Korean J Food Preserv
19(4), 577-585 (2012)

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Establishment of Extraction Conditions for the Optimization of the Black Garlic Antioxidant Activity Using the Response Surface Methodology

Jae-Ran Kang, Soo-Jung Lee, Hyo-Jin Kwon, Min-Hye Kwon and Nak-Ju Sung†
Department of Food Science and Nutrition, Institute of Agriculture and Life Sciences
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

반응표면분석을 이용한 흑마늘의 항산화 활성 최적화를 위한 추출조건 확립

강재란 · 이수정 · 권효진 · 권민혜 · 성낙주†
경상대학교 식품영양학과, 농업생명과학연구원

Abstract

This study was conducted to establish the extraction conditions for the optimization of the biological activities of black garlic using the response surface methodology (RSM). The extraction conditions were based on the central composite design, with 15 kinds of variations in the extraction temperature (50-90℃), extraction time (3-15 hrs), and ethanol concentration (0-100%). The total phenol, flavonoids, thiosulfinate contents, and anti-oxidant activity of black garlic extract were significantly higher at the J condition (90℃ for 9 hrs with a 50% ethanol concentration). In this condition, the biological activities such as DPPH radical scavenging (66.10%), ABTS radical scavenging activity (75.02%), and reducing power by of FRAP (375.4 μM/mL) were excellent. Overall, the extraction conditions for the optimized biological activities of black garlic via RSM were expected to be at 89.68℃ for 9.79 hrs with a 55.72% ethanol concentration. The actual values were 96.4-114.8% of the predicted values.

Key words : Black garlic, biological activity, response surface methodology

서 론

경제성장과 더불어 삶의 질적 향상은 건강 및 웰빙에 대한 기대감을 증대시켰으며, 기존에 건강을 주로 담당하던 치료약은 건강 유지 및 예방을 위한 기능성 물질인 생체 내 생리 기능성을 높일 수 있는 식품, 의류 및 화장품 등으로 다양하게 개발되고 있다. 생리활성의 유효물질은 대부분이 식물류에 함유되어 있는 것으로 밝혀지고 있으며(1), 인체에 대한 안전성과 효능이 확인된 식물의 경우에는 그 유효물질을 함유한 기능성 제품으로써 개발속도도 매우 빠르게 진행되고 있다(2). 더욱이 이러한 천연물질로부터 얻은 유효 성분의 이용도를 높이고 간편하게 이용할 수 있도록 식물류로부터 유효 물질의 추출 증대를 위한 공정의 개발과 함께 이들을 이용한 음료, 캡슐, 정제 등의 건강지향적 식품의 선호도도 더욱 높아지고 있는 추세이다(3).

흑마늘(black garlic)은 생마늘을 통마늘의 상태로 고온항온기에서 일정시간동안 숙성시켜 마늘의 자체성분과 효소 등에 의하여 마늘의 내부까지 흑색으로 변화한 것을 일컫는다(4). 이러한 과정에서 생마늘 고유의 생리활성은 유지되고 고온 숙성 과정에서 생성된 갈변물질에 의한 새로운 기능성의 증가, 생마늘의 강한 냄새와 매운 맛이 감소된 특징을 가지게 된다(4,5). 이로써 생마늘의 단점은 보완하고 마늘 자체 성분의 반응에 따른 감미와 산미의 조화로 마늘 섭취를 용이하게 할 수 있다. 또한 흑마늘 가공은 부가가치가 증대되고 동시에 안정적이고 지속적인 마늘 소비를 유발할 수 있는 대안으로 부각되고 있다. 최근 주요 마늘 산지인 남해, 의성 등을 중심으로 흑마늘 가공 산업이 활성화되고 있으며(6), 흑마늘의 이화학적 특성(7), 항산화 활성(4-6), 시판 흑마늘간의 이화학적 품질 및 항산화 특성 비교(8) 등 그 기능성에 관한 연구가 이미 보고된 바 있다. 이러

†Corresponding author. E-mail : snakju@gnu.ac.kr
Phone : 82-55-772-1431, Fax : 82-55-772-1439

한 흑마늘 자체에 관한 연구는 대부분이 열수 및 에탄올 추출(4,5,9)이나 순차 용매(6) 등을 사용하여 얻은 흑마늘 추출물의 생리활성 비교가 대부분이다.

흑마늘은 생마늘을 가공한 제품으로 원재료의 품종, 재배지, 가공 제품의 가공 조건 및 추출 조건 등에 따라서 개발 제품의 생리활성에 상당한 차이를 보이고 있다(9,10). 최근 흑마늘의 기능성이 밝혀짐에 따라 이를 이용한 다양한 제품의 개발과 흑마늘의 소비가 증대되고 있는 것을 고려해 본다면 최적의 흑마늘 제품 생산을 위해서는 흑마늘 제조에 따른 표준화된 공정의 확립 뿐만 아니라 생산된 흑마늘로부터 유용 물질의 최적 추출을 위한 추출 조건의 설정도 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 건강 및 기능성 식품 원료로 사용되고 있는 흑마늘로부터 유용성분의 용출을 최대화 할 수 있는 최적 추출 조건을 확립하기 위하여 추출 용매로 식품공전상 이용이 가능한 물과 에탄올을 이용하였다. 추출 시간과 온도를 조절한 중심합성계획에 따라 다양한 추출 조건에서 추출한 흑마늘 추출물로부터 유효물질의 함량 및 항산화 활성을 측정함으로써 반응표면 분석법에 따라 최적 추출조건을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출조건

흑마늘은 경남 남해군에 소재한 도울농산 영농조합법인으로부터 제공받았으며, 시료 20 g에 대해 200 mL의 용매를 가하여 각 추출 조건에서 추출한 후 이를 여과지(Whatman No 6, Whatman International Ltd, Maidstone, UK)로 여과하여 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 추출조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Central composite design for optimized extraction condition of black garlic

	Temperature (℃) X_1	Time (hrs) X_2	Ethanol concentration (%) X_3
A	60 (-1)	6 (-1)	25 (-1)
B	60 (-1)	6 (-1)	75 (+1)
C	60 (-1)	12 (+1)	25 (-1)
D	60 (-1)	12 (+1)	75 (+1)
E	80 (+1)	6 (-1)	25 (-1)
F	80 (+1)	6 (-1)	75 (+1)
G	80 (+1)	12 (+1)	25 (-1)
H	80 (+1)	12 (+1)	75 (+1)
I	50 (-2)	9 (0)	50 (0)
J	90 (+2)	9 (0)	50 (0)
K	70 (0)	3 (-2)	50 (0)
L	70 (0)	15 (+2)	50 (0)
M	70 (0)	9 (0)	0 (-2)
N	70 (0)	9 (0)	100 (+2)
O	70 (0)	9 (0)	50 (0)

수율 측정

일정량의 추출물을 90~100℃의 항온 건조기에서 용매를 제거시킨 후 중량을 측정하여 추출 전 시료 중량에 대한 백분율로 나타내었다.

총 페놀 화합물 및 플라보노이드 정량

총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량은 각각 Folin-Denis 법(11)과 Moreno 등(12)의 방법에 의해 비색 정량하였다. 즉, 총 페놀 화합물은 추출물 1 mL에 Foline-Ciocalteau 시약 1 mL를 넣고 3분 후 10% Na_2CO_3 용액 1 mL를 가하여 혼합한 후 실온의 암실에서 1시간 반응시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 함량은 추출물 1 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합한 후 실온의 암실에서 40분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 각각 gallic acid 및 quercetin (Sigma Co, St Louis, MO, USA)를 이용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선으로부터 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 산출하였다.

총 thiosulfinate 정량

Alliin의 분해 생성물인 thiosulfinate의 정량은 Freeman과 Mcbreen (13)의 방법을 이용하였다. 2 mM의 cysteine이 함유된 pH 7.5의 50 mM HEPES [N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid] 용액 0.5 mL에 흑마늘 추출액 0.1 mL를 첨가한 후 50 mM HEPES를 가하여 최종 부피가 5 mL가 되도록 하였다. 이를 27℃에서 10분간 반응시킨 후 1 mL를 취하여 0.4 mM DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] 1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 다시 27℃에서 10분간 반응시켜 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 L-cysteine (Sigma Co, St Louis, MO, USA)을 사용하여 흑마늘 추출물 중의 총 thiosulfinate의 함량을 산출하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 추출물과 DPPH 용액(5 mg/100 mL methanol)을 동량으로 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여, 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도비로 계산하였다(14).

ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate)] 라디칼 소거활성은 7 mM의 ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 냉암실에서 12시간동안 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정한 것을 ABTS 기질용액으로 사용하였다.

기질용액 3 mL에 추출물 1 mL를 가하여 실온에서 5분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 탈색정도를 흡광도비로 계산하였다 (15).

FRAP법에 의한 환원력 측정

FRAP (ferric reducing antioxidant power)법에 의한 환원력의 측정을 위하여 기질용액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazine) 용액 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 미리 혼합한 다음 37℃의 수욕상에서 가온한 것을 사용하였다. 96 well plate에 추출물 40 μL, FRAP 기질액 100 μL 및 증류수 40 μL를 차례로 혼합하여 37℃에서 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$를 사용하였으며, 환원력은 추출물에 대한 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 당량으로 산출하였다(16).

추출조건의 최적화를 위한 실험설계

추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획에 따라 추출 공정의 주요 변수로 작용할 수 있는 독립변수(X_n)는 추출 온도(60~90℃, X_1), 추출 시간(3~12 hrs, X_2) 및 에탄올 농도비(0~100%, X_3)로 하였으며, Table 1과 같이 실험범위를 5 단계로 부호화하여 15구간으로 추출 공정을 설정하였다. 이들 요인에 의해 영향을 받는 흑마늘 추출물의 생리활성에 관한 종속변수로는 추출물의 총 페놀 화합물, 플라보노이드 함량 및 총 thiosulfinate 함량과 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법에 의한 환원력으로 하였다. 이들은 각각 3회 반복 측정하여 평균값을 회귀분석에 사용하였으며, 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

$$+ b_{33}X^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) 프로그램을 이용하여 3차원 반응표면 분석으로 표시하였으며, 회귀분석 결과 최적점이 최대점 혹은 최소점이 아닌 안장점일 경우에는 능선분석을 통하여 최적점을 유도하였다.

통계처리

각 추출조건별 3회 이상 반복 실험한 결과에 대하여 SPSS 12.0을 사용하여 통계처리하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하여 추출조건에 따른 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

수율

15구간의 추출 조건에 의한 흑마늘 추출물의 수율은 Fig. 1과 같다. 추출 조건 중 N 조건(100% 에탄올 농도비)과 J 조건(90℃, 9 hrs, 50% 에탄올 농도비)을 제외한 모든 조건에서 수율이 50%이상으로 55.55~83.70% 범위였다. 특히 H 조건(80℃, 12 hrs, 75%에탄올 농도비)에서 83.70%로 가장 높았으며, 다음으로 F 및 L 조건의 순이었다. 전반적으로 추출 온도가 높고 시간이 길어질수록 수율이 높았으며, 추출 용매는 에탄올의 농도비가 높을수록 수율이 증가하는 경향이었다. 반면에 N 조건의 추출물에서는 31.75%로 수율이 가장 낮았으며, 이와 추출 온도와 시간이 동일한 M 조건(0% 에탄올 농도비)의 추출물에서는 오히려 61.40%로 N 조건보다 약 1.9배 정도 수율이 높아 흑마늘은 에탄올보다 물에서 유용물질의 용출이 더 용이한 것으로 확인되었다. 이는 흑마늘 제조과정 중 새로운 페놀성 화합물이 생성되며 이들 대부분이 수용성이며, 또 장시간의 추출 과정에 의존적인 것으로 추정된 바 있다(9). 또한 식물류의 에탄올 추출물에서는 에탄올의 농도비나 추출 온도가 높을수록 추출물 중의 페놀 및 플라보노이드 물질의 함량이 증가되며 이에 따른 전자공여 활성도가 상승된다는 보고가 있다(17). Jo 등(18)은 산머루의 에탄올 추출 시 수율은 추출 온도보다 에탄올의 농도에 영향을 더 많이 받으며, 50~70%의 에탄올 농도 범위에서 수율이 가장 높았다고 보고한 바 있다. 본 연구결과에서도 60℃의 추출(A, B 조건)보다 80℃의 추출(E, F 조건) 시 에탄올 농도비가 25%보다 75%일 경우 수율이 증가된 것으로 나타났으며, 70℃의 추출(K~O 조건)에서는 에탄올 농도비가 동일할 경우 추출 시간이 길어질수록 수율이 증가하였다. 또한 75%의 에탄올 농도비에서 최대의 수율을 보인 것으로 볼 때 흑마늘의 유용성분의 용출은 에탄올의 농도비, 추출 시간 및 온도의 상호작용에 의한 것으로 사료된다.

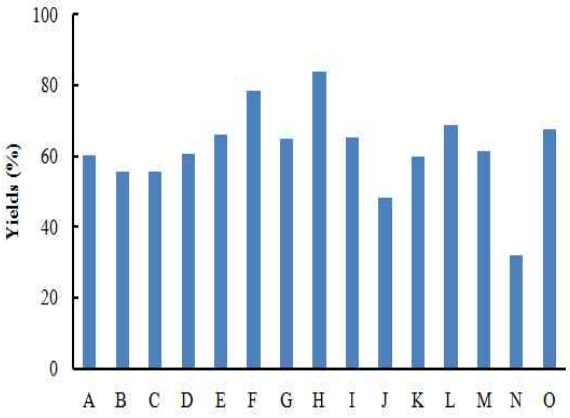

Fig. 1. Extraction yields for ethanolic extracts of black garlic.

총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량

추출 조건별 흑마늘 추출물의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량은 Table 2와 같다. J 조건(90℃, 9 hrs, 50% 에탄올 농도비)에서 각각 562.74 및 266.31 mg/mL로 유의적으로 가장 높은 함량이었다. 이는 수율이 가장 높았던 H 조건에 비해 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 약 1.5배 및 1.9배 정도 높았다. 전반적으로 추출 온도가 높고 추출 시간이 길어질수록 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가되는 경향이었으며, 에탄올의 농도에 따라서는 M 조건(0% 에탄올 농도비)의 흑마늘 추출물이 N 조건(100% 에탄올 농도비)에 비해 유의적으로 높아 총 페놀 함량은 약 2배, 플라보노이드 함량은 약 8.6배 정도 높은 함량이었다. 또한 A~F조건에서 추출 온도가 60℃인 경우보다 80℃일 때 에탄올의 농도비가 높을수록 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가되었는데, 이는 추출 수율과 비슷한 경향을 보였다. 70℃에서 추출된 흑마늘 추출물은 이보다 낮은 온도의 추출 조건(A~D)에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 낮아진 것으로 볼 때 흑마늘 추출물 중 유용물질 함량은 추출 온도에 의해 영향이 더 큰 것으로 사료된다. 전반적으로 에탄올 농도비가 높고 추출 온도나 시간이 높아질 때 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가되었다.

흑마늘 추출물의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 바탕으로 추출 조건에 대한 반응표면분석을 통한 회귀식의 결정계수(R^2) 및 유의성은 Table 3에 나타내었으며, 이때 반응표면 결과는 Fig. 2와 같다. 총 페놀 화합물 함량에 대한 반응표면분석의 결정계수(R^2)는 0.8818이며, 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 이때 반응표면 결과는 추출 온도가 89.72℃, 시간은 9.65 hrs, 56.28%의 에탄올 농도비에서 521.02 μg/mL의 함량으로 예측되었으며, 정상점은 안장점이었다. 15구간의 추출 조건에 따른 총 페놀 화합물의 최대값(562.74 μg/mL)은 예측값의 108.0%였다. 플라보노이드 함량에 대한 반응표면분석의 결정계수(R^2)는 0.8990이며, 추출 온도는 89.63℃, 시간은 9.93 hrs, 55.53%의 에탄올 농도비에 의해 최대 237.44 μg/mL의 함량을 보여 안장점으로 최적화될 것으로 예상되었다. 15구간의 추출 조건에 의한 최대값(266.31 μg/mL)은 예측값의 약 112.2%였다. 모델식의 적합도(degree of fit)를 나타내는 척도로 이용되는(19) 결정계수는 최소 0.8 이상이어야 모델식이 적합하다고 인지되는데(20) 상기 결과의 반응표면분석 결과는 모두 신뢰할 수 있는 결과라 판단된다. 식물체로부터 추출 조건을 달리한 추출물 중 페놀성 화합물의 함량은 물, 50% 에탄올 및 75% 에탄올 추출물 중 50% 에탄올 추출물에서 가장 높았다고 보고되어 있다(21). Lee 등(22)은 홍삼의 추출 시 다양한 농도의 에탄올 추출 조건에서 측정한 총 페놀 화합물의 함량이 에탄올 농도비가 60%까지는 증가되었으나, 80%이상의 에탄올 농도에서는 감소된 것으로 보고한 바 있다. 또한 겨우살이 추출물은 물 > 50% 에탄올 > 100% 에탄올 농도비의 순으로 총 페놀 화합물의

Table 2. Total phenol, flavonoid, thiosulfinate contents and antioxidant activities of black garlic extracts by response surface methodology analysis

	Conditions			Contents			Antioxidant activities		
	X_1	X_2	X_3	Total phenol (μg/mL)	Flavonoid (μg/mL)	Thiosulfinate (μM/mL)	DPPH radical scavenging (%)	ABTS radical scavenging (%)	Reducing power by FRAP (μM/mL)
A	60 (-1)	6 (-1)	25 (-1)	225.90±1.99^{d}	75.84±2.65^{f}	52.37±0.20^{g}	44.42±0.63^{j}	52.83±0.67^{g}	166.35±3.20^{d}
B	60 (-1)	6 (-1)	75 (+1)	204.54±1.58^{b}	43.60±2.71^{b}	7.02±0.58^{a}	26.34±0.28^{b}	42.18±0.43^{b}	145.96±1.13^{b}
C	60 (-1)	12 (+1)	25 (-1)	226.77±0.99^{d}	68.83±0.90^{e}	46.22±0.34^{e}	31.69±0.35^{d}	46.18±0.30^{d}	156.12±0.70^{c}
D	60 (-1)	12 (+1)	75 (+1)	214.70±3.32^{c}	49.30±2.27^{c}	10.80±0.78^{b}	27.39±0.34^{c}	44.41±0.21^{c}	156.50±1.45^{c}
E	80 (+1)	6 (-1)	25 (-1)	264.76±1.84^{h}	99.86±1.70^{g}	57.35±0.88^{i}	37.75±0.60^{g}	55.35±0.46^{h}	212.81±1.28^{g}
F	80 (+1)	6 (-1)	75 (+1)	318.29±1.98^{k}	112.48±5.24^{j}	47.26±0.72^{f}	39.13±0.15^{h}	61.65±0.34^{j}	270.27±1.38^{j}
G	80 (+1)	12 (+1)	25 (-1)	275.03±2.32^{i}	104.53±1.79^{h}	55.72±0.45^{h}	38.84±0.62^{h}	55.95±0.70^{i}	218.96±4.19^{h}
H	80 (+1)	12 (+1)	75 (+1)	364.16±2.38^{l}	142.85±1.73^{l}	59.92±0.73^{j}	42.75±0.20^{i}	63.80±0.86^{k}	297.19±3.13^{k}
I	50 (-2)	9 (0)	50 (0)	240.03±1.61^{e}	63.69±1.53^{d}	41.07±0.13^{c}	33.09±0.27^{e}	47.39±0.39^{e}	170.81±1.29^{e}
J	90 (+2)	9 (0)	50 (0)	562.74±3.37^{m}	266.31±1.57^{m}	149.93±0.68^{k}	66.10±0.72^{k}	75.02±0.36^{l}	375.42±4.79^{l}
K	70 (0)	3 (-2)	50 (0)	258.29±3.60^{g}	98.93±2.23^{g}	43.39±0.26^{d}	34.21±0.28^{f}	48.12±0.66^{f}	201.27±3.24^{f}
L	70 (0)	15 (+2)	50 (0)	293.56±2.13^{j}	123.60±1.10^{k}	56.36±0.60^{h}	33.93±0.21^{f}	52.24±0.41^{g}	232.35±1.95^{i}
M	70 (0)	9 (0)	0 (-2)	245.73±1.03^{f}	71.64±2.46^{e}	46.87±0.13^{ef}	32.68±0.30^{e}	46.40±0.19^{d}	158.19±4.53^{c}
N	70 (0)	9 (0)	100 (+2)	122.47±1.42^{a}	8.36±0.53^{a}	-	9.61±0.47^{a}	20.59±0.30^{a}	67.12±1.07^{a}
O	70 (0)	9 (0)	50 (0)	265.57±0.95^{h}	108.46±1.57^{i}	46.74±0.26^{ef}	32.81±0.47^{e}	48.02±0.29^{f}	199.73±0.90^{f}

$^{a-m}$Means with different superscript in the same column are significantly different at p <0.05
; Not determined

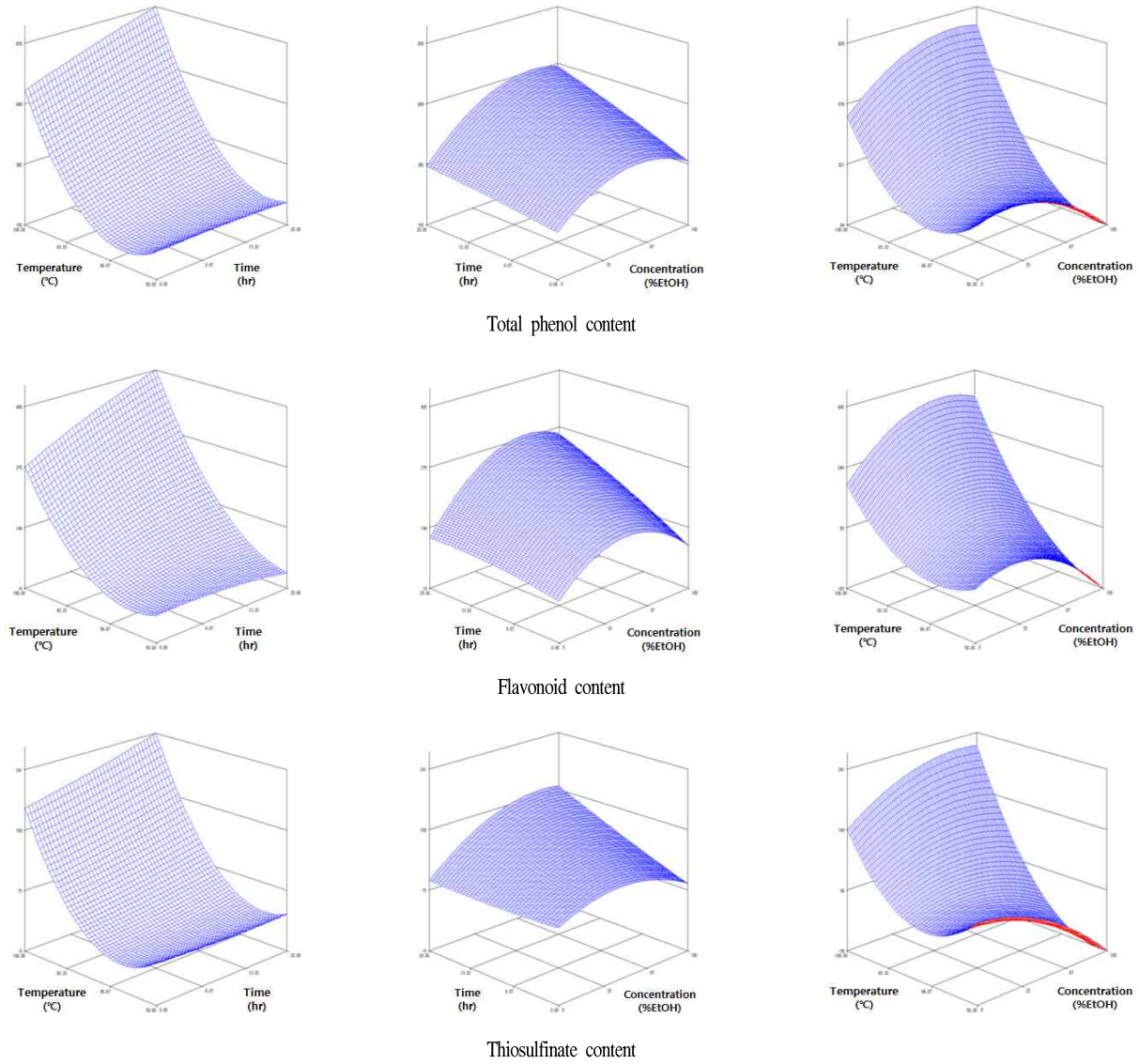

Fig. 2. Response surface plot for total phenol, flavonoid and thiosulfinate contents from ethanolic extraction of black garlic.

함량이 증가되었다고 보고되어 있는데(23), 이는 본 연구결과와 유사한 패턴이었다.

총 thiosulfinate 함량

추출 조건별 흑마늘 추출물의 thiosulfinate 함량은 Table 2에 나타낸 바와 같이 J 조건에서 가장 높았으며, 다음으로 H 및 E 조건의 순으로 70~90℃의 추출 온도범위에서 유의적으로 높은 함량이었다. 더욱이 J 조건은 수율이 가장 높았던 H 조건에 비해 약 2.5배 높은 함량이었다. 반면에 B 조건(60℃, 6 hrs, 75% 에탄올 농도비)은 7.02 μM/mL로 그 함량이 매우 낮았으며, 100% 에탄올 농도비로 70℃에서 9 hrs 추출한 추출물(N 조건)에서는 thiosulfinate가 검출되지 않아 흑마늘의 thiosulfinate 함량은 추출 조건에 따라 용출 정도에 상당한 차이를 보이는 것으로 확인되었다.

흑마늘 추출물의 thiosulfinate 함량에 대한 반응표면분석 결과 결정계수(R^2)는 0.9123이며 적합결여검정 결과 유의확률 0.0001로 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 3). 반응표면 결과는 89.85℃, 9.53 hrs, 54.17%의 에탄올 농도비에서 예측된 정상점이 안장점으로 최적값은 130.63 μM/mL였다(Fig. 2). 15구간의 추출물에 대한 thiosulfinate 함량의 최대값은 149.93 μM/mL로 이는 예측값에 대해 114.8%였다.

Thiosulfinate는 alliin의 분해산물로 마늘의 다양한 생리활성에서 주체가 되는 것으로 보고되어 있다(24). 특히 thiosulfinate의 대부분을 차지하는 diallyl disulfide, diallyl trisulfide 및 diallyl sulfide 등은 미생물의 생육억제 작용, 암세포 생육 억제 및 항산화, 혈당 강하 등에 관여하는 것으로 알려져 있으므로(25-27) 흑마늘 추출물 중의 함황 화합

Table 3. Polynomial equations calculated by RSM on biological activities from extraction condition of black garlic

	Polynomial equations	R^2	Significance
Total phenol content	$Y=266.445043+62.235125X_1-8.607375X_2-8.580125X_3+30.849755X_1^2+0.515745X_2^2-23.47087X_3^2+5.63875X_1X_2+5.6115X_1X_3+22.011X_2X_3$	0.8811	0.0373
Flavonoid content	$Y=104.0899826+39.211375X_1-5.19275X_2-7.961625X_3+12.666603X_1^2+0.768022X_2^2-18.583397X_3^2+4.54425X_1X_2+4.80125X_1X_3+12.83875X_2X_3$	0.8990	0.0853
Thiosulfinate content	$Y=42.841913+20.097688X_1-2.163313X_2-11.274938X_3+11.617614X_1^2+0.210614X_2^2-6.399386X_3^2+1.674875X_1X_2+3.027625X_1X_3+9.361875X_2X_3$	0.9123	0.0001
DPPH radical scavenging	$Y=33.578261+5.9125X_1-0.475X_2-3.9625X_3+4.209783X_1^2+0.322283X_2^2-2.902717X_3^2+2.025X_1X_2+3.45X_1X_3+2.05X_2X_3$	0.9136	0.0223
ABTS radical scavenging	$Y=48.013043+6.65X_1-0.4X_2-3.1125X_3+3.95163X_1^2+1.18913X_2^2-2.97337X_3^2+0.875X_1X_2+1.3X_1X_3+3.25X_2X_3$	0.8542	0.0371
Reducing power by FRAP	$Y=200.921739+48.975X_1-5.9625X_2-4.15X_3+18.352717X_1^2+4.277717X_2^2-21.759783X_3^2+4.1X_1X_2+5.175X_1X_3+19.45X_2X_3$	0.9228	0.0330

물의 함량은 시료의 생리활성과 비례적인 것으로 간주될 수 있다(28). 흑마늘은 생마늘에서 변화되는 과정에서 유기황화합물과 같은 수용성의 항산화 물질이 증가된다고 보고되어 있다(29,30). 본 연구 결과 흑마늘 추출물은 추출 온도가 높고 시간이 길수록 추출물 중 thiosulfinate 함량이 증가되어, 에탄올 농도비보다는 오히려 추출 온도에 의한 영향이 더 큰 것으로 나타났는데, 이는 상기의 연구 보고와도 유사한 결과였다.

항산화 활성

흑마늘 추출물의 추출 조건에 따른 항산화 활성은 DPPH 라디칼, ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법에 의한 환원력으로 측정하였다(Table 2). 중심합성계획에 의한 15가지 조건의 흑마늘 추출물에서 항산화 활성은 J 조건에서 유의적으로 가장 높았다. 다음으로 H 조건의 ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP법에 의한 환원력이 높았으나, DPPH 라디칼 소거활성은 H 조건과 A조건간에 유사한 수준을 보였다. 또한 N 조건의 흑마늘 추출물에서 항산화 활성이 유의적으로 가장 낮았는데, 이러한 활성의 차이는 추출물 중의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량과 유사한 경향이었다.

흑마늘 추출물의 항산화 활성에 대한 반응표면 분석 결과(Table 3, Fig. 3), DPPH 라디칼 소거활성은 결정계수(R^2)가 0.9136이며, 유의확률 0.0223으로 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 반응표면 결과 89.61℃, 10.02 hrs, 54.88%의 에탄올 농도비에서 63.16%로 최대값을 가지는 것으로 예상되었다. 15구간의 추출물 중 최대값은 66.10%로 이는 예측값의 104.7%였다. ABTS 라디칼 소거활성은 결정계수(R^2)가 0.8542였으며, 유의확률 0.0371로 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 반응표면 결과 89.72℃, 9.77 hr, 55.34%의 에탄올 농도비에서 77.79%의 활성으로 최대값을 가지며 15구간의 추출물 중 최대값은 75.02%로 이는 예측값의 96.4%였다. FRAP법에 의한 환원력은 결정계수(R^2)가 0.9228이며, 유의확률이 0.0.330으로 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 반응표면 결과 89.54℃, 9.82 hrs, 58.09%의 에탄올 농도비에서 380.05 μM/mL로 최대값을 가지며 15구간의 추출물 중 최대값은 375.42 μM/mL로 이는 예측값의 98.8%에 해당되었다.

최근 과채류는 열처리 과정에 의해 생리활성이 증가되는 것으로 보고되고 있다(31). 특히 고온 고압처리에 의해 폴리페놀 화합물의 함량이 증가되는 것으로 밝혀지고 있는데(32), 마늘의 경우 고온 고압처리 시 온도가 높아질수록 폴리페놀 함량이 증가되며, 특히 150℃에서 2시간 열처리한 시료에서 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높았다고 보고된 바 있다(32). 마늘의 고온 고압처리 시 온도가 높거나 시간이 길어짐에 따라 항산화 활성, 폴리페놀, 플라보노이드 및 5-hydroxymethyl-2- furaldehyde의 함량이 증가되는 것으로 보고되어 있는데(33), 생마늘에 비하여 흑마늘의 항산화 활성이 증가하는 것도 고온의 가공 공정에 따른 새로운 페놀 화합물 및 갈변물질 등이 증가되었기 때문인 것으로 보고되어 있다(4). Kim 등(34)은 사과의 가열 추출 시 열처리를 하지 않은 시료에 비해 ABTS 라디칼 소거활성이 크게 증가하였으며, ABTS 라디칼 소거활성은 페놀성 화합물의 함량에 의존적인 것으로 보고된 바 있다(35). Shin 등(4)은 상온에서 흑마늘을 물과 에탄올로 24시간 동안 추출하였을 때 물 추출물이 에탄올 추출물보다 항산화 활성이 높았는데 이는 본 실험과도 유사한 결과였다.

따라서 상기의 연구 결과 흑마늘 추출물의 유효물질 함량이나 항산화 활성은 전반적으로 J 조건에서 가장 높았으며, 다음으로 H 조건이었으나, 추출 수율은 H 조건에서 가장 높았다. 따라서 흑마늘의 추출물의 유효물질 함량과 항산화 활성이 최대화되는 추출 온도는 89.54~89.85℃, 추출 시간은 9.53~10.02 hrs, 이때 에탄올 농도비는 54.17~

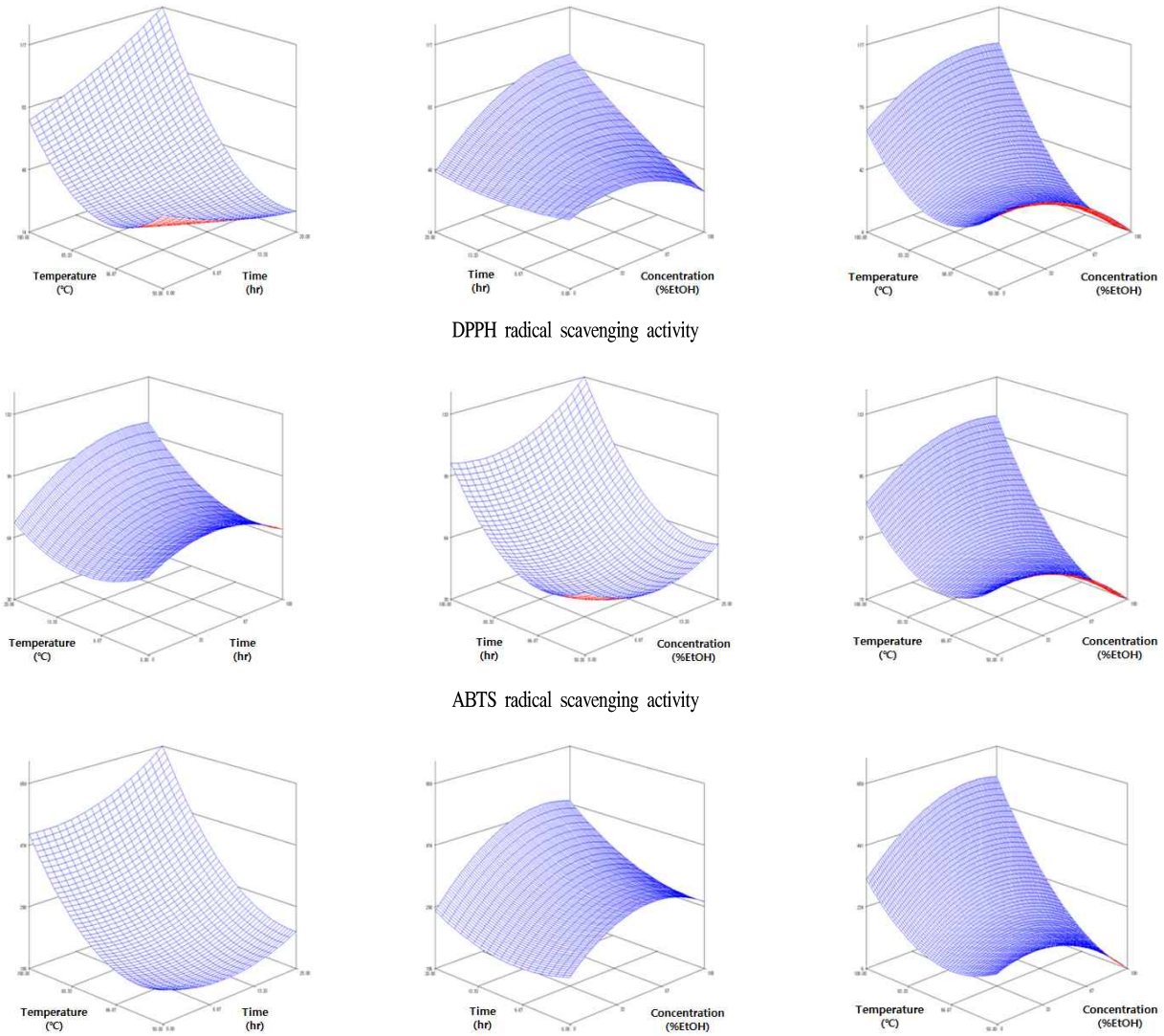

Fig. 3. Response surface plot for antioxidant activities from ethanolic extraction of black garlic.

58.09%의 범위로 평균 89.68℃, 9.79 hrs 및 55.72%의 에탄올 농도비 조건에서 흑마늘 추출물의 생리활성이 최적화될 것으로 예상되며, 이때 실측값은 예상값의 96.4~114.8%의 범위로 나타나 추출 조건의 유효성이 인정되는 것으로 판단된다.

요 약

반응표면 분석에 의해 흑마늘 추출물의 생리활성을 최적화할 수 있는 추출 조건을 설정하고자 하였다. 추출 조건은 중심합성계획(온도: 50~90℃; 시간: 3~15 hrs; 용매의 에탄올 농도비: 0~100%)에 따라 15가지 조건으로 실험하였다. 흑마늘 추출물의 총 페놀, 플라보노이드 및 thiosulfinate 함량과 항산화 활성은 J 조건(90℃, 9 hrs, 50%의 에탄올 농도비)에서 가장 높았다. 이때 DPPH 라디칼 소거활성은 66.10%, ABTS 라디칼 소거활성은 75.02%, FRAP법에 의한 환원력은 375.4 μM/mL이었다. 반응표면분석 결과 흑마늘 추출물은 평균적으로 89.68℃, 9.79 hrs 및 55.72% 에탄올 농도비에서 최적화될 것으로 예상되었으며, 실측값은 예상값의 96.4~114.8%였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업(110021-3)의 연구과제로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee SE, Seong NS, Bang JK (2003) Antioxidative activities of Korean medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci, 11, 127-134
2. Hwang EY, Kim DH, Kim HJ, Hwang JY, Park TS, Lee IS, Son JH (2011) Antioxidant activities and nitric oxide production of medicine plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus, Schizonepeta tenuifolia, Polygonatum odoratum* var. pluriflorum, *Paeonia lactiflora*). J Appl Biol Chem, 54, 171-177
3. Lim TS, Do JR, Kwon OJ, Kim HK (2007) Monitoring on extraction yields and functional properties of onion (*Allium cepa*) extracts by using response surface methodology. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 105-110
4. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Kim JG, Sung NJ (2008) Change of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing. J Life Sci, 18, 1123-1131
5. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ (2008) Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L). J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 965-971
6. Shin JH, Lee HG, Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ (2010) Antioxidant activity of solvent fraction from black garlic. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 933-940
7. Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH (2008) Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L). J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 465-471
8. You BR, Kim HR, Kim MJ, Kim MR (2011) Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 366-371
9. Cha JY (2009) Functional components and biological activities of marketing black garlic. MS Thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
10. Jeon SY, Baek JH, Jeong EJ, Cha YJ (2012) Volatile flavor compounds in commercial black garlic extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 116-122
11. Gutfinger T (1981) Polyphenols in olive oil. J Am Oil Chem Soc, 58, 966-968
12. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol, 71, 109-114
13. Freeman GG, Mcbreen F (1973) A rapid spectrophotometric methods of determination of thiosulfinate in onion and its significance in flavor studies. Biochem Soc Trans, 1, 1150-1154
14. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med, 26, 1231-1237
16. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem, 239, 70-76
17. Jeong JE, Shim SP, Jeong YS, Jung HK, Kim YC, Hong JH (2011) Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Citrus unshiu* peel by response surface methodology. Korean J Food Preserv, 18, 755-763
18. Jo IH, Kim CY, Lee TW, Lee GH, Choi YH (2010) Optimization of extraction of effective components from *Vitis coignetiae*, the crimson glory vine. Korean J Food Preserv, 17, 659-666
19. Sin HN, Yusof S, Hamid NSA, Rahman RA (2006) Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. J Foods Eng, 74, 352-358
20. Joglekar AM, May AT (1987) Product excellence through design of experiments. Cereal Foods World, 32, 857-868
21. Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HK (2004) Physiological activity of medicinal plant extracts. Korean J Food Preserv, 11, 388-393
22. Lee JW, Lee SK, Do JH, Yang JW (2000) Determination of total phenolic compounds from Korean red ginseng, and their extraction conditions. J Ginseng Res, 24, 64-67
23. Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2010) Antioxidant effects of *Viscum album* L. extracts by extraction conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 14-19
24. Choi YH, Shim YS, Kim CT, Lee C, Shin DB (2007) Characteristics of thiosulfinates and volatile sulfur compounds from blanched garlic reacted with allinase. Korean J Food Sci Technol, 39, 600-607
25. Kwon SK (2003) Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. J Appl Pharmacol, 11, 8-32
26. Tsao SM, Yin MC (2001) *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulfides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother, 47, 665-670

27. Chung JG (1999) 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
28. Shin JH, Choi DJ, Chung MJ, Kang MJ, Sung NJ (2008) Changes of physicochemical components and antioxidant activity of aged garlic at different temperatures. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 1174-1181
29. Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y (1994) Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. Planta Med, 60, 214-217
30. Ichikawa M, Yoshida J, Ide N, Sasaoka T, Yamaguchi H, Ono K (2006) Tetrahydro-β-carboline derivatives in aged garlic extract show antioxidant properties. J Nutr, 136, 726S-731S
31. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J Agric Food Chem, 50, 3010-3014
32. Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee J, Jeong HS (2012) Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 278-282
33. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS (2006) Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. Korean J Food Sci Technol, 38, 331-336
34. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS (2008) Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. Korean J Food Sci Thechnol, 40, 166-170
35. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS (2003) The antioxidant activities of some commercial test. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 723-727

(접수 2012년 4월 20일 수정 2012년 6월 19일 채택 2012년 6월 29일)