

Alliinase 활성화 처리법을 이용한 총백 추출법 개발

김혜원 · 김범식¹ · 김영은 · 고상훈*
세종대학교 식품공학과, ¹경일대학교 식품과학부

Development of Extraction Method for Welsh Onion Root by Alliinase Activation

Hye Won Kim, Bumsik Kim¹, Yeongeun Kim, and Sanghoon Ko*

Department of Food Science and Technology, Sejong University
¹Faculty of Food Science, Kyungil University

Abstract

The objective of this study is to improve allicin extraction from Welsh onion root (*Allium fistulosum* L.) by adjusting various extraction conditions such as the composition of extraction solvent, extraction time, and alliinase activation. Welsh onion root was extracted at different temperatures, ethanol (EtOH)/water ratios, and extraction periods to collect alliin- and allicin-enriched extract. The extract was analyzed by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) to quantify alliin and allicin. As a result, content of alliin and allicin extracted at 70°C in 70% ethanol for 2 h was 75.992 mg/g and 1.371 mg/g, respectively. In addition, prior to extraction, powdery Welsh onion root was immersed in water shaken for 30 min to activate alliinase in it. The water-soaking treatment improved allicin extraction and resulted in 0.111 mg/g allicin content in the final extract.

Key words: Welsh onion, alliin, allicin, alliinase, extraction

서 론

대파(*Allium fistulosum* L.)는 전세계적으로 널리 재배되고 있는 *allium* 속의 다년생 초본식물로, 특히 한국에서는 중요한 식물자원으로 연간 생산량이 500,000톤에 달하고 있다(Sohn et al., 2006). 마늘, 양파, 대파 등이 포함되어 있는 *allium* 속은 예로부터 우리 식단에서 중요한 부식으로 소비되어 왔고, 최근에는 다양한 생리적 기능에 관한 연구가 활발히 진행되면서 이들 *allium* 속에 대한 관심이 높아지고 있다(Song et al., 2009).

Allium 속의 특성은 조직이 분해되는 동안 생산되는 황 함유 휘발물질에 기인하는데, 기존에 수행된 대부분의 연구는 마늘(*Allium sativum*)의 추출물에 존재하는 물질인 allicin (diallylthiosulfinate)의 생리활성을 규명하는 것에 집중되어 있다. Allicin은 식물체내에서 불활성 전구체인 alliin (S-allyl-L-cystein sulfoxide)으로부터 alliinase라는 효소의 작용으로 세포가 파괴되면서 효소적으로 생성되는데,

allicin과 비효소적 분해산물인 thiosulfinate가 생체내의 thiol기와 강하게 반응하여 세포대사를 억제함으로써 항균 작용, 항진균작용, 항암작용, 혈당강하작용, 혈압강하작용, 동맥경화 예방작용 등 다양한 효능을 나타낸다(Shashikanth et al., 1984; Bianchini and Vainio, 2001; Elkayam et al., 2013; Majewski, 2014; Viswanathan et al., 2014).

대파는 항균작용뿐만 아니라 혈소판의 항응집효과, 항산화 및 항과민작용 그리고 LDL 콜레스테롤의 항산화 및 산화질소 생성 억제효과를 가지고 있는 것으로 발표되고 있다(Chen et al., 2000; Yamamoto et al., 2005; Sohn et al., 2006). 총백(*Allii fistulosi* Bulbus)은 대파의 흰 밑부분을 뿌리와 함께 잘라낸 것으로서, 전통적으로 기침, 감기, 두통 등의 치료나, 이노제, 독성저감화 등의 목적으로 사용되어왔고, 중국뿐만 아니라 국내 전통 한약서에도 그 내용이 기록되어 있다(Phay et al., 1999; Lee et al., 2005; Wang et al., 2005; Seo, 2011)

총백의 주요 활성성분인 alliin 및 allicin의 생리활성에 대한 다양한 연구는 진행되어 왔지만, alliin 및 allicin을 효율적으로 추출하는 가공방법에 대한 연구는 미약하다. 특히, alliin은 물의 존재 하에서 효소인 alliinase와 복합체를 빠르게 형성하는데, 이 복합체는 매우 불안정하여 탈수 작용과 함께 allyl sulfonic acid와 pyruvic acid, ammonia로 전환되어 alliin이 소실된다(Miron et al., 2000). 또한, 이

*Corresponding author: Sanghoon Ko, Department of Food Science and Technology, Sejong University, 209 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 143-747, Republic of Korea
Tel: +82-2-3408-3260; Fax: +82-2-3408-4319
E-mail: sanghoonko@sejong.ac.kr
Received January 27, 2015; revised March 17, 2015; accepted March 24, 2015

과정에서 생성된 allyl sulfonic acid는 상온에서 매우 반응성이 높으며 결과적으로 allyl sulfonic acid 두 분자가 alliin으로 자발적으로 변환된다. 하지만, 추출과정에서 alliin이 alliin 형태로 전환되어 추출되면 휘발성이 큰 alliin은 추출물에서 안정적으로 유지되기 어려우므로(Ilic et al., 2011). alliin으로 전환을 최소화할 수 있는 조건에서 총백으로부터 alliin을 추출하는 것이 바람직하다.

본 연구의 가설은 총백을 효과적으로 추출하기 위하여 alliin으로 전환을 최소화할 수 있는 조건에서 추출하는 조건을 확립하는 것인데, alliin-alliinase 복합체 형성에 영향을 미치는 조건을 제어하여 alliin과 alliin의 효율적 추출을 달성하는 것이다. 추출용매의 조성, 고형분과 추출용매의 비율, 온도 등의 추출조건 변화가 alliin-alliinase 복합체 형성에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 특히, alliin은 alliin에 비해 좀더 hydrophobic한 성질로 인하여 추출용매 증분과 에탄올 비율에 따라 각각이 추출되는 함량이 달라질 수 있다(Miron et al., 2000). 따라서, 기능성 식품으로써 총백의 다양한 활용을 위해서는 alliin과 alliin과 같은 활성성분 추출을 효율적으로 하는 방법 대한 다양한 연구가 필요한 실정이다. 본 연구의 목적은 (1) 총백으로부터 주요 활성성분인 alliin 및 alliin의 최적 추출조건을 설정한 후, (2) alliinase의 활성화에 의한 alliin 및 alliin에 미치는 영향을 연구하는 것이다. Alliin 및 alliin의 효과적인 추출조건을 확립하기 위하여, 추출온도, 추출용매조성, 추출시간을 변수로 설정했으며, alliinase 활성화 방법 등을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

추출조건 설정에 사용한 총백은 파의 뿌리 부분만 절단(뿌리로부터 3 cm 이내)하여 건조상태인 것을 경동시장에서 구입(planted in 2013, Kyungsan, Korea)하여 상온보관하였고, alliinase 활성화 처리 조건 설정 실험에 사용된 총백은 (주)제이팍스(harvested in 2014, Kongju, Korea)에서 구입하여 냉장보관하며 사용하였다. 총백의 유용성분 추출을 용이하게 하기 위하여 시료 모두 분쇄기(HMF-3450S, Hanil, Wonju, Korea)를 이용하여 상온에서 2분간 분쇄하여 100 mesh 정도의 분말로 제조하였다. 활성성분의 함량 측정에 쓰인 표준물질은 alliin ($\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 alliin ($\geq 98\%$, Santa Cruz Biotechnology Inc. Dallas, TX, USA)을 구입하여 사용하였다. 그 외 시약들은 모두 분석용 등급(analytical grade)을 사용하였다.

총백의 alliin 및 alliin 추출물 제조 조건 확립

총백으로부터 alliin과 alliin 활성성분을 효율적으로 추출할 수 있는 조건을 확립하기 위하여 추출용매, 추출온도, 추출시간 등을 달리하여 추출물을 제조하였다. 추출용매는

물, 70% ethanol, 100% ethanol 3종류가 준비되었고, 총백 분말에 추출용매를 10배 가한 후 3가지 온도조건(40, 70, 100°C)에서 2시간 또는 4시간 동안 연속 3회 환류 추출하였다. 추출물은 상온에서 30분간 방냉 후 여과(5 μm filter paper, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)한 다음 50°C 이하의 온도에서 60-70 °Bx 이상이 되도록 감압 농축하였다. 여과된 추출물은 급속냉동기(DF 9010, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 이용하여 -80°C에서 급속냉동 한 후, 동결건조기(FD5508, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에 넣은 후 -45°C에서 동결건조하였다.

Alliinase 활성화 조건 확립

총백의 alliinase 활성화 조건에 따른 alliin의 함량의 변화를 알아보기 위해 생총백을 Table 1와 같은 조건에서 처리하였다. 생총백은 분쇄기(HMF-3450S, Hanil)를 이용하여 분쇄한 후 시료와 물 비율 1:1, 1:3, 1:5의 3가지 조건, 수침온도 20°C, 40°C의 2가지 조건, 진탕시간(100 rpm, shaking water bath, NR-25, Nuriscience, Gunpo, Korea) 30분, 2시간의 2가지 조건에서 처리하여 alliinase를 활성화시켰다. Alliinase 활성화 조건에서 처리한 시료는 위의 총백의 alliin 및 alliin 추출물 제조 조건 확립에 서술된 방법을 이용하였으며, 이때 시료는 70% ethanol을 추출용매를 이용하여 70°C에서 2시간 추출하였다. 추출용매와 시료의 비율이 alliin과 alliin의 추출효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료와 추출용매의 비율을 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 4가지 조건으로 제조한 후 추출하였다. 제조된 총백추출물은 50°C 이하의 온도에서 60-70 brix 이상이 되도록 감압 농축한 후 동결건조하였다.

총백추출물의 HPLC 정량분석

동결건조 총백 추출물 분말 0.1 g을 50% methanol 10 mL에 첨가한 다음 자석교반기를 이용하여 충분히 용해시킨 후, 0.45 μm nylon syringe filter를 이용하여 여과하여 HPLC 분석시료로 사용하였다. 총백추출물에 함유되어 있는 alliin과 alliin 정량분석 방법(Mohammad, 2010)을 변형하여 사용하였다. Alliin과 alliin의 HPLC 분석조건은 Table 2와 같다. 분석기기는 Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies, Foster City, CA, USA)을 사용하였으며, 컬럼은 Unisol C18 (5 μm , 150 Å, 4.6×250 mm, Agela

Table 1. Experimental sets to activate alliinase of Welsh onion root

Experimental set	Variables
Ratio (root : water, w/v)	1:1, 1:3 and 1:5
Temperature (°C)	20 and 40
Shaking time (h)	0.5 and 2

Table 2. HPLC operating conditions to quantify alliin and alliin content in the extracts

HPLC condition	Alliin	Alliin
Mobile phase	0.04% formic acid : methanol	
Column	Unisol C18, 5 μ m, 150 \AA (4.6 \times 250 mm)	
Flow rate	1.0 mL/min	
Detector	UV 210 nm	UV 242 nm

Technologies, Wilmington, DE, USA)를 사용하였으며, detector는 alliin 검출을 위해 UV 210 nm를 이용하였으며, alliin의 검출을 위해서는 242 nm 파장에서 측정하였다. 이동상은 0.04% formic acid in water와 methanol을 이용하여 0-5분간 0% B, 5-10분간 50% B, 10-20분간 100% B가 되도록 gradient 법을 이용하여 1 mL/min 유속으로 흘려주

었고, 시료의 주입량은 10 μ L로 하였다. 총백의 alliin과 alliin의 동정은 표준품을 이용하여 각각 5-100 mg/kg 수준으로 표준용액을 조제하여 검량선을 작성한 후 계산된 함량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

HPLC를 이용한 alliin과 alliin의 분리 및 정량

총백 특유의 향과 항산화 기능 등으로 알려진 alliin과 alliin의 추출 최적 조건을 정립하기 위해 추출용매, 추출 온도, 추출시간 등을 달리하여 조건별로 alliin과 alliin의 함량을 측정하였다. 두 물질의 표준용액은 각각 5-100 mg/kg의 농도로 HPLC 분석 후 검량곡선을 그린 결과 상관계수 (r^2)은 0.999로 직선성을 보였다. 그리고 다음의 조건(Fig. 1)

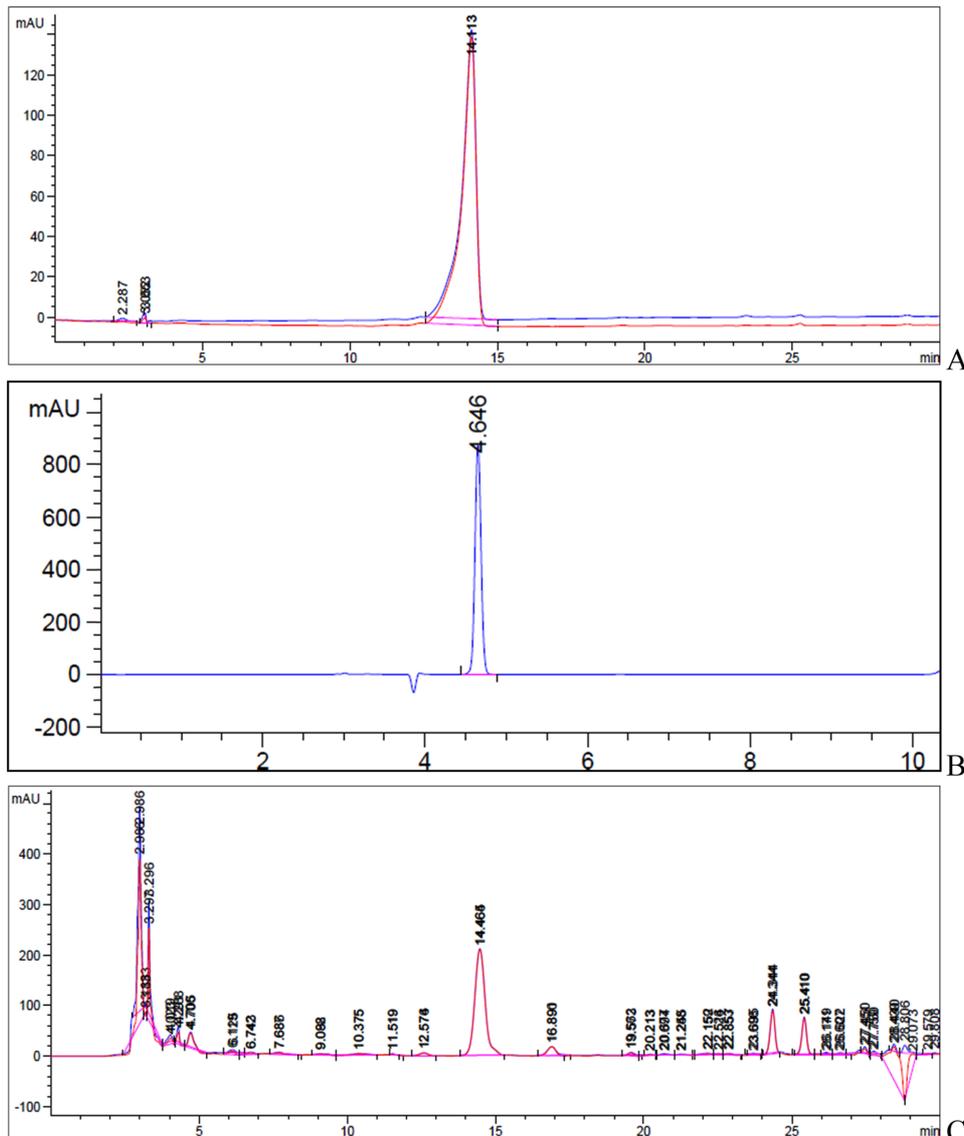


Fig. 1. HPLC spectra of alliin (A), alliin (B), and Welsh onion root extract (C).

으로 총백 추출물로부터의 alliin과 allicin의 함량을 분석할 수 있었다. 본 실험방법을 통해 분석한 결과 총백추출물로부터의 alliin과 allicin의 함량은 각각 40-90 mg/g, 0.010-0.150 mg/g에서 대부분 측정이 되었다.

추출조건에 따른 alliin과 allicin의 함량 변화

용매와 추출시간 및 추출온도에 따른 추출물의 alliin과 allicin의 함량을 확인한 결과(Table 3), alliin의 경우 총백 추출 조건 중 추출용매로 물을 사용하여 40°C에서 2시간 추출하였을 때, 86.477 mg/g으로 최대함량을 보였으며, 70°C, 100% ethanol, 4시간 조건에서는 alliin의 함량이 측정되지 않았다. 특히, 100% ethanol 추출조건에서는 물이나 70% ethanol 추출조건에 비해 alliin 함량이 절반 정도로 감소되는 것을 볼 수가 있었다. 즉, alliin은 ethanol을 함유할수록, 추출 온도가 높고, 시간이 길어질수록 함량이 낮아지는 것을 볼 수가 있었다. Allicin의 경우, 70% ethanol, 70°C, 2시간 추출조건에서 1.371 mg/g으로 최대함량을 보였으며, alliin과 같이 100% ethanol, 4시간 조건에서는 검출되지 않았다. Alliin (S-allylcysteine sulfoxide)은 구조상으로 원소별 구성비를 보았을 때, C 40.66%, H 6.26%, N 7.90%, O 27.08%, S 18.09%로써, allyl기와 sulfoxide기 그리고 아미노산인 cysteine으로 구성되어 있다. Alliin은 alliinase가 없는 경우에 매우 안정하여 가열처리 후에도 잔존할 수 있다. 반면에 allicin은 2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester, thio-2-propene-1-sulfinic acid S-allyl ester, diallyl disulfide-oxide, diallyl thiosulfinate로 알려져 있고 원소 구성비는 C 44.4%, H 6.21%, O 9.86%, 그리고 S 39.52%로 되어 있다(Mohammad, 2010). 따라서, allicin은 alliin에 비해 좀더 hydrophobic 한 성질을 가지고 있어 추출 시 에탄올의 비율이 증가할수록 함량이 높아지는 것을 볼 수가 있었고, 반면에 alliin은 감소하였다. Nikolić et al. (2010)은 FTIR spectrometry를 통해 allicin 함량변화를 측정된 결과, 80°C에 노출되었을 때 그 기능이 기하급수적으로 감소됨을 증명한다. 본 실험에서 alliin은 추출조건을 달리하여도 함량이 크게 변하지 않았으나, allicin은 추출조건에 따라 상이한 결과를 보였다. 이에, 총백으로부터 추출된 alliin과 allicin의 총 함량을 고려했을 때, 가장 많은 함량을 보였던 70% ethanol, 70°C, 2시간으로 추출조건을 설정하였다.

Alliinase 활성화 조건에 따른 alliin과 allicin의 함량 변화

Alliin을 allicin으로 전환시키는 효소인 alliinase는 대파, 마늘, 양파 등의 *allium*속의 식물이 crush될 때 활성화된다. Alliin은 물의 존재 하에서 효소인 alliinase와 복합체를 이룬다. 하지만, 이 복합체는 매우 불안정하여 탈수작용과 함께 allyl sulfonic acid와 pyruvic acid, ammonia로 전환된다. 그리고, 상온에서 매우 반응성이 높은 allyl sulfonic acid는 두 분자가 allicin으로 자발적으로 응축된다(Miron et al., 2000; Ilić et al., 2011).

이에 본 연구에서는 allicin의 추출을 최적화하기 위해 추출 전 분쇄기로 생총백을 분쇄하고 Table 1과 같은 조건으로 물과 혼합하여 진탕시키는 alliinase 활성화 처리과정을 수행하였다. 본 실험에서 설정한 총백 추출조건인 70% ethanol, 70°C, 2시간 조건으로 추출한 결과(Table 4), allicin은 생총백과 물을 1:1 혼합하여 40°C에서 30분간 진탕하는 alliinase 활성화했을 때 0.111 mg/g로써 최대함량을 보였다. Allicin의 함량은 혼합되는 물의 양과 반응온도가 증가할수록 감소하였다. 이는 alliinase의 최적 반응 조건이 pH 6.5, 33°C이라는 Nikolić et al. (2010)의 실험결과와 일치한다고 할 수 있다. 단, 반응시간에 있어서는 물과 혼합 비율 1:1의 경우 30분과 2시간 사이에 allicin의 함량에 있어서 큰 차이가 없었으나, 1:3과 1:5의 혼합비율에서는 2시

Table 4. Allicin concentrations of Welsh onion root extracts at various water-shaking conditions

Ratio (sample:water)	Shaking treatment		Allicin (mg/g)
	Temp. (°C)	Time (h)	
Control (1:0)	N/A		0.032
1:1	20	0.5	0.106
		2	0.064
	40	0.5	0.111
		2	0.102
1:3	20	0.5	0.000
		2	0.005
	40	0.5	0.006
		2	0.072
1:5	20	0.5	0.005
		2	0.064
	40	0.5	0.007
		2	0.073

Table 3. Alliin and allicin concentrations of Welsh onion root extract at various extraction conditions

Time (h)		Water			70% ethanol		100% ethanol	
		40°C	70°C	100°C	40°C	70°C	40°C	70°C
Alliin (mg/g)	2	86.477	77.749	76.078	79.006	75.992	44.534	56.697
	4	69.550	77.653	71.686	57.055	48.144	29.602	ND
Allicin (mg/g)	2	0.254	0.398	0.473	0.411	1.371	0.805	1.412
	4	0.142	0.343	0.484	0.292	0.915	0.320	ND

간에서 30분에 비해 10배 정도 더 많은 allicin이 확인되었다. 이는 물에 의한 희석으로 효소와 기질 사이의 반응이 짧은 시간에 제대로 이루어지지 않았기 때문으로 추정된다. 또한, 생총백의 alliinase 활성화 조건 후 추출 분석한 allicin의 함량은 총백의 건조, 분쇄 후 추출하여 분석했을 때의 결과에 비해 약 10% 수준이었다. 이는 생총백의 수분함량이 일반적으로 85-90% 수준으로써, 당초 예상한 수준의 함량결과가 도출되었다고 볼 수 있다.

요 약

본 연구에서는 총백 특유의 향과 항산화 기능 등으로 알려진 alliin과 allicin의 추출 최적 조건을 정립하기 위해 추출용매, 추출온도, 추출시간 등을 달리하여 alliin과 allicin의 함량을 측정하였다. 또한, 총백의 alliinase 활성화 조건에 따른 allicin의 함량의 변화를 알아보기 위해 생총백을 물과의 혼합비율, 수침온도, 진탕시간을 달리하여 처리하여 allicin 함량을 비교하였다. 결과적으로, alliin은 총백 추출 조건 중 추출용매로 물을 사용하여 40°C에서 2시간 추출하였을 때, 86.477 mg/g으로 최대함량을 보였으며, allicin의 경우, 70% ethanol, 70°C, 2시간 추출조건에서 1.371 mg/g으로 최대함량을 나타냈다. 본 실험에서는 총백의 추출 조건을 alliin의 함량이 크게 감소하지 않고, allicin의 함량이 최대로 추출될 수 있도록 70% ethanol, 70°C, 2시간으로 추출조건을 설정하였다. Alliinase 활성화 처리 조건에서는 생총백과 물을 1:1 혼합하여 40°C에서 30분간 진탕하였을 때, 0.111 mg/g으로써 최대의 allicin 함량을 보였다. 본 실험 결과, 다양한 추출조건에서 alliin과 allicin의 함량이 높은 총백추출물을 제조함으로써 원가경쟁력이 높은 총백추출물 기반 기능성 소재 또는 식품을 개발하는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, alliinase 활성화를 통한 allicin의 최적 추출방법을 확립함으로써, 총백 이외의 마늘, 양파, 대파 등 *allium* 속 식물을 이용한 allicin 개발을 타겟으로 하는 연구자들뿐만 아니라 전반적인 기능성 식품 산업에 있어서 소재 개발을 위한 기초자료가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단-나노·소재기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2014M3A7B4051125).

References

- Bianchini F, Vainio H. 2001. Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environ. Health Perspect.* 109: 893.
- Chen JH, Chen Hi, Wang JS, Tsai SJ, Jen CJ. 2000. Effects of welsh onion extracts on human platelet function in vitro. *Life Sci.* 66: 1571-1579.
- Elkayam A, Peleg E, Grossman E, Shabtay Z, Sharabi Y. 2013. Effects of allicin on cardiovascular risk factors in spontaneously hypertensive rats. *Isr. Med. Assoc. J.* 15: 170-173.
- Ilić DP, Nikolić VD, Nikolić LB, Stanković MZ, Stanojević LP, Cakić MD. 2011. Allicin and related compounds: biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta Univ. Phys. Chem. Technol.* 9: 9-20.
- Lee JK, Choi EH, Lee KG, Chun HS. 2005. Alleviation of aflatoxin B1-induced oxidative stress in HepG2 cells by volatile extract from allii fistulosi bulb. *Life Sci.* 77: 2896-2910.
- Majewski M. 2014. Allium sativum: facts and myths regarding human health. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 65: 1-8.
- Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. 2000. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1463: 20-30.
- Mohammad JAG. 2010. Determination of alliin and allicin in different types garlic using high performance liquid chromatography. *J. of University of Anbar for Pure Science* 4: 16-23.
- Nikolić VD, Ilić DP, Nikolić LB, Stanković MZ, Stanojević LP. 2010. Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin and allicin incorporated in gel. *Hem. Ind.* 64: 85-91.
- Phay N, Higashiyama T, Tsuji M, Matsuura H, Fukushi Y, Yokota A, Tomita F. 1999. An antifungal compound from roots of welsh onion. *Phytochemistry* 52: 271-274.
- Seo YJ. 2011. A study on the gynecologic use of allii fistulosi bulb. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 24: 63-73.
- Shashikanth K, Basappa S, Murthy VS. 1984. A comparative study of raw garlic extract and tetracycline on caecal microflora and serum proteins of albino rats. *Folia Microbiol.* 29: 348-352.
- Sohn HY, Kum EJ, Ftyu HY, Jeon SJ, Kim NS, Son KH. 2006. Antifungal activity of fistulosides, steroidal saponins, from allium fistulosum L. *J. Life Sci.* 2: 310
- Song HP, Shim SL, Jung IS, Kim JH, No GM, Seo HY, Kim DH, Kim KS. 2009. Analysis of volatile organosulfur compounds in korean allium species. *Korean J. Food Preserv.* 16: 929-937.
- Viswanathan V, Phadatare A, Mukne A. 2014. Antimycobacterial and antibacterial activity of allium sativum bulbs. *Indian J. Pharm. Sci.* 76: 256.
- Wang BS, Chen JH, Liang YC, Duh PD. 2005. Effects of welsh onion on oxidation of low-density lipoprotein and nitric oxide production in macrophage cell line raw 264.7. *Food Chem.* 91: 147-155.
- Yamamoto Y, Aoyama S, Hamaguchi N, Rhi GS. 2005. Antioxidative and antihypertensive effects of welsh onion on rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1311-1317.