송잎을 대상으로 열수-헥산(HWH), 열수-에탄올(HWE), 헥산, 에탄올 및 열수 등으로 획득된 추출물들로 항균활성을 조사하였다. 헥산, 에탄올, 열수-헥산, 열수-에탄올 추출물들은 그람양성 대표세균인 고초균(*B. subtilis*), 황색포도상구균 표준균주, 항생제 내성균주인 PRSA 및 MRSA에 대해서 항균활성을 나타내었으며, 특히 MRSA (ATCC 33591) 균주에 대해 다른 균주들 보다 높은 항균활성을 나타냈다. 열수 추출물은 황색포도상구균 표준균주 및 MRSA에서만 항균활성을 나타냈지만, 항균활성은 가장 높아 50 mg/ml의 농도에서 33 mm의 생육저해환을 나타냈다. 각 균주들에 대한 생장의 최소저해 농도(MIC)는 HWH 및 HWE 추출물이 모두 0.05 mg/ml의 농도로 가장 낮았고, 열수추출물이 0.5 mg/ml의 농도였으며, 에탄올 추출물은 5 mg/ml의 가장 높은 농도를 나타냈다. 모든 추출물들은 121°C에서 20분간의 열처리 후에도 항균활성이 유지되었으므로 열에 대해 안정한 물질임을 알 수 있었다. 본 연구결과로 식품산업에서 솔잎 추출물을 천연 항균제로 사용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.