

# 마늘의 기능성 황 화합물 변화와 크로마토그래피를 이용한 분석기술

## Changes in Biological Sulfur Compounds in Garlic and Chromatographic Methods in Their Analysis

신동빈 | 식품분석센터

Dong-Bin Shin | Food Analysis Center

### 서론

마늘(*Allium sativum* L.)은 부추과(*Alliaceae*)에 속하는 대표적인 *Allium*속 식물로 독특한 향미와 다양한 생리활성을 지니고 있다. 마늘의 이러한 식품학적, 약리적 가치는 마늘 중에 존재하는 황을 함유한 화합물에 기인되는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구 결과에 의하면 마늘의 다양한 생리활성을 나타내는 화합물들은 마늘 중에 존재하는  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides와 마늘 조직이 손상되면 생성되는 dialk(en)yl thiosulfinate들이 있다. 또한 dialk(en)yl thiosulfinate의 분해 및 분해물들의 화학적 반응에 의하여 생성되는 diallyl disulfide, diallyl trisulfide, diallyl sulfide와 같은 휘발성 황 화합물들도 암세포 성장억제 및 항균효과가 탁월한 것으로 나타났다.

$\gamma$ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine의 분해과정에 나타나는 S-allyl-L-cysteine은 간 장해예방효과,

methylhydrazine으로 유도되는 대장암 예방, 사람 신경아세포 종양 증식저해 작용, 항산화 작용 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고하고 있다. Diallyl sulfide는 aflatoxin B<sub>1</sub>, benzo(a)pyrene, nitrosoamine, dimethylhydrazine 등이 화학 발암제의 활성화에 의하여 유도되는 암을 cytochrome P 450-2 E1을 불활성화 시킴으로써 예방한다고 보고되었다. Ajoene 이나 allyl methyl trisulfide는 혈소판 응집 억제작용이 있으며, allyl methyl sulfide는 항산화 작용에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

마늘의 생리활성과 향미에 중요한 영향을 미치는 성분인  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides는 마늘 저장 중  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase 등의 효소작용에 의하여 변화하는 것으로 나타났다. 이러한 변화는 또한 마늘의 조직을 파쇄하면서 생성되는 dialk(en)yl thiosulfinate와 휘발성 황 화합물은 조성에도 영향을 줄 것이다. 마늘을 이용한 기능성 식품을 개발함에 있어서 생리활성에 관여하는 물

질의 변화를 먼저 규명하고 이를 근거로 하여 제품을 생산하여야 기능성 식품으로서 그 효능을 충분히 인정받을 수 있을 것이다.

따라서 본문에서는 마늘의 저장 중 생리활성과 향미에 중요한 영향을 미치는 성분인  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides의 생성경로와 저장, 가공과정에서의 성분 변화를 발표된 논문을 중심으로 정리하여 살펴보았다. 또한 마늘의 생산, 저장, 가공 중에 생성되는 주요 황 생리활성물질의 분석법에 대해 한국식품연구원 연구진들이 기본사업비로 수행하여 개발, 확립한 분석법에 대하여 서술하였다. 한국식품연구원 분석센터에서 개발, 확립된 마늘 중의 생리활성물질 분석법이 관련 업계의 제품개발 및 품질관리에 도움이 되기를 바란다.

### $\gamma$ -Glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl cysteine sulfoxides 화합물의 생성경로 및 저장 중 성분변화

1964년 Suzuki 등은 마늘로부터 최초로 몇몇  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines를 분리, 보고하였다. 그 후 Virtanen 등에 의하여 수종의 유사화합물이 더 보고되었다. 마늘에는  $\gamma$ -glutamyl-S-(2-propenyl)-L-cysteine,  $\gamma$ -glutamyl-S-(1-propenyl)-L-cysteine,  $\gamma$ -glutamyl-S-methyl-L-cysteine이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한  $\gamma$ -glutamyl peptide류는 alk(en)yl cysteines와 alk(en)yl cysteine sulfoxides로부터 transpeptidation 작용에 의하여 생성되는 것으로

알려져 있다. Matsuura 등은 성장기의 마늘에는  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines가 거의 존재하지 않으나, 마늘 지상부가 시들기 1개월 전부터 함량이 현저히 증가한다고 보고하였다. 지금까지 알려진 바로는  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines는 마늘의 저장성분인 것은 확실하나 질소대사과정에 있어서 그 중요성은 아직 분명하게 밝혀져 있지 않다.

저장 중의 마늘에 있어서는  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines에  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase가 작용하면 S-allyl cysteine, *trans*-1-propenyl cysteine, S-methyl cysteine이 생성된다. 마늘의 향기 및 생리활성 전구물질로 너무도 잘 알려진 alliin(S-allyl-L-cysteine sulfoxide)과 methiin(S-methyl-L-cysteine), isoalliin[S-(*trans*-1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide]은 그림 1에서 보는 바와 같이 각각 S-allyl cysteine, S-methyl cysteine, *trans*-1-propenyl cysteine에 oxidase가 작용하여 생성한다.

최근의 연구결과에 의하면 마늘을 저온저장 할 경우  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines가 분해되어 alliin, methiin, isoalliin이 생성되며, alliin 등의 생성 정도는 저장온도에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났다. Ichikawa 등은 마늘을 각각 -3, 4, 23°C에 150일간 저장하면서 마늘 중의 이들의 변화를 측정한 결과 모든 저장온도에서  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines가 분해되어 감소하는 경향을 나타낸 반면 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (alliin, methiin, isoalliin)는 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 감소 및 증가 경향은 -3, 25°C보다 4°C에 저장한 마늘에 있어서 가장 큰 것으로 나타났다. 즉 저장 전 건조함량기준으로 마늘 1 g당  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines(GSAC) 함량이  $51.2 \pm 7.3 \mu\text{mole}$ 인 마늘을 4°C에서 저장한 결과

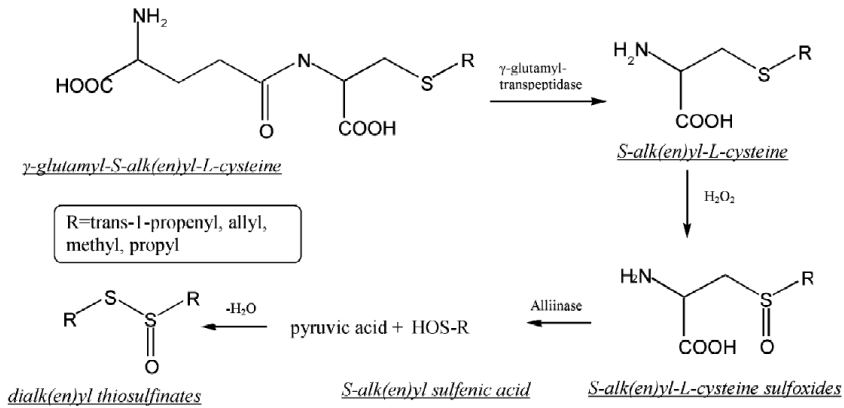


그림 1. S-allyl-γ-glutamyl-L-cysteine로부터 alliin 및 S-allyl-L-cysteine의 합성경로

60일 만에 66%가 감소한  $17.2 \pm 2.7 \mu\text{mole}$ 를 나타냈고 저장 90일까지도 지속적으로 감소하는 것으로 나타났다. 반면 alliin은 저장 90일까지 지속적으로 증가하였고 150일까지도 유의적 변화는 없는 것으로 나타났다(그림 2).

γ-Glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine은 -3°C에서 저장한 경우 저장 60일까지는 변화가 없었으나 그 후부터는 점점 감소하여 약 47% 감소하였다( $40.4 \pm 4.6$ 에서  $21.6 \pm 2.9 \mu\text{mol}$ ). 4°C에서는 10일에서 60일 사이에 급격히 감소하여 저장 60일, 150일에는 각각 66%, 81%가 감소하는 것으로 나타

났다( $40.4 \pm 4.6$ 에서  $13.86 \pm 2.4$ 와  $7.7 \pm 2.1 \mu\text{mol}$ /마늘 g당, 건조물질 기준). 반면 23°C에 저장한 마늘은 저장 90일까지는 완만히 감소하여 약  $23 \mu\text{mole}$ 에 도달하였다. γ-Glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines의 효소적 분해 작용에 의하여 생성된 isoalliin은 -3, 4°C에서 γ-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine에 반비례하여 증가하는 경향을 나타내어 저장 150일 후에는 각각 14배, 32배가 증가하였다(저장 전  $0.8 \pm 0.1$ 에서 각각  $11.2 \pm 4.5$ ,  $25.7 \pm 2.9 \mu\text{mole}$ 로 증가함). 23°C에 저장한 마늘의 isoalliin 함량은 저장 150일의 경우 약 4배 증가한  $3.4 \mu\text{mole}$ 를 나타

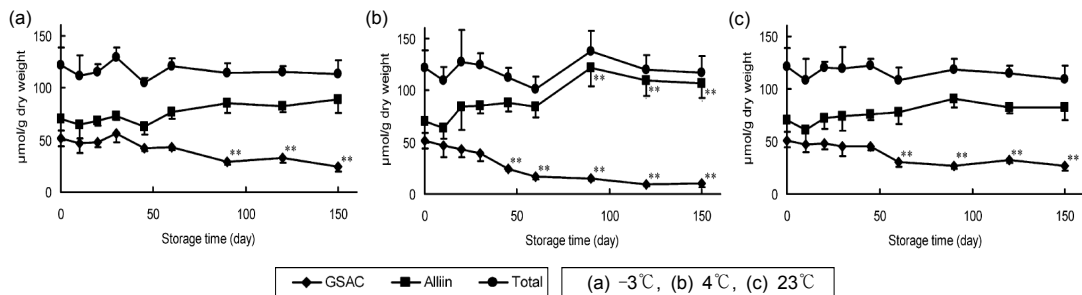


그림 2. -3°C(a), 4°C(b), 23°C(c) 저장 마늘의 GSAC 및 alliin의 함량변화

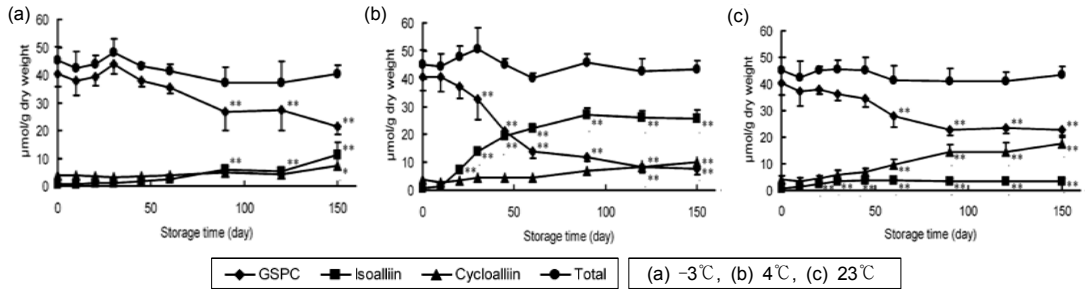


그림 3. -3°C(a), 4°C(b), 23°C(c) 저장 마늘의 GSPC 및 isoalliin의 함량변화

내었으나, cycloalliin 함량은 -3, 4°C보다 4.4배 높은  $17.5 \pm 3.5 \mu\text{mole}$ 을 나타내었다(그림 3).

$\gamma$ -Glutamyl-S-methyl-L-cysteine은 4°C에서 150일간 저장한 경우 39% 감소하였으나 -3, 23°C에서는 약간 감소하는 하는 것으로 나타났다(그림 4).

마늘 저장 중 위와 같이  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines이 감소하고 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides가 증가하는 것은 마늘 중에 존재하는  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase의 활성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. Lancaster 등과 Ceci 등은 발아하는 마늘은 휴면기의 마늘보다  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase의 활성이 높다고 보고하였다. Ichikawa 등은 그들의 연구결과에서 -3, 25°C보다는 4°C에 저장한 경우  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines

의 감소 현상이 큰 것은 4°C에 저장하는 동안 휴면기가 타파되면서 수반되는  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase 활성 증가에 기인하는 것이라고 하였다. 이전의 연구자들도  $\gamma$ -glutamyl peptide가 alliin과 같은 sulfoxides로 변화하는 것은 발아의 최적온도인 4°C의 저장온도와 밀접한 관계가 있다고 보고하였다.

## Dialk(en)yl thiosulfinate 화합물의 생성 및 변화

수확 저장 중의 마늘에는 3종류의  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteine류와 3종류의 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides인 alliin, methiin, isoalliin이 존

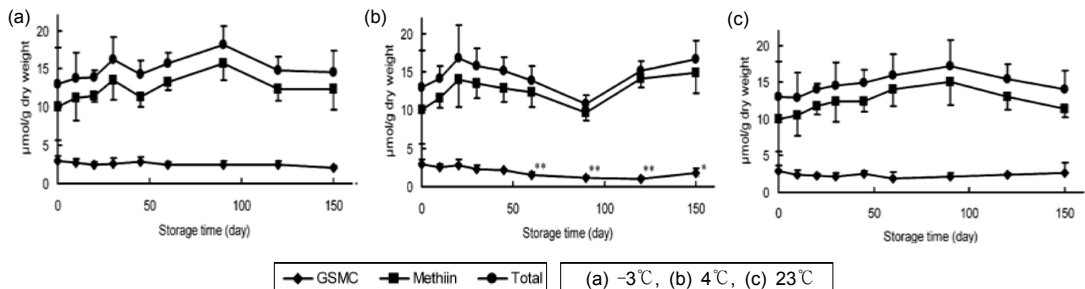


그림 4. -3(a), 4(b) 및 23°C(c) 저장 마늘의 GSMC 및 methiin의 함량변화

재하고 있다. S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide류는 마늘의 잎살저장세포(mesophyll storage cell) 내에 존재하고 있다. 한편 마늘의 유관세포(vascular bundle sheath cell) 속에는 alliinase라는 효소가 존재한다.

Alliin, methiin, isoalliin은 마늘 냄새를 나타내는 전구물질로서 마늘조직이 손상되지 않고 이들 세포 속에 서로 격리되어 있는 상태에서는 아무 냄새도 내지 않는다. 그러나 마늘을 파쇄하면 유관세포 속에 격리되어 있던 alliinase가 alliin, methiin, isoalliin과 서로 접촉 작용하여 3종의 alk(en)yl sulfic acid를 생성하고 이들이 순간적으로 결합하여 allyl-S(O)S-allyl(allicin)을 비롯한 8개의 thiosulfonates, 즉 allyl-SS(O)-propenyl-(E), allyl-S(O)S-propenyl-(Z), allyl-S(O)S-propenyl-(E), allyl-S(O)S-methyl, methyl-S(O)S-propenyl(e), allyl-SS(O)-methyl, methyl-S(O)S-methyl이 생성된다.

마늘의 alliinase 작용으로부터 생성되는 thiosulfonates량은 마늘 중에 존재하는 기질인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide 함량, alliinase 함량 및 활성에 따라 다를 수 있는데 이들의 함량 및 효소활성은 마늘의 품종, 토양조건, 기후환경, 저장조건, 가공조

건에 따라 차이가 있다.

마늘에 존재하는 alliinase는 448개의 아미노산과 당으로 구성되어 있으며 분자량은 약 54 kD의 polypeptide로 그 함량은 마늘 총단백질 함량의 10%에 상당하는 것으로 알려져 있다(생마늘 1 g당 약 10 mg임). Alliinase의 작용기질은 (-)-L-cysteine 으로부터 유래된 것이며 cysteine의 S 원자는 ethyl, propyl, isopropyl, allyl, butyl기와 같은 지방족 기질(aliphatic group)과 결합되어 있어야 한다. 또한 cysteine 유도체의 S 원자는 sulfoxide 형태로 존재하여야 한다. 따라서 S-alk(en)yl-L-cysteines는 기질이 아니다. Alliinase의 최적 pH는 5~8로 비교적 넓으며 최적 온도는 37°C이다. pH 3 이하에서 alliinase는 실활하며, 실활된 효소는 pH 3 이상에서 다시 활성이 살아나지 않는다. 또한 500 g의 마늘을 방사자루에 넣고 1 l 정도의 100°C 물에서 5분간 가열하면 효소가 완전히 실활되는 것으로 나타났다. 마늘의 alliin, methiin, isoalliin에 alliinase가 작용하여 생성되는 thiosulfonate는 35°C에서 30초 이내에 이루어지며, 6초 이내에 50% 이상이 전환되는 것으로 알려져 있다(그림 5).

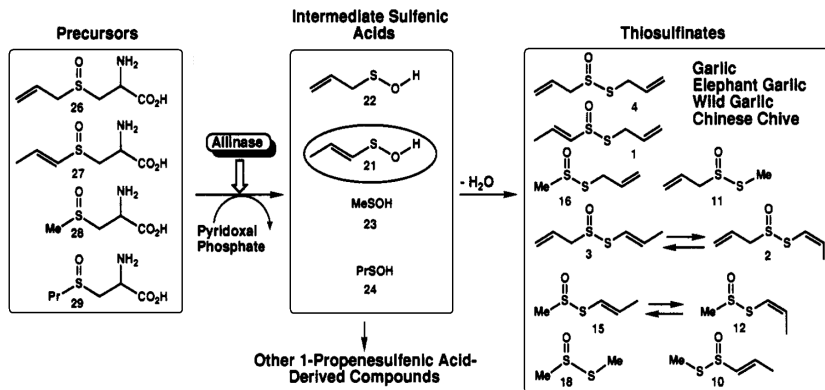


그림 5. 마늘의 dialk(en)yl thiosulfonate 화합물 생성경로

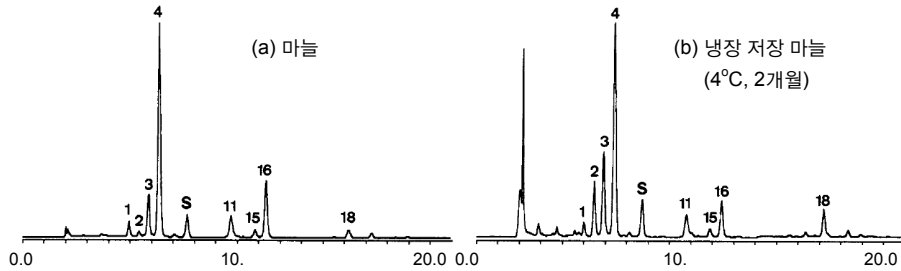


그림 6. 마늘 및 냉장 저장마늘의 thiosulfinates 분리 HPLC 크로마토그램

Block 등은 마늘을 냉장저장하면 1-propenyl 함유 thiosulfinates가 증가하는 것으로 나타났다. 즉 실온저장 마늘(sample 1), 뉴욕에서 수확한 저장초기 마늘(sample 2), 냉장저장 마늘(sample 3), 뉴욕에서 수확하여 냉장저장 마늘(sample 4) 4종의 allyl/methyl/ 1-propenyl 함유 thiosulfinates의 비율을 측정한 결과 각각 80:16:4, 78:11:11, 94:2:3, 90:3:8 인 것으로 나타났다(그림 6, 표 1).

### Alliinase 첨가에 의한 열처리 마늘로부터의 thiosulfinates의 재생성기술

마늘의 향미 및 생리활성에 주요한 역할을 하는 thiosulfinates의 생성을 인위적으로 조절하기 위한 연구를 수행하였다. 이를 위해 껍질을 벗기지 않은 통마늘을 100℃에서 5분간 열처리하여 마늘 중의 alliinase를 완전히 실효시킨 후 마늘로부터 추출,

표 1. 냉장저장 마늘의 thiosulfinates 함량변화

Peak No	Thiosulfinates	Garlic stored at room tem.		Garlic stored at refrigerator	
		sample 1	sample 2	sample 1	sample 2
1	AllSS(O)Propenyl-(E)	2.1	1.6	1.6	3.1
2,3	AllS(O)SPropenyl-(Z, E)	5.9	5.3	18	13
4	AllS(O)SAll	62	89	59	79
11	AllS(O)SMe	8.1	1.4	7.5	1.6
15	MeS(O)SPropenyl-(E)	1.2	-	1.9	-
16	AllSS(O)Me	18	2.9	11	3.9
18	MeS(O)SMe	2.2	-	0.9	-
total MeS(%)		16	2	11	3
total AllS(%)		80	94	78	89
total 1-propenylS(%)		4	3	11	8
total thiosulfinates <sup>1)</sup>		25.6	14.3	20.7	22.1

1) Unit: μmole/g wet weight.

정제한 alliinase를 첨가하여 효소 첨가량 및 반응시간에 따른 thiosulfinates의 종류와 최대 생성조건을 규명하였다. 열 처리한 마늘펄프에 마늘로부터 추출, 정제한 alliinase를 100, 200, 300, 400 unit를 가하여 37°C에서 5, 10, 15분씩 각각 반응시킨 후 HPLC로 thiosulfinates를 분석한 결과 그림 7과 같은 크로마토그램을 얻었다. 그림 7의 (d)는 열처리하지 않은 생마늘(대조구)의 크로마토그램으로 Block 등이 보고한 allicin 이외의 7개의 thiosulfinates 피크가 모두 나타났으나, 열처리하여 alliinase를 가하지 않은 마늘펄프의 크로마토그램 (a)는 내부표준 물질로 사용한 benzyl alcohol 이외에는 다른 피크가 전혀 나타나지 않았다. 반면 alliinase를 200, 400 unit를 각각 가하여 15분간 반응시킨 크로마토그램 (b), (c)는 alliinase의 첨가량이 증가할수록 피크의

수 및 각 피크의 면적이 증가하였다. 크로마토그램 (a)에서 thiosulfinates 피크가 없다는 사실은 마늘 중의 alliinase가 완전히 실활되었다는 것을 나타내는 것이다.

효소 첨가량 및 반응시간에 따른 thiosulfinates 생성량을 대조구를 100%로 하여 비교한 결과는 표 2와 같았다. 표 2에서 보는 바와 같이 본 실험조건에 의하여 열처리한 마늘펄프에 alliinase를 가하여 반응시키면 생마늘로부터 생성된 thiosulfinates의 약 80%가 생성되었으며, 이들의 상대적 생성량은 효소 첨가량 및 반응시간의 증가와 함께 증가하는 것으로 나타났다. 즉 alliinase를 100, 200, 300, 400 unit씩 가하여 5분 반응시킨 결과 thiosulfinates 전체 생성량은 대조구의 피크 총면적을 100%로 볼 때 각각 33.8, 62.8, 72.2, 73.6%가 생성되었으며,

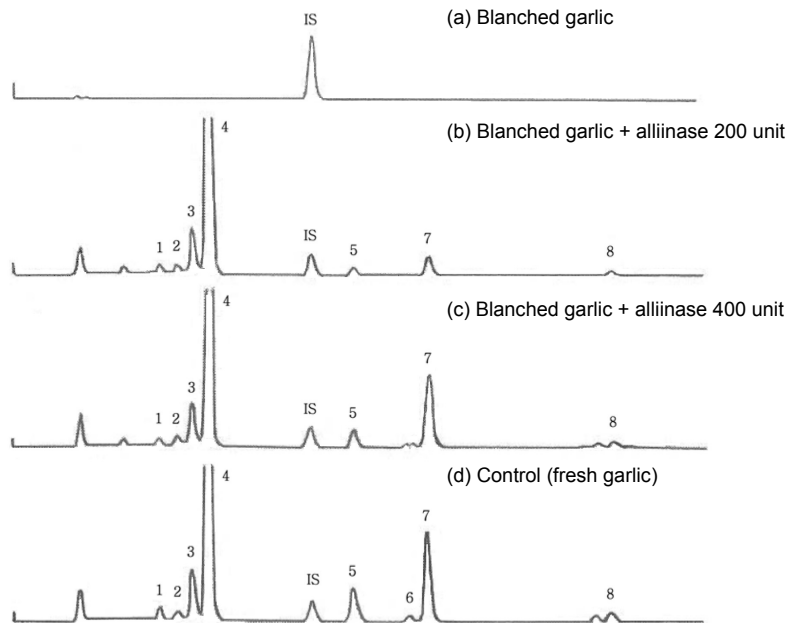


그림 7. Alliinase 반응조건에 따른 열처리 마늘로부터 생성된 thiosulfinates 크로마토그램

10분간 반응시킨 처리구에서는 각각 35.0, 65.3, 77.6, 80.2%가 생성 되었다. 15분간 반응시킨 경우에는 각각 36.9, 67.9, 77.3, 80.5%가 생성 되는 것으로 나타났다. 한편 반응시간 및 효소 첨가량에 따른 thiosulfinate의 생성량은 thiosulfinate의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 나타났다. 마늘의 전체 thiosulfinate 중 60% 이상을 차지하는 것으로 나타난 allicin은 alliinase 300 unit 이상을 가하여 5분간 반응시키면 거의 최대치인 85% 정도 생성되었으며 그 후 15분까지 약 3% 정도 상승하였다. Allyl-S(O)S-1-propenyl(Z), allyl1-S(O)S-1-propenyl(E)은 각각 200 unit 이상의 효소를 가하여 5분간 반응시키면 약 50, 70%가 생성되었으며 그 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 그러나 allyl1-SS(O)-1-propenyl(E)은 5분 반응시킨 시료에서 최대 70% 정도 생성되었으며 10, 15분간 반응한 시료에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. Allyl-S(O)S-methyl 및 allyl-SS(O)-methyl은 효소 첨가량의 증

가와 함께 증가하였으며, 반응시간 5분 이후에도 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 가장 낮은 생성률을 나타낸 methyl-S(O)S-methyl은 반응시간 15분까지 증가하는 것으로 나타내었다.

Allyl-SS(O)-methyl(E)은 10, 15분 처리구에서 감소하는 경향을 나타낸 것은 이 물질이 효소작용에 의하여 5분 이내에 최대 생성률에 도달하여 그 이후부터는 분해되는 것이며, methyl-S(O)S-methyl이 15분까지도 증가한 것으로 나타난 것은 다른 thiosulfinate에 비하여 비교적 늦게 생성되기 때문인 것으로 사료된다. Law와 Hughes는 마늘로부터 생성되는 thiosulfinate의 특성을 연구한 결과 생마늘을 파쇄하면 allicin 및 allyl propenyl thiosulfinate 화합물은 23℃에서 0.5분 이내에 최대 생성률을 나타내었으나, methyl기를 함유한 thiosulfinate는 이보다 10배 정도 늦은 5분 후에야 최대 생성률에 도달하였으며, 이들 모두 100분까지는 안정성을 유지하였다. 그러나 allyl 1-propenyl thiosulfinate는

표 2. Alliinase 첨가량 및 반응시간에 따른 thiosulfinate 함량 변화

(Unit : peak area percent<sup>2)</sup>)

PN <sup>1)</sup>	Compound	Addition concentration (alliinase)											
		100 unit <sup>3)</sup>			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	AllSS(O)Propenyl-(E)	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	AllS(O)SPropenyl-(Z)	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	AllS(O)SPropenyl-(E)	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	AllS(O)SAll	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	AllS(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	AllSS(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: 피크번호

2) 열처리하지 않은 마늘의 피크면적을 100%로 하여 비교한 면적비임

3) 1 unit는 1분에 1 μmole pyruvate를 생산하는 alliinase 량임.



thiosulfates 중 가장 불안정한 물질로 5분 후부터 감소하기 시작하였다고 보고하였다. Pruthi 등은 효소를 실험시킨 마늘 분말에 alliinase를 가하여 반응시키면 allicin과 allyl sulphide를 재생성시킬 수 있었으며, 열처리에 의하여 마늘 중의 peroxidase 및 catalase와 같은 갈변을 야기하는 효소도 실험시키므로 마늘분말제품의 경우 갈변을 방지할 수 있다고 하였다.

## 마늘 및 마늘 가공품 중의 기능성 황 화합물의 분석법

마늘 중의 기능성에 관여되는 황 화합물의 함량은 품종, 토양, 시비조건, 기후에 따라서 다를 뿐만 아니라 같은 마늘이라도 저장조건에 따라서 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 이는 마늘을 이용하여 특정 생리활성을 지닌 가공제품을 제조할 경우 사용하는 원료마늘의 표준화가 필요함을 말하고 있다. 또한 제조방법 및 제품의 품질 표준화도 필요하다. 이를 위해서는 관련된 기능성 물질이 무엇인가를 알고 이를 관리할 수 있는 분석법의 확립이 필요하다. 따라서 한국식품연구원 연구진들이 2년에 걸쳐 확립한 분석법을 소개하고자 한다.

### 마늘 중의 $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteines, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides 분석법

마늘 중의  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteine류는 구성 alk(en)yl기에 따라서  $\gamma$ -glutamyl-S-allyl-L-cysteine(GSAC),  $\gamma$ -glutamyl-S-*trans*-1-propenyl-L-

cysteine(GSPC),  $\gamma$ -glutamyl-methyl-L-cysteine(GSMC)이 존재하며 이들이 transpeptidase, 열처리 등에 의하여 분해되면 각각의 S-allyl-L-cysteine(SAC), S-*trans*-1-propenyl-L-cysteine(SPC), S-methyl-L-cysteine(SMC)이 생성된다. SAC, SPC, SMC가 peroxidase에 의하여 산화되면 이들로부터 각각 S-allyl-L-cysteine sulfoxide(alliin), S-*trans*-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide(isoalliin), S-methyl-L-cysteine sulfoxide(methiin)가 생성된다. 마늘 조직이 파쇄되면 alliinase의 작용에 의하여 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(alliin, isoalliin, methiin)가 분해되어 thiosulfates로 전이되기 때문에 이들 물질을 분석하기 위해서는 alliinase를 실험시켜야 한다. 실험을 위해서는 100℃에서 5분간 열처리하는 방법과 염산이나 개미산을 이용하여 pH를 3.2 이하로 유지하는 방법이 있다. 시료전처리, 추출, 분리방법을 상술하면 다음과 같다.

### 시료 전처리 및 추출법

생마늘의 GSAC, GSPCS, GSMC, GPA, alliin, isoalliin, SAC, SPC를 동시분석하기 위한 시료전처리 및 추출조건으로 생마늘을 100℃에서 5분간 열처리한 후 이를 균질하게 펄프화하였다. 펄프화된 마늘 1g를 취하여 증류수 20 ml에 용해하고 이를 1분간 vortex로 혼합한 후 5분간 sonication하고 전체량을 25 ml로 정용하여 membrane filter로 여과하여 분석에 사용하였다.

### HPLC 분석 조건

기기는 고속액체크로마토그래피, UV로 검출과장

은 208 nm로 측정하였으며, 컬럼은 Hypurity Elite C<sub>18</sub>(3 μm, 150 mm × 3.0 mm)을 사용하였다. 이동상으로는 sodium dihydrogen phosphate(phosphate buffer, 이동상 A)와 아세트니트릴과 이동상 A를 50:50(V/V)으로 혼합한 용액(이동상 B)을 gradient program을 사용하였다. 사용한 gradient program은 다음과 같다. 즉 100% A(0분), 70% A(5분), 46% A(25분), 0% A(28분), 100% A(30분), 100% A(50분). 이동상의 유속은 0.4 ml/min로 하였다.

### HPLC 분석 결과

앞에 서술한 시료추출 및 고속액체크로마토그래피 분리조건에 따라 분석한 결과, 그림 8에서 보는 바와 같이 GSAC, GSPC, GSMC, alliin, isoalliin, SAC, SPC 8종의 기능성 황 화합물을 분리할 수 있었다. 시료추출 및 분리조건에 대하여 국제적 유효성 검증기준에 의거 유효성을 검증한 결과 상관계수(0.95 이상), 회수율(75% 이상), 재현성(15% 이

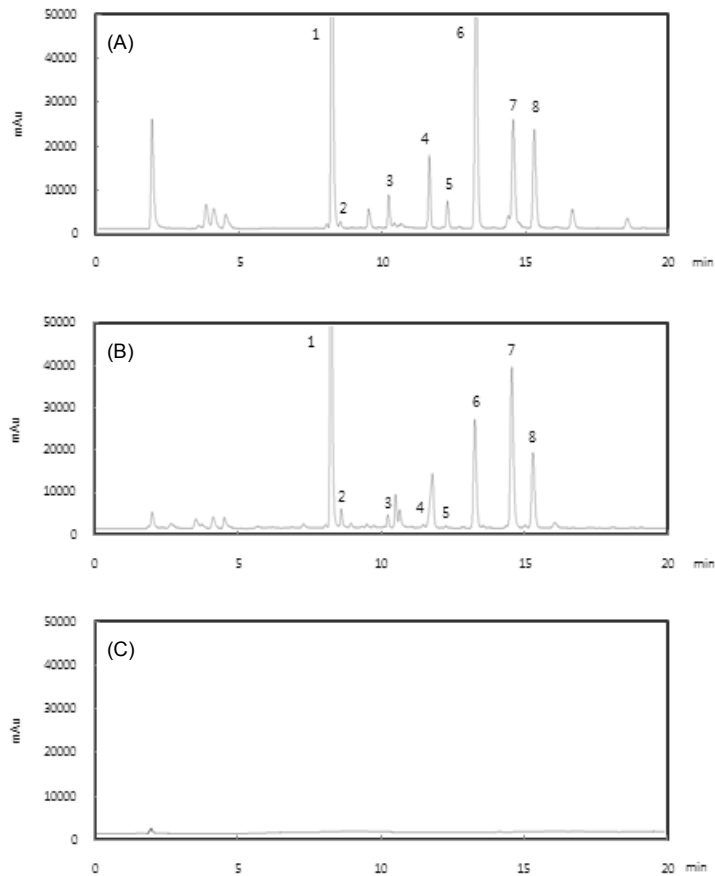


그림 8. 마늘의 황 화합물 크로마토그램. (A) 표준물질 혼합용액 시료, (B) 열처리 마늘, (C) Blank시료. Peaks identifications: (1) alliin, (2) isoalliin, (3) GSMC, (4) SAC, (5) SPC, (6) GSAC, (7) GSPC, (8) GPA

하)을 모두 충족하였다. 정량한계는 0.8~6.8 ug/ml 로 마늘에 존재하는 각각의 성분을 충분히 정량할 수 있는 것으로 나타났다.

위의 방법에 따라 의성, 남해, 신안, 서귀포 지역의 마늘을 각각의 1개 농가에서 직접 구입하여 분석한 결과는 표 3과 같다.

표 3에서 보는 바와 같이 alliin의 전구물질로 알려진 GSAC는 신안 지역의 마늘이 23.51 mg/마늘 g (건물량 기준)으로 다른 3개 지역에 비하여 높은 것으로 나타났다. 그러나 GSPC는 의성마늘이 타 지역에 비하여 높은 것으로 나타났다. Alliin은 의성, 남해, 신안이 같은 함량을 지닌 것으로 분석되었으며 alliin의 분해산물로 다양한 기능성을 나타내는 allicin은 4개 지역이 모두 같은 것으로 나타났다. 이상의 분석결과는 각 지역의 1개 농가에서 생산된 마늘을 분석한 결과로 각 지역의 생산 마늘에 대한 기능성 물질을 대표한다고 보기는 매우 어렵다. 따라서 앞으로 각 지역 생산 마늘에 대한 대표성을 나타낼 수 있는 시료를 구입하여 분석한 데이터를 확

보하는 것은 우리 마늘의 기능적 특성을 규명하는데 매우 중요한 단계라 사료된다.

### 마늘 중의 allicin과 thiosulfinates의 분석법

마늘 중의 allicin 함량은 마늘 및 마늘 가공제품의 기능성을 논하는데 있어서 매우 중요한 인자이다. 왜냐하면 2000년 이전까지만 하여도 마늘의 기능성과 관련된 가장 중요한 물질이 allicin으로 보고되어 있다. 또한 저장하지 않은 신선 마늘을 분쇄하여 분석해 보면 전체 thiosulfinate류 중에 85% 이상이 allicin 이기 때문이다. 그러나 마늘은 0~10℃ 이하에서 2개월 이상 장기저장하면 alliin과 isoalliin의 증가에 의하여 1-propenyl을 함유한 thiosulfinate의 함량 증가로 allicin 함량은 상대적으로 감소하지만 그래도 전체 thiosulfinate 중의 75% 이상을 차지하고 있다. 본 절에서는 allicin만을 분석하는 방법과 allicin을 비롯한 마늘 중에서 생성되는 thiosulfinate류를 모두 분석할 수 있는 방법에 관하여 각각 서술하고자 한다.

표 3. 주요 마늘 생산지역의 기능성 황 화합물 함량

화합물	농도(mg/마늘 g, 건물량 기준)			
	의성	남해	신안	서귀포
GSAC	13.04±0.68 <sup>1)</sup> c <sup>2)</sup>	18.12±0.48 b	23.51±1.24 a	17.68±0.81 b
GSPC	27.00±1.24 a	17.89±0.56 b	18.47±0.89 b	17.40±0.27 b
GSMC	1.11±0.08 ab	0.96±0.32 c	1.39±0.18 a	0.85±0.08 c
GPA	5.51±0.37 c	8.29±0.12 b	9.62±0.35 a	8.12±0.19 b
Alliin	28.81±1.49 a	30.03±0.43 a	28.09±1.14 a	25.65±0.68 b
Isoalliin	0.54±0.03 a	0.19±0.02 b	0.14±0.03 b	0.14±0.02 b
SAC	0.60±0.09 a	0.43±0.14 a	0.53±0.29 a	0.36±0.03 a
SPC	tr <sup>3)</sup>	tr	tr	tr
Allicin	4.24±1.31 a	3.25±0.82 a	4.26±0.39 a	4.60±1.33 a

1) 측정값은 3반복시험의 평균값과 표준편차임

2) 95%유의적 수준에서의 유의성임(같은 글로 표시는 유의적 차이가 없음을 나타냄)

3) tr은 미량이 존재함을 뜻함 (0.05 mg/g, dry weight 이하)

**Allicin 분석법**

**추출법**

마늘 중의 allicin 추출은 생마늘을 분쇄하여 1 g 을 취하고 증류수 20 ml에 용해하여 이를 1분간 vortex로 혼합한 후 5분간 sonication하고 전체량을 25 ml로 정용하여 membrane filter로 여과하여 분석에 사용한다.

**HPLC 분석 조건**

분석조건은 앞에서 서술한 alliin 등의 분석 조건과 동일하다.

**HPLC 분석 결과**

위와 같은 시료추출 및 분리조건에서 분석한 결과 그림 9와 같은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. Allicin 표준물질을 이용하여 확인한 결과 크로마

토그램 (b)에서 보는 바와 같이 생마늘을 분쇄하면 alliinase의 작용에 의하여 alliin이 분해되어 allicin 피크는 존재하지만 alliin 피크는 나타나지 않았다. 그러나 열처리한 마늘의 경우에는 alliin 피크는 나타나지만 allicin 피크는 없었다.

위의 방법에 따라 의성, 남해, 신안, 서귀포 지역의 마늘을 각각의 1개 농가에서 직접 구입하여 분석한 결과는 표 3에서 보는 바와 같이 4개 지역의 allicin 함량은 3.2~4.6 mg/마늘 g(건조물량 기준)으로 4개 지역 마늘 간의 유의적인 함량 차이는 없는 것으로 나타났다.

**Allicin 등 thiosulfates 동시분석법**

**추출법**

추출 조건을 확립하기 위하여 시료량, 추출용매, 추출시간을 검토하였다. 이를 위하여 마늘 2.5 g에

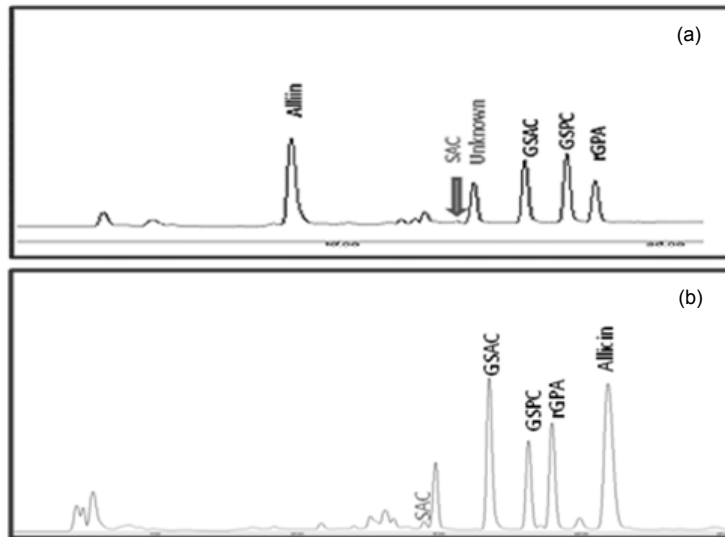


그림 9. Allicin 분석 HPLC 크로마토그램. (a) 열처리 마늘의 크로마토그램, (b) 분쇄한 생마늘의 크로마토그램

증류수 10 ml 가하여 혼합한 후 이에 디클로로메탄 12 ml를 가하여 20분간 초음파추출하고 이를 10,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 디클로로메탄층(하층)을 취하였다. 물층에 다시 디에틸에테르 12 ml를 가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액인 에테르층을 취해 앞서 추출한 디클로로메탄 추출 용액과 합하였다. 이를 30℃ 이하에서 감압건조 한 다음 내부 표준물질(benzyl alcohol) 0.4%가 함유 되도록 제조한 *n*-hexane과 2-propanol 혼합용액(98:2, v/v) 2 ml를 가하여 용해한 후 0.2 μm membrane filter로 여과하여 HPLC/UV 분석용 시험용액으로 사용하였다.

#### HPLC 분석 조건

기기는 고속액체크로마토그래피 및 UV로 검출 파장은 254 nm로 측정하였으며, 컬럼은 Chromsep HPLC column(5 μm, 250 mm × 4.6 mm, Varian, CA, USA)을 사용하였다. 이동상으로는 *n*-hexane(이동상 A)과 2-propanol(이동상 B)을 이용하여 분당 1.8 ml의 유속을 유지하면서 다음과 같은 gradient program하에서 분리하였다. 0분(A 용액 98%), 6분(A 용액 98%), 10분(A 용액 90%), 20분(A 용액 90%), 25분(A 용액 98%), 30분(A 용액 98%).

#### HPLC 분석 결과

추출법의 방법에 의하여 디클로로메탄 및 에틸 에테르를 이용하여 추출한 시료를 HPLC 분리 조건에 따라 분석한 결과 그림 10과 같은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 그림 10에서 보는 바와 같이 alliin 이외에도 *trans*-1-propenyl기를 함유한 thiosulfates의 분리가 가능하였고 또한 methyl기를 함유한 thiosulfates도 분리할 수 있었다. 시료추출 및 분리

조건에 대하여 국제적 유효성 검증기준에 의거 유효성을 검증한 결과 상관계성(0.95% 이상), 회수율(75% 이상), 재현성(15% 이하)을 모두 충족하였다. 정성 및 정량한계는 각각 1.83 및 2.99 ug/ml로 산출되었다. 앞에서 서술한 바와 같이 마늘을 15℃ 이하에서 저온 저장하면 alliin 및 isoalliin이 증가하는데 이의 증가에 따라 그림 6에서 보는 바와 같이 마늘을 파쇄하면 isoalliin으로부터 생성되는 thiosulfates의 함량도 변화한다. 따라서 본 시험법은 이러한 마늘 중의 sulfoxides 함량 변화에 따른 thiosulfate류의 변화를 측정할 수 있는 방법이다.

## 요 약

마늘은 위암, 대장암, 피부암 등 각종 암을 예방하는 효과 이외에도 혈전생성 억제효과, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈압상승 억제작용 등 각종 작용에 의해 심혈관 질환 예방효과가 있으며, 최근 항산화효과 뿐만 아니라, 면역기능강화, 피로회복 효과까지 있다는 보고도 있다. 이러한 마늘의 기능적 효과는 마늘 중에 존재하는 황 화합물에 기인하는 것으로 밝혀져 있다. 수확 후 저장마늘 중에는 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide(alliin, isoalliin, cycloalliin, methiin)와 이들의 저장물질로 알려진 3종의 γ-glutamyl-S-2-propenyl-L-cysteine, γ-glutamyl-S-*trans*-1-propenyl-L-cysteine, γ-glutamyl-S-methyl-L-cysteine이 존재한다. 마늘 중의 존재하는 이러한 기능성 관련 각종 황 화합물들은 마늘의 품종, 생육 환경(토양, 시비조건, 기후)뿐만 아니라 저장온도, 저장기간에 따라서도 많은 차이가 있다. 또한 이러한 기능성 황 화합물들은 가공과정뿐만 아니라 가

공기법에 따라서도 큰 차이를 나타낼 수 있다. 이는 동일한 재배조건에서 생성된 마늘을 가지고 특정 기능성이 있는 가공제품을 제조할 경우 마늘 원료의 상태 및 가공공정에 따라 그 효능에 많은 차이가 있는 제품이 생산될 수 있음을 의미한다. 따라서 특정 기능성과 관련된 마늘 가공제품을 제조하기 위해서는 이를 정확히 효율적으로 관리 할 수 있는 분석방법의 개발 및 확립이 필요하고 이를 근거

로 제품을 제조할 수 있는 공정 및 제품의 관리가 이루어져야 한다.

마늘의 황 화합물의 분석은 1990년 이전까지는 주로 가스크로마토그래피에 의거 마늘의 향미에 관련된 휘발성 황 화합물 위주로 분석이 진행되었다. 그러나 마늘의 생리약리학적 중요성이 점차 과학적으로 밝혀짐에 따라 마늘의 생리활성에 관련되는 각종 물질의 분석법에 많은 연구가 진행되었고

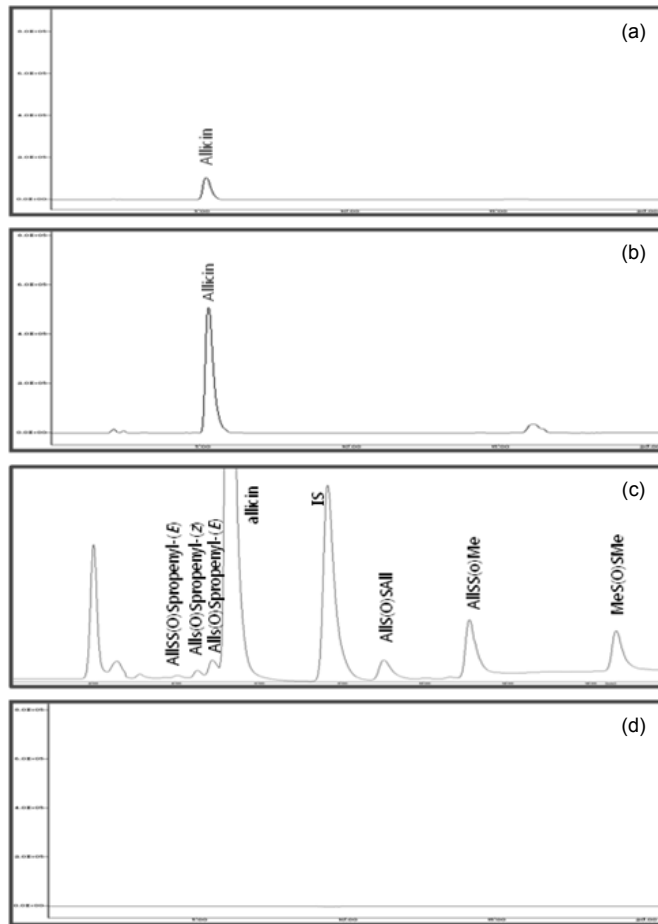


그림 10. Thiosulfinate 분석에 대한 HPLC 크로마토그램. (a) allicin 표준품(230 µg/ml), (b) allicin 표준품(930 µg/ml), (c) 신선분쇄마늘, (d) 바탕시험

다양한 분석기술이 개발되었다. 마늘 구(garlic bulb)에 존재하는  $\gamma$ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteine류, S-alk(en)yl-L-cysteine류, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides들은 주로 UV 검출기가 장착된 고속액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템에서 역상칼럼을 이용하여 동시에 많은 성분을 정량할 수 있는 기술이 개발되고 있으며, allicin을 비롯한 thiosulfinate류의 분석 역시 UV 검출기가 결합된 HPLC 시스템을 이용하여 분석하고 있으나 순상칼럼을 이용하여 분리하면 더욱 다양한 종류의 thiosulfinate를 분리할 수 있다. 그러나 마늘 가공제품들은 가공과정 중에 많은 분석 방해 물질이 발생되므로 가공제품의 특성에 적합한 정밀한 분석법의 개발이 필요시 되고 있다.

세계 기능성 식품 시장에서 마늘은 매우 다양한 제품의 형태로 출시되고 있으며 높은 시장 점유율을 나타내고 있는 품목 중의 하나이다. 세계 기능성 식품 시장에서 판매되고 있는 마늘 제품들은 제품의 기능성과 관련된 각종 성분들에 대하여 각각의 함량을 라벨에 표시하고 있다. 마늘은 한국인에게 있어서는 특별한 의미가 있는 식품이다. 한국 음식의 맛과 향을 유지하기 위해서 마늘은 반드시 필요한 소재이다. 이러한 마늘의 국내의 생산기반을 유지하기 위해서는 관련 가공 산업의 발달이 함께하여야 하고 이를 위해서는 마늘의 기능성에 관련된 분석 기술의 개발은 반드시 확립하여야 할 기반기술이라 사료된다.

#### ● 참고문헌 ●

1. 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
2. Block E, Naganathan S, Putman D, Zhao SH, *Allium* chemistry : HPLC analysis of thiosulfonates 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
3. Brodnitz MH, Pascale JV, Derslice LV, Flavor components of garlic extracts, *J, Agr Food Chem*, **19**, 273-275, 1971
4. Ceci LN, Curzio OA, Pomilio AB,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase/ $\gamma$ -glutamyl peptidase in sprouted *Allium sativum*, *Phytochemistry*, **31**, 441-444, 1992
5. Chi MS, Koh ET, Stewart TJ, Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard, *J Nutr*, **112**, 241-248, 1982
6. Choi MK, Chae KY, Lee JY, Kyung KH, Antimicrobial activity of chemical substance derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum* L, *Food Sci Biotechnol*, **16**, 1-7, 2007
7. Choi YH, Shim YS, Kim CT, Lee C, Shin DB, Characteristic of thiosulfonates and volatil sulfur compounds from blanched garlic reacted with alliinase, *J Food Sci Thechnol*, **39**, 600-607, 2007

8. Ichikawa M, Ide N, Yoshda J, Yamaguchi H, Ono K, Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography, *J Agric Food Chem*, **54**, 1535-1540, 2006
9. Ichikawa M, Ide N, Yoshda J, Ono K, Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage, *J Agric Food Chem*, **54**, 4849-4854, 2006
10. Jeang DY, Jeang SU, Garlic science, World Science, Seoul, Korea. 54-103, 2005
11. Kamel A, Saleh M, Recent studies on the chemistry and biological activities of the organosulfur compounds of garlic(*Allium sativum*), *Studies in Natural Products Chemistry*, **23**, 455-485, 2000
12. Lancaster JE, Shaw ML, Metabolism of  $\gamma$ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting of onion bulbs, *Phytochemistry*, **30**, 2857-2859, 1991
13. Lawson LD, Hughes BG, Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic, *Planta Med*, **58**, 345-350, 1992
14. Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG, Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products, *Planta Med*, **78**, 363-370, 1992
15. Leahy MM, Reineccius GA, Comparison of methods for the isolation of volatile compounds from aqueous model system, In *Analysis of volatiles*, Schreier P., Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 19-47, 1984
16. 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
17. Shin DB, Effect of extraction and dehydration methods on flavor compounds of garlic powder, Ph.D. Thesis, Chung-Ang Uni., Seoul, Korea, 1995
18. Spare CG, Virtanin AI, On the lachrymatory factor in onion(*Allium cepa*) vapors and its precursor, *Acta Chem Scand*, **17**, 641-650, 1963
19. Whitaker JR, Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic, *Adv Food Res*, **22**, 73-127, 1976
20. Yoo MY, Lee SH, Lee SG, Seog HM, Shin DB, Validation of High Performance Liquid Chromatography Methods for Determination of Bioactive Sulfur Compounds in Garlic Bulbs, *Food Sci Biotechnol*, **19**(6), 1619-1626, 2010
21. YU TH, WU CM, Liou YC, Volatile compounds from garlic, *J Food Sci*, **54**, 977-981, 1989

신 동 빈 농학박사

소 속 : 한국식품연구원 식품분석센터

전문분야 : 식품품질평가

E-mail : shindb@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9126