

Alliinase 첨가에 의한 열처리 마늘로부터 생성된 함황 화합물의 특성

최윤희 · 심유신 · 김청태¹ · 이 찬² · 신동빈*

한국식품연구원, ¹(주)농심, ²중앙대학교 식품공학과

Characteristics of Thiosulfinates and Volatile Sulfur Compounds from Blanched Garlic Reacted with Alliinase

Yoon-Hee Choi, You-Sin Shim, Cheong-Tae Kim¹, Chan Lee², and Dong-Bin Shin*

Korea Food Research Institute

¹Nong Shim Co., Ltd.

²Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract In this study, attempts were made to develop a method for controlling the volatile sulfur compounds in garlic. Crude alliinase extracted from fresh garlic was applied to garlic pulp blanched for 5 min at 100°C, and the changes in the thiosulfinates and volatile compounds of the blanched garlic pulp reacted with the enzyme were investigated. Eight kinds of thiosulfinates from garlic were separated by HPLC, and identified by LC/MS/MS. When the alliinase was added to the blanched garlic pulp at 100, 200, 300, or 400 units, and reacted for 15 min, respectively, thiosulfinates were generated in the amounts of 37, 68, 77, and 80% of the fresh garlic content (control). Under the same conditions, we analyzed the volatile compounds, where 28 peaks were identified by GC/MSD. Of the 28 peaks, 23 were volatile sulfur compounds. The results of the analysis showed that all the volatile compounds were generated at amounts of 25, 36, 66, and 76% of the content of the control, respectively. These results indicate that the sulfur compound content of garlic can be regulated, depending upon the reaction conditions of alliinase.

Key words: blanched garlic, alliinase, thiosulfinate, volatile sulfur compound

서 론

마늘은(*Allium sativum* L.) 백합과(Liliaceae)에 속하는 대표적인 *Allium*속 식물로 독특한 향미와 다양한 생리활성을 지니고 있다. 최근의 연구결과에 의하면 마늘의 다양한 생리활성은 마늘 중에 존재하는 thiosulfinates와 이들의 분해물질에 의한 것으로 보고되고 있다. 즉 allicin의 분해산물인 diallyl disulfide, diallyl trisulfide 및 diallyl sulfide 등은 미생물 생육억제 작용뿐만 아니라 암세포 생육억제 작용에도 관여하는 것으로 보고되어 있다(1-6). Diallyl sulfide는 aflatoxin B1, benzo(a)pyrene, nitrosoamine, dimethylhydrazine 등이 화학 발암제의 활성화에 의하여 유도되는 암을 cytochrome P450-2 E1의 불활성화로서 예방한다고 하였다. 유지 중에서 마늘을 파쇄하면 2분자의 allicin이 결합하여 생성된 ajoene이나 allyl methyl trisulfide는 혈소판 응집 억제작용이 있으며, allyl methyl sulfide는 항산화 작용에 관여하는 것으로 보고되고 있다(7).

마늘 및 마늘가공품 중의 각종 함황 화합물은 마늘 중에 존재하는 (+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide(alliin), (+)-S-methyl-L-cysteine sulfoxide(methiin) 및 (+)-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide

(isoalliin)가 alliinase[alliin alkyl-sulfenate-lyase(EC 4.4.1.4)]의 작용에 의하여 allicin(2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester)을 비롯한 methyl allyl, 1-propenyl allyl, allyl 1-propenyl, 1-propenyl methyl, dimethyl thiosulfinate 등의 thiosulfide류 화합물과 이들의 분해물 또는 분해산물들의 재결합에 의하여 생성되는 것이다(8-9). Allicin을 비롯한 thiosulfinates는 불안정한 화합물로서 분해되어 diallyl disulfide 및 저급의 sulfides 화합물을 생성하는 것으로 알려져 있다(10).

한편 마늘 중에 생리활성 물질로 알려진 휘발성 함황 화합물들은 마늘 섭취 후 불쾌한 냄새를 나타내는 원인 물질로도 알려져 있어 마늘을 이용한 가공식품의 원료로 사용하는데 제한적 요인이 되고 있다. Alliin으로부터 allicin의 생성은 pH 5-8 및 30-35°C에서는 30초 이내에 이루어지며, alliin의 절반이상이 6초 이내에 allicin으로 변화한다고 한다(11). 이러한 연구 결과는 생마늘을 파쇄한 후에는 마늘 중의 함황 화합물의 생성량을 인위적으로 조절하는 것은 매우 어렵다는 것을 나타내고 있는 것이다. 그러므로 마늘의 고유한 냄새성분 및 생리활성을 나타내는 물질을 조절하기 위해서는 이에 관여하는 효소의 활성을 조절할 수 있는 방법을 모색할 필요성이 있다.

따라서, 본 연구에서는 마늘의 효소반응에 의하여 생성되는 함황 화합물을 조절할 수 있는 방법의 일환으로 마늘을 열처리(blanching)하여 alliinase를 불활성화시킨 후, 이에 마늘로부터 추출한 alliinase를 가하여 반응시켜 반응조건에 따른 thiosulfinates 생성 및 이들의 분해산물인 휘발성 함황 화합물의 함량변화를 측정하고자 하였다.

*Corresponding author: Dong-Bin Shin, Korea Food Research Institute, 516, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9126

Fax: 82-31-780-9280

E-mail: shindb@kfri.re.kr

Received September 18, 2007; accepted October 27, 2007

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 마늘은 2006년 경북 의성지역에서 생산된 마늘을 가락동 농수산물시장에서 구입한 것으로 -1°C 에 보관하였다. 마늘 중의 alliinase를 완전히 불활성화시킨 열처리 마늘펄프(Blanched garlic pulp)는 Pruthi 등(12)의 방법에 따라 제조하였다. 즉 껍질을 제거하지 않은 생마늘 쪽 500 g을 망사형 자루에 넣고 100°C 에서 5분 동안 가열하여 외피를 제거한 후 파쇄기(Oscar kaiso DH-850, Dong-ah Ind. Co., Ltd., Gimhae, Korea)로 분쇄한 다음, 진공필름으로 포장하여 -20°C 에 보관하면서 시료로 사용하였다. 대조구는 -1°C 에 보관된 생마늘을 박피 후 파쇄기로 분쇄하여 사용하였다.

Alliinase 조제 및 활성측정

Alliinase 조효소액은 Mazelis와 Crews(13)과 Nock과 Mazelis(14)의 방법을 일부 변형하여 조제하였다. 즉 박피한 마늘 200 g에 0.02 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)용액 200 mL를 가하여 4°C 에서 3분간 균질기(National SSC81, Matsushita electric works, Ltd., Tokyo, Japan)로 균질하고, 치즈클로스(cheesecloth)를 이용하여 여과한 후 $15,000\times g$, 4°C 에서 60분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이에 1% protamine sulfate 30 mL를 가하여 잘 혼합하고 15분간 정치한 후, $15,000\times g$, 4°C 에서 다시 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 포화도가 33%가 되도록 ammonium sulfate를 천천히 가하면서 30분 동안 교반하였다. 포화액을 $15,000\times g$, 4°C 에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 침전물에 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)용액 25 mL를 가하여 녹였다. 이를 투석용 튜브(Spectra/Por[®] 2 membrane, MWCO 12,000-14,000, 29×250 mm, Spectrum Lab. Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)로 옮겨 밀봉하고 $25\ \mu\text{M}$ pyridoxal 5'-phosphate를 첨가한 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)용액에 담가 36시간 동안 투석하였다. 투석액을 $15,000\times g$, 4°C 에서 30분간 원심분리하여 상등액을 membrane filter(Minisart RC 25 $0.2\ \mu\text{m}$, Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과하여 조효소액을 조제하였다. 이와 같이 조제한 조효소액을 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

조제한 alliinase의 활성은 Friedemann과 Hangen(15) 그리고 Schwimmer와 Weston(16)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 10 mM alliin을 pyridoxal 5'-phosphate $25\ \mu\text{M}$ 이 함유된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 2 mL에 용해한 다음 이에 조제한 조효소액 100 μL 를 가하여 37°C 에서 10분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid를 420 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 1분에 1 μmole pyruvic acid를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다. 이때 사용한 alliin은 Stoll과 Seebeck(9)과 Freeman과 Whenham(17)의 방법에 따라 마늘로부터 추출, 정제하였다.

Thiosulfinates 및 휘발성 화합물의 생성을 위한 alliinase 반응조건

마늘로부터 추출, 제조한 alliinase를 열처리한 마늘펄프에 첨가하여 생성되는 thiosulfinates 및 volatile compounds 함량은 37°C 에서 효소의 첨가량 및 반응시간을 달리하여 측정하였다. 즉 열처리 마늘펄프 10 g에 증류수 10 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 본 실험에서 추출한 alliinase 조효소액을 100, 200, 300 및 400 unit를 각각 첨가하여 37°C 에서 각각 5, 10 및 15분간 반응시켰다. 반응조건에 따라 반응이 완료되면 즉시 포름산(formic acid)을 이용하여 pH 3.0으로 조절하여 효소반응을 정지시켰다.

LC/MS/MS를 이용한 thiosulfinates의 확인

마늘의 분쇄시 생성되는 thiosulfinates 화합물의 확인은 μ -bondapak C_{18} ($10\ \mu\text{m}$, 3.9×300 mm, Waters Co., Milford, MA, USA) 칼럼이 장착된 HPLC/MS/MS(Finnigan TSQ-Quantum EMR, Thermo electron Co., Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석한 결과 및 Block 등(18)의 HPLC를 이용하여 분석한 결과를 비교하여 확인하였다. HPLC/MS/MS를 이용한 분석조건은 APCI mode의 ion source를 사용하였고, MS의 vaporizer 및 capillary 온도는 각각 500 및 340°C 로 하였다. Sheath/Auxiliary gas는 질소를 사용하였으며, 압력은 각각 40 및 5 arbitrary units로 유지하였다. Mass range는 115 - $175\ m/z$ 로 하였다. 이동상은 0.1% 아세트산이 포함된 45% 메탄올을 사용하였으며 분당 유속은 1.0 mL로 하였다. 각 피크의 물질 확인은 Q1-scan mode에서 생성된 total ion chromatograph(TIC)로부터 분리된 피크의 분자량과 sulfur isotope effect를 이용하여 확인하였다. Allicin의 확인은 Shiseido SI2 system(Shiseido, Tokyo, Japan) HPLC가 장착된 API-3000(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) LC/MS/MS를 사용하여 ESI positive Q1-scan mode 및 multi-reaction scan mode에서 확인하였다.

HPLC를 이용한 thiosulfinates의 생성량 비교

열처리한 마늘펄프에 alliinase를 가하여 효소첨가량 및 반응시간에 따라 생성된 thiosulfinates는 Block 등(18)의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 분석하였다. 즉 효소반응을 정지시킨 각각의 시료를 250 mL 원심분리관에 전량 취하여 증류수 40 mL와 염화메틸렌(methylene chloride) 50 mL를 가하여 충분히 혼합한 후 $22,000\times g$, 4°C 에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 잔사에 다시 디에틸에테르 50 mL를 가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 취해 앞서 추출한 염화메틸렌 추출용액과 합하였다. 이를 30°C 이하에서 감압건조 한 다음 내부표준물질(benzyl alcohol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1%가 함유되도록 제조한 *n*-hexan과 2-propanol 혼합용액(98:2, v/v) 10 mL를 가하여 용해한 후 $0.2\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과하였다. 여과액 20 μL 를 취하여 실리카 겔 칼럼(Chromsep HPLC column, 250×4.6 mm, Varian, CA, USA)이 장착된 HPLC system(JASCO, Tokyo, Japan)에 주입하여 254 nm에서 측정하였다. 이때 이동상의 유속은 분당 1.8 mL로 하였으며 gradient system을 이용하여 분리하였다. 즉 용매 A는 *n*-hexan, 용매 B는 2-propanol을 사용하여 6분까지는 B 용액 2%로 유지하고 6분에서 16분까지는 B 용액 10%로 직선적으로 상승시킨 후 25분까지 B 용액을 10%로 유지하였다. 25분부터 35분까지 B 용액을 2%로 감소시켰다. Thiosulfinates의 생성량 비교는 내부표준물질을 이용하여 면적을 보정한 후, 대조구(생마늘펄프)의 thiosulfinates 피크면적을 100으로 하여 처리구의 피크면적을 상대적비(%)로 나타내었다.

휘발성 성분의 확인 및 생성량 비교

각각의 마늘로부터 생성한 휘발성 성분의 확인 및 생성량 비교는 펜탄(pentane)과 디에틸에테르 혼합용매(2:1, v/v)로 추출, 농축한 후 이를 GC/MSD(6890/5973 system, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA)에 주입하여 분석, 비교하였다. 즉 마늘의 휘발성 성분을 혼합용매로 추출 후 질소기류 하에서 최종 400 μL 로 농축하여 DB-5 칼럼(fused silica capillary, $60\text{m}\times 0.25$ mm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)이 장착된 GC/MSD에 1 μL 를 주입하였다. 운반기체는 헬륨으로 분당유속은 1.5 mL로 하였으며 오븐온도는 45°C 에서 3분간 유지한 후 분당 1.5°C 씩 220°C 까지 상승하여 10분간 유지하였다. 주입구 및 inter-

face 온도는 각각 230 및 260°C로 유지하였고, ionization voltage는 70 eV, mass range는 35-550 m/z 로 하였다. 주입시의 spilt ratio는 10:1로 하였다. 휘발성 성분의 확인은 Wiley 275 library의 표준 spectrum을 이용하였으며, relative similarity가 90% 이상인 화합물에 대하여 동일 물질로서의 유의성을 인정하였다. 또한 표준품과 현재까지 보고된 문헌(19,20)을 근거로 확인하였다. 처리구별 휘발성 향기성분의 상호 비교는 내부표준물질의 피크면적을 기준으로 산출한 시료의 피크면적으로 비교하였다. 내부표준물질은 diethyl disulfide(Sigma-Aldrich) 0.45 g을 50 mL 디에틸에테르에 녹여 2 mL를 최종 농축 전에 취해 넣었다.

결과 및 고찰

마늘로부터 추출한 alliinase의 활성

본 실험에 사용한 마늘로부터 추출한 alliinase 조효소액의 활성을 알아보기 위하여 마늘로부터 추출 정제한 alliin을 6 mM에서 2 mM 단위로 20 mM의 농도까지 제조한 용액에 alliinase 100 μ L를 일률적으로 가하여 생성된 pyruvate함량을 측정하였다. 그 결과 16 mM까지는 pyruvate함량이 지속적으로 증가하였으며 상관관계수(r^2)값이 0.997로 직선상의 범위에 있는 것으로 나타났다. Alliin 16 mM에 alliinase 100 μ L를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 생성된 pyruvate함량은 700 μ mole이었다. 마늘로부터 추출, 정제한 alliinase 조효소액의 단백질함량은 Bradford(21)의 방법에 따라 측정된 결과 mL당 25 mg이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서 추출, 정제한 alliinase 조효소액은 단백질 mg당 280 μ mole의 pyruvate를 생성하는 것으로 나타났다. Shin(22)은 alliin 10 μ M에 마늘로부터 추출한 조효소액 100 μ L를 가하여 효소활성을 측정된 결과 조효소액 단백질 1 mg당 pyruvate가 200-250 μ mole이 생성되었다고 보고하였으며, Tomofumi 등(23)은 332.5 μ mole이 생성되었다고 보고하였다. 이와 같이 연구자에 따라 pyruvate생성량이 차이를 나타내는 것은 조효소액의 정제 정도에 기인하는 것으로 사료된다.

마늘 중의 thiosulfates 확인

마늘 중의 γ -glutamyl-S-alkenyl-L-cysteine이 γ -glutamyl-transpeptidase에 의해 분해되면 S-alkenyl-L-cysteine이 생성되고, S-alkenyl-L-cysteine에 oxidase가 작용하여 alliin을 비롯한 S-alkenyl-L-cysteine sulfoxide가 생성된다(22). S-alkenyl-L-cysteine sulfoxide에 alliinase가 작용하면 alliin(2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$)을 비롯한 8종의 thiosulfates가 생성되는데 이의 생성정도는 마늘의 냄새 및 생리활성에 중요한 역할을 한다(24). 따라서 HPLC 및 LC/MS/MS를 이용하여 생마늘을 분쇄한 경우 생성된 thiosulfates의 종류를 확인하고자 하였다. 분쇄한 마늘을 유기용매로 추출하여 실리카 겔 칼럼이 장착된 HPLC로 분석한 결과 8개의 주요 피크를 얻을 수 있었다(Fig. 1). LC/MS/MS를 이용하여 이들 피크를 확인한 결과 마늘 중 가장 중요한 thiosulfate로 알려진 alliin은 scan mode에서 molecular ion 163 m/z 의 full fragment ion, 121 m/z 의 fragment ion [$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})\text{S}-$] 및 73 m/z 의 fragment ion($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-$)을 통해 확인할 수 있었다. 또한 2-propene-1-sulfinothioic acid S-methyl ester 및 methane sulfinothioic acid S-2-propenyl ester는 molecular ion 137 m/z 와 sulfur isotope 139 m/z 비율로 확인할 수 있었으며, (E)-1-propene sulfinothioic acid S-2-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-(Z,E)-propenyl ester는 molecular ion 163 m/z 및 sulfur isotope 165 m/z 비율로 확인하였다. Block 등(18)은 LC/

MS 및 NMR을 이용하여 마늘의 thiosulfates를 분리확인하였다. 그 결과 마늘로부터 alliin을 비롯한 8종의 thiosulfates를 확인하였다. 그들은 LC/MS로 alliin을 분석한 결과 본 연구결과와 같이 parent ion 163 m/z 와 daughter ion 73 m/z 를 확인할 수 있었으며, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-methyl ester 및 methane sulfinothioic acid S-2-propenyl ester는 LC/MS에서는 분리되지 않았지만 EI 조건하에서 parent ion 136 m/z 와 daughter ion 75, 73 및 63 m/z 를 확인할 수 있었다고 보고하였다. 또한 순상칼럼을 장착한 HPLC를 이용하여 생마늘중의 thiosulfates를 분석한 결과 Fig. 1의 (d)와 같이 분리된 크로마토그램을 얻었다고 보고하였다. 그들의 연구결과에 의하면 피크 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8은 각각 (E)-1-propenesulfinothioic acid S-2-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-(Z)-1-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-(E)-1-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-methyl ester, methanesulfinothioic acid S-(E)-1-propenyl ester, methanesulfinothioic acid S-2-propenyl ester, 및 methanesulfinothioic acid S-methyl ester로 확인되었다.

Alliinase 반응조건에 따른 thiosulfates의 생성량 비교

마늘로부터 추출, 정제한 alliinase를 열처리한 마늘필프에 가하여 반응시켜 반응조건에 따라 생성된 thiosulfate의 종류와 생성 정도를 알아보려고 하였다. 이를 위하여 열처리한 마늘필프에 마늘로부터 추출, 정제한 alliinase를 100, 200, 300 및 400 unit씩 가하여 37°C에서 5, 10 및 15분씩 각각 반응시킨 후 HPLC로 thiosulfates를 분석한 결과 Fig. 1 및 Table 1과 같은 결과를 얻었다. Fig. 1의 크로마토그램(d)는 열처리하지 않은 생마늘(대조구)의 크로마토그램으로 Block 등(18)이 보고한 alliin 이외의 7개의 thiosulfates 피크가 모두 나타났으나, 열처리하여 alliinase를 가지지 않은 마늘필프의 크로마토그램(a)는 내부표준물질로 사용한 benzyl alcohol 이외에는 다른 피크가 전혀 나타나지 않았다. 반면 alliinase를 200 및 400 unit를 각각 가하여 15분간 반응시킨 크로마토그램 (b) 및 (c)는 alliinase의 첨가량이 증가할수록 피크의 수 및 각 피크의 면적이 증가하였다. 크로마토그램(a)에서 thiosulfates 피크가 없다는 사실은 마늘 중의 alliinase가 완전히 실패하였다는 것을 나타내는 것이다.

효소첨가량 및 반응시간에 따른 thiosulfates 생성량은 Table 1과 같았다. Table 1에서 보는 바와 같이 본 실험조건에 의하여 열처리한 마늘필프에 alliinase를 가하여 반응시키면 생마늘로부터 생성된 thiosulfates의 약 80%가 생성되었으며, 이들의 상대적 생성량은 효소첨가량 및 반응시간의 증가와 함께 증가하는 것으로 나타났다. 즉 alliinase를 100, 200, 300 및 400 unit씩 가하여 5분 반응시킨 결과 thiosulfate 전체 생성량은 대조구의 피크 총면적을 100으로 볼 때 각각 33.8, 62.8, 72.2 및 73.6%가 생성되었으며, 10분간 반응시킨 처리구에서는 각각 35.0, 65.3, 77.6 및 80.2%가 생성되었고, 15분간 반응시킨 경우에는 각각 36.9, 67.9, 77.3 및 80.5%가 생성 되는 것으로 나타났다. 한편 반응시간 및 효소첨가량에 따른 thiosulfates의 생성량은 thiosulfate의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 나타났다. 마늘의 전체 thiosulfate중 60%이상을 차지하는 것으로 알려진 alliin은 alliinase 300 unit 이상을 가하여 5분간 반응시키면 거의 최대치인 85% 정도 생성되어 15분까지 약 3%정도 상승하는 것으로 나타났다. 2-Propene-1-sulfinothioic acid S-(Z)-1-propenyl ester, 2-propene-1-sulfinothioic acid S-(E)-1-propenyl ester도 각각 200 unit 이상의 효소를 가하여 5분간 반응시키면 약 50 및 70%가 생성되었으며

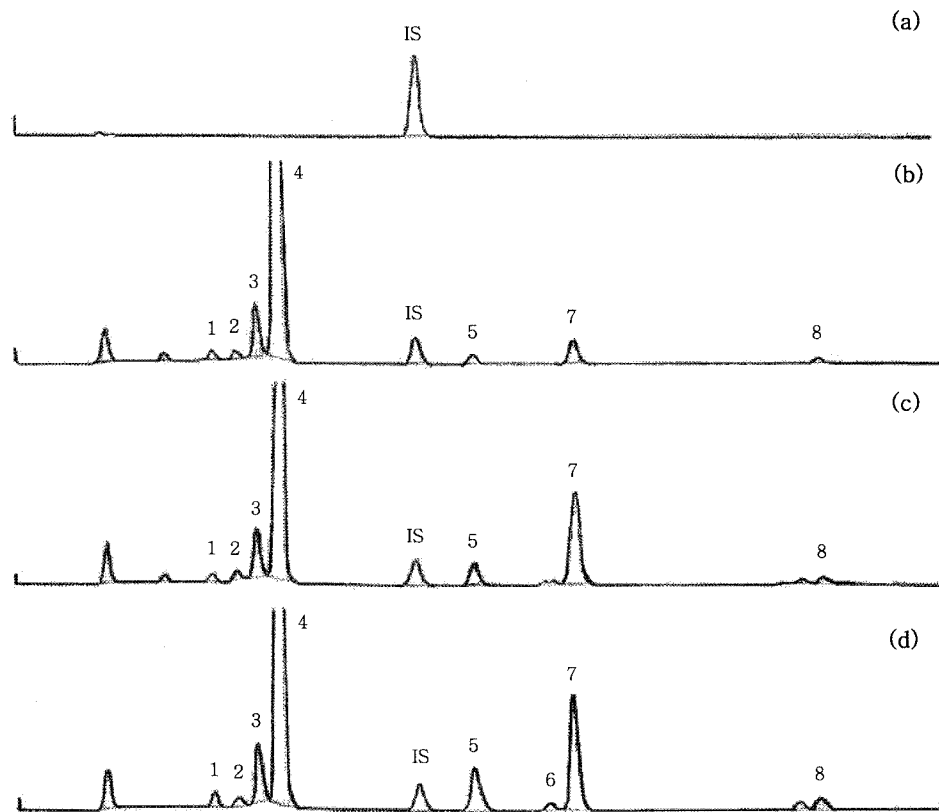


Fig. 1. Chromatograms of thiosulfates in garlic pulps reacted with alliinase under the various concentrations. (a) Blanched garlic, (b) blanched garlic + alliinase 200 unit, (c) blanched garlic + alliinase 400 unit, (d) control (fresh garlic) 1: (*E*)-1-propenesulfinothioic acid *S*-2-propenyl ester[AlISS(O)Propenyl-(*E*)], 2: 2-propene-1-sulfinothioic acid *S*-(*Z*)-1-propenyl ester[AlIS(O)SPropenyl-(*Z*)], 3: 2-propene-1-sulfinothioic acid *S*-(*E*)-1-propenyl ester[AlIS(O)SPropenyl-(*E*)], 4: 2-propene-1-sulfinothioic acid *S*-2-propenyl ester[allicin : AlIS(O)SAlI], 5: 2-propene-1-sulfinothioic acid *S*-methyl ester[AlIS(O)SMe], 6: methanesulfinothioic acid *S*-(*E*)-1-propenyl ester[MeS(O)Spropenyl(e)] 7: methanesulfinothioic acid *S*-2-propenyl ester[AlISS(O)Me], 8: methanesulfinothioic acid *S*-methyl ester[MeS(O)SMe], IS (Internal standard): Benzyl alcohol.

그 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 그러나 (*E*)-1-propene sulfinothioic acid *S*-2-propenyl ester는 5분 반응시킨 시료에서 최대 70% 정도 생성되었으며 10 및 15분간 반응한 시료에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 2-Propene-1-sulfinothioic acid *S*-methyl ester 및 methanesulfinothioic acid *S*-(*E*)-1-propenyl

ester는 효소첨가량의 증가와 함께 증가하였으며 반응시간 5분 이후에도 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 가장 낮은 생성율을 나타낸 methanesulfinothioic acid *S*-methyl ester는 반응시간 15분까지 증가하는 것으로 나타내었다. 본 연구에서 (*E*)-1-propenesulfinothioic acid *S*-2-propenyl ester화합물이 10 및 15분 처리구에

Table 1. Changes in thiosulfates of blanched garlic pulps reacted with alliinase under the various conditions

(Unit: peak area percent²⁾)

PN ¹⁾	Compound ³⁾	Addition concentration (alliinase)											
		100 unit ⁴⁾			200 unit			300 unit			400 unit		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
1	AlISS(O)Propenyl-(<i>E</i>)	56.1	44.1	42.8	59.6	43.2	48.5	69.0	52.2	48.0	51.77	45.60	52.8
2	AlIS(O)SPropenyl-(<i>Z</i>)	27.0	35.3	28.3	51.7	50.5	62.3	48.3	60.0	62.5	50.89	47.55	53.8
3	AlIS(O)SPropenyl-(<i>E</i>)	44.8	44.9	40.4	73.3	74.1	79.6	71.7	72.9	58.5	64.38	68.47	70.7
4	AlIS(O)SAlI	43.2	45.3	47.0	80.1	82.6	84.8	85.4	88.8	85.6	83.16	88.46	87.5
5	AlIS(O)SMe	6.1	7.1	7.0	15.6	18.3	20.1	32.8	31.7	38.5	41.59	48.00	48.3
7	AlISS(O)Me	4.9	5.3	5.3	14.7	18.1	17.8	60.5	65.9	68.8	73.05	87.21	76.1
8	MeS(O)SMe	0.7	0.9	0.0	16.8	33.7	19.0	15.0	17.3	16.3	15.60	6.17	26.3
	Total	33.8	35.0	36.9	62.8	65.3	67.9	72.2	77.6	77.3	73.6	80.2	80.5

¹⁾PN: Peak number.

²⁾Peak area percent is the relative ratio of peak area of each compound in fresh garlic pulp.

³⁾Chemical Abstracts names of compounds refer to Fig. 1.

⁴⁾1 unit is the amount of alliinase that generates 1 μ mole pyruvate for one minute.

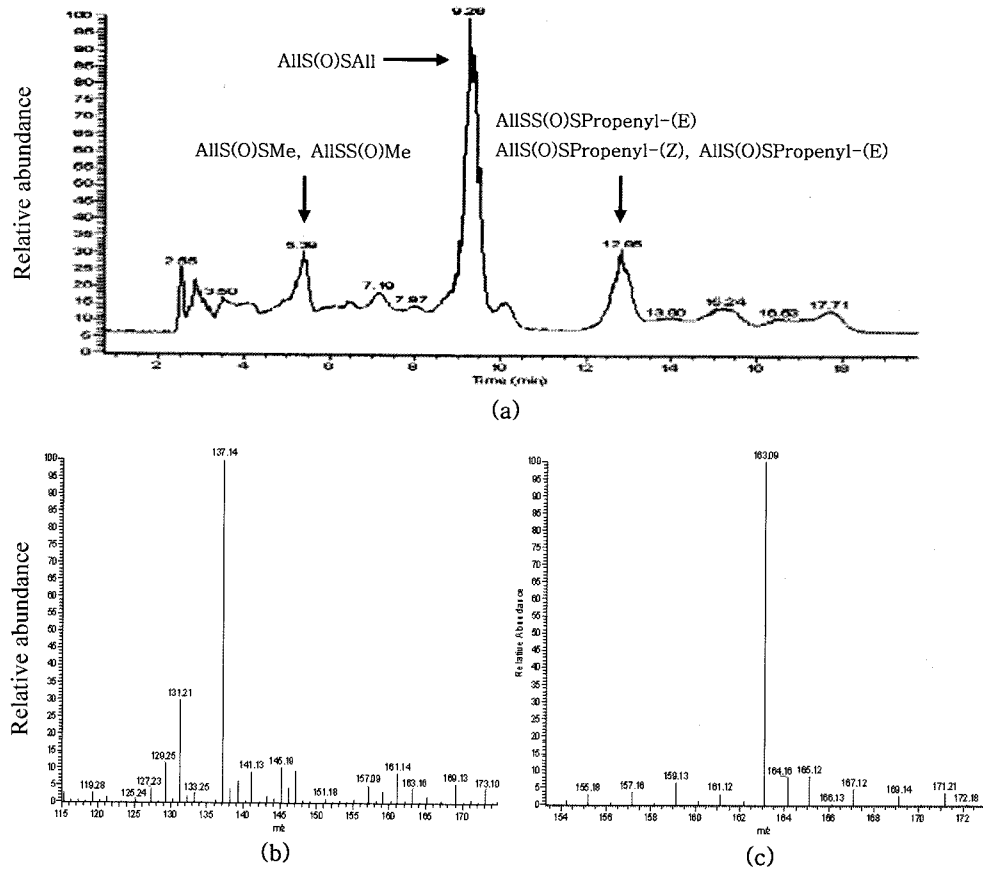


Fig. 2. Total ion chromatogram and mass spectrum of thiosulfates in garlic. (a) Total ion chromatogram, (b) mass spectrum of AllS(O)SMe, AllSS(O)Me, (c) mass spectrum of AllSS(O)SPropenyl-(E), AllS(O)SPropenyl-(Z), AllS(O)SPropenyl-(E).

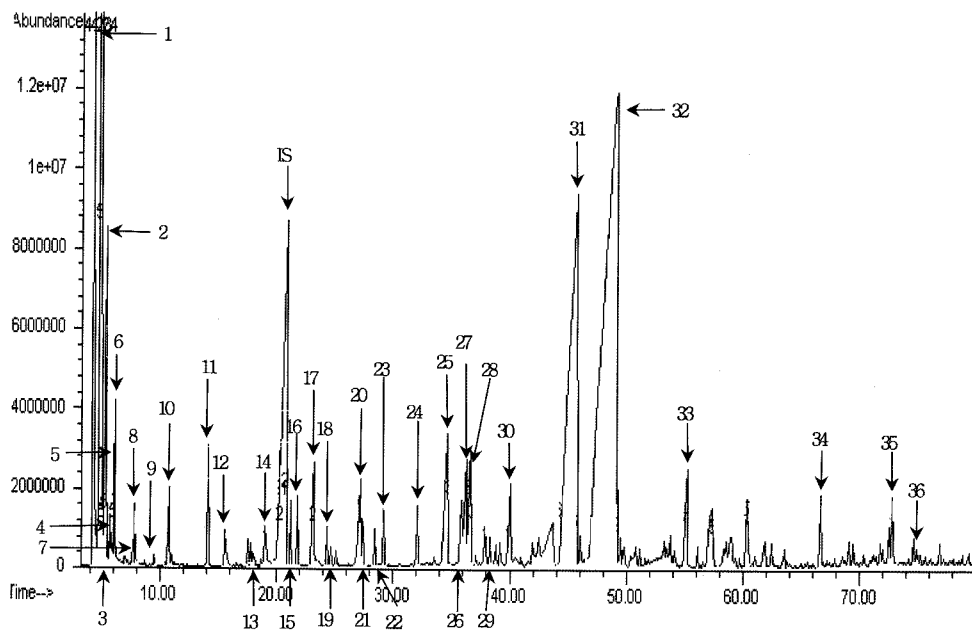


Fig. 3. GC-MSD total ion chromatogram of volatile compounds in fresh garlic.

서 감소하는 경향을 나타낸 것은 이 물질이 효소작용에 의하여 5분 이내에 최대 생성물에 도달하여 그 이후부터는 분해되는 것으로 사료되며, dimethyl thiosulfinate가 15분 까지도 증가한 것으로 나타난 것은 다른 thiosulfates에 비하여 비교적 늦게 생성되

기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같은 현상은 Law와 Hughes (25)의 연구결과에서도 볼 수 있었다. 즉 그들은 마늘로부터 생성되는 thiosulfates의 특성을 연구한 결과 생마늘을 파쇄하면 alliin 및 allyl propenyl thiosulfates 화합물은 23°C에서 0.5분

Table 2. Changes in volatile compounds of blanched garlic pulps reacted with alliinase for 15 min under the various concentrations
(Unit: Area count/10,000)

PN ²⁾	RT	Compound	Alliinase concentrations (unit ³⁾)				
			Control ¹⁾	100	200	300	400
1	4.21	Sulfur dioxide	5914.6	916.7	2033.5	2787.6	3227.5
2	5.29	2-Propen-1-ol	2983.7	623.4	1304.3	578.4	2469.2
3	5.36	Cyclopentane	615.4	502.0	550.5	578.4	737.1
4	5.52	1,5-Hexadiene	205.8	137.0	166.5	65.7	114.0
5	6.03	2-Propen-1-thiol	623.7	223.5	353.8	502.9	360.8
6	6.07	Propylene sulfide	1239.7	452.5	730.2	766.0	569.2
7	7.63	Propanoic acid	196.7	56.8	130.0	219.3	255.6
8	7.81	Allyl methyl sulfide	1260.6	10.8	80.4	214.1	600.0
9	9.50	Dimethyl disulfide	112.5	3.0	9.9	39.7	142.5
10	10.74	2-Butenoic acid	964.9	491.3	545.8	626.2	698.0
11	14.12	Methyl ethyl disulfide	1096.4	277.7	388.4	690.7	1759.9
12	15.59	Diallyl sulfide	673.9	92.4	218.2	250.0	311.6
13	18.02	3-Methyl-2-cyclopenten-1-thione	227.6	45.6	161.1	183.4	161.2
14	19.02	3,4-Dimethylthiophene	872.6	80.1	200.7	259.5	178.7
15	21.18	<i>trans</i> -Propenyl methyl disulfide	474.4	28.4	45.2	92.1	103.8
16	21.81	<i>cis</i> -Propenyl methyl disulfide	661.2	28.8	66.7	91.1	106.2
17	23.14	Unknown	2239.0	955.8	1383.4	1467.6	1251.9
18	24.29	Dimethyl trisulfide	313.2	6.2	12.0	64.3	309.8
19	24.63	<i>S</i> -Methyl methanethiosulphinate	223.0	146.7	181.7	180.3	211.5
20	27.21	Unknown	2089.2	101.8	124.3	806.9	916.2
21	27.40	2,3-Dimethylthiophene	396.8	71.2	117.6	141.3	194.7
22	28.44	2-Methyl-1,3-dithiane	339.5	14.4	9.0	111.1	265.0
23	29.19	Unknown	557.5	8.1	21.3	161.5	313.8
24	32.09	Unknown	723.4	83.1	162.7	297.5	839.1
25	34.62	Diallyl disulfide	3601.6	533.6	914.5	2674.3	3513.5
26	35.85	Unknown	1456.5	331.4	722.1	994.2	753.3
27	36.25	Unknown	2203.6	131.8	267.9	811.3	1818.7
28	36.59	C ₆ H ₁₀ S ₂	2992.5	472.3	855.9	1035.1	858.2
29	38.32	4-Mercapto-3-methyl-crotonic acid	286.6	64.0	90.5	54.1	94.4
30	40.01	Allyl methyl trisulfide	1592.8	412.5	1034.5	1553.9	2009.4
31	45.71	3,4-Dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin	34647.6	9141.0	17797.7	26197.9	32285.7
32	49.08	2-Vinyl-4H-1,3-dithiin	58038.8	16432.2	15629.4	40611.4	40712.7
33	55.18	Diallyl trisulfide	3938.1	900.4	1255.8	2165.6	3253.2
34	66.68	Unknown	1029.5	62.4	126.6	662.2	660.6
35	72.78	Unknown	941.4	557.9	734.7	932.3	1023.1
36	74.91	Diallyl tetrasulphide	304.2	95.5	132.3	211.2	260.5
Total			136038.4	34492.5	48558.9	89079.1	103340.8

¹⁾Control is the fresh garlic pulp.²⁾ and ³⁾ refers to Table 1.

이내에 최대 생성율을 나타내었으나, methyl기를 함유한 thiosulfonates는 이보다 10배 정도 늦은 5분 후에야 최대 생성율에 도달하였으며, 이들 모두 100분까지는 안정성을 유지하였다. 그러나 allyl 1-propenyl thiosulfonate는 thiosulfonates중 가장 불안정한 물질로 5분 후부터 감소하기 시작하였다고 보고하였다. Pruthi 등(12)은 효소를 실험시킨 마늘분말에 alliinase를 가하여 반응시키면 allicin과 allyl sulphide를 재생성시킬 수 있었으며, 열처리에 의하여 마늘중의 peroxidase 및 catalase와 같은 효소도 실험시켜 분말 제품의 경우 갈변을 방지할 수 있다고 하였다.

마늘 중의 휘발성 향기 성분의 확인

생마늘과 열처리한 마늘 펄프에 효소를 가하여 반응조건에 따

른 시료들의 휘발성 향기성분을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 용매추출법에 의하여 추출, 농축한 향기성분을 GC/MSD에 주입하여 분석한 결과 Fig. 3과 같은 Total Ion Chromatogram(TIC)을 얻었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 분리된 36개의 피크에 대하여 각각의 mass spectrum, 표준물질을 이용한 retention time 등에 근거로 하여 각 피크에 대한 성분을 확인한 결과 28개의 피크에 대하여 성분이 확인되었다. 확인된 28개의 휘발성 성분은 황 화합물 23종, 산류 2종이었으며 이외에 2-propen-1-ol, cyclopentane 및 1,5-hexadiene이 존재하는 것으로 나타났다(Table 2). 23종의 sulfide류 화합물은 allicin의 실은분해산물로 알려진 diallyl disulfide, diallyl sulfide, diallyl trisulfide 및 이산화황이 확인되었고, allicin의 GC/MSD 분석과정 중 분해산물로 알려진 3,4-dihydro-3-vinyl-

1,2-dithiin 및 2-vinyl-4H-1,3-dithiin도 확인되었다. 또한 마늘의 주요 향기성분으로 보고된 dimethyl disulfide, allyl methyl sulfide, trans-propenyl methyl disulfide, cis-propenyl methyl disulfide, dimethyl trisulfide, allyl methyl trisulfide들도 확인되었다(19,20). 식품의 향기성분은 추출방법에 따라서 차이가 있는 것으로 보고되어있다. Leahy와 Reineccius(26)의 연구에 의하면 pentane으로 추출할 경우에는 ethanol, propanol 및 butanol과 같은 알코올류는 추출되지 않는 반면 purge and trap concentrator를 이용할 경우에는 이와 같은 알코올류는 흡착관에 잘 흡착되어 검출되는 것으로 보고되었다. Tenax GC가 장착된 purge and trap concentrator를 이용하여 마늘의 향기성분을 분석한 Shin(19)의 연구결과에서는 1-hexanol, 2-butanal 및 hexanal이 검출되었다고 보고하였으나 Likens-Nikerson장치를 이용하여 마늘의 향기성분을 포집한 후 농축하여 분석한 Yu 등(20)의 연구에서는 1-hexanol은 검출되었으나 2-butanal 및 hexanal은 검출되지 않은 것으로 보고하였다. 이와 같이 용매추출 및 증류추출장치에서 2-butanal 및 hexanal이 검출되지 않은 것은 두 방법 모두 용매에 흡착시켜 분석하는 원리를 이용하는 것이지만 농축과정에서 손실되는 것으로도 추정할 수 있다. 마늘 중의 알데하이드 및 알코올류는 alliin, methiin 및 isoalliin이 분해되어 생성된 sulfenic acid들이 물과 작용하여 알코올을 생성하고, 생성된 알코올로부터 해당 알데하이드 물질이 생성된다고 Spare와 Virtanin(27)은 보고하였다. 마늘 essential oil에서는 diallyl disulfide가 주성분이며 diallyl trisulfide와 diallyl tetrasulfide도 함유되어 있다고 보고하였다(19). 또한 Brodnitz 등(10)은 alliin이 분해되면 각종 monosulfide, disulfide, trisulfide 이외에도 이산화황이 생성된다고 보고하였다.

Alliinase 반응조건에 의한 휘발성 성분의 생성량 비교

열처리 마늘필프에 alliinase를 가하여 thiosulfates의 생성량을 측정한 결과 15분 동안 반응시켰을 때 thiosulfates의 생성량이 최대치에 도달하는 것으로 나타났다. 따라서 alliinase를 열처리 마늘필프에 100, 200, 300 및 400 unit씩 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 시료들과 대조구에 대한 휘발성 향기성분의 생성량을 GC/MSD로 분석한 결과는 Table 2와 같았다. 대조구의 휘발성 향기성분의 총 피크면적을 100%로 하여 비교할 때 alliinase를 열처리 마늘필프에 100, 200, 300 및 400 unit씩 첨가한 시료들의 휘발성 향기성분의 전체 생성율은 각각 25.4, 35.7, 65.5 및 76.0%이었다. 마늘의 주요 향기성분이며 생리활성을 나타내는 것으로 알려진 diallyl disulfide, diallyl trisulfide, diallyl sulfide 등과 같은 함황 휘발성성분의 전체 생성율은 각각 25.4, 35.3, 67.5 및 76.3%이었으며, 함황 휘발성물질 총 피크면적의 77.3%를 차지하는 것으로 나타난 alliin 열분해산물인 3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin 및 2-vinyl-4H-1,3-dithiin화합물은 각각 27.6, 36.1, 72.1 및 78.8%가 생성되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 HPLC를 이용하여 이들 시료의 thiosulfates 총 함량 생성율을 측정한 결과와 유사한 경향을 나타내고 있었다.

요 약

마늘의 주요 향기성분 및 생리활성을 나타내는 것으로 알려진 함황 화합물의 생성을 조절하기 위한 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 열처리에 의하여 마늘 중의 효소를 완전히 실패시킨 마늘필프에 마늘로부터 추출한 alliinase를 첨가하여 첨가량 및 반응시간에 따른 thiosulfates 및 휘발성 향기성분의 함량 변화를 측정하였다. HPLC 및 LC/MS/MS를 이용하여 생마늘 중의

thiosulfates를 분리, 확인한 결과 8종의 thiosulfates를 확인하였다. Alliinase는 전체 thiosulfates함량의 약 60%를 차지하는 것으로 나타났다. 마늘로부터 추출한 alliinase를 열처리 마늘필프에 각각 100, 200, 300 및 400 unit를 첨가하여 5, 10 및 15분씩 각각 반응시킨 결과 효소첨가량 및 반응시간의 증가와 함께 thiosulfates 함량도 증가하였다. 100, 200, 300 및 400 unit의 alliinase를 첨가하여 15분간 반응시킨 결과 총 thiosulfates는 생마늘(대조구)에 비하여 각각 37, 68, 77 및 80%가 생성되는 것으로 나타났다. GC/MSD를 이용하여 대조구 및 효소를 첨가하여 반응시킨 시료의 휘발성 향기성분을 분석한 결과 36개의 피크를 분리하였고, 이중 28개 피크에 대하여 확인 할 수 있었다. 확인된 28개의 피크 중 23개 피크가 함황 화합물이었다. Alliinase를 100, 200, 300 및 400 unit씩 첨가하여 15분간 반응시킨 시료에 대하여 휘발성 향기성분을 분석한 결과 대조구에 비하여 각각 25, 36, 66 및 76%가 생성되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 열처리한 마늘에 alliinase를 첨가하여 반응시키면 반응조건에 따라 마늘 중의 주요생리활성 물질 및 휘발성 향기성분인 thiosulfates와 휘발성 함황 화합물의 생성을 30-80%까지 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Kwon SK. Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. J. Appl. Pharmacol. 11: 8-32 (2003)
2. Tsao SM, Yin MC. *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemoth. 47: 665-670 (2001)
3. Chi MS, Koh ET, Stewart TJ. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. J. Nutr. 112: 241-248 (1982)
4. Chung JG. Effects of garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine *N*-acetyltransferase activity in human bladder tumor cells. Drug Chem. Toxicol. 22: 343-358 (1999)
5. Chun HJ, Lee SW. Studies on antioxidative action of garlic components isolated from garlic (*Allium sativum* L.). Korean Home Econ. Assoc. 24: 43-51 (1986)
6. Fanelli SL, Castro GD, de Toranzo EG, Castro JA. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl sulfide. Res. Commun. Mol. Path. 102: 163-174 (1998)
7. Jeang DY, Jeang SU. Garlic Science. World Science, Seoul, Korea. pp. 93-103 (2005)
8. Lawson LD, Wood SG, Hughes BG. HPLC analysis of alliin and other thiosulfates in garlic clove homogenates. Planta Med. 57: 263-270 (1991)
9. Stoll A, Seebeck E. Chemical investigation on alliin, the specific principle of garlic. Adv. Enzymol. 11: 377-400 (1951)
10. Brodnitz MH, Pascale JV, Derslice LV. Flavor components of garlic extracts. J. Agr. Food Chem. 19: 273-275 (1971)
11. Kamel A, Saleh M. Recent studies on the chemistry and biological activities of the organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). Vol. 23, pp. 455-485. In: Studies in Natural Products Chemistry. Rahman A (ed). Elsevier, New York, NY, USA (2000)
12. Pruthi JS, Singh LJ, Girdhari L. Thermal stability of alliinase and enzymatic regeneration of flavour in odourless garlic powder. Curr. Sci. India 28: 403-404 (1959)
13. Mazelis M, Crews L. Purification of the alliin lyase of garlic, *Allium sativum* L. J. Biochem.-Tokyo 108: 725-730 (1968)
14. Nock LP, Mazelis M. The C-S lyases of higher plants: Direct comparison of the physical properties of homogeneous alliin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*). Plant Physiol. 85: 1079-1083 (1987)
15. Friedemann TE, Hangen, GE. Pyruvic acid II. The determination of keto acids in blood and urine. J. Biol. Chem. 147: 415-442

- (1943)
16. Schwimmer S, Weston WJ. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *J. Agr. Food Chem.* 9: 301-304 (1961)
 17. Freeman GG, Whenham RJ. The use synthetic(±)-S-1-propyl-L-cystein sulphoxide and of alliinase preparation in studies of flavor changes resulting from processing of onion (*Allium cepa* L.). *J. Sci. Food Agr.* 26: 1333-1346 (1975)
 18. Block E, Naganathan S, Putman D, Zhao SH. *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (Ramsons), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. *J. Agr. Food Chem.* 40: 2418-2430 (1992)
 19. Shin DB. Effect of extraction and dehydration methods on flavor compounds of garlic powder. PhD thesis, Chung-Ang University, Seoul, Korea (1995)
 20. Yu TH, Wu CM, Liou YC. Volatile compounds from garlic. *J. Food Sci.* 54: 977-981 (1989)
 21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
 22. Shin DS. Effect of food components and processing condition on antimicrobial of garlic-alliinase reaction compounds. MS thesis, Chung-Ang University, Seoul, Korea (2001)
 23. Tomofumi M, Asako H, Mitsuyo S, Mami Y, Kazuki S. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cystein suloxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive). *Eur. J. Biochem.* 257: 21-30 (1998)
 24. Arnault A, Christides JP, Mandon N, Haffner T, Kahane R, Auger J. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromatogr. A* 991: 69-75 (2003)
 25. Law LD, Hughes BG. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Med.* 58: 345-350 (1992)
 26. Leahy MM, Reineccius GA. Comparison of methods for the isolation of volatile compounds from aqueous model system. pp. 19-47. In: *Analysis of Volatiles*. Schreier P (ed). Walter de Gruyter, Berlin, Germany (1984)
 27. Spare CG, Virtanin AI. On the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*) vapors and its precursor. *Acta Chem. Scand.* 17: 641-650 (1963)