J. Fd Hyg. Safety 15(3), 235–240 (2000)

부추의 항균활성 물질의 분리

홍정화† · 이미형* · 강민철 · 허성호*****

*인제대학교 식품과학부 · *유니푸드테크(주) · **식품의약품안전청 부산지청,*
*****동의공업대학 식품과학연구소*

Separation and Identification of Antimicrobial Compounds from Korean Leek (*Allium tuberosum*)

Jeong-Hwa Hong†, Mi-hyoung Lee*, Minchul Kang and Sung-Ho Hur*****

School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
**Unifood Tech, Kimhae 621-010, Korea*
***Korea Food & Drug administration, Pusan 608-080, Korea*
****Institute of Food science, Dongeui Institute of Technology, Pusan 614-715, Korea*

ABSTRACT – Various separation techniques of antimicrobial compounds from food materials have proven to be ineffective, involving liquid-liquid extraction and chromatography. We established efficient separation procedure for partially purifying antimicrobial compounds from Korean leek. Separation procedures consisted of ultrafiltration, liquid-liquid extraction, TLC and HPLC. Molecular weight of antimicrobial compounds were less than 5,000 dalton. Major compounds were propenyl methyl disulfide, S-methyl methylthiosulphonate and dimethyl disulfide.

Key word □ Korean leek, Antimicrobial activity, Separation

부추(*Allium tuberosum*)는 백합과, 파속에 속하는 다년생 초본으로 한국, 중국, 대만, 몽고, 일본, 동북아시아 지역에 분포하며 원산지는 동아시아 지역이다.[1-2] 한방에서 부추는 맛이 맵고 성질은 따뜻하여 소화관을 따뜻하게 하고, 혈액 순환을 조절하며 소염과 해독작용을 한다고 알려져 있다. 부추의 독특한 냄새와 매운 맛은 황화아릴에 의한다고 알려져 있는데 이러한 성분들은 항균활성을 나타낼 가능성이 매우 높다.[3]

우리나라에 자생하는 식물을 대상으로한 항균활성에 관한 연구가 많이 있으나 항균물질의 분리와 확인이 부족하여 연구결과를 실용화하기에는 미흡하다. 이에 반해 외국에서는 음식의 풍미를 위해 사용하는 향신료의 항균작용에 관한 많은 연구 결과 중 육류와 생선의 향신료로 쓰이는 rosemary, sage등은 22종의 그람음성균과 24종의 그람양성균에 대한 높은 항균활성이 보고되었고[4] 건강식품으로 잘 알려진 마늘, 양파와 식물의 정유성분에 대한 항균활성이 연구되었다.[5-8]

본 논문에서는 전보[9]에 이어 부추의 항균성물질 분리에 있어 항균활성의 소실방지와 더불어 효과적인 분리방법을 확립하기 위한 최적 공정의 제시와 함께 항균물질의 화학구조를 규명하는데 목적을 두었다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

재료

경남 김해시 대동면 산지에서 재배된 부추를 대동농협을 통해 구입하여 −70°C로 동결저장하여 사용하였다.

항균활성시험

항균활성 시험균주로 이용한 식중독균인 *Bacillus cereus*는 내열성 포자 형성균으로서 부추의 항균활성에 대하여 민감한 반응을 나타내어 선택하였다. 각 분리단계별로 얻어진 분획에 대하여 *Bacillus cereus* KCTC 1012를 표준균주로 agar diffusion method에 의하여 항균활성을 측정하였다.[10-11] *Bacillus cereus*를 600 nm, 흡광도 0.1이 되도록 희석한 일정농도를 증균배양하여 plate count agar에 도말한 후 paper disc (ϕ : 8 mm)에 실험과정에서 분리한 각각의 시료를 30 μl씩 주입하여 35°C, 24시간 배양한 후 항균 활성환

의 지름을 측정하였다.[12]

항균물질의 분리

Ultrafiltration

분자량 5,000 dalton으로 분리할 수 있는 한외여과막(Centrisart 13229, Sartorius)을 이용하여 항균물질을 분리하였다. 생부추를 원심분리(10,000×g, 30 min)하여, glass filter(GF/C)로 여과한 후, 한외여과막이 부착되어 있는 centrisart를 swing형 원심분리기에서 원심분리(2300×g, 60 min)하여 여과액과, 상청액에 여과액 용량에 해당하는 증류수를 가하여 항균활성을 측정하였다.

Liquid-liquid extraction

한외여과액 50ml에 동량의 증류수를 가하고 다시 hexane 100 ml를 가하여 분액여두에 넣어 5분간 진탕한 후 haxane층과 물층으로 분리하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 이후 수용액층을 chloroform, ethylacetate, butanol 순으로 hexane과 동일하게 용매분획하였다. 각 용매분획층을 회전진공증발기로 건고한 후 건고물의 무게를 측정하고 건고물 무게의 10배에 해당하는 추출용매로 용해시켜 agar diffusion method로 항균활성을 평가하였다.[13]

Thin layer chromatography

Liquid-liquid extraction에서 항균활성을 나타내는 부분을 TLC plate (Merck, Kieselgel 60 F_{254})에 spotting하여 chloroform과 methanol(10 : 1, v/v) 용매로 전개시켰다. 그 후, TLC에 나타난 영역을 각각 취하여 일정량의 chloroform과 methanol 1 : 1(v/v) 용매에 용출시킨 후 paper disc에 주입, 건조하여 항균활성을 측정하였다.[14]

High performance liquid chromatography

TLC에서 항균활성을 나타낸 영역을 취하여 이동상으로 용해하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 후, Sep-Pak C_{18}로 처리한 시료를 HPLC로 분석하였다.[15] Column은 C_{18}(Finepak, 30×300 mm, Jasco, Japan)을 사용하였고, UV detector 254 nm, 시료 20 μl, 유속은 0.5 ml/min로 하였다. 이동상으로는 물과 methanol을 gradient로 분리하였다. 초기 10분간은 20% methanol로, 30분동안 methanol 100%로 증가시켜 측정하였다.

GC/MS

부추의 항균활성 물질의 분자구조를 밝히기 위하여 시료를 GC/MS로 측정하였으며, Techmar LSC-2000 (Techmar Co., Cincinnati, USA)를 이용하여 purge and trap method에 따라 수행하였다. 시료 3 ml 당 40 ml/min, 20분간 질소가스를 이동시켜 포집하였다. Dry purge에서 2분간 흡수되지 않은 물질과 수분을 제거하였고, 초기 50°C에서 휘발성물질을 흡착하여 200°C로 승온시켜 탈착하였다. 주요 향기성분은 standard 화합물과 상응하는 retention time과 mass spectra data와 비교하여 항균활성물질을 확인하였다.[16]

결과 및 고찰

Ultrafiltration

분자량 5,000 dalton 으로 한외여과하여 여액은 바로 항균활성을 측정하는데 사용하고 한외여과막을 통과하지 못한 분자량 5,000 dalton 이상의 물질은 증류수를 이용하여 여액과 동일한 용량이 되도록 첨가하였다. 분자량 5,000 dalton 이상에서는 환이 생기지 않았고, 5,000 dalton 이하에서 14 mm의 환이 나타났다. 분자량 5,000 이하에서만 항균활성이 나타나는 것으로 보아 항균물질의 분자량은 5,000 이하의 저분자 물질임을 알 수 있었다(Fig. 1). 이는 마늘의 항균물질로 잘알려진 allicin의 분자량 162, 갓의 항균물질($C_{22}H_{22}O_{12}$) 분자량 478[13], 김등의 연구에 의한 부추의 항균물질 분자량이 200-400 정도로 보고된[15] 바와 비교할 때 본 실험에 이용한 부추의 분자량도 저분자물질임을 추정할 수 있었다.

Liquid-liquid extraction

대체로 *Allium*속의 항균활성물질은 SH기를 포함하는 것

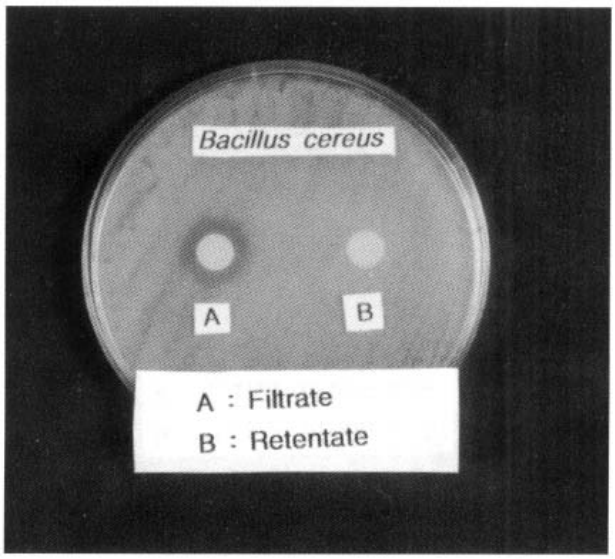

Fig. 1. Effect of ultrafiltration on the antimicrobial activity of Korean leek extact (MW cut off 5,000 dalton).

Table 1. Composition of antimicrobial activities with different fractions from liquid-liquid extraction using ultrafiltrate of Korean leek extract

Strains	Clear zone (mm*)			
	Hexane	Chloro-form	Ethylac-etate	Butanol
Staphylococcus aureus	18	30	16	-**
Streptococcus mutans	-	-	-	-
Bacillus cereus	22	33	23	-
Bacillus subtilis	18	33	19	-
Lactobacillus plantarum	-	-	-	-
Escherichia coli O157:H7	16	25	14	-
Salmonella typhimurium	14	22	15	-
Pseudomonas fluorescens	13	24	15	-
Pichia membranaefaciens	-	40	-	-

* : Paper disc diameter : 8 mm
** : No inhibitory zone was formed

으로 알려져 있으며, 그 보다도 더 많은 물질이 복합적으로 이루어져 있다고 추정되고 있다. 따라서 이 복합물을 분리하는 것은 각 활성기의 전위도 차를 이용하는 것이 대부분이다. 그러므로 유기용매를 이용하여 이 복합물을 분리해서 활성도를 찾는 것은 매우 의미있는 것으로 판단되어 극성

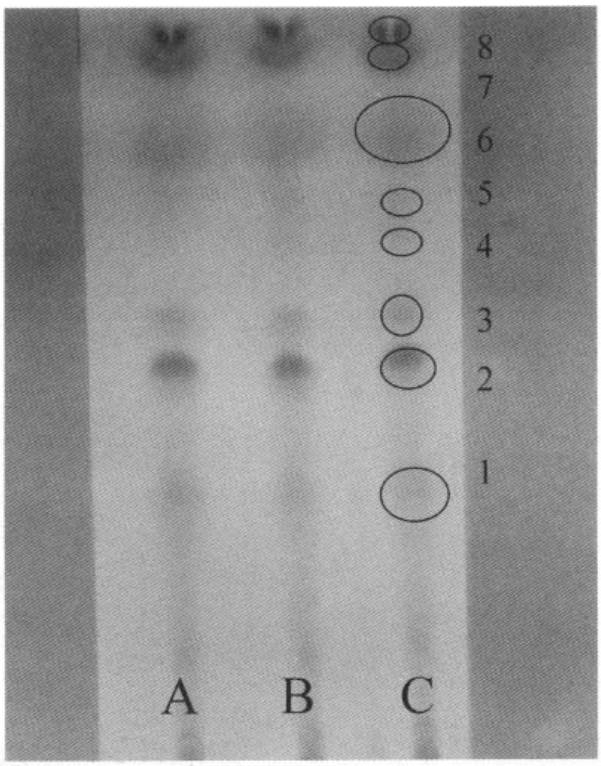

Fig. 2. TLC chromatogram of chloroform fraction from liquid-liquid extraction (A, 30 μl: B, 20 μl: C, 10 μl)

Table 2. Antimicrobial activity of different TLC fractions toward *Bacillus cereus*

Number of TLC fraction	Clear zone (mm*)
Control**	20
1	-***
2	9.5
3	9.0
4	9.0
5	8.5
6	27.5
7	10.0
8	9.5

* : Paper disc diameter : 8 mm
** : Extract of raw Korean leek
*** : No inhibitory zone was formed

정도가 다른 용매로 분획을 하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과 chloroform 분획에서 모든 균주에 대하여 가장 높은 항균활성환을 나타내었다(Table 1). 이는 산초의 용매분획에 있어 chlorofom 분획에서 ethylacetate 분획보다 조금 더 항균활성을 나타내는 것과 일치하였고[14] 갓의 항균물질이 chloroform 분획 보다는 ethylacetate 분획에서 좀 더 활성을 나타낸다는 결과와는 약간의 차이를 보였다.[13]

Thin layer chromatography

Chloroform 분획의 항균물질을 분리하기 위하여 박층 크로마토그라피를 이용하였으며 그 결과는 Fig 2와 같다. UV 254 nm 를 조사한 결과 8개의 분리된 층을 얻었고, 이 부분들을 분취하여 용매에 녹여 여과한 후 농축하여 agar diffusion법으로 항균활성을 측정하였다. TLC fraction 6번에서 27.5 mm로 가장 큰 항균활성을 나타내었다 (Table 2). TLC 이후, ninhydrin 단백질 발색시약으로 반응시켰으나 발색반응이 나타나지 않아 단백질 계통이 아닌 부추자체가 함유한 독특한 물질이라 추정되었다.

High performance liquid chromatography

TLC 실험에서 항균활성이 크게 나타난 6번 영역이 UV

Table 3. Antimicrobial activity of different peaks of HPLC from TLC fraction No. 6

Number of HPLC peak	Clear zone (mm*)
1	-**
2	9.5
3	13.5
4	-
5	-

* : Paper disc diameter : 8 mm
** : No inhibitory zone was formed

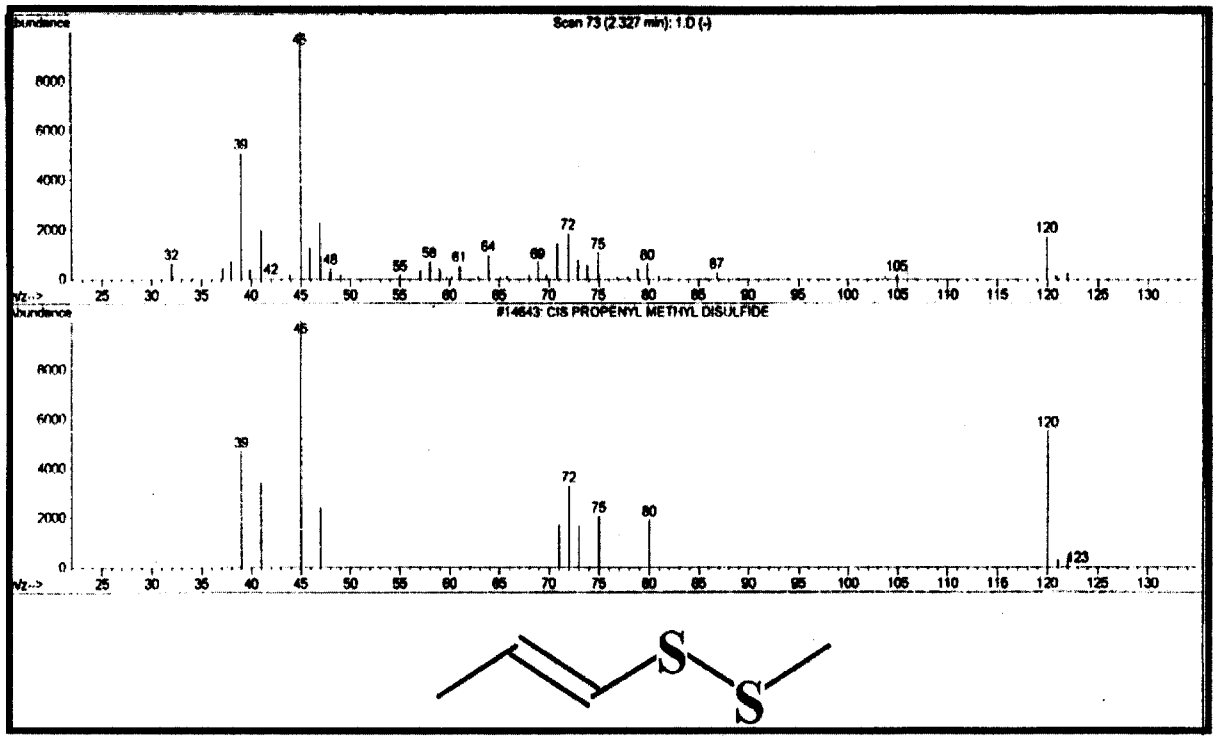

Fig. 3. Structure of *cis*-propenyl methyl disulfide from HPLC fraction No. 2.

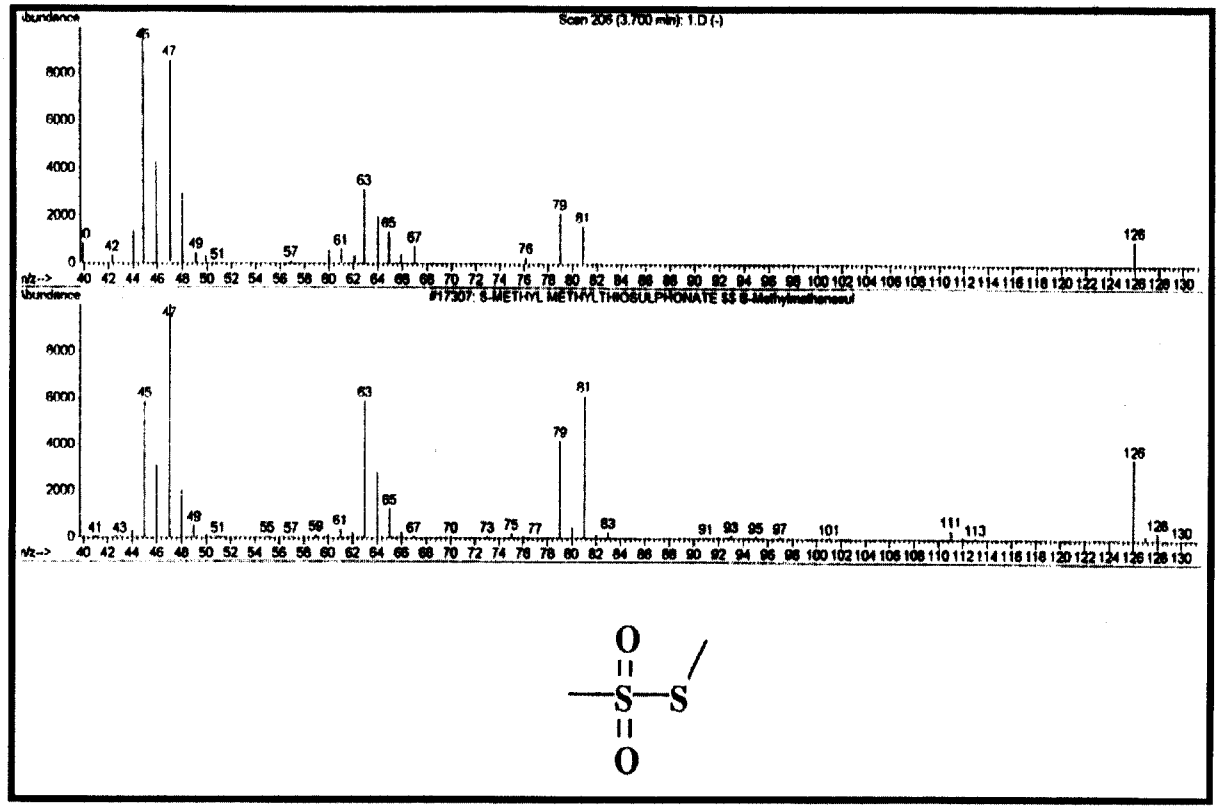

Fig. 4. Structure of S-mehtyl methylthiosulphonate from HPLC fraction No. 2.

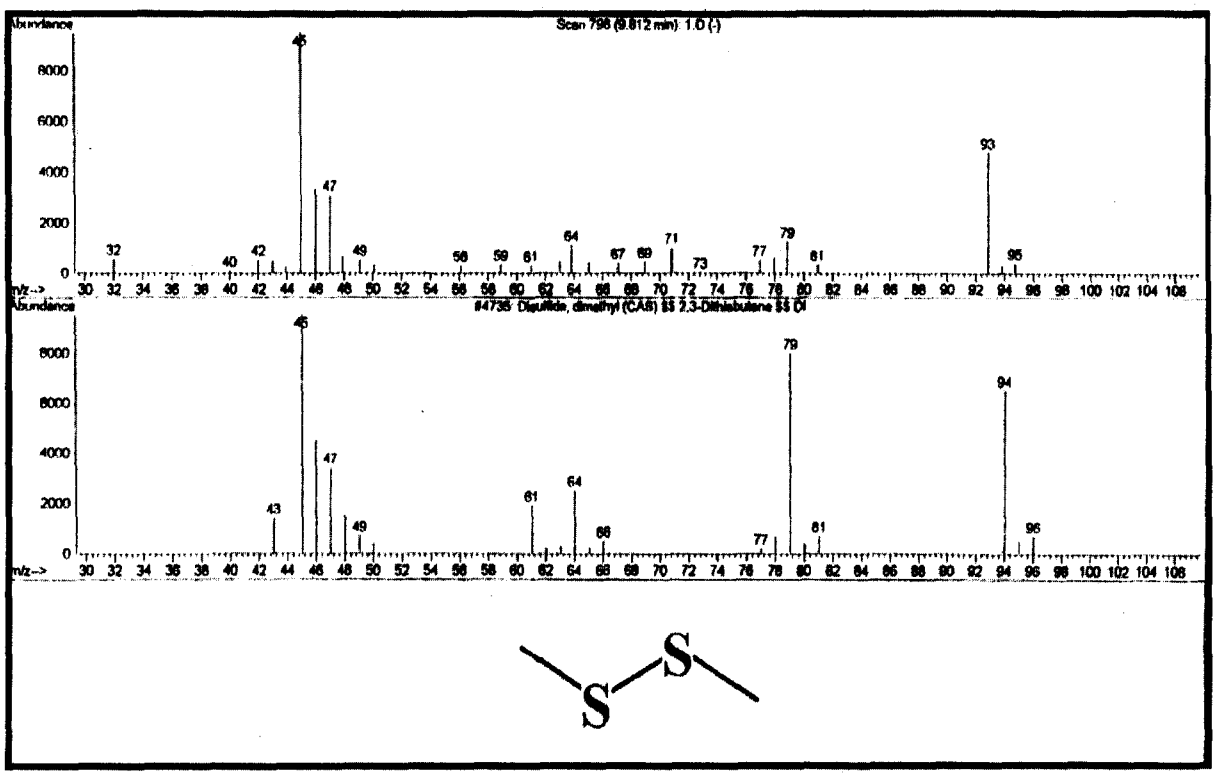

Fig. 5. Structure of dimetyl disulfide from HPLC fraction No. 3.

254 nm에서 측정이 가능하였으므로, UV detector의 파장을 254 nm로 결정하였다. ODS column을 사용하여 methanol과 물의 gradient로 용출시킨 결과 5개의 peak을 얻었다. 생부추즙을 대조구로 하여 비교하면 1번, 4번, 5번 peak에서는 항균활성이 나타나지 않았고 2번 peak에서는 9.5 mm, 3번 peak에서는 13.5 mm를 나타내었다. 따라서 항균물질은 2가지 이상의 복합체로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Table 3).

화학적 구조

GC/MS의 결과 부추의 항균물질은 황화합물인 *cis*-propenyl disulfide(Fig. 3), S-methyl methylthiosulphonate (Fig 4), dimethyl disulfide(Fig 5)로 판명되었다. 황화합물은 allium속 식물에서 다량 함유되어 있고, 이것은 미생물 세포내 주요 단백질과 결합하거나, 호흡에 관여하는 효소의 SH기와 반응한다는 보고가 있다.[17]

현재 많은 연구가 진행된 마늘의 경우 항균작용을 하는 allicin과 이와 유사한 methyl methanethiosulfinate의 항균활성 기작을 살펴보면 thiosulfinate가 세포내 중요한 단백질인 SH기와 반응해 단백질 활성을 저해하는 것으로 추정되고 있다. Thiosulfinate의 구조중 -S(O)S-기가 항균활성을 나타내고, 이것은 아미노산인 cysteine과 쉽게 결합한다는 것이 확인되었다. 기타 마늘의 항미생물 작용에 대한 설명으로는 allicin이 호흡에 관여하는 효소의 SH기와 반응한다는 것과 지방산 합성에 관여하는 acetyl-Co A synthetase를 특이하게 저해한다는 보고가 있다.[18-20] 그리고, sulfur dioxide의 항균활성 기작은 NAD-dependent reaction에서 황에 대한 반응이 민감하므로 미생물 내에서 enzyme-catalyzed reaction을 저해하는 것으로 알려지고 있다.

감사의 글

본 연구는 1998년 농림부 첨단기술개발사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

식품의 항균물질 분리에 있어 여러 가지 방법이 있지만 오차와 손실이 많아 실용화 하기에는 많은 문제점이 있다. 현재 일반적인 분리법으로 유기용매분획법, 크로마토그래피 등이 있으나, 많은 시간과 노력을 필요로 하며 시료에 따라 항균활성이 소실되는 경우가 많다. 본 연구는 전편의 '부추의 미생물학적 항균활성 특성과 가공식품에의 응용' 에 이어 부추의 항균활성 물질을 효과적으로 분리하기 위한 방법을 정립하고 항균활성 물질을 확인하였다. 부추의 항균활성 물질 분리를 위하여 ultrafiltration, liquid-liquid extraction, TLC, HPLC 순으로 정제하였다. Ultrafiltration 결과 항균물질은 분자량 5,000 dalton 이하의 저분자 물질이었고, TLC로 분리된 8개의 spot중 대조군에 비하여 높은 항균활성을 나타내는 1개의 spot을 추출하여, HPLC로 유효 peak 2개를 얻었고 각 peak 성분을 GC/MS로 확인한 결과 cis-propenyl methyl disulfide, S-methyl methylthiosulphonate, dimethyl disulfide등의 황화합물로 구성된 복합물질로 확인되었다.

참고문헌

1. 이유성, 이상태: 현대식물분류학. 우성문화사, 서울, pp.471-473 (1991).
2. 이창복: 신고식물분류학. 향문사, 서울, pp.334-341 (1993).
3. 농업정보신문: 월간원예 168호. 농업정보신문, 서울, pp.102-105 (1998).
4. Larry R. Beuchat and David A. Golen.: Antimicrobials occurring naturally in foods. *J. Food technology.* Jan., 134-142 (1989)
5. Maria B. Z., Lamar S. R. Jose S. M. Miriam L. S. and Arnaldo R. L.: Volatile sulfides of the amazonian garlic bush. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1009-1010 (1984).
6. D. E. Conner and L. R. Beuchat.: Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* **49**, 428-434 (1984).
7. Fleming, H.P. and Walter, W. M.: Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *J. Microbiology.* **26**, 777-782 (1980).
8. Jamal N. B. and Ibrahim A. W.: Citric acid and antimicrobial affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J. Food Sci.* **59**, 130-134 (1994).
9. 홍정화, 이미형, 전치수, 허성호: 부추의 항균활성 특성과 식품에의 응용. 한국식품위생안전성학회지, **14**, 422-427 (2000).
10. 이병완, 신동화: 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균물질의 검색. 한국식품과학회지, **23**, 200-204 (1991).
11. Bauer, A.W., Kirby, M.M., Sherris, J.C., and Turck, M : Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493 (1966)
12. 신동화: 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용. 식품과학과 산업, **23**, 68-77 (1990).
13. 강성구: 갓의 항균물질의 분리 및 항균성. 한국영양식량학회지, **24**, 695 (1995).
14. 김순임, 한영실: 산초로부터 항균성 화합물의 분리 및 동정. 한국조리과학회지 **13**, 56-63 (1997).
15. 김선재, 박근형: 부추의 항미생물 활성물질. 한국식품과학회지, **28**, 604-608 (1996).
16. 이상화, 주광지: Purge-and-trap법에 의해 추출한 참기름 향기분석. 한국식품 과학회지, **30**, 260-265 (1998).
17. Heath, H.B. and Reineccius, G.: Flavor chemistry and technology. Macmillan, UK (1986).
18. Small, L. D., Bailey, J. H. and Cavallito, C. J.: Comparison of some properties of thiosulfonates and thiosulfates. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 3536 (1949).
19. Zighbi, M. G.: Volatile sulfides of the amazonian garic bush. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1009-1010 (1984).
20. Kwon, H., Cha, I. and Lee, W.: Antimicrobial activity of volatile flavor components from Houttuynia cordata Thunb. *J. Food Sci. Nutr.*, **1**, 208-213 (1996).