

자가숙성발효 후 흑마늘의 S-Allyl-L-cystein, Diallyl Disulfide 및 Total Amino Acids 분석

김문수¹ · 김민주¹ · 방우석² · 김근성¹ · 박성수^{3*}

¹중앙대학교 식품공학과

²영남대학교 식품영양학과

³제주한라대학교 제주향토식품연구소

Determination of S-Allyl-L-cystein, Diallyl Disulfide, and Total Amino Acids of Black Garlic after Spontaneous Short-term Fermentation

Mun-Su Kim¹, Min-Ju Kim¹, Woo-Suk Bang², Keun-Sung Kim¹, and Sung-Soo Park^{3*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Gyeonggi-do 456-756, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongbuk 712-749, Korea

³Cheju Traditional Food Institute, Cheju Halla University, Jeju 690-708, Korea

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the oldest cultivated plants and has been used throughout the world as a food supplement and a folk medicine for thousands of years. Raw garlic has been processed into a variety of commercial garlic products for consumer convenience. The latest new processing technology, 'spontaneous short-term fermentation', has been developed to process raw garlic into black garlic. The physiologically active effects of garlic have been attributed to its organosulfur compounds. In this study, the proximate compositions and the total amino acid content of raw Namhae garlic and black garlic were determined. The two major organosulfur compounds of garlic, S-allyl-L-cysteine (SAC), and diallyl-disulfide (DADS), were also analyzed using RP-HPLC. The proximate compositions were not different between raw and black garlic. The amount of 13 amino acids was greater in black garlic than in raw garlic among a total of 17 amino acids considered. The black garlic had 2-fold higher levels of SAC and 30-fold higher levels of DADS than the raw garlic. Therefore, it is suggested that consuming black garlic produced by spontaneous short-term fermentation is more effective than consuming raw garlic, in order for consumers to take more physiologically active organosulfur compounds (SAC and DADS), which are the compounds that are good for consumer health.

Key words: garlic, HPLC, S-allyl-L-cysteine, diallyl-disulfide, total amino acids

서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과에 속하는 대표적인 *Allium*속 식물로서 지금은 파과(*Alliaceae*)로 분류되는 다년생 식물이며, 원산지는 중앙아시아나 지중해 연안지역으로 우리나라에는 중국을 거쳐 전래된 것으로 추정된다. 중국 본초강목에는 대산(大蒜) 또는 호산(胡蒜)이라 하였으며, 삼국유사에서 일연스님은 산(蒜)이라 적고 있고, 조선시대 초기 훈몽자회에 의해 산(蒜)을 마늘의 한자로 표기하게 되었다. 품종은 생태형에 따라 난지계와 한지계로 분류하고 있다. 난지계는 제주, 남해, 해남, 무안 등이 주산지이며, 한지계는 의성, 서산, 삼척 등이 주산지이다. 오랜 재배역사와 더불어 식용 및 의약품으로 널리 이용되어 왔으며 아시아 지역 및 이집트, 로마에 이르기까지 광범위하게 각종 신체질환의 예

방과 치료에 효과적이라고 알려져 왔다(1).

1844년 독일의 화학자 Wertheim이 steam distillation을 통해 처음으로 garlic oil을 제조한 후 성분 분석하여 주성분이 유기 유황화합물임을 보고하였다. 그 후, 민간요법 수준에서 주장하거나 응용되었던 효능들이 과학적인 연구를 통해 입증되었고, 작용기전이 규명되어 새로운 생리활성물질들이 밝혀졌다(2-4). 마늘의 주요한 유효성분으로 알려진 allicin은 1944년에 Cavallito에 의해 강한 항균작용이 있다고 알려졌으나 이후 여러 연구를 통하여 강한 산화작용으로 인해 다량 섭취하면 정상세포나 조직을 손상시킬 수 있으며 매우 불안정한 물질이라는 연구결과 등도 보고되었다(5,6). 그래서 마늘의 또 다른 유용 생리활성물질들의 동정과 보다 효과적으로 섭취하기 위한 조리방법, 음용방법으로 건강식품류들이 개발, 개선되었으며 60~70°C, 85~95% 습도에서

*Corresponding author. E-mail: parkss@chu.ac.kr
Phone: 82-64-741-7460, Fax: 82-64-741-7460

40일 이상 생마늘을 숙성 발효시키는 spontaneous short-term fermentation(자가숙성발효) 방법에 의한 가공법 등이 개발되었다. 이것은 열에 의해 마늘의 효소 활성을 감소시켜 allicin 함량은 줄고 폴리페놀과 플라보노이드 등의 항산화 물질의 활성과 당도를 증가시키는 가공법이 보고되었다(7).

1992년 Block 등(8,9)에 의하여 가공마늘에서 인체에 유용한 100여종의 함황화합물의 존재가 밝혀짐으로써 이런 가공방법을 통하여 생리활성 기능을 가진 화합물들을 더 많이 함유할 수 있도록 가공기술이 발전되어왔다. 최근 allicin을 대신하는 유효성분으로서 냄새가 없는 유기 유황화합물에 주목하게 된다. 그중 *S*-allyl-L-cysteine(SAC), *S*-methyl-L-cysteine(SMC), diallyl-disulfide(DADS) 등 물 또는 기름에 용해되는 성질을 갖고 있는 유기 유황화합물의 연구가 활발히 진행되고 있다(10,11).

최근 효소제와 같은 첨가물을 첨가시키지 않고 마늘 자체에 포함된 효소를 이용하여 마늘의 성분을 변화시켜 생리활성 기능을 높인 자가숙성발효 마늘 가공법이 등장하여 이들에 함유된 함황화합물의 연구가 활발히 진행되고 있다. Jang 등(7)의 흑마늘에서 추출한 시료의 항산화력과 고혈압억제 능 등이 생마늘 추출물에 비해 높게 나타났다는 연구와 Sato 등(12)의 LC-MS를 이용하여 spontaneous short-term fermentation에 의해 제조된 발효시킨 마늘 추출물로부터 항산화효과를 증가시키는 물질을 동정하였다는 결과들이 보고되었다.

본 연구에서는 최근 개발된 흑마늘의 대표적 유효 생리활성 성분인 함황화합물들(SAC, DADS)의 함량, amino acids의 함량, 그리고 일반성분의 함량 변화 정도를 발효전의 생마늘과 비교 측정하여 마늘을 이용한 건강기능식품을 개발하는데 필요한 기초 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

남해산 난지계 생마늘 및 그와 동품종의 발효마늘을 한국의 생산업체에서 구입하였다. SAC(primary grade)와 DADS(secondary HPLC grade)는 ChromaDex 회사(Boulder, CO, USA)의 phytochemical standard를 구입하여 -1°C 에서 냉동보관 하였다. Methanol과 distilled water는 HPLC grade(Burdic & Jackson, Morristown, NJ, USA)를 사용하였다.

실험기기 및 장치

HPLC는 W600 Multisolvent delivery system(Waters, Milford, MA, USA), detector는 W486 Tunable absorbance detector(Waters), injector는 Rheodyne injector 7725i(Cotati, CA, USA), column은 $5\ \mu\text{m}$ particles, $4.6\times 150\ \text{mm}$ XTerra-MS C18(Waters)을 사용하였다. Software는 EM power(Waters)를 이용하였다.

발효마늘의 제조

Sato 등(12)의 제조방법에 의거하여 생산된 국내 제조업체의 제품을 실험원료로 채택하였다. 제조 원리는 마늘의 자가숙성발효에 의한 것으로서 여타의 첨가제를 투입하지 않고 85~95%의 습도 하에 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 온도를 유지시킨 후 40일 동안 반응한 것이다.

일반성분분석(AOAC 방법)

수분함량은 105°C dry oven에서 상압가열건조법으로 함량을 측정하여 산출하였고, 조단백질은 Auto-kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출장치로 추출하여 측정하였고, 조섬유는 1.25% H_2SO_4 및 NaOH 분해법으로, 조회분은 550°C 직접회화법으로 측정하였으며 그 외 나머지 성분들은 가용성 무질소물로 나타내었다.

아미노산 함량 분석

각각의 시료 1 g에 6 N HCl 용액 10 mL을 가하고 진공 밀봉하여 heating block($110\pm 1^{\circ}\text{C}$)에서 24시간 동안 가수분해 시킨 후, glass filter로 여과한 여액을 회전진공농축기를 이용하여 HCl을 제거하고, 증류수로 3회 세척한 다음 감압농축하여 sodium citrate buffer(pH 2.2) 10 mL로 용해한 후 $0.22\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기(S433D, Sykam GmbH, Gilching, Germany)를 이용하여 분석, 정량하였다.

S-allyl-L-cysteine과 diallyl disulfide 분석

시료의 전처리를 위해 껍질을 벗긴 생마늘, 발효마늘 2종과 남해산 생마늘을 으갠 후 소량을 4°C 에서 1개월간 별도로 보관한 1종류를 각각 막자사발을 이용하여 으갠 후 5 g씩을 100 mL의 용매에 섞는다. 상온의 ultrasonication에서 5분간 균질 시킨 후 상온에서 30분간 추출하여 35°C 에서 농축하고 4°C 에 보관하였다(13). HPLC 분석조건으로는 물과 메탄올로 구성되어진 이동상의 유속은 1 mL/min, UV 210 nm (wavelength), injection volume 5 μL 로 적용하였고, A 저장소의 이동상 조성은 95에서 0 vol.%로 일직선으로 감소되도록, B 저장소의 이동상 조성은 5에서 100 vol.%로 일직선으로 증가되도록 하여 3분 동안 현 상태를 유지하고 최종적으로 처음상태로 돌아가 2분을 유지시킨다. 모든 크로마토그래피 진행은 적정(실온)온도에서 실행되어졌으며, 시료중의 DADS는 온도에 민감하므로 가급적 빨리 분석 장비로 이송하여 측정하였다.

통계처리

본 실험결과는 3회 반복 실험하여 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 산출한 평균과 표준편차로 나타내었다. HPLC의 변수(retention time and peak area)들은 마지막 측정치의 평균값으로, 크로마토그래피 실험 결과의 평가는 수학적 통계방법에 의해 산출하였다. 1회 측정치의 상대오차는 5%를 초과하지 않았고 상대표본(대조군)에

Table 1. Proximate compositions of raw garlic and fermented black garlic (dry basis, %)

	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	Nitrogen free extract
Raw garlic	32.36±0.23 ¹⁾	1.46±0.15	1.13±0.15	4.05±0.22	61.01±0.31
Fermented garlic	32.02±0.64	2.30±0.06	2.64±0.13	4.85±0.02	58.21±0.59

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.



Fig. 1. Photographs of fermented garlic.

의해 나타난 정확도는 5% 이내이다.

결과 및 고찰

발효마늘의 제조

Sato 등(12)의 방법에 의거하여 85~95%의 습도 하에 60~70°C의 온도를 유지하여 40일 동안 자가 숙성 발효시켜 실험에 사용할 발효마늘을 제조하여 숙성시킨 발효흑마늘 단면의 모습이다(Fig. 1).

일반성분 함량

일반성분 분석을 통해 생마늘(남해산)은 단백질 32.36±0.23%, 지방 1.46±0.15%, 섬유소 1.13±0.15%, 회분 4.05±0.22%, 가용성 무질소물 61.01±0.31%로 나타났다. 이는 dry basis 기준으로 발효마늘의 가공처리 중에 건조되어 수분 손실이 일어나므로 수분함량을 고려하여 건조물 기준으로 환산한 결과이다(Table 1). 또한 발효마늘(남해산)은 단백질 32.02±0.64%, 지방 2.30±0.06%, 섬유소 2.64±0.13%, 회분 4.85±0.02%, 가용성 무질소물 58.21±0.59%의 결과로 나타났다. 일반성분은 약간의 함량 차이는 있으나 크게 변화하는 특징적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

아미노산 함량

생마늘과 발효숙성마늘의 아미노산 함량은 arginine, lysine, proline, threonine에서 감소를 보인 반면, 이를 제외한 13 종류에서 아미노산 함량이 많게는 2배 이상 증가함을 보였다(Table 2). Arginine은 총 아미노산 대비 함량이 높은 것이 특징적이다. 특히 소아에게 필수적인 histidine의 함량은 319.19±5.42 mg/g에서 796.62±7.01 mg/g로 2배 이상 크게 늘어났다. 감칠맛을 내는 glutamate, glycine의 함량이 크게 증가했으며, 함황아미노산인 cysteine과 methionine의 함량도 증가하는 결과가 나왔다. 부분적으로는 cysteine의 대응인 methionine의 함량도 늘었다. 방향족이며 필수아미노산인 phenylalanine(부분적으로 tyrosine대응)과 tyrosine

Table 2. Total amino acids of raw garlic and fermented black garlic (dry basis, mg/sample 100 g)

Amino	Raw garlic	Fermented garlic
Alanine	102.02±6.61 ¹⁾	174.37±2.01
Arginine	1,543.65±15.78	1,371.23±2.05
Aspartate	785.84±18.43	1,064.27±8.66
Cysteine	295.24±5.08	381.86±14.86
Glutamate	1,493.30±5.10	1,835.57±21.33
Glycine	226.23±11.48	354.02±10.30
Histidine	319.19±5.42	796.62±7.01
Isoleucine	169.41±11.58	204.25±0.11
Leucine	318.31±14.16	432.64±6.84
Lysine	400.23±7.77	284.22±7.34
Methionine	47.20±3.92	66.60±1.08
Phenylalanine	188.99±11.67	238.33±0.81
Proline	1,029.04±6.42	438.93±0.91
Serine	282.61±6.25	327.84±9.58
Threonine	381.72±12.39	220.99±0.13
Tyrosine	166.87±15.43	190.38±4.28
Valine	298.20±10.98	375.82±7.81
Total	8,048.01±33.31	8,757.94±103.45

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

의 함량도 증가한 결과로 나타났다. Alanine, aspartic acid, isoleucine, leucine, serine, valine도 생마늘 대비 발효숙성 마늘에서 함량이 증가하였다. 그러나 proline의 함량 변화는 생마늘보다 발효마늘에서 현저히 줄어들었다.

S-allyl-L-cysteine과 diallyl-disulfide 함량

전처리 과정을 거쳐 마늘로부터 메탄올로 추출한 추출물 내의 SAC와 DADS의 함량을 측정하기 위하여 5 point multi-calibration curve를 Fig. 2와 같이 도식화하였다. 농도대비 peak area를 비교하여 각각의 SAC, DADS(X), 추세선값(the corresponding absorbance value; Y)과 오차범위(r²)를 구하였고 SAC, DADS의 calibration curve의 회기방정식과 오차범위는 각각 Y=6011.9X-68760, r²=0.9994와 Y=9302.5X+826330, r²=0.9902로서 신뢰도가 높게 나타났다. 생마늘과 발효마늘의 SAC와 DADS의 함량 변화를 나타내는 chromatogram 결과는 Fig. 3, 4와 같다. Standard와 동일한 retention time 및 농도의 변화별로 샘플을 측정하였고 standard peak를 대조하여 샘플의 SAC와 DADS를 추정하였다. Retention time이 동일하지 않을 경우 spiking하여 판독 가능하게 하였다.

먼저 남해산 생마늘 및 발효마늘의 SAC 함량은 각각 245.35±1.35 µg/g와 522.51±1.19 µg/g로 약 2배 이상의 함량 증가를 보였다(Table 3). 또한 DADS 함량의 경우, 생마늘은 0.275±0.015 µg/g이고, 발효마늘은 8.710±0.45 µg/g

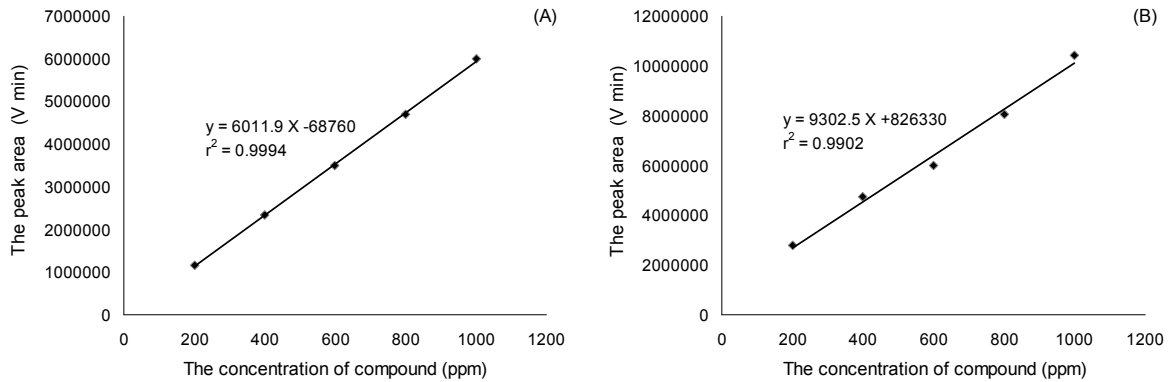


Fig. 2. The calibration curve of the SAC and DADS. A: calibration curve of SAC, B: calibration curve of DADS.

로 약 30배 증가하였다. 그리고 장기간의 발효숙성과정을 거치지 않고 4°C에서 1개월 동안 저장한 생마늘의 경우 SAC의 함량은 $1,965.25 \pm 11.35 \mu\text{g/g}$ 로 크게 증가하였으나 DADS의 함량은 검출되지 않았다. 이것은 마늘조직 속의 allinase가 온도의 영향은 받지 않고 alline을 allicin으로 생성 후 SH기와 결합하여 다량의 S-allylcysteine을 생성한 것으로 사

료된다. 그러나 diallyl disulfide의 불검출은 다른 영향, 즉 온도나 습도 등의 요인이 작용했을 것이라 사료된다(14). 따라서 생마늘을 파쇄 하여 저장하거나, 자가숙성발효 등의 가공법으로 제조된 가공마늘을 섭취함으로써 수용성인 SAC와 지용성인 DADS 등의 생리활성물질들을 보다 쉽고, 다량으로 섭취할 수 있을 것으로 생각된다.

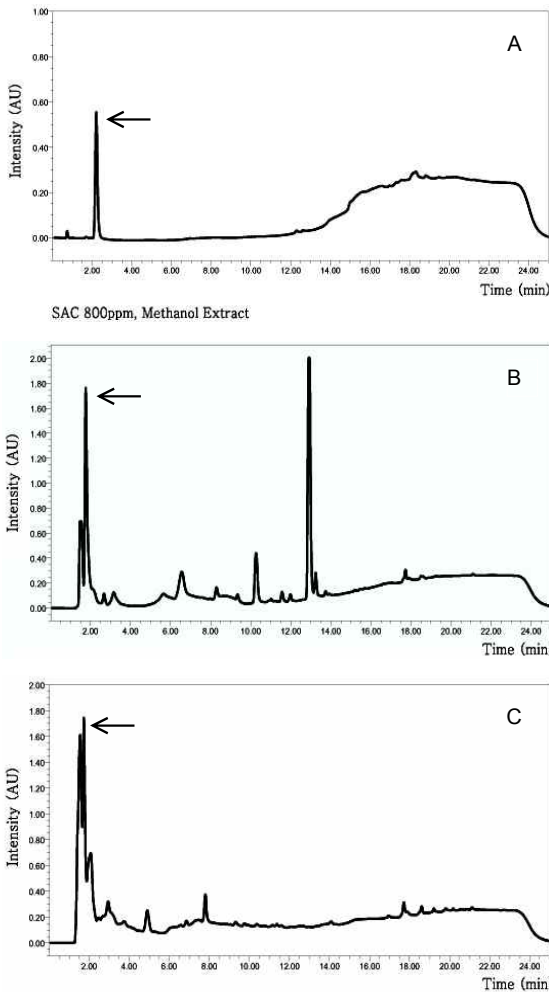


Fig. 3. Chromatogram of SAC. A: phytochemical standard, B: raw garlic extract, C: fermented garlic extract.

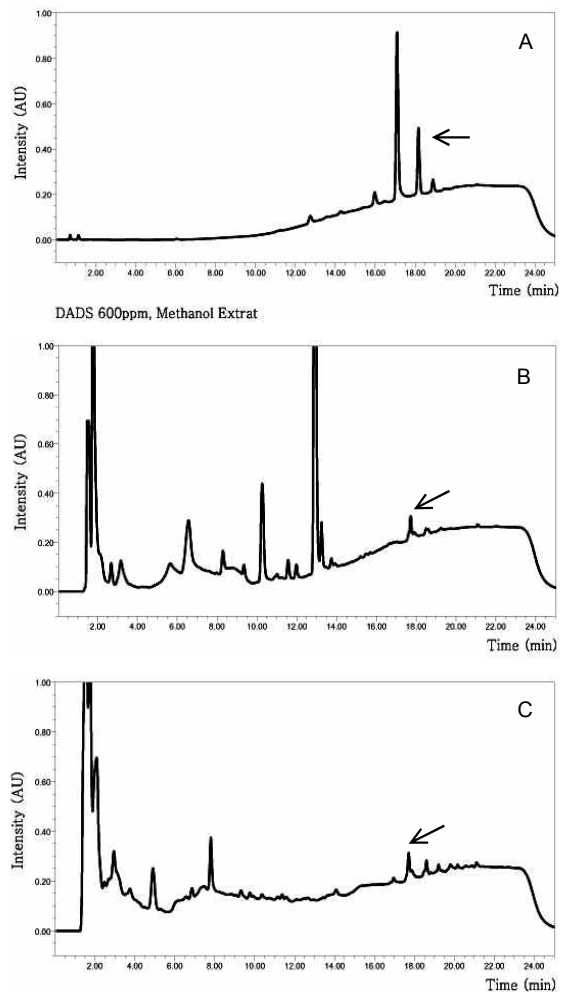


Fig. 4. Chromatogram of DADS. A: phytochemical standard, B: raw garlic extract, C: fermented garlic extract.

Table 3. Contents of SAC and DADS in raw garlic and fermented black garlic (dry basis, µg/sample g)

	SAC ¹⁾	DADS
Raw garlic	245.35±1.35 ²⁾	0.275±0.015
Raw garlic (during 1 month store)	1,965.25±11.35	ND
Fermented garlic	522.51±1.19	8.710±0.45

¹⁾SAC: S-allyl-L-cysteine, DADS: Diallyl-disulfide

²⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

요 약

남해산 생마늘 및 흑마늘의 일반성분 분석, 아미노산 함량 및 마늘의 주요 황 함유 생리활성물질인 수용성 S-allyl-L-cysteine(SAC) 및 지용성 diallyl-disulfide(DADS)의 함량을 분석하여 발효 전후 이들 성분에 대한 함량 변화를 비교하였다. 일반성분의 함량은 생마늘과 자가숙성발효마늘에서 큰 변화가 없었다. 흑마늘 내의 17종 아미노산중 13종 아미노산 함량이 증가하였다. 특히 함황아미노산인 cysteine 및 methionine의 함량(mg/100 g)이 각각 295.25±5.08에서 381.86±14.86로, 47.2±3.92에서 66.6±1.08로 증가하였고, histidine의 함량(mg/100 g)은 319.19±5.42에서 796.62±7.01로 크게 증가하였다. SAC 및 DADS의 함량(µg/g)은 245.35±1.35에서 522.51±1.19로, 0.275±0.015에서 8.710±0.45로 각각 2배와 30배 이상으로 생마늘에 비하여 흑마늘 내의 함량이 매우 큰 폭으로 증가하였다. 이러한 현상은 자가숙성발효라는 제조과정에서 생마늘의 alliin이 1차적으로 효소와 기타 화학적 반응에 의해 allicin으로 전환된 후, alliin으로부터 다른 일련의 복합적인 화학반응에 의하여 많은 양의 SAC 및 DADS가 생성된 결과에 의하여 나타났다고 할 수 있다. 또한 자가숙성 발효 과정 중 이러한 SAC 및 DADS 등과 같은 마늘 내 함황화합물들의 지표물질 생성 확인은 인체에 유익한 생리활성을 보유한 많은 종류의 다른 함황화합물들이 동시에 흑마늘 내에서 생성되었음을 암시한다. 그러나 흑마늘의 제조과정은 85~95%의 습도, 60~70°C에서 40여일 정도 장기간의 숙성이 필요하다. 이러한 숙성 과정은 특정 미생물 또는 효소를 이용하여 단축할 필요가 있다. 또한 SAC 및 DADS 등과 같이 생리활성이 높은 함황화합물들의 함량을 증가시킬 수 있는 새로운 가공법에 대한 연구가 필요하다.

문 헌

- Block E. 1992. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 252: 114-119.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131: 955S-962S.
- Lancaster JE, Shaw ML. 1989. γ-Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavor precursors) in allium. *Phytochemistry* 28: 455-460.
- Yu TH, Wu CM. 1989. Stability of allicin in garlic juice. *J Food Sci* 54: 977-981.
- Melino S, Sabelli R, Paci M. 2011. Allyl sulfur compounds and cellular detoxification system: effects and perspectives in cancer therapy. *Amino Acids* 41: 103-112.
- Lawson LD. 1998. Garlic; a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. American Chemical Society, Washington, DC, USA. Vol 691, p 176-209.
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic extract. *Korea J Food Sci* 40: 443-448.
- Block E, Naganathan S, Putman D, Zhao ST. 1992. Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (Ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniguely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J Agric Food Chem* 40: 2418-2430.
- Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus allium-implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew Chem Int Ed Engl* 31: 1135-1178.
- Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Ruiz RJ, Zhou Z, Lech J, Rosen SL, Hartman TG. 2001. Determination of allicin, S-allylcysteine and volatile metabolites of garlic in breath, plasma or simulated gastric fluids. *J Nutr* 131: 968S-971S.
- Mutsch-Eckner M, Sticher O, Meier B. 1992. Reversed phase high performance liquid chromatography of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in *Allium sativum* including the determination of (+)-S-allyl-L-cystene sulfoxid, r-L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine and r-L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine. *J Chromatogr* 625: 183-190.
- Sato E, Kohno M, Hamano H, Niwano Y. 2006. Increased antioxidative potency of garlic by spontaneous short term fermentation. *Plant Foods Hum Nutr* 61: 157-160.
- Wan X, Polyakova Y, Row KH. 2007. Determination of diallyl disulfide in garlic by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal Sci Technol* 20: 442-447.
- Iberl B, Winkler G, Knobloch K. 1990. Products of allicin transformation; ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Med* 56: 202-211.

(2012년 4월 25일 접수; 2012년 5월 2일 채택)