Check for updates

J East Asian Soc Diet Life
36(5): 337~350 (2026)
http://dx.doi.org/10.17495/easdl.2026.10.36.5.337

마늘을 활용한 알리티아민 마늘 Complex의 제조공정 표준화 및 *In Vitro* 생리활성 평가

김소영[1] · 채지형[1] · 예은주[2] · 최재원[1] · 이혜민[1] · 도예빈[1] · 김정욱[3†]

[1]나눔제약(주) 주임연구원, [2]나눔제약(주) 본부장, [3]나눔제약(주) 센터장

Standardization of the Manufacturing Process and *In Vitro* Biological Activities of an Allithiamine Garlic Complex

So Young Kim[1], Ji Hyeong Chae[1], Eun Ju Ye[2], Jae Won Choi[1], Hye Min Lee[1], Ye-bin Doh[1] and Jung-wook Kim[3†]

[1]Research Associate, Nanum Pharmaceutical Co., Ltd., Yeongcheon 38823, Republic of Korea
[2]Division Director, Nanum Pharmaceutical Co., Ltd., Yeongcheon 38823, Republic of Korea
[3]Center Director, Nanum Pharmaceutical Co., Ltd., Yeongcheon 38823, Republic of Korea

ABSTRACT

This study established a process for manufacturing an allithiamine-garlic complex (AGC) from fresh garlic, thiamine-containing ingredients, and thiamine, and evaluated its biological activities. Thiamine-containing beer yeast, pea, and tiger bean were compared for their thiamine contents, antioxidant activities, and effects on C2C12 myoblast viability. Beer yeast was selected as the thiamine-containing ingredient for AGC preparation. Thiamine was additionally incorporated as a substrate for allithiamine formation. Ingredient composition and manufacturing conditions, including pH, temperature, and reaction time, were screened by analyzing the thiamine, allicin, and allithiamine contents. The screening results showed that allithiamine content was relatively higher under alkaline conditions at 40℃, whereas the final manufacturing conditions were established separately by considering the screening results and manufacturing applicability (alkaline conditions at 40℃). AGC prepared under the final manufacturing conditions showed higher 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity than thiamine, enhanced cell viability, and reduced lactate dehydrogenase (LDH) activity under H_2O_2-induced oxidative stress in C2C12 myoblasts. These findings demonstrate the feasibility of establishing a reproducible manufacturing process for AGC and suggest its potential as a functional food ingredient.

Keywords: allithiamine-garlic complex (AGC), manufacturing process optimization, allithiamine, antioxidant activity, C2C12 myoblast

서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 전통적으로 식품 및 약용 소재로 널리 이용되어 온 대표적인 기능성 식품 소재로, 우리나라 중부와 남부지방에서 널리 재배되고 있다(Kim YW 등 2012). 마늘은 식품의약품안전처로부터 '혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음' 및 '혈압 조절에 도움을 줄 수 있음'의 기능성을 인정받아 건강기능식품 소재로서 높은 활용 가치를 지니고 있다(Ministry of Food and Drug Safety 2015). 마늘의 주요 생리활성 성분으로는 alliin, allicin 및 S-allyl cysteine을 비롯한 다양한 유기황 화합물이 알려져 있으며(Shang A 등 2019), 이들 성분은 항균(Kim KJ 등 2005; Moon WH & Yoo KD 2014), 항산화(Chung JY & Kim CS 2008; Shin JH 등 2008), 항염증(Kim DG 등 2025), 항암(Kim KJ 등 2005) 및 항고지혈증(Yun AR & Choi KH 2011) 등 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 그 중, alliin은 마늘 조직을 파쇄 또는 분쇄할 경우, alliinase의 작용에 의해 분해되어 allicin으로 변환된다(Kourounakis PN & Rekka EA 1991). Fujiwara M 등(1954a)의 연구에서 알칼리 조건에서 마늘추출물에 thiamine을 첨가하였을 때 새로운 thiamine 유도체가 생성된다는 사실을 확인하였으며, 이를 allithiamine으로 명명하였다. allithiamine은 마늘 유래 allicin이 thiamine의 thiazole 고리와 반응하여 생성되는 지용성 화합물로, 일반적인 thiamine과 유사한 생리활성을 나타내면서도 체내 흡수율 및 이용성이 우수한 것으로 보고되어 있다(Fujiwara M 등 1954b). 따라서 allithiamine은 마늘의 유기황 화합물과 thiamine을 이용하여 제조할 수 있는 기능성 소재로서 활용 가능성이 있으나, 그 생성량은 원료 조성 및 반응 조건에 따라 영향을 받을 수 있다. 선행 연구에서도 마늘과 곡물 또는 효모 유래 원료를 혼합하는 것만으로는 allithiamine 생성이 제한적이었으나, thiamine을 추가로 공급하였을 때 allithiamine 생성량이 증가하는 것으로 보고되었

† **Corresponding author :** Jung-wook Kim, Tel : +82-54-332-8383, Fax: +82-54-332-8382, E-mail : jwkim@mpis.re.kr

다(Lee CD 등 2025). 이에 따라 allithiamine의 효율적인 생성을 위해서는 마늘과 thiamine의 반응 조건뿐만 아니라 thiamine을 함유하는 식품 소재의 종류 및 조성에 대한 검토가 필요하다.

맥주효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 맥주를 발효시킨 후 걸러낸 효모를 정제, 건조한 것으로 단백질, 비타민 및 미네랄 등 다양한 영양성분을 함유한 것으로 알려져 있다(Jaeger A 등 2020). 특히 *S. cerevisiae*는 thiamine을 생합성하는 것으로 알려져 있으며, 균주에 따라 thiamine 생산능력에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Rocchi R 등 2023). 이러한 특성으로 인해 맥주효모는 thiamine을 함유하는 식품 소재로서 allithiamine 생성에 활용 가능성이 있다. 또한, 콩류는 필수 아미노산, 지방산, 유기산, 무기질 및 비타민을 풍부하게 함유하고 있어 영양학적 가치가 높은 식품 소재로 이용되고 있으며(Namgung HJ 등 2010), 그 중 완두콩(Frias J 등 2011) 및 호랑이콩(Sangronis E & Machado CJ 2007)은 thiamine을 함유한 식품 소재로 알려져 있다.

한편, thiamine(vitamin B_1)은 에너지 대사와 신경 기능에 중요한 역할을 하는 필수 비타민으로, 포유류에서 thiamine monophosphate, thiamine diphosphate, thiamine triphosphate 및 adenosine thiamine triphosphate 형태로 존재한다(Makarchikov AF 등 2025). Thiamine 또는 thiamine 유도체의 섭취가 운동 중 피로와 관련된 생리적 지표에 긍정적인 영향을 미칠 수 있으며(Nozaki S 등 2009; Choi SK 등 2013), Thiamine 대사 이상은 산화 스트레스와도 연관되는 것으로 보고되고 있다(Mrowicka M 등 2023). C2C12 세포는 마우스 골격근 유래 myoblast 세포주로, 골격근 세포의 산화 스트레스 및 세포 손상을 평가하는 데 널리 활용되고 있다(Sun S 등 2014). 이에 본 연구에서는 알리티아민 마늘 복합물(allithiamine-garlic complex, AGC)의 골격근 세포 수준에서의 안전성과 산화 스트레스 보호 효과를 평가하기 위해 C2C12 세포를 활용하였다. 또한, 천연 식품 소재에 함유된 thiamine의 함량은 원료의 종류와 특성에 따라 차이가 있으며, 천연 소재만을 이용할 경우 allithiamine 생성에 필요한 thiamine 공급량이 제한될 수 있다. 이에 본 연구에서는 thiamine 함유 소재의 특성을 활용하는 한편, allithiamine 생성에 필요한 thiamine의 공급을 보완하고자 thiamine을 추가하여 AGC 제조에 적용하였다.

따라서 본 연구에서는 thiamine을 함유한 식품 소재 중 완두콩, 호랑이콩 및 맥주효모를 thiamine 공급원 후보로 선정하여 thiamine 함량과 항산화 활성 및 C2C12 근육세포에서의 세포 안전성을 비교 평가하였다. 이를 통해 최종 원료를 선정하고, 선정된 원료를 thiamine 및 생마늘과 함께 적용하여 알리티아민 마늘 복합물(allithiamine-garlic complex, AGC)를 제조하였다. 또한 원료 조성과 반응 조건에 따른 thiamine, allithiamine 및 allicin의 함량 변화를 분석하여 allithiamine 생성에 적합한 제조 조건을 확립하고, allithiamine을 지표성분으로 하여 제조공정의 표준화 가능성을 평가하였다. 최종적으로 제조된 AGC의 항산화 활성과 C2C12 세포에서의 세포 생존율 및 세포독성을 평가하고 thiamine과 비교함으로써 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

비타민 B_1 염산염 정제 분말(Vitamin B_1 hydrochloride, DMS lnc, Grenzach-Wyhlen, Germany)은 원료 공급업체인 Bigsol(Gunpo-si, Korea)을 통해 구매하였다. 비활성 맥주효모(Beer Yeast Korea lnc, Mungyeong-si, Korea)는 Nutrazen (Guri-si, Korea)으로부터 구매하여 사용하였다. 마늘은 경북 영천산으로, 2025년 7월 수확 후 약 10개월간 저장된 것을 2026년 5월 경북 영천 신녕농협에서 구입하여 세척 후 별도의 전처리 없이 실험에 사용하였다. 티아민 공급 원료로 사용한 호랑이콩과 완두콩은 국내산으로 태복 잡곡(Yeongcheon-si, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 제조

1) 맥주효모, 완두콩, 호랑이콩 추출물 제조

맥주효모, 호랑이콩 및 완두콩을 각 100 g씩 전자저울(PX4202KR, OHAUS, Parsippany, USA)을 사용하여 정확히 칭량한 후, 정제수 2 L와 혼합하여 열수 추출기(HAC100, LK Lab Korea, Namyangju, Korea)를 이용하여 55℃에서 2시간 동안 추출을 진행하였다. 추출 완료 후 pH meter(ST3100, OHAUS, Parsippany, USA)를 사용하여 pH를 측정한 뒤, 회전식 감압 농축기(N-1300S-W, EYELA, Shanghai, China)로 초기 부피의 50% 수준까지 농축하였다. 농축액은 동결건조기(FD-8508, ilShinBioBase Co., Ltd, Dongducheon, Korea)를 이용하여 동결건조 후 본 실험의 분석 시료로 사용하였다.

2) 맥주효모, 완두콩, 호랑이콩 마늘 혼합물의 제조

맥주효모, 호랑이콩 및 완두콩을 각각 100 g씩 취하고, 마늘은 마늘 분쇄기(KHC-1000G, Kitchen Art Co., Ltd, Zhongshan, China)를 이용하여 다진 마늘로 제조하였다. 각 시료를 전자저울로 각각 100 g씩 정확히 칭량한 후, 정제수 2 L를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 열수 추출기를 이용하여 55℃에서 2시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후 pH

meter(ST3100, OHAUS, Parsippany, USA)를 이용하여 추출액의 pH를 측정하였으며, 회전식 감압 농축기를 이용하여 초기 부피의 약 50%까지 농축하였다. 농축액은 동결건조기를 이용하여 동결건조 후 분말화하여 본 실험의 분석 시료로 사용하였다.

3) 알리티아민 마늘 복합물(Allithiamine Garlic Complex, AGC)의 제조

Allithiamine-garlic complex(AGC)는 Kim JW 등(2025)이 기술한 특허 방법에 따라 마늘, 맥주효모 분말 및 비타민 B_1 염산염 정제 분말을 이용하여 제조하였다. 생마늘을 선별한 후 세척하여 표면의 이물질을 제거하고, 표면의 잔존 수분을 제거한 다음 제조에 사용하였다. 세척 및 건조된 마늘은 파쇄하여 마늘에 존재하는 alliin이 alliinase의 작용에 의해 allicin으로 전환되도록 하였다. 이후 파쇄된 마늘, 비타민 B_1 염산염, 맥주효모를 설정된 배합비에 따라 혼합하였다. 혼합물에 정제수를 첨가하여 초기 pH를 6.6±0.2로 조절한 후 믹서기(ST-QS32L, Guangzhou Shengtian Machinery Co., Ltd, Guangzhou, China)를 이용하여 균질화하였다. 균질화된 혼합물은 반응탱크(ST-50LS, Guangzhou Shengtian Machinery Co., Ltd, Guangzhou, China)로 이송하여 22±18℃에서 48±24h 동안 교반 반응을 진행하였다. 반응이 완료된 시료는 동결한 후 필요에 따라 최소한으로 농축하거나 별도의 농축 과정 없이 동결건조 하였다. 동결건조된 시료는 분쇄기를 이용하여 20~30 mesh의 입도로 분쇄하였으며, 각 원료를 혼합한 후, 조절된 조건에서 반응시켰으며, 반응이 완료된 시료를 동결건조 및 분말화하였다. 최종적으로 얻어진 분말을 AGC로 명명하고 이후 실험에 사용하였다.

3. DPPH 자유라디칼 소거 활성 측정

각 시료의 DPPH 자유라디칼 소거 활성 측정은 에탄올에 0.4 mM 농도로 용해한 α,α′-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) 용액(Dongin biotech Co., Ltd, Seoul, Korea) 100 μL에 시료 50 μL를 첨가하여 측정하였다. 양성 대조군으로는 합성 항산화제인 Butylated hydroxytoluene(BHT, Junsei Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 0.05%(w/v) 농도로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정하고, 각 시료의 대조구는 시료를 첨가하지 않은 에탄올 용액으로 하였다. 상온에서 30분간 차광하여 반응시킨 반응액을 microplate reader(EOPCH2, BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH(라디칼소거능, \%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

4. 지표성분 분석

시료 중 알리신, 티아민 및 알리티아민의 함량은 Lee CD 등(2025)의 방법을 수정 및 보완하여 HPLC-UV 시스템(UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany)을 이용하여 분석하였다. 알리신 분석에는 C18 컬럼(YMC triart C18, YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% 인산(Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd, Siheung, Korea)을 함유한 물(용매 A)과 acetonitrile(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (용매 B)을 15:85(v/v)로 혼합한 등용매 조건으로 설정하였다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼 온도는 30℃, 주입량은 10 μL로 하였으며, 208 nm에서 검출하였다.

티아민 및 알리티아민 분석은 C18-L 컬럼(Aegispak C18-L, Youngjin Biochrom Co., Seongnam, Korea)을 사용하여 수행하였다. 티아민 분석을 위한 이동상 A는 20 mM sodium dihydrogen phosphate monohydrate(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)와 10 mM sodium 1-heptanesulfonate(Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd, Siheung, Korea) 수용액(pH 2.2)으로 조제하였으며, 이동상 B는 이동상 A와 acetonitrile을 50:50 (v/v) 비율로 혼합하여 조제하였다. 유속은 0.4 mL/min, 컬럼 온도는 30℃, 주입량은 10 μL로 설정하였으며, 검출 파장은 208 nm로 하였다. 이동상 기울기는 0분에서 0% B, 5분에서 30% B, 25분에서 54% B, 30분에서 32분까지 100% B, 37분에서 45분까지 0% B로 설정하였다.

알리티아민 분석을 위한 이동상 A는 5 mM sodium 1-heptanesulfonate 수용액(pH 2.8), 이동상 B는 methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 유속은 0.3 mL/min, 컬럼 온도는 30℃, 주입량은 10 μL로 설정하였으며, 검출 파장은 254 nm로 하였다. 이동상 기울기는 0분에서 10분까지 10% B, 40분에서 45분까지 100% B, 50분에서 60분까지 10% B로 설정하였다.

표준물질은 한국천연물과학기술연구소(Anseong, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질 1 mg을 정확히 칭량하여 추출 용매에 용해한 후 초음파 처리하고, 알리신은 0.20 μm PTFE membrane filter, 티아민은 0.20 μm PVDF membrane filter, 알리티아민은 0.45 μm PVDF membrane filter로 여과하였다. 여과액은 각각 0.02~1 mg/g 범위의 농도가 되도록 희석하여 분석에 사용하였다.

5. 세포 배양

본 실험에 사용된 마우스 유래 근육세포인 C2C12 cell (CRL-1772)은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 배양 배지는 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA)와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY,

USA)이 포함된 DMEM 배지를 배양액으로 37℃ incubator (MCO-18AC, PHC Co, Tokyo, Japan)에서 배양하였으며, 배지는 2~3일마다 교체하였다. 실험에는 약 70~80% confluence에 도달한 세포를 사용하였다.

6. 세포 생존율 측정

C2C12 myoblast에서 세포 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; cat. no. CCK-3000, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. C2C12 세포를 96-well plate에 1×10^4 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 600 μM H_2O_2와 양성 대조군인 홍삼농축액분말 0.2 mg/mL 또는 실험군인 AGC를 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 및 1 mg/mL 농도로 병용 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 각 well에 CCK-8 시약 10 μL를 첨가하고 37℃에서 30분 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리군(control)에 대한 백분율(%)로 계산하였다.

7. Lactate Dehydrogenase(LDH) 활성 억제능 측정

LDH 활성은 Cell Cytotoxicity Assay Kit(cat no. LDH1000, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. C2C12 세포를 96-well plate에 1×10^4로 분주하여 하룻밤 동안 배양한 후, 600 μM H_2O_2와 양성 대조군인 홍삼농축액분말 0.2 mg/mL 또는 실험군인 AGC를 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 및 1 mg/mL 농도로 병용 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 각 well의 배양 상등액 10 μL를 새로운 96-well plate로 옮긴 다음, LDH 반응용 working solution을 첨가하여 제조사의 지침에 따라 실온에서 차광하여 반응시켰다. 반응 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH 활성 억제능(%)은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{LDH 활성 억제능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{H_2O_2 \text{ 처리군의 흡광도}}\right) \times 100$$

8. 통계 처리

본 연구의 모든 실험 결과는 SPSS statistics package(30.0 version, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 산출하였다. 각 군 간의 평균 차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하였다. 군 간의 차이는 Duncan's multiple range test에 $p<0.05$ 수준에서 사후 검정을 실시하였으며, mean±S.D.로 표시하였다.

결 과

1. Thiamine 공급원 원료가 AGC 제조에 미치는 영향

1) Thiamine 공급원 원료가 DPPH Radical Scavenging에 미치는 영향

Thiamine 공급원 원료의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 맥주효모(BY), 완두콩(PS) 및 호랑이콩(PV) 추출물은 농도

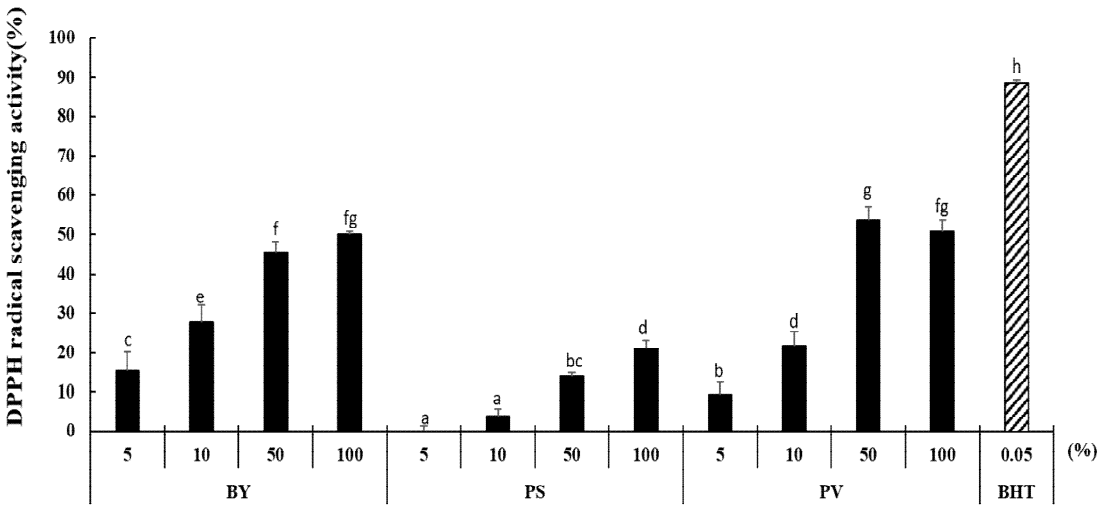


Fig. 1. Effect of BY, PS and PV on DPPH radical scavenging activity.

BY: Brewer's yeast, PS: *Pisum sativum* L., PV: *Phaseolus vulgaris* L. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다. 세 가지 추출물 중 맥주효모와 호랑이콩 추출물에서 상대적으로 우수한 항산화 활성이 나타났으며, 완두콩 추출물은 전반적으로 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 맥주효모와 호랑이콩을 우선 후보 원료로 선정하였으며, 이후 각 원료와 마늘을 혼합하여 제조한 시료의 세포 활성 및 티아민 함량을 평가하고, 이를 종합하여 최종 원료를 선정하고자 하였다.

2) Thiamine 공급원 원료가 C2C12 세포 생존율 및 세포 보호 활성에 미치는 영향

마우스 유래 C2C12 근아세포에서 맥주효모, 완두콩 및 호랑이콩 추출물과 각 원료를 마늘과 혼합한 시료의 세포독성 및 세포 보호 활성을 평가한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 세포독성을 평가한 결과, 맥주효모-마늘 혼합물(BYGC), 완두콩-마늘 혼합물(PSGC) 및 호랑이콩-마늘 혼합물(PVGC)의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 이후 H_2O_2로 산화 스트레스를 유도한 C2C12 세포에서 세포 보호 활성을 평가한 결과, H_2O_2 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군 대비 60.44±3.58%로 감소하여 산화 스트레스가 유도되었음을 확인하였다. 반면 BYGC, PSGC 및 PVGC 처리군은 모든 농도에서 H_2O_2 단독 처리군에 비해 세포 생존율이 유의적으로 증가하여 세포 보호 활성을 나타내었다. 특히 BYGC 처리군은 모든 농도에서 PSGC 및 PVGC 처리군에 비해 높은 세포 생존율을 나타내어, 세 시료 중 가장 우수한 세포 보호 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

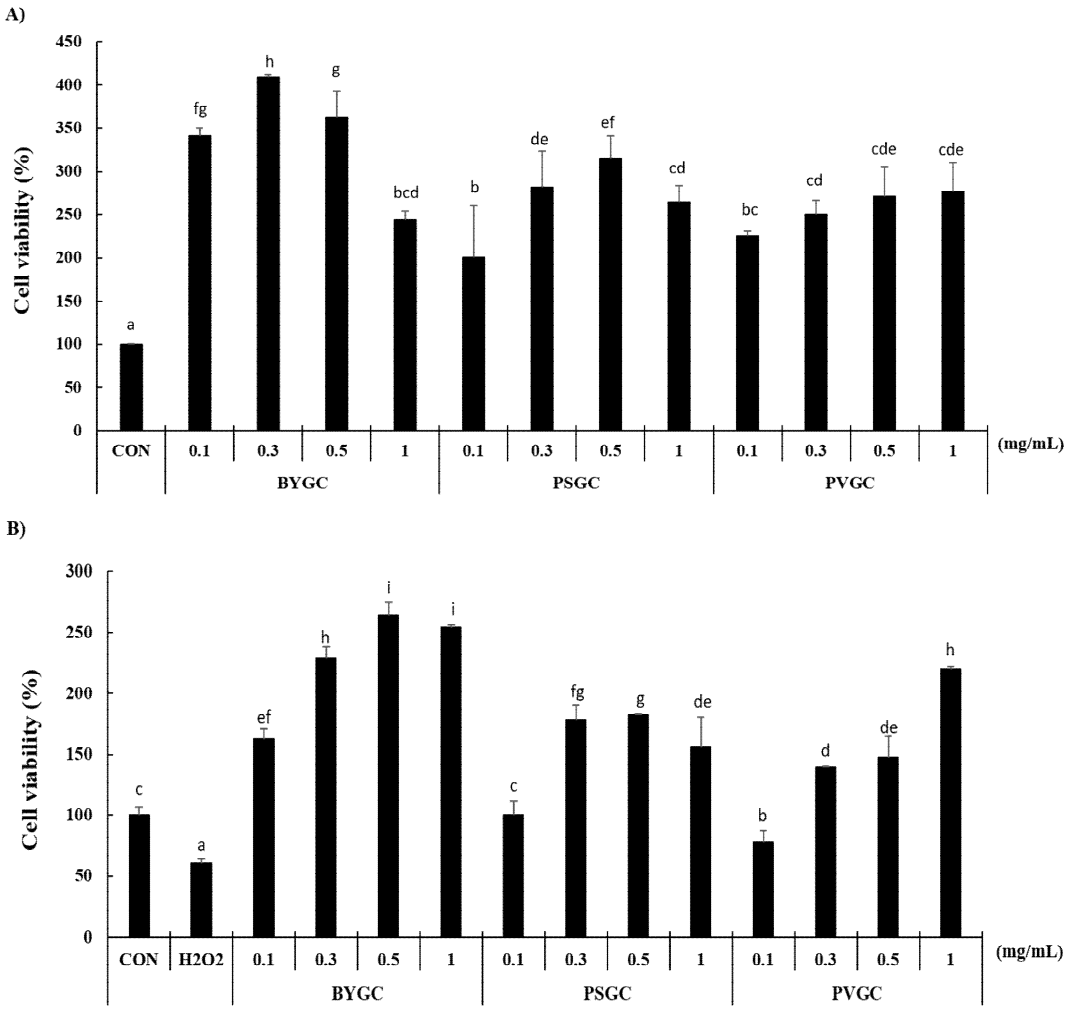


Fig. 2. Effect of BYGC, PSGC and PVGC on cell viability and protective activity in C2C12 cells.

BYGC: Brewer's yeast+Garlic Complex, PSGC: *Pisum sativum* L.+Garlic Complex, PVGC: *Phaseolus vulgaris* L.+Garlic Complex. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

3) Thiamine 공급원 원료가 C2C12 세포에서 LDH 활성 억제에 미치는 영향

마우스 유래 C2C12 근아세포에서 맥주효모, 완두콩 및 호랑이콩 추출물과 각 원료를 마늘과 혼합한 시료의 LDH 활성 억제능을 평가한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. BYGC, PSGC 및 PVGC는 모든 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의적인 LDH 활성 억제능을 나타내었다. 특히 BYGC는 모든 농도에서 PSGC 및 PVGC에 비해 유의적으로 높은 LDH 활성 억제능을 나타내어, 세 시료 중 가장 우수한 LDH 활성 억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

4) Thiamine 공급원 원료가 티아민 함량에 미치는 영향

맥주효모, 완두콩 및 호랑이콩 추출물과 이들 원료를 각각 마늘과 혼합한 시료의 티아민 함량을 분석하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 단일 원료의 티아민 함량을 분석한 결과, 맥주효모는 21.7 mg/g으로 완두콩 및 호랑이콩에 비해 각각 3.24배 및 8.04배 높은 함량을 나타내었다. 또한 BYGC가 36.4 mg/g으로 가장 높은 티아민 함량을 나타냈으며, PSGC 및 PVGC 혼합물에 비해 각각 5.52배 및 8.67배 높은 함량을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 티아민 함량이 가장 우수한 맥주효모를 최종 후보 원료로 선정하였으며, AGC 제조에 사용하였다.

2. AGC 제조 조건 설정

1) AGC 원료 비율이 Allithiamine 함량에 미치는 영향

Allithiamine 생성에 필요한 thiamine 공급량 및 적정 첨가

Table 1. Analysis of thiamine contents in BY, PS, PV, BYGC, PSGC, and PVGC

Sample	Thiamine (mg/g)
BY	21.7
PS	6.7
PV	2.7
BYGC	36.4
PSGC	6.6
PVGC	4.2

BY: Brewer's yeast, PS: *Pisum sativum* L., PV: *Phaseolus vulgaris* L. BYGC: Brewer's yeast+Garlic Complex, PSGC: *Pisum sativum* L.+Garlic Complex, PVGC: *Phaseolus vulgaris* L.+Garlic Complex.

수준을 설정하기 위하여 thiamine 첨가량과 원료 혼합비에 따른 allithiamine 함량을 분석하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 각 시료의 allithiamine 함량을 분석한 결과, S1, S2 및 S3 조건에서는 각각 0.99, 1.16 및 0.84 mg/g으로 나타났으며, S4 조건에서는 5.77 mg/g으로 증가하였다. S5 조건에서는 8.05 mg/g으로 S4 대비 약 39.5% 증가하여 S1~S4 조건에 비해 높은 allithiamine 함량을 나타내었다. 이후 thiamine 및 맥주효모 첨가량을 증가시킨 S6 및 S7 조건에서는 각각 8.96 및 9.73 mg/g으로 S5 대비 각각 약 11.3% 및 20.9% 증가하였으나, S5 이후에는 원료 투입량 증가에 비해 allithiamine 함량의 증가 폭이 상대적으로 제한적인 경향을 나타내었다. 특히 S6에서 S7로 thiamine 및 맥주효모의 첨가

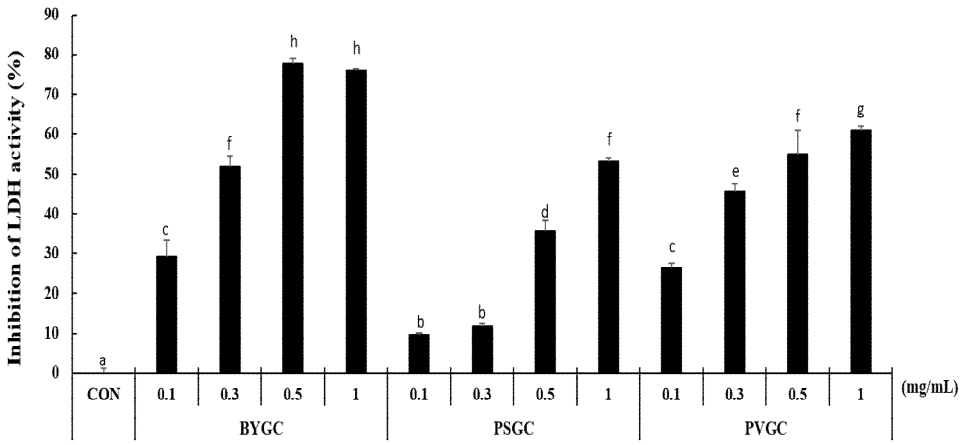


Fig. 3. Effect of BYGC, PSGC and PVGC on LDH activity in C2C12 Cells.

BYGC: Brewer's yeast+Garlic Complex, PSGC: *Pisum sativum* L.+Garlic Complex, PVGC: *Phaseolus vulgaris* L.+Garlic Complex. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

Table 2. Analysis of thiamine, allicin, allithiamine contents in S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7

Sample	Thiamine (mg/g)	Allicin (mg/g)	Allithiamine (mg/g)	Yield (%)
S1	60.66	2.28	0.99	37.5
S2	43.99	4.7	1.16	38.0
S3	36.45	11.2	0.84	37.4
S4	22.72	8.41	5.77	32.4
S5	32.66	9.17	8.05	38.5
S6	178.52	7.07	8.96	37.2
S7	294.07	5.66	9.73	41.0

S1: thiamine 1%+Brewer's yeast 9%+Garlic 10%, S2: thiamine 1%+Brewer's yeast 9%+Garlic 20%, S3: thiamine 1%+Brewer's yeast 9%+Garlic 40%, S4: thiamine 1%+Brewer's yeast 9%+Garlic 60%, S5: thiamine 5%+Brewer's yeast 15%+Garlic 60, S6: thiamine 10%+Brewer's yeast 10%+Garlic 60%, S7: thiamine 15%+Brewer's yeast 5%+Garlic 60%.

량을 추가로 증가시켰을 때 allithiamine 함량은 약 8.6% 증가하는 데 그쳤다. 각 조건의 수율은 32.4~41.0% 범위로 확인되었다. 따라서 S5 조건은 S6 및 S7 조건에 비해 allithiamine 함량은 다소 낮았으나, S5 이후 원료 투입량 증가에 따른 allithiamine 함량의 추가 증가 폭이 상대적으로 제한적이었다. 이에 따라 allithiamine 함량, thiamine 및 맥주효모의 투입량, 수율 및 원료 사용 효율을 종합적으로 비교하였으며, S5 조건을 후속 제조공정 screening에 적용할 원료 혼합비로 선정하였다.

2) pH, 반응시간, 반응 온도가 Allithiamine 함량에 미치는 영향

앞선 원료 혼합비율 screening을 통해 선정된 조건을 적용하여 AGC를 제조하고, 제조공정 조건에 따른 allithiamine 함량의 변화를 확인하기 위하여 pH, 반응시간 및 반응 온도를 달리하여 screening을 수행하였다. 반응시간은 12시간 및 24시간, 반응 온도는 4℃, 25℃ 및 40℃로 설정하였으며, pH 조건은 산성(pH 2 이상 3 미만), 중성(pH 5 이상 6 이하) 및 염기성(pH 7 이상 8 미만)으로 구분하였다. pH 조절을 위하여 산성 조건에서는 acetic acid(AA, Junsei Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan), 중성 조건에서는 증류수(distilled water, DW), 염기성 조건에서는 sodium bicarbonate(SB, Junsei Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 각 조건에서 제조된 시료의 thiamine, allicin 및 allithiamine 함량과 수율을 분석하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

12시간 반응 조건에서 allithiamine 함량은 4℃에서 0.52~0.59 mg/g, 25℃에서 0.98~1.00 mg/g, 40℃에서 2.20~3.29 mg/g으로 나타났다. 특히 40℃ 및 염기성 조건을 적용한 S16에서 3.29 mg/g으로 가장 높은 함량이 확인되었다. 24시간 반응 조건에서도 4℃에서 0.56~0.59 mg/g, 25℃에서 1.32~1.42 mg/g, 40℃에서 3.09~3.37 mg/g으로 나타났으며, 40℃ 및 염기성 조건을 적용한 S25에서 3.37 mg/g으로 가장 높은 함량이 확인되었다.

반응시간에 따른 allithiamine 함량을 비교한 결과, 동일한 온도 및 pH 조건에서 12시간과 24시간의 차이는 상대적으로 제한적인 반면, 반응 온도에 따른 함량 차이는 상대적으로 크게 나타났다. 특히 40℃ 조건에서 다른 온도 조건에 비해 높은 allithiamine 함량이 확인되었으며, 40℃ 내에서는 염기성 조건에서 상대적으로 높은 함량이 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 본 screening에서는 40℃ 및 pH 7 이상 8 미만의 조건이 allithiamine 함량 측면에서 상대적으로 우수한 조건으로 확인되었다.

한편, 본 연구에서 분석한 allithiamine 함량은 최종 시료의 단위 중량당 함량(mg/g)으로 나타낸 값으로, 공정 중 allithiamine 형성에 따른 변화뿐만 아니라 제조 및 동결건조 과정에서의 수분 제거에 따른 농축 효과가 함께 반영될 수 있다. 따라서 동결건조 후 확인된 allithiamine 함량의 증가를 동결건조 과정에서의 추가적인 allithiamine 생성으로 단정하기보다는 각 조건의 수율과 함께 고려하여 해석하였다.

또한 최종 제조 조건의 선정에는 allithiamine 함량뿐만 아니라 각 조건에서의 수율, 반응시간 및 온도 조건의 관리 가능성, pH 조절의 용이성, 그리고 대용량 제조 시 현재 확보된 제조설비에서의 적용 가능성을 함께 고려하였다. 특히 screening에서 높은 allithiamine 함량을 나타낸 40℃ 및 pH 7 이상 8 미만 조건을 기준으로 실제 대용량화 시 현장 제조공정에서의 온도 및 pH 조건을 설정하는데 활용하는 연구자료로만 활용하였고, 재현성 실험에서 종합적으로 판단하여 S5의 방법으로 재현성 검증에 적용하여 이후 실험에 적용하였다.

Table 3. Analysis of thiamine, allicin, allithiamine contents in S8－S25

Sample	RT (hr)	Temperature (℃)	Solvent base	pH	Thiamine (mg/g)	Allicin (mg/g)	Allithiamine (mg/g)	Yield (%)
S8			AA	2.74	208.35	0.77	0.57	37.4
S9		4	DW	5.47	133.03	0.78	0.52	38.0
S10			SB	7.87	121.51	0.91	0.59	42.0
S11			AA	2.14	204.99	0.92	0.98	41.8
S12	12	25	DW	6.04	117.70	1.00	0.99	40.5
S13			SB	7.95	126.00	1.08	1.00	41.7
S14			AA	2.11	210.76	1.35	2.98	41.5
S15		40	DW	5.98	118.94	1.75	2.2	40.2
S16			SB	7.64	117.65	1.87	3.29	39.5
S17			AA	2.04	208.26	0.84	0.56	38.0
S18		4	DW	5.57	126.79	0.84	0.56	39.5
S19			SB	7.55	133.49	0.89	0.59	40.1
S20			AA	2.13	199.22	1.13	1.34	42.6
S21	24	25	DW	5.27	131.01	1.16	1.32	40.1
S22			SB	7.98	102.51	1.13	1.42	44.7
S23			AA	2.14	115.54	1.53	3.09	45.2
S24		40	DW	5.27	115.65	2.16	3.15	41.2
S25			SB	7.84	192.96	1.44	3.37	38.7

S8: AGC (12 hr-4℃-AA-pH 2.7), S9: AGC (12 hr-4℃-DW-pH 5.47), S10: AGC (12 hr-4℃-SB-pH 7.87), S11: AGC (12 hr-25℃-AC-pH 2.14), S12: AGC (12 hr-25℃-DW-pH 6.04), S13: AGC (12 hr-25℃-SB-pH 7.95), S14: AGC (12 hr-40℃-AA-pH 2.11), S15: AGC (12 hr-40℃-DW-pH 5.98), S16: AGC (12 hr-40℃-SB-pH 7.64), S17: AGC (24 hr-4℃-AA-pH 2.04), S18: AGC (24 hr-4℃-DW-pH 5.57), S19: AGC (24 hr-4℃-SB-pH 7.55), S20: AGC (24 hr-25℃-AC-pH 2.13), S21: AGC (24 hr-25℃-DW-pH 5.27), S22: AGC (24 hr-25℃-SB-pH 7.98), S23: AGC (24 hr-40℃-AA-pH 2.14), S24: AGC (24 hr-40℃-DW-pH 5.27), S25: AGC (24 hr-40℃-SB-pH 7.84).

3) 최종 제조 조건에서 제조된 AGC의 재현성 검증

앞선 원료 혼합비율 및 제조공정 조건에 대한 screening 결과를 바탕으로, allithiamine 생성 경향과 제조공정의 적용 가능성을 종합적으로 고려하여 최종 AGC 제조 조건을 별도로 설정하였다. 최종 제조 조건은 원료 혼합비율, 반응 온도, 반응시간 및 pH 조건을 포함하여 설정하였으며, 이후 생리활성 평가에 사용되는 AGC는 해당 최종 제조 조건을 적용하여 제조하였다.

설정된 최종 제조 조건의 재현성을 확인하기 위하여 동일한 조건으로 AGC를 2회 반복 제조하고, 제조된 AGC의 thiamine, allicin 및 allithiamine 함량과 수율을 분석하였다. 그 결과를 Table 4에 나타내었다.

반복 제조한 두 시료(S26 및 S27)의 allithiamine 함량을 분석한 결과, 각각 8.52 및 9.39 mg/g으로 확인되었으며, 두 시료 간 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한 thiamine 및 allicin 함량과 수율에서도 유사한 수준이 확인되었다. 따라서 최종 제조 조건을 적용하여 반복 제조한 AGC에서 주요 성분의 함량 및 수율이 유사한 수준으로 나타나, 해당 제조 조건에서 일정 수준의 제조 재현성이 확보됨을 확인하였다.

Table 4. Analysis of thiamine, allicin, allithiamine contents in S26 and S27

Sample	Thiamine (mg/g)	Allicin (mg/g)	Allithiamine (mg/g)	Yield (%)
S26	90.46	16.62	8.52	42.5
S27	85.93	15.75	9.39	43.7

S26: Allithiamine garlic complex (AGC) 1st, S27: Allithiamine garlic complex (AGC) 2nd.

3. 최종 제조 조건으로 제조한 AGC의 생리활성

1) AGC가 DPPH 자유라디칼 소거능에 미치는 영향

선정된 제조 조건에서 제조된 AGC의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. AGC는 티아민을 함유하고 있으므로, 티아민 단독 처리군과 비교하여 AGC의 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과, AGC와 티아민 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 모든 농도에서 AGC가 thiamine 단독 처리군에 비해 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다.

2) AGC가 C2C12 세포 생존율 및 세포 보호 활성에 미치는 영향

마우스 유래 C2C12 근아세포에서 AGC 및 thiamine의 세포독성 및 세포 보호 활성을 평가한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 먼저 AGC 및 thiamine의 세포 생존율을 평가한 결과, AGC 처리군은 대조군에 비해 전반적으로 농도 의존적으로 높은 세포 생존율을 나타내었다. 1 mg/mL 농도에서는 세포 생존율이 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 대조군 대비 130.87±3.48%로 높은 세포 생존율을 나타내었다. Thiamine 처리군에서도 농도 증가에 따라 세포 생존율이 증가하는 경향이 나타나, AGC 및 thiamine 모두 C2C12 세포에 대한 유의적인 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다.

이후 H_2O_2로 산화 스트레스를 유도한 C2C12 세포에서 AGC 및 thiamine의 세포 보호 활성을 평가한 결과, AGC 및 thiamine 처리군 모두 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며, H_2O_2 단독 처리군의 세포 생존율인 68.55±4.06%에 비해 모든 농도에서 유의적으로 높은 세포 생존율을 나타내었다. 이를 통해 AGC 및 thiamine이 H_2O_2에 의해 유도된 산화 스트레스로부터 C2C12 세포를 보호하는 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 양성 대조군으로 사용한 홍삼농축액 분말은 0.1 및 0.5 mg/mL에서 각각 92.47±2.19% 및 93.08±0.80%의 세포 생존율을 나타내었으며, AGC는 0.3 및 0.5 mg/mL에서 각각 93.26±3.52% 및 96.84±4.74%의 세포 생존율을 나타내어 홍삼농축액 분말과 유사하거나 높은 세포 보호 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 통해 AGC는 C2C12 세포에서 세포 생존율을 증가시키고 H_2O_2에 의해 유도된 산화 스트레스를 완화하여 세포 보호 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

3) AGC가 C2C12 세포에서 LDH 활성 억제에 미치는 영향

마우스 유래 C2C12 근아세포에서 AGC 및 thiamine의 LDH 활성 억제능을 평가한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. H_2O_2 단독 처리군인 대조군에 비하여 AGC 및 thiamine은 모든 농도에서 LDH 활성을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다. 특히 AGC 1 mg/mL 처리군에서는 LDH 활성 억제능이 78.47±0.16%로 나타나, 양성 대조군인 0.5 mg/mL 처리군의 77.87±0.31%와 유사한 수준의 LDH 활성 억제능을 나타내었다. 또한 저농도인 0.05 및 0.1 mg/mL에서 AGC는 각각 60.41±0.65% 및 56.79±3.05%의 LDH 활성 억제능을 나타내었으며, 동일 농도의 thiamine(각각 36.81±0.31% 및 49.34±3.20%)에 비해 유의적으로 높은 억제능을 나타내었다. 따라서 AGC

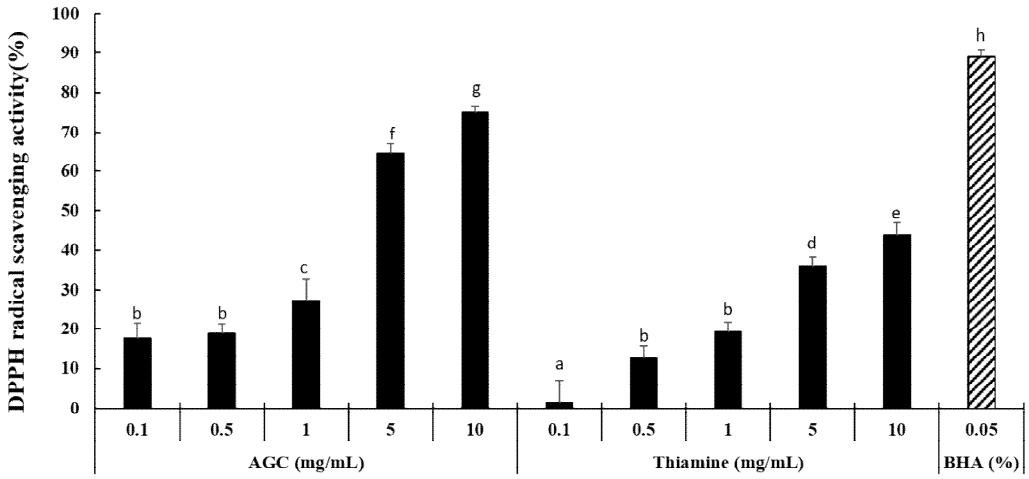


Fig. 4. Effect of AGC, Thiamine on DPPH radical scavenging activity.

AGC: Allithiamine garlic complex. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

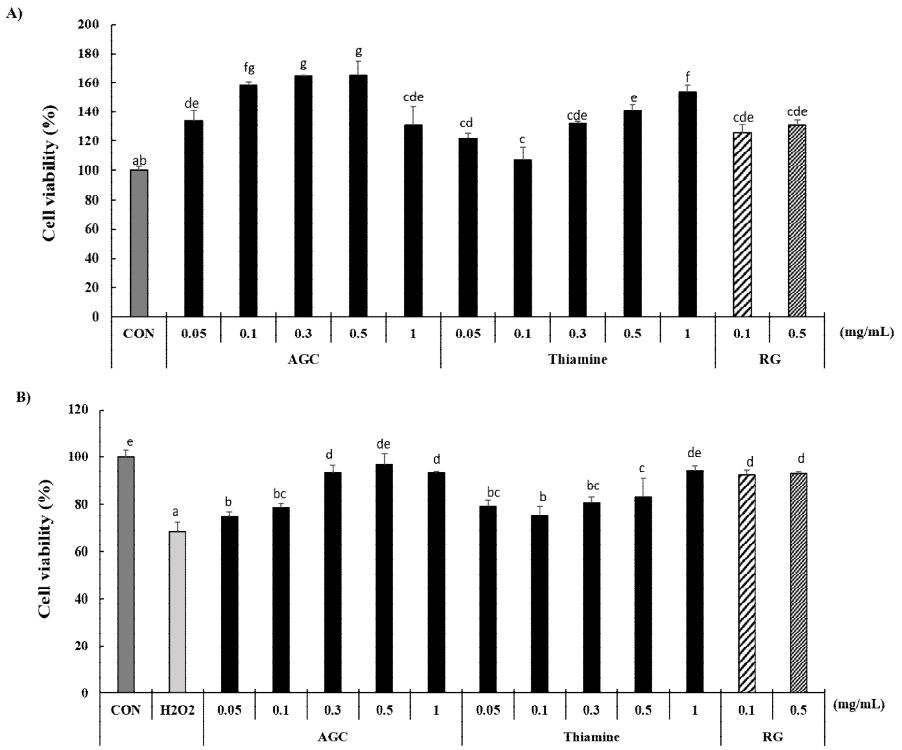


Fig. 5. Effects of AGC on cell viability and protective activity in C2C12 cells.

AGC: Allithiamine garlic complex. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

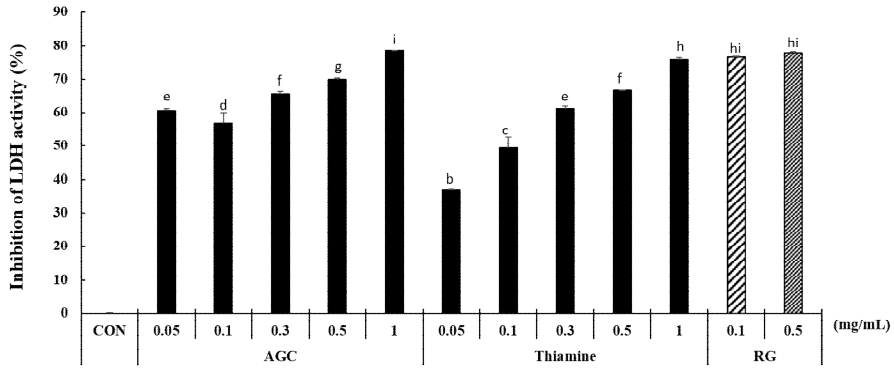


Fig. 6. Inhibitory effect of AGC on LDH activity in C2C12 Cells.

AGC: Allithiamine garlic complex. The Results are values are mean±S.D. (n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

가 thiamine보다 우수하게 LDH 활성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

고 찰

최근 건강에 대한 관심이 증대됨에 따라 식품 및 천연물 소재가 지니는 다양한 생리활성과 이를 활용한 기능성 소재 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 마늘(*Allium sativum* L.)은 대표적인 식용 및 약용 식물로서 alliin, allicin 및 S-allyl cysteine을 비롯한 유기황 화합물이 마늘의 주요 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 마늘에 함유된 유기황 화합물은 특유의 강한 휘발성과 불쾌취를 유발하여 가공식품 및 기능성 소재 개발에 있어 한계가 존재하였다(Choi HY 등 2007). 한편, thiamine(vitamin B_1)은 탄수화물

대사 및 에너지 생성에 필수적인 수용성 비타민으로, 식품을 통한 충분한 섭취가 중요하다(Yoon HS 2005). 마늘의 allicin은 thiamine의 thiazole 고리와 반응하여 지용성 화합물인 allithiamine을 생성하며, allithiamine은 thiamine 고유의 생리활성을 나타내면서 더 높은 체내 흡수 및 이용률이 향상되는 장점이 보고되었다(Fujiwara M 등 1954b). 그러나 천연 원료를 이용하여 allithiamine의 생성을 유도하고, 생산 표준화를 위한 제조공정을 확립한 연구는 여전히 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 생마늘과 thiamine 및 thiamine 공급원을 활용하여 allithiamine 함량을 높일 수 있는 AGC의 제조 조건을 screening하고, 제조된 AGC의 항산화 및 C2C12 세포 보호 활성을 평가하고자 하였다.

먼저 AGC 제조에 적합한 thiamine 공급원을 선정하기 위하여 맥주효모, 완두콩 및 호랑이콩의 항산화 활성, C2C12 세포 보호 활성 및 LDH 억제 활성, thiamine 함량을 비교하였다. DPPH radical 소거능을 평가한 결과, 맥주효모와 호랑이콩에서 상대적으로 우수한 항산화 활성이 확인되었으며, 각 원료를 마늘과 혼합한 시료 중, BYGC가 가장 우수한 C2C12 세포 보호 활성과 LDH 활성 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과를 통해 thiamine 공급원 원료에 따라 마늘과 혼합한 시료의 생리활성에 차이가 나타날 수 있음을 확인하였다.

원료별 thiamine 함량을 비교한 결과, 맥주효모는 완두콩 및 호랑이콩에 비해 높은 thiamine 함량을 나타내었으며, 마늘과 혼합한 경우에도 BYGC에서 가장 높은 thiamine 함량이 확인되었다. *S. cerevisiae*는 thiamine 대사 및 생합성과 관련된 특성을 갖는 것으로 보고되어 있으나(Nosaka K 2006), 본 연구에서는 맥주효모의 높은 thiamine 함량이 나타난 구체적인 원인이나 thiamine 함량에 영향을 미치는 기전을 직접적으로 확인하지는 않았다. 따라서 본 연구에서 확인된 원료별 thiamine 함량 차이는 각 원료의 특성에 따른 결과로 판단하였으며, 항산화 활성, C2C12 세포 보호 활성, LDH 활성 억제능 및 thiamine 함량을 종합적으로 고려하여 맥주효모를 AGC 제조를 위한 thiamine 공급원으로 선정하였다.

선정된 맥주효모를 기반으로 AGC의 원료 배합비를 설정하기 위한 screening을 수행하고, 원료 혼합비율에 따른 allithiamine 생성량을 비교하였다. 먼저 thiamine과 맥주효모의 첨가량을 일정하게 유지하고 생마늘의 첨가 비율을 단계적으로 증가시킨 결과, 생마늘 첨가량이 증가함에 따라 allithiamine 생성량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 생마늘 60%를 첨가한 조건에서 가장 높은 allithiamine 함량이 확인되었다. 이는 본 연구에서 설정한 배합 조건에서 생마늘의 첨가량이 allithiamine 형성에 영향을 미치는 주요 요인 중 하나임을 시사한다.

생마늘 60%를 고정한 후 thiamine과 맥주효모의 첨가량을 조절한 결과, S5 조건에서 8.05 mg/g의 allithiamine이 확인되었으며, thiamine 및 맥주효모의 첨가량을 증가시킨 S6 및 S7 조건에서는 각각 8.96 및 9.73 mg/g으로 더 높은 함량이 나타났다. 그러나 S5 이후에는 thiamine 및 맥주효모의 투입량 증가에 비해 allithiamine 함량의 증가 폭이 상대적으로 제한적인 경향을 나타내었다. 특히 S5 대비 S6 및 S7의 allithiamine 함량은 각각 약 11.3% 및 20.9% 증가하였으므로, 단순히 최대 함량을 기준으로 배합비를 선정하기보다는 추가 원료 투입량과 이에 따른 원료비 및 제조 공정상의 부담을 함께 고려할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 allithiamine 함량이 충분히 확보되면서도 원료 사용량과 경제성 및 공정 적용 가능성을 고려하여 S5 조건을 후속 제조공정에 적용할 배합비로 설정하였다. 이는 소재 개발 과정에서 특정 지표성분의 최대 함량만을 기준으로 조건을 선정하기보다 원료 효율과 제조공정의 실용성을 함께 고려하여 배합비를 결정할 필요가 있음을 보여준다.

S5 배합비를 적용하여 pH, 반응시간 및 반응 온도에 따른 allithiamine 함량을 비교한 결과, 반응 온도 및 pH에 따라 함량 차이가 나타났으며, 특히 40℃ 및 pH 7 이상 8 미만 조건에서 상대적으로 높은 함량이 확인되었다. 반면 동일한 온도 및 pH 조건에서 반응시간을 12시간에서 24시간으로 증가시켰을 때 allithiamine 함량의 차이는 크지 않았다. 이러한 결과는 본 연구의 screening 범위에서 반응시간을 연장하는 것보다 반응 온도 및 pH를 적절하게 설정하는 것이 allithiamine 함량 확보에 상대적으로 중요할 가능성을 보여준다. 또한 allithiamine 형성이 반응물의 pH와 온도에 영향을 받는다는 선행 연구의 보고(Kim IH 등 1998)와도 유사한 경향을 나타내었다.

다만 본 연구에서 screening을 통해 확인된 높은 allithiamine 함량을 나타내는 조건이 반드시 실제 제조공정에서의 최종 조건으로 가장 적합한 것은 아니다. 식품소재의 제조공정에서는 지표 성분의 함량뿐만 아니라 원료의 물성 변화, pH 및 온도의 균일한 유지, 제조설비에서의 공정 제어 가능성, 원료 사용량 및 제조원가 등을 함께 고려해야 한다. 이에 본 연구에서는 screening 결과를 바탕으로 allithiamine 형성에 유리한 조건의 범위를 확인하고, 실제 제조설비에서의 적용 가능성과 공정 효율 및 대량 생산 가능성을 종합적으로 고려하여 최종 AGC 제조 조건을 설정하였다. 이러한 접근은 실험실 수준에서의 최대 함량을 확보하는 것과 실제 생산공정에서 안정적으로 적용할 수 있는 제조 조건을 구분하여 설정하였다는 점에서 의미가 있다.

한편, 본 연구에서 측정한 allithiamine 함량은 최종 시료의 단위 중량당 함량(mg/g)으로, 제조 및 동결건조 과정에서의

수분 제거에 따른 농축 효과가 함께 반영될 수 있다. 따라서 동결건조 후 확인된 함량의 증가를 동결건조 과정에서 allithiamine이 추가적으로 생성된 결과로 단정하기는 어렵다. 또한 제조 조건에 따라 최종 수율에 차이가 발생할 수 있으므로, 각 조건의 allithiamine 함량은 수율과 함께 고려하여 해석할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 조건별 allithiamine 함량과 수율을 함께 제시하였으며, 함량 차이를 실제 allithiamine 생성량의 차이로 직접 해석하기보다는 최종 제조물에서 확인된 단위 중량당 함량의 차이로 해석하였다. 따라서 본 screening에서 확인된 40℃ 및 pH 7 이상 8 미만 조건의 상대적으로 높은 allithiamine 함량은 해당 조건이 allithiamine 형성에 유리할 가능성을 시사하는 결과로 판단된다. 다만 실제 반응 과정에서의 생성량 차이를 명확하게 규명하기 위해서는 반응 전후 및 동결건조 전후의 allithiamine 함량과 고형분 및 수율을 포함한 물질수지에 대한 추가적인 검증이 필요할 것으로 판단된다.

최종 제조 조건을 적용하여 AGC를 반복 제조하고 thiamine, allicin 및 allithiamine 함량을 분석한 결과, 두 제조 batch 모두에서 8 mg/g 이상의 allithiamine이 확인되었으며, 두 batch 간 유사한 함량을 나타내었다. 이는 최종 제조 조건을 반복 적용하였을 때 AGC의 주요 성분 함량이 유사한 수준으로 유지될 수 있음을 보여준다. 기능성 소재의 품질관리를 위해서는 주요 성분의 함량을 일정하게 유지하는 것이 중요하므로, 본 연구에서 확인된 반복 제조 간 allithiamine 함량의 유사성은 향후 AGC 제조공정의 표준화 및 품질관리 기준 설정을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 다만 본 연구에서는 2회의 반복 제조를 대상으로 확인하였으므로, 제조공정의 재현성을 보다 명확하게 평가하기 위해서는 추가적인 제조 batch를 대상으로 한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

최종 제조 조건에서 제조된 AGC의 생리활성을 평가한 결과, AGC는 thiamine 단독 처리군 대비 유의하게 높은 DPPH radical 소거능을 보였다. 이는 AGC의 항산화 활성이 thiamine 자체의 효과에 국한되지 않고, 마늘 유래 유기황 화합물 및 allithiamine을 포함한 AGC 구성성분의 복합적인 영향에 의한 결과일 가능성을 시사한다. 다만 본 연구에서는 AGC의 개별 구성성분을 분리하여 비교하지 않았으므로, 각 성분의 기여도 또는 시너지 효과에 대해서는 추가적인 검증이 필요할 것으로 판단된다.

C2C12 근아세포를 이용하여 AGC의 세포 수준에서의 생리활성을 평가한 결과, AGC는 모든 농도에서 유의적인 세포 독성을 나타내지 않았으며, H_2O_2로 산화 스트레스를 유도한 세포 모델에서 AGC 처리는 감소된 세포 생존율을 농도 의존적으로 회복시켰다. C2C12 세포에서 H_2O_2 처리는 세포 내 ROS 생성을 증가시켜 산화적 손상과 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Siu PM 등 2009). 또한, 세포막 손상과 관련된 LDH 활성에서도 유사한 결과가 확인되었다. H_2O_2 처리에 의해 증가한 LDH 활성이 AGC 처리 후 농도 의존적으로 억제되었으며, 일부 농도에서는 thiamine군보다 우수한 억제 효과를 나타내었다.

LDH(Lactate dehydrogenase)는 주로 세포질 내에 존재하며, 세포막 손상에 의해 세포 외부로 유출되는 효소로서 세포 손상 정도를 평가하는 지표로 활용될 수 있다(Jones DA 등 1984). 따라서 본 연구 결과, C2C12 세포에서 AGC에 의한 세포 생존률 증가 및 LDH 활성 억제는 AGC가 근육세포의 산화 스트레스 조건에서 세포 생존능 유지에 기여할 가능성을 시사한다.

종합하면, 본 연구에서는 생마늘, thiamine 및 맥주효모를 이용하여 allithiamine 함량에 영향을 미치는 원료 배합 및 제조공정 조건을 screening하고, screening 결과와 제조상의 적용 가능성을 종합적으로 고려하여 실제 제조에 적용할 최종 제조 조건을 별도로 설정하였다. 또한 최종 제조 조건을 적용하여 반복 제조한 AGC에서 유사한 수준의 allithiamine 함량을 확인하였으며, AGC의 항산화 활성 및 산화 스트레스가 유도된 C2C12 세포에서의 보호 활성을 확인하였다. 이러한 결과는 AGC가 마늘 유래 유기황 화합물과 thiamine을 활용한 복합 기능성 소재로서 활용 가능성이 있음을 보여준다. 다만 본 연구에서 확인된 allithiamine 함량은 최종 시료의 단위 중량당 함량으로, 제조 및 동결건조 과정에서의 수분 제거에 따른 농축 효과가 포함될 수 있으므로 이를 실제 allithiamine 생성량의 증가로 직접 해석하는 데에는 한계가 있다. 향후에는 반응 전후 및 동결건조 전후의 물질수지를 포함한 분석을 통해 공정 단계별 allithiamine의 생성 및 회수 특성을 명확하게 확인할 필요가 있다. 또한 본 연구는 제한된 제조 조건을 대상으로 한 screening과 *in vitro* 수준의 생리활성 평가를 수행한 연구이므로, 보다 다양한 제조 조건 및 추가적인 제조 batch를 대상으로 한 검증과 함께 동물실험 및 분자생물학적 분석을 통해 AGC의 생체 내 효능과 작용기전을 규명할 필요가 있다. 아울러 allithiamine 함량과 생리활성 간의 관계를 명확히 하기 위해 개별 구성성분에 대한 비교 및 상관관계 분석 등의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 생마늘, thiamine 및 맥주효모를 활용하여 allithiamine 함량이 높은 AGC의 제조 조건을 screening하고, 최종 제조 조건으로 제조된 AGC의 항산화 및 산화 스트레

스가 유도된 C2C12 세포에서의 보호 활성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 맥주효모, 완두콩 및 호랑이콩 중 맥주효모가 상대적으로 우수한 DPPH radical 소거능과 C2C12 세포 보호 활성을 나타내었으며, thiamine 함량 또한 21.7 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 또한 마늘과 혼합한 시료 중 BYGC가 가장 우수한 세포 보호 활성 및 LDH 활성 억제능과 높은 thiamine 함량을 나타내어, AGC 제조를 위한 thiamine 공급원으로 맥주효모를 선정하였다.

2. 생마늘, thiamine 및 맥주효모의 원료 혼합비율과 제조공정 조건을 단계적으로 screening하여 AGC 제조를 위한 원료 배합비 및 제조 조건 설정에 필요한 기초자료를 확보하였다. 원료 혼합비율을 비교한 결과, 생마늘 첨가량 증가에 따라 allithiamine 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 생마늘 60.0%, thiamine 5.0% 및 맥주효모 15.0%를 포함하는 S5 조건을 원료 사용량, 제조원가 및 공정 적용 가능성을 종합적으로 고려하여 후속 제조공정에 적용할 배합비로 설정하였다. 제조공정 조건에 따른 allithiamine 함량을 비교한 결과, 반응시간에 따른 차이보다 반응 온도 및 pH에 따른 차이가 상대적으로 크게 나타났으며, 40℃ 및 pH 7 이상 8 미만 조건에서 상대적으로 높은 allithiamine 함량이 확인되었다. 이를 바탕으로 allithiamine 형성에 유리한 조건의 범위를 확인하고, 실제 제조공정에서의 적용 가능성 및 공정 효율 등을 종합적으로 고려하여 최종 AGC 제조 조건을 설정하였다. 해당 조건을 적용하여 AGC를 반복 제조한 결과, 두 제조 batch에서 모두 8 mg/g 이상의 allithiamine 함량이 확인되었으며 batch 간 유사한 함량 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 본 연구에서 설정한 제조 조건을 반복 적용할 경우 AGC의 allithiamine 함량이 비교적 유사한 수준으로 유지될 수 있음을 보여주며, 향후 AGC 제조공정의 표준화 및 품질관리 기준 설정을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 최종 제조 조건으로 제조한 AGC는 thiamine과 비교하여 모든 농도에서 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, H_2O_2로 산화 스트레스가 유도된 C2C12 세포 모델에서 세포 생존율을 증가시키고 LDH 활성을 억제하였다.

따라서 본 연구에서 확립한 AGC는 allithiamine을 지표성분으로 표준화할 수 있는 기능성 복합 소재로서 개발 가능성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(RS-2024-00407212).

REFERENCES

Choi HY, shim YS, Kim CY, Lee C, Shin DB (2007) Characteristics of thiosulfinates and volatile sulfur compounds from blanched garlic reacted with alliinase. Korean J Food Sci Technol 39(6): 600-607.

Choi SK, Baek SH, Choi SW (2013) The effects of endurance training and thiamine supplementation on anti-fatigue during exercise. J Exerc Nutrition Biochem 17(4): 189-198.

Chung JY, Kim CS (2008) Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(8): 972-978.

Frias J, Giacomino S, Peñas E, Pellegrino N, Ferreyra V, Apro N, Carrión MO, Vidal-Valverde C (2011) Assessment of the nutritional quality of raw and extruded *Pisum sativum* L. var. laguna seeds. LWT-Food Sci Technol 44(5): 1303-1308.

Fujiwara M, Watanabe H, Matsui K (1954a) “Allithiamine” a newly found derivative of vitamin B_1. I. Discovery of allithiamine. J Biochem 41(1): 29-39.

Fujiwara M, Nanjo H, Arai T, Ziro S (1954b) “Allithiamine” a newly found derivative of vitamin B_1. II. The effect of allithiamine on living organism. J Biochem 41(2): 273-285.

Jaeger A, Arendt EK, Zannini E, Sahin AW (2020) Brewer’s spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. Fermentation 6(4): 123.

Jones DA, Jackson MJ, McPhail G, Edwards RH (1984) Experimental mouse muscle damage: the importance of external calcium. Clin Sci (Lond) 66(3): 317-322.

Kim DG, Cha GS, Yoo SH, Kang MJ (2025) Anti-inflammatory effects of the aged garlic extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Food Sci Preserv 32(1): 136-148.

Kim IH, Lee YC, Kim HK, Park MH (1998) Synthesis and purification of allithiamine from garlic. Korean J Food Sci Technol 30(2): 293-298.

Kim JW, Ye EJ, Chae JH, Kim SY, Jang MA, Doh YB (2025) Method for producing composite composition with increased garlic-derived allithiamine content and composite composition produced thereby. Korean Patent Application No. 10-2025-0131740.

Kim KJ, Do JR, Kim HK (2005) Antimicrobial, Antihypertensive and anticancer activities of garlic

extracts. Korean J Food Sci Technol 37(2): 228-232.

Kim YW, Jang MW, Hong SY, Kim YH (2012) Assessing southern-type garlic suitability with regards to soil and temperature conditions. Korean J Soil Sci Fert 45(2): 266-271.

Kourounakis PN, Rekka EA (1991) Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 74(2): 249-252.

Lee CD, Chae J, Kim M, Jang M, Ye E, Kim J, Lee S (2025) Identifying the garlic and grain mixture with the highest allithiamine content. Agriculture 15(3): 284.

Makarchikov AF, Wins P, Bettendorff L (2025) Biochemical and medical aspects of vitamin B1 research. Neurochem Int 185: 105962.

Ministry of Food and Drug Safety (2015) Information On Functional Ingredients For Health Functional Foods: 2-60 Garlic. https://www.foodsafetykorea.go.kr (Accessed 22. 10. 2026).

Moon WH, Yook KD (2014) Antimicrobial effect of garlic extract against pathogenic bacteria. J Digit Conv 12(10): 477-484.

Mrowicka M, Mrowicki J, Dragan G, Majsterek I (2023) The importance of thiamine (vitamin B1) in humans. Biosci Rep 43(10): BSR20230374.

Namgung HJ, Park HJ, Cho IH, Choi HK, Kwon DY, Shim SM, Kim YS (2010) Metabolite profiling of doenjang, fermented soybean paste, during fermentation. J Sci Food Agric 90(11): 1926-1935.

Nosaka K (2006) Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 72(1): 30-40.

Nozaki S, Mizuma H, Tanaka M, Jin G, Tahara T, Mizuno K, Yamato M, Okuyama K, Eguchi A, Akimoto K, Kitayoshi T, Mochizuki-Oda N, Kataoka Y, Watanabe Y (2009) Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide improves energy metabolism and physical performance during physical-fatigue loading in rats. Nutr Res 29(12): 867-872.

Rocchi R, Wolkers-Rooijackers JCM, Liao Z, Tempelaars MH, Smid EJ (2023) Strain diversity in *Saccharomyces cerevisiae* thiamine production capacity. Yeast 40(12): 628-639.

Sangronis E, Machado CJ (2007) Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. LWT-Food Sci Technol 40(1): 116-120.

Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, Mavumengwana V, Li HB (2019) Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). Foods 8(7): 246.

Shin JH, Choi DJ, Chung MJ, Kang MJ, Sung NJ (2008) Changes of physicochemical components and antioxidant activity of aged garlic at different temperatures. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(9): 1174-1181.

Siu PM, Wang Y, Alway SE (2009) Apoptotic signaling induced by H_2O_2-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. Life Sci 84(13-14): 468-481.

Sun S, Wong S, Mak A, Cho M (2014) Impact of oxidative stress on cellular biomechanics and rho signaling in C2C12 myoblasts. J Biomech 47(15): 3650-3656.

Youn HS (2005) New nutritional concepts of vitamins and minerals. Clin Exp Pediatr 48(12): 1295-1309.

Yun AR, Choi KH (2011) Meta analysis for anti-hyperlipidemia effect of garlic. J Kor Data Anal Soc 13(3): 1197-1207.

Date Received Sep. 02, 2026
Date Revised Oct. 27, 2026
Date Accepted Oct. 27, 2026