
참깨의 香氣成分 및 褐色化 關聯物質의
生理活性

姜 明 花

湖西大學校 自然科學部 食品營養學科

참깨의 香氣成分 및 褐色化 關聯物質의 生理活性

姜明花

湖西大學校 自然科學部

초 록

참기름은 높은 온도로 볶아 짜는 공정을 통해 제조되는데 이때 참깨의 성분 중 당과 단백질에 의한 Maillard 반응에 의해 향기성분인 pyrazine 화합물과 갈색물질이 생성된다. 참깨의 볶는 방법, 온도 및 시간은 참기름의 맛과 향기에 중요한 인자가 될 수 있고 또한 참기름에 함유되어 있는 갈색물질과 향기성분인 pyrazine 류가 생리활성을 나타낼 수 있는 가능성이 제기되어 본 연구에서는 참기름으로부터 갈색화 관련 물질을 용매별로 분류하여 tyrosinase 저해 효과와 항산화 효과를 측정했고 pyrazine 유도체들의 혈소판 응집에 미치는 효과를 측정하였다. 갈색도가 높은 butanol, methanol에서 농도 의존적으로 높은 tyrosinase 저해효과를 보였다. 또한 각종 radical 소거 능을 측정한 결과 butanol에서 높은 소거능을 보였다. 향기 성분에 다량 함유되어 있는 Pyrazine 유도체가 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집억제능을 측정한 결과 -methyl의 결합수가 많을수록 (2,3,5-trimethylpyrazine>2,5-dimethylpyrazine>pyrazine) 농도 의존적으로 높은 응집 억제효과를 나타내었다. 이상의 결과, 참기름 가공 공정에서 생성되는 갈색화관련 물질과 향기 성분인 pyrazine 유도체는 생리활성을 나타내는 물질임이 확인되어 기능성 식품에 다양하게 활용되기를 기대한다.

Key word : pyrazine, antiplatelet, brown pigmane, maillard reaction, sesame.

I . 서 론

참깨(*Sesamum indicum L.*)는 영양가가 높고, 볶음과정에서 고소하고 특유한 향미와 갈색화 물질을 생성하기 때문에 식용유, 조미료, 향신료 등으로 오래전부터 우리나라와 중국 등지에서 빼놓을 수 없는 식품 부재료로 다양하게 이용되어 왔다. 깨강정, 깨죽, 깨소금 등과 같이 종실 자체를 사용하거나, 종자를 볶아 압착하여 기름을 짜 식용유로 사용하여왔다. 참기름은 높은 온도로 볶아 짜는 공정을 통해 제조된다. 이때 참기름 특유의 고소한 맛과 진한 갈색은, 참깨의 성분 중 당과 단백질에 의한 Maillard 반응에 의해 생성되어지며, 이 갈색화 및 향기성분은 가열온도와 시간에 의해 크게 좌우된다. 참깨의 볶는 방법, 온도 및 시간은 참기름의 맛과 향기에 중요한 인자가 될 수 있을 뿐 아니라, 생성되는 갈색물질은 생체 내 생리활성에 관여할 것으로 추정된다. 가공식품 중에 발생하는 다수의 pyrazine 류(Fig. 1)는 그들 자신이 천연에 존재하는 경우는 드물고 가공처리하는 동안에 공존하는 환원당과 아미노산류와의 반응 또는 단백질의 열분해 등에 의해서 2

차적으로 생성되는데 100 여종 이상의 화합물이 식품에서 분리되고 있다. 특히 참기름 중에는 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine(Fig. 1)을 형성하고 acetylpyrazine 도 많이 형성된다. 최근 천연물에 함유되어 있는 pyrazine 류가 혈소판 응집을 억제하고 혈전이 형성되기 어렵게 한다는 다수의 연구가 보고되면서 pyrazine 류의 항혈전 작용에 관한 관심이 집중되고 있다

따라서 본 연구에서는 참깨의 볶음과정에서 생성되는 멜라닌 색소의 항산화 성과 tyrosinase 저해 작용이 있는지를 검토하고 또한 pyrazine 류가 혈소판 응집을 억제하고 혈전이 형성에 영향을 미치는지를 측정하여 참기름 생성 시 항산화력이 높은 멜라닌 색소함유 기름 생성을 위한 기초연구 및 참기름의 우수성을 입증하고 아울러 천연식품중에 발생하는 식품의 갈변현상을 막기 위한 천연 효소 저해제의 개발을 시도하고자 한다.

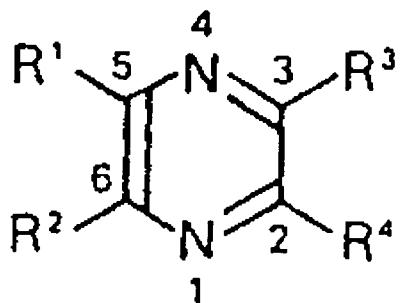


Fig 1 . Structure of pyrazine

II . 실험방법

시약 및 재료

본 실험에 사용된 시료는 pyrazine(Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd.,), -2,5-dimethylpyrazine, -2,3,5-trimethylpyrazine(Tokyo Chem. Inducstry Co. Ltd.,)을 사용하였고, 각 혈소판 유발 인자로 사용되는 arachidonic acids, adenosine-5-diphosphate(ADP), collagen 및 α -tocopherol 은 Sigma (U.S.A. MA., Co. Ltd.) 에서 구입하였다. 세사민, 세사몰린 및 세사미놀 배당체는 Katuszaki 등(1994) 의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 분취하여 Mass로 분자량을 확인하고 각종 실험에 사용하였다. 갈색물질 분리는 참기름을 헥산에 녹이고 XAD-7 resine 을 충진하고 ethyl acetate 을 용출시켜 그 용출물을 감압 건조 후 silica column 으로 chloroform, hexane, butanol, ethyl acetate 및 methanol로 재분리하였다 (Fig. 2). 농도를 일정하게 맞춘 추출물의 갈색도는 흡광도 440 nm에서 측정하였다. 수율 측정은 감압 건조 후 실온에 48 시간 건조시킨 후 측정하였다.

갈색물질의 생리활성 측정 (Tyrosinase 저해효과 측정)

Tyrosinase 저해효과 측정은 Kubo 등(1986)의 방법을 약간 변형하였다. 반응구는 1/5M sodium

phosphate buffer(pH 6.8), 10 μ M DOPA 0.5 mL, 180 unit tyrosinase 0.5 mL 와 농도를 달리한 추출물 1.0mL 를 첨가하여 25°C에서 10 분간 반응시킨 후 흡광광도계 475 nm 에서 측정하여 저해율을 구하였다. 이때 토코페롤, 세사민, 세사몰린 및, 세사미놀 배당체와 비교하였다.

총 페놀함량 측정

용매별 추출물의 총 페놀함량 측정은 AOAC 의 Folin-Denis 법을 일부 변형하여 비색정량하였다. 건조 시료 일정량을 DMSO 에 녹이고 일정 농도로 희석하여 각종 분석에 이용하였다. 시료 0.2 mL 에 Na_2CO_3 를 2.0 mL 가하고 2 분간 실온에 방치한 후 50% Folin-Denis 시약을 0.2mL 가하고 혼합하여 실온에서 30 분 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin으로 농도를 조제하여 표준 곡선을 작성하고 모든 처리는 3 회 반복하여 계산하였다.

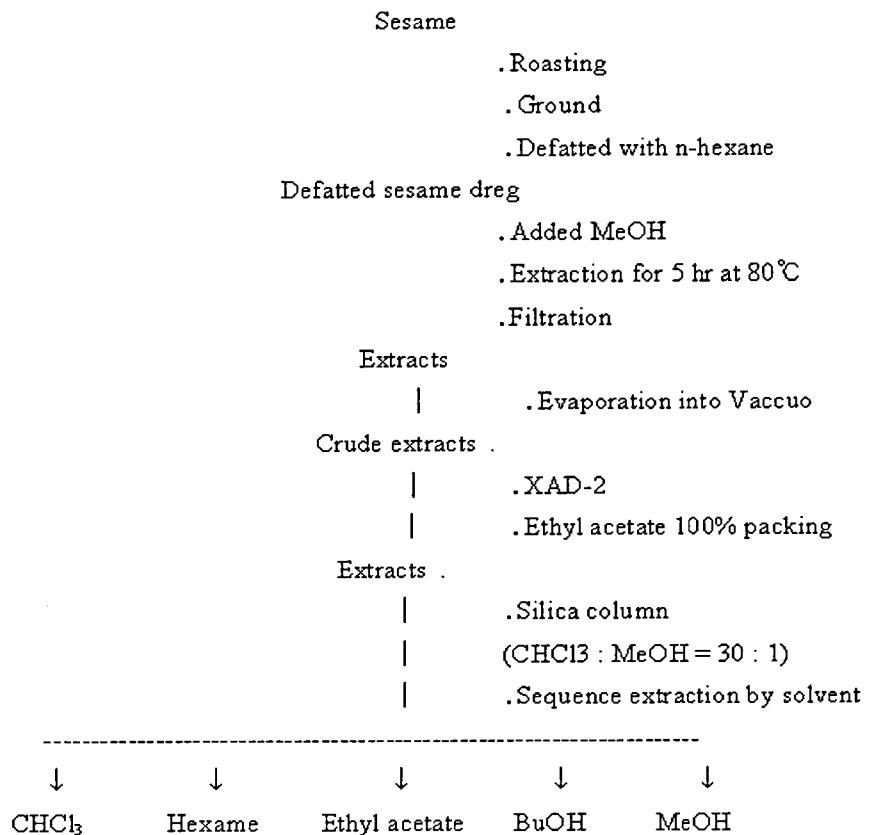


Fig. 2. Schematic procedure for extracts of brown pigment in roasted sesame dreg

Radical 소거능 측정

Superoxide radical 소거능 측정을 위해 SOD 유사활성을 측정했다. 각 시료를 0.2 mL 에 pH 8.5 로 보정한 tris-HCl buffer 3 mL 와 0.2 mM pyrogallol 0.2 mL 를 가하여 25°C에서 10 분간 방치한 후 1N-HCl로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 100-[(시료첨가구의 흡광도)/(시료

무첨가군의 흡광도)] \times 100으로 나타내었다. Hydroxy radical 소거능 측정은 2-deoxyribose oxidation system으로 측정하였다. 시험관에 0.1 mM FeSO₄/EDTA 용액과 10 mM 2-deoxyribose 그리고 시료 용액을 동량으로 첨가하고 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)와 10 mM H₂O₂를 가하고 37°C의 수욕조에서 4 시간 반응시킨 후 2.8% trichloro acetic acid(TCA)용액을 가하여 반응 후 반응을 정지시켰다. 그 후 1.0% thio-barbituric acid(TBA) 용액을 가하고 95°C에서 10 분간 가열 후 금속히 냉각시켜 반응을 정지시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{% Inhibition} = \{(\text{시료무첨가군의 O.D.} - \text{시료 첨가군의 O.D.}) / \text{시료무첨가군의 O.D.} \} \times 100$$

혈소판 응집 억제효과 측정

혈소판 농축 혈장(Platelet rich plasma : PRP)의 조제 : 혈소판 활성화 작용을 측정하기 위해서는 토끼 혈액을 citrate-dextrose 용액에 채혈한 후 250 \times g로 10 분간 원심분리한 후 침전물(Platelet rich plasma)을 분리한 후 Tyrode HEPES buffer pH 6.35 용액으로 두 번 세척한 후, 마지막으로 Tyrode buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 washed platele를 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경으로 계측하여 혈소판 수가 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되도록 회석하여 실험에 사용하였다.

혈소판 활성화 작용 측정 : 혈소판 형태의 변형과 응집작용은 광투과도의 변화를 이용한 흡광도 측정장치(whole-blood aggregometer, Crrono Log Co.,)를 사용하였다. 혈소판 부유액 250 μl 를 취하여 CaCl₂ 1mM을 첨가한다. 1,200 rpm에서 교반하면서 37°C로 incubation 시킨 후 3 분이 경과 한 후에 collagen을 투여하여 혈소판 응집을 유도하였다. 혈소판 활성화 억제 작용은 collagen으로 유도된 aggregation(%)을 대조군(A)으로 각종 pyrazine 류로 처리한 후 유도된 aggregation(%)을 시료(B)로 계산한 결과는 (%) inhibition로 나타내었다.

$$\text{Inhibition(%)} = \{ (A-B)/A \} \times 100$$

A : control aggregation(%) , B : sample aggregation(%)

통계처리

모든 측정 결과는 mean \pm S.D로 나타내었고 유의성 검증은 SAS package를 이용하여 Duncan's multiple range test로 $\alpha=0.05$ 에서 유의성 검증을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

추출물의 수율 및 갈색도 측정

참깨를 갈아 MeOH로 추출한 후 XAD-7 column을 통과시켜 소수성이 강한 지용성 물질을 제거하고 Sillica column을 통과시켜 얻은 각 분획별 추출물의 수율과 갈색도 측정 결과는 Table 1과 같다. 수율은 chloroform 0.35%, hexane 0.306%, ethyl acetate 0.065%, butanol 0.198% 및 methanol

0.416%로 methanol 로 추출할 때 수율이 가장 높았다. 각 용매별 추출물의 갈색도는 지용성 용매에서는 낮은 흡광도를 나타내었으나 butanol 0.293 과 MeOH 0.636 로 갈색물질이 다량 추출되었다.

각 분획별 추출물의 tyrosinase 저해효과

각 분획별 추출물의 tyrosinase 저해 효과를 측정하여 IC_{50} 을 측정한 결과는 Table 2와 같다. Chloroform의 IC_{50} 은 0.278 mg/mL, n-hexane 0.089 mg/mL 였다. Butanol 0.801mg/mL 였고, ethyl acetate 0.496 mg/mL 였다. 한편 갈색도가 가장 높았던 methanol 분획물의 IC_{50} 은 0.174 mg/mL 였다. 이상의 결과 갈색도가 제일 높았던 methanol 보다 butanol에서 tyrosinase 의 저해 효과가 높은 물질을 많이 함유하고 있을 것으로 생각되어 이물질에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

리그난의 tyrosinase 저해효과

참깨에 함유되어 있는 항산화 물질이 tyrosinase 의 효과에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되어 세사민, 세사몰린 및 세사미놀 배당체의 tyrosinase 에 미치는 효과를 측정한 결과 Fig. 3과 같다. 세사민은 0.1 mg/mL의 농도에서는 억제 효과가 없었으나 0.2 mg/mL 및 0.3 mg/mL에서 25% 그리고 0.4 mg/mL에서는 50.0%의 억제효과가 있었으나 그 이상 농도에서는 tyrosinase 의 활성을 촉진시켰다. 또한 세사몰린은 0.1 mg/mL의 농도에서는 16.6%, 0.2 mg/mL 33.3%, 0.3 mg/mL에서 58.3%으로

Table 1. Yields of brown degree in each fractionated

Solvent	Yield (%)	Brown degree (A 440 nm)
Chloroform	0.35	0.023
n-hexane	0.306	0.023
Butanol	0.06	0.092
Ethyl acetate	0.198	0.293
Methanol	0.416	0.636

Table. 2 IC_{50} values of extracts fractionated

	IC_{50} (mg/ml)
Chloroform	0.278
n-hexane	0.089
Butanol	0.801
Ethyl acetate	0.496
Methanol	0.174

나타났다. 한편 참깨박에 함유되어 있는 배당체 성분인 sesaminol-triglucosides 의 경우, 0.1 mg/mL 의 농도에서는 54.2%, 0.2 mg/mL 66.7%, 0.3 mg/mL 에서 70.8%으로 억제효과가 있는 것으로 나타났고 STG 의 경우 고농도에서도 촉진 효과는 나타나지 않았다. 천연 항산화제의 IC₅₀ 을 나타낸 농도를 살펴보면(Table 3) 세사민은 같은 농도에서 거의 없고 세사몰린은 0.267 mg/mL, STG 가 0.033 mg/ml, α -tocopherol 0.127 mg/ml 로 토코페롤이 가장 효과가 좋았고 세사몰린도 억제효과가 다른 리그난 보다 낮은 농도에서 뛰어난 것으로 나타났다. Vamos-vigyazo 등(1981) 은 0.5 mM 4-hexylresorcinol 과 cinnamic acid 를 역미셀계에 첨가한 결과 tyrosinase 의 활성을 46%와 93%까지 억제한다고 보고하였고, Shin 등(2000)의 역미셀계를 이용하여 petroleum ether 로 추출한 지용성 식물체 추출물 중 엽경채류의 추출물을 1% 농도로 첨가하여 tyrosinase 저해효과 분석 결과 무순 69%, 양상치 41%, 알파파 40%, 브로콜리 32% 순으로 나타났고 근채류는 마늘이 100% 억제효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 고구마 70%, 양파 69%, 도라지는 56%로 나타낸다고 보고하였고, 지용성 추출물을 역미셀계에서 분석하는 것이 수용성 추출물을 첨가하여 분석하는 것보다 흡광도 파장에 방해를 주지 않아 효능 평가 시 좋은 방법임을 제안하였다. 최근 Kim 등(2001)은 대극과 식물인 등대풀로부터 분리한 가수분해형 탄닌의 tyrosinase 활성 억제에 미치는 효과를 측정하였다. 등대풀 전초에서 분리한 phenol carboxylic acid 및 phenol carboxylic acid glucosides, gallotannins 을 kojic acid 와 비교한 결과 phenol carboxylic acid 는 carboxy group 이 free 인 경우 효소에 대해 억제효과를 나타내지 않았고, methyl ester 인 경우 현저하게 강한 억제 효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 glucosides 중 1-O-galloyl- β -D-glucose 는 현재 미백 화장품에 첨가제로 사용되고 있고, 이때

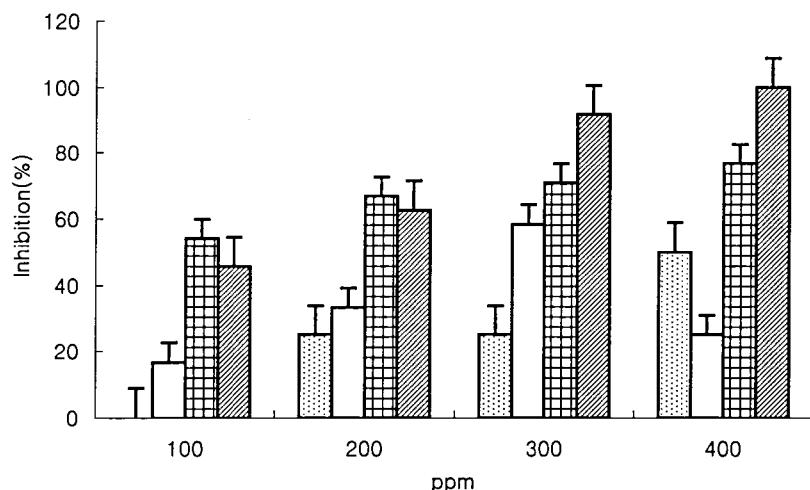


Fig. 3. Tyrosinase inhibition activities of various antiovidants in sesame seed.

Each value is mean \pm SD of experimental group. Different alphabets in each values

Show statistical difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test. ($p<0.0001$)

▨: sesamin □: sesamolin ■: sesaminol-triglucoside(STG) ☐: tocophero.

Table. 3 IC₅₀ values in sesame lignans and α -tocopherol

Antioxidant	IC ₅₀ (mg/ml)
Sesamin	-
Sesamolin	0.267
STG*	0.033
α -tocopherol	0.127

* STG : sesaminol-triglucoside

구성당이 glucose 인 경구가 galactose, quinnic acid 및 shikimic acid 보다 강한 활성을 나타내어 구조와의 상관관계를 구명하여 polyalcohol 의 종류에 따라 활성에 뚜렷한 차이를 나타낸다고 보고하였다(Kim et al. 2001)

총 페놀함량 측정

각 용매별 추출물에 함유되어 있는 총 페놀함량 측정결과 Fig. 4와 같다. 페놀함량은 chloroform 0.2275 mg/mL, n-hexane 0.054 mg/mL butanol 0.2575 mg/mL, ethyl acetate 0.0845 mg/mL 그리고, methanol(MeOH) 0.1945 mg/mL로 chloroform과 butanol에서 페놀함량이 높았다. 메탄올도 비교적 높게 나타났으나 n-hexane과 ethyl acetate 층에서는 비교적 낮았다. 이를 용매별 추출물을 HPLC에 의해 분석한 결과 세사민과 세사몰린 등의 항산화 물질은 거의 검출되지 않았다(data not).

SOD 유사활성

생체내 항산화 효소중의 하나인 superoxide dismutase(SOD)는 세포 내 활성산소를 과산화수소로 전화시키는 반응을 촉매하는 효소이며 SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase

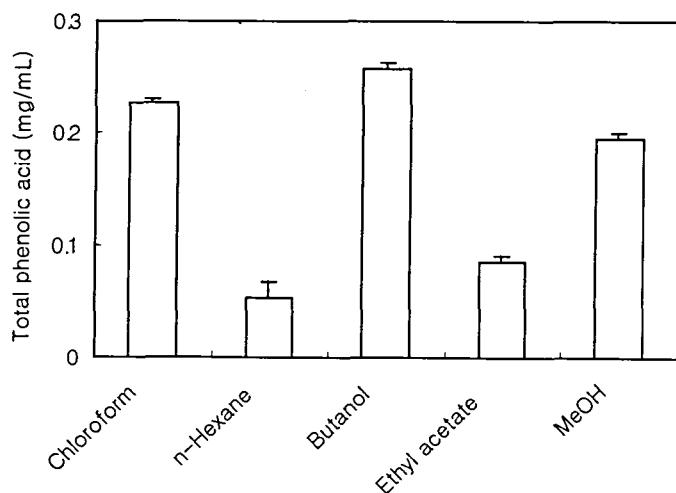


Fig. 4. Total phenolic acids contents of extract fractionated with each solvent from roasted sesame dredge.

에 의해 물분자와 산소 분자로 전환되는 중요한 효소 중에 하나이다($^2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). SOD 와 똑같지는 않지만 유사활성 측정 방법이 사용되고 있다. superoxide anion 의 활성을 억제시키는 물질 즉, SOD 유사 활성 측정 방법이 널리 이용되고 있어 이를 이용해 측정한 결과를 Fig. 5 에 나타내었다. 참기름의 갈색층을 분리하기 위해 용매를 달리하여 추출한 각 용매 분획별 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 chloroform $46.11 \pm 5.49\%$, n-hexane $36.52 \pm 6.99\%$, butanol $56.43 \pm 7.75\%$, ethyl acetate $82.63 \pm 1.32\%$ 및 methanol 이 $87.05 \pm 0.45\%$ 로 나타나 ethyl acetate 과 methanol 에서 SOD 유사활성이 높았다.

Hydroxyl radical 소거능

활성산소중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 hydroxyl radical 소거능을 2-deoxy-ribose oxidation system 을 이용하여 각 fraction 용매별 추출물로 조사한 결과 Fig. 6 과 같다. Hydroxyl radical 소거능은 chloroform 39.29% , butanol 42.97% , ethyl acetate 39.46% 및 methanol 이 45.66% 로 methanol 의 hydroxy radical 소거능이 약간 높았다. Hydroxyl radical 소거능이 비교적 갈색도가 다른 용매보다 높았던 methanol 에서 높게 나타났는데, 이는 참깨에 포함되어 있는 비교적 지용성이 강한 세사민과 세사몰린 및 세사미놀 등 항산화제들을 제거시킨 순수한 갈색물질의 항산화능일 것으로 추정된다.

본 실험결과 갈색도와 항산화성이 일치하고 있음을 알 수 있었고 항산화성이 가장 커던 methanol 에 다양한 항산화 관련 갈색물질이 존재하고 있음을 추정할 수 있겠다. 당과 아미노산의 종류에 따라 갈색도에 있어 차이가 크게 나타나지만, 항산화 효과는 갈색도와 반드시 비례하지 않는다. Lingnert 와 Erriksson (1980, 1981)에 의하면 maillard 초기 반응시에는 항산화 효과가 갈색도에 비례하지만, 최대치에 이르고 난 다음에는 오히려 감소한다고 보고한 바 있다. 이러한 결과를 기초로 Lim 등(1997)의 색도를 일정하게 하여 model system 에서 melanoidin 계 물질들의 항산화 효

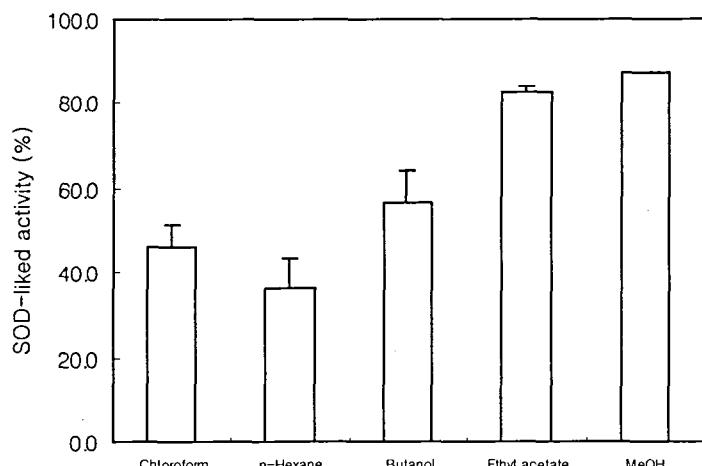


Fig. 5. SOD-like activity(%) of extract fractionated with each solvent from roasted sesame dreg

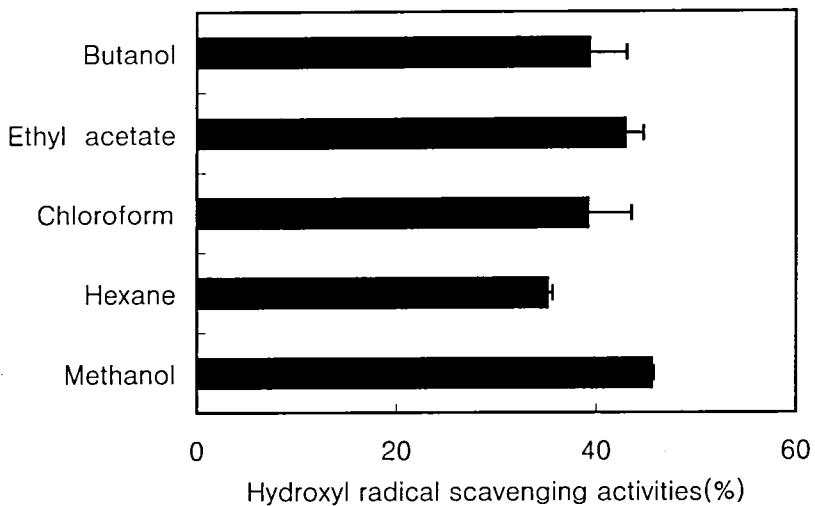


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activities of each solvent extracts prepared from roasted sesame dreg by using 2-deoxy-ribose oxidation system.

과를 측정한 결과 glucose-lysine 이 반응하여 생성된 melanoidin 계 물질의 항산화 효과가 가장 커고 glucose-glycine 이 반응하여 생성된 melanoidin 계 물질의 항산화능이 낮았음을 보고하여 반응물질에 따라 항산화 효과에 큰 차이가 나타난다고 보고하였다.

Pyrazine 류의 혈소판에 미치는 효과

혈소판의 collagen 에 의한 활성화 및 응집작용에 미치는 pyrazine, 2,3-dimethylpyrazine 및 2,3,5-trimethylpyrazine 류의 효과를 측정한 결과 Fig. 7 과 같다. Pyrazine 은 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서 5%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 15.4% 및 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서는 70%의 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 2,3-dimethylpyrazine 의 경우 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 5%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 11.5% 및 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 74%로 pyrazine 과 거의 비슷한 경향으로 나타났다. 한편 2,3,5-trimethylpyrazine 은 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 5%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 35.7% 및 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 86%로 pyrazine 및 2,3-dimethylpyrazine 보다 혈소판 응집 능에 좋은 효과가 있는 것으로 나타났으나 pyrazine 류가 저농도에서는 거의 효과가 나타나지 않았으나 고농도에서 좋은 효과를 나타내었다. 최근 Park 과 Chang(2000)은 자근(紫根)추출물을 이용한 혈소판 응집능을 조사한 결과 혈소판 응집 억제능이 β, β -dimethyl-acetylshikonin \geq α -methyl-n-butylshikonin > isobutylshikonin > acetylshikonin > shikonin 등의 순으로 효과가 있는 것으로 보고한 바 있어 혈소판 응지 억제에는 메틸기가 강한 작용을 할 것으로 추정된다. 또 다른 연구결과 작약 중에 함유되어 있는 benzoyloxypanaeoniflorin 이 혈소판 응집을 강하게 억제한 것으로 보고하였다(Son & Park 2002). 이들 pyrazine 류의 IC₅₀을 계산한 결과 Table 4 와 같이 Pyrazine 은 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,3-dimethylpyrazine 은 2,3,5-trimethylpyrazine 은 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 2,3,5-trimethylpyrazine 이 다른 pyrazine 에 비교해 낮은 농도에서도 억제능이 강한 것으로 나타났다.

Table 4. IC₅₀ of some pyrazine on the platelet aggregation induced by collagen

Compounds	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Pyrazine	220
2,3-dimethylpyrazine	200
2,3,5-trimethylpyrazine	140

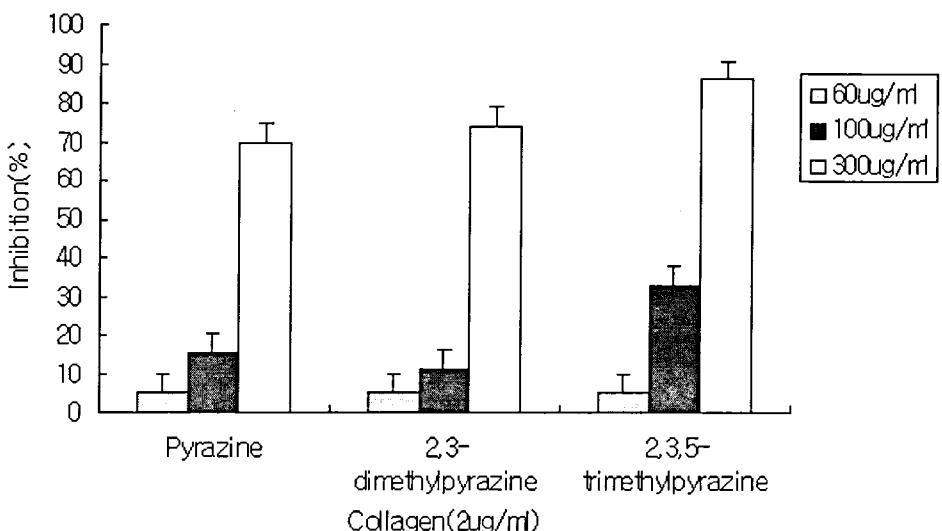


Fig. 7. Inhibitory effect of some pyrazine on the platelet aggregation induced by collagen.

참 고 문 헌

- Joslyn MA, Ponting JD. (1967) Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Adv Food Res* Academic press. NY. Vol. 20 p. 14.
- Namiki M. (1995) The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International* 11: 281-329.
- Jung MY, Bock JY, Baik SO, Lee JH, Lee TK. (1999) Effects of roasting on pyrazine contents and oxidative stability of red pepper seed oil prior to its extraction. *J Agric Food Chem* 47: 1700-1704.
- Lingnert H, Erriksson CE. (1980) Antioxidative maillard reaction products II. Products from sugars and peptides or proteinhydrolysates. *J Food process Preserv* 4: 161.
- Vernin G, Debrauwer L, Vernin GMF, Zamkotsian RM, Metzger J, Larice JL, Parkanyi C. (1992) Heterocycles by thermal degradation of amadori intermediates. in off flavors in Foods and beverages; Charalabous, G., Ed., Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands.
- Praag VM, Stein HS, Tibbetts MS. (1968) Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans. *J Agric Food Chem* 16: 1005-1008.
- Allen MS, Lacey MJ, Harris RLN, Brown WV. (1991) Potent odorants of the roasted powder and brew of

- arabica coffee. *Z. Lebensm.-Unters-Forsch.* 195: 239-245.
- Cheigh HS, Lee JS, Lee CY. (1993) Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 570.
- Chuyen NV, Utsunomiya N, Hidaka A, Kato H. (1990) Antioxidative effect of maillard reaction products *in vivo*. In the maillard reaction in food processing, Human nutrition and physiology, Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F. and Liardon, R. (ed.,) Birkhauser Verlag, Basel. p. 285.
- Marie-France H, Collin S. (1998) Pyrazine and thiazole structural properties and their influence on the recovery of such derivates in aroma extraction procedures. *J Agric Food Chem* 46: 1975-1980.
- Kim ND. Kim SG. (1999) Chemopreventive effects of 2-(allylthio)pyrazine. *Arch Pharm Res* 22: 99-107.
- Moschos CB, Lahiri K, Lyons M, Weisse AB, Oldewurtel HA, Regan TJ. (1973) Relation of Micrcirculatory thrombosis to thrombus in the proximal coronary artery. Effect of aspirin, dipyridamol and thrombolysis. *Am Heart J* 86: 61-68.
- Ohta A, Takahashi H, Miyata N, Hirono T, Uchino E, Yamada K, Aoyaki K, Suwabe Y, Fujitaka M, Suzuki T, Okamoto K. (1997) Anti-platelet aggregation activity of some pyrazine. *Biol Pharm Bull* 1076-1081.
- Katsuzaki H, Kawasumi M, Kawakishi S, Osawa T. (1994) Sesaminol glucoside in sesame seeds. *Phytochem* 35: 773.
- Kubo M. (1986) Application of crude drus with anti-tyrosinase activity to cosmetics. *Fragrance J* 6: 210.
- Vamos-vigyazo L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 15: 49.
- Shin YJ, Han DS, Kim SJ, Kim IH. (2000) Ability of lipophilic extract obtained from plants to inhibit tyrosinase activity in reverse micelles. *Korean J Food Sci Technol* 32: 736.
- Kim JJ, Lee JS, Kim YS, Kim JA, Chung SR, Jang TS, Lee SH. (2001) Inhibitory effect of hydrolysable tannins isolated from the *Euphorbia helioscopia* on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. *Yakak Hoeji* 45: 214.
- Lingnert H, Erriksson CE. (1980) Antioxidative maillard reaction products II. products from sugars and peptides or proteinhydrolysates. *J Food process Presev* 4: 161.
- Lingnert, H. and Erriksson, C.E. Antioxidative effect of maillard reaction products. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5 : 453 (1981).
- Lim WY, Kim JS, Moon GS. (1997) Antioxidative effect and characteristics of different model melanoidins with same color intensity. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1045.
- Park YH, Chang SK. (2000) Effects of shikonin pigments from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* on rabbit platelets. *JFd. Hyg Safety* 15: 167-172.
- Son DJ, Park YH. (2002) Effects of extract from *paeoniae radix* on rabbit platelets. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 511-515.

ゴマの香気成分と褐色化関連物質の生理活性

姜明花

湖西大学校 自然科学部 食品栄養学科

抄録

ごま油は高い温度で焙煎して絞る工程を経て製造されるが、この時ゴマの成分である糖と蛋白質が Maillard 反応を起こして香気成分である pyrazine 化合物と褐色物質を生成される。ゴマの焙煎方法、温度及び時間はごま油の味と香りに影響を及ぼす重要な因子になると共に、ごま油に含有されている褐色物質と香気成分である pyrazine 類は生理活性を示す可能性が提起されている。

本研究では、ごま油から褐色化関連物質を溶媒別に分留して tyrosinase 阻害効果と抗酸化効果を測定し、pyrazine 誘導体らの血小板凝集に及ぼす効果を調べた。褐色度が高い butanol,methanol 抽出物が濃度依存的に高い tyrosinase 阻害効果を見せた。又各種 radical 消去能を測定した結果 butanol 抽出物で高い消去能を示した。香気成分に多量含有されている pyrazine 誘導体が collagen で誘導された血小板凝集の抑制能を測定した結果、メチル基の結合数が多い程(2,3,5-trimethylpyrazine > 2,5-dimethylpyrazine > pyrazine) 濃度依存的に高い凝集抑制効果を示した。以上の結果からごま油加工工程で生成される褐色化関連物質と、香気成分である pyrazine 誘導体は生理活性を示す物質であることが確認され、健康機能性食品に幅広く活用されることが期待される。

Key words : pyrazine, antiplatelet, brown pigmane, maillard reaction, sesame.

I. 序言

ゴマ(*Sesamum indicum* L.)は栄養価が高く焙煎過程で香ばしい特有の香味と褐色物質を生成するために食用油、調味料、香辛料などに韓国では古くから必須の食材として幅広く利用されてきた。Kkae-gang-jeong(ゴマおこし), Kkae-juk(ゴマ粥), Kkae-sokeum(ごま塩)等のように種実其の物を使用したり、種実を焙煎し圧搾して油を絞り食用油として使用した。ごま油は高温で煎って絞る工程を通して製造される。この時のごま油特有の香ばしい香気と濃い褐色は、ゴマの成分中にある糖と蛋白質によるメイラード反応によって作られるが、この褐色化と香気成分は焙煎温度と時間により大きく左右される。ゴマの焙煎方法、焙煎温度及び時間はごま油の味と香りの重要な因子になるばかりでなく、生成された褐色物質

は生体内における生理活性に関わるものと推察される。加工食品中に生成される多数のピラジン類(Fig.1)はそれ自体が天然に存在する場合は稀で、加工処理過程で共存する還元糖とアミノ酸類との反応若しくは蛋白質の熱分解などにより2次的に生成されるもので100余種以上の化合物が食品から分離されている。特にごま油には2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine(Fig.1)が多くacetylpyrazineも多く生成される。最近天然物に含まれるpyrazine類が血小板凝集を抑制して血栓の形成を難しくするとの研究が多数報告されてからpyrazine類の抗血栓作用に対し関心が集中されている。

本研究ではゴマの焙煎過程で生成されるメラニン色素の抗酸化性とtyrosinase阻害作用について検討し、pyrazine類が血小板凝集を抑制して血栓の形成に及ぼす影響を測定して、ごま油製造時に抗酸化力が強いメラニン色素含有油を得るために基礎データにすると同時に、ごま油の優秀性を立証しようとした。またこれと関連して天然食品中で起こる褐変現象を防止出来る天然の酵素阻止剤の開発を試んでみた。

II. 実験方法

試薬と材料

本実験での試薬pyrazineはTokyo Kasei Kogyo Co. Ltd., 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazineはTokyo Chem. Industry Co. Ltd.のものを使用し、血小板誘発因子として使われるarachidonic acid, adenosine-5-diphosphate(ADP), collagen及び α -tocopherolはSigma(U.S.A. MA.,Co. Ltd)のものを使用した。セサミン、セサモリン及びセサミノール配糖体はKatsuzakiら(1994)の方法に従いHPLCを利用して分取しMSで分子量を確認して各種実験に使用した。褐色物質分離はごま油を核酸に溶かしてXAD-7 resinに充填しethyl acetateで溶出して、溶出物を減圧乾燥後silica columnでchloroform, hexane, butanol, ethyl acetate及びmethanolで再分離した(Fig.2)。濃度を一定に合わせた抽出物の褐色度は440nmでの吸光度を測定して示した。収量測定は減圧乾燥後室温で48時間乾燥させてから測定した。

褐色物質の生理活性測定

Tyrosinase阻害効果測定：Kuboら(1986)の方法を若干変形した。濃度を変えた抽出物1.0mLに1/5M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 10 μ M DOPA 0.5mL、180 unit tyrosinase 0.5mLを添加して25°Cで10分間反応させた後に吸光光度計475nmで吸光度を測定して阻害率を求めた。この場合tocopherol, sesamin, sesamolin及びsesaminol配糖体のそれと比較した。

総フェノール含量測定

溶媒別抽出物の総フェノール含量測定は AOAC の Folin-Denis 法を一部変形して比色定量した。乾燥試料一定量を DMSO に溶解し一定濃度に希釈して各種分析に利用した。試料 0.2mL に Na_2CO_3 を 20.mL 加え 2 分間室温に放置後 50% Folin-Denis 試薬を 0.2mL 加えて混合し室温に 30 分間放置後 750nm で吸光度を測定した。濃度を調整した quercertin で標準曲線を作成した。全ての処理は 3 回反復して実施した。

Radical scavenging measurement

Superoxide radical 消去能測定のために SOD 類似活性を測定した。各試料 0.2mL に pH8.5 に補正した tris-HCl buffer 3mL と 0.2mM pyrogallol 0.2mL を加え 25°C に 10 分間放置した後 1N-HCl で反応を停止させ 420nm で吸光度を測定、 $100 - \{(\text{試料添加区の吸光度}) / (\text{試料無添加区の吸光度})\} \times 100$ で示した。Hydroxy radical 消去能測定は 2-deoxyribose oxidation System で測定した。試験管に 0.1 mM FeSO_4 /EDTA 溶液と 10 mM 2-deoxyribose 及び試料の同量溶液を添加した後 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)と 10mM H_2O_2 を加えて 37°C の水浴上で

4 時間反応させてから 2.8% trichloroacetic acid(TCA)溶液を加え反応後反応を停止させた。その後 1.0% thiobarbituric acid(TBA)溶液を加えて 95°C で 10 分間加熱してから急冷して反応を停止させ 532nm で吸光度を測定し次のように計算した。

$$\% \text{ Inhibition} = \{ (\text{試料無添加区の O.D.} - \text{試料添加区の O.D.}) / (\text{試料無添加区の O.D.}) \} \times 100$$

血小板凝集抑制効果の測定

血小板濃縮血漿(Platelet rich plasma、PRP)の調製：血小板活性化作用を測定するためには兎の血液を citrate-dextrose 溶液に採血後 250 x g で 10 分間遠心分離して沈殿物(血小板濃縮血漿)を分離してから Tyrode HEPES buffer pH 6.35 溶液で 2 回洗浄後、最後に Tyrode buffer pH 7.35 溶液に浮遊させて washed platelet を調製した。血小板の数を光学顕微鏡で計測、血小板の数が $5 \times 10^8/\text{mL}$ になるように希釈して実験に使った。

血小板活性化作用測定：血小板形態の変形と凝集作用は光透過度の変化を利用した吸光度測定装置(whole-blood aggregometer, Crrono Log Co.)を使用した。血小板浮遊液 250 μL を取り CaCl_2 1mM を添加する。1,200 rpm で攪拌しながら 37°C で incubation した後 3 分が経過したら collagen を入れて血小板凝集を誘導した。血小板活性化抑制作用は collagen で誘導された aggregation(%)を対照区(A)と各種 pyrazine 類で処理後誘導された試料区(B)の aggregation(%)をもって次のように計算をし (%) inhibition で示した。

$$\text{Inhibition(\%)} = \{(A-B)/A\} \times 100$$

A : control aggregation(%), B : sample aggregation(%)

統計処理

全ての測定結果は mean \pm S.D で表し、有意性の検証は SAS Package を利用して Duncan's multiple range test で $\alpha=0.05$ で有意性検証を実施した。

III. 結果及び考察

抽出物の収量及び褐色度

ゴマを磨碎してメタノールで抽出した後、XAD-7 column を通して疎水性が強い脂溶性物質を除去して silica column を通過させて得た各分画別抽出物の収量と褐色度の測定結果を Table 1 に示した。メタノールで抽出した場合の収量が一番高かった。各溶媒別抽出物の褐色度は脂溶性溶媒では低い吸光度を示したが ethyl acetate と methanol では高かった。

各分画別抽出物の tyrosinase 阻害効果

各分画別抽出物の tyrosinase 阻害効果を測定し IC₅₀ を測定した結果は Table 2 の通りである。褐色度が最も高かった methanol より butanol 分画物に tyrosinase の阻害効果が高い物質が多く含まれているものと推測され、この物質に対する詳細な研究が必要であると考えられた。

ゴマリグナンの tyrosinase 阻害効果

ゴマに含まれている抗酸化物質が tyrosinase の効果に影響を及ぼすものと考えられ、セサミン、セサモリン及びセサミノール配糖体の tyrosinase に対する効果を測定した結果は次の通りである(Fig.3)。セサミンは 0.1mg/mL の濃度では抑制効果が無かったけれども 0.2, 0.3mg/mL では 25%、そして 0.4mg/mL では 50.0%の抑制効果が有ったけれどもそれ以上の濃度では反って tyrosinase の活性を促進させた。又セサモリンは 0.1 mg/mL の濃度では 16.6%、0.2 mg/mL では 33.3%、0.3 mg/mL では 58.3%の抑制効果を示した。一方ゴマ搾油粕に含まれる配糖体成分である sesaminol-triglucosides の場合には 0.1 mg/mL の濃度では 54.2%, 0.2 mg/mL では 66.7% 0.3mg/mL では 70.8%の抑制効果が認められたが、STG の場合には高濃度における促進効果は現れなかった。天然抗酸化剤の IC₅₀ を示す濃度を調べてみると(Table 3),セサミンは同濃度では殆ど無く、セサモリンは 0.267mg/mL, STG は 0.033 mg/mL, α -トコフェロールが 0.127 mg/mL で α -tocopherol が最も効果が高かった。セサモリンは抑制効果が他のリグナンに比べて低濃度で優れている事が分かった。Vamos-vigyazo ら(1981)は 0.5 mM 4-hexylresorcinol と cinnamic acid を逆ミセル系に添加

した結果 tyrosinase の活性を 46%と 93%まで抑制すると報告しているし、Shin ら(2000)が逆ミセル系を利用して石油エーテルで抽出した植物体の脂溶性抽出物の中、葉茎菜類の抽出物を 1%濃度に添加して tyrosinase の阻害効果を分析した結果を見ると、蕪 69%、レタス 41%、アルファアルファ 40%、ブロッコリー 32%の順になっており、根菜類ではニンニクが 100%抑制効果を示すと報告している。尚 甘藷 70%、玉葱 69%、桔梗の根は 56%を示すと報告し、脂溶性抽出物を逆ミセル系で分析するのが水溶性抽出物を添加して分析するより吸光度波長に妨害を与えるので效能の評価をするには良い方法であると提案している。最近 Kim ら(2001)は大戟科(*Euphorbia-ceae*)植物である沢漆(*Euphorbla helioscopia*)から分離した加水分解型タンニンの tyrosinase 活性抑制に及ぼす効果を測定した。沢漆全草から分離した phenol carboxylic acid 及び phenolcarboxylic acid glucosides, gallotannins を kojic acid と比較した結果、phenol carboxylic acid は carboxy group が free である場合には酵素に対して抑制効果を示さず methyl ester の場合には大変強い抑制効果を示すと報告した。又 glucosides の中で 1-O-galloyl- β -D-glucose は現在美白化粧品に添加物として使用されており、この時 構成糖が glucose で有る時が galactose, quinic acid 及び shikimic acid より強い活性を示すので、構造との相関関係を究明して

poly-alcohol の種類により活性に明白な差があらわれると報告している(Kim et al. 2001)。

総フエノール含量測定

各溶媒別抽出物に含有されている総フエノール含量の測定結果は Fig.4 の通りである。

Butanol 0.2575 mg/mL, chloroform 0.2275 mg/mL, Methanol 0.1945mg/mL とフエノール含量が高かったけれども n-hexane と ethyl acetate は比較的低かった。これら溶媒別抽出物について HPLC で分析した結果セサミンとセサモリンなどの抗酸化物質は殆ど検出されなかった。

SOD 類似物質

生体内の抗酸化酵素の一つで有る superoxide dismutase(SOD)は細胞内の活性酸素を過酸化水素に転化させる反応を触媒する酵素で SOD により生成された過酸化水素は catalase 又は peroxidase により水分子と酸素分子に転換される重要な酵素の中の一つである($^2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)。SOD と全く同じではないが類似活性測定方法が使われている。superoxide anion の活性を抑制する物質、即ち SOD 類似活性測定方法が広く利用されており、これらを利用して測定した結果を Fig.5 に示した。ごま油の褐色層を分離するために、溶媒を異にして抽出した各溶媒の分画別抽出物の SOD 類似活性を測定した結果、chloroform $46.11 \pm 5.49\%$ 、n-hexane $36.52 \pm 6.99\%$ 、butanol $56.43 \pm 7.75\%$ 、ethyl acetate $82.63 \pm 1.32\%$ 及び methanol は $87.05 \pm 0.45\%$ となり ethyl acetate と methanol で SOD 類似活性

が高かった。

Hydroxyl radical 消去能

活性酸素の中で反応性が強くて生体酸化に重要な役割を示す hydroxyl radical 消去能を 2-deoxy-ribose oxidation system を利用して各 fraction 溶媒別抽出物で調べた結果は Fig.6 の通りである。Hydroxyl radical 消去能は chloroform 抽出物 39.29%, butanol 抽出物 43.97%, ethyl acetate 抽出物 39.46% 及び methanol 抽出物 45.66% で methanol 抽出物の hydroxyl radical 消去能が若干高かった。Hydroxyl radical 消去能が、他の溶媒に比べて褐色度が比較的高かった methanol 抽出物で高く出たのは、ゴマに含まれている比較的脂溶性が強いセサミンやセサモリン及びセサミノールなど抗酸化剤を除去した純粋な褐色物質の抗酸化能に由来するものと推定される。この実験結果、褐色度と抗酸化性は一致する事が明らかになったし、抗酸化性が最も強かった methanol 抽出物にさまざまな抗酸化関連物質の存在が推定できる。糖とアミノ酸の種類によって褐色度に大きな開きがあるけれども抗酸化効果は褐色度に必ずしも比例はしない。Lingnert と Erriksson(1980, 1981)によれば maillard 反応初期には抗酸化効果が褐色度に比例するけれども、最大値に達した後には反って減少すると報告した事がある。これらの結果を基礎に Lim ら(1997)は、褐色度を一定にして model system で melanoidin 系物質の抗酸化効果を測定した結果、glucose-lysine が反応して生成された melanoidin 系物質の抗酸化効果が最も大きく、glucose-glycine が反応して生成された melanoidin 系物質の抗酸化能は低い事を報告して反応物質により抗酸化効果には大きな差がある事を報告した。

Pyrazine 類の血小板に及ぼす効果

血小板のコラーゲンによる活性化及び凝集作用に及ぼす pyrazine, 2,3-dimethylpyrazine 及び 2,3,5-trimethylpyrazine などの効果を測定した結果を Fig.7 に示す。Pyrazine は 60 μ g/mL の低濃度では 5%, 100 μ g/mL では 15.4%、しかし 300 μ g/mL の高濃度では 70% の抑制効果を示した。又 2,3-dimethylpyrazine の場合には 60 μ g/mL で 5%, 100 μ g/mL で 11.5% であったが 300 μ g/mL では 74% と pyrazine とほぼ同じような傾向を見せた。一方 2,3,5-trimethylpyrazine の場合には 60 μ g/mL で 5%, 100 μ g/mL で 35.7%、300 μ g/mL では 86% と pyrazine 及び 2,3-dimethylpyrazine より血小板凝集能抑制に良い効果を示した。このように pyrazine 類は低濃度では殆ど効果を示さなかったが高濃度では良い効果を示した。最近、Park と Chang(2000)は ムラサキの根(紫根、*Lithospermum erythrorhizon*)抽出物を利用した血小板凝集能を調べた結果、血小板凝集抑制能が β, β -dimethylacetylshikonin \geq α -methyl-n-butylshikonin > iso-butylshikonin > acetylshikonin > shikonin の順に効果があると報告しているので、血小板の凝集抑制にはメチル基が強く作用しているものと推定される。

また、別の研究結果によると芍薬(*Paeonia lactiflora*)中に含有されている benzoyloxy-paeoni-florin が血小板凝集を強く抑制すると報告している(Son & Park, 2002)。これら pyrazine 類の IC₅₀ を計算した結果は Table 4 の通りで pyrazine が 220 μ g/mL, 2,3-dimethylpyrazine は 200 g/mL, 2,3,5-trimethylpyrazine は 140 μ g/mL となり 2,3,5-trimethyl-pyrazine が他の pyrazine 類に比べて低い濃度でも強い凝集抑制能を示す事が明らかになった。

♣ 70740 ♣

1992 : 숙명여자대학교 대학원 식품영양학과 이학석사

1999 : 名古屋大學 식품화학 이학박사

2004 : 호서대학교 식품영양학과 교수