

마늘로부터 추출한 Alliin-Alliinase 반응물질의 항미생물성

신동선 · 이영춘
중앙대학교 식품공학과

Aantimicrobial Activities of Alliin-Alliinase Reation Compounds Extracted from Garlic

Doung-Sun Shin and Young-Chun Lee

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract

The reaction stability and antimicrobial activities of alliin and alliinase extracted from garlic were studied and the results are summarized as follows. The optimum pH and temperature of alliinase extracted from garlic bulbs were 6.0 and 37°C, respectively. Alliinase held the maxmum activity for 10 mins. at the optimum temperature, and was relatively stable for 30 min. The activity decreased significantly after 35 mins. at 37°C. The antimicrobial activities of alliin-alliinase reaction compounds varied among micro-organisms. MIC of the alliin-alliinase reaction compounds were 0.13-1.0% against Gram positive bacteria, 1.0-1.5% against Gram negative bacteria, 0.3% against yeasts, and 0.3-0.5% against molds.

Key words: antimicrobial activity, alliin, alliinase, garlic

서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과의 *Allium*속에 속하는 작물로, 주성분은 fructosan이라는 수용성 fructose 중합체인 탄수화물 70%, 단백질 20%, 섬유소 30%, 회분 3.4%으로 이루어져 있다. 그리고 마늘의 향유 성분은 diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, divinyl sulfide등이 있으며(Nock, 1987), 이들 성분은 allicin의 분해산물로 항미생물성에 중요한 역할을 한다.

마늘의 주된 항미생물성 성분인 allicin은 allyl 2-propenethiosulfinate의 화학구조를 가졌으며, 이는 생마늘에 들어 있는 것이 아니라 마늘에 상처를 입혔을 때 마늘에 전구체로 들어있는 alliin (S-allyl-L-cysteine sulfoxide)이 alliinase 효소에 의해 allicin으로 분해된다(Arthur stoll, 1949; 1951). 마늘에는 alliin 이외에 S-methyl-L-cysteine sulfoxide 등이 함

유되어 있고 이 역시 alliinase에 의해 미생물 생육 저해작용이 있는 methyl methanethiosulfinate로 분해된다.

본 연구에서는 마늘을 천연보존제로 사용하여 식품의 품질수명을 연장하고자하는 시도의 기초연구로 alliin과 alliinase를 마늘로부터 각각 추출하여 반응 안정성을 조사하고, 선정된 미생물에 대한 항미생물성을 측정 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 마늘은 서산 마늘로 산지에서 직접 구입하여 외피를 제거한 후 PE백에 넣어서 -70°C의 냉동고에 보관 하였다. 이것을 4°C에서 해동한 후 물기를 제거하고 시료로 사용 하였다.

Alliin추출

Alliin추출은 Stoll (1951)과 George (1975)의 방법을 개량하여 사용 하였다. 마늘 1 kg을 121°C의 autoclave에서 20분간 증숙하여 75% ethyl alcohol로

Corresponding author: Young-Chun Lee, Dept. food Sic. & Tech., Chung-Ang Univ., Naeri san 40-1, Daeduk-myun, Ansong, Kyungi-do 456-756, Korea. Phone: 82-31-676-2451, Fax: 82-31-675-4853. E-mail: leeyc@post.cau.ac.kr

추출한 후 감압 여과 하였다. 이 여액을 45°C에서 감압 농축한 후 분획여두에서 ethylether를 가하여 분획한 후 45°C에서 다시 감압 건조 하였다. 이 분말을 150 mL의 증류수로 용해하고 1500 mL의 ethyl alcohol을 가하여 잘 혼합한 후 24시간 정치하여 탄수화물을 제거 하였다. 이를 원심분리한 다음 상등액을 감압 건조하여 미황색 분말을 얻었다. 다시 이것을 소량의 증류수로 용해하고 4°C에서 냉각한 ethyl alcohol를 첨가하여 진탕시킨 후 정치하여 잔사를 99% ethyl-alcohol로 여러번 세척한 다음, 감압 건조기에서 건조한 다음 acetone을 사용하여 2회이상 재결정하여 4.5 g의 결정성 alliin를 얻었다. 이를 분취한 alliin의 효소적 반응에 의해 생성된 pyruvate의 생성량을 통하여 확인하였으며, -70°C에 보관하여 실험에 사용 하였다.

Alliinase 추출

Mazelis (1968)등의 방법을 이용하여 마늘 200 g에 10% glycerol, 5% NaCl, 0.05% 2-mercaptoethanol, 1mM penly methyl sulfonyl fluoride을 포함한 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5)용액을 200 mL 가하여 균질기(JANKE & KUNKEL, ULTRA-TURRAX T50)로 약 3분간 균질화 하였다. 이것을 4겹의 cheesecloth로 여과하여 4°C, 10,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 상등액에 1% protamine sulfate 30 mL을 혼합한 후 15분 동안 정치 하였다. 이것을 다시 4°C, 10,000 rpm으로 30분 원심분리하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate으로 33% 되도록 4°C에서 30분간 천천히 교반하면서 포화시켰다. 이 현탁액을 4°C, 10,000 rpm으로 30분 동안 원심분리 하였다. 이때 침전된 단백질을 10% glycerol, 1mM PMSF를 포함한 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)용액 25 mL에 용해한 후, 25 μ M pyridoxal-5-phosphate를 함유한 상기 buffer용액을 사용하여 ammonium sulfate를 최소화하기 위하여 4°C에서 36시간 동안 투석 하였다. 이 투석액을 10,000 rpm, 4°C으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 멸균된 0.2 μ m membrane filter로 2회 여과한 후 효소의 불활성화를 방지하기 위하여 -70°C에서 보관 하였다.

Alliinase 활성 측정 및 기질의 농도 결정

Alliinase의 활성은 Friedmann (1943)의 방법을 개량하여 측정 하였다. 즉, pyridoxal-5'-phosphate 25

μ M, 10 mM alliin이 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 2 mL내에 함유되도록 조제한 후 alliinase을 100 μ L 넣어 잘 혼합한 후 35°C에서 10분 동안 반응시키고 10% TCA용액을 3 mL 첨가하여 반응을 정지 시켰다. 이 반응액을 1 mM에 10% TCA용액을 2 mL 가하여 35°C 항온수조에서 10분 동안 반응 시킨 후, 2 N HCL에 0.1% 2,4-dinitrophenyl hydrazine용액 1 mL을 첨가하여 5분 동안 반응시키면서 3 mL의 ethyl acetate를 첨가하고 2분 동안 혼합 시켰다. 상등액에 6 mL 10% sodium carbonate를 넣고 2분 동안 반응 시킨 후, 미리 30°C의 항온수조에 넣어둔 tube에 즉시 용액의 하층부로부터 5 mL을 취하여 옮겼다. 이에 1.5 N NaOH 5 mL을 첨가한 후 5분 동안 반응 시키면서 red~orange red로 나타나기 시작하면 420 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의해 pyruvate의 생성을 확인 하였다. 1분에 1 μ mole pyruvate를 생성시키는 효소량을 1 unit로 정하였다.

Alliin의 양을 결정하기 위하여 alliinase 100 μ L를 일률적으로 첨가하고 기질의 양이 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 2 mL에 포함하도록 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM로 달리하여 pyruvate양을 측정 하였다.

pH와 온도가 alliinase 활성에 미치는 영향 및 최적온도에서의 안전성

pH는 2~12까지 각각 조절하여 pyruvate 생성량을 측정하였다. 온도가 alliinase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C의 온도를 선정하여 pyruvate 생성량을 측정하였다. 최적온도에서 alliinase의 안정성을 측정하기 위해서 pH는 6.5로 하고 온도는 37°C로 선정하여, 10분 동안 반응시킨 후 5분 간격으로 반응을 정지시켜 60분 동안 경시적으로 pyruvate양을 측정 하였다.

Alliin-alliinase 반응물질의 항미생물성 측정

본 실험에 사용된 균주에 따른 배양배지 및 배양 조건은 Table 1과 같으며, 항미생물성 측정을 위하여 세균과 효모는 Hisae (1993)과 Lorian (1986)등의 액체배지희석법으로 실시 하였다. 시험관에 배지를 5 mL씩 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 각각 여과한 alliin-alliinase 혼합물을 각 농도별로 첨가한 것을 처리구로 하고 첨가하지 않은 것을 대조

Table 1. List of microorganisms and culture conditions used to determine antimicrobial activities

Microorganisms	Media	Culture conditions
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1021)	LB ¹ (LBA ²)	37°C, 24 hr
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	LB(LBA)	37°C, 24 hr
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 2715)	LB(LBA)	37°C, 24 hr
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2344)	LB(LBA)	37°C, 24 hr
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 35150)	LB(LBA)	37°C, 24 hr
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	LB(LBA)	37°C, 24 hr
Yeasts		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KCCM11666)	YM ³ (YMA ⁴)	27°C, 48 hr
<i>Candida utilis</i> (KCCM 11750)	YM(YMA)	27°C, 48 hr
Molds		
<i>Aspergillus niger</i> (KCCM 11478)	PD ⁵ (PDA ⁶)	27°C, 72 hr
<i>Aspergillus flavus</i> (KCCM 60130)	PD(PDA)	27°C, 72 hr

LB1: Luria-Bertani broth, LB¹: (Bacto tryptone 10 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, sodium chloride 10 g/l), LBA²: Luria-Bertani Agar (Bacto tryptone 10 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, sodium chloride 10 g/l, Bacto agar 20 g/l), YM³: Yeast-malto extract broth (Bacto yeast extract 3 g/l, Bacto malt extract 3 g/l, Bacto peptone 5 g/l, Bacto dextrose 10 g/l), YMA⁴: Yeast-malto extract Agar (Bacto yeast extract 3 g/l, Bacto malt extract 3 g/l, Bacto peptone 5 g/l, Bacto dextrose 10 g/l, Bacto agar 20 g/l), PD⁵: Potato Dextrose broth (potato 200 g/l, Bacto dextrose 20 g/l), PDA⁶: Potato Dextrose Agar (potato 200 g/l, Bacto dextrose 20 g/l, Bacto 15 g/l)

구로 하였다. 균주($10^5 \sim 10^6$ CFU/mL)는 1%가 되게 조절 하여 배지에 균등하게 되도록 접종한 후 37°C에서 세균은 24시간, 효모는 48시간 진탕 하면서 배양한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균주가 증식하지 않는 농도를 최소저해농도(MIC)로 하였다.

곰팡이는 삼각 플라스크에 배지를 20 mL씩 취한 후 여과된 alliin-alliinase 혼합물을 첨가하고 포자 현탁액을 1 mL씩 균등하게 접종하여 27°C에서 72시간 진탕하면서 배양하였으며, MIC를 측정하기 위해서 glass microfibre filter($\Phi 45$ mm, Whatman

International Ltd., England)의 항량을 구하여 배양된 균체를 여과하였다. 여과된 균체를 105°C, dry open에서 건조하여 항량을 구한 후 glass microfibre filter의 무게를 뺀 값을 균체의 건조량으로 결정하여 MIC값을 측정 하였다.

결과 및 고찰

기질의 농도 결정

마늘에서 분리한 alliinase 100 μ L에 alliin 400 μ g에 작용 시켰을 때 효소작용에 의해서 생성되는 pyruvate 양은 200~250 μ mol/mg이었다. Tomofumi에 의하면 마늘에서 alliinase를 추출하기 위하여 미분쇄하여 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 침전 및 분리 하였을 때 332.5 μ mol/mg을, column 통과한 것은 7.62 μ mol/mg의 pyruvate양을 얻었다. Alliinase의 사용량은 100 μ L로 하고 기질의 농도를 달리하여 alliinase에 의한 pyruvate 생성량을 측정 한 결과, 3 mM, 5 mM, 10 mM까지는 pyruvate 생성량이 증가하다가 20 mM, 30 mM에서는 더 이상 증가하지 않았고 10 mM과 같은 pyruvate양을 얻었다(Fig. 1). 이것은 Nirmal과 Jerry (1995) 등이 alliinase 활성도를 측정 한 기질의 농도와 유사한 결과였으며, 이를 기초로 하여 기질의 농도를 10 mM로 결정하여 본 연구에 적용 하였다.

pH와 온도가 alliinase 활성에 미치는 영향

Alliinase가 pH의 변화에 따라 pyruvate를 생성하는 양을 측정 한 결과 pH 4~8에서 pyruvate 생성량이 비교적 높았으며, pH 6에서 가장 높았다(Fig. 2).

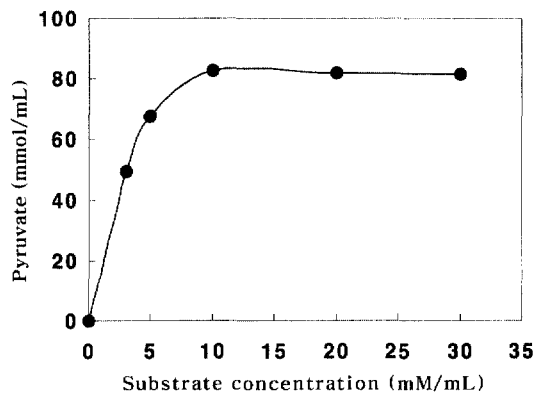


Fig. 1. Amount of pyruvate produced by the alliin-alliinase reaction as affected by substrate concentration.

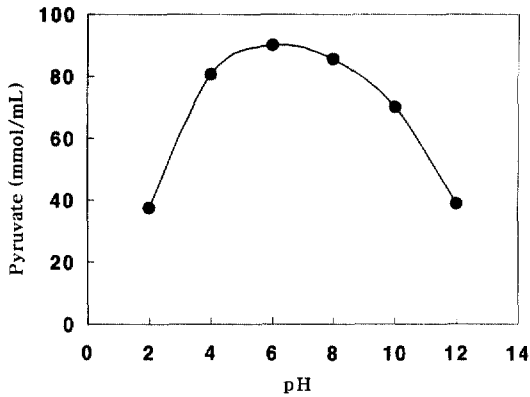


Fig. 2. Effect of pH on the pyruvate production by alliin-alliinase reaction.

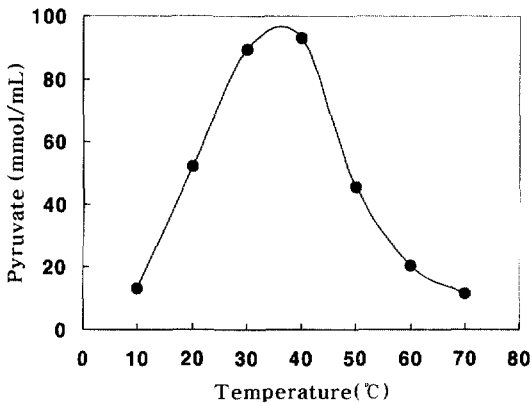


Fig. 3. Effect of temperature on the pyruvate production by alliin-alliinase reaction.

Stoll과 Seebeck (1949, 1951)등에 의해서 보고된 것에 의하면 마늘에 존재하는 alliinase는 pH 4~8에서 높은 활성을 나타내며, Mazelis and Crews (1968)는 최적 pH를 6.5으로 보고한 것으로 보아 pH 6 부근이 alliin을 생성하는 최적 조건이기 때문에 pyruvate 생성량이 높아진 것으로 판단 되었다. Alliinase는 pH 4~8에서 비교적 안정적인 활성을 유지하였다.

온도가 alliinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 온도를 달리하여 pyruvate 생성량을 측정한다. 결과, 30~40°C 부근에서 pyruvate양이 90~97 mmol/mL로 가장 많았으며, 최적온도는 36~37°C이었다 (Fig. 3). 50~70°C 이상의 높은 온도에서는 alliinase가 불활성화 되어 pyruvate 생성량이 감소 하였으며, 30°C이하의 온도에서는 온도가 낮을수록 비례적으로 효소 활성이 감소하였다. 이렇게 alliinase

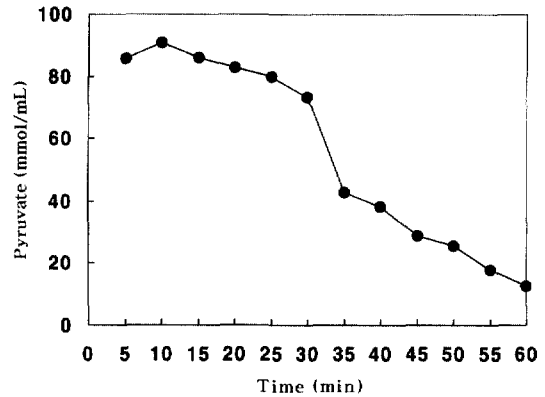


Fig. 4. Alliinase stability at optimum on temperature (37°C).

의 활성은 높은 온도나 낮은 온도에서 보다는 오히려 30~40°C에서 pyruvate 생성량이 증가됨을 알 수 있었다. 이런 결과는 Stoll등의 보고(1949, 1951)한 alliinase의 최적 온도인 35~37°C와 일치 하였다.

최적온도 37°C에서 alliinase는 약 15분간 높은 활성(90~95 μ mmol/mL of pyruvate)을 보이다가, 그후 30분까지는 비교적 안정적 활성을 유지하였다(Fig. 4). 35분 후부터는 pyruvate 생성량이 상당한 속도로 감소 하였다

Alliin-alliinase 반응물질의 항미생물성

Alliin-alliinase 반응물질의 항미생물성은 세균의 경우, Gram 양성균의 MIC값은 *Bacillus subtilis*는 0.13%로 가장 작았으며, *Listeria monocytogenes*는 0.5%, *Staphylococcus aureus* 1%로 측정 되었다. Gram 음성균의 MIC값은 *Escherichia coli*와 *Escherichia coli* O157:H7는 1%, *Salmonella typhimurium*는 1.5%로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 5). 이는 alliin-alliinase 반응물질이 Gram 음성균보다 Gram 양성균에 대하여 항미생물성이 높은 것으로 평가 되었다. 마늘중의 항균성 물질인 alliin의 thiosulfonate기가 -SH기와 반응하여 미생물을 저해 (Block, 1985)하고, Gram 양성균 및 Gram 음성균 모두에 대하여 포자의 발아와 균의 생장을 억제하며, 대사 질환에 대한 약리 작용이 있음이 보고 되었다(Cavallito, 1944).

조(1998)등의 연구 결과에 의하면, 마늘이 김치에서 분리한 호기성 세균에 미치는 영향을 조사한 결과 마늘은 Gram 음성균보다 Gram 양성균에 강한 항균력을 나타내며, Gram 양성균 중에서도 간균보

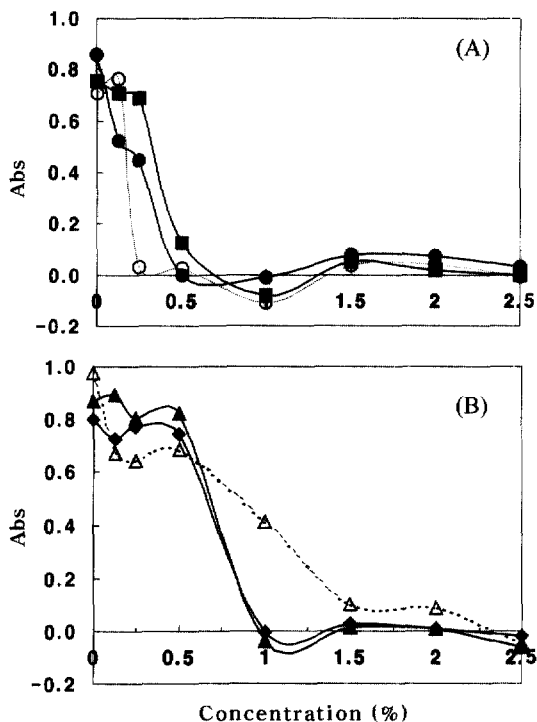


Fig. 5. MIC of alliin-alliinase reaction compound on bacteria.

(A) Gram positive: ○ - ○ : *Bacillus subtilis*, ■ - ■ : *Staphylococcus aureus*, ● - ● : *Listeria monocytogenes*, (B) Gram negative: ▲ - ▲ : *Escherichia coli*, ◆ - ◆ : *Escherichia coli* O157:H7, △ - △ : *Salmonella typhimurium*

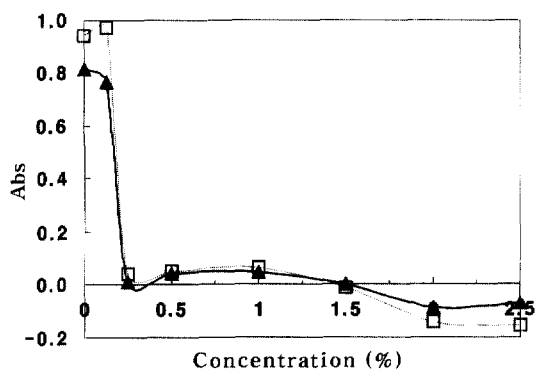


Fig. 6. MIC of alliin-alliinase reaction compound on yeasts.

□ - □ : *Candida monocytogen*, ▲ - ▲ : *Saccharomyces cerevisiae*

다 구균에 대해 더욱 강한 항균력을 나타내는 것으로 보고 하였다. Fig. 6에서 보는데와 같이 효모의 MIC는 *Candida monocytogen*와 *Saccharomyces*

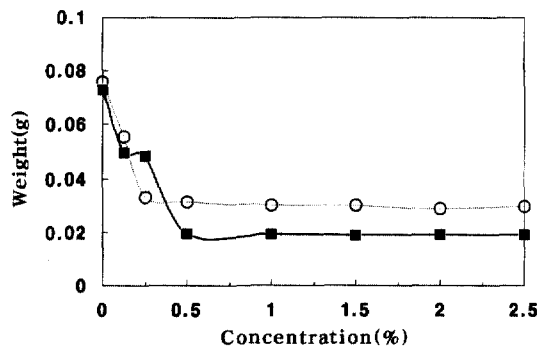


Fig. 7. MIC of alliin-alliinase reaction compound on molds.

■ - ■ : *Aspergillus niger*, ○ - ○ : *Aspergillus flavus*

cerevisiae 모두 0.3%로 측정되었다. 곰팡이의 MIC값은 *Aspergillus niger*는 0.5%, *Aspergillus flavus*는 0.3%로 측정 되었다(Fig. 7).

위의 결과에서 나타난 것과 같이 alliin-alliinase 혼합물의 항미생물성은 *Salmonella typhimurium*의 1.5%를 제외하고 1%내에서 MIC값이 결정 되었으며, 세균보다 효모나 곰팡이의 생장을 더 효과적으로 억제하여 항미생물성이 큰 것으로 평가 되었다.

요 약

마늘에서 분리한 alliin과 alliinase의 반응 안정성과 alliin-alliinase 반응물질의 항미생물성에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같았다.

마늘에서 분리한 alliinase의 최적 반응 pH는 6이였으며, 온도는 37°C 이었다. Alliinase는 최적온도에서 약 10분간 최고의 활성을 나타냈고, 30분까지는 비교적 안정적이었으나 35분 후부터 활성이 감소 하였다.

Alliin-alliinase 반응물질의 항미생물성은 각 균주마다 다르게 나타났으며, 세균의 경우 Gram 양성균은 0.13~1%, Gram 음성균은 1~1.5%로 나타났으며, 효모는 0.3%, 곰팡이는 0.3~0.5%로 나타났다. *Salmonella typhimurium*의 1.5%를 제외하고는 세균에 대한 MIC 값은 1%이내 이었다.

문 헌

Arthur stoll and Ewald Seebeck. 1951. Chemical investigations on alliin, the specific pringiple of garlic. *Advan. Enzymol.* 11: 377-400

Arthur stoll and Ewald Seebeck. 1949. Uber alliin, diegen-

- uine mutter substance des knobauchols. *Helv. Chim. Acta.* **31**: 189-210
- Block, E. Abraham, K. O and Shankarannaryanna, M. L. 1985. The chemistry of garlic and onion. *Scientific American.* **252**: 94-99
- Cavallito, C. J. and Bailey, J. H. 1944. Alliin, the antibacterial principle of *Alliumsativum*. I. Isolation, physical properties, and antibacterialation. *J. Am. Chem. Soc.* **66**: 1950-1951
- Cavallito, C. J., Buck, J. S., and Suter, C. M. 1944. Alliin, the antibacterial principle of *Alliumsativum*. II. Determination of the chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **66**: 1952-1954
- Cho, N. C., D. Y. Jhon, M. S. Shin Y. H. Hong, and H. S. Lim. 1998. Effect of garlic concentration of growth of microorganism during kimchi fermentation, *Korean J. Sci. Technol.* **20**: 231-235
- Dababneh, B. F. A. and Al-Delaimy, K. S. 1984. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by garlic extract. *Lebens. Wiss. Technol.* **17**: 29-31
- Friedemann, T. E. and G. E. Hangen. 1943. Determination of α -keto acid. *J. Biol. Chem.* **147**: 415-421
- George G. Freeman and Robert J. Whenham. 1975. The use synthetic (\pm)-S-1-Propyl-L-cystein sulphoxide and of alliinase preparation in studies of flavour changes resulting from processing og onion (*Allium cepa* L). *J. Sci. Food Agric.* 1333-1346
- Hisae, M. and Isao, K. 1993. Bactericidal activity of anacardic acid against *Streptococcus mutants* and their potentiation. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1780
- Henry E. Tobkin, J. R. and Mendel Mazelis. 1979. Alliin lyase: Preparation and characterization of the homogeneous enzyme from onion bulbs. *Archives of Biochem. and Biophysics.* **193**(1): 150-157
- Kim, S. J and Park, K.H. 1995. Aantimicrobial activites of the extracts of vegetable Kimchi stuff. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 216-265
- Lorian, M. D. 1986. Antibiotics in Laboratory medicine. 2nded., Willams and Wilkins.
- Mazelis, M. and Crews, L. 1968. Purification of the alliin lyase of garlic, *allium sativum* L. *Biochem. J.* **108**: 725-730
- Nock, L. P. and Mazelis, M. 1987. The C-S lyases of higher plantal: Direct comparison of physical properties of homogeneous alliin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*). *Plant Physiol.* **85**: 1079-1083
- Saleem, Z. M and Al-Delaimy, K. S. 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *J. Food. Prot.* **45**: 1007
- 이영노. 1996. 한국식물도감. 908-909
- Tomofumi, M. Asako, H. Mitsuyo, S. Mami, Y. and Kazuki, S. 1998. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cystein sufoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive). *Eur. J. Biochem.* **257**: 21-30
- Tirza Hanum, Nirmal, K. Sinha and Jerry, N. Cash. 1995. Characteristics of γ -glutamyl transpeptidase and alliinase of onion and their effects on the enhancement of pyruvate formation in onion macerates. *J. Food Biochem.* **19**: 51-65