

검은깨의 항산화 활성물질

안찬영 · 현규환 · 박근형

전남대학교 식품공학과

Investigation of Antioxidative Substances in Black Sesame Seed

Chan-Young Ahn, Kyu-Hwan Hyun and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

The antioxidative substances in black sesame and white sesame seed were investigated. The thiocyanate test indicated the presence of antioxidative substances in the extracts of black sesame seed as well as white sesame seed. The activity of white sesame seed was more strong than that of black sesame seed. The active components were discussed after purified using silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, C_{18} column chromatography, successively.

Key words: antioxidative substances, sesame seed, thiocyanate test, gel filtration, HPLC

서 론

최근 우리나라에서는 지방질식품 특히 라면 등의 튀김식품의 소비가 증가하고 있는 추세이다. 이러한 지방질식품이나 식용유지는 가공 및 저장중에 주로 자동산화에 의해 불쾌한 냄새나 맛을 내거나 독성을 나타내기도 하여 지방질식품의 품질의 저하를 일으킨다. 따라서 유지의 산패를 방지하기 위한 수단으로 항산화제가 사용되는데 주로 합성 항산화제인 BHA, BHT 등의 phenol성 물질이 보편적으로 사용되어 왔으나 안전성 문제⁽¹⁾와 소비자들의 거부반응 등에 의해 그 사용량이 감소하고 있는 추세이다. 이러한 이유로 최근 합성항산화제 대신 천연항산화제가 주목을 받고 있는데 그것은 식품의 산패방지를 하기 위한 식품첨가물로서의 이용 뿐만 아니라 생체내에서의 노화억제효과 등⁽²⁾ 여러가지 효과가 인정되고 있기 때문이다. 이같은 배경에 의해 tocopherol을 위시한 천연항산화제의 수요가 급속히 높아지고 있으며, 동시에 천연항산화제의 개발이 강력히 요구되고 있다.

한편, 흑임자라 불리는 검은깨는 참깨과에 속하는 식물로서 흰깨에 비해 유지함유량은 적으나 방향성이 풍부하고 맛이 좋아⁽³⁾ 우리나라에서는 예로부터 한과류와 죽, 조미료 등의 식용^(4,5) 및 약용으로 이용⁽⁶⁾되어온 식품재료임에도 불구하고 검은깨의 항산화성 물질에 대한 보고는 매우 미비한 실정으므로 검은깨를 대상으로 항산화성 물질의 검색을 비교적 연구가 진행되어 있는 흰깨와 병행하여 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

검은깨와 흰깨를 시중에서 구입하여, 저온(4°C)에서 보관하면서 사용하였다. 시료는 볶음처리(roasted)한 것과 처리하지 않은(unroasted) 것으로 나누고, 볶음처리한 것은 가정용 참기름 제조기(깨돌이, 한일 Heo-200)를 이용하여 기름과 박으로 분리하였다.

항산화 활성물질의 추출

볶지 않은 깨로부터 항산화물질의 추출은 Fukuda 등의 방법⁽⁴⁾에 따랐다. 즉 blender에 과량의 acetone을 넣어 마쇄 추출하고, 이를 G_3 glass filter로 여과하여 얻어진 acetone 추출액을 -60°C에서 동결시켜 비동결획분(Unfrozen fraction)과 동결획분(Frozen fraction)으로 분리시켰다. 볶은 깨는 기름과 박으로 나누어 위와같은 방법으로 처리하였다.

항산화 활성물질의 분리 및 정제

Silica gel 흡착 chromatography는 다음과 같이 행하였다. 시료 10배량의 silica gel(일본 Wako사, C-200, 100~200 mesh)을 *n*-hexane-EtOAc(9 : 1, v/v)용매계로 slurry를 만들어 column에 충전하고 시료를 동용매계에 녹여 흡착시킨 후 *n*-hexane-EtOAc 용매계를 사용하여 *n*-Hexane 내에 EtOAc 농도를 10%에서 100%까지 10%씩 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법⁽⁸⁾으로 분획하였다.

Sephadex LH-20 chromatography는 Sephadex LH-20(25~100 μ , Pharmacia사)을 MeOH- $CHCl_3$ (4 : 1, v/v)용매계로 하룻밤 팽윤시킨 후 column에 충전하고 동용

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Chonnam National University, Department of Food Science and Technology, 300 Yongbong-Dong, Kwang-ju 500-757, Korea

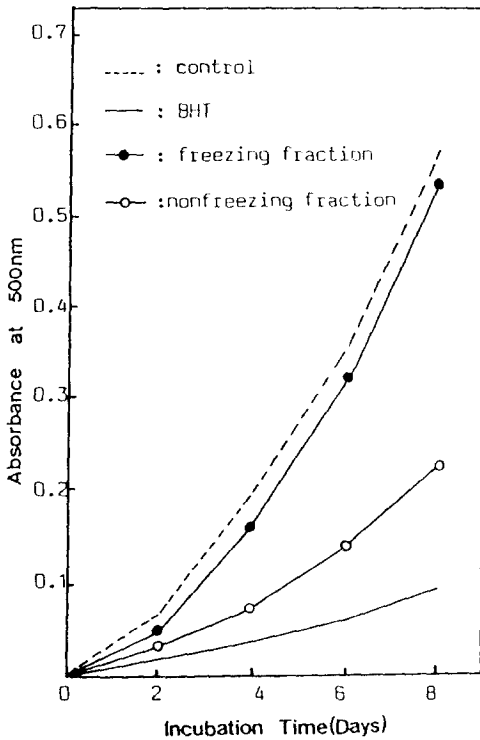


Fig. 1. Antioxidative activity of the freezing fraction and nonfreezing fraction of the acetone extract from white sesame seed

매개로 용출 분획하였다.

HPLC 분석은 시료를 여과(Millipore FH type, 0.5 μ m Waters사)시킨 다음 μ Bondapak C₁₈(Waters사) column을 사용하여 H₂O-MeOH(85 : 15, v/v) 용매계⁽⁷⁾로 1분당 2 ml씩 용출시키면서 50분간 1분 간격으로 분획하였다.

항산화 활성의 검정

Thiocyanate method는 Mitsuda 등의 방법⁽⁹⁾에 따라 CHCl₃ 200 μ l에 추출물중 생체중량 40g에 상당하는 시료를 녹이고 0.13 ml의 linoleic acid를 함유한 99% ethanol 10 ml를 가하고 여기에 0.2 M phosphate buffer(0.2 M Na₂HPO₄+KH₂PO₄, pH 7.0) 10 ml를 넣고 증류수로 채워 25 ml로 하였다. 상기액을 cap test tube에 넣고 40 $^{\circ}$ C에서 incubation하면서 경시적으로 항산화활성을 측정하였으며, 측정방법은 시료액 0.1 ml에 75% ethanol 4.7 ml를 넣고 30% thiocyanate액 0.1 ml에 0.02 M 염화제1철의 3.5% 염산용액 0.1 ml를 가하여 3분 뒤에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성의 비교를 위해 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT) 200 μ g을 사용하여 BHT 첨가구로 하였다.

Weighing method는 Olcott 등의 방법⁽¹⁰⁾에 따라 칭

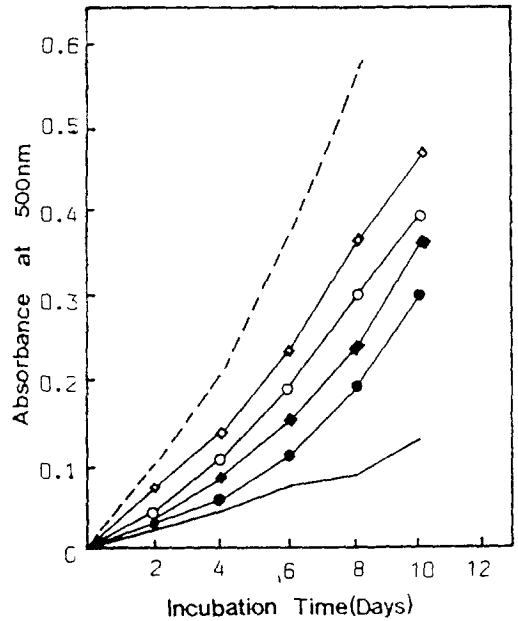


Fig. 2. Antioxidative activity of the nonfreezing fraction of acetone extract from roasted and unroasted sesame seeds by the thiocyanate method

---; control, —; BHT, ○—○; unroasted white sesame, ●—●; roasted white sesame, □—□; unroasted black sesame, ■—■; roasted black sesame

량비에 추출물중 생체중량 40g에 상당하는 시료를 CHCl₃ 용액에 녹여 넣고 N₂ gas로 CHCl₃을 제거하였다. 여기에 linoleic acid 1g을 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 incubation하면서 무계변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Acetone 추출물의 항산화활성

흰깨의 acetone 추출액을 동결 처리하여 분리된 동결 회분과 비동결회분에 대해 항산화활성을 thiocyanate 방법으로 검정한 결과 Fig. 1과 같이 동결회분은 대조구와 거의 차이가 없을 정도로 활성이 나타나지 않았으나, 비동결회분의 경우는 BHT보다는 낮았으나, 대조구에 비하여 상당한 유도기간의 연장효과를 나타냈다. 이러한 결과로 보아 acetone 추출물에 포함되어 있는 항산화 활성물질의 정제에 동결과정은 크게 도움이 되는 것으로 인정되어 시료의 비동결회분을 검색대상으로 하였다.

볶음 처리한 깨와 볶음 처리하지 않은 깨의 활성비교

각각의 깨를 볶음처리한 것과 볶음처리하지 않은 것으로 나누어 acetone으로 추출, 동결과정을 거친 비동결회분에 대하여 각 깨의 항산화활성을 비교한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 이들 결과를 보면 흰깨와 검은깨에 항산화 활성물질의 존재가 확인되었으며, 또 흰깨, 검은

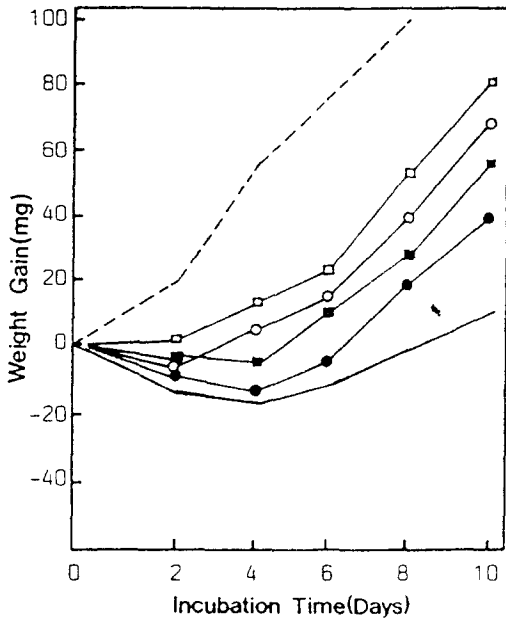


Fig. 3. Antioxidative activity of the nonfreezing fraction of acetone extract from roasted and unroasted sesame seeds by the weighing method

----; control, —; BHT, ○—○; unroasted white sesame, ●—●; roasted white sesame, □—□; unroasted black sesame, ■—■; roasted black sesame

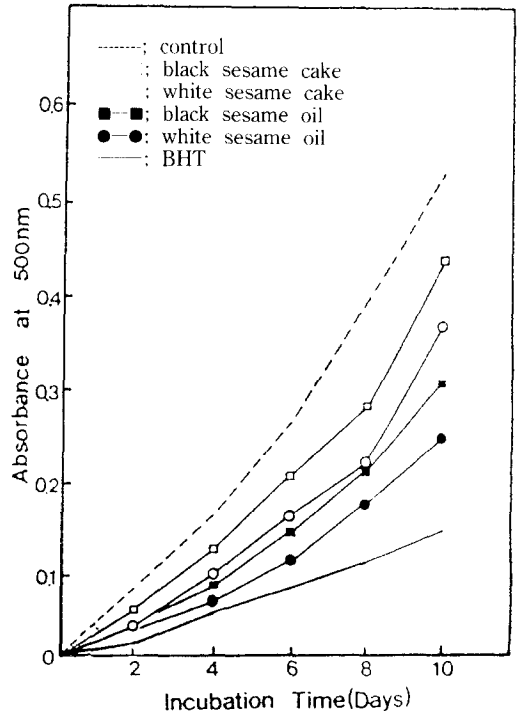


Fig. 4. Antioxidative activity of the nonfreezing fraction of acetone extract from oil and cake of the roasted sesame seeds by the thiocyanate method

깨 모두 볶은 쪽의 종자에서 더 강한 항산화활성이 인정되었고, 흰깨가 검은깨보다 약간 더 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 경향은 thiocyanate method나 weighing method에서 동일하였다.

한편, Fukuda 등^(7,8)은 볶음처리한 흰깨가 볶음처리하지 않은 흰깨보다 항산화활성이 강한 볶음처리 과정에서 sesamol이 항산화활성이 강한 sesamol로 변하기 때문이라고 설명⁽¹¹⁾하고 있다.

볶음처리한 기름과 박에 포함된 항산화활성의 비교

볶음처리한 각각의 깨를 기름과 박으로 분리하여 thiocyanate 방법으로 항산화활성을 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. 볶음처리한 각각의 깨의 기름에서 BHT보다는 낮으나 대조구에 비해 상당히 높은 활성을 보였으며 흰깨가 검은깨보다 약간 높은 활성을 나타냈다. 박의 경우도 기름의 경우보다는 떨어지나 활성을 인정할 수 있었으며, 활성의 크기는 흰깨, 검은깨의 순이었다.

볶음 처리한 깨의 기름에 포함된 항산화 활성물질의 검색

볶음처리한 깨의 기름에서 얻어진 acetone 추출물의 비동결획분을 silica gel 흡착 chromatography로 분획하고 각 획분의 항산화활성을 thiocyanate method로 검정하였는데, 500 nm에서의 흡광도가 0.3까지 증가하는데

Table 1. Antioxidative activity of the silica gel chromatography fractions from seeds oil

Fraction number	<i>n</i> -Hexane : EtOAc	Days ¹⁾	
		White sesame	Black sesame
1	9 : 1	13	11
2	8 : 2	14	13
3	7 : 3	14	12
4	6 : 4	15	13
5	5 : 5	17	15
6	4 : 6	15	14
7	3 : 7	14	13
8	2 : 8	14	13
9	1 : 9	15	14
10	0 : 10	16	14
Control		10	
BHT		18	
Sesamol		16	

¹⁾days to reach O.D. 0.3 at 500 nm by thiocyanate method

걸리는 날짜수로 나타낸 측정결과는 Table 1과 같다. 흰깨와 검은깨 모두 EtOAc 농도 50% 용출획분(활성 I로 명명)과 100% 용출획분(활성 II로 명명)에서 비교적 강한 활성을 나타냈다. 이러한 경향은 Fukuda⁽⁸⁾ 등이

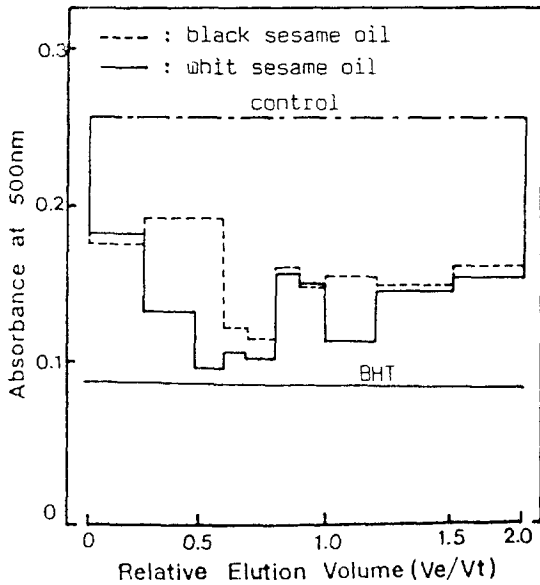


Fig. 5. Antioxidative activity of the silica gel active fraction I from white sesame oil and black sesame oil after Sephadex LH-20 chromatography

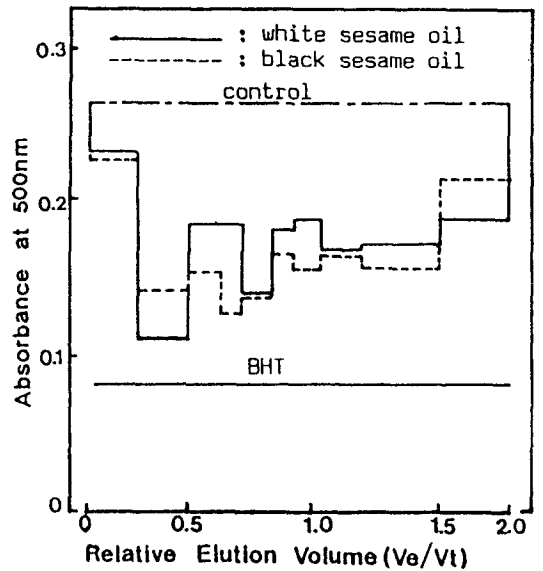


Fig. 6. Antioxidative activity of the silica gel active fraction II from white sesame oil and black sesame oil after Sephadex LH-20 chromatography

흰깨를 대상으로 검토한 결과와 일치하고 있었으며, 또 silica gel 흡착 chromatography 상에 의해 분획된 검은깨의 획분도 흰깨에 버금가는 활성을 나타냈다.

Silica gel 흡착 chromatography에서 얻어진 각 기름의 활성 I과 활성 II를 Sephadex LH-20 chromatography에 의해 분획하고 얻어진 획분에 대하여 15일간 배양 후 thiocyanate method로 항산화활성을 검정한 결과는 Fig. 5(활성 I)과 Fig. 6(활성 II)에 나타났다.

활성 I을 gel filtration에 의해 분획하고 얻어진 획분에 대해 항산화활성을 검정한 결과, 흰깨의 경우 ve/vt 0.5~0.8과 1.0~1.2 용출영역에서, 검은깨는 ve/vt 0.6~0.8 용출영역에서 활성이 인정되었다. 활성 II의 경우 흰깨에서는 ve/vt 0.3~0.5와 0.7~0.8 용출영역에서, 검은깨는 ve/vt 0.3~0.5와 0.6~0.8의 용출영역에서 각각 활성이 인정되었다.

Sephadex LH-20 chromatography에 의해 얻어진 활

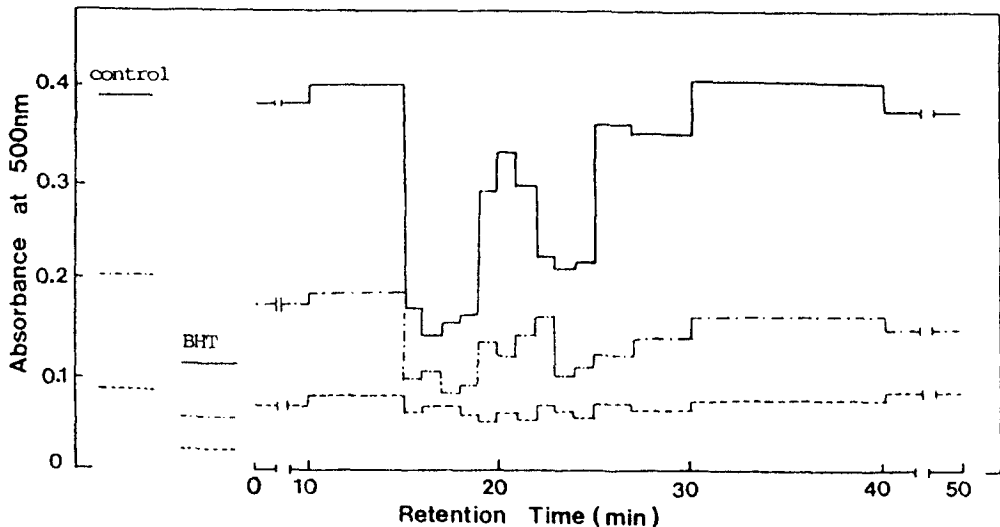


Fig. 7. Antioxidative activity of the active fraction I from white sesame seed oil after HPLC
 -----; 6 days,; 10 days, —·—·—; 15 days

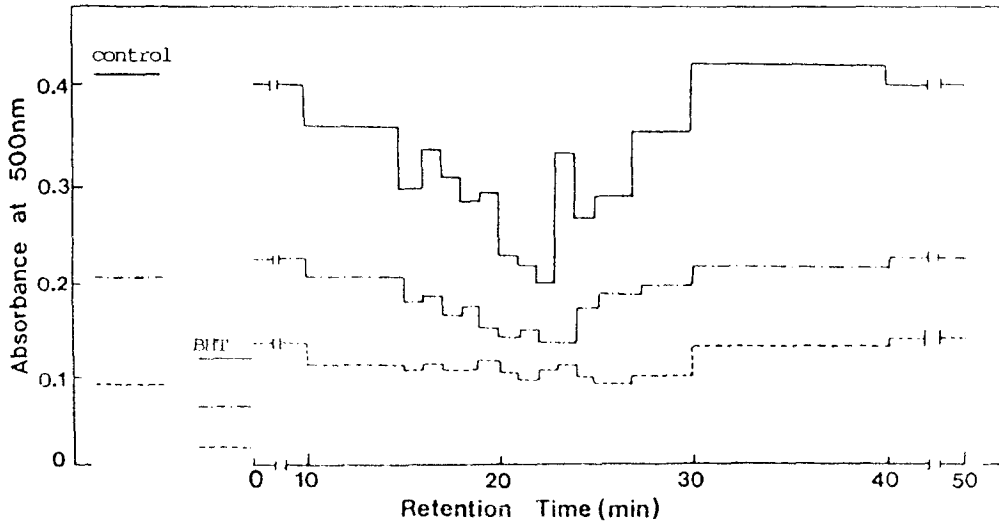


Fig. 8. Antioxidative activity of the active fraction II from white sesame seed oil after HPLC
 -----; 6 days, - - - -; 10 days, — ; 15 days

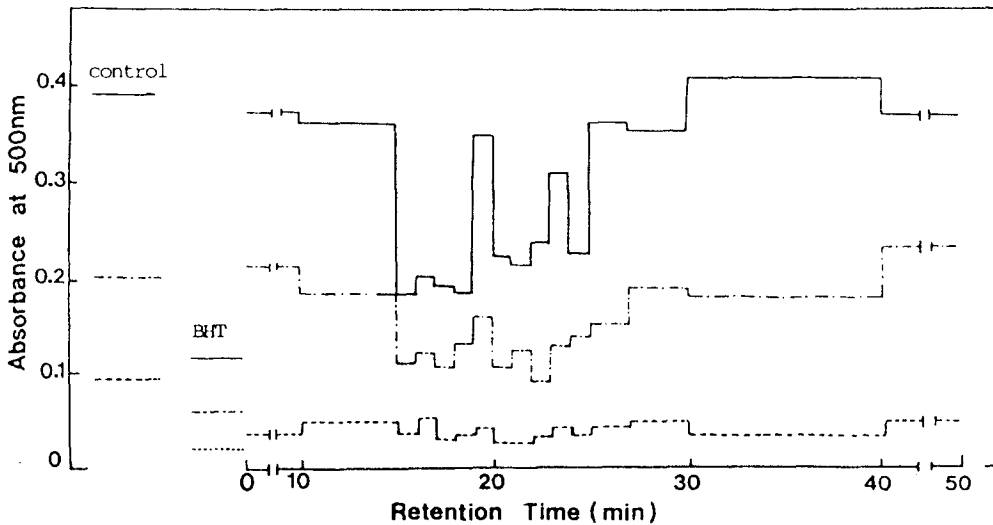


Fig. 9. Antioxidative activity of the active fraction I from black sesame seed oil after HPLC
 -----; 6 days, - - - -; 10 days, — ; 15 days

성획분들을 합하여 HPLC를 행하여 1분 간격으로 분획하고 얻어진 획분에 대해 thiocyanate method에 의해 6, 10, 15일 incubation하여 항산화활성을 검정한 결과는 흰깨의 경우 Fig. 7(활성 I), Fig. 8(활성 II) 그리고 검은깨의 경우는 Fig. 9(활성 I), Fig. 10(활성 II)과 같다. 활성 I은 흰깨는 retention time(Rt) 15~19분에서 주활성이 그리고 Rt 22~25분에서 약한 활성이 인정되었으며, 검은깨는 Rt 15~19분에서 주활성이 그리고 Rt 20~23분에서 약한 활성이 인정되었으며, 흰깨와 검은깨의 활성의 크기는 거의 유사하였다.

활성 II의 경우, 흰깨는 Rt 20~23분에서 주활성이, 검은깨의 경우 Rt 15~17분에서 약한 활성이 그리고 Rt 20~24분에서 주활성이 인정되었다. 흰깨, 검은깨 모두 Rt 20~24분에서 강한 활성이 인정되었으며 활성의 크기는 흰깨가 검은깨보다 더 높았다.

이상의 결과, silica gel 흡착 chromatography에서 얻어진 활성 I, II를 Sephadex LH-20 chromatography로 일부 정제한 다음 reverse phase의 HPLC로 분획하여 항산화활성을 조사한 결과 활성 I은 Rt 15~19분 그리고 활성 II는 Rt 20~25분에서 주활성이 인정되었다.

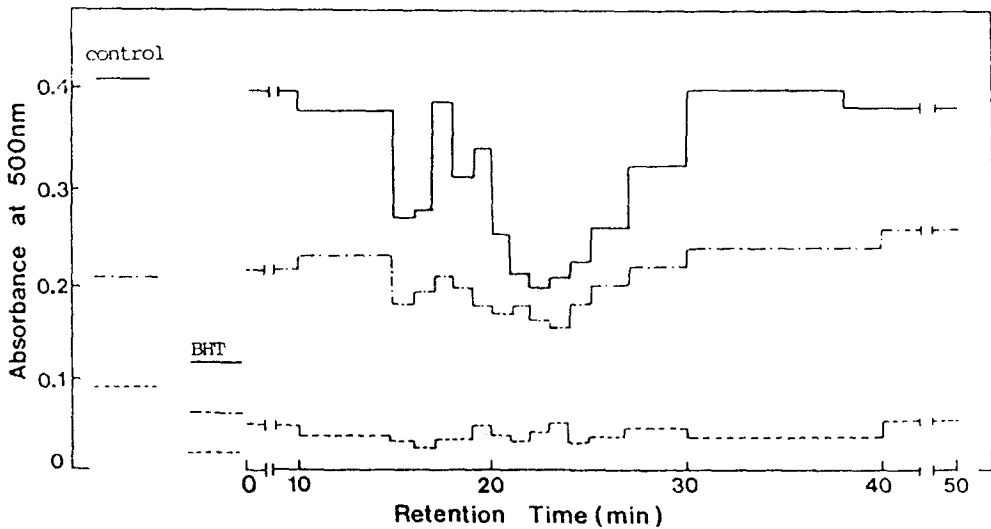


Fig. 10. Antioxidative activity of the active fraction II from black sesame seed oil after HPLC

-----; 6 days, - - - - -; 10 days, —; 15 days

한편, 참깨기름에 존재하는 강력한 항산화제의 하나로 sesamol이 알려져 있는데, 본 실험조건에서 sesamol의 Rt이 17분이어서 활성 I의 활성분체는 sesamol로 추정되며, 활성 II는 gel filtration의 용출위치로 보아 sesamol보다 분자량이 큰 물질에 의해 활성이 발현되고 있는 것으로 생각된다. Fukuda 등⁽⁸⁾은 참깨에서 항산화 활성물질로 tocopherol과 lignan 물질의 관련을 시사한 바 있는데, 활성 II의 항산화 활성분체에 대해서는 더욱 검토가 필요하리라 생각된다.

볶음 처리한 깨의 cake에 포함된 항산화활성

박에서 얻어진 acetone 추출물을 silica gel 흡착 chromatography로 용출 분획하고 각 획분의 항산화활성을 thiocyanate method로 조사한 결과 기름의 경우와 유사한 경향을 나타내 흰깨, 검은깨 모두 EtOAc 농도 50% 용출획분과 EtOAc 100% 용출획분에서 활성의 크기는 기름에 비해 떨어지나 상당한 항산화활성이 인정되었다. 이 결과는 기름의 경우와 일치하여, 볶은 깨에서 얻어진 박에 포함된 활성분체와 볶은 깨에서 얻어진 기름의 활성분체가 유사한 물질임이 시사되었다.

요 약

검은깨에 포함된 항산화활성물질의 검색을 흰깨와 병행하여 수행한 결과, 흰깨와 같이 검은깨에도 항산화 활성물질의 존재가 인정되었으며, 활성의 크기는 흰깨가 검은깨보다 약간 높았으며 볶음처리를 하면 항산화활성이 증가하였다. 이들 참깨에 함유된 활성획분의 chromatography상의 거동에 있어서 상당부분 유사성이 인정되었다. 또 볶은 깨의 기름과 박을 분리하여 활성을 검정한

결과 양자에 포함된 활성분체가 서로 유사하였으며 활성의 강도는 기름의 경우가 훨씬 강하였고, 박의 경우 항산화 활성이 기름에 비해 약하다고는 하나, 상당한 항산화 활성물질의 잔류가 인정되었다.

문 헌

1. Osawa, T. and Namiki, M.: 天然抗酸化劑とその生理活性. *Food Chemical*, **9**, 42(1985)
2. 日本 營養食養學會: 過酸化脂質と營養. 學會出版 center, p.73(1986)
3. 武政三男: Spice 百科事典. 三秀書房, p.345(1981)
4. 문범수, 이갑상: 식품재료학. 수학사, p.163(1991)
5. 윤서석: 한국음식. 수학사, p.94(1991)
6. 이춘영, 김우정: 천연 향신료와 식용색소. 향문사, p.75(1987)
7. Fukuda, Y., Osawa, T. and Namiki, M.: Antioxidants in sesame seed. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **28**, 461(1981)
8. Fukuda, Y., Osawa, T., Namiki, M. and Ozaki, T.: Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 301(1985)
9. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K.: Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, **19**, 210(1966)
10. Olcott, H.S. and Einset, E.: A weighing method for measuring the induction period of marine and other oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **35**, 161(1958)
11. Fukuda, Y., Nagata, M., Osawa, T. and Namiki, M.: Chemical aspects of the antioxidative activity of the roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 857(1986)

(1991년 8월 20일 접수)