

GOVP1200622023

T0009026

최 중
연구보고서

마쇄 마늘 녹변 물질 분리 및
구명에 관한 연구

Isolation and Characterization of Green
Pigment in Crushed Garlic

서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**마쇄 마늘 녹변물질 분리 및 구명에 관한 연구**”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5월 24일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 이 승 구
세부연구책임자 : 이 승 구
세부연구책임자 : 배 로 나
연 구 원 : 엄 향 란
연 구 원 : 조 정 은
연 구 원 : 박 병 성
연 구 원 : 최 창 수
연 구 원 : 이 원 희

요 약 문

I. 제 목

마쇄 마늘 녹변물질 분리 및 구명에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 생활환경의 변화와 더불어 편리하게 바로 이용하거나 먹을 수 있는 채소에 대한 선호도가 증가함에 따라 상당량의 신선 농산물이 가공된 형태로 유통되고 있다. 마늘 또한 과거 통마늘 위주에서 박피 마늘, 마쇄 마늘 등의 다양한 형태로 유통되고 있다. 녹변(greening) 현상은 마쇄 마늘에서만 발생하는 현상으로 마늘 저장, 가공, 유통 시 가장 문제가 되고 있고, 시각적으로도 거부감을 불러일으켜 소비자들의 마늘 이용을 기피하게 한다.

녹변 현상은 작용 기작이 거의 밝혀지지 않고 있으며 유기산, 열처리 등을 통한 단순한 억제책만이 단편적으로 연구되었을 뿐이다. 본 연구 기관은 지난 몇 년간 녹변 현상 원인 구명에 관한 연구를 수행하여 어느 정도 그 원인을 구명하는데 성공하였다. 녹변 현상은 3달 이상 10°C 이하의 저온 저장된 마늘에서 나타나는 생리 현상 또는 장해 현상의 하나로 향미 성분 전구체, 글라이신, 포름알데하이드와의 반응에 의하여 발생한다는 잠정적 결론을 얻었다. 하지만 현재 재배 생산된 마늘의 80% 이상이 저온 저장 후 출하되는 현실을 감안할 때 녹변을 방지하는 수확 후 처리 기술을 적용하는데 한계가 있는 것이 사실이다.

따라서 본 연구의 목적은 녹변 마늘에서 나타나는 녹색물질을 순수하게 분리하여 동정함으로써 마쇄 마늘의 녹변 문제를 근본적으로 해결하고, 더 나아가 녹변을 야기하지 않는 가공, 유통 기술을 개발하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

6개월 이상 0°C에서 장기 저장한 마늘에서 나타나는 녹색물질을 분리하여 구명하고, 녹변 현상을 억제하기 위한 여러 가지 처리를 하였다. 우리나라 마늘 주요 재배지에서 생산된 대서마늘, 남해마늘, 육쪽마늘을 6개월 이상 0, 5, 10, 15, 20°C에서 저장하여 녹변 현상 발생 여부를 관찰하였다. 녹변물질의 순수 분리 방법을 확립을 위해 Amberlite XAD-16과 Sephadex LH-20 resin을 이용한 column chromatography를 이용하였고, HPLC를 통해 최종 분리 하였다. 6개월 이상 0°C에서 장기 저장한 마늘에서 녹색물질을 순수 분리하여 여러 종류의 질량분석기(LC-ESI/MS, FAB/MS, MALDI-TOF/MS)를 통해 분자량을 확인하였으며, 핵자기공명(NMR)을 이용하여 구조식을 확인하였다. 녹변 물질 형성에 사용되는 예상 물질인 향미성분 전구체, 글라이신과 포름알데하이드를 혼합하여 녹변물질을 합성하였다. 녹변 현상 억제를 위해 citric acid, malic acid, acetic acid 등의 유기산과 cysteine, ascorbic acid 등의 화학제를 처리하여 효과를 알아보았으며, 40, 50°에서 열처리를 실시하였다. 양파에 있는 LF synthase에 의해 thiosulfinate의 형성이 억제되고 propanthial-S-oxide가 형성되어 녹색물질 전구체 생성이 줄어든다는 점에 착안해 양파 파우더 처리를 실시하여 녹변 현상 억제 효과를 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 품종, 저장온도, 저장기간에 따른 녹변 발생 유무

본 연구 결과 3개월 이상 10°C 이하의 저온에서 저장된 마늘에서는 품종과 재배지역에 상관없이 녹변이 발생하였다. 녹변의 발생 정도는 저장온도가 낮아질수록, 저장기간이 길어질수록 심하였다. 한지형 마늘에서 주로 녹변이 나타난다고 알려져 있었으나, 난지형인 대서마늘과 남해마늘에서도 녹변이 관찰되었으며 남해마늘에서 가장 약하게 나타났다. 또한 녹변은 재배 중 수분 공급이 많은 논마늘에서 주로 발생된다고 알려져 있으나, 본 연구에서는 밭과 논재배에 관계없이 녹변이 발생되었으며 그 정도도 비슷하였다.

2. 녹색물질 분리 및 구명

마쇄마늘을 100% 메탄올을 이용하여 추출한 후 감압 농축시킨 후 남은 잔여물에 에탄올을 첨가하여 단백질 등의 hydrocolloids 성분을 응고시켜 제거한 후 다시 감압 농축시켜 crude한 상태의 녹색물질을 얻었다. Amberlite XAD-16, Sephadex LH-20 resin으로 충전된 오픈 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 최종적으로 하부의 녹색층만을 획득하여 분자량 및 구조식을 위한 시료로 이용하였다. 녹색물질은 440과 590nm 두 파장에서 흡광도를 나타내는 물질로서 상온에 일정 기간 두면 노란색으로 변하는 성질을 나타낸다.

녹색물질의 분자량은 LC-ESI/MS, FAB/MS, MALDI-TOF/MS 등의 다양한 질량분석기를 통한 분석 결과 411[M+H⁺=412]로 최종 확인되었다. 녹색물질의 구조를 동정하고자 ¹³C, ¹H, DEPT135, COSY, TOCSY, HMBC, HMQC 등의 핵자기공명(NMR), FT-IR 등의 여러 가지 구조 분석기기를 이용하였다. 녹색물질은 25에서 30개의 탄소(C), 1 또는 3개의 산소(O), 1 또는 3개의 질소(N), 그리고 1개의 황(S)을 각각 포함하는 것으로 조사되었다. 분자구조를 정확하게 동정하지는 못했으나, 벤젠고리를 포함한 세 개의 주요 fragments들이 녹색물질의 분자구조를 이루고 있음을 확인하였다.

3. 녹변현상 억제

녹변현상을 억제하기 위하여 화학제, 열처리 등을 실시하였으며, 양파 파우더를 처리하였다. 유기산 등의 화학제는 녹변 억제에 큰 효과를 보이지 못했으며, 산으로 인한 맛의 변질이 나타났으며, ascorbic acid 4%와 cysteine 1.25% 처리 시 녹변을 방지할 수 있었다. 열처리는 40°C에서 24시간 처리구에서 억제 효과가 있었으며 cysteine과 복합 처리 시 효과가 더 좋았다. 하지만 ascorbic acid과 복합 처리 시 갈변이 나타나 오히려 품질이 저하되었다. 양파 파우더 처리를 통하여 녹변을 효과적으로 억제할 수 있었다. 마늘에 양파 파우더를 처리하면 1-PeCSO와 alliinase의 반응 결과 생성된 sulfenic acid가 LF synthase와 반응하여 thiosulfinate 형성을 억제하므로 결과적으로 녹색 색소 형성에 필요한 전구체를 형성하지 못하고 녹색 색소도 형성되지 못한다. 양파 파우더의 LF synthase에 의해 마늘 녹변이 억제되므로 열풍건조가 아닌 동결건조된 파우더로만

효과를 볼 수 있었으며, 1.5% 처리 시 가장 효과가 좋았다.

SUMMARY

Characterization of Green Pigment and Prevention of Green Discoloration in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.)

1. Characterization of Green Pigments Isolated from Crushed Garlic (*Allium sativum* L.)

Unknown green pigments, responsible for greening in crushed garlic, were purified using a series of column chromatography and identified using liquid chromatography-electrospray ionization (LC-ESI), matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), and magnetic nuclear resonance (NMR) spectroscopy (C^{13} , DEPT135, COSY, TOCSY, HMBC, HMQC).

Green pigments extracted from crushed garlic showed two maxima of absorbance at 440 and 590 nm. LC-ESI and MALDI-TOF MS suggested that molecular weight (MW) of green pigment. Molecular ion having a peak at m/z 412 was found to be a compound that results in greening and its MW was 411. However, the structure of isolated compound was not elucidated perfectly. The complete isolation of MW 411 compound for proper structure elucidation was not achieved under the chromatographic conditions examined. It consisted of one sulfur atom and one or three nitrogen atoms, and 25 to 30 carbon atoms. MW 411 was finally concluded to be water soluble compound that contains sulfur and nitrogen atoms, which is significantly different from all the green pigments previously reported in plant.

The presence of methylene and methyl and carbonyl group, alcoholic carbons, and an aromatic ring in MW 411 could be obtained from C^{13} spectrum of NMR spectroscopy. The observed values for an aromatic ring were 137.6, 130.0, 126.2, and 128.2 ppm, which indicate that these substituents are related to aromatic ring in meta position. In DEPT 135 spectrum, methane and methyl carbons give rise to

positive peaks, while methylene carbons appear as inverse peaks. The methylene carbons produce the inverted peaks: carbon 3 appears at 39.1 ppm and carbon 5 appears at 59.1 ppm. The carbonyl carbon does not appear in the DEPT135 spectrum since it has no attached hydrogen atoms.

2. Prevention of Greening in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.) by Treatments

The storage quality of crushed garlic with organic acids, antioxidant, salts, cysteines, and thermal treatments was investigated. Quality attributes of processed garlic were evaluated in terms of color, pH, flavor, pyruvic acid, sugar content, microbial examination. Overall, the treatments with ascorbic acid (6%) or cysteine (1.25%) showed the best storage stability in crushed garlic. Thermal treatments were achieved at 40 or 50°C for 24 h and combined with ascorbic acid (2%) or cysteine (0.5%). While thermal treatments were effective in preventing discoloration, some browning showed in high temperature treatment over 50°C, especially in the combination treatment with ascorbic acid.

Pyruvic acid content, a degradation product of alliin, was decreased as the heating temperature was raised. Pyruvic acid content displayed a positive correlation between the amount of pyruvic acid and greening in crushed garlic. Free sugars, such as fructose, and sucrose were not affected by heat treatment, but fructan was decreased by thermal treatments. Volatile compounds of garlic were decreased by thermal treatment, and increased by cysteine, respectively. However, there was no significant difference in component of materials; only composition of materials was different between treatments. In microbial examination, microbial inactivation was observed when ascorbic acid or cysteine was added in crushed garlic, due to the lower pH. However, the total viable cells were increased in thermal treatments, slightly.

CONTENTS

I. Introduction	12
1. Objectives	12
2. Goals and Scope	12
2.1 Greening development by cultivar, storage temperature, and storage period	13
2.2 Effect of transfer and deep freezing in color development	14
2.3 Isolation and structure identification of green pigment in crushed garlic cloves	14
2.4 Antifungal activity test of greening garlic	14
2.5 Post-harvest treatment for inhibition of greening	15
II. Current Development of Relates Technology	16
1. Current development of relates technology in Korea	16
2. Current development of relates technology in foreign country	16
III. Research Data:	
approaches, results, and discussion	18
1. Greening development by cultivar, storage temperature, and storage period	18
2. Effect of transfer and deep freezing in color development	23
3. Isolation and structure identification of green pigment in crushed garlic cloves	26
4. Antifungal activity test of greening garlic	44
5. Post-harvest treatment to inhibition of greening	47
IV. Achievement Evaluation	66

V. Practical Application of the Results	71
VI. Scientific Information Collected through the Project	75
VII. Literature Cited	76

목 차

제 1장 연구개발 과제의 개요	12
제 1절 연구개발의 필요성	12
제 2절 연구개발 목표 및 범위	13
1. 품종, 저장온도, 저장기간에 따른 녹변 발생	13
2. 변온 및 초저온 처리가 녹변에 미치는 영향	14
3. 마쇄마늘 녹색물질 분리 및 구멍	14
4. 녹변마늘 항균력 실험	14
5. 마쇄마늘 녹변 방지 기술	15
제 2장 국내외 기술개발 현황	16
제 1절 국내 기술개발 현황	16
제 2절 국외 기술개발 현황	16
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과	18
제 1절 품종, 저장온도, 저장기간에 따른 녹변 발생	18
제 2절 변온 및 초저온 처리가 녹변에 미치는 영향	23
제 3절 마쇄마늘 녹색물질 분리 및 구멍	26
제 4절 녹변마늘 항균력 실험	44
제 5절 마쇄마늘 녹변 방지 기술	47
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	66
제 1절 목표달성도	66
제 2절 관련분야에의 기여도	70
제 5장 연구개발 결과의 활용계획	71
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	75

제 7장 참고문헌 76

제 1장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

녹변(greening)현상은 마쇄마늘 유통 및 판매 시 나타나는 현상 중 하나로서 소비자들로 하여금 마늘 이용을 기피하게 만든다. 저온 저장 마늘을 가공품으로 제조 시 주로 발생하는데 영양학적인 면에서는 문제가 되지 않으나 시각적 측면에서 갈변과 함께 문제점으로 대두되고 있다. 본 연구기관에서는 마쇄 마늘 녹변에 대해 연구를 수행한바 어느 정도 그 원인을 구명하는데 성공해서 녹변 현상은 3달 이상 장기간 저온 저장된 마늘에서 나타나는 생리 현상 또는 장해 현상의 하나로 잠정적 결론을 내렸다. 현재 마늘의 저장, 유통 형태를 살펴보면 5-6월에 수확하여 이듬해 수확 전까지 장기 저장하는 형태로, 재배 생산된 마늘의 80% 이상이 저장 후 출하되기 때문에 장기 저장을 위해서 저온 저장은 불가피한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 녹변 마늘에서 나타나는 녹색물질을 순수 분리하여 동정함으로써 마쇄 마늘 녹변 문제를 근본적으로 해결하고, 더 나아가 녹변을 야기 하지 않는 가공, 유통 기술을 개발하는데 이용하고자 한다. 또한 녹변 현상 방지 기술을 개발하여 녹변 발생으로 인한 경제적 손실을 막고, 시각적인 문제를 해소하고자 한다.

1. 기술적 측면

현재 가공 시 마쇄 마늘의 녹변을 방지하는 기술은 열풍처리 및 화학 첨가제를 이용하여 pH를 조절하는 처리를 함으로써 변색되지 않은 상태로 장시간 저장하고 있다. 그러나 근래 화학적 처리에 의해 pH를 조절하는 기술에 대해서는 건강상의 이유로 소비자가 사용을 꺼리며, 산에 의해 맛과 향기가 변질될 수 있다. 또한 열처리는 열에 의해 품질이 손상되고 효과가 균일하지 못하며 대규모 처리 시 변색 억제가 어렵다. 더 나아가 이러한 pH를 조절하는 화학적 처리나 열처리 시 녹변의 완전 제어가 힘들다. 따라서 미지의 녹색물질 자체를 구명하는 기술 개발은 녹변 방지 기술보다 근본적이고 직접적인 해결책을 줄 것으로 기대할 수 있다. 또한 녹변 마늘에서 분리된 녹색 색소는 이미 식물체에서 알려진 녹색 색소인 엽록소와는 상이한 물질로 마쇄 마늘의 녹색물질 동

정은 새로운 물질 탐색의 결과로 이어질 가능성이 있다.

2. 경제, 산업적 측면

녹변은 마늘을 저장, 가공, 유통, 판매하는 농업인이나 기업인들에게 현장 애로 사항으로 문제 시 되고 있다. 마쇄 마늘 녹변을 연구한 지난 몇 년간 이와 직접적으로 관련된 식품 업체나 농민들이 마늘 녹변 문제를 해결하고자 노력을 하는 것을 직접 확인하였다. 실제적으로 한 유통업체의 경우 가공 후 시장에 출하된 마쇄 마늘 제품 중 녹변 마늘이 발견 시 전량 수거하는 방법으로 해결하고 있으며, 이로 인한 경제적 손실이 막대한 실정이다. 마늘 녹변에 대한 소비자들의 인식 또한 과다한 농약 처리로 인한 것이라는 잘못된 인식이 자리 잡고 있어 이에 대한 개선이 시급하다. 따라서 녹색물질 구멍을 통해 녹변 마늘에 대한 소비자들의 인식을 달리할 수 있으며, 녹변 마늘 이용 기피 현상을 해결할 수 있다.

3. 사회, 문화적 측면

소비자들의 건강한 식생활을 위해 안전한 농산물을 공급하고, 가공 마늘의 품질적인 면에서 세계적인 경쟁력을 갖출 수 있다.

제 2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 품종, 저장온도, 저장기간에 따른 녹변 발생

가. 연구 목표

마늘의 품종별로 저장온도, 저장기간을 달리하여 녹변 발생 여부를 확인하여 녹변의 원인을 파악한다.

나. 연구 범위

- 1) 마늘의 품종: 대서마늘, 남도마늘, 육쪽마늘
- 2) 저장온도: 0, 5, 10, 15, 20°C
- 3) 저장기간: 6개월

2. 변온 및 초저온 처리가 녹변에 미치는 영향

가. 연구 목표

저장 온도의 변화와 마쇄 후 초저온 저장 등을 통하여 마쇄 전 온도 처리가 마늘 녹변에 미치는 영향을 조사한다.

나. 연구 범위

- 1) 변온 처리: 0°C에서 1개월 저장한 다음 -70°C에서 저장 후 녹변 관찰
25°C에서 1개월 저장한 다음 0°C에서 저장 후 녹변 관찰
- 2) 초저온 처리: 0°C에서 1개월 저장한 다음 마쇄 하여 -70°C에서 저장 후 녹변 관찰
25°C에서 1개월 저장한 다음 마쇄 하여 -70°C에서 저장 후 녹변 관찰

3. 마쇄마늘 녹색물질 분리 및 구명

가. 연구 목표

다양한 chromatography를 이용하여 녹변 마늘에서 녹색물질을 순수 분리하고 MS, NMR 등의 spectroscopy를 이용하여 구조를 동정한다

나. 연구 범위

- 1) 순수 분리: Methanol로 추출하여 open column chromatography와 HPLC를 이용하여 분리
- 2) 구조 동정: MS를 이용하여 분자량을 확인하고, NMR을 이용하여 구조 동정

4. 녹변마늘 항균력 실험

가. 연구 목표

녹변마늘과 비녹변마늘의 항균력을 비교함으로써 마늘이 갖는 일반적 효능을 녹변마늘도 나타내는지 확인하였다.

나. 연구 범위

Aspergillus 곰팡이류는 많은 음식을 부패시키는 대표적인 미생물로 *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* 등 세 종류의 미생물을 이용하여 항균력을 테스트하였다

5. 마쇄마늘 녹변 방지기술

가. 연구 목표

녹변 현상의 원인 및 기존 문헌을 통하여 녹변을 방지할 수 있는 수확후 처리 기술을 확립한다.

나. 연구 범위

- 1) 화학제 처리: citric acid, malic acid, acetic acid, ascorbic acid, cysteine
- 2) 열처리: 40 또는 50°C에서 24시간 처리
- 3) 양파 파우더 처리: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5% 처리

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 기술개발 현황

마쇄 마늘의 녹변 원인 및 방지에 대한 연구는 극히 일부분만 진행되어 왔다. 국내에서 진행된 연구는 녹변의 원인 및 기작에 관한 부분보다는 주로 녹변 억제 기술에 초점이 맞춰져 진행되어 왔다. 열처리와 염, 항산화제, 유기산 등의 화학제 처리가 주를 이루고 있는데 이는 일시적인 효과를 거두고 있을 뿐이다. 배와 이(1990)는 다진 마늘을 1% citric acid 용액에 침지하면 pH가 4.0-5.0 정도 유지되어 녹변이 감소하고, 또한 최적 pH가 6.0-6.5인 polyphenol oxidase의 작용 억제제로 갈변이 감소되며 soybean oil과 복합 처리시 효과가 증진된다고 보고하였다. 신 등(1987)은 마늘의 갈변이 건조조건, 수분함량 및 환원당에 의하여 크게 좌우된다고 보고, 65°C에서 0.1%, 75°C에서 0.5%, 85°C에서 1.0%의 아황산 용액에 침지하였을 때 갈변을 억제할 수 있었다고 보고하였다. 마늘의 녹변 억제는 기관, 대학뿐만 아니라 산업체에서도 많은 연구가 이루어져 왔다. (주)동방유량은 마늘을 열풍처리 및 화학 첨가제를 이용하여 pH를 조정하는 처리를 함으로써 변색되지 않은 상태로 장시간 저장 가능한 기술을 개발하여 특허권을 취득하였으며, 태영영농조합법인도 수확후 저온저장고에서 출고된 마늘을 자연건조 및 예냉 처리하고 파쇄한 후 100°C 이상의 순간고온수증기에 의한 처리를 한 후 향신료를 첨가하고 진공 포장하여 보관하는 기술을 개발하였다.

녹변의 발생에는 수확시기, 저장온도, 품종 등의 외적 요인이 관여하며 수확시기가 늦어질수록 그리고 저장온도가 낮을수록 나타난다고 한다. 또한 마늘의 저온저장이 상온 저장이나 CA 저장보다 녹변을 더 많이 유발하는 것으로 알려져 있다.

제 2절 국외 기술개발 현황

마늘의 이용량이 국내보다 적은 외국의 경우, 1950년대부터 녹변 현상의 원인 및 생리적 발생 기작을 구명하고자 하는 몇몇 연구가 진행되어 왔다. Lukes(1986)는 처음으

로 마늘 녹변이 발생하는 주요 원인 물질이 S-1-propenyl-cysteine sulfoxide(1-PeCSO, isoalliin)라고 추측하였다. *Allium*속 채소의 변색은 마늘의 녹변 보다는 양파에서 발생하는 pinking에 관한 연구가 더 많이 진행되었고, 발생 기작에 관한 연구가 몇몇 보고된 바 있다. Shannon 등(1967a)은 pinking 현상을 크게 3단계로 나누었다. 1단계는 마쇄 등의 물리적 작용에 의해 세포질 내에 있는 1-PeCSO와 액포에 있는 alliinase 효소가 반응하여 thiosulfinate(color developer)를 형성하는 단계이다. 2단계는 1단계에서 형성된 color developer가 glycine과 같은 free amino acid와 결합하여 pigment precursor를 형성하는 단계이며, 3단계는 pigment precursor와 carbonyls이 결합하여 최종적으로 색소를 형성한다는 가설이다(Banbyopadhyay 등, 1973; Joslyn 등 1956; Joslyn 등, 1958; Lukes 1959; Shannon 등, 1967a, 1967b). Kubec 등(2004)은 마늘의 녹변과 양파의 적변에 관한 실험을 통해 양파의 pinking 현상은 1-PeCSO와 alliinase가 반응에 의한 현상이며, 마늘의 녹변 현상은 1-PeCSO, alliinase, 2-PeCSO(S-2-propenyl-cysteine sulfoxide)의 반응에 의해 발생된다는 것을 밝혀냈다. 하지만 이제까지의 연구는 주로 녹변 발생 기작에 초점이 맞춰져 있었고, 녹변을 유발하는 녹색물질 자체를 구명하고자 하는 연구는 진행된 바 없다.

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 품종, 저장온도, 저장기간에 따른 녹변 발생

1. 재료 및 방법

가. 공시재료

경북 의성(한지형, 의성마늘), 전남 고창(난지형, 대서마늘), 경남 남해(난지형, 남해마늘) 등 우리나라 마늘 주산지의 논과 밭에서 각각 재배된 것으로 2004년 5월 중순에서 7월말에 걸쳐 수확된 마늘을 이용하였다(Table 1).

나. 저장 조건

수확 후 약 2주 동안 반그늘에서 건조시킨 후 온도 6수준(0, 5, 10, 15, 20, 25°C)에 각각 저장하면서 녹변 발생 유·무를 조사하였다(Table 1). 자연건조 후 마늘 보호엽의 수분함량은 건조 전과 비교하여 22-26% 정도 감소하였다. 저장직전 마늘인편의 육질은 단단하고 밝은 백색을 나타냈으며 인편내부 상태는 저장업숙의 공간이 없고 멩아엽의 길이가 5mm 안팎이었다.

다. 색도 측정

각각의 온도에서 저장된 마늘을 품종별로 마쇄 후 상온에서의 녹변 정도를 colorimeter(Minolta CR 200, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다. 색도는 Hunter 'a' value (redness-greenness)로 표시하였다. Hunter 'a' 값이 음의 값으로 낮아질수록 녹변정도가 심한 것을 의미한다.

Table 1. Plant materials and storage temperature.

Cultivar	Field type	Storage temperature (°C)
'Euisung'	paddy	0, 5, 10, 15, 20, 25
	upland	
'Daeseo'	paddy	0, 5, 10, 15, 20, 25
	upland	
'Namhae'	paddy	0, 5, 10, 15, 20, 25
	upland	

2. 연구 결과

본 실험에 이용된 모든 마늘에서, 즉 재배지역, 품종, 밭 또는 논 재배 등에 상관없이 저장 중 비슷한 시기에 녹변이 관찰되었다. 한지형 마늘에서 주로 녹변이 나타난다고 알려져 있었으나, 난지형인 대서마늘과 남해마늘에서도 녹변이 관찰되었으며 그 정도는 더 심하였다. 또한 녹변은 재배 중 수분공급이 많은 논마늘에서 주로 발생된다고 알려져 있으나, 본 연구에서는 밭과 논 재배에 관계없이 녹변이 발생하였으며 그 정도도 비슷하였다. 지난 2000년부터 2003년에 수행된 연구보고서에 의하면 수확시기와 맹아형성은 녹변과 상관이 없는 것으로 조사된 바 있다.

일반적으로 마늘의 녹변현상은 수확 전 재배요인 보다는 수확 후의 저장온도와 관련이 있음을 알 수 있다. 0°C에서 15°C에 저장된 모든 마늘에서 저장 1개월째 처음 녹변이 관찰되었으며, 20°C 이상의 온도에서는 녹변이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 수확 후 저장 온도 특히 15°C 이하가 녹변을 유발하는 중요한 온도임을 알 수 있다(Fig. 1). 10°C와 15°C에서 녹변발생 정도는 매우 미미하였으나 온도가 0°C 가까이 내려 갈수록 녹변정도는 더 심하였다. 녹변은 수확 즉시의 마늘에서는 관찰되지 않았으며 1개월 이상 15°C 이하에 저장된 마늘에서만 나타났다. Fig. 2는 밭에서 재배된 의성, 대서, 남해마늘의 저장기간 및 온도에 따른 녹변정도를 Hunter 'a' 값으로 나타낸 것이다. 녹색색소의 양은 저장기간이 길어질수록 저장온도가 낮을수록 많아져 녹색을 나타내는 Hunter 'a' 값도 낮은 음의 값을 나타내었다.

이상의 결과로 마늘 녹변현상은 모든 지역 및 품종의 마늘에서 나타나는 현상이며 특히 수확 후 15°C 이하의 저장온도와 함께 이에 일정기간 노출되었을 때에만 보여지는 일종의 생리현상임을 알 수 있었다. 낮은 온도 일수록 미지의 녹색물질을 합성하기 위해 필요한 물질대사가 마늘 인편내부에서 촉진되어 녹변을 유발하는 것으로 생각된다. 그 예로 지난 2000년부터 2003년 수행된 연구보고서에 따르면 0°C에서 4개월 이상 저장된 녹변마늘은 같은 기간 동안 15°C 이상의 온도에 저장된 비녹변 마늘에 비하여 향미성분 전구체 함량과 효소 알리네이즈 활성이 실제로 높게 나타났다. 향미성분 전구체 중 1-PeCSO(ISOALLIIN)과 2-PeCSO(ALLIIN) 함량은 녹변과 매우 밀접한 관련이 있었으며 특히, 효소 알리네이즈에 의한 이들의 분해산물들이 미지의 녹색물질을 만들어 내는데 관여하는 것으로 추측된다고 하였다.

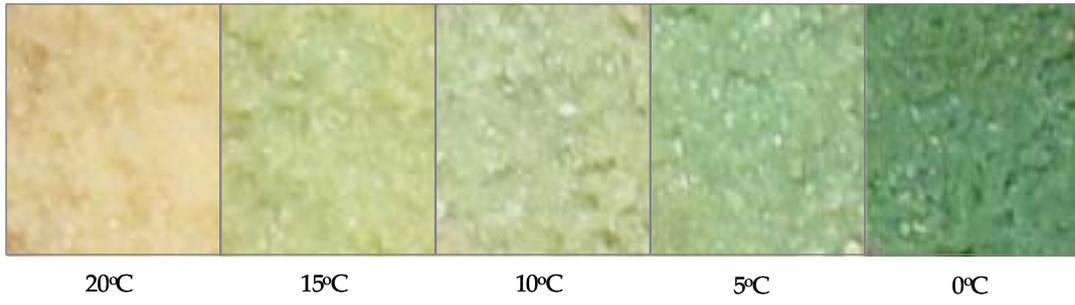


Fig. 1. Change of color development in crushed garlic stored for 6 months depending on storage temperature.

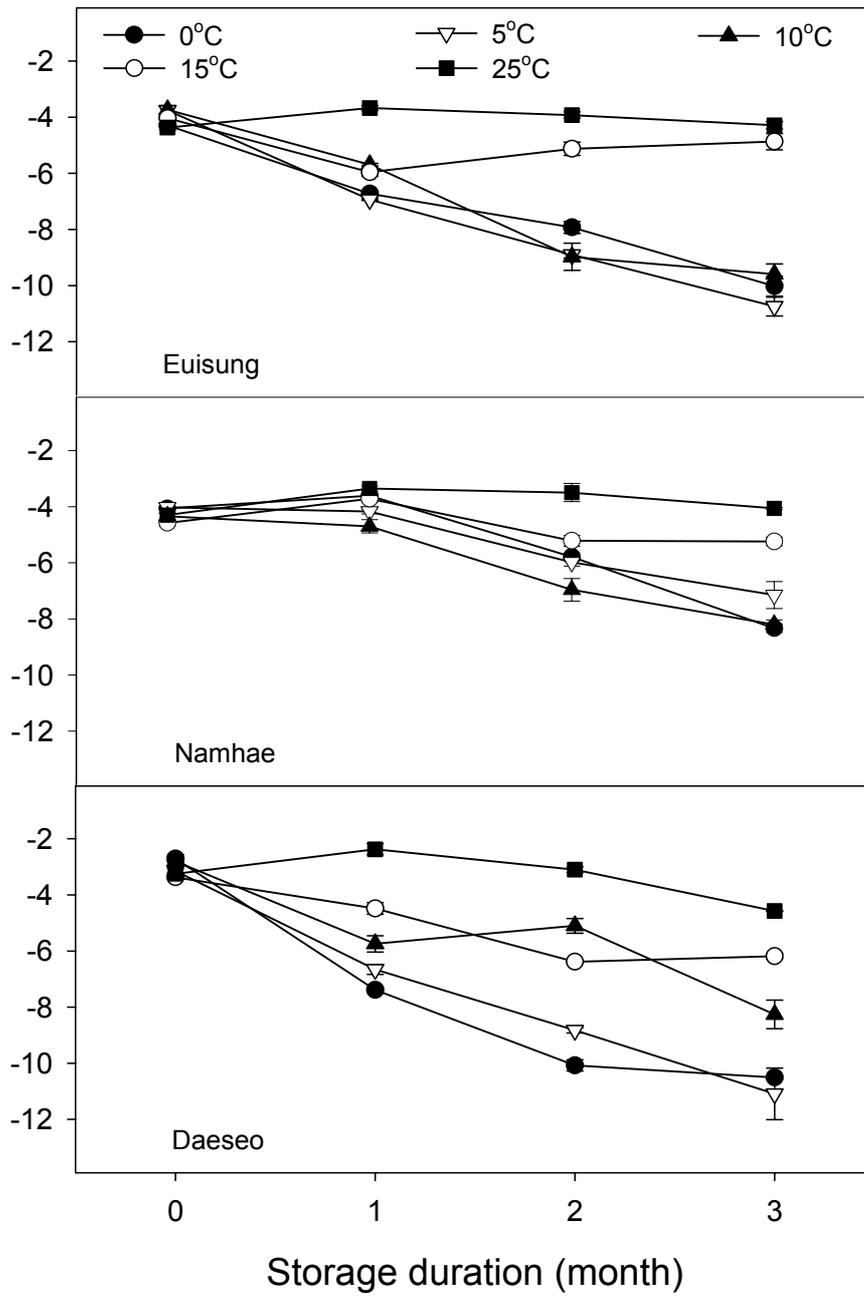


Fig. 2. Change of Hunter 'a' value depending on storage period and temperature.

제 2절 변온 및 초저온 처리가 녹변에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

0°C와 25°C에서 일정기간 저장된 대서마늘을 이용하여 아래와 같이 변온 및 초저온 (-70°C) 처리를 하여 녹변발생 유·무를 관찰하였다.

- (A) 0°C, 6개월 저장된 마늘을 마쇄 직후 초저온 냉동고에서 냉동 보관 후 녹변 발생 유·무를 관찰함
- (B) 0°C, 3개월 저장된 마늘을 25°C로 옮겨 다시 3달간 저장한 후 마쇄하여 초저온 냉동고에서 냉동 보관 후 녹변 발생 유·무를 관찰함
- (C) 25°C, 3개월 저장된 마늘을 0°C로 옮겨 다시 3달간 저장한 후 마쇄하여 초저온 냉동고에서 냉동 보관 후 녹변 발생 유·무를 관찰함
- (D) 25°C, 3개월 저장된 마늘을 마쇄 직후 초저온 냉동고에서 냉동 보관 후 녹변 발생 유·무를 관찰함

2. 연구 결과

0°C와 25°C에 3개월간 저장되었던 녹변마늘과 비녹변 마늘에 각각 변온 및 초저온 (-70°C) 처리를 한 후 녹변발생 유·무를 관찰하였다(Fig. 3). 0°C, 6개월 동안 저장된 마늘을 마쇄 직후 -70°C에서 24시간 동결한 후 상온에서 해동시킨 것과(Fig. 3a), 3개월 후 0°C에서 꺼내어 25°C로 옮겨 다시 3개월 이상 저장한 후 마쇄한 마늘은(Fig. 3b) 녹변이 나타났다. 또한 25°C, 3개월 동안 저장된 마늘을 0°C로 옮겨 다시 저장한 마늘은 1개월째부터 녹변이 관찰되었다(Fig. 3c). 하지만 25°C, 3개월 저장된 마늘을 -70°C에 보관한 후 상온에서 해동한 마늘에서는 녹변이 나타나지 않았다(Fig. 3d).

이상의 결과로 수확 후 녹변을 유발하는 온도(본 연구에서는 15°C 이하임)에 일정기간(약 1개월 이상) 저장된 마늘은 변온(0°C 또는 25°C) 및 초저온 처리(-70°C)를 해도 녹변이 계속 나타남을 알 수 있었다. 이는 인편내부에 이미 생성된 녹변 유발물질이 소진되지 않고 그대로 보존되었기 때문인 것으로 보여 진다. 또한 25°C에 저장되어 있던

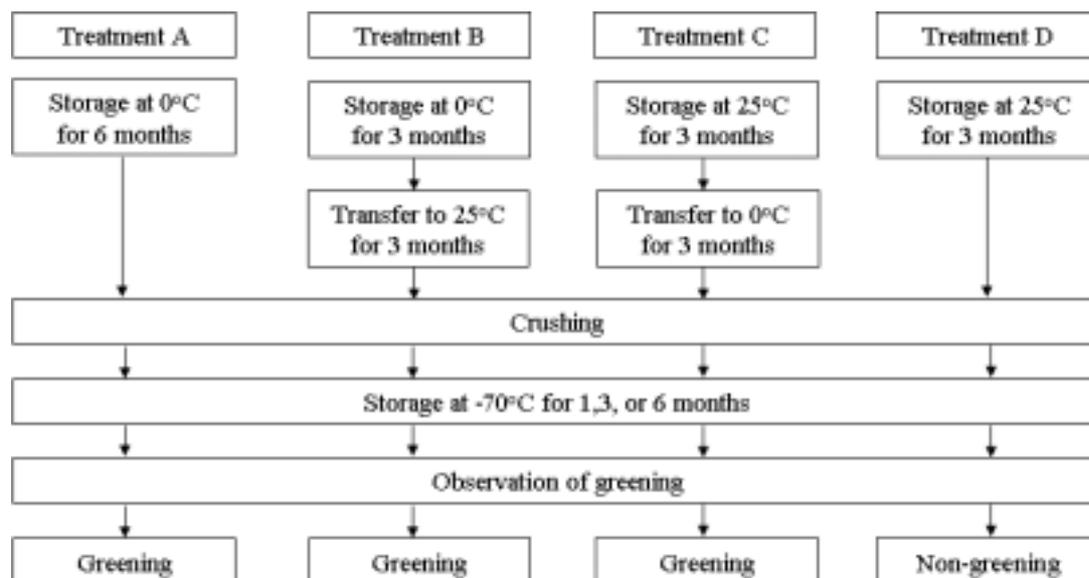


Fig. 3. Development of green pigment in crushed garlic by storage temperature and crushing time.

마늘을 다시 0°C로 이동하여 저장했을 때 녹변이 나타난 것은 녹변유발 물질이 0°C에 의해 새로이 생성되었거나 그 함량이 증가하였기 때문으로 추측된다. 수확 직후 마쇄하여 -70°C에 보관한 후 해동한 마늘에서 녹변이 나타나지 않은 것은 초저온 조건으로 인해 녹변유발 물질을 생성 및 증가시키기 위한 인편 내부의 생리대사가 완전히 정지하였기 때문이다. 또한 초저온 처리는 녹변유발 및 억제에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

2000년부터 2003년 수행된 연구보고서에 따르면 마늘의 녹변은 수확 후 저장온도 및 저장기간, 녹변유발 물질과 효소 알리네이즈의 반응에 의하여 나타나는 일종의 생리현상이라 하였다. 녹변은 향미성분 전구체의 일종인 1-PeCSO(isoalliin)와 2-PeCSO(alliin)에 효소 알리네이즈가 작용하여 만들어낸 미확인 물질이 아미노산의 일종인 글라이신과 포름알데하이드와 반응하여 최종적으로 미지의 녹색물질을 만들어내어 나타난 결과이다. 따라서 마늘에 열처리를 하여 효소 알리네이즈의 활성을 억제하여 녹변을 방지하고자 하는 기술이 시도되고 있으나 높은 온도(45°C 이상)에서 장시간(48시간 이상) 처리해야 하는 어려움과 열처리한 마늘은 마늘고유의 풍미를 잃어버릴 수 있다는 문제점이 있다. 하지만, 수확 후 0°C는 약 1개월, 5°C와 10°C는 약 2개월 내에 마늘을 마쇄한 후 -70°C에 장기간 보관하면서 이용하면 녹변을 방지함과 동시에 마늘의 풍미를 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3절 녹변마늘 녹색물질 분리

1. 재료 및 방법

가. 시약

모든 용매와 시약은 분석용으로 이용 가능한 고순도의 것들을 이용하였다. Amberlite XAD-16과 Sephadex LH-20 resin은 Sigma(MO, USA)와 Amersham Pharmacia Biotech.(Uppsala, Sweden)으로부터 각각 구입하였다. HPLC 분석용 등급의 메탄올, 에탄올, trifluoroacetic acid(TFA), petroleum ether, 클로로포름, NaOH, 글리세롤, tetrahydrofuran(THF), 그리고 cyano-4-hydroxynamic acid 등은 Sigma사로부터 methanol-d₄는 Merck(NJ, USA)사로부터 구입하였다. 모든 실험에는 3차 증류수가 사용되었다.

나. 마늘 시료

2004년부터 2005년 우리나라에서 재배된 한지 및 난지형 마늘(*Allium sativum* L.)을 구입한 후 0°C에서 약 5달 간 저장하면서 마쇄 시 녹변이 발생하면 실험에 이용하였다.

다. 녹색물질 합성

마쇄마늘을 에테르에 추출 후 여과한 다음 감압증류한 후 남은 잔여물을 citrate-phosphate buffer(pH 5.6)에 녹여 glycine을 넣어 녹색색소 전구체를 만들었다. 녹색색소 전구체에 formaldehyde를 첨가한 후 상온에 방치하면서 녹색물질 형성을 관찰하였다. 합성된 녹색색소의 흡광도를 측정하여 마늘에서 추출된 녹색색소와 유사한 물질임을 확인하였다.

라. 녹색물질 분리 방법

약 4Kg의 마쇄마늘을 100% 메탄올(4L)을 이용하여 3회에 걸쳐 녹색물질을 추출한다. 추출용매 메탄올을 35°C에서 감압농축 시킨 후 남은 잔여물(약 300mL)에 4°C에 보관된 차가운 에탄올(약 50-100mL)을 첨가하여 단백질 등의 hydrocolloids 성분을 응고시켜 제거한 후 여액을 보관한다. 이를 다시 감압농축한 후 crude한 상태의 녹색물질을 얻는다.

다. Amberlite XAD-16 resins으로 충전된 open column chromatography(500×20mm i.d.)에 위에서 얻은 crude한 녹색물질을 0-100%(각각 500mL) 메탄올과 함께 gradient 방식으로 흘려보낸다. 이때 0-90% 메탄올로 얻어진 분획물은 제거하고 100% 메탄올 분획물만 획득 후 감압농축 시킨다. 이를 다시 Sephadex LH-20 resin으로 충전된 open column chromatography(700×1.5mm i.d., Pharmacia, Sweden)를 이용하여 100% 메탄올로 흘려보낸 후 최종적으로 하부의 녹색층만 획득하여 분자량 및 구조분석을 위한 시료로 이용한다(Fig. 4). Sephadex LH-20 open column chromatography부터 얻은 녹색물질의 순도는 HPLC를 이용하여 확인한다.

마. 질량분석(Mass spectrometry: MS)

질량을 분석하기 위해 분리된 녹색물질을 100% 메탄올에 녹인 후 1-2 μ L를 MS probe에 놓았다. FAB/MS(JMS-AX505WA Jeol, Japan)는 glycerol을 matrix로 이용하였다. MALDI-TOF/MS(Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation spectrophotometer, Applied Biosystem Inc.)는 positive ion mode에서 accelerating voltage는 20kV로, extractor voltage of 9kV로 설정 후 5.0×10^{-6} Torr의 압력으로 측정하였다. Cyano-4-hydroxybenzoic acid를 matrix로 사용하였으며, calibration mixture I(Applied Biosystems Inc., CA, USA)를 표준물질로 사용하였다. LC-ESI/MS(Hewlett Packard, HP1100, USA)는 Quattro LC triple-quadrupole MS로서 positive와 negative ion mode에서 분석하여 녹변물질 분자량을 확인하였다.

바. 핵자기 공명(Nuclear magnetic resonance)

분리된 녹색물질 3mg을 500 μ L의 methanol- d_4 에 녹여서 ^{13}C (Avance 500, Bruker, Germany), ^1H , DEPT135 등의 1D spectrum과 COSY, TOCSY, HMQC, 그리고 HMBC(Avance 600, Bruker, Germany) 등의 2D spectrum 등을 이용하여 물질의 구조를 동정하였다. Reference peak로 메탄올을 이용하였다.

사. 적외선 분광장치(FT-IR)

FT-IR(Nicolet Magna 550 series II, Midac, USA)을 이용하여 분자구조의 작용기를 확인하고, 라이브러리를 이용하여 유사물질을 탐색하였다.

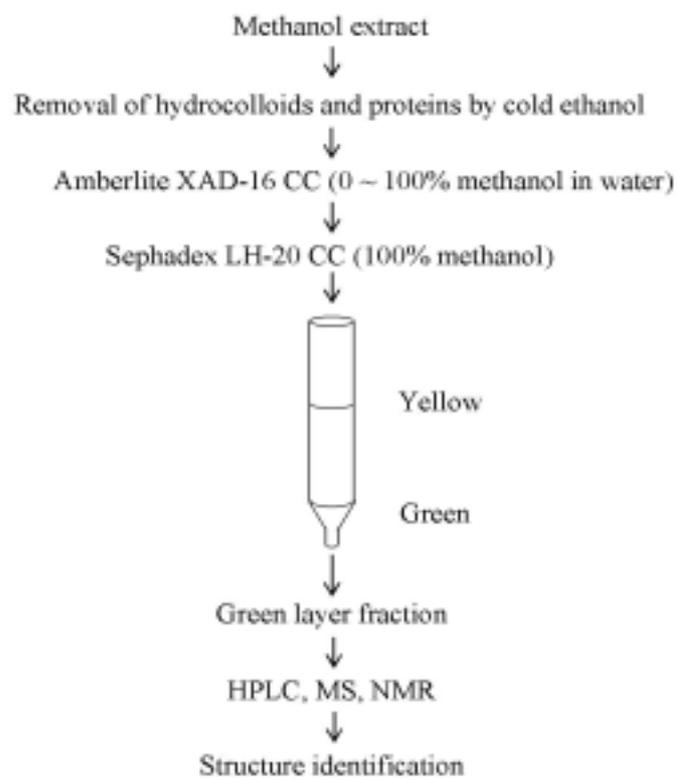


Fig. 4. Purification and identification procedures for green pigment extracted from crushed garlic cloves.

아. 초고속액체크로마토그래피(HPLC)

본 연구에서 사용한 HPLC(Hewlett Packar, HP1100, USA) 분석조건은 다음과 같다: 컬럼, Alltima C₁₈(250×4.6mm i.d., 5μm); 시료 주입량, 10μL; 컬럼 온도, 20°C; 이동상, 0.1% acetic acid/water : acetonitrile (60:40, v/v); 유속, 1.0mL/min; UV-VIS 검출기, 210, 240, 280, 440, and 595nm.

자. 흡수스펙트럼

Spectrophotometer(Shimazu, Japan)를 이용하여 녹색물질의 흡수 스펙트럼을 확인하였다.

2. 연구 결과

녹변마늘로부터 녹색물질을 분리하기 위해서는 물, acetic acid, 메탄올, 에탄올과 같은 극성용매를 이용해야 가능하다. 비극성용매인 ethyl ether, diethyl ether, 클로로포름, dichloromethan 등을 이용하면 녹색물질이 거의 녹아나오지 않아 분리에 부적합하다. 이는 녹변 마늘의 녹색물질은 매우 극성의 성질을 갖는다는 것을 의미한다. 따라서 녹색물질을 분리하기 위한 모든 크로마토그래피 기술의 적용에 있어서 용매의 선택이 매우 중요하다. 본 연구에서 이용된 다양한 크로마토그래피 기술 중 박층크로마토그래피(thin-layer chromatography)는 녹변물질을 분리하기 위한 효과적인 방법이 되지 못하였고, open column chromatography와 HPLC를 이용한 방법이 효과적이었다.

가. 녹색물질의 합성

마쇄 마늘의 에테르 추출물을 glycine, formaldehyde와 합성한 결과는 2000년에서 2003년까지 수행한 과제와 같게 나왔다. 590nm에서 최대흡광도를 나타냈으며, 이때 색은 녹변마늘의 녹색물질과 거의 유사하였다. Color developer와 glycine의 반응은 녹변을 나타내는 마늘에서만 보여 지는 것으로 녹변마늘은 녹색색소를 만들어 내기 위해 꼭 필요한 color developer를 포함하고 있으며, 비녹변 마늘은 이를 포함하고 있지 않기 때문이다. 합성된 pigment precursor는 에테르, 헥산과 같은 비극성 용매에는 녹지 않으며 물과 에탄올, 메탄올 등의 극성용매에 잘 녹는 성질을 보여, 녹변마늘에서 추출된 녹색색소와 거의 유사한 solvent solubility를 갖는다. 녹색색소 형성을 위하여 필요

한 formaldehyde의 농도는 매우 적으며, pigment precursor와 formaldehyde의 반응은 590nm 흡광도에 가장 근접하는 스펙트럼을 만들어냈다.

나. Sephadex LH-20 open column chromatography 및 HPLC를 이용한 녹색물질 분리

최종적으로 Sephadex LH-20에서 분리한 녹색물질 분획물을 HPLC를 이용하여 순도 및 특징을 확인하였다(Fig. 5). HPLC 분리결과 녹색물질은 97% 이상의 높은 순도를 나타내었다. 녹색물질은 본 연구에서 사용한 HPLC 분석조건에서 1.7분대(Peak 1)에 검출이 되었으며 Fig. 5에 삽입된 흡수스펙트럼 확인 결과 녹색변마늘이 갖는 고유의 파장인 590nm에서 흡광도를 나타내 검출된 물질이 녹색물질임을 확인할 수 있었다. Fig. 5의 Peak 2는 590nm에서 흡광도는 보이지 않는 미지의 물질이다. Prep-HPLC로부터 순수 분리된 녹색물질 또한 440과 590nm의 두 파장에서 흡광도를 보였다. 특히 590nm는 녹색변마늘에서 분리된 녹색물질이 갖는 특이적 파장으로 녹색물질을 상온에 일정기간 두면 노란색으로 변하는데, 이때는 440nm에서만 흡광도를 나타낸다(Fig. 6).

다. 질량분석을 이용한 녹색물질의 분자량 확인 및 적외선 분광장치(FT-IR)

Fig. 4에 해당하는 다양한 크로마토그래피로부터 분리된 녹색물질의 최종 분자량 확인을 질량분석기(FAB, MALDI-TOF, LC-ESI/MS)를 이용하여 확인하였다. 모든 스펙트럼에서 m/z 412 $[M+H]^+$ 에 해당하는 분자이온이 100%로 나타나 이 물질이 녹색물질이며 분자량은 411임을 확인할 수 있었다(Fig. 7, 8, 9). FAB을 이용한 질량분석의 결과 m/z 104, 320, 496에 해당하는 이온들이 나타났는데 이는 약간의 불순물로 확인되었다(Fig. 7). 질량분석 결과 녹색물질의 분자량[M]은 411이었으며, 이때 $[M+2]$ 에 해당하는 이온의 함량은 4-5% 정도이므로 이를 근거로 녹색물질은 1개의 황(S)을 포함하는 물질임을 확인할 수 있었으며, $[M+1]$ 의 비율로 홀수개의 질소(N)를 갖는 물질로 추정할 수 있었다. 이상의 질량분석 결과를 통하여 녹색물질의 예상되는 분자식은 25-30개의 질소를 갖는 물질로 추정이 가능하며, Table 2와 같다.

적외선 분광장치의 결과는 Fig. 10과 같다. FT-IR로부터 얻어진 정보를 라이브러리 검색한 결과 미지의 녹색물질은 코코넛 추출물인 coconut oil diethanolamide ($NH(CH_2CH_2OH)_2$, 분자량 105.14) 분자와 유사한 작용기를 갖고 있는 것으로 조사되었다.

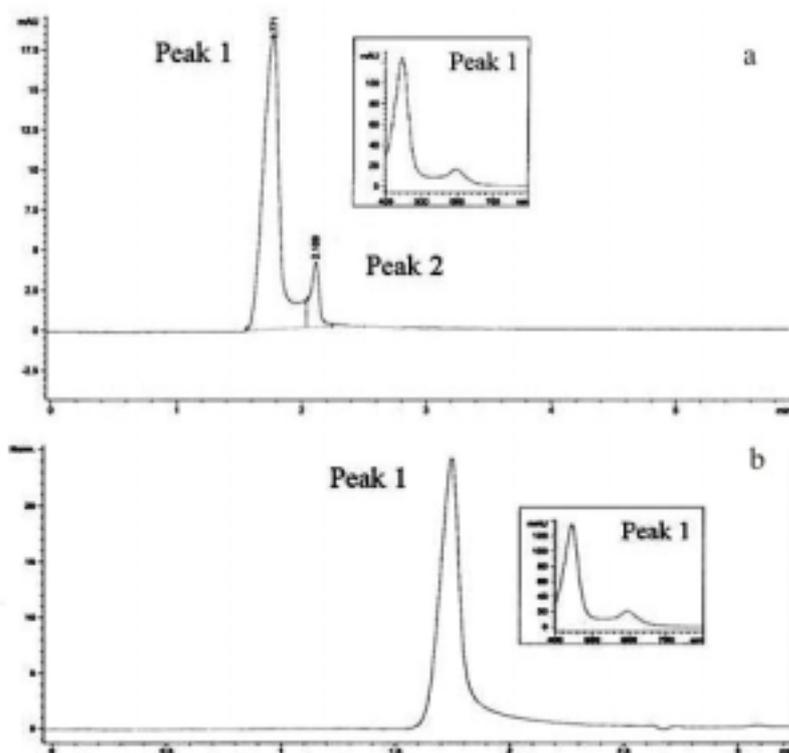


Fig. 5. HPLC chromatogram of lower-layer green fraction on Sephadex LH-20 CC. Peak 1 was determined to be the green pigment of interest, according to the absorption spectrum inserted in chromatogram (a). Only Peak 1 was collected using a fraction collector repeatedly, and re-injected into HPLC to confirm separation (b)

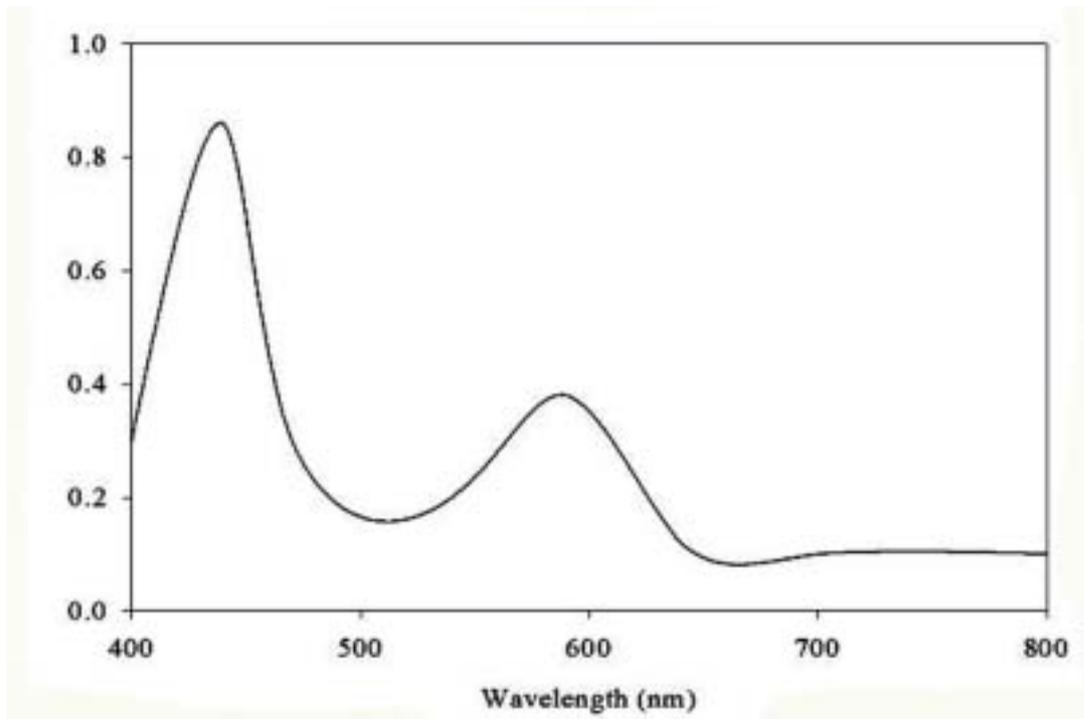


Fig. 6. Absorption spectrum of green pigment (dissolved in 100% methanol) purified from crushed garlic cloves.

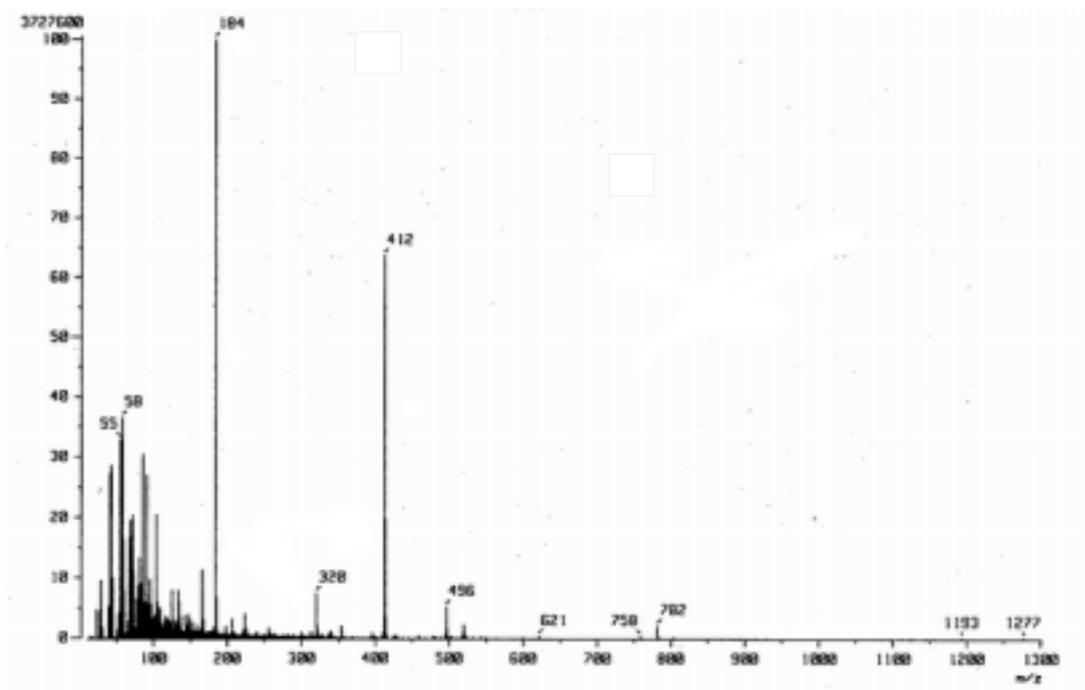


Fig. 7. FAB MS spectrum of green pigment isolated from crushed garlic cloves.

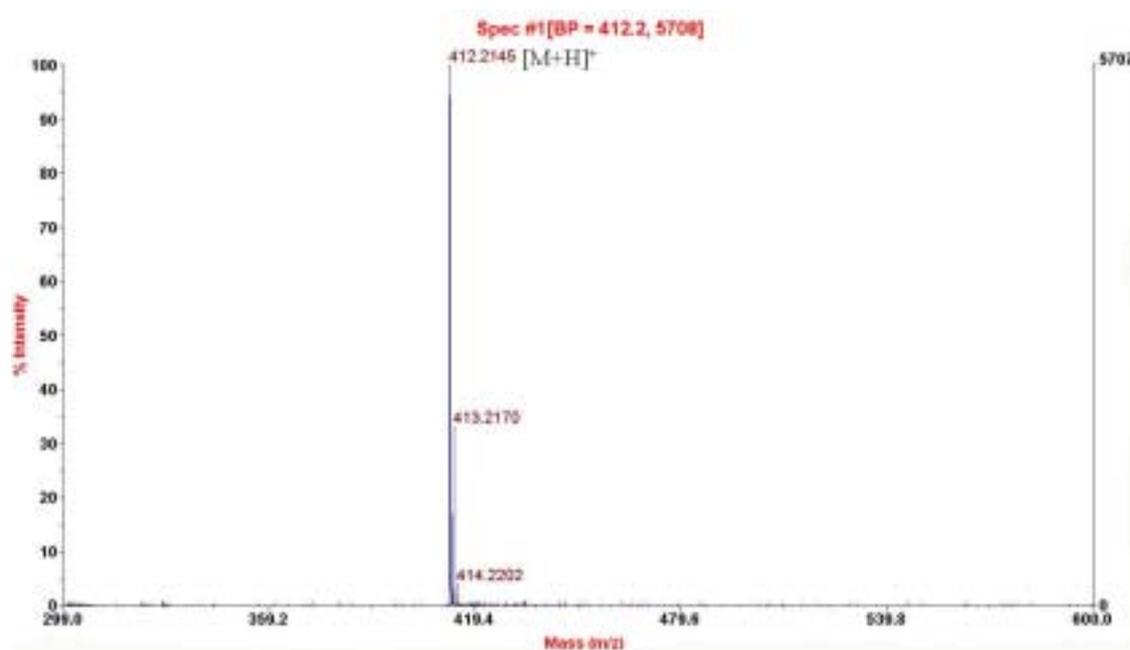


Fig. 8. MALDI-TOF MS spectrum of green pigment isolated from crushed garlic cloves.

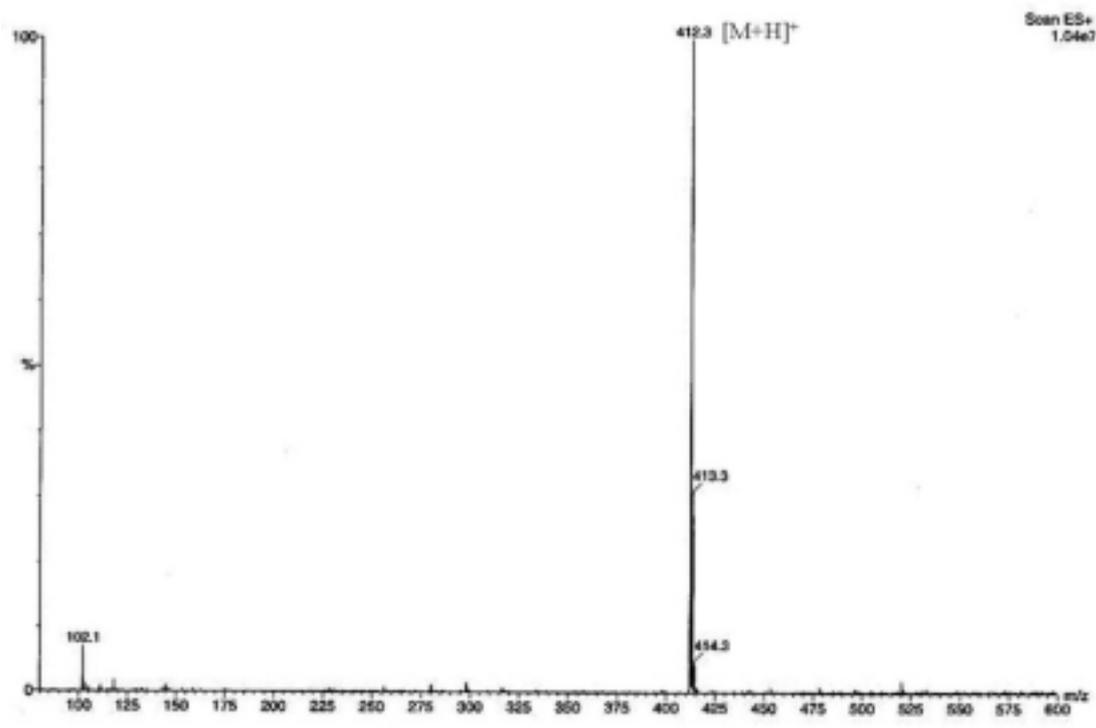


Fig. 9. LC-ESI MS spectrum of green pigment isolated from crushed garlic cloves.

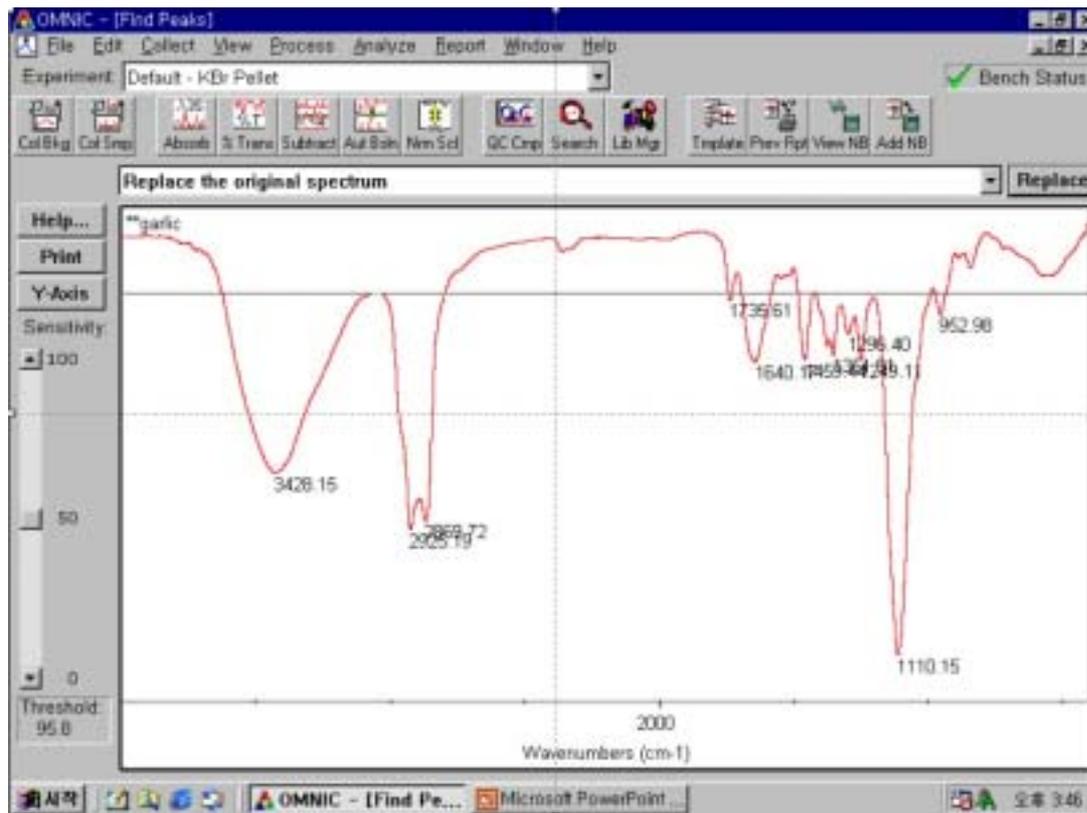


Fig. 10. FT-IR spectrum of green pigment in crushed garlic cloves.

Table 2. Possible molecular formula of the green pigment isolated from crushed garlic cloves.

$C_{25}H_{17}N_1O_3S_1$
$C_{25}H_{21}N_3O_1S_1$
$C_{25}H_{33}N_3O_1S_1$
$C_{25}H_{49}N_1O_1S_1$
$C_{26}H_{21}N_1O_2S_1$
$C_{26}H_{37}N_1O_1S_1$
$C_{27}H_{25}N_1O_1S_1$
$C_{28}H_{13}N_1O_1S_1$

라. 핵자기공명을 이용한 녹색물질 분자구조 추정

분리된 녹색물질의 분자량과 예상되는 분자식을 질량분석 기술을 이용하여 추정한 후 최종적으로 녹색물질 분자의 3차원적인 구조를 알기 위해서 핵자기공명기술(C^{13} , DEPT135)을 적용하였다(Fig. 11, 12). 녹색물질은 매우 불안정한 물질로 조금만 열에 노출되어도 갈변되는 특징이 있다. 따라서 본 연구에 있어서 녹색물질의 완벽한 구조 동정에 많은 어려움이 있었으며 분자 구조의 일부 fragments만 확인이 가능하였다. 일반적으로 NMR spectrum에서 포화된 탄소 원자는 high field(8-60ppm)에서 나타나며 녹색물질의 spectrum에서 살펴보면 다음과 같다: R-CH₃(①, ②), R-CH₂-R(③, ④, ⑤). 포화된 탄소 원자 다음 부분(40-70ppm) 영역에서는 전기적으로 음성인 원자가 나타나서 R-CH₂-O(⑥)이 나타난다. 불포화된 탄소(⑦, alkene)와 aromatic ring 탄소 원소(⑧)의 chemical shift는 100-150ppm에서 나타난다. 마지막으로 가장 low field에서 나타나는 carbonyl group(⑨)은 155-220ppm에서 나타난다. 따라서 녹색물질은 카보닐족(C=O), 방향족(aromatic ring) 탄소골격을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 또한 aromatic ring은 137.6, 130.0, 126.2, 그리고 128.2ppm에서 나타나는데 이 데이터를 근거로 benzene ring의 작용기는 *meta* position에 있다는 것을 확인할 수 있다(Fig. 11). DEPT135에서는 methin, methyl, 그리고 methylene을 알 수 있다. Methin과 methyl은 positive peak이 나타나 위로 솟아있고, methylene은 거꾸로 뒤집혀서 나타난다. 녹색물질로 DEPT135를 찍은 결과 ③(25.1ppm), ④(30.1ppm), ⑤(33.4ppm) 탄소는 methylene임을 확인할 수 있었다. Carbonyl 탄소인 ⑨은 수소를 포함하지 않기 때문에 DEPT135에서는 나타나지 않았다(Fig. 12). 수소-수소 간 결합과 수소-탄소 간 결합을 확인할 수 있는 COSY, TOCSY, HMBC, HMQC 등의 이차원 핵자기공명 실험 결과는 Fig. 13과 같다. 이상의 모든 결과를 근거로 녹색물질의 부분적 탄소 구조를 Fig. 14와 같이 추정하여 나타내었다.

마. 녹변마늘에서 분리된 녹색물질의 완벽한 분자구조 구명이 어려운 이유

녹변마늘의 녹색물질은 식물체에서 다량 존재하는 녹색색소인 엽록소(chlorophyll)와는 전혀 다른 새로운 물질로 본 연구에서 판명이 났다. 이러한 사실은 본 연구에 의해서 밝혀진 분자량과 부분적인 분자구조 구명에 근거한 것이다. 이상의 연구 업적은 SCI 저널인 Food Chemistry에 처음으로 2006년 게재가 확정되었다. 녹색물질의

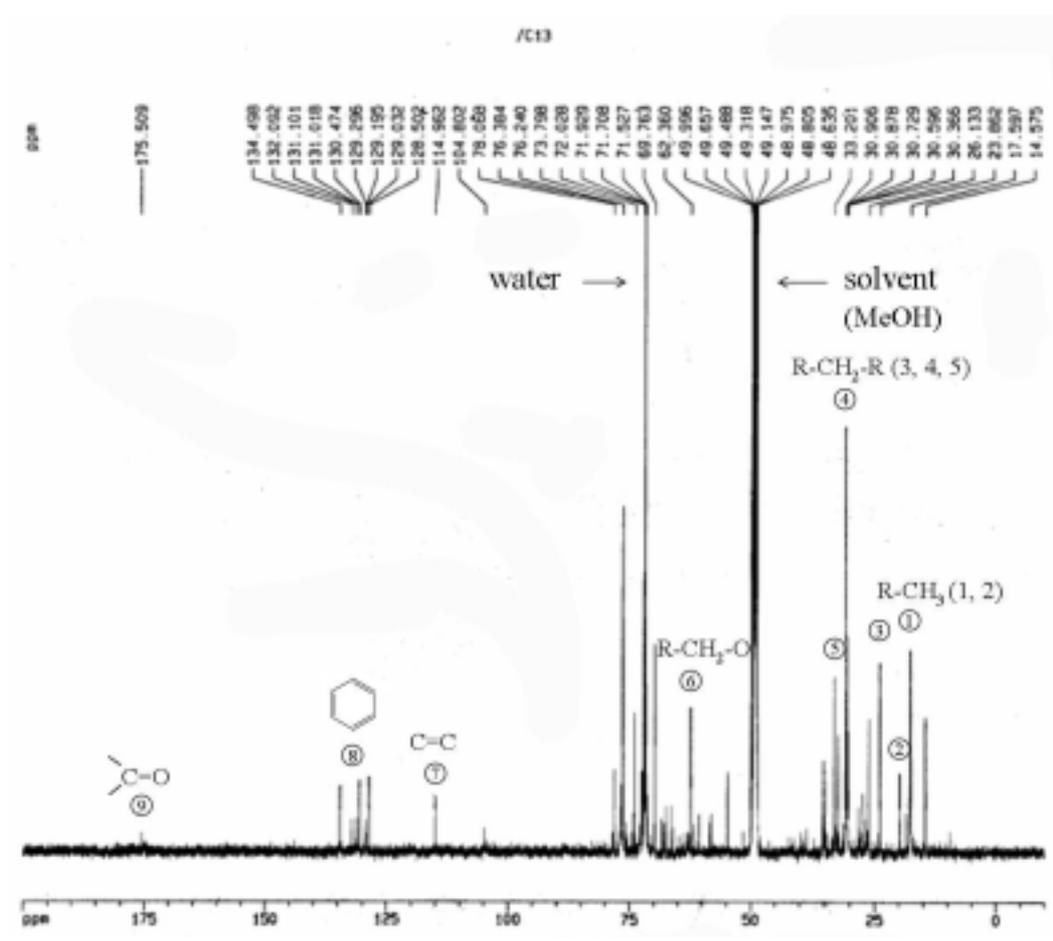


Fig. 11. C^{13} NMR spectrum of green pigment isolated from crushed garlic cloves.

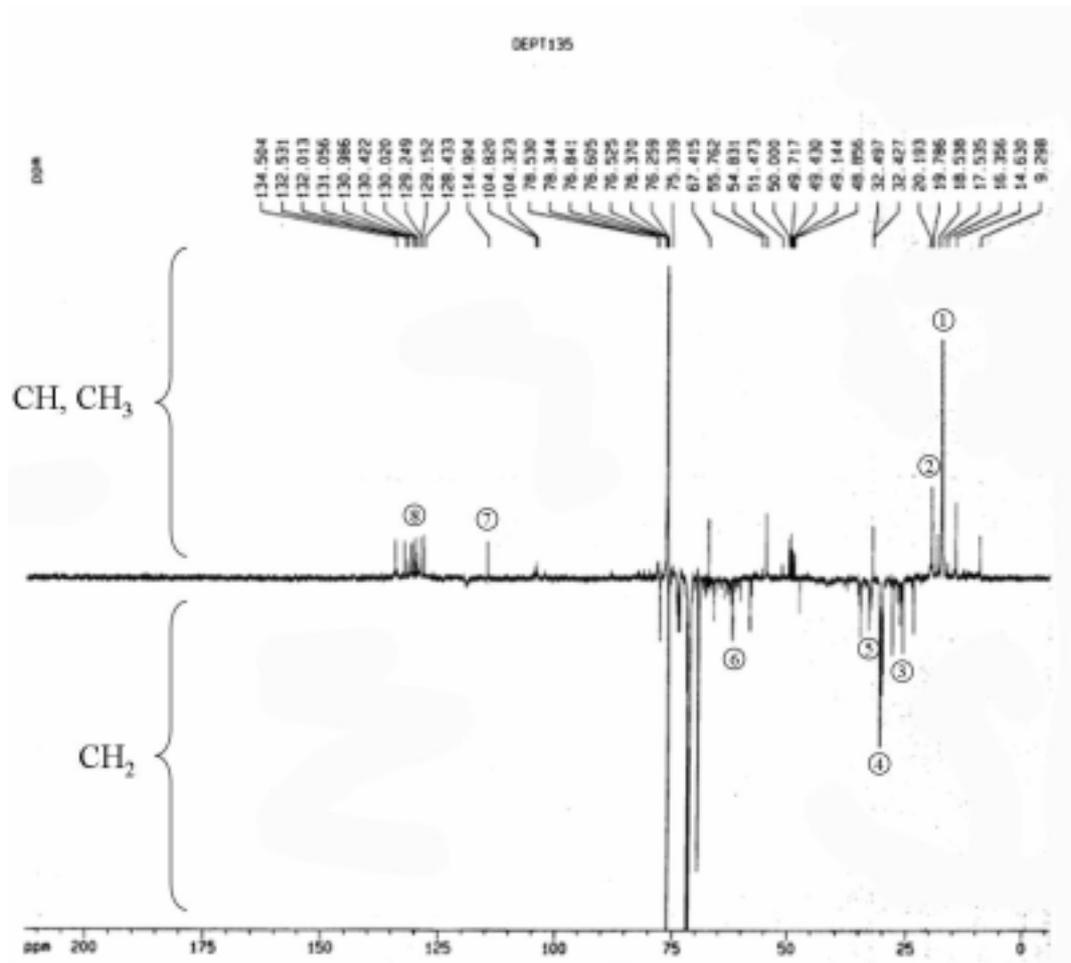


Fig. 12. C^{13} NMR spectrum of green pigment isolated from crushed garlic cloves.

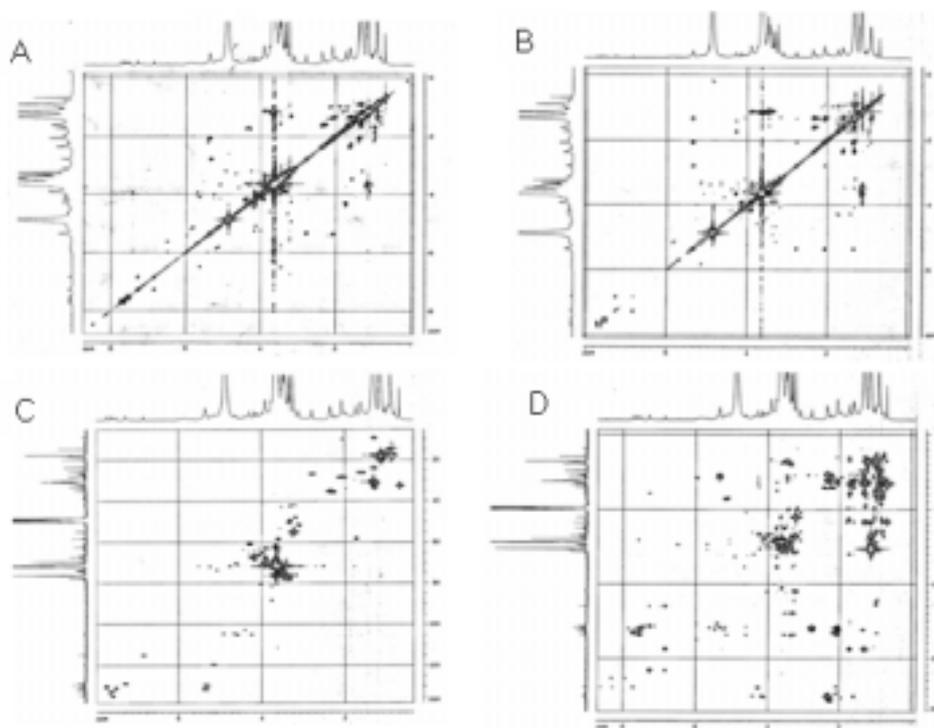


Fig. 13. Two-dimensional NMR spectra of green pigment isolated from crushed garlic cloves. A, COSY; B, TOCSY; C, HMQC; D, HMBC.

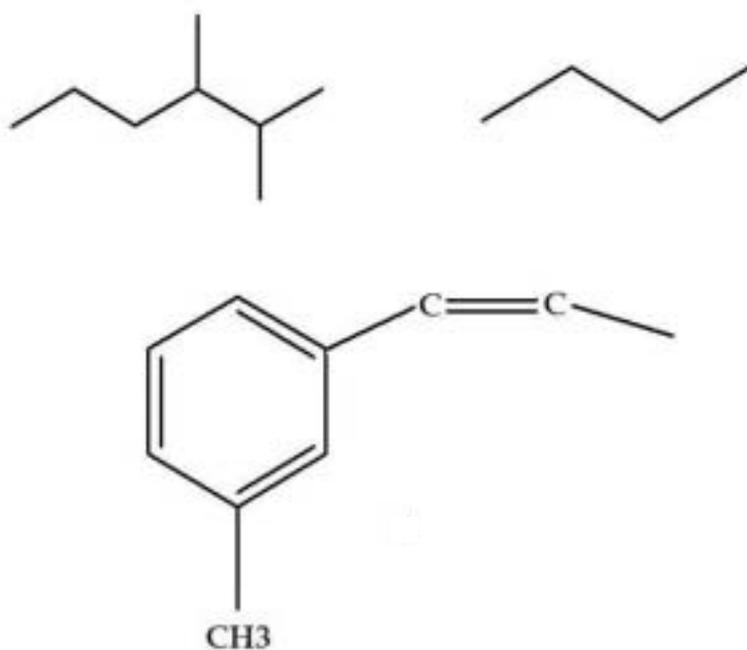


Fig. 14. Fragments of green pigment based on NMR spectra.

완벽한 구조 동정을 통해서 녹변마늘에서 논란이 되고 있는 안전성과 더 나아가 보다 정확한 녹변발생 기작 등을 밝히고자 하였으나 본 연구를 수행하면서 많이 실험적 어려움이 따름을 알 수 있었다. 즉, 녹색물질은 매우 불안정한 특징을 갖고 있어 분리의 단계 단계마다 성질이 전혀 다른 물질로 변한다. 예를 들어 상온에서 쉽게 갈색으로 변하며 저온에서도 그 성질을 오래 유지하지 못한다. 가능한 한 초 저온 상태로 보관을 해야 오래 동안 보관이 가능하다. 더군다나 분자구조를 밝히기 위해서 가장 중요한 단계인 핵자기공명을 이용한 단계에서는 장시간의 분석시간으로 인하여 분리해 낸 녹색물질이 쉽게 파괴된다. 이러한 문제를 해결하고자 분석시간 동안 저온으로 유지 가능한 핵자기공명 기술을 이용하기도 하였으나 매우 불안정한 성질을 갖는 녹색물질을 분석하기 위한 문제점을 완벽하게 극복하지는 못하였다. 아울러 이러한 실험상의 문제점은 초저온에서 측정이 가능한 핵자기공명 또는 질량분석과 연계된 핵자기공명 기술을 이용하면 해결이 가능하리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 녹색물질의 완벽한 구명을 통하여 안전성을 검증하고자 했던 연구 목적의 일부를 다음과 같은 실험을 수행함으로써 간접적으로 증명하고자 하였다. 즉, 녹변마늘과 비 녹변마늘의 항균력을 비교함으로써 마늘이 갖는 일반적 효능을 녹변마늘도 나타내는지 확인하였다.

제 4절 녹변마늘 항균력 실험

1. 재료 및 방법

가. 공시 재료

마쇄 후 녹변이 나타나는 마늘과 나타나지 않는 마늘을 대상으로 각각 마쇄 직후 그리고 마쇄 5시간 후에 마늘즙을 증류수로 추출하여 항균력 시험을 하였다.

나. 마늘 추출액

마쇄 마늘 약 5g을 100ml 증류수에 교반하여 거른 후 10배 희석하여 항균력 시험에 이용하였다.

다. 미생물 배양

세 종류의 미생물 *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*을 각각 이용하였다. 미생물을 Sabouraud dextrose agar(Difco, Detroit, MI)에서 37°C, 72시간 동안 배양 후 spore 포집을 위해서 1% Tween 20을 10ml 첨가하였다. 그 후 원심분리(1000xg, 25분)하여 conidia를 취합한 후 시험에 이용하기 전까지 4°C에 보관하였다.

라. 항균력 시험

거름종이(직경 6mm)에 40 μ L의 마늘추출액을 적신 후 위의 미생물을 미리 접종하여 준비한 sabouraud dextrose agar 배지위에 올려놓은 후 25°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 거름종이 주위에 생성된 저지대(inhibition zone, mm)를 측정하여 항균력을 비교하였다. 저지대 측정은 거름종이의 직경은 제외하고 나타내었다.

2. 시험 결과

Aspergillus 곰팡이류는 많은 음식을 부패시키는 대표적인 미생물로 알려져 있다. 또한 *A. flavus*는 아프라톡신(aflatoxins)이라는 독소를 만들어내어 이 미생물이 감염된 음식을 섭취한 사람이나 동물에게 치명적인 영향을 초래하기도 한다. 한편, 마늘은 미생물

에 대한 매우 다양한 항균력(antifungal, antiviral)을 갖고 있어 식품 및 의약품 제조나 부패 미생물의 번식을 억제하기 위한 물질 제조에 많이 응용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 녹변 마늘이 갖는 항균력을 비녹변 마늘과 비교하여 나타내었다(Table 3). 녹변 및 비녹변 마늘로부터 추출한 마늘즙은 모두 마쇄 직후에 높은 항균력을 나타내었고, *A. flavus*에 대한 항균력이 다소 높게 나타났다. 마쇄 후 5시간 경과하여 추출한 마늘즙의 항균력은 초기에 비하여 절반이상 감소하였으며 이와 같은 현상은 모든 처리구에서 동일하게 나타났다. 이는 마늘의 주요 항균성분인 각종 휘발성 황 화합물들이 소실되었기 때문이다. 한편, 녹변 및 비녹변 마늘로부터 추출된 마늘즙의 항균력 차이는 본 연구에 이용된 모든 미생물에서 나타나지 않아 녹변마늘 역시 마늘의 일반적인 항균력을 갖고 있는 것으로 조사되었다.

Table 3. Inhibitory zone against *Aspergillus* spp. in greening or non-greening garlic extract.

		<i>A. niger</i>	<i>A. flavus,</i>	<i>A. fumigatus</i>
non-greening	initial	34±2.3	42±2.4	32±2.3
	5 h later	23±1.2	18±2.5	14±1.2
greening	initial	35±2.5	45±2.1	29±1.5
	5 h later	25±1.6	21±2.3	17±1.9

제 5절 마쇄마늘 녹변 방지기술

1. 재료 및 방법

가. 공시 재료

경상북도 의성에서 2004년에 재배된 육쪽마늘을 0°C에서 9개월간 저장한 후 사용하였다.

나. 화학제 및 열처리

마쇄마늘에 여러 종류의 유기산(citric acid, acetic acid, malic acid), ascorbic acid, cysteine 등의 화학제와 열처리, 복합처리 등을 Table 4, 5와 같이 실시하였다.

다. 색변화 및 pH 측정

마쇄마늘의 색은 색차계(Minolta CR-200, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다. Hunter L, a, b값을 이용하여 나타내었으며, 색변화는 Hunter-Scofield 방정식을 이용하여 ΔE 값으로 나타내었다(Francis and Clydesdale, 1975).

$$\Delta E = [(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2]^{1/2}$$

L_0 , a_0 , b_0 는 초기값을 의미하며 pH값은 pH meter를 이용하여 측정하였다(Orion 720, MA, USA).

라. 양파 파우더 처리

녹변 억제를 위해 통마늘에 동결 건조시킨 양파 파우더 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5%를 함께 넣고 동시에 마쇄하였다.

Table 4. Chemicals and their concentrations used for the effects on color changes in crushed garlic.

Additives	Concn	Additives	Concn
Organic acids		Salts	
citric acid(CA)	0.5-2%	sodium ascorbate(SA)	1-2.5%
acetic acid(ACA)	0.5-2%	sodium phosphate(SP)	0.1-0.2%
malic acid(MA)	0.5-2%	sodium chloride(SC)	0.5-2%
Antioxidant		Cysteines	
ascorbic acid(AA)	2-6%	L-cysteine(CY)	0.5-1.25%
		N-acetyl-L-cysteine(ACY)	0.5-1.25%

Table 5. Heat and chemical treatments used for the effects on color changes in crushed garlic.

Heat temp	Chemical treatment	Heat temp	Chemical treatment
	none		none
40°C for 24h (H40)	ascorbic acid 1% cysteine 0.5%	50°C for 24h (H50)	ascorbic acid 1% cysteine 0.5%

마. 피루브산, 당 측정

피루브산 측정을 위하여 마쇄마늘 2g을 취하여 5mL의 10% TCA(trichloroacetic acid) 용액에 넣고 섞은 다음 1시간 경과 후 200mL의 증류수를 부어주면서 여과하였다. 여과액 1mL, 0.0125% 2,4-dinitrophenylhydrazin이 포함된 2N HCl 1mL, 그리고 증류수 1mL을 함께 섞어주었다. 37°C에서 10분간 방치한 후 5mL의 0.6N NaOH을 넣어주고 spectrophotometer를 이용하여 420nm에서의 흡광도를 측정했다. 표준물질은 sodium pyruvate를 이용하였다(배와 이, 1990).

Sucrose, fructose, fructan 등의 당 측정을 위하여 Pontis(1990) 방법을 이용 하였다. Sucrose와 fructose 등의 유리당 분석은 액체 크로마토그래프를 이용하여 분석하였다. 마늘의 유리당 추출을 위해 마쇄한 마늘 1g을 삼각플라스크에 취하여 증류수 50mL을 넣은 후 200rpm으로 40°C에서 30분간 교반한 다음 여과하였다. 여과액을 Sep-pak C18 cartridge(Waters, Part No. WAT020515)를 통과시킨 후 HPLC에 주입하였다.

Fructan 측정을 위해서는 유리당 분석을 위해 추출한 샘플에 0.5mL의 0.4N H₂SO₄를 넣어 5mL로 정용한 다음 10분간 끓인다. 끓인 후 0.5mL의 0.4N NaOH를 넣어 중화시키고 membrane filter(pore size 0.45μL)로 여과한 다음 10μL를 취하여 HPLC에 주입한다. 당 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 5와 같다.

총 Fructan의 계산은 다음과 같다. Total fructan = total fructose + 1/2 sucrose

Table 6. Operating conditions for sugar analysis by high performance liquid chromatography

Instrument	YoungLin KR HPLC (Model 9300, Anyang, Korea)
Column	Waters Sugar-Pack column (300mm x 6.5mm)
Mobile phase	Pure water 100%
Flow rate	0.5mL/min
Detector	Refractometer detector (YoungLin TRIATHLON, Anyang, Korea)

바. 향기성분 분리 및 동정

향기성분은 dynamic headspace법에 따라 purge and trap concentrator(Tekmar LSC 2000, OH, USA)을 사용하여 포집하였다. 시료는 마쇄한 마늘 5g과 증류수 10mL을 시료병에 취하여 30분간 purging하면서 추출하였다. 향기성분은 자동적으로 flame ionization detector(FID)와 DB-5칼럼(fused silica capillary column, 60x0.32mm I.D., 0.25 μ L film thickness, J&W Scientific, CA, USA)이 장착된 GC(Hewlett-Packard 5890, CA, USA)에 주입되어 분리하였다. Injector와 detector 온도는 각각 120°C 및 300°C로 하였고 오븐 온도는 35°C에서 3분간 유지한 후 분당 1.5씩 220°C까지 상승시켜 220°C에서 10분간 유지하도록 하였다. 운반 기체는 헬륨을 사용하였고 분당 유속을 1.2mL로 하였다.

향기성분의 동정은 gas chromatograph-mass spectrometer(GC/MS: Hewlett-Packard 5972 system, CA, USA)를 이용하였다. 시료도입을 위한 ionization voltage는 70eV, resolution은 1000, mass range는 35-300m/e로 하였으며 그 밖의 조건은 향기성분의 분리를 위한 GC 조건과 같다. 표준물질이 있는 경우는 표준물질의 분석결과를 이용하여 동정하였고, 그 밖의 물질은 GC/MS에 내장된 Wiley library와 비교하여 동정하였다.

사. 미생물 실험

마쇄마늘 1g을 취하여 증류수 100mL에 희석한다. 배지로 plate count agar(PCA, Difco Laboratories, MI, USA)를 사용하였으며, 35°C에서 24시간 배양 후 총 균수를 세었다. 각 처리구는 3반복하여 통계 처리하였으며, 평균값을 나타내었다.

2. 연구 결과

가. 화학제 및 열처리

마쇄 마늘에 여러 가지 화학제 및 열처리를 실시하여 24시간 후의 색변화를 관찰한 결과는 Fig. 15와 같다. 녹변의 정도는 화학제 종류, 농도 및 열처리 정도에 따라 다르게 나타났다. 처리한 모든 화학제 중 ascorbic acid(AA) 4-6%, N-acetyl-L-cysteine(ACY) 1-1.25%, L-cysteine(CY) 및 sodium ascorbate(SA) 1-1.25%에서 가장 효과가 좋았다. 녹변 기작과 관련해서 AA와 SA의 억제효과는 아직 밝혀지지 않았으며, CY의 경우는 alliinase의 경쟁적 저해제로 작용하여 녹변을 억제하는 것으로 밝혀졌다

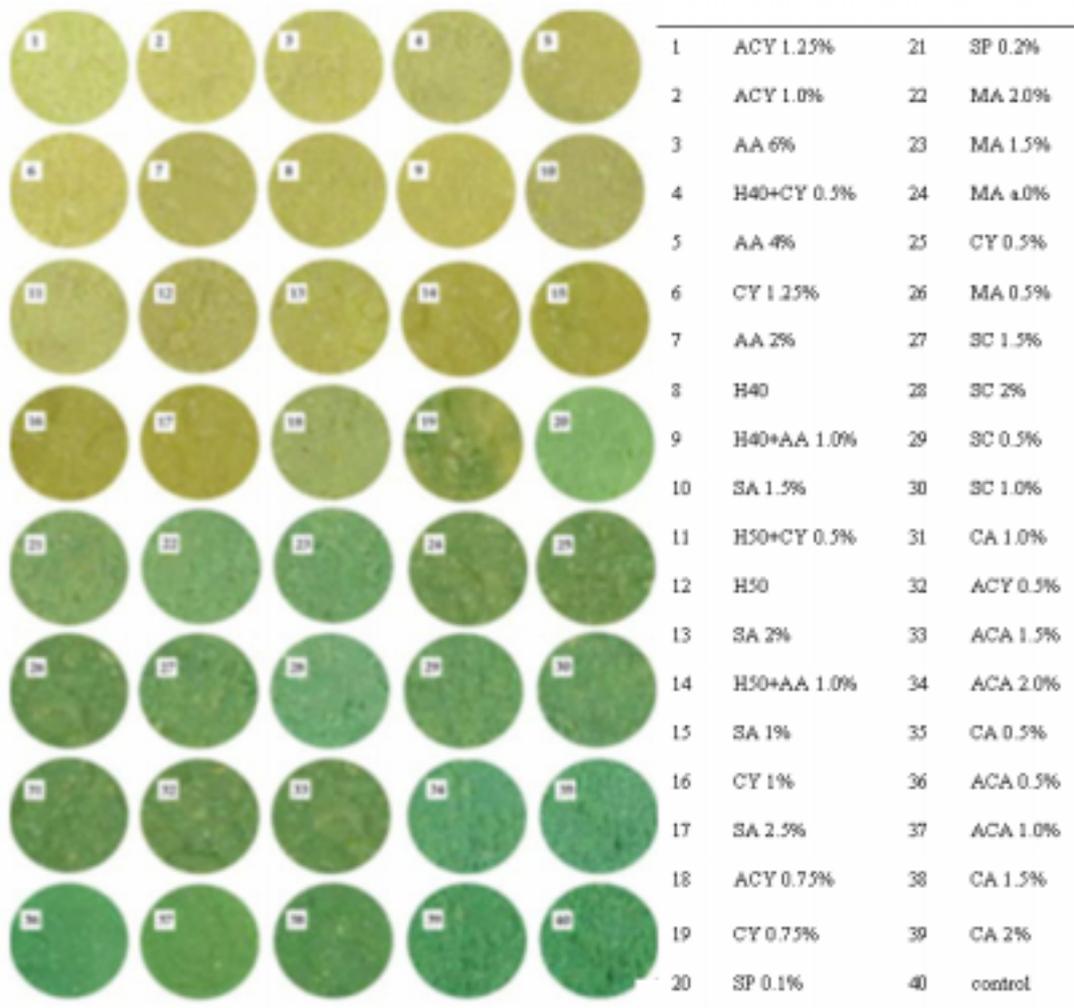


Fig. 15. Color formation in crushed garlic depending on chemical and thermal treatments after storage at 4°C for 24 h; AA, ascorbic acid; CY, cysteine; ACY, acetyl cysteine; H40, heat 40°C for 24 h; H50, heat 50°C for 24 h; SA, sodium ascorbate; SC, sodium chloride; MA, malic acid; CA, citric acid; ACA, acetic acid; SP, sodium phosphate.

(Jansen 등, 1989). 녹변은 마늘의 유황화합물은 1-PeCSO와 효소 alliinase의 효소 반응으로서 열처리를 실시하였을 때 억제되는 효과가 나타났다. 열처리의 경우 50°C에서 처리한 경우 약간의 갈변이 나타나서 색변화는 40°C 처리 시 더 좋게 나타났으며 CY 0.5%와 복합 처리 시 효과가 더 좋았다. AA와의 복합 처리 시 갈변이 심해지는 단점을 보였으며 처리 온도와 농도가 높을수록, 갈변의 정도가 심하게 나타났다. 이러한 갈변은 항산화력이 높을 때 갈색의 melanoidins을 형성하면서 나타나는 반응인 maillard reaction으로 보이며(Manzocco 등, 2001), maillard reaction은 특히 열처리 온도가 높고 시간이 길어질수록 반응이 활발해져서 갈변이 심하게 나타난다고 보고된 바 있다(Anses 등, 1999; Nicoli 등, 1999).

마쇄마늘의 색 변색을 측정하기 위해 Hunter-Scofield 방정식을 이용하여 ΔE 값으로 나타내었고, Hunter-Scofield 방정식은 녹색과 연관된 a값 뿐 만 아니라 L, a, b값 모두가 관여된 방정식이므로 녹변 뿐 만 아니라 마쇄마늘의 또 다른 문제점인 갈변까지도 확인할 수 있다. ΔE 값은 색의 변화를 나타내므로 마쇄 직후의 초기값은 0으로 시작된다. ΔE 값은 AA(4-6%), ACY(1-1.25%), H40+CY(0.5%)에서 가장 낮게 나타났으며, CY 1.25%와 AA 2%가 그 다음 순으로 나타났다(Table 7). 유기산(acetic acid, malic acid, citric acid)과 염(sodium chloride, sodium phosphate) 등은 녹변에 거의 효과가 없었다. ACA의 경우 녹변 억제에는 효과가 있었으나, 아직 식품첨가물로서 허가가 나지 않은 상태이기 때문에 사용은 불가능한 화학제이기 때문에 pyruvic acid, sugar, flavor 등의 품질 평가 시 배제하였다.

이상의 결과로 녹변 억제에 가장 효과적인 화학제는 ascorbic acid와 cysteine이었으며 sodium ascorbate는 어느 정도 효과는 있었으나, 상품화하기에는 효과가 미흡했다.

Table 7. Rate of color change (ΔE) chemical and thermal treatments; CA, citric acid; MA, malic acid; ACA, acetic acid; AA, ascorbic acid; CY, cysteine; ACY, acetyl cysteine; SA, sodium ascorbate; SC, sodium chloride; SP, sodium phosphate; H40, heat 40°C for 24 h; H50, heat 50°C for 24 h

chemical	concn	ΔE	
		12 h	24 h
Control		20.9 a	28.6 a
CA	0.5%	22.5 a	24.8 c
	2.0%	18.7 b	26.6 b
MA	0.5%	9.5 gh	17.9 ef
	2.0%	11.1 efg	17.3 f
ACA	0.5%	18.5 b	25.7 bc
	2.0%	11.7 def	21.9 d
AA	2.0%	5.1 jk	4.6 l
	4.0%	3.3 kl	3.2 mn
	6.0%	2.7 lm	2.6 n
CY	0.5%	12.4 de	17.5 ef
	1.0%	2.5 lm	12.1 h
	1.25%	4.4 kl	4.0 lm
ACY	0.5%	11.4 ef	18.8 e
	1.0%	2.8 lm	2.5 n
	1.25%	2.6 lm	2.3 n
SA	1.0%	6.5 ij	7.9 j
	2.5%	8.0 hi	8.8 ij
SC	0.5%	14.3 c	18.2 ef
	2.0%	13.5 cd	18.1 ef
SP	0.1%	11.1 efg	15.8 g
	0.2%	12.5 cde	15.9 g
H40		4.5 kl	5.8 k
H40 + AA	1.0%	3.7 kl	6.2 k
H40 + CY	0.5%	1.3 m	2.6 n
H50		9.4 gh	8.7 ij
H50 + AA	1.0%	9.9 fgh	9.9 i
H50 + CY	0.5%	7.9 hi	8.0 j

열처리는 녹변 자체의 억제 효과는 인정되나, 열로 인해 마늘이 익고, 품질이 저하되며 갈변이 발생하는 단점이 드러났다.

나. 양파 파우더 처리

양파에는 마늘에는 존재하지 않는 눈물을 자극하는 최류성의 lachrymatory factor가 있고, 이 화합물을 합성하는 LF synthase 효소가 존재한다. 양파와 마늘의 황화합물과 효소에 의해 일어나는 반응의 경로는 Fig. 16과 같으며 lachrymatory factor (propanthiol-S-oxide)가 만들어지는 간략한 모식도는 Fig. 17과 같다. Lachrymatory factor는 1-PeCSO와 alliinase 효소가 반응한 후 생성된 sulfenic acid가 thiosulfinate로 형성되지 않고, LF synthase와 반응하여 만들어 지는 최류성 물질이다. 마늘의 녹변은 1-PeCSO와 alliinase 효소가 반응한 후 thiosulfinate가 아미노산과 반응하여 발생된다고 알려져 있으며, 본 연구에서는 이 점에 착안하여 양파 파우더를 첨가하여 1-PeCSO와 alliinase 효소의 반응 후 LF synthase에 의해 thiosulfinate의 생성을 억제시켰다. 양파 파우더의 효소를 이용하는 방법이므로 파우더 제조는 열풍건조가 아닌 동결건조법을 이용하였으며 처리 결과는 Fig. 18과 같다. 마늘마늘에 양파 파우더를 처리한 결과 녹변이 억제되었으며, 마늘 중량의 1.5%를 처리하였을 때의 Hunter 'a' 값이 초기치와 가장 근접한 -3.56으로 가장 효과가 좋았다. 특히 1.5% 처리구에서는 녹변을 눈으로 확인할 수 없어 상품화도 가능한 것으로 사료된다. 0.5%부터 점차 효과가 좋아지다가 1.5%를 정점으로 2%부터는 오히려 1.5%보다 Hunter 'a' 값이 낮게 나와 효과가 떨어지는 것을 확인할 수 있는데, 이는 양파 파우더에는 LF synthase도 존재하지만, 녹변의 기질로 작용하는 1-PeCSO도 상당량 존재해서 오히려 녹변이 진행되는 것으로 추측된다. 이와 같은 양파 파우더를 처리하여 마늘의 녹변을 억제하는 방법은 소비자들이 기피하고, 맛의 변형이 있는 화학제의 단점과 품질 손상이 일어나고 갈변이 발생하는 열처리 방법의 단점을 보완해 줄 것으로 기대된다.

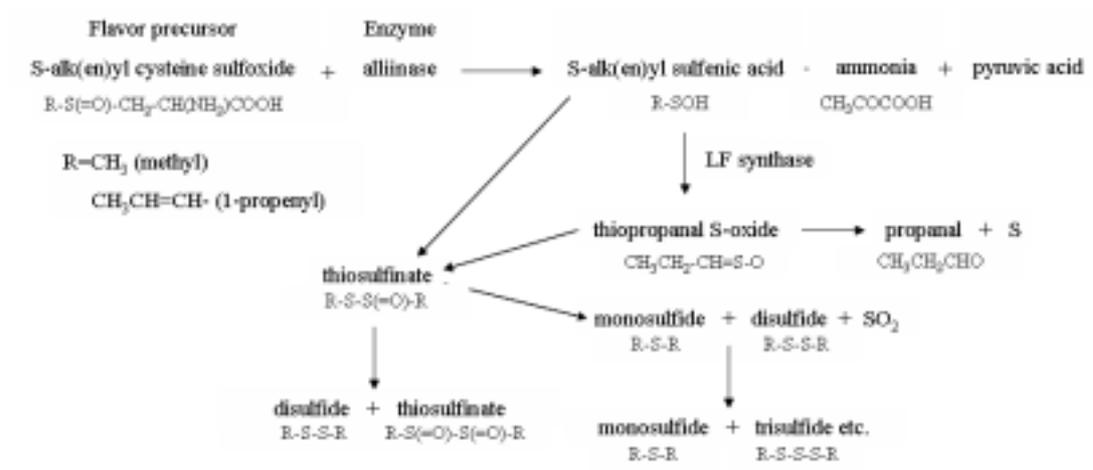


Fig. 16. Reaction pathway of ACSOs and alliinase in *Allium* spp.

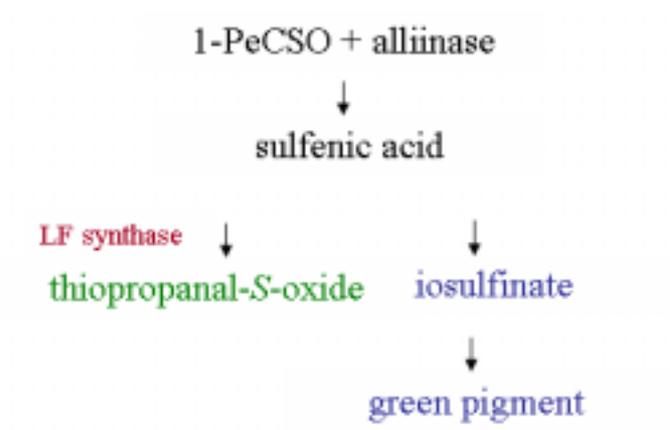


Fig. 17. Formation of lachrymatory factor (propanthiol-S-oxide) in onion.

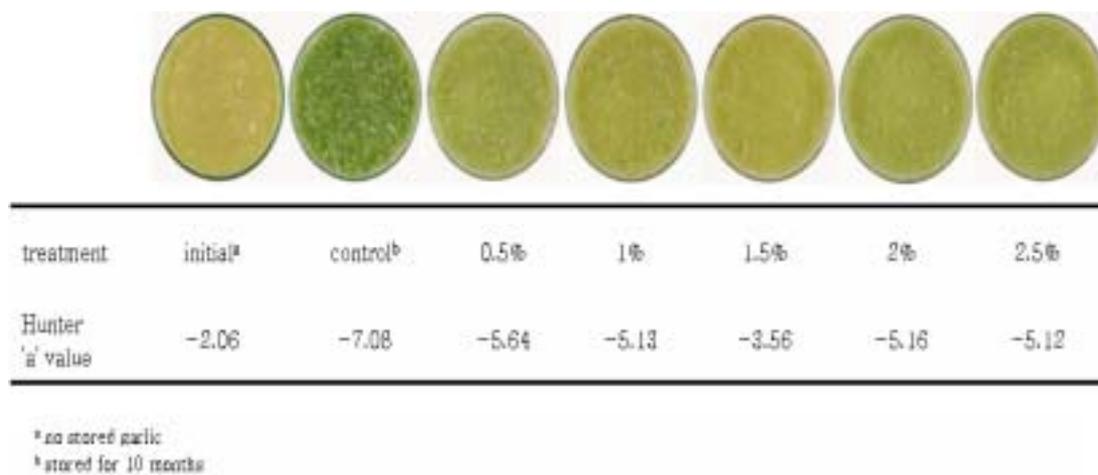


Fig. 18. Color formation in crushed garlic by onion powder treatment after storage at 4°C for 24 h

다. 피루브산, 유리당, fructan 함량

화학제 및 열처리가 마쇄 마늘의 품질에 미치는 영향을 알아보기 위해 피루브산과 유리당, fructan 등의 당 함량을 측정된 결과 Table 8, Fig. 19와 같았다. 마늘 녹변은 건전한 인편에서는 나타나지 않고 반드시 인편을 마쇄하였을 때에만 보여 지는 현상이다. 따라서 증가한 향미성분 전구체들이 실제로 녹변을 나타내는 녹색 색소를 만들어 내기 위해서는 효소 알리네이즈의 작용을 받을 것으로 예상된다. 피루브산 함량은 저장 초기에는 73.7mM이며 10달간 저장한 처리구에서는 103.6mM로서 저장기간이 증가함에 따라 효소활성과 피루브산 함량은 증가하는 경향을 보였다. 피루브산은 효소반응의 결과 생성되는 물질이므로 열처리에 의해 감소하였다. 40°C에서 24시간 처리 시 40.1이었으며 50°C에서 24시간 처리 시 33.1mM로서 처리 온도가 높아질수록 피루브산 함량은 감소하고, 이로서 알리네이즈 활성도 감소하는 것을 추측할 수 있다. 피루브산은 마늘의 유효화합물과 알리네이즈 효소의 반응 결과 생성되는 생성물이므로 열처리에 의해 알리네이즈 활성이 약해져 피루브산 함량도 감소하는 것으로 추정된다. 또한 피루브산 함량은 녹변과도 상관관계를 보여 피루브산 함량이 가장 높은 10개월간 저장 무처리구에서 녹변 정도를 나타내는 Hunter 'a' 값이 가장 낮게 나와 녹변의 정도가 심함을 알 수 있으며, 녹변이 발생하지 않는 저장 초기구와 40°C 열처리구에서는 피루브산 함량이 낮게 나타남을 알 수 있다. 50°C 처리구는 녹변은 발생하지 않았지만 약간의 갈변이 발생하여 Hunter 'a' 값이 녹변이 발생하지 않은 저장초기구보다 높은 0.04가 나왔다. Ascorbic acid와 cysteine의 처리 시 피루브산의 함량은 대조구와 대비하여 큰 차이가 없어서 ascorbic acid와 cysteine는 알리네이즈 활성화에 영향을 미쳐 녹변을 억제하는 것은 아닌 것으로 추정된다(자료 미 제시).

마늘에 존재하는 sucrose, fructose, fructan 등의 당을 정량한 결과 Fig. 19와 같다. Sucrose, fructose의 경우 저장 기간, 열처리 등에 영향을 받지 않아 처리구 간 유의차가 나타나지 않았다. 하지만 fructan의 경우 저장 기간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였으며, 열처리에 의해 큰 폭으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Fructan은 장내 유용세균인 bifidobacteria의 증식에 이용되어 최근 기능성 성분으로 주목받고 있으며, 마늘의 독특한 풍미에 영향을 미치는 주요 성분이다. Ascorbic acid와 cysteine 처리 시 당 성분의 변화는 나타나지 않았으나(자료 미 제시), 열처리 시 함량이 줄어 열처리가 마늘 품질을 저하시키는 것을 알 수 있었다.

Table 8. Change of pyruvic acid concentration by thermal treatments.

Treatment temp. (°C)	Pyruvic acid concn (mM)	Hunter 'a' value (24 h later)
initial ^a	73.7 b	-2.10 b
no heat ^b	103.6 a	-6.33 c
40 ^c	40.1 d	-1.97 b
50 ^d	33.1 de	0.04 a

^anon stored garlic

^b6 months stored garlic without any treatment

^cthermal treatment at 40°C for 24 h

^dthermal treatment at 50°C for 24 h

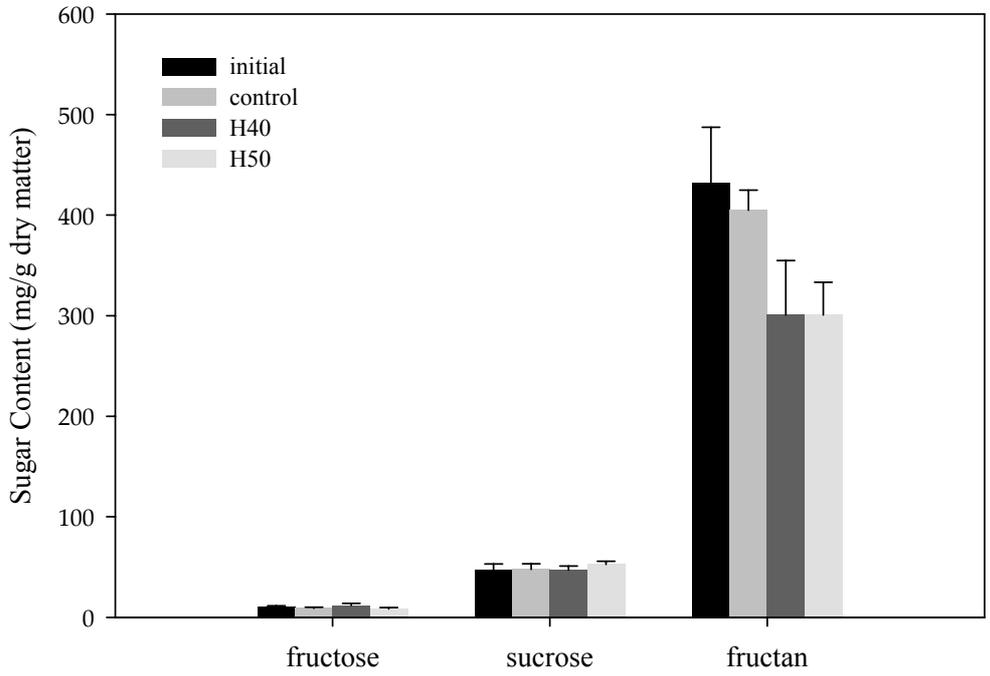


Fig. 19. Changes of free fructose, sucrose, and fructan contents by thermal treated garlic cloves.

라. 향기성분 동정

처리별 마늘의 향기성분을 분석한 결과는 Table 9와 같다. GC를 이용하여 향기성분을 분리한 결과 11개의 주요 피크를 얻었으며 각 성분은 GC/MS로 동정하였다. 11종의 향기성분은 황함유화합물 9종을 차지하여 마늘의 주요 향기성분은 황을 함유하는 것을 알 수 있었으며, 황함유화합물 중 diallyl disulfide가 총 피크면적의 50% 가량을 차지하는 것으로 나타나 마늘의 가장 중요한 향기성분임을 알 수 있었다.

처리별 마늘의 향기성분을 총 피크면적을 기준으로 볼 때 cysteine 처리구가 가장 높았고, 10개월간 저장구가 그 다음이었으며 50°C에서 24시간 동안 저장 초기 수준으로 낮게 나타났다. GC/MS로 동정한 결과를 살펴보면 저장 초기 시료의 경우 diallyl disulfide 51.0%, 4-mercapto-3-methyl thiocrotomic acid 21.9%, diallyl trisulfide 10%, methyl allyl disulfide 6.8% 순으로 나타났으며, 10개월간 저장한 마늘의 경우 47.4%, 34.5%, 3.3%, 3.1%를 나타냈고, 50°C에서 24시간 동안 열처리구에서는 54.1%, 17.1%, 9.6%, 7.3%였고, cysteine 0.5% 처리구에서는 33.3%, 36.9%, 1.4%, 11.4%로 나타났다. 각 처리에 따라서 향기성분의 피크면적의 변화가 나타났으며, 특히 cysteine 처리 시 총 피크면적이 10개월간 저장한 마늘보다 68% 가량 증가하였으며 4-mercapto-3-methyl thiocrotomic acid의 증가가 두드러졌다. 열처리의 경우 총 피크면적이 저장 초기구의 총 피크면적보다 낮게 나와 열처리로 인한 향기 성분의 감소를 확인할 수 있었으며, 이는 열처리로 인해 효소 alliinase의 활성이 낮아져서 상대적으로 황함유화합물의 생성이 억제되었기 때문이다. 향기성분 분석을 위해 headspace법을 택하였는데, allicin은 매우 불안정한 화합물로서 주로 diallyl disulfide등의 더욱 휘발성이 강한 저분자로의 분해가 쉽게 이루어지기 때문에 headspace법으로는 검출이 어려워 본 실험에서는 검출되지 않았다.

마늘의 향기성분은 alliin이 alliinase에 의하여 allicin 등의 thiosulfinate로 되고 thiosulfinate가 분해되어 안정한 황화합물, 알코올 및 알데하이드 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다(Shin et al., 1999). 기존의 보고에 의하면 마늘의 황화합물은 thiosulfinate가 분해되어 diallyl disulfide를 형성하고 이것이 마늘 중에 존재하는 소량의 methyl 및 propyl 유도체 화합물들과 상호 작용하여 disulfide 및 trisulfide 등의 보다 복잡한 황화합물을 생성한다고 알려져 있다.

Table 9. Effects of chemical and thermal treatments in volatile composition in crushed garlic.

(unit: peak area/10,000)

No	material	no storage	10 months storage		
		initial area	control area	H50 ^a area	CY ^b area
1	diallyl-monosulfide	711	351	1299	1135
2	methyl allyl-disulfide	1513	1784	1364	10801
3	trans propenyl methyl-disulfide	369	531	128	7653
4	diallyl-disulfide	11349	26818	13356	31586
5	allyl thio crotonic acid	552	4014	468	6297
6	4-mercapto-3-methyl thio crotonic acid	4888	19531	2638	34965
7	methyl allyl-trisulfide	-	973	200	635
8	3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-dithin	104	67	-	-
9	2-vinyl-4-H-1,3-dithin	311	169	-	-
10	diallyl-trisulfide	2237	1899	1531	1401
11	1-propenyl trisulfide diallyl tetrasulfide	195	226	205	210
	Total	22229	56363	21189	94683

^a Heat treatment at 50°C for 24 h

^b Cysteine 1.25%

마. 항균 실험

화학제 및 열처리한 마쇄마늘의 항균성 실험 결과는 Fig. 20, 21과 같다. 10개월간 저장 후 아무 처리도 하지 않은 마늘에서의 총 균수는 1.16×10^4 CFU/g이고, 40°C에서 24시간 열처리한 마늘에서의 총 균수는 1.66×10^4 CFU/g이었다. Ascorbic acid와 cysteine 처리 시 균이 전혀 발견되지 않았는데, 이는 ascorbic acid와 cysteine 처리로 인해 pH가 낮아졌기 때문으로 추측된다. Ascorbic acid 6% 처리 시 pH는 3.9였고, cysteine 1.25% 처리 시 pH는 4.1이었다. Jay(1996)에 의하면 식품에 있어서 pH는 미생물과 화학 반응에 연관되어 있는 인자로서 세균 번식에 있어서 최적 pH는 7 정도이며, pH가 4 이하일 경우 세균 번식이 억제된다고 하였다. 무처리구와 열처리구에서는 균이 발견되었고, 이 때의 pH는 각각 5.5와 5.8이었다. 특히 열처리는 무처리구보다 총 균수가 증가하는 경향을 보여 항균성에서는 부정적인 효과를 나타냈다.



	control	ascorbic acid 6%	cysteine 1.25%	40°C for 24 h
	control	AA 6%	CY 1.25%	H40
pH	5.5	3.9	4.1	5.8

Fig. 20. The total viable cells and pH values of ascorbic acid, cysteine and thermal treatment.

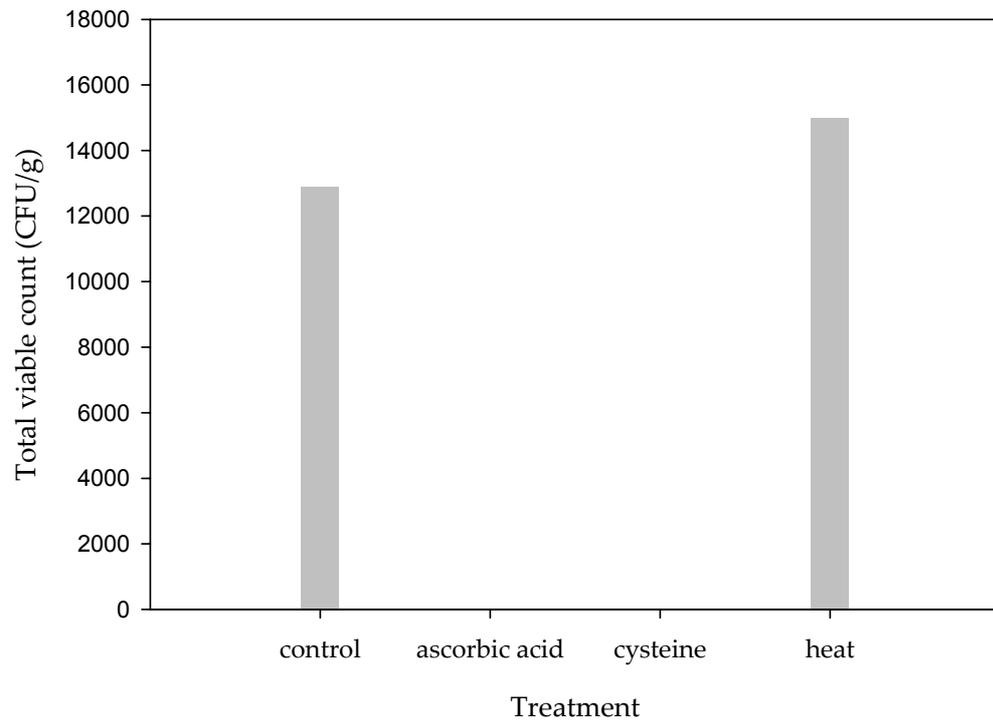


Fig. 21. Total viable microbial cells in crushed garlic with 6% ascorbic acid, 1.25% cysteine, and thermal treatment at 40°C for 24h

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 목표달성도

1. 녹변물질 분리 방법 확립 및 순수 분리

연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
녹변물질 분리	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹변 마늘 유기 및 시료 확보 - 우리나라 마늘 주요 재배지에서 생산된 마늘 품종 - 스페인산(대서마늘), 대만산, 육쪽마늘 - 6개월 이상 0°C에 저장하여 녹변 마늘 유기 - 미지의 녹색물질에 대한 기본 적인 정보를 얻기 위한 연구 - 다양한 용매에 따른 용해도 확인 - 흡광도 확인 등 	달성
방법 확립 및 순수 분리	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미지의 물질 순수 분리 방법 자료 수집 - 천연물 화학, 유기화학 등을 연구하는 학문과 연계 (서울대학교 농화학과 농약학연구실) - Organic chemistry index에 등재되어 있는 유사 물질 탐색 - 각종 문헌에 게재된 자료 수집하여 최적의 분리 방법 확립 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹변물질 순수 분리 방법 확립 - 다양한 Column chromatography를 이용한 방법 - HPLC를 이용한 방법 - TLC를 이용한 방법 등 	달성

연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
녹변물질 분리 방법 확립 및 순수 분리	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹변물질 순수 분리 - 1차 년도에 확립된 분리 기술 정립 및 실제적 분리 - 녹변 마늘로부터 녹색물질 각각을 순수 분리함 - 이들을 질량분석, 핵자기공명 분석을 위한 시료로 사용 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹변물질 형성에 사용되는 예상 물질들을 이용하여 녹변물질 합성 - 향미성분 전구체+글라이신+포름알데하이드 - 합성된 녹변물질과 순수 분리된 녹변물질의 유사성 검증 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 순수 분리된 녹변물질의 산업적 이용 가능성 확인 - 탐색 녹변물질 형성을 억제 할 수 있는 외부 첨가제(천연물질) 탐색 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 보완 사항으로 지적된 분리물질의 특성 및 생리구명 내용은 물질 분리가 안 된 현 상황에서 신종 호르몬이나 옥신 전구물질로 전제하고 실험을 수행하는 것이 현실적으로 불가능하므로 1차적으로 물질구명이 이루어진 이후에 물질의 특성에 대한 평가를 실시할 계획임 	달성

2. 녹변 현상 원인 및 기작 구명

연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
녹변물질 동정 및 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미지의 물질 탐색을 위한 자료 수집 - 질량 분석(MS chromatography), 핵자기공명(NMR) 등을 이용한 연구의 자료 및 정보 수집 - MS와 NMR 분석을 위한 최적의 분리 방법 및 분리 조건 확립 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 순수 분리된 녹변물질 분자량 확인 - 질량분석기: EI, ESI, FAB, MALDI-TOF-MS 이용 - 5회 이상 반복 실험을 통한 확인 연구 - 녹변물질의 구조 추정 	달성
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 순수 분리된 녹변물질의 화학적 분자 구조 확인 - 핵자기공명(¹H, ¹³C NMR) 이용 - IR 이용 - 5회 이상 반복 실험을 통한 확인 연구 	90%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ MS, NMR 결과를 이용한 녹색물질 동정 - 기존의 Organic chemistry index에 등재된 물질에서 유사 물질 탐색 - 인터넷 자료 (Chemical finder)를 통한 유사 물질 탐색 	90%

연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
녹변물질 동정 및 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ MS, NMR을 이용한 물질 분자량 및 구조 추정을 위한 연구 계속 진행 ○ 최종적으로 순수 분리된 녹변물질이 새로운 물질로 관명 시 Organic chemistry index 등재 ○ 녹변물질 구명 시 녹변물질 안전성 검증 및 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 안전성 검증 시 녹변 마늘 이용 가능성 확대 - 타 학문으로 확대 이용 가능 	<p>달성</p> <p>80%</p> <p>80%</p>

제 2절 관련분야에의 기여도

1. 마쇄마늘 녹변물질 및 기작 구명 부분

마쇄마늘 녹변 현상은 식품 및 수확 후 관리 분야에서 그동안 미지의 연구 분야였다. 본 연구를 통하여 녹변현상은 수확 후 저온저장에 의하여 나타나는 일종의 생리현상임을 분명하게 밝혔음은 물론, 녹변을 유발하는 녹색물질은 미지의 물질이며 이를 순수 분리하여 부분적 분자구조 및 특성을 처음으로 제시하여 2006년 SCI 저널인 Food Chemistry에 게재하여 발표하도록 확정되었다. 이러한 연구업적은 관련분야에서 처음으로 시도되는 것들이었으며, 이러한 결과는 녹변방지 기술을 개발하여 특허를 출원할 수 있는데 뒷받침이 되었다.

2. 마쇄마늘 녹변 방지 기술 부분

그 동안에 이루어진 수많은 녹변 억제 기술은 녹변현상 기작에 대한 정확한 연구나 정보가 없이 시도된 것들이다. 하지만 본 연구를 통하여 밝혀진 기작은 녹변을 억제하기 위한 기술을 개발하고 특허를 내는데 중요한 기여를 하였다. 즉, 양파 파우더를 제조하여 첨가 시 녹변을 방지할 수 있음을 밝혀낸 본 연구의 기술은 녹변 발생 기작에 근거하여 개발된 것이다. 기존의 열처리, 다양한 화학 물질 첨가 등을 이용하여 개발된 방지법은 녹변이 어떻게? 그리고 왜? 발생하는지에 대한 기본적인 이해 없이 개발된 것이 대부분이라 사실상 녹변의 완벽한 제어가 불가능 하였다. 본 연구에서는 녹변현상에 대한 의문점과 근본적인 해결책을 처음으로 함께 제시하였다.

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구를 통한 연구 결과들은 다음과 같이 활용할 계획에 있다.

1. 특허(2006년 5월 11일 출원)

제목: 다진 마늘의 녹변 억제 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 다진 마늘

영문제목: METHOD TO INHIBIT GREENING OF CRUSHED GARLIC AND THE CRUSHED GARLIC THEREBY

요약: 본 발명은 화학첨가제를 처리하거나 가열처리하지 않고 마늘 자체의 맛과 향을 유지하면서 다진 마늘의 녹변을 억제하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 다진 마늘을 제공하는 것을 목적으로 한다.

이를 위해 본 발명에 따른 다진 마늘의 녹변 억제 방법은, 저온저장고에서 출고된 마늘을 박피 및 세척하고, 동결 건조시킨 양파 파우더를 준비하는 단계와; 상기 준비된 마늘의 일정량에 1중량% 내지 2.5 중량%의 양파 파우더를 첨가한 후 마늘과 양파 파우더가 잘 혼합되도록 섞으면서 다지는 단계를 포함하는 것을 기술적 특징으로 한다.

2. 논문 게재

1) Food Chemistry 게재확정(2006년)

제목: Green Pigment in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves: Purification and Partial Characterization

2) 한국원예학회 게재예정(2006년)

제목: Effect of Storage Temperature and S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxide on Green Pigment Formation in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves

3) Food Science and Biotechnology 게재예정(2006년)

제목: Predicted Reaction Involved in Green Pigment Formation ('Greening') of

3. 학술대회 발표

1) 2004년 추계원예학회 포스터 발표

제목: 저장 온도 및 품종이 마쇄마늘 녹변에 미치는 영향

요약: 품종 및 저장 온도가 마쇄 마늘 녹변에 미치는 영향과 미지의 녹색물질을 탐색하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 2004년에 산청, 남해, 의성 지역에서 각각 재배 수확된 대서(밭마늘, 논마늘), 남해, 육쪽(밭마늘, 논마늘) 마늘을 상온에서 2주간 건조 후 0, 5, 10, 15, 25°C에 두면서 녹변 발생을 관찰하였다. 그 결과 25°C 이외의 모든 처리 구에서 저장 약 2달 후부터 녹변이 관찰되었으며, 온도가 낮아질수록, 저장기간이 길어질수록 녹변 발생 정도는 심하였다. 특히 같은 저장 조건하에서 대서 마늘은 Hunter 'a' 값이 -10.07로, -5.79인 남해와 -6.72인 육쪽 마늘에 비해 현저히 낮아 녹변 발생 정도가 가장 심하였다. 그러나 밭마늘과 논마늘의 차이는 관찰되지 않아 마늘 녹변은 수확 후 저장 온도에 가장 큰 영향을 받는 것으로 조사되었다. 녹변 마늘에서 나타나는 미지의 녹색물질을 다양한 크로마토그래피로 순수 분리 하여 질량분석기로 확인한 결과 녹색물질의 분자량은 411로 최종 확인되었다.

2) 2005년 춘계원예학회 포스터 발표

제목: 녹변마늘로부터 분리된 미지의 녹색물질 분자구조 동정

요약: 녹변마늘에서 나타나는 미지의 녹색물질을 순수 분리하고 분자구조를 동정하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 2004년에 산청, 남해, 의성 지역에서 각각 재배 수확된 대서, 남해, 육쪽 마늘을 0°C에서 3개월간 저장한 후 마쇄하여 나타난 녹색물질을 Amberlite XAD-16과 Sephadex LH-20을 이용한 컬럼 및 액체 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리하였다. 최종적으로 분리된 녹색물질을 핵자기공명(¹³C, ¹H, DEPT135, TOCSY, COSY, HMQC, HMBC), FT-IR, 질량분석(EI, LC-ESI, FAB, MALDI-TOF/MS) 등의 방법을 이용하여 분자량을 확인하고 분자구조를 동정하였다. FT-IR로부터 얻어진 정보를 라이브러리 검색한 결과 미지의 녹색물질은 코코넛 추출물인 coconut oil diethanolamide(NH(CH₂CH₂OH)₂, 분자량 105.14) 분자와 유사한 작용기를 갖고 있으며, 25개에서 28개의 탄소(C)와 산소(O) 1 또는 3개, 질소(N) 1 또는 3

개, 황(S) 1개를 각각 포함하고 있는 것으로 조사되었다. 또한 벤젠고리를 포함한 세 개의 주요 분자 fragment들이 녹색물질의 분자구조를 이루고 있음을 확인하였고 이를 처음으로 제시하였다.

3) 2005년 추계원예학회 포스터 발표

제목: Control of Greening by Chemical and Thermal Treatments in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves

요약: A study was conducted to control greening in crushed garlic. The storage quality of crushed garlic with organic acids, antioxidant, salts, cysteines, and thermal treatments was investigated. Quality attributes of processed garlic were evaluated in terms of color, pH, flavor, pyruvic acid, and sugar content. Overall, the treatments with ascorbic acid (6%) or cysteine (1.25%) showed the best storage stability in crushed garlic. Thermal treatments were achieved at 40 or 50°C for 24 h and combined with ascorbic acid (2%) and cysteine (0.5%). While thermal treatments were effective in preventing discoloration, some browning showed in high temperature treatment over 50°C, especially in the combination treatment with ascorbic acid. Heat treatment reduced pyruvic acid content. Pyruvic acid content displayed a positive correlation between the amount of pyruvic acid and greening in crushed garlic. Garlic flavor was enhanced by cysteine treatment, but reduced by thermal treatments, respectively.

4) 2006년 국제원예학회 포스터 발표예정

제목: Isolation and Characterization of Green Pigment in Crushed Garlic (*Allium sativum* L.)

요약: Unknown green pigments, responsible for greening in crushed garlic, were purified using a series of column chromatography and identified using liquid chromatography-electrospray ionization (LC-ESI), matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), and magnetic nuclear resonance (NMR) spectroscopy (C^{13} , H^1 , DEPT 135, COSY, TOCSY, HMBC, HMQC). Green pigment extracted from crushed garlic showed two

maxima of absorbance at 440 and 590 nm. LC-ESI and MALDI-TOF MS suggested that molecular weight (MW) of green pigment. Molecular ion having a peak at m/z 412 was the compound that resulted in greening. The complete isolation of compound for proper structure elucidation was not achieved under the chromatographic conditions examined. It consisted of one sulfur atom and one or three nitrogen atoms, and 25 to 30 carbon atoms. The presence of methyl and carbonyl group, alcoholic carbons, and an aromatic ring in the chemical could be obtained from C^{13} spectrum of NMR spectroscopy. The observed values for an aromatic ring were 137.6, 130.0, 126.2, and 128.2 ppm, which indicate that these substituents are related to aromatic ring in *meta* position. The carbonyl carbon does not appear in the DEPT135 spectrum since it has no attached hydrogen atoms.

5) 2006년 국제원예학회 포스터 발표예정

제목: Why Greening in Garlic and Pinking in Onion?

요약: *Allium* discoloration, greening in garlic (*Allium sativum* L.) and pinking in onion (*Allium cepa* L.) during processing, has been studied. These discolorations are originated from reactions with alliinase and ACSOs (alk(en)y cysteine sulfoxide), especially 1-propenyl cysteine sulfoxide (1-PeCSO, isoalliin). Despite the formations of both pigments are very similar in nature, generated pigments are green in garlic and pink in onion. To obtain differences in the mechanism of color formation, model solution was made mixing heated onion extracts and crude garlic enzyme (alliinase) with different ratio. As crude garlic enzyme concentration was high, colored pigment was green, and as concentration of heated onion extracts was high, pink pigment was formed. Color variation was caused by different enzyme concentration against same amount of cooked onion extracts. While trace of 1-PeCSO and high amounts of alliinase were present in garlic, high amounts of 1-PeCSO and low amount of alliinase were in onion.

제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

(해당사항 없음)

제 7장 참고문헌

- Anses, M., L. Manzocco, M.C. Nicoli, and C.R. Lerici. 1999. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *J. Sci. Food Agric.* 79:750-754.
- Bae, R.N. and S.K. Lee. 1990. Factors affecting greening and its control methods in chopped garlic. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 31:358-362.
- Bandyopadhyay, C. and G.M. Tewari. 1973. Thin-layer chromatographic investigation of color developer involved in pinking of white onion purees. *J. Agric. Food Chem.* 21:952-954.
- Francis, F.J. and F.M. Clydesdale. 1975. *Food chemistry: Theory and applications.* The AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Jansen, H., B. Muller, and K. Knobloch. 1989. Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: Investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and on a new coenzyme. *Planta Med.* 55:440-445.
- Jay, J.M. 1996. *Modern food microbiology.* 5th ed. Chapman & Hall, New York.
- Joslyn, M.A. and R.G. Peterson. 1958. Reddening of white onion bulb purees. *J. Agric. Food Chem.* 6:754-764.
- Joslyn, M.A. and T. Sano. 1956. The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue. *Food Research* 21:170-183.
- Kubec, R., M. Hrbacova, R.A. Musah, and J. Velisek. 2004. *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* 52:5089-5094.
- Lukes, T.M. 1959. Pinking of onions during dehydration. *Food Technol.* 13:391-393.
- Lukes, T.M. 1986. Factors governing the greening of garlic puree. *J. Food Sci.* 51:1577, 1582.
- Manzocco, L., S. Calligaris, D. Mastrocola, M.C. Nicoli, and C.R. Lerici. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.* 11:340-346.
- Nicoli, M.C., M. Anese, and M. Parpinel. 1999. Influence of processing on the

- antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 10:94-100.
- Pontis, H.G. 1990. Fructan. p. 353. In: P.M. Dey and J.P. Harborne (eds.). *Methods in plant biochemistry*. Vol. 2. Academic Press. New York.
- Shannon, S., M. Yamaguchi, and F.D. Howard. 1967a. Precursors involved in the formation of pink pigments in onion purees. *J. Agric. Food Chem.* 15:423-426.
- Shannon, S., M. Yamaguchi, and F.D. Howard. 1967b. Reactions involved in formation of a pink pigment in onion purees. *J. Agric. Food Chem.* 15: 417-422.
- Shin, D.B., J.B. Hwang, and Y.C. Lee. 1999. Effects of pre-heating on the flavor of garlic. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:1583-1588.
- 신호선, 김현구. 1987. 아황산처리 및 건조온도가 건조마늘 플레이크의 품질에 미치는 영향. *논문집.* 26:297-311.