

## 흑마늘의 항산화, 항균 및 항혈전 활성화

정인창, 손호용\*

안동대학교 식품영양학과

Received: July 7, 2014 / Revised: August 20, 2014 / Accepted: August 20, 2014

### Antioxidation, Antimicrobial and Antithrombosis Activities of Aged Black Garlic (*Allium sativum* L.)

In-Chang Jung and Ho-Yong Sohn\*

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

In the course of study for development of functional food ingredients from aged black garlic (ABG), heat-treated ripe bulbs of *Allium sativum* L., the water extracts from raw-garlic (RG) and ABG, and the subsequent organic solvent fractions of ABG were prepared, and their antioxidant, antimicrobial, and antithrombosis activities were compared. The extraction yield of ABG was 4-folds higher than that of RG, and the contents of total polyphenol, total flavonoid, total sugar and reducing sugar in the ABG extract were 4-folds, 1.56-folds, 3.36-folds and 6.75-folds higher than those of the RG extract, respectively. In antioxidation activity assay, the extract of ABG showed minor scavenging activity against DPPH anion, but revealed strong scavenging activity against ABTS cation and nitrite. Especially, the ethylacetate fraction from the ABG extract demonstrated stronger antioxidation activity than the RG extract and other fractions. Although the antimicrobial and antithrombosis activities of the RG extract did not appear in the ABG extract, the ethylacetate fraction from the ABG extract had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and strong antithrombosis activity via the inhibition of prothrombin, blood coagulation factors and platelet aggregation. All extracts and fractions did not show any hemolytic activity against human red blood cells up to 5 mg/ml. Our results suggest that the ethylacetate fraction of ABG could be applicable to the development of functional food ingredients for antithrombosis agents.

**Keywords:** *Allium sativum* L., Aged Black-Garlic, antioxidation, antithrombosis

## 서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과의 여러해살이 식물로, 원산지는 서부아시아로 알려져 있으나 한국, 일본, 인도를 포함한 아시아 전역 및 남유럽에 광범위하게 분포하고 있으며, 특유의 맛과 향으로 전 세계에서 가장 많이 사용하는 향신료 중의 하나이다[1, 4]. 마늘은 탄수화물 20%, 단백질 3.3%, 지방 0.4%, 섬유질 0.92%, 회분 13.4%로 구성되어 영양적으로 우수할 뿐 아니라, 다량의 비타민 C, 다양한 유기산 및 황화합물들을 포함하여 항균, 항암 및 고혈압 예방효과를 나타내는 건강식품 소재로 잘 알려져 있다[14, 16]. 특히 생마늘의 황화 아릴류(allyl sulfur compounds)들은 항균, 항암, 동맥경화 예방, 지질대사 개선, 면역세포 활성화 및 항산화 활

성 등의 다양한 유용 생리활성을 나타내나, 이들의 강한 신미 및 취기는 마늘이 향신료 개념에서 벗어나 건강식품소재로 광범위하게 이용되는 것을 어렵게 하고 있다[22]. 따라서 마늘의 매운 맛과 자극취를 없애기 위해 다양한 온도와 압력에서의 가열처리[16], 유산균[28] 및 홍국을 이용한 마늘 발효[26] 등이 시도되어 왔다.

흑마늘은 통마늘을 고온 항온기에 일정시간(30-40일) 숙성하여 마늘의 자체성분과 효소 등에 의해 마늘 인편의 내부까지 모두 흑색으로 변화된 마늘을 말하며, 장시간의 고온 숙성처리에 의해 생마늘과 달리 진한 흑갈색을 띄며, 마늘의 매운 맛은 감소되고, 달콤하면서 새콤하고 점도가 높은 젤리와 같은 물성을 가지게 된다[5]. 일반적인 생마늘의 향미 성분은 diallyl thiosulfinate, diallyl disulfide 및 저급의 sulfide로 알려져 있으며[16], 이들은 마늘의 allin이 allinase에 의해 효소분해될 때 생성된다고 알려져 있다[8, 16]. 그러나 흑마늘에는 고온숙성 과정에서 휘발성 황화합물의 분해 및 소실이 나타나고, 2,6-dimethyl-4-heptanone, 3-methylbutanal,

### \*Corresponding author

Tel: +82-54-820-5491, Fax: +82-54-820-7804

E-mail: hysohn@anu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

benzaldehyde, furfural, 5-methyl-2-furfural 등이 증가되어 전체적으로 fruit-sweet 향이 증가되어 관능성이 증대되는 것으로 알려져 있다[8]. 또한 흑마늘은 마늘이 가진 유용성분 이외에 고온숙성 중에 생성된 새로운 물질들을 포함할 수 있다. 현재까지 흑마늘의 알려진 생리기능으로는 항산화[22, 24], 대장암 및 위암 세포의 생육억제[6, 30], 항당뇨 활성[11], 지질대사 개선, 혈당감소 및 구속 스트레스 감소 효과[12], tyrosinase 및 elastase 저해에 따른 미백 및 주름개선 효과[17], 면역세포 활성화[19] 및 cytokine 생산촉진[21], 간독성 방지[23], 알러지 감소[33] 및 흑마늘 핵산 추출물의 인간 백혈병세포 사멸촉진[18] 효과가 알려져 있다. 최근에는 흑마늘을 이용한 가공식품 개발에도 연구가 진행되고 있으며, 흑마늘 진액을 제조하기 위한 최적 열수 추출조건의 확립[10], 흑마늘 분말을 청국장[9], 머핀[31], 돈육햄[32] 등에 첨가하여 기능성과 관능성을 강화시킨 가공제품 개발 등의 보고가 계속되고 있다.

본 연구에서는, 경북 의성산 흑마늘의 유용활성을 평가하고자 생마늘과 흑마늘 추출물의 항산화, 항균, 항혈전 활성을 비교하였으며, 이후 흑마늘 추출물의 순차적 용매 분획물을 조제하여 분획물의 활성을 평가하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 마늘은 2012년 경북 의성에서 생산한 마늘을 구입하여 사용하였으며, 흑마늘은 2012년 경북 의성에서 가공한 흑마늘(의성흑마늘 바이오영농조합) 제품을 구입하여 사용하였다. 마늘 추출물 조제의 경우, 껍질을 벗긴 마늘과 동량의 멸균수를 분쇄용 백(Model 400, Closure Bags 6041, Seward, England)에 넣고 분쇄기(Stomacher 400, Seward, England)로 10분간 마쇄하였다[15]. 이후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리(HA-1000-3, Hanil Science Industrial, Korea)하여 상등액을 회수하였으며, 상등액은 50°C 조건하에 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai, Japan)하여 분말로 조제하였다. 흑마늘 추출물은 흑마늘(20 kg)을 90°C의 열수 추출기(YJ-EXT-1000, Yujin Technology, Korea)에 넣고 12시간 상압 추출하여 조제하였으며, 조제된 추출액(3.2 brix) 70리터는 진공농축기(YJ-EV-1000, Yujin Technology, Korea)를 이용하여 50°C 조건하에 감압 농축하여 분말로 조제하였다. 흑마늘 추출물의 유기용매 분획물 제조의 경우, 추출물을 물에 현탁한 후 *n*-hexane, ethylacetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 최종적으로 물 잔류물을 회수하였으며, 각각의 분획물들은 상기와 동일한 방법으로 감압건조하여 분말화 하였다. 조제된 시료는 DMSO에 녹여 *in-vitro* 조건에

서 항산화, 항균 및 항혈전 활성 평가에 사용하였다. 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 마늘 및 흑마늘은 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2012-AS1, 2012-AS2).

### 항산화 활성 측정

조제된 시료의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) anion scavenging activity [DSA], ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] cation scavenging activity [ASA] 및 nitrite scavenging activity [NSA] 측정으로 평가하였다[3]. 먼저 DSA 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20 µl에 99.5% ethanol 에 용해시킨  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH용액 380 µl를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader (Asys Hitech, Expert96, Asys, Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DSA는 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 백분율로 표시하였다[3]. ASA 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma) 5 ml와 140 mM potassium persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 ethanol로 희석하였다. 조제된 희석용액 190 µl와 시료 10 µl를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA(%)를 결정하였다[13].

$$ASA (\%) = [(C - S)/C] \times 100$$

C: DMSO 첨가시 흡광도

S: 시료 첨가시 흡광도

NSA 측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma)를 가하고 혼합하였다. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite 양을 측정하였다. NSA(%)는 다음의 식에 의해 계산하였다[13].

$$NSA (\%) = [1 - (A - C)/B] \times 100$$

A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도

C: 시료의 흡광도

항산화 활성평가의 대조구로는 vitamin C (Sigma)를 사용하였으며, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 흑마늘 시료의 radical 소거활성은 각각의 활성화된 anion, cation,

nitrite를 50% 소거하는데 소요되는 시료 농도(RC<sub>50</sub>)를 계산하여 나타내었다.

### 항균 활성 측정

마늘 및 흑마늘 시료의 항균 활성은 기존의 보고된 방법과 동일하게 평가하였다[13]. 항균 활성평가를 위한 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Bacillus subtilis* KCTC 1924를, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, 진균으로는 *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233를 사용하였다. 항세균 활성 평가의 경우, Nutrient broth (Difco, USA)에 각각의 세균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 균주를 O.D.<sub>600</sub> 0.1로 조정하여 Nutrient agar (Difco, USA) 배지를 포함하는 멸균 petri dish (90×15 mm, Green Cross, Korea)에 100 µl 도말하고, 각각의 시료 5 µl를 멸균 disc-paper(지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여, 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 진균 경우에는 Sabouraud dextrose (Difco, USA)를 이용하여 동일한 방법으로 30°C에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[13]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

### 항응고 활성 측정

항응고 활성은 기존에 보고된 방법[2]과 동일하게 혈액응고측정기(Amelung coagulometer KC-1A, Amelung, Lemgo, Germany)를 이용하여 트롬빈 타임(Thrombin Time, TT), 프로트롬빈 타임(Prothrombin Time, PT) 및 에이피티 타임(activated Partial Thromboplastin Time, aPTT)을 측정하여 평가하였다. TT, PT 및 aPTT 측정의 용매대조구로는 DMSO를 사용하였으며, 양성대조구로는 아스피린(Sigma)을 사용하였다. 먼저 TT는 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma) 50 µl와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µl, 다양한 농도의 시료 추출액 10 µl를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 TT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 TT 평균치의 비율로 나타내었다[2, 13]. PT 측정은 혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A의 튜브에

첨가하여 37 °C에서 3분간 가온 후, 130 µl의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 프로트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 PT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 PT 평균치의 비율로 나타내었다[2, 13]. aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 µl의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 35 mM CaCl<sub>2</sub> (65 µl)를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었다. aPTT 연장 활성은 3회 이상 반복한 aPTT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 aPTT 평균치의 비율로 나타내었다[20]. 혈장은 표준혈장(Control plasma, MD Pacific Technology, China)을 구입하여 사용하였으며, PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology, China)의 분석시약을 사용하여 측정하였으며, 기타 시약은 Sigma사(USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 혈소판 응집 저해 활성

항혈전 활성 중 혈소판 응집저해 활성은, 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기저항값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다[7]. 혈소판은 건강한 인간의 혈액을 3.2% sodium citrate 용액과 1:9 (v/v)로 혼합한 후 1,100 rpm에서 10분간 원심분리하여 platelet rich plasma (PRP)를 회수하였으며, 이를 적십자로부터 공급받아 사용하였다. PRP는 기존의 보고[7]와 동일하게 washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 1 nM EDTA, pH 6.5)로 3회 수세하였으며, 최종적으로 suspending buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% gelatin, pH 7.4)에 희석하여 최종 혈소판 농도가 5×10<sup>8</sup> cells/ml 되도록 조정하였다[7]. 혈소판 응집 평가는 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, USA)를 사용해 37°C에서 측정하였다. 즉, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µl, suspending buffer 147.5 µl, 시료 5 µl가 포함된 반응 cuvette에 혈소판 50 µl을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 µl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under curve를 측정하여 평가하였으며[7]. 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집정도를 나타내며, slope는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 나타내며, area under curve는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는

것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다[27]. 시료의 혈소판 응집저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under curve 값의 비로 나타내었다.

### 인간 적혈구 용혈 활성 평가

제조된 마늘 및 흑마늘 시료의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100  $\mu$ l를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100  $\mu$ l를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu$ l를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다[20]. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 적혈구 용혈을 위한 실험 대조구로는 Triton X-100 (1 mg/ml)를 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ Hemolysis} = [(Abs. S - Abs. C) / (Abs. T - Abs. C)] \times 100$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도

Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도

Abs. T: Triton X-100 첨가구의 흡광도.

### 기타 분석

추출물 및 분획물의 총 flavonoid의 함량 측정은 기존의 보고[25]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 methanol 교반 추출하고 여과한 추출검액 400  $\mu$ l에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin (Sigma, USA)을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 추출검액 400  $\mu$ l에 50  $\mu$ l의 folin-ciocalteau, 100  $\mu$ l의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[25]. 표준시약으로는 tannic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 총 당 정

량의 경우에는 phenol-sulfuric acid 법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 법을 이용하였다[29]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 생마늘 및 흑마늘의 추출물 조제 및 성분 비교

마늘 추출물을 조제하기 위해 생마늘은 상온 추출, 흑마늘은 열수 추출하였다. 생마늘의 경우 이열성 성분의 파괴를 막기 위해 상온 추출하였으며, 흑마늘의 경우 최적 추출조건으로 보고된 90°C [10]에서 추출하였다. 생마늘 및 흑마늘의 추출효율은 각각 10.1% 및 40.6%로 나타난 바(Table 1), 이는 추출조건의 차이 뿐만 아니라, 흑마늘의 장기간의 고온 숙성과정 중 마늘 물성의 변화, 마늘 성분의 구조적 변화, 수분감소에 따른 상대적인 성분 농축 등에 기인하는 것으로 추측된다[5, 24]. 각각의 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 당 및 환원당 함량을 측정한 결과, 흑마늘 추출물이 생마늘 추출물보다 총 폴리페놀은 4배, 총 플라보노이드 함량은 1.56배 높게 나타났으며, 총 당 및 환원당은 각각 3.36배 및 6.75배 높게 나타났다. 이러한 결과는 흑마늘이 생마늘보다 총 폴리페놀은 1.9배, 총 플라보노이드는 2.6배 증가하였다는 Shin 등의 기존 보고[22]보다는 높은 증가를 나타내었으나, 총 폴리페놀은 16배, 총 플라보노이드는 7배 증가하였다는 Kwon 등의 보고[16]보다는 낮은 증가였다. 따라서 흑마늘을 제조하는 고온 숙성과정 중 마늘로부터 다양한 성분의 추출이 용이해지고, 당 분해효소의 활성 및 페놀성 화합물의 생성이 증대되어 폴리페놀 성분 및 환원당의 급격한 증가가 나타남을 확인하였다. 한편 흑마늘의 순차적 용매 분획물은 대부분이 butanol 분획 및 물 잔류물로 나타났으며, hexane 및 ethylacetate 분획은 흑마늘 추출물의 0.18% 및 0.64%로 나타나, 흑마늘 추출물의 대부분은 수용성 성분임을 알 수 있었다(Table 1). 분획물 중에서는 ethylacetate 분획에서 77.67 mg/g 및 39.74 mg/g의 높은 함량의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 나타낸 반면, 나머지 분획물

**Table 1. Components analysis of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic.**

Samples	Extraction or fraction yield (%)	Content (mg/g)				
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar	
Raw-garlic	Water extract	10.1	1.25 ± 0.13	2.55 ± 0.12	146.11 ± 13.00	41.79 ± 1.37
Black garlic	Water extract	40.6	1.95 ± 0.08	10.23 ± 0.19	491.57 ± 2.32	282.49 ± 11.59
	Hexane fr. <sup>a</sup>	0.18	1.81 ± 0.17	7.92 ± 0.11	336.98 ± 9.27	205.31 ± 4.09
	Ethylacetate fr.	0.64	39.74 ± 2.97	77.67 ± 0.05	320.81 ± 1.24	233.28 ± 5.46
	Butanol fr.	31.28	1.73 ± 0.11	11.62 ± 0.45	704.51 ± 2.16	333.11 ± 6.14
	Water residue	65.01	3.23 ± 0.03	11.15 ± 0.45	475.73 ± 8.46	302.00 ± 5.12

<sup>a</sup>fr: fraction. Values are means ± standard deviation of triplicate determinations.

들은 7.9-11.6 mg/g 및 1.73-3.23 mg/g의 상대적으로 낮은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

### 흑마늘 추출물 및 분획물의 항혈전 활성

생마늘과 흑마늘의 항산화 활성을 비교하였으며 그 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. 흑마늘은 DPPH 음이온에 대한 소거능은 생마늘보다 미약하였으나, ABTS 양이온 소거

능 및 nitrite 소거능은 생마늘보다 우수하였다. 특히 nitrite 소거능이 발암억제와 관련[18]됨을 고려할 때 흑마늘이 생마늘보다 발암억제 효능은 더욱 우수하리라 판단된다[6, 30]. 흑마늘의 순차적 분획물의 항산화능을 측정한 결과, 가장 강력한 활성은 ethylacetate 분획에서 나타났으며, DPPH 음이온, ABTS 양이온 및 nitrite 소거능의  $RC_{50}$ 은 각각 vitamin C가 나타내는  $RC_{50}$ 의 1/22, 1/22 및 1/4.5로 나타났다.

한편 흑마늘 추출물 및 분획물의 항세균 및 항진균 활성을 생마늘 추출물과 비교한 결과는 Table 3에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 ampicillin과 miconazole은 각각 우수한 항세균 및 항진균 활성을 나타내었다. 생마늘 추출물은 기존의 보고[14]와 유사하게 실험에 사용한 세균 및 진균에 모두 광범위한 항균 활성은 나타내었다. 그러나 흑마늘 추출물은 항균 활성이 나타나지 않았으며, 분획물 중 ethylacetate 분획은 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus subtilis*에 한해 약한 항세균 활성을 나타내었다. 따라서 생마늘의 흑마늘 제조과정 중 휘발, 소실 및 분해되는 물질에 의해 항균 활성이 나타남을 알 수 있었다.

**Table 2. The radical scavenging activities ( $RC_{50}$ s) of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic.**

Samples/Chemicals	Radical scavenging activity: $RC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)		
	DPPH	ABTS	Nitrite
Raw-garlic Water extract	770.5	1123.5	205.5
Black garlic Water extract	1299.8	961.3	115.8
Hexane fr. <sup>a</sup>	>4,000	1421.7	NA <sup>b</sup>
Ethylacetate fr.	280.4	116.3	73.5
Butanol fr.	2334	1081.5	NA <sup>b</sup>
Water residue	>4000	1463.4	437.7
Vitamin C	10.8	5.28	16.1

<sup>a</sup>fr: fraction.

<sup>b</sup>NA: No activity.

$RC_{50}$ : The concentration required for 50% scavenging against particular free radical species.

### 흑마늘 추출물 및 분획물의 항혈전 활성

생마늘 및 흑마늘 추출물의 항혈전 활성은 혈액응고 저해 활성과 혈소판 응집저해 활성을 측정하여 평가하였다. 혈액응고 저해활성 측정결과는 Table 4에 나타내었으며, 용매 대

**Table 3. Antimicrobial activity of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic against pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi.**

Samples/Chemicals	Growth inhibition zone (mm)									
	Gram positive			Gram negative				Fungi		
	SA <sup>a</sup>	SE	LM	BS	EC	PA	PV	ST	CA	SC
Raw-garlic Water extract	23.0	18.5	9.0	25.5	12.0	8.5	19.0	29.0	17.5	19.0
Black garlic Water extract	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexane fr. <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethylacetate fr.	11.0	-	-	8.0	-	-	-	-	-	-
Butanol fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water residue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	21.0	20.5	15.0	23.5	9.5	11.5	29.0	21.0	-	-
Miconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	12.0	15.0

<sup>a</sup>SA: *Staphylococcus aureus*, SE: *Staphylococcus epidermidis*, LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella typhimurium*, CA: *Candida albicans*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*.

<sup>b</sup>-: No inhibition.

<sup>c</sup>fr: fraction.

<sup>d</sup>ND: Not determined.

The concentrations of the extracts and antibiotics used were 0.5 mg/disc and 1  $\mu$ g/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a classical result of three independent determinations.

조구인 DMSO의 TT, PT, aPTT 응고시간은 각각 24.0 ± 0.18초, 18.6 ± 0.17초 및 40.5 ± 0.86초로 나타났다. 먼저 임상에서 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린(양성 대조구)은 1.5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 무첨가구에 비해 각각 1.9배, 1.7배 및 1.9배 연장시켜 우수한 항혈전 활성을 나타냄을 확인하였다. 생마늘 추출물 역시 5.0 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 무첨가구에 비해 각각 1.5배, 1.1배 및 1.3배 연장시켜 우수한 트롬빈 저해(TT 시간 연장) 및 혈액응고인자 저해(aPTT 시간 연장)를 통한 항혈전 활성을 확인하였다. 그러나 흑마늘 추출물에서는 5.0 mg/ml 농도에서 무첨가구

에 비해 거의 혈전생성 시간의 변화가 나타나지 않아 항혈전 활성이 인정되지 않았으며, 흑마늘 추출물의 분획물에서도 ethylacetate 분획을 제외하고 나머지 분획물에서는 항혈전 활성은 인정되지 않았다. Ethylacetate 분획은 4.4배 연장된 PT 결과와 같이 트롬빈보다 프로트롬빈에 대한 저해활성이 강력하였으며, 특히 15배 이상 연장된 aPTT 결과와 같이 혈액응고인자 저해활성이 매우 강력함을 확인하였다(Table 4). 이와 같은 흑마늘 ethylacetate 분획의 강력한 혈액응고 저해는 일반적인 한약재[20], 해조류[2], 체리[3] 보다 우수한 활성으로, 한방에서 혈행개선 약재로 사용되고 있는 사인, 계혈등, 오배자 등과 유사한 항혈전 활성이다[20]. 따라서 흑마늘 열수 추출물의 ethylacetate 분획은 향후 활성물질의 정제와 함께 항혈전제로 개발 가능하리라 판단된다.

**Table 4. Anticoagulation activity of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic.**

Samples/Chemicals (mg/ml)	Anticoagulation activity (×control)		
	TT	PT	aPTT
DMSO	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Aspirin (1.5)	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Raw-garlic (5.0)	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0
Black garlic Water extract (5.0)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0
Hexane fr. <sup>a</sup>	0.9 ± 0.1	ND <sup>b</sup>	ND
Ethylacetate fr.	1.2 ± 0.1	4.4 ± 0.2	>15
Butanol fr.	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0
Water residue	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0

<sup>a</sup>fr: fraction.

<sup>b</sup>ND: Not determined.

TT: Thrombin Time, PT: Prothrombin Time, aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time.

한편 흑마늘의 혈소판 응집 저해를 평가하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타내었다. 먼저 아스피린은 농도 의존적으로 인간 혈소판 응집을 저해하였으며, 0.25 mg/ml 농도에서 혈소판 응집도는 무첨가구에 비해 46.6%를 나타내었다. 생마늘 추출물 역시 농도 의존적으로 강력한 응집저해를 나타내었으며, 특히 0.08 mg/ml 농도에서도 무첨가구의 16.4%, 0.16 mg/ml 농도에서 무첨가구의 10.8%의 혈소판 응집도를 나타내었다. 그러나 흑마늘 추출물(0.25 mg/ml)은 혈소판 응집저해 활성이 나타나지 않았으며, 분획물 중에서는 ethylacetate 분획(0.25 mg/ml)에서 39.1%의 혈소판 응집, butanol 분획(0.25 mg/ml)에서 66.7%의 응집이 나타나, ethylacetate 분획이 강력한 혈소판 응집저해활성을 가짐을 알 수 있었다. 상기의 결과는, 비록 흑마늘 추출물은 항혈전 활성이 미약하나, 흑마늘 추출물의 ethylacetate 분획은 프

**Table 5. Platelet aggregation activity of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic.**

Samples/Chemicals (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope (ohm/min)	Lag time (sec)	Area under	PAA <sup>a</sup> (%)
DMSO	18	4	52	132.1	100.0
Aspirin (0.5)	5	1	96	26.6	20.1
Aspirin (0.25)	10	2	38	61.6	46.6
Raw-garlic Water extract (0.64)	2	0	132	9.5	4.2
Water extract (0.32)	2	0	56	18.8	8.3
Water extract (0.16)	4	1	54	24.4	10.8
Water extract (0.08)	5	1	42	37.1	16.4
Black garlic Water extract (0.25)	22	4	43	154.2	116.7
Ethylacetate fr. <sup>b</sup> (0.25)	8	1	54	51.7	39.1
Ethylacetate fr. (0.12)	12	2	52	76.0	57.5
Butanol fr. (0.25)	13	2	56	88.1	66.7
Water residue (0.25)	22	4	23	161.0	121.9

<sup>a</sup>PAA: Platelet Aggregation Activity.

<sup>b</sup>fr: fraction.

**Table 6. Hemolytic activities of the extracts and organic solvent fractions of raw- and black-garlic against human red blood cell.**

Samples/Chemicals (mg/ml)	Hemolysis against human RBC (%)
DMSO	0.0 ± 1.9
Triton X-100 (1.0%)	99.9 ± 0.7
Raw-garlic (5.0)	-2.4 ± 0.9
Black garlic (5.0)	
Water extract	2.5 ± 0.3
Hexane fr. <sup>a</sup>	0.5 ± 1.4
Ethylacetate fr.	-0.5 ± 0.4
Butanol fr.	1.8 ± 0.7
Water residue	2.4 ± 0.4

<sup>a</sup>fr: fraction.

로트롬빈, 혈액응고인자 및 혈소판 응집을 저해하여 우수한 항혈전제로 이용 가능성을 제시하고 있다.

#### 흑마늘 추출물 및 분획물의 인간 적혈구 용혈활성

흑마늘 추출물 및 분획물의 실제적 이용가능성을 검토하기 위해 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가하였다. 먼저 triton X-100 (1 mg/ml)은 99.9% 이상의 용혈활성을 나타내었으며, 용매 대조구로 사용된 DMSO (2%)는 용혈활성을 나타내지 않았다(Table 6). 생마늘 및 흑마늘의 추출물과 이의 분획물들은 5 mg/ml 농도까지 용혈활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과는, 흑마늘의 가열숙성과정 중에 다양한 폴리페놀 성분 및 환원당의 급격한 증가와 함께, 항산화 활성 및 항혈전 활성물질의 증가가 나타남을 제시하며, 특히 흑마늘 물 추출물의 ethylacetate 분획물은 강력한 항산화 및 항혈전 활성을 나타내어 향후 기능성 식의약품 소재로 개발 가능성을 제시하고 있다.

#### 요 약

흑마늘을 이용한 식의약품 기능성 소재 개발 연구의 일환으로, 생마늘과 흑마늘 추출물을 조제하여 항산화, 항균, 항혈전 활성을 비교하였으며, 이후 흑마늘 추출물의 순차적 용매 분획물을 조제하여 활성분획을 확인하고자 하였다. 흑마늘의 열수 추출효율은 40.6%로 생마늘의 4배의 효율을 나타내었으며, 고온 숙성과정을 통해 생마늘보다 총 폴리페놀은 4배, 총 플라보노이드 함량은 1.56배, 총 당 및 환원당은 각각 3.36배 및 6.75배 증가되었다. 항산화 활성 평가 결과, 흑마늘 추출물은 DPPH 음이온에 대한 소거능은 생마늘 추출물보다 미약하였으나, ABTS 양이온 소거능 및 nitrite 소거능은 생마늘 추출물보다 우수하였다. 특히 흑마늘 추출물의

ethylacetate 분획은 매우 강력한 항산화 활성을 나타내었다. 흑마늘 추출물은 생마늘 추출물에 비해 항균 및 항혈전 활성을 상실한 반면, 흑마늘 추출물의 ethylacetate 분획은 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus subtilis*에 대한 항세균 활성과 프로트롬빈, 혈액응고인자 저해, 인간 혈소판 응집저해를 나타내어 강력한 항혈전 활성을 확인하였다. 흑마늘 열수 추출물 및 분획물은 적혈구 용혈활성은 나타나지 않았다. 본 연구결과는 흑마늘 추출물의 ethylacetate 분획이 향후 항혈전 활성을 위한 기능성 식의약품 소재로 개발 가능성을 제시하고 있다.

#### Acknowledgments

This research was supported by 2012-ANU Industry & Academy Research Funding.

#### References

- Abel-Salam BK. 2012. Immunomodulatory effects of black seeds and garlic on alloxan-induced diabetes in albino rat. *Allergol. Immunopathol.* **40**: 336-340.
- Ahn SM, Hong YK, Kwon KS, Sohn HY. 2010. Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 35 different seaweed extracts. *J. Life Sci.* **20**: 1640-1647.
- Ahn SM, Ryu HY, Kang DK, Jung IC, Sohn HY. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prinus avium* L. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 371-376.
- Aminuddin M, Partadiredja G, Sari DC. 2014. The effects of black garlic (*Allium sativum* L.) ethanol extract on the estimated total number of purkinje cells and motor coordination of male adolescent wistar rats treated with monosodium glutamate. *Anat. Sci. Int.* DOI 10.1007/s12565-014-0233-2.
- 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.
- Dong M, Yang G, Liu H, Liu X, Lin S, Sun D, et al. 2014. Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed. Rep.* **2**: 250-254.
- Hwang HJ, Kang MS, Kim BK, Jung BM, Kim MH. 2012. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* **22**: 1680-1687.
- Jeon SY, Beak JH, Joeng EJ, Cha YJ. 2012. Volatile flavor compounds in commercial black garlic extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 116-122.
- Jeong TS, Kim JH, An SA, Won YD, Lee SH. 2013. Effect of black garlic on antioxidant and amino acids composition in cheonggukjang. *Korean J. Food Preserv.* **20**: 643-649.
- Kang JR, Lee SJ, Kwon HJ, Kwon MH, Sung NJ. 2012. Establishment of extraction conditions for the optimization of the black garlic antioxidant activity using the response surface

- methodology. *Korean J. Food Preserv.* **19**: 577-585.
11. Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ, Shin JH. 2013. The effect of extract powder from fresh and black garlic on main components in serum and organs of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* **23**: 432-442.
  12. Kang MJ, Shin JH. 2012. The effect of black garlic extract on lipid metabolism in restraint stressed rats. *J. Life Sci.* **22**: 1529-1537.
  13. Kim JI, Jang HS, Kim JS, Sohn HY. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant Activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J. Microbiol Biotechnol.* **37**: 113-139.
  14. Kim KJ, Do JR, Kim HK. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. *Korea J. Food Sci. Technol.* **37**: 228-232.
  15. Kwon JE, Baek UH, Jung IC, Sohn HY. 2010. Biological activity of fresh juice of wild garlic, *Allium victorialis* L. *Korea J. Food Sci. Technol.* **17**: 541-546.
  16. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic on the high temperature and pressure treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 331-336.
  17. Lee HS, Kim SH. 2010. Safety evaluation of black garlic extract for development of cosmeceutical ingredients – skin irritation and sensitization studies. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1213-1219.
  18. Park C, Park S, Chung YH, Kim GY, Choi YW, Kim BW, et al. 2014. Induction of apoptosis by a hexane extract of aged black garlic in the human leukemic U937 cells. *Nutr. Res. Pract.* **8**: 132-137.
  19. Purev U, Chung MJ, Oh DH. 2012. Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **34**: 651-660.
  20. Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Sohn HY. 2010. Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J. Life Sci.* **20**: 922-928.
  21. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Ryu EJ, et al. 2013. Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *J. Life Sci.* **23**: 63-68.
  22. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Kim JG, Sung NJ. 2008. Changes of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing. *J. Life Sci.* **18**: 1123-1131.
  23. Shin JH, Lee CW, Oh SJ, Yun J, Kang MR, Han SB, et al. 2014. Hepatoprotective effect of aged black garlic extract in rodents. *Toxicol. Res.* **30**: 49-54.
  24. 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.
  25. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocaleau reagent. *Meth. Enzymol.* **299**: 152-178.
  26. Sumioka I, Hayama M, Shimokawa Y, Shiraishi S, Tokunaga A. 2006. Lipid-lowering effect of monascus garlic fermented extract (MGFE) in hyperlipidemic subjects. *Hiroshima J. Med. Sci.* **55**: 59-64.
  27. Sweeney JD, Hoerning LA, Behrens AN, Novak E, Swank RT. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of *in-vitro* hypersensitivity to ristocetin. *Am. J. Clin. Path.* **93**: 522-525.
  28. Tak HM, Kim GM, Kim JS, Hwang CR, Kang MJ, Shin JH. 2014. Quality characteristics and biological activity of fermented black garlic with probiotics. *J. Life Sci.* **24**: 549-557.
  29. Valentina U, Facic J, Stampar F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**: 185-192.
  30. Wang X, Jiao F, Wang QW, Wang J, Yang K, Hu RR, et al. 2012. Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth *in-vitro* and *in vivo*. *Mol. Med. Rep.* **5**: 66-72.
  31. Yang SM, Kang MJ, Kim SH, Shin JH, Sung NJ. 2010. Quality characteristics of functional muffins containing black garlic extract powder. *Korean J. Food Cookery Sci.* **26**: 737-744.
  32. Yang SM, Shin JH, Kang MJ, Sung NJ. 2011. Quality characteristics of pork ham containing different amounts of black garlic extracts. *Korean J. Food Preserv.* **18**: 349-357.
  33. Yoo JM, Sok DE, Kim MR. 2014. Antiallergic action of aged black garlic extract in RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J. Med Food* **17**: 92-102.