

식물 모상근 배양을 이용한 유용2차 대사산물에 관한 연구(II) - Allylisothiocyanate의 항균·살균 효과 -

†^{1,2,3}박 돈 희 · ^{1,2}정 귀 택 · ^{1,2}양 송 원 · ⁴황 백 · ⁵우 희 권 · ⁶이 준 행 · ⁷조 영 일
전남대학교 화학공학부¹, 생물산업기술연구소², 축매연구소³, 생물학과⁴, 화학과⁵, 의과대학 미생물학교실⁶
연세대학교 화학공학과⁷
(접수 : 2001. 7. 9., 게재승인 : 2001. 8. 22.)

On the Study of Useful Secondary Metabolites Using Plant Hairy Root Cultures - Effects of Antimicrobial and Disinfectant Activity of Allylisothiocyanate -

Don-Hee Park^{†1,2,3}, Gwi-Taek Jeong^{1,2}, Song-Won Yang^{1,2}, Baik Hwang⁴, Hee-Gweon Woo⁵,
Joon-Haeng Rhee⁶, and Yung-Il Joe⁷

¹Faculty of Chemical Engineering, ²Institute of Bioindustrial Technology, ³Institute of Catalysis, ⁴Dept. of Biology,
⁵Dept. of Chemistry, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
⁶Dept. of Microbiology, Medical School, Chonnam National University, Kwangju 501-190, Korea
⁷Dept. of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received : 2001. 7. 9., Accepted : 2001. 8. 22.)

It is known as the allylisothiocyanate which is extracted from *Wasabia koreana*'s root. It contains 80% of the oil refining material. The allylisothiocyanate as secondary metabolites of *Wasabia koreana* plant is a possibility of having the high value which is useful. The research observed the allylisothiocyanate material as the basic study for industrializing to make its mass product. Finally, it shows that the antimicrobial and disinfectant effect against the microbe incubated adding 50 ppm allylisothiocyanate for 15 hours.

Key Words : allylisothiocyanate, antimicrobial activity, *Wasabia koreana*, secondary metabolites

서 론

고추냉이는 우리나라 울릉도에서 오랜 옛날부터 자생하고 있는 식물이다. 고추냉이는 원래 *Wasabia koreana*로 학명이 되어 있었으며, 최근 들어 일본학자들에 의하여 *Wasabia japonica*라고 명명되어 세계적으로 널리 불려지고 있다. 이 고추냉이는 십자화과에 속하는 상록, 다년생, 속근성 반음지 식물로서 풍미, 향미 그리고 신미를 가지고 있으며(1,2), 주요 성분은 sinigrin, allylisothiocyanate, butylisothiocyanate, vitamin C, KHSO₄ 그리고 포도당 등으로 구성되어 있다(3,4). 특히 allylisothiocyanate (AIT)는 살균, 살충작용 및 소화를 촉진하고 비타민 C의 산화 억제뿐만 아니라 최근에는 성인병 예방

과 항암 효과가 있다고 보고된 바 있다(5-7). AIT는 휘발성 물질로서 식물체내에서 포도당 및 황산수소칼륨과 결합된 glucosinolate 즉 sinigrin이라는 향과 맛이 없는 안정된 화합물 상태로 존재하다가 식물체 조직이 절단되거나 상처를 입으면 고추냉이의 조직 중에 들어 있는 myrosinase 효소(myrosulfate와 thioglucosidase의 복합효소)의 작용으로 sinigrin이 가수분해되어 AIT, 포도당 그리고 황산수소칼륨 등이 생산되어 강렬한 향미가 생성된다(2,3). 또한 AIT (H₂C=CHCH₂NCS)의 일반적인 특성은 무색 또는 옅은 노란색을 띠며, 매우 코를 찌르는 자극적인 냄새가 난다. 매운 맛이 나며 광학적으로 불활성이다(8).

본 연구는 식물조직 배양을 이용하여 유용 2차 대사산물을 얻어서 고부가가치 상품으로 개발하는 것이 목표이다. 상기의 목표를 달성하기 위한 1단계 연구로서 고추냉이의 2차 대사산물인 allylisothiocyanate의 항균 및 살균 효과를 관찰하였다.

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1841, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : dhpark@chonnam.ac.kr

Table 1. List of strains used for antimicrobial experiments

Strains	Medium
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LB broth (pH 7.0, 37°C)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM broth (pH 7.0, 30°C)
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	YM broth (pH 7.0, 30°C)
<i>Thiobacillus</i> sp. IW	<i>Thiobacillus</i> broth (pH 8.0, 30°C)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Mueller Hinton broth (pH 7.0, 37°C)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Mueller Hinton broth (pH 7.0, 37°C)
<i>Vibrio vulnificus</i> M06-2410	2.5 LB broth (pH 7.0, 37°C)

재료 및 방법

시약 및 사용 균주

고추냉이 시료는 색소나 다른 첨가물을 넣지 않은 중국산 분말 원료를 승진식품(주)으로부터 제공받아 사용하였으며, allylthiocyanate는 Aldrich에서 구입하였고, 다른 시약은 표준품을 사용하였다. 또한 항균 및 살균 효과를 측정하기 위하여 실험실에서 용이롭게 취급하는 균을 선택하였으며, 자세한 이름들은 Table 1에 나타났다.

고추냉이의 성분 추출

고추냉이 분말 50 g을 삼각 플라스크에 넣고 증류수 100 mL를 첨가한 후 완전 혼합하여 37°C에서 1시간 가량 추출시킨 후, 300 mL의 증류수를 다시 첨가한 후 3시간 정도 추출하였다. 이 추출액을 여과지로 여과한 후 여과액을 수증기 증류법으로 4-5시간 동안 증류하여 100 mL 정도의 응축액을 받아 실험 재료로 사용하였다.

AIT 시료 제조 및 첨가

AIT 시료는 95% AIT 용액 1 mL를 70% EtOH 10 mL에 녹여 사용하였고, AIT 시료는 0, 10, 20, 30, 그리고 50 ppm 단위로 첨가하였다. 그러나 *E. coli* 미생물에는 AIT 첨가 농도를 50, 100, 200 그리고 300 ppm으로 실험을 수행하였다.

미생물에 대한 항균·살균 효과 측정

(1) 각 시료의 미생물 증식 저해도의 측정

AIT시료를 준비된 ppm 단위량 만큼 배지에 첨가하고 대상 미생물의 최적온도에서 120 rpm으로 혼탕배양 한 후 일정량 배양액을 채취하여 미생물 농도를 분광광도계(Shimadzu, UV-160A, Japan)로 이용하여 620 nm에서 측정하여 대조구와 시료가 첨가된 실험구와의 차이로 측정하였다.

(2) 원판 확산법 (Paper disc method)에 의한 AIT의 항균성 측정

대상 미생물 균을 MH(Mueller Hinton) 배지에서 18시간 배양시킨 후 100배 희석하여 MH 한천 평판배지 전면이 멸균된 면봉으로 균 희석액 200 µL를 균등하게 도말한 후, 3-5 분간 건조하였다.

건조된 배지 위에 멸균된 paper disc (φ:8 mm, Advantec)를 올려놓고 밀착시킨 후 paper disc에 각각의 ppm단위로 정량된 AIT 시료를 20 µL 씩 점적 한 후, 배지 뚜껑을 밀어 닫아 온도 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 paper disc 주위

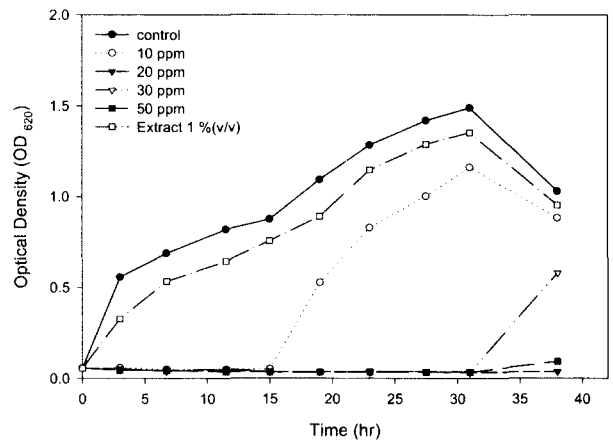


Figure 1. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *vibrio vulnificus* M06-2410.

의 균증식 억제대 (clear zone)의 직경크기 (φ:mm)를 측정하여 비교하였다(9).

(3) AIT의 최소발육저지농도 및 최소살균 농도 측정,

각 시험관에 MH 배지 5 mL를 분주한 후 시료액 5 mL를 제1 시험관에 넣고 잘 혼합한 후 5 mL를 제2시험관으로 옮긴다. 반복 조작하여 2배 계단 희석된 시료 함유배지를 조제한다. 마지막 시험관에는 시료를 넣지 않고 대조용으로 사용한다. 각 시험관 속 MH 배양액에서 18시간 배양시킨 후 균주액 10⁴배정도 희석한 균주액을 5 mL씩 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 균의 증식유무를 관찰한다.

균이 증식하지 않은 배지 중 시료의 농도가 가장 낮은 배지의 시료농도를 최소발육저지농도(Minimal Inhibitory Concentration: MIC)로 표기한다. 또 균이 증식하지 않은 배지를 MH 한천 평판배지에 일정량 도말하여 37°C에서 18시간 후에 균의 증식상태를 보아 균의 증식이 없는 배지 중 가장 낮은 농도의 시료를 최소살균농도(Minimal Bactericidal Concentration: MBC)로 판정한다(10,11).

결과 및 고찰

Figure 1은 AIT 농도 변화에 따른 *Vibrio vulnificus* 균의 거동 상태를 관찰한 결과의 그림이다. 그림에서 Extract 1 % (v/v)는 고추냉이 시료의 추출액을 1 % (v/v)의 농도로 배지에 첨가하여 균의 증식 억제 정도를 관찰한 것이다. 이 그림에서 AIT의 농도 10 ppm 이상을 균에 투입하면 적어도

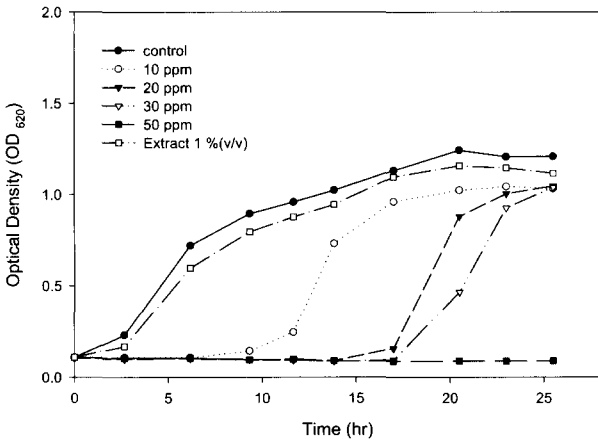


Figure 2. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *thiobacillus* sp. IW.

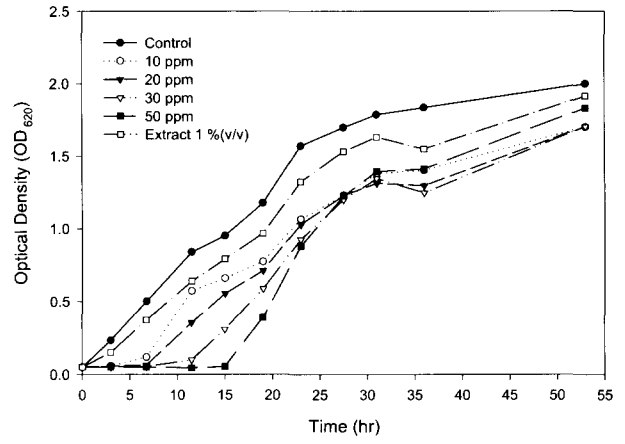


Figure 5. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

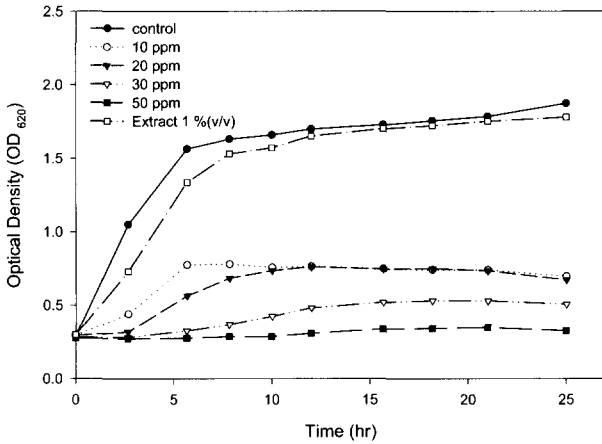


Figure 3. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *S. cerevisiae*.

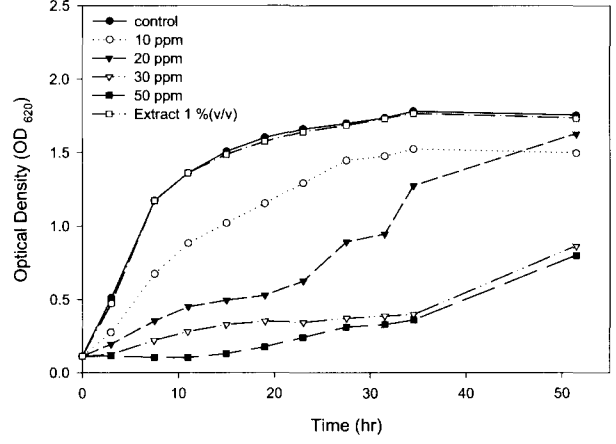


Figure 6. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *staphylococcus aureus* ATCC 25923.

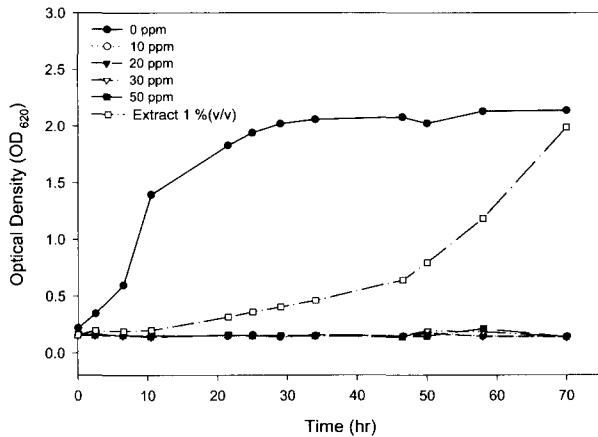


Figure 4. Antimicrobial effects of allylthiocyanate on cell growth of *C. bombicola* ATCC 22214.

15시간 안에는 증식되지 않으며 강력하게 증식 억제되고 있는 것으로 보였다.

Figure 2는 *Thiobacillus* sp. IW 미생물의 AIT 농도에 따른 증식 상태를 보여준 그림이다. 이 그림에서 AIT 농도가 50 ppm

만 넘어도 그 미생물이 증식되는 징후는 보이지 않고 있다.

Figure 3은 AIT 농도에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* 미생물의 증식상태를 보여주고 있는 그림이다. 이 그림에서도 AIT 농도에 대한 미생물의 거동이 예민하게 반응을 하고 있음을 알 수 있다. AIT 농도가 10 ppm에서부터 50 ppm 까지 대체로 증식이 억제되고 있음을 알 수 있다.

Figure 4는 AIT 농도에 따른 *Candida bombicola* 균의 증식 상태를 보여주고 있는데, 10 ppm 농도에서도 예민하게 피해를 나타내고 있다. *C. bombicola* 균은 AIT에 대하여 매우 약함을 알 수 있다.

Figure 5는 AIT 농도에 따른 *Pseudomonas aeruginosa* 미생물의 적응 상태를 보여준 그림이다. 이 그림에서는 *P. aeruginosa* 균이 15시간 지나면 모두 증식되고 있음을 알 수 있고, AIT 농도에 잘 견디고 있다.

Figure 6도 AIT농도의 변화에 따른 증식저해를 나타내고 있는 그림이다. *Staphylococcus aureus* 균도 50 ppm 정도 첨가하였을 때 10시간 안에는 균이 증식하고 있는 상태를 찾을 수가 없었다.

Figure 7은 *E. coli* 미생물이 여러 가지 AIT 농도에 따른 AIT 농도가 50 ppm으로부터 300 ppm까지 증가함에 따라 *E.*

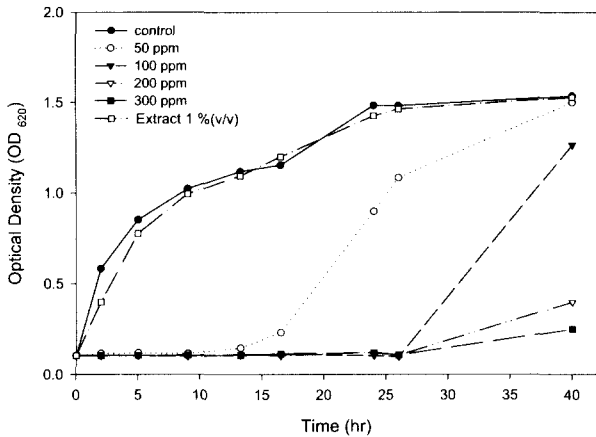


Figure 7. Antimicrobial effects of allylisothiocyanate on cell growth of *E. coli*.

coli 균은 기본적으로 증식저해의 영향을 받고 있다. AIT 농도가 300 ppm일 때는 25시간 이상 배양을 시도하였지만 증식상태가 전혀 보이지 않았다.

Table 2는 실험대상의 여러 미생물에 대한 AIT 농도에 따른 항균 효과를 보여주고 있다. 실험대상 5종의 미생물은 50 ppm의 AIT 농도 이상이면 15시간까지 증식되지 않고 있음을 알 수 있었다.

Table 3은 AIT 농도에 따른 실험 대상 미생물에 대한 최소발육저지농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)의 결과를 나타낸 표이다. 이 표에서 *Vibrio vulnificus* M06-2410 균은 AIT의 적은 농도 즉, 12.5 ppm 에서도 살균효과를 얻을 수 있어 특히 *Vibrio* 균에 의한 여름철 생선 전염 사고를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

고추냉이 뿌리에서 추출된 정유(精油) 물질 중에 약 80%를 차지하고 있는 것이 allylisothiocyanate(AIT)로 알려지고 있다. Allylisothiocyanate 물질은 고추냉이 식물의 2차 대사산물로서 고부가가치를 가질 수 있다. 본 연구는 고추냉이의 allylisothiocyanate를 대량으로 생산하여 산업화하기 위한 기초 연구로서 allylisothiocyanate 물질의 항균과 살균효과를 관찰하였다. 결론적으로 실험에 사용한 미생물에 대한 allylisothiocyanate 농도를 50 ppm 정도 이상 첨가하였을 때 최소 15시간 동안은 증식억제 효과가 있음을 알았다.

감 사

이 논문은 1998년 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 표한다.

REFERENCES

- John, M. Follett (1978), Production of *Wasabia Japonica* in Japan, *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, **36**, 443-447.
- Ohtsuru, M. and H. Kawatani (1979), Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica*, *Agric. Biol. Chem.* **43**(11), 2249.
- Lim, I. S and M. S. Lee (1985) Volatile Compounds Characterizing the Flavor of Korean Horseradish Roots, *Korean J. Nutr.*, **18**(4), 293-300.
- Lee, S. W., J. S. Seo, S. D. Kim, Y. H. Kim, S. N. Yu, and D. Y. Kim (1997), Allylisothiocyanate Content in Different Plant Parts of *Wasabia japonica* mastum, *Korean J. Crop Sci.*, **42**(3), 281-285.

Table 2. Antimicrobial activity of allylisothiocyanate on several microorganisms

Strain	Allylisothiocyanate Conc. (mg/μL)				
	0.01	0.05	0.1	0.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-/**	5/*	14.5/*	-/-	-/-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-/**	-/*	10.5/*	-/-	-/-
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	-/**	5/**	3/*	-/*	-/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-/**	-/**	-/**	-/-	-/-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-/**	-/*	-/-	-/-	-/-
<i>Vibrio vulnificus</i> M06-2410	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

※ (A/B) : A is inhibition zone area(mm) and B is growth state of microorganism - : no growth, *, ** : growth state

Table 3. Comparison of the MICs and MBCs of Allylisothiocyanate

Strain	MIC (ppm)	MBC (ppm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37.5	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70	120
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	50	120
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50	220
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50	350
<i>Vibrio vulnificus</i> M06-2410	12.5	12.5

5. Yasujiro, Morimitsu, et. al. (2000), Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, Wasabi, *Mechanims of Ageing and Development*, **116**, 125-134.
6. Jung, B. S., B. K. Lee, S. T. Shim, and J. K. Lee (1989), Effect of the Volatile Constituents of Mugwort Seed Extract on the Growth of Microorganism, *Korean J. Dietary Culture*, **4**(4), 417-424.
7. Davidson, P. Michael, and Alfred Larry Branen (1993), Antimicrobials in Foods, Second Edition, pp.597-615, Marcel Dekker, Inc.
8. Centennial Edition (1989), The Merck Index, Eleventh edition, p.291.
9. David Hawcroft et. al., (1987), Quantitative Bioassay, John Wiley & sons, London.
10. Marwan, Aref G and Charles W. Nagel (1986), Quantitative Determination of Infinite Inhibition Concentritions of Antimicrobial Agents, *Applied and Environmental Microbiology*, 559-561.
11. Parish, Mickey E., and P. Michael Davidson (1993), Methods for Evaluation, In Antimicrobials in Foods, P. Michael Davidson and Alfred Larry Branen, Eds., p.597, Marcel Dekker, Inc.