J. Fd Hyg. Safety 21(3), 145–152 (2006)

마늘 황화합물의 병원성미생물 번식억제작용

경규항†
세종대학교 식품공학과

Growth Inhibitory Activity of Sulfur Compounds of Garlic against Pathogenic Microorganisms

Kyu Hang Kyung†
Department of Food Science, Sejong University
(Received August 1, 2006/Accepted September 13, 2006)

ABSTRACT – Efforts have been made to explore the possibility of using garlic as an antimicrobial therapeutic agent since garlic extract and its individual sulfur compounds show antimicrobial activities against all kinds of microorganisms including bacteria, molds, yeasts and protozoa. *Staphylococcus aureus* has been the most studied bacteria along with many other Gram positive and negative pathogenic bacteria, including species of the genera *Clostridium, Mycobacterium, Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Salmonella* and *Shigella*. *Candida albicans* has been the most studied among the eukaryotic microorganisms. A pathogenic protozoa, *Giardia intestinalis*, was also tested. All the microorganisms tested was inhibited by garlic extract or its sulfur components. Garlic has been known to be growth inhibitory only when fresh garlic is crushed, since allicin-generating reaction is enzyme-catalyzed. Allicin is known to be growth inhibitory through a non-specific reaction with sulfhydryl groups of enzyme proteins that are crucial to the metabolism of microorganisms. Another plausible hypothesis is that allicin inhibits specific enzymes in certain biological processes, e.g. acetyl CoA synthetase in fatty acid synthesis in microorganisms. Allicin transforms into other compounds like ajoene and various sulfides which are also inhibitory to microorganisms, but not as potent as their mother compound. It is reported recently that garlic heated at cooking temperatures is growth inhibitory especially against yeasts, and that the growth inhibitory compound is allyl alcohol thermally generated from alliin in garlic.

Key words: garlic, antimicrobial activity, allicin, alliin, allyl alcohol, sulfides

서론 및 배경

마늘의 항균작용은 매우 오래 전부터 알려져 왔으며, 그 과학적 연구의 효시는 Walton 등[1]으로서 이들은 마늘이 항균작용을 갖고 있다는 사실을 과학적 실험으로 증명해보였다. 마늘의 항균작용은 마늘에 들어있는 일종의 비단백성 함황아미노산(non-protein sulfur amino acid)인 알린(alliin; S-propenyl-L-cysteine sulfoxide)이 alliinase 효소에 의해 분해되어 생성되는 알리신(allicin; allyl 2-propenethiosulfinate)때문인 것으로 알려져 있다.[2,3] 이와 유사한 비단백성 함황아미노산은 *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide가 있으며 마늘에 적은 양이 들어있으며 양배추를 포함하는 *Brassica*에 함유되어 있고 이들 채소류의 항미생물작용 물질의 전구물질이기도 하다. 그러나 알린은 마늘을 포함하는 백합과(*Lilliaceae*) 채소 외에 다른 식물에는 들어있는 곳이 없다. 알린과 *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide는 L-cysteine sulfoxide의 알릴 및 메틸 유도체이며 공히 alliinase(L-cysteine sulfoxide lyase)에 의해 분해되어 알리신 또는 methyl methanethiosulfinate를 생성시켜 항균작용을 나타낸다.

마늘의 항균작용물질은 세균, 효모, 곰팡이는 물론 원생동물에도 생육저해작용이 있는 것으로 알려져 있다. 마늘의 알리신이 항균작용을 가질 수 있는 중요한 이유는 분자구조 중에 -S-S(O)-기를 가지고 있기 때문이다.[4] 알리신은 thiosulfinate 그룹에 속하는 휘발성 함황물질로서 항균작용이 매우 강력하다. 알리신과 같은 thiosulfinate는 화학적으로 불안정하여 저장 중에 항균작용이 없거나 낮은 물질로 변화하기 때문에 마늘의 강력한 항균작용은 시간이 지나면서 약화된다.

알리신이 항균작용물질이라는 사실은 항생물질 탐색이 한창이었던 1940년대 초에 밝혀졌고 명칭도 항생물질의 명칭

†Author to whom correspondence should be addressed.

과 어미가 같은 알리신(allicin)으로 명명되었으며[2] 구조도 일종의 thiosulfinate라는 것이 밝혀졌다.[5] 알리신은 알린이 효소에 의해 분해되어야만 생성되는 데, 마늘 내에서는 서로 다른 세포내에 존재하기 때문에 접촉하지 않다가 물리적으로 조직이 파괴되면 서로 접촉하면서 효소작용이 일어나는 것이다.[2,3,6] 전구물질인 알린은 알리신이 발견된 지 몇 년 뒤인 1948년에 마늘로부터 결정으로 순수분리되었고[7] 3년 뒤인 1951년에 화학적으로 합성되었다.[8] 마늘로부터 알린을 정제하려고 노력한 사람은 20세기 초에 Rundqvist[9]가 기록상 최초였으며 알린에 알린 (alliin)이라는 명칭을 붙인 사람도 Rundqvist이었다. 추출한 물질에 이물질인 탄수화물이 많이 섞여있었으므로 그 성질을 잘못 파악하고 이를 알린(alliin)이라고 명명하였는데 나중에 알린을 결정으로 분리한 Stoll과 Seebeck이 그 명칭을 그대로 사용하면서부터 공식적인 명칭으로 정해졌다.[7]

마늘은 여러 가지 많은 생리작용을 가지고 있는 데 예를 들면 항암작용,[10] 혈중지질함량감소작용,[11] 항비루스작용,[12] 항혈전(antithrombotic) 작용,[13] 그리고 기타 여러 가지 효소의 활성을 저해하는 작용[14-18]이 알려져 있다. 마늘 알리신의 항균작용은 기본적으로 미생물 세포내에서 대사작용에 관여하는 여러 가지 효소를 저해하기 때문에 나타나는 현상으로 이해하고 있다. 마늘의 항균작용은 알린에 alliinase 효소가 작용하는 것이기 때문에 마늘을 일단 가열하면 마늘을 파괴하더라도 항균작용이 나타나지 않는다는 것이 정설이었다. 하지만 마늘을 식품을 조리하는 정도의 온도에서 가열하면 강력한 항효모작용이 나타나는 것이 최근에 확인되었으며,[19,20] 알린이 열분해되어 항균물질이 생성된다고 하였다. 본 총설에서는 마늘이 병원성 미생물에 미치는 항균작용에 대하여 기술하고자 하며, 특히 최근에 보고된 가열마늘의 항균작용도 포함시키고자 한다.

병원균에 대한 마늘의 항균작용

생마늘의 강력한 항균작용은 매우 오래전부터 알려져 왔으며 많은 연구자들이 미생물에 의한 감염 등의 치료를 염두에 두고 마늘의 항균작용을 연구하였다. 특히 생마늘의 항균작용이 매우 강력하여 마늘의 연구를 시작한 이래 주로 생마늘의 항균작용에 대한 연구가 주를 이루었다. 마늘은 항균작용이 매우 강력하며 살균작용을 나타내며 1-2%의 농도에서는 세균의 번식을 저해하고 그보다 높은 온도에서는 살균작용을 나타내었다.[12,21-31]

페니실린, streptomycin, doxycilline 및 cephalexin과 같은 여러 가지 항생제에 내성(multiple resistant)을 나타내는 *Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa*가 마늘에 의해 번식저해를 받는 것으로 나타났다.[32] 그러나 똑같이 항생제 내성을 나타내는 *Klebsiella* sp.는 마늘에 의해 저해 받지 않아 마늘에 대한 감수성은 미생물 종에 따라 다른 것으로 나타났다.

마늘이 위염을 유발하는 *Helicobacter pylori* 세균에 미치는 영향을 연구한 O'Gara 등[33]은 마늘제품을 섭취함으로서 *H. pylori* 세균 감염으로 인한 만성 위염질병의 이환을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 이들이 마늘유(garlic oil)와 마늘분말의 *H. pylori*세균 번식저해작용을 연구한 결과 마늘제품들은 *H. pylori* 감염치료용 제재로서의 활용가능성이 높다고 하였다. 비교적 *H. pylori* 세균 감염율이 높은 우리나라에서 마늘이나 그 가공제품을 이용한 위염의 발생률을 감소시킬 수 있다고 예상할 수 있다.

사람에게 병원성을 나타내는 그람 양성 및 음성 세균 19종(*Bacillus cereus* 1종, *Escherichia coli* 3종, *Shigella* 3종, *Vibrio* 3종, *Yersinia* 1종, *Listeria* 1종, *Salmonella* 4종, *Campylobacter* 3종)에 대한 마늘의 항균작용을 시험한 결과 마늘유의 48시간 최소번식억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)가 최고 5.5 mg/ml로 나타났으며, 시험한 모든 장내병원균에 대해 우수한 번식저해효과가 있는 것으로 나타났다. 마늘분말의 경우 마을유와 같은 시험조건에서 시험했을 때 MIC가 25 mg/ml로서 마늘유와 비교하였을 때 항균작용은 낮았으나 모든 시험 세균을 저해할 수 있었다.[34]

Small 등[35]은 ethyl ethanethiosulfinate 및 ethyl ethanethiosulfonate를 합성하여 이 두 관련 물질의 항균활성을 비교한 결과 *Clostridium perfringens, Mycobacterium tuberculosis* 및 *Trichophyton mentagophytes*에 대해서는 동일한 정도의 항균활성을 나타내었고, *E. coli, Klebsiella pneumoniae* 및 *S. aureus*에 대해서는 sulfonate가 sulfinate에 비해 항균활성이 많게는 10배정도 강력한 것으로 보고하였다. 이들 두 황화합물은 실제 마늘에는 생성되지 않는 인공합성물로서 sulfinate와 sulfonate의 항균작용비교를 위해 수행한 연구였다. 역시 실제 마늘에 함유되어 있지는 않지만 인위적으로 합성한 diethyl disulfide를 포함하는 disulfide류가 결핵균(human type *Mycobacterium tuberculosis*)에 항균작용이 있었다.[36]

Ajoene은 알리신이 변화되어 생성되는 함황물질로서 혈전생성을 방지하는 것으로 잘 알려져 있으며 세균의 번식을 저해활성도 있는 것으로 나타났다.[37] *B. cereus*와 *Mycobacterium smegmatis*는 5 μg/ml, S. aureus는 20 μg/ml, 그리고 *K. pneumoniae*는 100 μg/ml의 ajoene으로 번식을 완전히 저해할 수 있었다.

Srivastava 등[29]은 *Klebsiella, Salmonella, Shigella* 등이 포함한 21종의 그람 음성 병원균에 미치는 마늘의 항균작용

을 연구하였으며, 일부 세균들 (*Salmonella arizonae*와 *Shigella cloacae*)의 경우를 제외하고는 마늘추출액이 ampicillin (30 μg/ml)보다 우수한 항균활성이 있다고 보고하였다. 마늘 추출액을 끓였을 때도 항균작용이 유지되었다고 보고하였으나 실제 자료에 나타난 바로는 활성이 매우 많이 감소하였으며 저장하는 동안에도 활성의 감소가 나타났다. 한편 정량적인 연구에서 생마늘액 1-4%를 배지에 첨가하면 *E. coli, S. typhosa, S. dysenteriae* 및 *S. aureus*의 번식을 완전히 저해하였으며[28] 다른 연구에서는 마늘 1%[21]나 2%[22]를 첨가하였을 때 *S. aureus*의 번식을 저해한다고 보고하여 대체로 비슷한 결과이었으나, 이와 같이 저해농도에 차이가 나타나는 것은 사용한 마늘에 따라 알린 함량이 다른 데도 기인할 수 있으며 동시에 시험균주로 사용한 *S. aureus*가 서로 다르기 때문일 것으로 사료된다. 마늘추출액이 *S. aureus*의 번식을 완전히 저해하지만 마늘액을 80-90°C로 5분 정도 가열하면 항균활성이 완전히 소멸되었다.[24] 그러나 건조 마늘을 수화시켰을 때 *S. typhimurium*에 대한 저해작용이 유지되었다.[23]

*Clostridium perfringens*의 포자는 배양배지에 마늘을 1-2%를 첨가하면 영양세포로 번식하지 못하였다는 보고[26]가 있었으나 마늘성분이 포자의 발아를 저해한 것인지 발아한 포자의 번식을 저해한 것인지는 불명확하였다.

마늘을 가열하였을 때 생성되는 항균물질은 생마늘에 생성되는 것과는 차이가 있는 데 가열온도나 시간에 따라 항균활성이 다르고 121°C에서 45분 가열하였을 때는 이보다 가열시간이 짧거나 긴 때보다 *S. aureus*의 번식을 저해하는 성질이 가장 큰 것으로 나타났다.[19] 가열 마늘의 항균작용에 대한 내용을 뒤에서 상세히 설명하고자 한다.

병원성 진균류를 포함하는 진핵세포에 대한 저해작용은 주로 *C. albicans*에 대한 연구가 주를 이루었다. 마늘의 항균작용은 세균에게보다는 효모를 포함하는 진균류에 더 강력하게 작용하여[20] 감염치료용이 목적이라면 진균류 감염치료에 더 적합하다고 할 수 있다. 진균류 중에서 곰팡이는 정량적인 번식억제 측정법이 쉽지 않아 대체로 효모에 대한 항균작용이 많이 연구된 것으로 판단되었다.

Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Torulposis 및 *Trichosporon* 속에 속하는 효모의 번식에 대한 마늘의 영향을 연구하였을 때[30] 모두 마늘의 영향을 받아 번식이 저해되었으며, 특히 질염(vaginitis)에 감염된 환자로부터 분리한 *C. albicans* 22주를 시험했을 때 모두 마늘에 의해 번식저해를 받았다. 마늘의 알리신이 분해되어 생성되는 ajoene은 앞서 언급한 대로 항세균작용도 뛰어난 데 *C. albicans*를 포함하는 진균류에 강력한 번식저해작용이 있고 저해 농도는 20 μg/ml 이내이었다.[38] 이 농도는 세균을 저해하는 농도와 대체로 유사한 것으로 나타났다.[37] 기타 *C. albicans*에 대한 마늘의 번식저해작용을 연구한 보고가 다수 있었다.[15,16,27,39,40] 비교적 많은 연구가 이루어지지는 않았으나 원생동물인 *Giardia intestnalis*에 대한 마늘 및 마늘 구성성분의 번식저해작용을 연구하였을 때 매우 우수한 번식억제제로 평가되었다.[41] 마늘 추출물이나 마늘에 있는 것으로 알려진 allyl alcohol은 *Giardia* 세포내외부의 전기화학적 포텐셜을 상쇄하여 에너지 대사를 저해하였으며, 세포내외부의 형태의 변형을 유발하였고 대사에 변화를 일으켜서 *Giardia*의 사멸원인이 되었다.

마늘 항균작용 물질 및 이의 전구체

마늘이나 양배추를 포함하는 *Allium*이나 *Brassica* 채소의 항균작용을 나타내는 물질의 전구물질(precursor compounds)인 *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide류 (알린과 *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide 포함)는 이들 채소류의 황대사에 중요한 역할을 담당하는 데, 아마도 유기황 자원의 세포내 축적방법으로 추정되었다.[42] 이 황화합물들은 식물마다 축적된 양에 큰 차이를 나타내고 있음은 물론 마늘의 경우 재배지역이나 재배시의 환경에 따라 알릴기와 메틸기의 조성의 차이를 나타낸다. 비교적 온도가 낮은 지역에서 재배한 마늘에 메틸기에 비해 알릴기의 상대적 함량이 높게 나타났다.[6] Block 등[6]은 낮은 온도가 스트레스로 작용하여 메틸기를 가지는 L-cysteine sulfoxide의 합성을 감소시킬 것이라고 추정하였다.

Alliinase 효소는 마늘의 알린과 다른 세포내에 있기 때문에[43] 마늘조직이 파괴되지 않는 한 알린은 분해되지 않고 마늘 냄새도 나지 않으며 항균작용물질도 생성되지 않는다. 일단 마늘의 조직이 파괴되어 기질과 효소가 접촉하게 되면 분해반응은 매우 신속하게 일어나서 총 알린의 80% 이상이 단 2분 만에 분해된다.[3] 우리가 생마늘을 씹으면 즉각 매운 맛과 냄새가 나는 것이 효소의 빠른 분해작용을 의미하기도 한다.

마늘뿐만 아니라 세균도 alliinase 효소를 가지고 있는 것으로 보고되었다. Stoll과 Seebeck[3]은 알린이 첨가되어 있는 영양배지에 *E. coli*를 배양하면 마늘 냄새가 발생하는 것을 관찰하였다. *Pseudomomnas cruciviae*[44]와 *Bacillus subtilis*[45]로부터 분리한 효소가 *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide를 methyl methanethioshlfinate를 포함하는 분해산물로 분해하는 것이 확인되었다. 그리고 이들 효소들은 마늘의 alliinase 효소와 마찬가지로 pyridoxal phosphate를 조효소로 요구하였다.

마늘에는 L-cysteine sulfoxide의 유도체 중에 알릴기를 가진 것이 85%를 초과하기 때문에 마늘을 파쇄하면 주로 알

리신 (allyl 2-propenethiosulfinate)이 생성되지만, 마늘에는 메틸기를 가진 L-cysteine sulfoxide도 존재하므로 혼합된 구조를 갖는 thiosulfinate가 생성되는 데 예를 들면 allyl methanethiosulfinate, methyl 2-propenethiosulfinate 그리고 methyl methanethiosulfinate가 생성된다.[6] 알리신은 thiosulfinate 중에서 최초로 알려진 물질로서 그 항균작용 모드는 대체로 정균작용이다.[2] Small 등[4]이 thiosulfinate의 구조와 관련된 항균작용 정도를 비교한 바가 있는 데, 그람 음성이나 양성 세균에 비슷하게 작용하지만 구성 알킬기의 탄소수가 많아짐에 따라 그람 음성세균에 대한 활성은 감소하고 그람 양성세균에 대한 활성은 높아진다고 하였다. 알킬기가 가지를 친 경우에는 가지를 치지 않은 것에 비해 항균작용이 낮게 나타났다.

또 Small 등[35]은 thiosulfinate와 thiosulfinate가 disproportionation 반응을 일으켜 생성되는 thiosulfonate와 항균활성을 *S. aureus*와 *Klebsiella pneumoniae*를 대상으로 비교하였을 때 두 가지가 거의 비슷한 항균활성을 나타내었다.

알리신을 포함하는 thiosulfinate류는 불안정하며, 특히 알리신은 3°C에서도 불안정하며 2주일이면 항균활성을 잃는 것으로 나타났다.[3] Brodnitz 등[46]도 알리신 수용액을 20°C에 20시간 동안 저장하였을 때 알리신이 완전히 분해되어 여러 가지 sulfide 류 (diallyl monsulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide) 및 아황산으로 변하였다고 하였다. 하지만 마늘 추출물에 들어있는 알리신은 수용액에서보다 안정하여 40°C에서 144시간이 지나야 완전히 분해되었다.[47] 이들은 알리신은 순수한 수용액상태에서보다는 마늘 추출액의 상태에서 더 안정한 것으로 추정하였다. 그리고 알리신이 이와 같이 극도로 불안정한 것은 아마도 알릴기에 있는 불포화 이중결합이 원인인 것으로 추정하였다.[4] 마늘추출물의 *C. utilis* 효모에 대한 MIC는 처음(0 time)에는 0.1%보다도 낮지만 37°C에 저장하면 항균활성이 점진적으로 약해져서 30일 만에 16%로 급증하였다.[20]

마늘을 autoclave 온도에서 가열하면 항균작용이 없다는 과거의 보고[1]가 있었으나 최근에 보고에 의하면 autoclave한 마늘액도 *S. aureus*의 번식을 저해하는 작용이 있었으며[19] 알린 수용액(1.0%)을 autoclave하였을 때도 마찬가지로 항균작용이 나타나는 것을 확인하였다.[20] 45분동안 autoclave한 마늘액의 휘발성 물질을 분석하였을 때 diallyl disulfide나 diallyl trisulfide가 발견되었으며 항균력과 함량과의 관계를 비교하였을 때 diallyl trisulfide가 주 항균작용물질일 것으로 추정되었다.[19] Diallyl trisulfide의 *S. aureus*에 대한 항균작용은 매우 강력하여 MIC가 40 ppm이었다.[20,48] Kim과 Kyung[20]은 가열한 마늘이나 생마늘 또는 마늘의 알린 분해물인 sulfide류는 모두 세균보다는 효모에 대한 항균활성이 10배 이상 크다는 것을 발견하였으며, 동시에 가열한 마늘의 항세균작용물질과 항효모작용물질은 본질이 다르다고 주장하였다.[19] 이어진 연구에서 가열 마늘의 항효모작용물질은 allyl alcohol (2-propen-1-ol)인 것으로 동정되었으며 이 물질은 마늘의 항균물질 중에서 황을 포함하지 않는 최초의 그리고 유일한 물질로 확인되었다.[49] Allyl alcohol은 마늘을 가열하였을 때도 생성되지만 순수한 알린 수용액을 가열하여도 생성되었으며, 가열마늘의 항균작용 패턴과 가열한 알린 수용액의 항균작용 패턴은 순수한 allyl alcohol의 항균작용 패턴과 동일하게 나타났다.[49]

마늘유(garlic oil)는 알리신이 분해되어 생성된 sulfide류의 혼합물로서 항균작용이 있다. 마늘유는 마늘을 파쇄한 뒤 끓여서 휘발되는 물질을 응축시켜 얻는다.[50] 끓이는 과정 중에 마늘에 생성된 알리신이 여러 가지 종류의 sulfide로 변하게 되는 데 diallyl disulfide가 가장 많으며 그 다음이 diallyl tri- 및 tetra-sulfide이다.[33,51,52] 마늘유 및 이를 구성하는 sulfide류는 개별적으로 모두 항균작용을 나타낸다.[33,51,34] 마늘유를 구성하는 sulfide 중에서 분자내 황의 숫자가 많은 것일수록 항균작용이 큰 것으로 나타났다.[48,34] 예를 들면 diallyl trisulfide는 diallyl disulfide보다 10배 이상 항균작용이 강력하며 diallyl tetrasulfide는 trisulfide에 비해 약간 항균력이 크다.[48]

알리신의 유도체중에 ajoene은 원래 항혈전작용[12]이 있는 것으로 알려져 있었으나 나중에 *Aspergillus niger*와 *C. albicans*에 대해 매우 강력한 항진균성작용이 있는 것으로 보고되었으며 MIC는 20 μg/mL로 나타났다.[38] Ajoene이 알리신보다 더 강력한 항진균작용을 갖는 것은 진균의 세포벽에 작용하기 때문이며, 따라서 특정한 세균을 제외하고는 항세균작용을 기대할 수 없다고 추정하였다.[38] 하지만 그 뒤에 Naganawa 등[37]은 ajoene의 항세균작용에 대한 다른 의견을 제시하였는데 ajoene은 그람 양성 세균 및 효모에는 강력한 항균작용을 나타내지만 그람 음성 세균에 대해서는 항균작용의 차이가 크다고 하였다.

마늘 항균물질의 작용기작

마늘 항균물질 중에서 먼저 함황화합물의 작용기작을 고찰하고자 하며 황을 포함하지 않은 물질(예, allyl alcohol)의 작용 기작은 이 섹션의 뒤에 언급하고자 한다. 마늘의 주요 항균물질인 알리신은 화학적으로는 thiosulfinate 그룹에 속하는 물질로서 세포내 대사에 필수적인 단백질(주로 효소 단백질)의 -SH기와 반응하여 항균작용을 나타내는 것[4,5,27,35]으로 알려져 있다. 마늘 항균작용 연구의 선도자인 Small 등[4]은 thiosulfinate (예, 알리신)가 항균작용을 가지는 것은 그 분자구조 내에 -S(O)S-기를 가지고 있기 때문이며, 이는

thiosulfinate가 cysteine과 반응하여 항균력이 없어진다는 사실로 증명해 보였다.

알리신을 포함하는 thiosulfinate의 항균작용 메카니즘이 발표된 이후에 thiosulfinate의 저해작용에 대한 특정 대사과정이나 효소에 대한 논문이 발표되었다.[14-18] Wills[14]는 알리신이 -SH기를 가지고 있는 효소를 일반적으로 저해하지만 그런 -SH 효소 중에서도 xanthine oxidase, succinic dehydrogenase 그리고 triose phosphate dehydrogenase를 특히 저해한다고 하여 -SH에 대한 비특이적 저해 메카니즘(non-specific inhibitory mechanism)과 특이적 효소 저해기작(specific inhibitory mechanism)을 동시에 제시하였다. Wills[14]는 알리신이 항균작용이 있는 것은 그 분자구조 중에 -S(O)S-기가 있어 그렇다는 Small 등[4]의 주장을 재확인하였고 -S-S-, -S- 그리고 -SO- 기는 항균작용을 가지 않는다고 주장하였다. 그러나 disulfide류가 항균작용이 있다는 것이 추후에 확인되었고, 특히 disulfide류가 결핵균에 항균작용이 있다는 보고36)를 보면 -S-S-가 항균작용이 없었다는 것은 알리신만큼 강하지 않다는 것이지 전연 없다는 것은 아니었던 것으로 해석된다. 언급은 되지 않았지만 -S-S-S-구조를 가지는 diallyl trisulfide는 알리신에 못지않은 강력한 항균작용을 가지고 있어[20,48] sulfide류에 대한 Wills[14]의 연구는 불완전했었던 것으로 판단된다. Adetumbi 등[15]과 Ghanoum[16]은 알리신을 포함하는 thiosulfinate가 지방질 합성을 저해한다고 하였고, Feldberg 등[17]은 RNA합성을 저해한다고 보고하였다. 알리신은 지방질 합성과정에서 acetyl CoA나 malonate가 지방산으로 합성되는 것은 저해하지 않으나 acetate가 지방산으로 합성되는 것만 저해하는 점으로 미루어보아 지방질 합성과정 중의 여러 효소중에서 acetyl CoA synthetase만을 특정하게 저해하는 것으로 추정되었다.[18] 특히 이 저해작용은 알리신의 해당효소(acetyl CoA synthetase)에 대한 특이(specific)한 효소저해작용으로 해석되었고 다른 문헌에서 제기되었던 바와 같은 일반적인(non-specific) -SH기 저해작용이 아니었다.

알리신의 세포막 투과와 관련된 연구를 수행한 Miron 등[53]은 친수성 SH 화합물, 예를 들면 환원형의(reduced) glutathione을 phospholipid vesicle에 집어넣고 시험한 결과 알리신은 phopholipid 이중구조를 쉽게 통과하여 vesicle안에 들어있는 -SH기와 반응하는 것을 관찰하였고, 이 반응속도가 알리신이 수용액내에 있는 것과 거의 같은 속도로 이루어지는 것으로 보아 알리신이 phopholipid 이중구조를 통과하는 것은 쉬운 과정임을 보여주었다. 알리신이 사람의 적혈구막을 시험했을 때도 그 통과속도가 매우 빠른 것이 입증되었으며 알리신은 세포막의 누출(leakage)을 유발하거나 막과 반응도 하지 않았고 매우 좋은 효율로 막을 통과하여 세포내 -SH물질과 반응하였다.[53]

마늘의 *C. albicans* 번식 저해에 관한 연구를 수행한 Ghanoum[16]은 환자로부터 분리한 6개의 *C. albicans* 분리주를 주사전자현미경(scanning electron microscopy)과 세포내 물질 누출시험(cell leakage test)을 이용해 관찰한 결과 배지에 마늘을 첨가하면 효모의 표면에 손상이 나타나는 것을 관찰하였으며, 지방질 합성 대사에 큰 변화가 나타나는 것을 확인하였다. 이는 마늘의 항균활성물질이 대사에 필수적인 효소 단백질의 -SH 기와 반응하여 불활성화시키고 이 결과 미생물의 번식저해작용이 나타나는 것이라고 해석하여 일반적인 반응 메카니즘을 반복 제시하였다.

마늘의 *C. albicans*에 대한 저해작용을 연구한 Lemar 등[39]은 그람 음성 세균인 *E. coli*에 대한 마늘의 저해 농도는 *C. albicans*에 비해 매우 높은 데 이 이유는 세균의 peptidoglycan은 효모의 세포벽에 비해 항균물질의 투과효율이 낮기 때문이라고 추정하였다. 그 중요한 이유로 효모의 세포벽의 주 성분은 탄수화물이기 때문에 마늘의 유효성분인 알리신이 통과하여 지나갈 때 알리신과 반응할 -SH기가 없지만 세균의 peptidoglycan에는 -SH기가 있을 수 있기 때문이었다. 유사한 결과[41]로 세포벽이 없는 원생동물 *Giardia intestinalis*에 대한 마늘의 번식저해농도는 *C. albicans* 보다도 훨씬 더 낮은 것으로 보아 세포벽의 투과성이 마늘에 대한 감수성에 영향을 주는 것으로 판단하였다. 마늘과 allyl alcohol을 포함하는 마늘 성분의 *C. albicans*에 대한 항균메카니즘을 연구한 Lemar 등[40]은 마늘이 활성산소(reactive oxygen species)를 생산하게 하여 세포로 하여금 산화스트레스를 받아 사멸(programmed cell death)하게 하거나 또는 산화환원의 완충작용을 통해 세포를 보호하는 세포내 -SH기 물질을 소모시켜서 세포를 사멸시키는 두 가지 가설을 제시하였는데, 다른 많은 연구자들의 의견은 후자와 같으며 일반적인 -SH 물질과의 반응을 통한 미생물의 저해이다. 한 예로서 가열마늘의 주요 항균물질인 allyl alcohol을 쥐의 간세포(rat hepatocytes)와 반응시키면 세포내 reduced glutathione이 소모되었고, 이로 말미암아 세포내 지방의 산화가 일어나는 것이 관찰되었다.[54]

마늘이 중요한 항 캔디다 활성 (anti-candidal activity)을 가졌으며[27] 마늘은 *Candida* 세포내 거대분자(단백질, 지방질과 핵산)의 합성을 저해하기 때문에 캔디다 번식저해작용이 있다고 보고한 Adetumbi 등[15]은 특히 지방질 합성은 완전히 저해되며 이 작용이 *Candida* 효모의 번식을 저해하는 직접적인 원인이라고 지적하여서 일반적인 -SH 화합물과의 반응과는 다른 가설을 제시하였다.

비황화합물의 작용기작은 함황화합물의 항균작용기작과 다르게 보고 있다. 마늘의 항균작용물질 중에서 그 분자구조

중에 황(S)을 포함하지 않은 것으로 일종의 불포화 알콜인 allyl alcohol (2-propen-1-ol)이 있는 것으로 밝혀졌고 그 작용 메카니즘은 이미 다른 연구분야에서 많은 연구가 수행된 바 있다.[49] Allyl alcohol은 alliin이나 마늘을 식품을 가열조리하는 온도 범위에서 가열하였을 때 생성되며 열에 견디는 힘이 매우 강력하다.[49] Allyl alcohol의 항세균작용(antibacterial activity)은 보통의 알콜인 ethyl alcohol과 차이가 없었으나[55] 항효모작용 (antiyeast activity)은 에틸 알콜이나 프로필 알콜에 비해 수천 배 정도 더 강력하였다. 이와 유사한 불포화 1차 알콜의 1종인 2-buten-1-ol도 n-뷰틸 알콜에 비해 10배 이상 강력한 항효모작용을 나타내었는데 비해 다른 포화 알콜류는 특별히 효모에 더 강력한 항균작용을 나타내지 않아서 불포화 1차 알콜류는 특이한 항효모작용이 있다는 사실을 알 수 있었다. 참고로 2차 불포화 알콜류는 1차 불포화 알콜류가 나타내는 항효모작용을 나타내지 않았다.[55]

이와 같은 allyl alcohol을 포함하는 불포화 1차 알콜류의 강력한 항효모작용은 이 알콜이 세포내 alcohol dehydrogenase(ADH)효소에 의해 산화되어 각각에 해당하는 불포화 알데히드로 변화하며 이 알데히드가 항효모작용을 나타내는 것으로 이해되고 있다.[56] 이렇게 생성된 불포화 알데히드류는 이중결합과 케토기가 공액관계를 유지하기 때문에 매우 강력하게 단백질의 알킬화작용(protein alkylating)을 한다고 알려져 있다.[57] ADH는 allyl alcohol을 산화하여 acrolein을 만든다.[57] 이러한 1차 불포화 알콜류에 비해 2차 알콜류는 (예를 들면 3-buten-2-ol) ADH에 의해 산화되어 알데히드를 만드는 대신 ketone을 만들기 때문에 세포내에서 아무런 해를 끼치지 않고 배설된다.[58]

ADH를 생성하는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 allyl alcohol에 매우 민감해서 MIC가 0.004%인 데 비해 ADH를 생성하지 않는 *S. cerevisiae*균주는 allyl alcohol에 민감하지 않고 MIC는 0.5%이며 이는 allyl alcohol에 대한 많은 세균들의 MIC와 동일하다.[55] Allyl alcohol 자체는 세포에 약간만 유해하지만 그의 산화물인 acrolein은 매우 유해하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 allyl alcohol이 효모에게만 특이하게 작용하는 것은 효모의 ADH 활성과 관계가 있다고 볼 수 있었다. ADH 발현이 효모에서는 매우 활발한 데 비해 세균에서는 그렇지 않은 것으로 추정되며, 때에 따라서는 미생물의 배양환경과 밀접한 관계가 있는데 *E. coli*를 호기적으로 배양하면 allyl alcohol에 잘 견디지만 혐기적조건에서는 매우 민감하였다.[59] 하지만 ADH를 생산하지 않는 변이주는 호기적 또는 혐기적 배양조건에 따라 민감도의 차이가 없이 allyl alcohol에 잘 견딘다. 실제로 allyl alcohol은 무독한 물질이며 이것이 ADH에 의해 산화된 acrolein이 독성작용이 있다고 하였다.[60]

국문요약

마늘과 마늘의 황화합물은 여러 가지 미생물(그람 양성 및 음성 세균, 곰팡이, 효모, 원생동물)의 번식을 저해하므로 마늘을 감염증치료에 쓰고자 하는 노력이 많았고 따라서 병원성 미생물에 대한 번식저해연구가 많이 수행되었다. 마늘에 의한 병원성 미생물의 번식저해작용을 연구한 대상 미생물 중에서 세균으로는 *Staphylococcus aureus*가 가장 많이 연구되었고 기타 많은 종류의 그람 음성 및 양성 병원성 세균이 연구대상이었다. 효모와 곰팡이를 통털어 *Candida albicans*의 번식저해 연구가 전체 진균류 연구의 대부분을 차지하였다. 특이하게 *Giardia intestinalis*에 대한 연구보고도 있었으며 마늘은 시험한 대부분의 미생물에 대해 강력한 천연 항균제로서 인정되었다. 마늘은 원래 가열하지 않은 생마늘이어야 알린이 alliinase 효소에 의해 분해되어 강력한 항균물질인 알리신을 생성하게 되므로 주로 생마늘의 항균작용연구가 주를 이루었다. 알리신은 불안정하여 저장중에 분해되어 여러 가지 물질로 변화하게 되는 데 알리신이 분해되어 생성되는 ajoene이나 기타 여러 가지 sulfide 류 역시 세균이나 효모에 매우 강력한 항균작용을 나타낸다. 마늘의 알리신이 나타내는 항균작용은 thiosulfinate기가 미생물의 대사에 중요한 역할을 하는 효소 중에서 -SH 기를 가지는 효소단백질과 결합하여 불활성화시키기 때문에 결과적으로 미생물이 사멸하는 것으로 설명되고 있다. 하지만 이와 같은 일반적인 독성 메카니즘 이외에 특이한 효소에 특이하게 저해작용을 나타낸다는 가설이 있고 그 중에서도 지방산 합성에 관여하는 효소를 저해하기 때문이라는 의견이 많다. 최근에 식품의 조리 온도에서 가열한 마늘이 항균작용이 있는 것이 발견되었는데 그 작용은 주로 항진균작용이며 그 항균작용물질은 알린이 열분해되어 생성되는 allyl alcohol인 것으로 보고되었다.

참고문헌

1. Walton, L., Herbold, M. and Lindegren, C. C.: Bactericidal effects of vapors from crushed garlic. *Food Res.* **1**, 163-169 (1936).
2. Cavallito, C. J. and Bailey, J. H.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I: Isolation, physical properties and antimicrobial action. *J. Amer. Chem. Soc.* **66**, 1950-1951 (1944).
3. Stoll, A. and Seebeck, E.: Chemical investigation of alliin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol.* **11**, 377-400 (1951).
4. Small, L. D., Bailey, J. H. and Cavallito, C. J.: Alkyl thiosulfinates. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1710-1713 (1947).
5. Cavallito, C. J., Buck, J. S. and Suter, C. M.: Allicin, the antibacterial principles of *Allium sativim*. II. Determination of the chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 1952-1954 (1944).
6. Block, E., Naganathan, S., Putman, D. and Zhao, S.-H.: *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (Ramsons), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2418-2430 (1992).
7. Stoll, A. and Seebeck, E.: Uber Alliin, Die Genuine Muttersubstanz Des Knoblauchols. 1. Mitteilung uber *Allium* Substanzen. *Helv. Chim. Acta* **31**, 189-210 (1948).
8. Stoll, A. and Seebeck, E. Die Synthese Des Naturlichen Alliins and Seiner Drei Optisch Aktiven Isomeren. 5. Mitteilung uber *Allium*-Substanzen, *Helv. Chim. Acta* **34**, 481-487 (1951).
9. Rundqvist, C.: Pharmacological investigation of *Allium* bulbs. *Pharmaceutiskt Notisblad.* **18**, 323-333 (1909).
10. Caragay, A. B.: Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* **46**, 65-68 (1992).
11. Augusti, K. T. and Mathew, P. T.: Lipid lowering effect of allicin (diallyl disulphide-oxide) on long term feeding to normal rats. *Experientia* **30**, 468-470 (1974).
12. Rees, L. P., Minney, S. F., Plummer, N. T., Slator, J. H. and Skyrme, D. A.: A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 303-307 (1993).
13. Block, E., Ahmed, S., Jain, M. K., Creely, R. W, Apitz-Castro, R. and Cruz, M. R.: (E,Z)-Ajoene: A potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8295-8296 (1984).
14. Wills, E. D.: Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic. *Biochem. J.* **63**, 514-520 (1956).
15. Adetumbi, M., Javor, G. T. and Lau, B. H. S.: *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis in *Candida albicans*, Antimicrob. *Agents Chemother.* **30**, 499-501 (1986).
16. Ghannoum, M. A.: Studies of the antimicrobial mode of action of *Allium sativum* (garlic). *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2917-2924 (1988).
17. Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C. and Thompson, N. H.: *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. Antimicrob. *Agents Chemother.* **32,** 1763-1768 (1988).
18. Focke, M., Feld, A. and Lichtenthaler, H. K.: Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS* **261**, 106-108 (1990).
19. Kyung, K. H., Kim, M. H., Park, M. S. and Kim, Y. S.: Alliinase-independent inhibition of *Staphylococus aureus* B33 by heated garlic. *J. Food Sci.* **67**, 780-785 (2002).
20. Kim, J. W. and Kyung, K. H.: Antiyeast activity ofheated garlic in the absence of alliinase enzyme action. *J. Food Sci.* **68**, 1766-1770 (2003).
21. Dababneh, F. A. and Al-Delaimy, K. S.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by garlic extract. *Lebensm. Wissenschaft. Technol.* **17**, 29-31 (1984).
22. Mantis, A.J., Karaioannoglou, P. G., Spanos, G. P. and Panetos, A. G.: The effect of garlic extract on food poisoning bacteria in culture media. I. *Staphylococcus aureus*. *Lebensm. Wissenschaft. Technol.* **11**, 26-28 (1978).
23. Johnson, M. G. and Vaughn, R. H.: Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl. Microbiol.* **17**, 903-905 (1969).
24. Saleem, Z. M. and Al-Delaimy, K. S.: Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. J. Food Prot. **45**, 1007-1009 (1982).
25. De Wit, J. C., Notermans, S., Gorin, N. and Kampelmacher, E. H.: Effects of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Prot.* **42**, 222-224 (1979).
26. Mantis, A. J., and Koidis, P. A., Karaioannoglou, P. G. and Panetos, A. G.: Effect of garlic extract on food poisoning bacteria. Lebensm. *Wissenschaft. Technol.* **12**, 230-232 (1979).
27. Barone, F. E. and Tansey, M. R.: Isolation, purification, identification, synthesis, and kinetics of activity of the anticandidal component of *Allium sativum*, and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* **69**, 793-825 (1977).
28. Al-Delaimy, K. S. and Ali, S. H.: Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **21**, 110-112 (1970).
29. Srivastava, K. C., Perera, A. D. and Saridakis, H. O.: Bacteriostatic effects of garlic sap on Gram negative pathogenic bacteria: An in vitro study. *Lebensm. Wissenschaft. Technol.* **15,** 74-76 (1982).
30. Moore, G. S. and Atkins, R. D. The fungicidal and fungistatic effects of aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia* **69,** 341-348 (1977).
31. Tansey, M. R. and Appleton, J. A.: Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* **67**, 409-413 (1975).
32. Singh, K. V. and Shukula, N. P.: Activity of multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia* **15**,

313-315 (1984).
33. O'Gara, E. A., Hill, D. J. and Maslin, D. J.: Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2269-2273 (2000).
34. Ross, Z. M., O'Gara, E. A., Hill, D. J., Sleighttholme, H. V. and Maslin, D. J.: Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**, 475-480 (2001).
35. Small, L. D., Bailey, J. H. and Cavallito, C. J.: Comparison of some properties of thiosulfonates and thiosulfinates. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3565-3566 (1949).
36. Brown, H. D., Matzuk, A. R., Becker, H. J., Conbere, J. P., Constantin, J. M., Solotorovsky, M., Winsten, S., Ironson, E. and Quastel, J. H.: The antituberculosis activity of some ethylmercapto compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3860 (1954).
37. Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukyda, H., Fujino, T. and Suzuki, A.: Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4238-4242 (1996).
38. Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H. and Nakagawa, S.: Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 615-617 (1987).
39. Lemar, K. M., Turner, M. P. and Lloyd, D. : Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 398-405 (2002).
40. Lemar, K. M.., Muller, C. T., Plummer, S. and Lloyd, D. : Cell death mechanisms in the human opportunistic pathogen *Candida albicans*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 685-686 (2003).
41. Harris, J. C., Plummer, S., Turner, M. P. and Lloyd, D. : The microaerophilic flagellate *Giardia intestinlis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective antigiardial. *Microbiology* **146**, 3119-3127 (2000).
42. Mae, T., Ohira, K. and Fujiwara, A.: Fate of (+)*S*-methyl-L-cysteine sulfoxide in Chinese cabbage, *Brassica pekinesis* RUPR. *Plant Cell Physiol.* **12**, 1-11 (1971).
43. Lawson, L. D. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. *In* Lawson, L. D. and Bauer, R. (eds.) Phytomedicines of Europe: Their chemistry & biological activity. *ACS Symposium Series* **691**, 176-209 (1998).
44. Nomura, J., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O.: *S*-Alkylcysteinase: Enzymatic cleavage of *S*-methyl-L-cysteine and its sulfoxide. *J. Biol. Chem*. **238**, 1441-1446 (1963).
45. Murakami, F.: Studies on the nutritional value of *Allium* Plants (XXXVI) Decomposition of alliin homologues by microorganism and formation of substance with thiamine masking activity. *Vitamins (Tokyo)* **20**, 126 (1960).
46. Brodnitz, M. H., Pascale, J. V. and von Derslice, L.: Flavor components of garlic extract. *J. Agric. Food Chem*. **19**, 273-275 (1971).
47. Yu, T.-H. and Wu, C.-M.: Stability of allicin in garlic juice. *J. Food Sci.* **54**, 977-981 (1989).
48. Kim, J. W., Huh, J. E., Kyung, S. H. and Kyung, K. H.: Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 235-239 (2004).
49. Choi, J. H. and Kyung, K. H.: Allyl alcohol is the sole antiyeast compound in heated garlic extract. *J. Food Sci.* **70**, M305-M309 (2005).
50. Pentz, R. and Siegers, C.P.: Garlic preparations: Methods for quantitative and qualitative assessment of their ingredients. In: Garlic, The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species, 2nded. (eds. Koch, H. P. and Lawson, L. D.). Williams and Wilkins (1996).
51. Kim, J. W., Kim, Y. S. and Kyung, K. H.: Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *J. Food Prot.* **67**, 499-504 (2004).
52. Lawson, L. D., Wang, Z. J. and Hughes, B. G.: Identification and HPLC analysis of sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Med.* **57**, 363-370 (1991).
53. Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M. and Einer, L.: The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes amy contribute to its biological activity. *Bioch. Biophys. Acta* **1463**, 20-30 (2000).
54. Silva, J. M. and O'Brien, P. J.: Allyl alcohol- and acrolein-induced toxicity in isolated rat hepatocytes. *Archiv. Biochem. Biophys.* **275**, 551-558 (1989).
55. Lee, S., Woo, Y. H. and Kyung, K. H.: Allyl alcohol found in heated garlic is a potent selective inhibitor for yeasts but not for bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol*. In press (2006).
56. Youngleson, J. S., Santangelo, J. D., Jones, D. T. and Woods, D. R.: Cloning and expression of a *Clostridium acetobutylicum* alchohol dehyadrogease gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 676-682 (1988).
57. Rando, R. R.: Allyl alcohol-induced irreversible inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 2328-2331 (1974).
58. Dickinson, F. and Dalziel, K.: The specifications and configurations of ternary complexes of yeast and liver alcohol dehydrogenases. *Biochem. J.* **104**, 165-172 (1967).
59. Lorowitz, W. and Clark, D.: *Escherichia coli* mutants with a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **152**, 935-938 (1982).
60. Wills, C. and Hom, D.: An efficient selection producing structural gene mutants of yeast alcohol dehydrogense resistant to pyrazole. *Genetics* **11**, 791-795 (1988).