

## 반응표면분석법을 이용한 마늘 열수추출조건의 최적화

이진만<sup>†</sup> · 차태양<sup>1</sup> · 김성호<sup>2</sup> · 권택규<sup>3</sup> · 권중호<sup>4</sup> · 이상한<sup>4</sup>

호서대학교 식품생물공학과, <sup>1</sup>(주)김정문알로에 생명과학연구소,  
<sup>2</sup>경북과학대학 약용식품과, <sup>3</sup>계명대학교 의과대학 면역학교실, <sup>4</sup>경북대학교 식품공학과

## Optimization of Hot-Water Extraction Condition of Garlic Using a Response Surface Methodology

Jin-Man Lee<sup>†</sup>, Tae-Yang Cha<sup>1</sup>, Seong-Ho Kim<sup>2</sup>, Taeg-Kyu Kwon<sup>3</sup>, Joong-Ho Kwon<sup>4</sup>  
and Sang-Han Lee<sup>4</sup>

Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>1</sup>R&D Center Kim Jeong Moon Aloe Co., LTD., Cheonan 330-882, Korea

<sup>2</sup>Department of Herbs & Food Science, Kyungbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>4</sup>School of Medicine, Keimyung University, Daegu 700-712, Korea

### Abstract

Much research is conducted on the biological activities of medicinal herbs, traditional plants, and agricultural products, cultivated in Korea. This study focused on optimization of hot-water extraction methods for such products, by analyzing and monitoring extraction characteristics using a response surface methodology. We found that the total phenolics contents, electron-donating abilities, and nitrite-scavenging abilities of extracts were significantly affected both by the solvent used for extraction, and by the nature of the particular herb or plant under study. The extraction efficiencies of valuable ingredients such as alliin, alliin, and total thiosulfinate, were greatly affected by extraction temperature, but not by extraction time or the solvent used. We elicited a regression formula for each variable. We first entered the optimal values of all extraction conditions giving active ingredients into the model. Next, we entered the optimal values of all extraction conditions favoring the retention of valuable antioxidant characteristics. Finally, we entered processing factors into the model. Overall, the optimal extraction was at 80°C for 3.5 hr with 8.5 ml of solvent/g of sample. The predicted values of each variable were similar to the actual values.

**Key words** : garlic, antioxidant, alliin, alliin, response surface methodology

### 서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과(Liliaceae) 파속(*Allium*)의 인경 채소로 원산지는 중앙아시아와 지중해 연안 지방이라 전해지고 있으며(1), 고대 이집트, 그리스, 인도, 로마, 중국 등에서 수천 년간 조미 향신료와 의약품으로 널리 이용되어 왔다. 중국 한(漢)나라 때 서역(西域) 지방을 탐험한 장건(張騫)이 그 지방에서 먹는 마늘을 갖고 들어온 것이

중국 마늘 재배의 시초이며, 이것이 우리나라에 보급되었다. 마늘의 한문 표기는 대산(大蒜)인데, 오랑캐 땅에 나는 풀이라서 호(胡)라 하기도 하고, 강하고 특수한 냄새 때문에 훈채라고 하기도 한다.

마늘은 독특한 향미와 우수한 생리활성을 지니고 있어 식품공업에서는 절임류 및 향신료로 이용되었지만 최근에는 마늘의 항균작용, 암세포 성장억제작용, 항혈전작용 등의 생리적 활성을 이용한 기능성식품 및 의약품원료로도 사용되고 있다(2,3). 마늘의 유효성분은 alliin, 즉 결정성 아미노산인 S-allyl-L-cysteine sulfoxide라고 알려져 있으며

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : jmlee@hoseo.edu,  
Phone : 82-41-540-5645, Fax : 82-41-544-4151

(4), 마늘 특유의 휘발성 향기성분은 마늘 조직이 파괴될 때 자체효소인 allinase(5)에 의하여 alliin이 분해되어 생성된 allicin이 다시 diallyl thiosulfinate와 diallyl disulphide 및 저급의 sulphide류로 분해되어 발생된다고 보고(6)되고 있다.

현재 마늘을 이용한 가공제품은 신선냉장, 냉동, 초산조제, 일시저장 마늘 절임류, 마늘 다대기, 건조마늘 분말 등이 국내에서 시판되고 있다(7). 근래에 들어와서 경제 활동에 힘입어 가공 식품에 대한 소비자들의 요구가 다양화되어 반가공 형태의 제품에서 즉석 식품에 이르기까지 다양한 형태의 가공 제품이 생산, 판매되고 있다. 그러나 마늘을 이용한 가공 제품은 극히 저조한 실정인데 즉, 마늘 전체 생산량 중 98%가 생마늘 형태로 이용되고 있는 반면 가공 제품은 매우 미미한 수준이다. 이와 같이 마늘을 이용한 가공제품이 저조한 이유는 우리의 식품관에도 기인하고 있으나, 소비자가 요구하는 마늘을 소재로 한 고품질의 가공제품을 생산하지 못하는 데도 큰 원인이 있다고 할 수 있다.

마늘에 관한 연구는 마늘 추출액의 기능성에 미치는 영향(8), 마늘 추출액의 저장 중 기능성 성분 변화(9), 마늘 추출물의 향기 성분 변화에 대한 연구는 미비한 편이다.

따라서 본 연구에서는 마늘을 건강기능식품가공소재로 활용하기 위하여 유효성분이 많이 포함된 열수 추출물을 얻고자 반응표면분석에 의해 열수 추출물의 이화학적 특성을 모니터링하고 추출조건을 최적화하여 마늘의 식품학적 가치를 재조명하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 사용된 마늘(*Allium sativum* L.)은 2003년과 2004년에 창녕에서 생산한 것을 사용하였다. 마늘은 포대에 담아 상온에서 보관하였으며, 실험 시에는 박피 세척시키고 탈수시킨 다음 분쇄기(Kaiser KA-2600, Seoul, Korea)로 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

### 무기성분 분석

무기성분은 시료 1 g을 건식분해 한 다음 정량하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 원자흡광광도계(AAnalyst 100/300 Atomic Absorption Spectrometer, Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 목적하는 무기성분의 분석조건에 따라 검량선을 작성하고 이를 토대로 시험용액을 분석하였다.

### 추출 조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 열수 추출 특성의 모니터링과 추출조건 최적화를 알기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(11)을 사용하였고, 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(12)을 실시하여 추출공정에 중요한 독립변수( $X_i$ )로 고려되는 인자 즉, 추출온도( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ ) 및 용매비( $X_3$ )에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계 부호화하였으며(Table 1), 중심합성계획에 따라 16구로 설정하여 추출실험을 하였다. 또한, 이들 독립변수에 영향을 받는 종속변수( $Y_n$ ) 즉, 추출물의 품질인자로서는 alliin 함량( $Y_1$ ), allicin 함량( $Y_2$ ), 총 thiosulfinate 함량( $Y_3$ ), 총 페놀성 화합물 함량( $Y_4$ ), 전자공여능( $Y_5$ ) 및 아질산염 소기능( $Y_6$ )을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 또한 열수 추출에 있어서 추출조건이 마늘 추출물의 유효성분 및 항산화제 추출특성에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program(13)을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

Table 1. Experimental design of hot-water extraction conditions for garlic

Extraction condition	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Temperature ( $^{\circ}$ C)	60	70	80	90	100
$X_2$ Time (hr)	1	2	3	4	5
$X_3$ Solvent per sample (v/w)	2	4	6	8	10

### Alliin 함량 측정

Alliin 분석(14)은 각각의 조건에 추출된 추출물을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 아래의 Table 2의 조건에 따라 HPLC를 사용하여 분석하였다. Alliin (Fluka, Germany) 동정은 표준품의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

Table 2. Operating conditions of HPLC for analysis of alliin and allicin

Specification	Condition	
	Alliin	Allicin
Instrument	Shimadzu LC-10AT	Shimadzu LC-10AT
Column	$\mu$ Bondapak <sup>TM</sup> C <sub>18</sub> column (3.9×300 mm, pore size:10 $\mu$ m)	Shim-pack ODS column (4.6×250 mm, pore size:5 $\mu$ m)
Detector	UV 210 nm	UV 280 nm
Flow rate	0.7 mL/min	1.0 mL/min
Mobile phase	Acetonitrile : water = 45:55	Acetonitrile : water : methanol = 41:50:9

### Allicin 함량 측정

Allicin 분석(15)은 각각의 조건에 추출된 추출물을 0.45

$\mu\text{m}$  membrane filter로 여과한 후 아래의 Table 2의 조건에 따라 HPLC를 사용하여 분석하였다. Allicin (Wako, Japan) 동정은 표준품의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

#### 총 thiosulfinate 함량 측정

총 thiosulfinate 함량은 Han 등(16)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 2 mM cysteine이 함유된 50 mM HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid], pH 7.5) 용액 0.5 mL에 추출물 0.1 mL를 첨가하였고, 여기에 50 mM HEPES 용액 4.4 mL를 넣어 총 반응용액의 부피를 5 mL로 하였다. 이 반응 용액을 27°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응액 1 mL를 취하여 50 mM HEPES buffer로 조제한 0.4 mM DTNB[5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid)] 1 mL를 가한 후 잘 혼합한 다음 27°C에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계 412 nm에서 흡광도를 측정하였고 표준품의 정량 곡선을 이용하여 계산하였다. 정량 곡선은 50 mM HEPES buffer (pH 7.5)로 조제한 0.05~0.30 mM의 cysteine용액 1 mL에 0.4 mM DTNB용액 1 mL를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하였고 412 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

#### 총 페놀성 화합물 함량 측정

각 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis법(17)에 따라 비색 정량하였다. 즉, 추출물 2 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mL를 넣어 진탕하고 1 시간 실온에서 방치하여 UV-1601 PC spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 검액 대신 증류수를 넣어 동일하게 처리하였다. 이때 표준물질로는 tannic acid를 5~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조제하여 검량곡선의 작성에 사용하였다.

#### 전자공여능 측정

시험용액의 전자공여능(electron donating ability, EDA) 시험은  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)를 사용한 방법으로 측정하였다(18). 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 가하고 50% ethanol 용액을 blank로 하여 517 nm에서 DPPH 용액의 흡광도를 약 1.0으로 조정한 후 이 용액 4 mL를 취하여 추출물 1 mL와 혼합한 후 상온에서 10 분간 방치시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였고 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{공시험의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 아질산염 소거능 측정

Kato 등(19)의 방법으로 520 nm에서 비색 정량하였다. 즉, 1 mM  $\text{NaNO}_2$  용액 1 mL에 마늘 추출물 1 mL를 첨가하고, 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.2 M 구연산 완충 용액(pH 3.0)을 사용하여 pH를 각각 1.2 및 3.0으로 조정된 buffer 용액을 첨가하여 반응용액을 10 mL로 정용하였다. 반응용액은 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 1 mL를 취해 2% 초산 용액 5 mL를 첨가한 다음, Griess 시약(30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1 : 1 비로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 실온에서 15 분간 방치시킨 후, 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식에 의하여 아질산염 소거율을 구하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A-C}{B}\right) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1 mM  $\text{NaNO}_2$  용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치 후의 흡광도

B :  $\text{NaNO}_2$  용액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도

#### 최적 추출조건의 예측 및 실증시험

회귀식에 의한 예측은 SAS (statistical analysis system) program(20)을 이용하여 최적 추출조건을 반응 변수인 추출물의 특성, 즉 주요성분인 유효성분 함량 및 항산화적 특성의 contour map을 superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위로 예측하였다(21). 또한 예측된 범위에서 임의의 점을 설정하여 회귀식에 대입한 후 그 예측된 최적값에 대하여 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### 무기성분

마늘에 함유된 무기질 함량은 Table 3과 같다. 7종의 무기성분을 확인하였는데 K, Mg, Ca 및 Na의 함량이 높았고, Fe, Zn 및 Mn 함량이 낮게 나타났고 K, Mg, Ca, Na, Fe 등의 순으로 많이 함유되어 있었다. Chang 등(22)은 마늘의 무기성분은 수확시기와 생산지역에 따라 다소 차이가 있으며, K 함량이 가장 높고 Mg과 Ca 그리고 Na 순으로 많이 함유되었고 국내산 식용 지하 부위 채소들의 무기성분들은 큰 차이가 없었고 모든 시료들이 K, Ca, Mg 등을 많이 함유하고 있다는 보고와 일치하였다.

#### 추출조건에 따른 추출물 특성의 모니터링

마늘로부터 최적 추출조건을 설정하기 위해 추출온도, 추출시간 및 시료에 대한 용매비를 독립변수로 하여 중심합

**Table 3. Mineral composition of garlic**

(unit : mg%, dry basis)							
	Ca	Mn	Fe	Na	K	Mg	Zn
Garlic	14.4	0.24	2.20	8.50	81.30	21.70	0.86

성계획에 의해 설계된 16구의 추출조건에서 얻어진 추출물의 alliin 함량, allicin 함량 및 항산화적 특성 등의 결과는 Table 4 및 5와 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고 각 종속변수 즉, 유효성분 함량, 총 페놀성 화합물 함량, 전자공여능 및 아질산염 소거능에 대한 회귀식을 얻었다(Table 6). 또한 변수별 최적 추출조건과 추출물의 특성 값을 예측하여 Table 7에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면은 추출온도, 추출시간 및 시료에 대한 용매비를 독립변수로 하여 Fig. 1~7에 나타내었다.

**Table 4. Experimental data on alliin, allicin and total thiosulfinate content of garlic under different conditions based on central composite design by response surface analysis**

Experiment No. <sup>1)</sup>	Extraction condition			Alliin content (mg%)	Allicin content (mg%)	Total thiosulfinate content (mM)
	Temperature (°C)	Time (hr)	Solvent per sample (v/w)			
1	70 (-1)	2 (-1)	4 (-1)	54.07	1.98	0.165
2	70 (-1)	2 (-1)	8 (1)	57.70	1.22	0.141
3	70 (-1)	4 (1)	4 (-1)	43.07	2.98	0.174
4	70 (-1)	4 (1)	8 (1)	51.48	2.49	0.167
5	90 (1)	2 (-1)	4 (-1)	37.59	2.19	0.180
6	90 (1)	2 (-1)	8 (1)	54.80	5.55	0.185
7	90 (1)	4 (1)	4 (-1)	33.76	4.22	0.175
8	90 (1)	4 (1)	8 (1)	39.19	5.52	0.184
9	80 (0)	3 (0)	6 (0)	31.67	3.75	0.192
10	80 (0)	3 (0)	6 (0)	31.67	3.75	0.192
11	60 (-2)	3 (0)	6 (0)	90.52	3.60	0.139
12	100 (2)	3 (0)	6 (0)	27.89	5.58	0.177
13	80 (0)	1 (-2)	6 (0)	49.02	1.19	0.164
14	80 (0)	5 (2)	6 (0)	28.05	4.03	0.191
15	80 (0)	3 (0)	2 (-2)	23.47	1.61	0.184
16	80 (0)	3 (0)	10 (2)	52.62	5.72	0.203

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

**추출물의 alliin 함량**

마늘의 유효성분은 alliin, 즉 결정성 아미노산인 S-allyl-L-cysteine sulfoxide라고 알려져 있으며(23), 다른 종류의 백합과 식물보다 alliin을 다량 함유하고 있다. 마늘 추출액 중의 alliin은 항산화 효과, 혈중 지질저하 효과가 있음이 보고되었다(24).

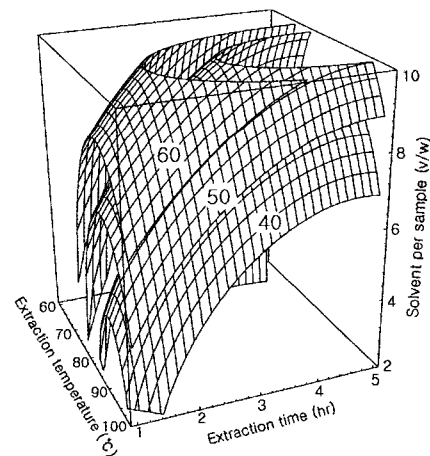
**Table 5. Experimental data on total phenolics content, electron donating ability and nitrite-scavenging ability of garlic under different conditions based on central composite design by response surface analysis**

Experiment No. <sup>1)</sup>	Extraction condition			Total phenolics content (mg%)	Electron donating ability (%)	Nitrite-scavenging ability (%)	
	Temperature (°C)	Time (hr)	Solvent per sample (v/w)			pH 1.2	pH 3.0
1	70(-1)	2(-1)	4(-1)	8.29	14.70	79.04	36.13
2	70(-1)	2(-1)	8(1)	11.26	21.86	88.38	45.11
3	70(-1)	4(1)	4(-1)	9.01	15.33	76.76	39.13
4	70(-1)	4(1)	8(1)	11.74	26.00	90.04	49.90
5	90(1)	2(-1)	4(-1)	8.95	19.47	86.93	36.53
6	90(1)	2(-1)	8(1)	14.42	28.01	94.40	52.49
7	90(1)	4(1)	4(-1)	9.94	16.33	87.14	37.92
8	90(1)	4(1)	8(1)	14.93	24.62	90.66	66.66
9	80(0)	3(0)	6(0)	10.53	23.62	90.25	49.10
10	80(0)	3(0)	6(0)	10.53	23.62	90.25	49.10
11	60(-2)	3(0)	6(0)	9.23	18.59	80.66	46.10
12	100(2)	3(0)	6(0)	12.33	17.84	84.44	38.72
13	80(0)	1(-2)	6(0)	6.73	23.36	87.97	47.50
14	80(0)	5(2)	6(0)	16.18	22.61	90.66	47.10
15	80(0)	3(0)	2(-2)	5.78	10.80	63.69	23.35
16	80(0)	3(0)	10(2)	13.33	30.02	93.40	56.68

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

HPLC로 분석한 각각의 추출물의 alliin 함량을 Table 4에 나타내었으며, 4차 반응표면은 Fig. 1에 나타내었고, 결과에 대한 회귀식은 Table 6과 같다.

추출 조건별 추출물의 alliin 함량에 대한 회귀식은 R<sup>2</sup>는 0.8553으로 10% 이내의 유의성이 인정되었다. 추출 조건에



**Fig. 1. Response surface for alliin content in extracts at constant values (alliin: 40, 50, 60 mg%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.**

따라 예측된 정상점은 최대점으로 나타내었고, 이 때 최대 값은 83.35 mg%로 예측되었고, 추출 조건은 추출온도 60.34 °C, 추출시간 2.69 hr 및 시료에 대한 용매비는 6.42 v/w이었다. 추출물의 alliin 함량의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 추출온도에 가장 큰 영향을 받고 있었으며, 추출시간과 용매비가 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다.

#### 추출물의 allicin 함량

Alliin은 alliin에 alliinase가 작용하여 생성되는 1차 생성물로서, 마늘의 매운 맛을 나타내는 성분이며, 생성된 allicin은 자발적으로 분해되어 마늘 특유의 자극성 냄새를 형성한다. Allicin은 혈당치를 감소시키고 고지혈증, 동맥경화증과 같은 만성퇴행성질환의 개선에 주요한 물질로 알려져 있으며 최근에는 항암효과에 많은 연구가 보고되고 있다(25).

마늘로부터 최적 추출물을 얻기 위해 각각의 조건에서 추출한 추출물의 allicin 함량은 Table 4와 같다. 이러한 결과를 이용하여 추출조건과 추출물의 allicin 함량에 대한 반응표면 회귀식은 Table 6에 나타난 것과 같이 구하였다.

추출물의 allicin에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>가 0.8861로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점이고 최대값은 7.64 mg%로 예측되었다. 이때의 추출 조건은 추출온도 95.81 °C, 추출시간 3.14 hr 및 시료에 대한 용매비 8.43 v/w이었다(Table 7). 추출물의 allicin 함량에 대한 4차원 반응 표면을 분석하여 본 결과 추출온도가 높고, 시료에 대한 용매비가 높을수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

**Table 7. Predicted levels of extraction conditions of garlic for the maximum responses of variables by the ridge analysis**

Responses	R <sup>2</sup>	Pro>F	X <sub>1</sub> <sup>1</sup> (°C)	X <sub>2</sub> <sup>2</sup> (hr)	X <sub>3</sub> <sup>3</sup> (v/w)	Maximum	Morphology
Alliin content (mg%)	0.8553	0.0546	60.34	2.70	6.42	83.35	Maximum
Allicin content (mg%)	0.8861	0.0290	95.81	3.14	8.43	7.65	Saddle point
Total thiosulfinate content (mM)	0.8783	0.0347	87.85	3.48	9.55	0.20	Saddle point
Total phenolics content (mg%)	0.8621	0.0490	91.20	4.13	8.42	16.40	Saddle point
Electron donating ability (%)	0.9686	0.0080	78.51	3.61	9.79	29.48	Saddle point
Nitrite-scavenging ability pH 1.2 (%)	0.9073	0.0166	81.56	3.07	7.97	93.93	Maximum
Nitrite-scavenging ability pH 3.0 (%)	0.9017	0.0195	88.49	4.02	8.99	64.46	Saddle point

<sup>1</sup>Extraction temperature (°C).

<sup>2</sup>Extraction time (hr).

<sup>3</sup>Solvent per sample (v/w).

#### 추출물의 총 thiosulfinate 함량

추출 조건에 따른 alliin의 분해 산물인 thiosulfinate 함량의 변화를 알아보기 위해 마늘의 총 thiosulfinate 함량을 흡광도로 측정한 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 6에 나타내었다.

추출물의 회귀식 R<sup>2</sup>는 0.8783이고 5% 이내의 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점은 안장점이고 최대값은 0.20 mM로 예측되었다. 이 예측값을 추출할 수 있는 조건은 추출온도 87.85 °C, 추출시간 3.48 hr 및 시료에 대한 용매비 9.54 v/w로 나타났다. 각각의 추출 조건에 따라 총 thiosulfinate 함량에 대한 contour map과 4차원 반응 표면은 Fig. 3에서와

**Table 6. Polynominal equations calculated by RSM program for hot-water extraction conditions of garlic**

Response	Second order Polynominals	R <sup>2</sup>	Significance
Alliin content	YALLIIN = 605.230625 - 12.399750X <sub>1</sub> - 10.940000X <sub>2</sub> - 6.150625X <sub>3</sub> + 0.068838X <sub>1</sub> <sup>2</sup> - 0.022750X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> + 1.716250X <sub>2</sub> <sup>2</sup> + 0.068750X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> - 0.412500X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> + 0.398437X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.8553	0.0546
Allicin content	YALLICIN = 18.716250 - 0.467688X <sub>1</sub> + 3.273125X <sub>2</sub> - 2.192188X <sub>3</sub> + 0.002100X <sub>1</sub> <sup>2</sup> - 0.003375X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> - 0.285000X <sub>2</sub> <sup>2</sup> + 0.036938X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> - 0.111875X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> - 0.005312X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.8861	0.0290
Total thiosulfinate content	YTSC = - 0.446063 + 0.014406X <sub>1</sub> + 0.060062X <sub>2</sub> - 0.026906X <sub>3</sub> - 0.00085000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> - 0.000513X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> - 0.003625X <sub>2</sub> <sup>2</sup> + 0.000281X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> + 0.001313X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> + 0.000093750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.8783	0.0347
Total phenolics content	YTPC = 12.050000 - 0.201375X <sub>1</sub> - 0.067500X <sub>2</sub> - 0.536875X <sub>3</sub> + 0.000625X <sub>1</sub> <sup>2</sup> + 0.003750X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> + 0.231250X <sub>2</sub> <sup>2</sup> + 0.029750X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> - 0.0045000X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> - 0.060938X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.8621	0.0490
Electron donating ability	YEDA = - 122.617500 + 2.679750X <sub>1</sub> + 10.826250X <sub>2</sub> + 4.580625X <sub>3</sub> - 0.013513X <sub>1</sub> <sup>2</sup> - 0.141250X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> - 0.158750X <sub>2</sub> <sup>2</sup> - 0.006250X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> + 0.203750X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> - 0.200625X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.9686	0.0080
Nitrite-scavenging ability pH 1.2	YpH1.2 = - 138.178125 + 3.828188X <sub>1</sub> + 4.393125X <sub>2</sub> + 17.502813X <sub>3</sub> - 0.019250X <sub>1</sub> <sup>2</sup> - 0.036375X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> - 0.233750X <sub>2</sub> <sup>2</sup> - 0.072688X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> - 0.000625X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> - 0.731563X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.9073	0.0166
Nitrite-scavenging ability pH 3.0	YpH3.0 = - 0.587500 + 1.502563X <sub>1</sub> - 9.124375X <sub>2</sub> - 4.295937X <sub>3</sub> - 0.016725X <sub>1</sub> <sup>2</sup> + 0.097125X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> - 0.450000X <sub>2</sub> <sup>2</sup> + 0.155938X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> + 0.910625X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> - 0.567813X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.9017	0.0195

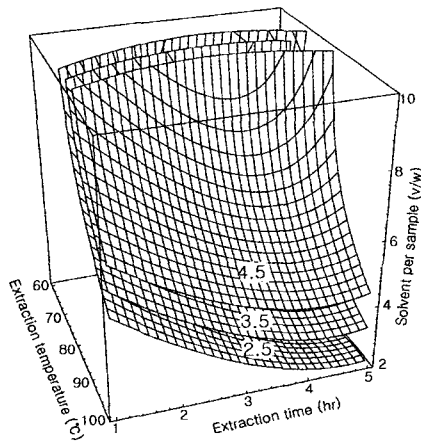


Fig. 2. Response surface for allicin content in extracts at constant values (allicin: 2.5, 3.5, 4.5 mg%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

같이 추출온도가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내었다.

마늘의 경우 thiosulfinate는 주로 diallyl thiosulfinate가 상당 부분을 차지하고 있으며 이들 성분들은 체내에서 세포 대사에 저해작용을 함으로써 항균작용, 항암작용, 저혈당 작용, 혈압강화작용 등 각종 효능을 나타내는 것으로 밝혀지고 있다(26). 특히, diallyl thiosulfinate는 vitamin B<sub>1</sub>과 동일한 생리작용을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다.

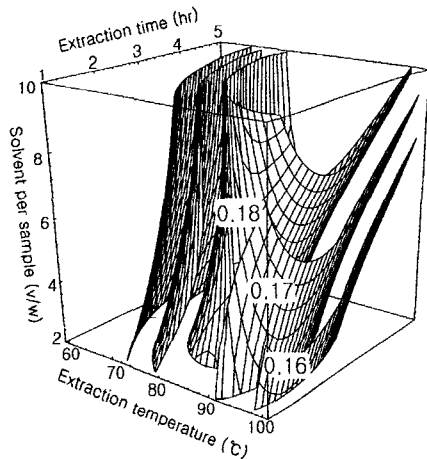


Fig. 3. Response surface for total thiosulfinate content in extracts at constant values (total thiosulfinate: 0.16, 0.17, 0.18 mM) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

추출물의 총 페놀성 화합물 함량

각각의 추출물에 대한 총 페놀성 화합물 함량은 Table 5에 나타내었으며, 4차원반응표면은 Fig. 4에 나타내었고, 회귀식은 Table 6과 같다. 총 페놀성 화합물 함량에 대한 추출물의 회귀식은 R<sup>2</sup>는 0.8162이고, 5% 유의 수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점이고, 이 때

의 추출 조건은 추출온도 91.19°C, 추출시간 4.13 hr 및 시료에 대한 용매비 8.41 v/w에서 최대값은 16.40 mg%이었다. 추출조건에 따른 총 페놀성 화합물 함량에 대한 추출 특성은 Fig. 4에서와 같이 시료에 대한 용매비와 온도가 높을수록 증가하는 것으로 나타났다.

페놀성 물질은 식물체에서 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응시 기질로 작용하여 미생물의 공격을 막아 식물 자체를 보호하는 동시에 떼은 맛, 쓴맛과 같은 식물성 식품의 고유한 맛에 관여한다(27). 또한, 페놀성 화합물은 항암 작용, 혈압강화작용, 피임작용, 간 보호작용, 진정작용 등 여러 작용이 알려져 있으며 항산화 작용을 가진 대표적인 물질로 보고되어 있다(28).

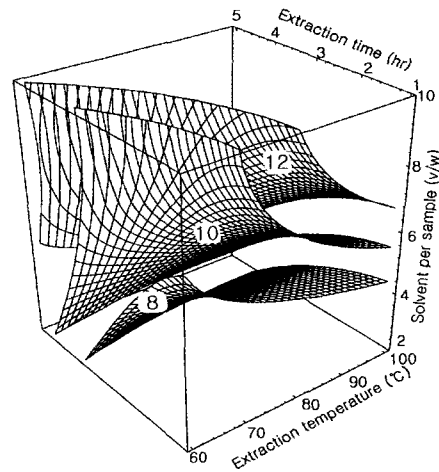


Fig. 4. Response surface for total phenolics content in extracts at constant values (total phenolics content: 8, 10, 12 mg%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

추출물의 전자공여능

전자공여능 작용은 자유라디칼에 전자를 공여하는 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고, 인체 내에서는 자유라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다(29). 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 전자공여능은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정한다(30).

마늘의 각 추출물에 대한 전자공여능을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 이 결과를 이용하여 추출조건과 전자공여능에 대한 반응표면 회귀식은 Table 6에 나타내었다. 전자공여능에 대한 추출물의 회귀식 R<sup>2</sup>는 0.9686이고, 1% 유의 수준에서 유의성이 인정되었다. 또한 온도, 시간, 시료에 대한 용매비의 추출 조건에 따른 전자공여능의 4차원 반응표면 분석으로 예측된 정상점은 안장점으로 최대값은

29.48%이었고, 이때의 추출 조건은 추출온도 78.51°C, 추출 시간 3.61 hr 및 시료에 대한 용매비는 9.79 v/w이었다(Table 8). 전자공여능의 추출 특성에 따른 4차원 반응 표면에서 볼 때 시료에 대한 용매비가 높을수록 공여능의 값은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

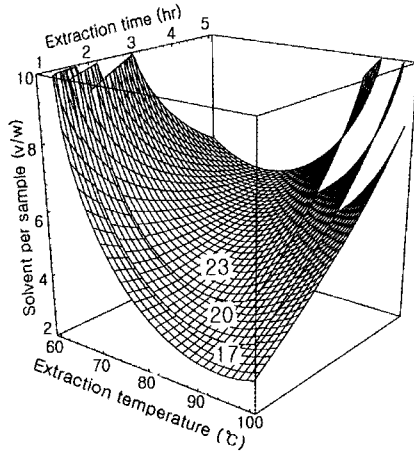


Fig. 5. Response surface for electron donating ability in extracts at constant values (electron donating ability: 17, 20, 23%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

추출물의 아질산염 소거능

각 추출물의 아질산염 소거능은 Table 5에 나타내었고, 추출조건에 따른 추출물의 아질산염 소거능에 대한 회귀식은 Table 6에 나타난 것과 같이 구하였다. pH 1.2 및 3.0에 따른 아질산염 소거능에 대한 추출물의 회귀식 R<sup>2</sup>는 각각 0.9073 및 0.9017이고 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. pH 1.2 아질산염 소거능의 예측된 정상점은 최대점으로 Table 7과 같이 최적 예측 조건은 추출온도 81.56°C, 추출

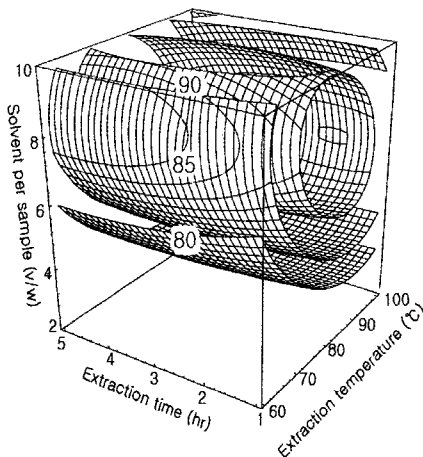


Fig. 6. Response surface for nitrite-scavenging ability pH 1.2 in extracts at constant values (NSA: 80, 85, 90%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

시간 3.06 hr 및 시료에 대한 용매비가 7.97 v/w으로 나타났으며, 최대값은 93.93%로 예측되었다. pH 3.0 아질산염 소거능의 예측된 정상점은 안장점으로 나타나 능선분석을 실시한 결과, 최대값은 64.46%이었고, 이 때 최적 예측 조건은 추출온도 88.48°C, 추출시간 4.02 hr 및 시료에 대한 용매비는 8.99 v/w이었다.

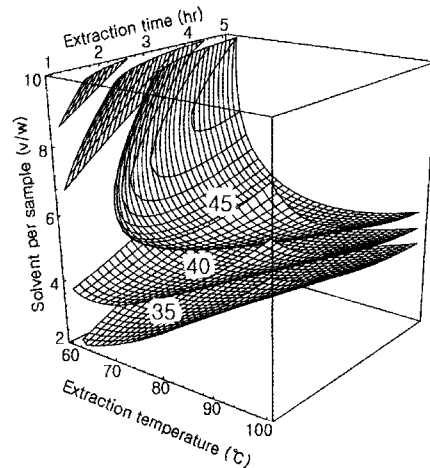


Fig. 7. Response surface for nitrite-scavenging ability pH 3.0 in extracts at constant values (NSA: 35, 40, 45%) as a function of extraction temperature, time and solvent per sample of garlic.

아질산염 소거작용은 Kang 등(31)이 보고한 결과와 같이 pH의 감소에 따라 본 실험에서도 아질산염 소거능이 우수한 것으로 나타났다. Kim 등(32)의 보고에 의하면 일상 생활에서 주로 섭취되는 야채류가 전반적으로 아질산염 소거능이 강하게 나타났으며, 야채 추출물의 아질산염 소거능이 pH 1.2에서 가장 좋았다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였고, 이는 마늘 추출물이 nitrosamin 반응을 효과적으로 저해할 것으로 생각된다. 이처럼 마늘 등 야채 추출물이 아질산염 소거능이 높게 나타나는 것은 Fox 등(33)이 ascorbic acid, cystein, hydroquinone 및 nicotinlamide adenine dinucleotide와 같이 환원성 물질을 아질산염과 반응시키면 아질산염의 일부는 이들 물질에 의해 nitric oxide(NO)로 전환된다고 보고하였는데 이러한 영향은 마늘에 함유된 ascorbic acid, phenol 화합물, allyl 화합물 등에 기인된다고 알려져 있다.

Table 8. The range of optimum extraction condition for maximum response variables by superimposing response surfaces of effective ingredients and antioxidant characteristics in the extract of garlic

Extraction condition	Range of predicted condition
Temperature (°C)	70~90
Time (hr)	3~4
Solvent per sample (v/w)	7.5~9.5

### 최적 추출조건의 예측

마늘의 유효성분 및 항산화적 특성의 최적 추출 조건을 설정하기 위하여 각 조건별 추출물의 alliin 함량, allicin 함량, 총 페놀성 화합물 및 전자공여능 등에 대한 contour maps를 superimposing하여 최적 범위를 예측하였다. 유효 성분 및 항산화적 특성이 일치하는 범위는 추출온도 70~90°C, 추출시간 3~4 hr 및 시료에 대한 용매비 7.5~9.5 v/w로 나타났다(Table 8). 따라서 이와 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건 범위 내에서 임의의 조건 즉, 추출온도 80°C, 추출시간 3.5 hr 및 시료에 대한 용매비 8.5 v/w를 대입하여 유효성분 및 항산화적 특성을 측정된 결과, Table 9와 같이 나타났다. Alliin 함량 41.16 mg%, allicin 함량 27.92 mg%, 총 페놀성 화합물 함량 13.51 mg%, 전자공여능 27.92%, 아질산염 소거능 pH 1.2와 pH 3.0에서 각각 93.67%, 57.90%로 나타났으며, 이론치와 비교하였을 때 alliin 함량과 총 페놀성 화합물 함량은 다소 낮은 값을 나타내었으나, allicin 함량, 총 thiosulfinate 함량, 전자공여능 및 아질산염소거능은 이론치보다 높은 값을 나타내었다. 실측값은 예측값의 94.52~114.01%로 나타나 추출조건의 유효성이 인정되었다.

**Table 9. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of their extracts**

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A×100(%)
Alliin content (mg%)	41.16	46.93	114.01
Allicin content (mg%)	4.53	4.48	98.89
Total thiosulfinate content (mM)	0.19	0.18	94.74
Total phenolics content (mg%)	13.51	14.5	107.32
Electron donating ability (%)	27.92	26.39	64.52
Nitrite-scavenging ability pH 1.2 (%)	93.67	92.05	98.27
Nitrite-scavenging ability pH 3.0 (%)	57.90	56.53	97.63

<sup>1)</sup>Calculated using the predicted equations for response variables.

Given optimal condition of independent variables: extraction temperature 80°C, extraction time 3.5 hr, solvent per sample 8.5 v/w.

<sup>2)</sup>Mean values of triplicates determinations.

### 요 약

국내에서 재배되고 있는 약용식물 및 농산물의 생리적 활성에 대하여 현재 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 추출조건별로 마늘의 유효성분 함량 및 항산화적 특성을 반응표면분석법으로 모니터링하여 최적 열수추출 조건을 설정하였다. 실험결과 총페놀성 화합물 함량, 전자공여능 및 아질산염 소거능은 용매비에 의해 많은 영향

을 받고 있는 것으로 나타났다. Allin, allicin 및 total thiosulfinate는 추출온도에 많은 영향을 받고 있는 것으로 나타났으나, 추출시간 및 용매비에 대해서는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 각각의 변수에 대한 회귀방정식을 도출하였으며, 유효성분 함량과 항산화적 특성에 대한 추출조건을 종합하여 superimposed contour map으로 최적 조건을 예측하였다. 예측된 최적 추출조건은 추출조건 80°C, 추출시간 3.5 hr 및 용매비 8.5 v/w으로 나타났으며, 예측된 값은 실제 유효성분 및 항산화적 특성을 조사한 결과 유사한 값을 보였다.

### 감사의 글

본 연구는 창녕군 농업기술센터 과제의 지원으로 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lee, T.B. (1979) Illustrated flora of Korea, Hangmunsa, Seoul, Korea, p.203
2. Kamanna, V.S. and Chandrasekhara, N. (1983) Biochemical and physiological effects of garlic(*Allium sativum* Linn.). J. Sci. Ind. Res., 42, 353-357
3. Watanabe, T. (1988) Utilization of principles of garlic. Food Processing, 23, 40-42
4. Stoll, A. and Seebeck, E. (1951) Chemical investigation on alliin, the specific principle of garlic. Adv. Enzymol., 11, 377-400
5. Mazelis, M. and Crews, L. (1968) Purification of the alliinase of garlic, *Allium sativum* L. Biochem. J., 108, 725-730
6. Stoll, A. and Seebeck, E. (1949) Über den enzymatischen abbau des alliiins und die eigenschaften der alliinase. Helv. Chim. Acta., 32, 197-205
7. Rural Development Administration (2001) Present of the garlic industry and improvement of plans. 62th (11-1390000-001075-01), 3, Suwon, Korea
8. Byun, P.H., Kim, W.J. and Yoon, S.K. (2001) Effect of extraction conditions on the functional properties of garlic extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 507-513
9. Byun, P.H., Kim, W.J. and Yoon, S.K. (2001) Change of functional properties of garlic extracts during storage. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 301-306
10. Park, C.J., Kim, S.D. and Oh, S.K. (1993) Study on the flavor of garlic extract. Korean J. Food Sci. Technol.,



- 25, 593-595
11. Myers, R.H. (1971) Response surface methodology, Allyn and Bacon Inc., Boston, p. 127-139
  12. Wanasumudara, P.K.J.P.D. and Shahidi, F. (1996) Optimization hexameta- phosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. Korean J. Food Sci., 61, 604-607
  13. Marth, L.A. and Jsmes, P.B. (1992) The mathematica handbook, compatible with mathematica version 2.0, An inprint of academic press. Inc. Harcourt Brace & Co., Massachusetts, p.15-511
  14. Lee, E.H., Chang, K.S., Kwon, Y.A. and Lee, E.M. (1997) Optimization of the alliiins extraction in the garlic by supercritical carbon dioxied. Food Eng. Prog., 1, 149-153
  15. Sohn, K.H., Lim, J.K., Kong, U.Y., Park, J.Y. and Akinori, N. (1996) High pressure inactivation of allinase and its effects on flavor of garlic. Korean J. Food Sci. Technol., 28, 593-599
  16. Han, J., Lawson, L., Han, G. and Han, P.A. (1995) A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfates. Anal. Biochem., 225, 157-160
  17. Amerine, M.A. and Ough C.S. (1980) Methods for analyses of musts and wine. Wiley & Sons, New York, 176-180
  18. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
  19. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric. Biol. Chem., 51, 1333
  20. SAS institute. (1988) SAS/STAT User's Guide. Version 6. 4th(ed.) Cary, N.C, U.S.A.
  21. Floros, J.D. and Chinnan, M.S. (1987) Optimization of pimento pepperlyepeeling process using response surface methodology. Trans. ASAE, 30, 560-566
  22. Chang, K.M. and Lee, M.S. (1999) A studies on mineral contents of the underground vegetables produced in Korea harvested in different times. Korean J. Soc. Food Sci., 15, 545-549
  23. Stoll, A. and Seebeck. E. (1951) Chemical investigation on alliin the species principle of garlic. Adv. Enzymol., 11, 377-379
  24. Naito, S., Yamaguchi, N. and Yokoo, Y. (1981) Antioxidative activities of vegetables of *Allium* species. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 28, 291-269
  25. Caballito, C.J., Bailey, J.H. and Buck, J.S. (1976) Antibacterial principle of *Allium sativum*; III Its precursor and essential oil of garlic. J. Am. Chem. Soc., 67, 1032-1035
  26. Abdullah, T.H., Kandil, O., Elkadi, A. and Carter, J. (1988) Garlic revisited; Therapeutic for the major diseases of our time. J. Nat. Med. Asso., 80, 439
  27. Kim, I.W., Shin, D.H. and Choi, U. (1999) Isolation of antioxidative components from the bark of *Rhus verniciflua* S. screened from some Chinese medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 885-863
  28. Giacosa, A. and Filiberti, R. (1996) Free radicals, oxidative damage and degenerative disease. Eur. J. Cancer Prev., 5, 307-312
  29. Lee, K.D., Chang, H.K. and Kim, H.K. (1997) Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. Korean J. Food Sci. Technol., 29, 432-436
  30. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1190-1200
  31. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D. (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 978-984
  32. Kim, D.S., Ahn, B.W., Yeum, D.W., Yeum, D.M., Lee, D.H., Kim, S.B. and Park, Y.H. (1987) Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural components; 1. Nitrite-scavenging effects of vegetable extracts. Bull. Korean Fish. Soc., 20, 463-468
  33. Fox, J.B. and Ackerman, S.A. (1968) Formation of nitric oxide myoglobin; Mechanisms of the reaction with various reductants. J. Food Sci., 33, 364-370