ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2017** Vol. 27. No. 4. 471~475 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.4.471

- Note -

Physicochemical Characteristics and Antioxidant Activities of Freezing Pretreated Black Garlic

Hye Jung Choi[1], Bo Ram Lim[1], Sang-Chul Ha[2], Gi-Seok Kwon[3], Dong Wan Kim[4] and Woo Hong Joo[1]*

[1]*Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 51140, Korea*
[2]*Department of Confectionery Decoration, Daegu Mirae College, Gyeongsan 38607, Korea*
[3]*Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea*
[4]*Department of BioHealth Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea*

Received December 14, 2016 /Revised December 22, 2016 /Accepted December 22, 2016

Freezing pretreatment can destroy the cell membrane of garlic and may improve some food-quality of garlic. Therefore we investigated the effect of freezing pretreatment at -20°C and -70°C on quality of aged black garlic, compared with traditional processing methods. Our results showed that freezing pretreatment at -70°C had the greatest impact on qualities and antioxidant activities of black garlic. Browning degree and pH of black garlic after both the freezing pretreatment and aging process were 3.14 and 3.55, respectively. Furthermore, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity and reducing power of aged black garlic can be enhanced by pre-freezing processing. Reducing sugar and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) contents of freezing pretreated and aged black garlic were increased by 1.69 and 1.14 fold, respectively, compared with the control samples. The results indicated that freezing pretreatment had improved the overall qualities (such as browning degree, pH, reducing sugar) and functional materials of black garlic.

Key words : Antioxidant activity, black garlic, pre-freezing processing

서 론

마늘은 파, 양파, 부추 등과 같은 백합과(Liliaceae)의 *Allium* 속 식물로 특유의 맛과 향을 가져 조미료 및 항신료로 다양한 식품에 첨가제로 사용되고 있으며[5], 또한 단순 가공품으로써 장아찌, 분말, 과립제 및 추출액 등의 형태로 소비되고 있다. 최근 발효 숙성마늘의 제조법이 발달하면서 다양한 제형의 2차 가공품들이 개발되어 그 소비가 증가하고 있는 추세이다[3].

발효 숙성마늘은 적절한 습도를 유지하면서 일정기간 고온에서 갈변반응을 유도한 것으로 매운맛 감소와 단맛 증가, allyl sulfide 등 휘발성 황함화합물에 의한 특징적인 냄새 감소 및 유효 지표성분인 S-allyl cysteine (SAC) 생성 등 다양한 이화학적 반응을 긍정적인 방향으로 변화시켜 제조한 것이다[3, 9]. 또한 마늘을 숙성함으로써 phenol 및 flavonoid 함량이 증가되며 항산화 활성, 항노화, 콜레스테롤 저하 작용, 항혈전, 혈압강화, 항염증 및 항암작용 등의 기능이 향상되는 것으로 보고되므로 건강식품 소재로서의 가지를 인정받아 다양한 형태의 마늘 가공제품의 소비가 증대되고 있는 추세이다[4, 6, 11, 13, 16].

기존의 마늘 숙성 방법은 특별한 전처리 과정없이 장시간 고온에서 숙성하는 단순한 방법으로 많은 시간과 에너지가 소모되는 공정으로 이 과정에서 세포막이 파괴되어 여러 물질이 서로 상호작용하여 기능성을 증대시키게 된다. 이러한 세포막 파괴는 전처리를 통하여 가능하며 특히 동결 전처리를 통해 유도할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 -20℃와 -70℃에서 30시간 동결 전처리를 실시한 후에 숙성과정을 검토하였고, 그에 따른 다양한 항산화 활성을 측정함으로써 효과적인 흑마늘 숙성 공정확립을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

마늘의 동결 전처리

시판되는 남해산 마늘을 구입하여 3 kg씩 분리하고 각각 -20℃와 -70℃에서 24시간 동안 동결 전처리를 실시하였다. 전처리 후 45℃에서 4일간 건조시켰으며 온도 70℃±3와 습도 90% 조건하에서 14일 동안 숙성하여 5, 7, 11 및 14일 숙성한 마늘을 실험에 사용하였다(Fig. 1).

갈변도 및 pH 측정

숙성에 따른 갈변도와 pH를 측정하기 위해 10 g의 흑마늘을 얇게 절단하고 100 ml의 멸균수를 첨가하여 혼합하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459
E-mail : whjoo@changwon.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

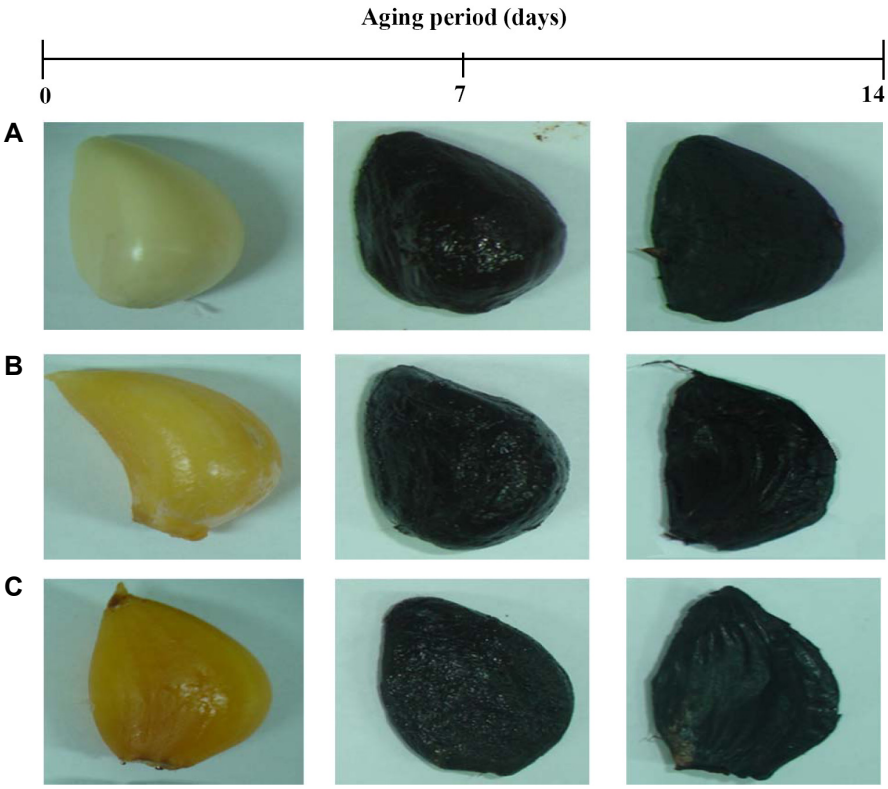

Fig. 1. Browning degree of black garlic during aging periods after freezing pretreatment for 24 hr. (A): Non-pretreated control, (B): Pretreated sample at -20℃, (C): Pretreated sample at -70℃.

실온에서 1시간 정치한 후, 원심분리(8,000× g, 15 min)하여 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 갈변도를 확인하였고 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였다.

환원당 (reducing sugar) 함량 측정

추출물과 6 mM hydrogen chloride를 1:4 (v/v)로 섞은 후 10분간 끓이고, 2 ml의 0.05 mM 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)를 첨가하여 5분 더 반응시킨 후, 580 nm에서 흡광도를 측정하였다[10]. 표준물질로 glucose를 농도별(12.5-100 μg)로 제조하여 검정곡선을 작성하였으며, 이에 기초하여 환원당 함량을 정량하였다.

흑마늘을 이용한 항산화 활성

흑마늘 시료 추출

동결 전처리 후 숙성 시간에 따른 활성을 측정하게 위해 5 g의 흑마늘을 얇게 절편을 만들어 15 ml의 멸균수에 넣고 충분히 혼합한 뒤, 80℃에서 1시간 동안 열수 추출하였다. 원심분리(8,000x g, 10 min) 후 상층액은 동결 건조한 뒤 10% 농도로 조절하여 실험에 사용하였으며, 동결 전처리 하지 않은 숙성 마늘을 대조군으로 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

흑마늘 추출물에 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, in 99.5% ethanol) 용액 1:1 (v/v)로 첨가하고 10초간 vortexing 후 37℃에서 30분간 반응시킨 뒤, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다[2]. 각 시료와 대조구의 흡광도를 비교하여 radical 제거율을 계산하였고, 그 결과는 IC_{50}으로 나타내었다.

Reducing power 측정

1 ml의 흑마늘 추출물에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide을 1:1(v/v)로 첨가하여 50℃에서 20분 동안 반응시킨 후, 2.5 ml의 10% trichloroacetic acid을 가하여 반응을 종결시켰다. 원심분리(8,000x g, 10 min) 한 후, 상층액과 1% ferric chloride를 1:1(v/v)로 혼합한 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

5-hydroxymethyl furfura (HMF) 함량 조사

2 ml의 추출물에 5 ml의 0.6% 4-methylaniline solution을 첨가하고 1 ml의 0.5% barbituric acid를 가하여 혼합한 뒤 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[8]. 표준물질로 5-HMF를 농도별(0.2-0.8 mg/ml)로 제조하여 검량곡선을 작성하여 검증하였다.

결과 및 고찰

흑마늘 숙성에 따른 갈변도와 pH 변화

동결 전처리한 마늘과 처리하지 않은 마늘(대조군)의 숙성 기간에 따른 갈변도를 비교한 결과(Fig. 1), 동결 전처리 한 마늘이 대조군에 비해 갈변화가 진행속도가 빠른 것으로 나타났다. 특히, -20℃에서 전처리한 마늘보다 -70℃에서 처리한 마늘의 갈변화가 빠른 것으로 나타났고, 숙성기간이 길수록

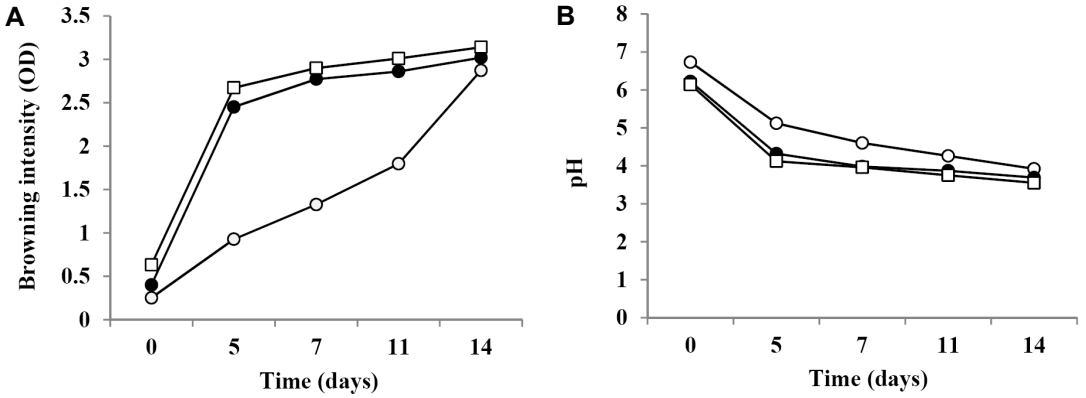

Fig. 2. Changes of browning intensity (A) and pH (B) during aging periods after freezing pretreatment for 24 hr. (○) Non-pretreated control, (●) Pretreated sample at -20℃, (■) Pretreated sample at -70℃.

갈변도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 숙성 기간 동안의 pH 변화는 숙성 전 대조군 마늘은 pH 6.73에서 14일 숙성 후 pH 3.92였으며, -20℃에서 전처리한 마늘은 pH 6.22에서 숙성 후 pH 3.69로 나타났고, -70℃에서 전처리한 마늘은 pH 6.14에서 pH 3.55로 조사되었다. 동결 전처리 한 흑마늘의 pH가 대조군 마늘에 비해 낮은 것으로 확인되었다 (Fig. 2B).

pH는 갈변 물질의 생성과 더불어 감소되는데, 숙성 동안 생마늘의 alline과 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide 등 함황 아미노산이 분해되어 생성된 allicin 및 pyruvic acid 등에 의해 pH가 낮아지는 것으로 보고되어 있다[17]. 또한 생마늘에 비해 흑마늘의 구성 아미노산의 함량이 높으므로[14], 이러한 pH 감소현상이 흑마늘에서 더 뚜렷하게 나타나는 것으로 사료된다. 갈변도와 pH 변화에 기초하면 동결 전처리가 마늘 숙성 과정의 중요 인자로 고려되어야 할 것이다.

동결 전처리 후 숙성 흑마늘의 환원당 함량

-70℃에서 동결 전처리 후 11일 숙성한 흑마늘의 환원당 함량이 41 mg/g으로 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3). 모든 처리군에서 11일 숙성했을 때 가장 함량이 많은 것으로 나타났고, 대조군과 -20℃에서 동결 전처리 후 숙성한 마늘은 각각 24.23과 30.58 mg/g로 조사되었다. 남해산과 의성 흑마늘의 환원당은 각각 15와 16%로 보고되어[17], -70℃에서 동결 전처리 한 흑마늘에 비해 3-4% 함량이 높은 것으로 확인되었다.

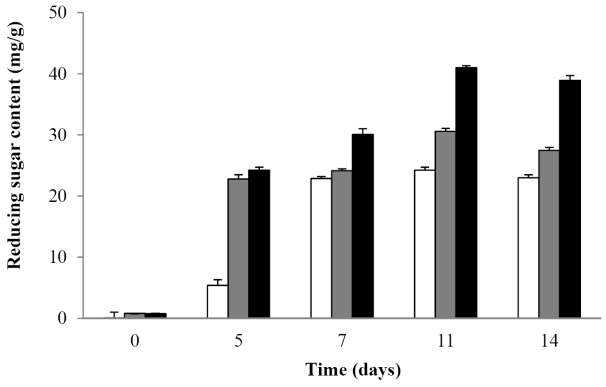

Fig. 3. Changes of reducing sugar content during aging periods after freezing pretreatment for 24 hr. (White bar) non-pretreated control, (grey bar) pretreated sample at -20℃, (black bar) pretreated sample at -70℃.

동결 전처리 후 숙성 흑마늘의 항산화 활성

동결 전처리한 마늘과 대조군의 DPPH radical 소거능은 동결 전처리한 마늘에서 높은 것으로 확인되었다(Table 1). 100 μg/ml 농도에서 숙성 전 대조군 마늘의 IC_{50} 값은 400 μg/ml 보다 높게 측정되었으며, 숙성기간이 길어짐에 따라 소거능은 증가하였다. 특히 -70℃에서 전처리 후 14일 숙성한 마늘의 IC_{50} 값은 169 μg/ml로 활성이 가장 좋은 것으로 확인되었다. 시판되는 남해, 의성 및 창녕 통흑마늘의 DPPH radical 소거능의 IC_{50} 값은 200 mg/ml 농도에서 각각 13.1, 12.4, 12.4 mg/ml으로 보고되어 있다[17]. 본 연구를 통해 제조된 남해산 흑마늘의 radical 소거능은 매우 우수했으며, 동결 전처리를 했을 때 활성이 더 증가함을 확인할 수 있었다.

또한 $Fe^{3+}(CN^-)_6$에서 $Fe^{2+}(CN^-)_6$로의 환원력을 흡광도로 측정한 결과, 0.1 mg/ml 농도에서 -20℃와 -70℃에서 동결 전처

Table 1. DPPH radical scavenging activity of black garlic processed by freezing pretreatment

	IC_{50} (μg/ml)		
Minute	Non-pretreated control	Pretreated sample at -20℃	Pretreated sample at -70℃
0	>400		
5	284	226	209
7	262	217	198
11	222	195	175
14	217	192	169

리한 마늘은 11일 숙성했을 때 각각 0.468과 0.513으로 전처리 하지 않는 마늘 0.384에 비해 높은 환원력을 가진 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 시판되는 생마늘과 흑마늘의 환원력은 0.2 mg/ml 농도에서 각각 0.06과 0.42로 보고됨으로써[17], 본 연구에서 제조된 동결 전처리 후 숙성한 흑마늘의 환원력이 뛰어남을 확인할 수 있었다. 따라서 숙성조건에 따라 기능성 물질의 함량이 달라질 수 있으며, 특히 동결 전처리 과정은 흑마늘을 제조하는데 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다.

동결 전처리 후 숙성 흑마늘의 5-hydroxymethyl furfura (HMF) 함량 변화

Maillard 반응의 산물인 5-HMF 함량을 측정함으로써 갈변도를 확인한 결과, 7일에서 11일 숙성기간 사이에 모든 처리군에서 5-HMF 함량이 급격하게 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 4B). 숙성기간이 길어질수록 갈변도는 증가하였으며, -70℃에서 동결 전처리 후 14일 숙성한 흑마늘의 5-HMF 함량이 0.6 mg/g으로 가장 높은 것을 확인하였다. 중국 산동 지역의 마늘로 -18℃에서 동결 전처리 후 제조한 흑마늘은 22일 숙성했을 때 5-HMF 함량이 0.26 mg/g으로 보고되었다[15]. 본 연구에서 사용한 남해산 마늘을 -20℃에서 동결 전처리 후 14일 숙성

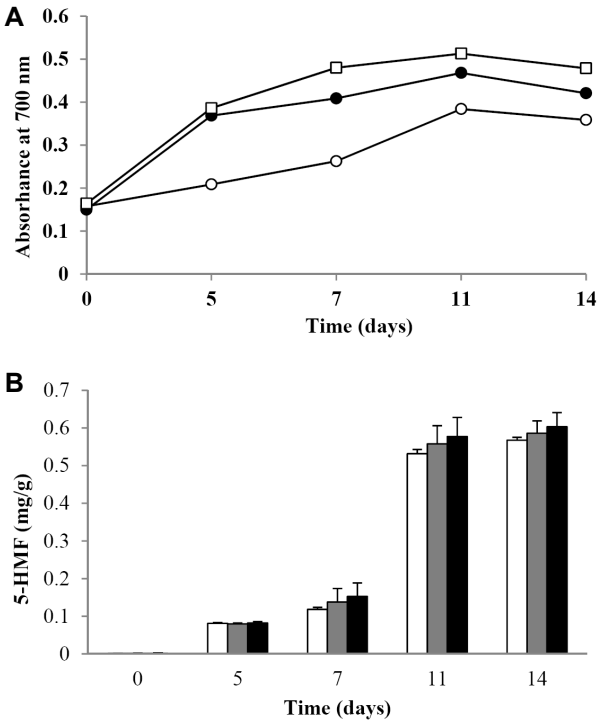

Fig. 4. Changes of reducing powder (A) and 5-HMF content (B) during aging periods after freezing pretreatment for 24 hr. (A) Changes of reducing powder; (○) non-pretreated control, (●) pretreated sample at -20℃, (■) pretreated sample at -70℃. (B) Changes of 5-HMF content; (white bar) non-pretreated control, (grey bar) pretreated sample at -20℃, (black bar) pretreated sample at -70℃.

했을 때 0.58 mg/g으로 5-HMF 함량도 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다. 80-90℃의 높은 온도에서 마늘 숙성시 단백질의 α-amino group과 당과의 반응에 의해 비효소적 갈변 반응이 주로 일어나며[1], 이때 생성된 갈색 물질인 melanoidins은 환원성 물질로 항산화 활성이 높은 것으로 보고되어 있다[7].

남해산 마늘을 구입하여 -20℃과 -70℃에서 동결 전처리 후 숙성한 흑마늘과 전처리 하지 않고 숙성한 흑마늘의 항산화 활성을 검토한 결과, 동결 전처리 후 숙성한 마늘의 DPPH radical 소거능, 환원능 및 5-HMF 함량이 높은 것으로 조사되었고, 특히 -70℃에서 동결 전처리 후 숙성한 흑마늘의 항산화 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 따라서 흑마늘 제조공정에 동결 전처리 방법을 활용한다면 기능성 향상뿐만 아니라 에너지 측면에서도 효율적일 것으로 판단된다.

감사의 글

본 결과물은 교육부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 연구결과입니다. 그러므로 이에 감사드립니다.

References

1. Bas, S. K. and Kim, M. R. 2002. Effects of sodium metabisulfite and adipic acid on browning of garlic juice concentrate during storage. *Kor. J. Soc. Food Cookery Sci.* **18,** 73-80.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181,** 1199-1200.
3. Choi, D. J., Lee, S. J., Kang, M. J., Cho, H. S., Sung, N. J. and Shin, J. H. 2008. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum L.). J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37,** 465-471.
4. Jang, E. K., Seo, J. H. and Lee, S. P. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **2,** 156-161.
5. Kim, Y. P., Lee, G. W. and Oh, H. I. 2006. Optimization of extraction conditions for garlic oleoresin and changes in the quality characteristics of oleoresin during storage. *Kor. J. Food Nutr.* **19,** 219-226.
6. Lee, E. N., Choi, Y. W. and Kim, H. K. 2011. Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF-*α*-induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF-*κ*B activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother. Res.* **1,** 92-100.
7. Lee, J. W. and Do, J. H. 2006. Current studies on red reaction products and acidic polysaccharide in Korean red ginseng. *J. Ginseng Res.* **30,** 41-48.
8. Li, L. and Meng, S. J. 2002. Study on the determination of HMF in fruits, vegetables and their products. *Liaoning Agric. Sci.* **4,** 12-14.
9. Machizuki, E., Yamamoto, T., Suzuki, S. and Nakazawa, H. 1996. Electrophoretic identification of garlic and garlic products. *J. AOAC Intl.* **79,** 1466-1470.

10. Miller, G. N. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
11. Sasaki, J. and Machiya, E. 2007. Processed black garlic (*Allium sativum* L) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. *Medicinal Aromatic Plant Sci. Biotech.* **2,** 278-281.
12. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of red reactions: antioxidative activities of products of red reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr.* **44,** 307-315.
13. Seo, Y. J., Gweon, O. C., Lee, Y. M., Kang, M. J. and Kim, J. I. 2009. Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *J. Food Sci. Nutri.* **14,** 1-7.
14. Sung, N. J. 2008. Physicochemical components and antioxidant activity of black garlic. *Kor. J. Food preserv.* **7,** 45-53.
15. Lu, X, Li, N., Qiao, X., Qiu, Z. and Liu, P. 2016. Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *J. Food Drug Anal.* **19,** 1-10
16. Yang, S. T. 2007. Antioxidative activity of extracts of aged black garlic on oxidation of human low density lipoprotein. *J. Life Sci.* **17,** 1330-1335.
17. You, B. R., Kim, H. R., Kim, M. J. and Kim, M. R. 2011. Comparison of the quality characteristics and antioxidant activities of the commercial black garlic and lab-prepared fermented and aged black garlic. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40,** 366-371.

초록 : 동결 전처리한 숙성 흑마늘의 이화학적 특성 및 항산화 활성

최혜정[1] · 임보람[1] · 하상철[2] · 권기석[3] · 김동완[4] · 주우홍[1]*
([1]창원대학교 생물학화학융합학부, [2]대구미래대학교 제과데코레이션과, [3]안동대학교 생약자원학과, [4]창원대학교 생명보건학부)

마늘의 동결 전처리는 세포막을 파괴할 수 있으며, 식품 품질을 향상시킬 수 있다. 따라서 전통적인 흑마늘 가공방법과 -20°C와 -70°C에서 동결 전처리후 숙성 흑마늘의 효과를 비교하였다. 실험 결과, -70°C에서의 동결 전처리가 흑마늘의 품질과 항산화 활성에 가장 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다. 동결 전처리와 숙성과정을 거친 흑마늘의 갈변화 정도와 pH는 각각 3.14와 3.55로 나타났고, DPPH free radical 소거 활성 및 환원력은 동결 전처리 과정을 통해 향상시킬 수 있었다. 또한 동결 전처리 후 흑마늘의 환원당 및 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) 함량은 대조군 흑마늘에 비해 각각 1.69 및 1.14배 증가하였다. 그 결과 동결 전처리는 전반적인 품질(갈변정도, pH, 환원당)과 흑마늘의 기능성을 향상시킴을 확인할 수 있었다.