

추출용매에 따른 오레가노 종자 분획물의 항산화 및 유지산화안정성 평가

이현종¹ · 김민아¹ · 홍성실² · 김미자^{1,*}

¹강원대학교 보건과학대학 식품영양학과, ²강원대학교 보건과학대학 간호학과

Evaluation of antioxidant properties and oxidative stability of oregano seed solvent fraction

Hyun-Jong Lee¹, Min-Ah Kim¹, Sungsil Hong², and Mi-Ja Kim^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition, College of Health Science, Kangwon National University

²Department of Nursing, College of Health Science, Kangwon National University

Abstract The *in vitro* antioxidant activity of oregano seed fractions, fractionizing with 80% ethanol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water, was evaluated, and their effects on edible oils were determined in corn oil at 180°C. The ethyl acetate fraction had the highest radical-scavenging activity. The ferric reducing antioxidant power activity and total phenol content of the ethyl acetate fraction were determined as 6,130 μmol ascorbic acid equivalents/g extract and 770 μmol tannic acid equivalents/g extract, respectively, which were significantly higher than those of the other fractions ($p < 0.05$). Primary and secondary oxidation products in corn oil added with the ethyl acetate fraction of oregano seed significantly decreased by 1.5 and 1.26 times, respectively, compared with those in the control groups. The major volatile ingredients in the ethyl acetate fraction of oregano seeds were determined to be carvacrol, thymoquinone, and 3-cyclopentylcyl-cyclopentan-1-one. Ethyl acetate is a suitable solvent for extracting antioxidant compounds from oregano seeds and can be used as a natural antioxidant.

Keywords: oregano seed, oxidative stability, antioxidant, ethyl acetate fraction, natural antioxidant

서 론

허브는 특유의 향과 풍미가 존재하여 음식의 맛을 향상시켜주는 조미료로써 사용되며, 다양한 연구를 통해 항균과 항산화 작용, 항염증 등의 기능이 밝혀지면서 건강의 유익한 효과를 가지는 기능성 식품의 소재로써 알려져 있다(Choi와 Rhim, 2008; Dorman과 Deans, 2000). 이러한 허브를 이용하는 방법에는 단순한 첨가와 추출물로서 사용하는 방법이 있으며(Kang 등, 2017), 일부 지역에서는 향신료와 전통 의약품으로 사용되었다. 주로 향신료로 사용되는 식물은 카레의 주성분인 로즈마리, 오레가노, 계피, 정향, 커민, 후추 등이 있으며(Shan 등, 2005), 그 중 오레가노(*origanum vulgare*)는 지중해 연안에 분포하고 있는 식물로 독특한 향과 맛을 가지고 있어 다양한 요리에 향신료로 활용된다. 특히 오레가노 정유 성분은 동물성, 식물성 병원체에 의한 식중독 박테리아 증식을 억제하는 효과를 나타내었으며(Dorman과 Deans, 2000), 높은 항산화 활성과 함께 병원성 진균에 대해 억제 활성을 보였는데, 이는 오레가노의 카바크롤(carvacrol), 리날로올(linalool), 티몰(thymol) 등의 산소화 모노테르펜 탄화수소

(oxygenated monoterpenes hydrocarbons) 성분에 기인하는 것으로 보고되었다(Deleanu 등, 2018). 이와 더불어 오레가노 열수 추출물은 *Escherichia coli* K99와 *Salmonella typhimurium*에 대한 높은 항균 효과 및 항산화 활성을 나타내었으며(Kang 등, 2017), 오레가노 에탄올 추출물의 경우 합성 항산화제인 BHA, BHT 만큼 효과적인 지질 산화 안정성을 나타내는 것으로 보고되었다(Almeida-Dori와 Regitano-Darce, 2000). 또한, 스트레스를 통한 위염 유발 쥐에서 항염증 활성이 보고되었다(Yoshino 등, 2006). 이처럼 다양한 연구를 통해 오레가노 추출물 또는 정유에 대한 항염, 항균, 및 항산화에 관한 많은 연구가 이루어졌으나, 오레가노를 처리하는 조건은 연구마다 상이 하였다. 따라서 본 연구는 오레가노 종자를 효과적인 천연항산화제로 사용하기 위한 용매 조건을 탐색하고자 오레가노 종자를 80% 에탄올(ethanol), 헥세인(*n*-hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(*n*-butanol), 증류수로 분획하여, 시험관 내에서 항산화 활성과 유지 산화 안정성 평가 및 유효 분획물의 향기 분석을 통해 오레가노 종자의 항산화 활성이 가장 크게 나타나는 추출 조건을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

오레가노 종자 분획물 제조에 사용한 용매인 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트 및 부탄올은 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea) 제품을 사용하였으며, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 과황산칼륨 (potassium persulfate), 아세트산

*Corresponding author: Mi-Ja Kim Professor, Department of Food and Nutrition, College of Health Science, Kangwon National University, Samcheok, Gangwon 25949, Korea
Tel: +82-33-540-3313
Fax: +82-33-540-3319
E-mail: mijakim@kangwon.ac.kr
Received September 22, 2020; revised December 13, 2020; accepted December 16, 2020

나트륨(sodium acetate), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), 염화제이철(ferric chloride), 폴린-데니스 시약(Folin-Denis' reagent), 탄산나트륨(sodium carbonate), 탄닌산(tannic acid) 및 아스코르브산(ascorbic acid)은 Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 아이소옥테인(isooctane, Daejung)과 파라-아니시딘(*p*-anisidine, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)을 각각 구입하여 사용하였다.

오레가노 종자 분획물 제조

오레가노 종자의 분획물 제조는 Lee와 Lim (2015)의 연구를 참고하였다. 오레가노 종자 100 g당 15배의 80% 에탄올을 첨가한 후 진탕기(RS-1, JEIO TECH, Daejeon, Korea)에서 6시간 진탕하였다. 진탕한 용액은 거름종이를 통해 고형물을 여과하고, 감압 농축 후 동결건조 하였다. 이후 동결건조 된 80% 에탄올 추출물에 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수의 순서로 분획하여 오레가노 종자 분획물을 제조하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Ham 등(2015)의 방법을 변형하여 측정하였다. 메탄올 용액을 사용하여 0.1 mM DPPH 용액이 되도록 제조하였다. 제조된 DPPH 용액 0.75 mL에 시료 용액 0.25 mL를 넣고 10초간 진탕한 다음 암실에서 30분간 반응시킨 후, UV/VIS spectrophotometer (Mega-U600, Scinco, Seoul, Korea)를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하여 시료와 동일한 과정을 실시한 후, 다음의 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100$$

A_C : 대조군의 흡광도

A_S : 실험군의 흡광도

ABTS 양이온 라디칼 소거 활성

ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 실험은 Fellegrini 등(1999)의 방법에 따라 수행하였다. 증류수에 녹인 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1 (v/v)의 비율로 혼합한 후, 상온의 암실에서 12시간을 방치하여 ABTS 양이온 라디칼을 형성하였다. 형성된 ABTS 양이온 라디칼 측정을 위해 UV/VIS spectrometer (Mega-U600, Scinco)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고, 0.70±0.05이 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS 양이온 라디칼 용액을 시료와 혼합하여 6분간 상온 암실에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 사용하여 시료와 동일한 과정을 실시한 후, 다음의 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS cation radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100$$

A_C : 대조군의 흡광도

A_S : 실험군의 흡광도

FRAP assay

FRAP assay는 Benzie와 Strain (1996)의 방법에 따라 수행하였다. 증류수에 sodium acetate를 녹여 300 mM 농도의 용액을 제조한 후 acetic acid를 이용하여 pH 3.6으로 맞추었다. 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine는 40 mM HCl을 이용하여 제조하였고, FeCl₃은

20 mM의 농도로 제조하였다. 제조된 용액을 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하고 37°C에서 15분간 정치한 후 FRAP 시약으로 사용하였다. 제조된 FRAP 시약 0.9 mL과 시료 0.03 mL를 혼합한 후 암실에서 30분간 반응하였다. 그 후 UV/VIS spectrometer (Mega-U600, Scinco)를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 ascorbic acid equivalent로 나타내었다.

총 페놀 함량 측정(Total phenolic contents)

총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(Folin과 Denis, 1912)을 응용하여 측정하였다. 증류수와 1:1 (v/v)로 희석한 Folin-Denis시약을 시료와 혼합하였다. 그 후 증류수와 sodium carbonate를 넣고 30분간 대기하고 UV/VIS spectrometer (Mega-U600, Scinco)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 tannic acid equivalents/g로 나타내었다.

Headspace oxygen contents

오레가노 종자 분획물의 유지 산화 안정성에 대한 효능 평가를 위해 Kim과 Kim (2020)의 방법을 참고하여 유지 산화 후 남아 있는 잔존 산소량을 다음과 같이 측정하였다. 각각의 오레가노 종자 분획물이 0.02% (w/v) 농도로 포함된 유지 시료 1 g을 gas-tight vial에 넣고, 100°C 오븐에서 40, 60, 80분 동안 유지 산화를 유도하였다. 그 후 air-tight syringe로 20 µL의 headspace gas를 60/80 packed column (3.0 m×2 mm ID, Restek Ltd., Bellefonte, PA, USA)과 thermal conductivity detector (TCD)가 장착된 Hewlett-Packard 7890 gas chromatograph (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)에 주입하였다. GC의 오븐, 주입구, 검출기의 온도는 각각 60, 180, 180°C로 설정하였으며, 이동상인 헬륨 가스는 20 mL/min으로 주입하였다.

Conjugated dienoic acid (CDA) value

각각의 오레가노 종자 분획물을 유지와 0.1% (w/w) 농도로 혼합한 후 오븐에서 180°C로 산화하였다. 산화된 시료 0.1 g에 isooctane을 넣어주어 0.4% (w/v)의 농도로 분산시킨 다음 적절한 농도로 희석한 후 UV/VIS spectrophotometer (Mega-U600, Scinco)를 이용하여 233 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Conjugated dienoic acid value (\%)} = 0.84 \times \left(\frac{A_{233}}{b \times c} \times a - k_0 \right)$$

A_{233} : 233 nm에서 Abs

k_0 : acid의 Abs, 계수(0.03)

a: 희석배수

b: cell의 길이(cm)

c: L당 시료의 g수

p-Anisidine value (*p*-AV)

각각의 오레가노 종자 분획물을 유지와 0.1% (w/w) 농도로 혼합한 후 오븐에서 180°C로 산화하였다. 산화된 유지 시료를 0.4% (w/v)의 농도로 isooctane을 사용하여 희석하였다. 희석한 시료 1 mL과 0.25% *p*-anisidine 용액을 0.2 mL 혼합하여 15분 동안 암실에서 반응하였다. 그 후 UV/VIS spectrophotometer (Mega-U600, Scinco)를 사용하여 350 nm에서 흡광도를 측정하였다.

휘발성 물질 분리

휘발성 물질의 추출 방법은 Cho 등(2003)의 연구를 참고하여 고체상 미량추출(solid phase microextraction, SPME)법을 사용하

였다. 휘발성 물질의 평형 상태를 유지하기 위하여 1시간 동안 상온 암소에서 방치한 후, 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector, FID)가 장착된 GC (Hewlett-Packard 6890, Agilent Technologies Inc.)를 사용하여 휘발성 물질을 분리하였다. 사용된 fiber는 65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이며, 고정 상으로는 HP-5 GC column (30 $\text{m} \times 0.32 \text{ mm ID}$, 0.25 μm film, Agilent Technologies Inc.)을 사용하였다. 기기의 온도 조건은 초기 40°C, 2분 방치 후 160°C로 상승시켰다. 주입기와 검출기의 온도는 각각 250°C, 300°C로 고정하였다.

휘발성 물질 분석

GC-MS (5973, Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 동정하였으며, GC-FID와 동일한 조건으로 사용하였다. MS분석 조건은 70eV, 220 ion source 온도를 사용하였으며, 질량 스펙트럼 라이브러리(mass spectra library)과 표준물질의 머무름 시간(retention time)을 활용하여 휘발성 물질을 분석하였다.

통계처리

실험은 모두 3회 반복하였으며, 실험을 통해 얻어진 결과는 SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)를 통해 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, Duncan의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 통해 유의 확률 5% 미만 수준에서 사후 검증하였다.

결과 및 고찰

오레가노 종자 분획물의 DPPH 라디칼 및 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성

오레가노 종자 분획물에 따른 DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성은 Fig. 1과 같다. 오레가노 종자 80% 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수 분획물 모두에서 DPPH 라디칼 소거 활성이 나타났으며, 에틸 아세테이트, 80% 에탄올, 부탄올, 헥세인, 증류수 순서로 각각 92.3, 84.6, 49.5, 27.0, 5.4%의 유의적인 DPPH 라디칼 소거 활성 차이를 보였다($p < 0.05$). 특히 증류수 분획물에서 라디칼 소거 활성이 5.4%로 분획물 중 가장 낮게 나타났으며, 에틸 아세테이트 오레가노 종자 분획물의 라디칼 소거 활성이 92.3%으로 분획물 중 유의적으로 가장 높게 나타났다($p < 0.05$). ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 측정 결과 오레가노 종자 80% 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수 분획물 모두에서 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 나타났으며, 에틸 아세테이트, 헥세인, 80% 에탄올, 부탄올, 증류수 순서로 각각 53.9, 48.9, 32.2, 18.9, 1.6%의 유의적인 라디칼 소거 활성 차

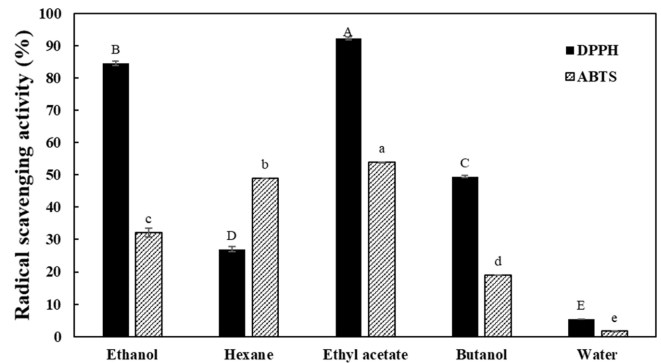


Fig. 1. DPPH and ABTS cation radical scavenging activity of oregano seed solvent fractions. Significant differences were indicated using different letters ($p < 0.05$). ethanol: 80% ethanol, Hexane: n-hexane, butanol: n-butanol

이를 보였다($p < 0.05$). DPPH의 결과와 마찬가지로 오레가노 종자 증류수 분획물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 1.6%로 분획물 중 가장 낮게 나타났으며, 에틸 아세테이트 오레가노 종자 분획물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 53.9%로 가장 크게 나타났다($p < 0.05$). Jadid 등(2017)은 다양한 용매를 사용한 후추 (*Piper retrofractum* Vahl.) 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 분석하였으며, 용매로 메탄올을 사용한 추출물의 경우 DPPH 라디칼에 대한 IC_{50} 값이 101.74 $\mu\text{g/L}$ 인 반면, 에틸 아세테이트 추출물의 경우 66.12 $\mu\text{g/L}$ 로 메탄올 추출물에 비해 에틸 아세테이트 추출물이 더욱 우수한 라디칼 소거 활성을 나타낸 것을 관찰하였다. 또한, Bouaziz 등(2015)은 은매화(*Myrtus communis* L.)를 메탄올, 헥세인, 클로로포름, 에틸 아세테이트로 분획하여 생성된 추출물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 분석하였는데, 은매화 에틸 아세테이트 추출물과 메탄올 추출물이 다른 용매 추출물에 비해 강력한 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 이와 더불어 Yu 등(2011)은 향신료의 일종인 로즈마리를 메탄올, 헥세인, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수 용매로 분획하여 DPPH와 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 측정을 통해 로즈마리 에틸 아세테이트 분획물에서 DPPH, ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 가장 높게 나타난 것을 보고하였다. 본 연구결과 또한 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 DPPH, ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 다른 분획물들보다 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 이는 오레가노 종자에 포함된 항산화 물질이 에틸 아세테이트에 다량 용출된 것으로 생각된다. 오레가노 분획물의 라디칼 소거능이 DPPH와 ABTS 방법에 따라 다르게 나타났는데 이는 두 분석법간 라디칼 소거 기

Table 1. Ferric reducing antioxidant power activity (FRAP) and total phenolic contents (TPC) of solvent fractions from oregano seeds

Oregano seed fractions	FRAP ¹⁾ (μmol ascorbic acid equivalent/g extract)	TPC ²⁾ (μmol tannic acid equivalent/g extract)
80% Ethanol	1,416.43 \pm 54.63 ^b	353.03 \pm 14.87 ^b
n-Hexane	1,224.86 \pm 75.26 ^c	161.95 \pm 9.34 ^d
Ethyl acetate	6,130.75 \pm 59.21 ^a	770.48 \pm 7.34 ^a
n-Butanol	930.91 \pm 21.39 ^d	220.89 \pm 5.82 ^c
Water	99.91 \pm 9.00 ^e	10.06 \pm 2.38 ^e

¹⁾FRAP, ferric reducing antioxidant power

²⁾TPC, total phenolic contents

Significant differences among groups were indicated by different letters ($p < 0.05$).

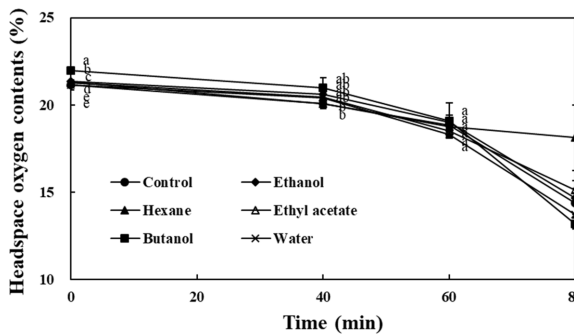


Fig. 2. Headspace oxygen content of oxidized corn oil at 180°C for 80 min with the addition of oregano seed solvent fraction. Significant differences were indicated using different letters ($p < 0.05$). ethanol: 80% ethanol, Hexane: n-hexane, butanol: n-butanol

전이 다름에 기인하며, 전자 또는 수소 라디칼을 받아 항산화 활성을 나타내는 반응 속도 차이에 기인한 것으로 사료된다(Katalinic 등, 2006; Sridhar와 Charles, 2019). 또한 두 분석법에 사용되는 용매 극성도에 따라 분획물의 용해도 차이가 발생되어 상이한 항산화력이 측정될 수 있다(Sharma와 Bhat, 2009).

오레가노 종자 분획물의 FRAP 환원력 및 총 페놀 함량 비교

FRAP 환원력 측정 결과 및 총 페놀 함량 비교는 Table 1에 나타내었다. 오레가노 종자 80% 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수 분획물의 FRAP 환원력을 비교한 결과 에틸 아세테이트, 80% 에탄올, 헥세인, 부탄올, 증류수 분획물 순서로 차이를 보였으며, 특히 에틸 아세테이트 분획물의 FRAP 환원력이 6,130 μmol ascorbic acid equivalent/g extract로 80% 에탄올, 헥세인, 부탄올, 증류수 분획물에 비해 각각 약 4.3, 5.0, 6.6, 62배 유의적으로 높은 FRAP 환원력이 관찰되었다($p < 0.05$). 총 페놀 함량은 오레가노 종자 80% 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수 분획물을 비교하였으며, 에틸 아세테이트, 80% 에탄올, 부탄올, 헥세인, 증류수 분획물 순서로 차이를 보였다. FRAP 환원력의 결과와 마찬가지로 에틸 아세테이트 분획물이 분획물 중 유의적으로 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), 80% 에탄올, 헥세인, 부탄올, 증류수 분획물에 비해 각각 약 2.2, 4.8, 3.5, 77배 높은 770 μmol tannic acid equivalent/g extract 총 페놀 함량을 나타냈다. Ahn 등(2000)은 카레의 향신료인 오레가노 잎을 각각 메탄올, 에틸 아세테이트, 헥세인 용매로 추출하여 Rancimat을 통한 항산화 효과를 평가하였으며, 산화 유도기간이 각각 25.6, 29.0, 27.3시간으로 에틸 아세테이트의 추출조건에서 높은 항산화 효과를 보고하였다. 또한, Hu 등(2016)은 회전모인동(*Lonicera macranthoides*) 추출물의 항산화 활성과 페놀 화합물을 연구하였는데, 실험에 사용된 회전모인동의 물, 석유 에테르, 에틸 아세테이트 및 n-부탄올 추출물을 비교한 결과 에틸 아세테이트 추출물에서 가장 높은 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 나타냈다. 이와 더불어 Han 등(2019)에 따르면 오레가노 종자 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 264.64 μmol tannic acid equivalent/g extract, FRAP 환원력은 339.78 μmol ascorbic acid equivalent/g extract 나타난 것을 보고하여, 본 연구의 에틸 아세테이트 용매 분획보다 낮은 결과값을 나타내었다. 따라서, 오레가노 종자에 포함된 다량의 페놀 화합물이 용출될 수 있는 최적의 조건은 실험에 사용된 용매 중 에틸 아세테이트인 것으로 관찰되었다.

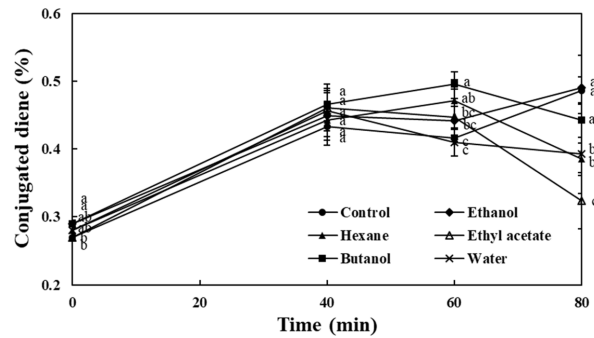


Fig. 3. Conjugated dienoic acid in corn oil oxidized at 180°C for 80 min with the addition of oregano seed solvent fraction. Significant differences were indicated using different letters ($p < 0.05$). ethanol: 80% ethanol, Hexane: n-hexane, butanol: n-butanol

오레가노 종자 분획물 간 headspace oxygen 함량 비교

오레가노 종자 분획물 간 유지 산화 안정성 비교를 위해 headspace oxygen 함량을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 오레가노 종자 분획물이 0.02% 첨가된 유지 시료를 180°C에서 0, 40, 60, 80분 산화시킨 결과, 80분 이상 산화가 진행되면서 오레가노 종자 헥세인, 에틸 아세테이트, 80% 에탄올 분획물을 첨가한 시료군이 대조군에 비해 각각 1.25, 1.05, 1.02배 많은 headspace oxygen contents 차이를 보였다. Ryu 등(2018)은 녹차, 로즈마리, 레몬밤 등의 허브 침출유 첨가가 대두유의 산패 억제에 기여하는 것으로 보고하였으며, Boskovic 등(2019) 연구에 의하면 포장된 돼지고기 정육에 오레가노 정유를 첨가할 경우 2주의 보관 기간 동안 지질 산화를 효과적으로 감소시켰음을 보고하였고, Boroski 등(2012)은 기능성 유제품 음료에 오레가노 열수 추출물 첨가가 오메가-3 지방산의 산화를 효율적으로 억제한 것을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 항산화 활성이 크게 나타났던 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물 역시 headspace oxygen 함량 증가를 유도하여 유지 산화를 지연시키므로 유지의 산화 안정에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

오레가노 종자 분획물의 CDA가 및 p-AV

유지의 산화 과정 중 생성되는 공액 이중결합을 측정하는 CDA가 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 각각의 오레가노 종자 분획물을 첨가한 유지 시료를 180°C에서 0, 40, 60, 80분 산화시킨 결과, 80분 이상 유지 산화 시 오레가노 종자 에틸 아세테이트, 헥세인, 증류수 분획물을 0.1% 첨가한 유지 시료의 CDA가 오레가노 종자 분획물을 첨가하지 않은 대조군의 CDA 양과 비교하여 유의적으로 감소하였다. 특히, 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물을 첨가하였을 때 대조군에 비해 유의적으로 1.5배 감소된 결과를 보였다($p < 0.05$). 이와 더불어 유지의 산화 중 생성되는 이차 산화물을 측정하는 p-AV의 결과는 Fig. 4에 나타내었다. CDA 측정과 마찬가지로 시료를 180°C에서 0, 40, 60, 80분 산화시킨 결과, 80분 이상 산화가 진행되면서 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물을 0.1% 첨가한 유지 시료의 이차 산화물 양이 대조군에 비해 차이를 보였으며, 1.2배 유의적으로 감소된 것이 관찰되었다($p < 0.05$). Ji 등(1992)은 여러 향신료의 항산화 활성을 조사하였으며, 이러한 향신료들의 항산화 활성은 주로 디테르펜 락톤(diterpene lactone)과 페놀 화합물에 기인한 것으로 보고하였다. Kouri 등(2007)은 오레가노(*Origanum dictamnus*)의 석

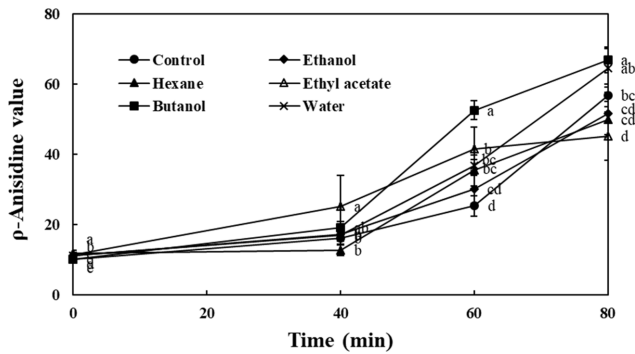


Fig. 4. *p*-Anisidine values in corn oil oxidized at 180°C for 80 min with the addition of oregano seed solvent fraction. Significant differences were indicated using different letters ($p < 0.05$). ethanol: 80% ethanol, Hexane: *n*-hexane, butanol: *n*-butanol

유 에테르, 에틸 에테르, 에탄올, 에틸 아세테이트 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위하여 유지 산화 모델을 통한 conjugated dienes, peroxide value를 평가하였는데, 오레가노 에틸 아세테이트, 디에틸 에테르 추출물이 0.02%의 농도에서 유지를 효율적으로 안정화시켰음을 관찰하였고, 이는 디에틸 에테르, 에틸 아세테이트 추출물에 포함된 플라보노이드로부터 유리 페놀성 OH가 유

지에 수소를 제공하여 산화하는 동안 발생하는 라디칼 반응을 소거한 것으로 보고하였다. 또한, 플라보노이드 및 페놀 산으로부터 유래된 항산화 성분을 유지에 혼합할 때 에틸 아세테이트 추출물을 사용하는 것이 효율적인 것으로 보고하였다. 뿐만 아니라 Rhim과 Choi (2009)는 오레가노 에탄올 추출물의 지질과산화 억제 정도를 측정하였는데, 오레가노 추출물 첨가군의 지질과산화가 첨가하지 않은 군에 비해 14% 감소된 것으로 나타났다. 이와 더불어 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)와 비교하였으며, 동일한 농도의 오레가노 추출물과 BHT를 각각 첨가하였을 때 오레가노 추출물 첨가군은 64%, BHT 첨가군은 71% 지질과산화를 억제한 것으로 나타나 천연 항산화제인 오레가노 추출물이 합성 항산화제인 BHT와 유사한 수준의 지질과산화 억제가 나타난 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서 진행된 오레가노 종자 분획물의 유지 산화 안정성 평가 결과 오레가노 종자의 에틸 아세테이트, 헥세인, 증류수 분획물이 유지 산화를 지연시키는 것으로 나타났으며, 그 중 유지에 잘 혼합되는 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물이 오레가노 종자가 함유한 항산화 물질을 효율적으로 사용하여 유지 산화 안정성을 향상시킬 수 있는 천연항산화제의 용매 조건이라 판단된다.

오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 휘발 성분 분석

GC-MS를 사용한 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 휘

Table 2. Volatile analysis of oregano seed ethyl acetate fractions by GC-MS

Volatile compounds	Peak area (10^6) (%) ¹⁾
Carvacrol	136.47±90.01 (19.36)
Thymoquinone	64.70±3.72 (9.18)
3-Cyclopentylcyclopentan-1-one	58.99±2.54 (8.37)
(2-furyl)Methylphenylchlorosilane	52.63±1.32 (7.47)
<i>ρ</i> -Cymene	51.34±7.32 (7.28)
4(5)-Acetyl-2-(2,2-dimethylpropyl)-1 <i>H</i> -imidazole	48.76±2.08 (6.92)
β-Bisabolene	38.86±1.79 (5.51)
Thymol	26.32±15.27 (3.73)
3,7-Dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol	26.19±2.05 (3.72)
Dehydro- <i>p</i> -cymene	25.52±1.74 (3.62)
4-Methoxy-4-methyl-2-cyclobutenone	20.00±0.89 (2.84)
Linalool	18.98±2.32 (2.69)
Tetradecane	16.80±2.22 (2.38)
Calamenene	16.09±0.96 (2.28)
Naphthalene	13.45±3.81 (1.91)
γ-Terpinene	13.04±2.05 (1.85)
δ-Amorphene	13.00±1.42 (1.84)
α-Phellandrene	12.49±3.78 (1.77)
Hexadecane	11.51±0.98 (1.63)
(1 <i>aS</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> ,7 <i>bR</i>)-1,1,4,7-tetramethyl-1 <i>a</i> ,2,3,5,6,7,7 <i>a</i> ,7 <i>b</i> -octahydrocyclopropra[e]azulene	10.90±0.54 (1.55)
1-Acetyl-4-methyldibenzofuran	10.13±0.39 (1.44)
α-Bisabolene	9.75±0.56 (1.38)
Butylated hydroxytoluene	9.03±0.79 (1.28)
Total volatiles	704.93±148.56 (100)

¹⁾The numbers in parentheses represent the percentage of each component contained in the total volatile components of oregano seed.

발 성분 분석 결과는 Table 2에 나타내었다. 카바크롤, 타이모퀴논(thymoquinone), 리날로올, 티몰, 파라시멘(ρ -cymene), 감마테르피넨(γ -terpinene), 델타아모르펜(δ -amorphene), 알파펠란드렌(α -phellandrene) 등의 성분이 검출되었으며, 검출된 총 향기 성분 중 카바크롤의 함량이 19.36%로 가장 많았다. Ruben 등(2014)은 오레가노 정유를 분자 증류를 통하여 분획하였으며, 주요 성분으로 카바크롤, terpinen-4-ol, 감마테르피넨 등이 검출된 것을 보고하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Ultee 등(2000)의 연구에 의하면 오레가노와 백리향 정유에 존재하는 카바크롤은 *Bacillus cereus*에 대한 항균 활성을 갖는 것으로 보고하였으며, 시멘(cymene)과 조합하여 사용하였을 때 상승효과가 나타나는 것으로 보고하였다. 또한 Cho 등(2012)은 카바크롤이 고지방식품을 섭취한 쥐의 지방 생성과 염증 반응에 관여하는 유전자 발현을 조절하는 것으로 보고하였다. 따라서 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물에 포함된 이러한 성분에 의해 항산화 활성과 유지산화 안정성 향상에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 항산화 활성이 우수한 것으로 알려진 오레가노 종자를 80% 에탄올, 헥세인, 에틸 아세테이트, 부탄올, 증류수로 분획하여 시험관 내 항산화 활성을 평가하고 180°C로 산화된 옥수수 기름에 적용하여 유지 산화에 미치는 영향을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 라디칼 소거 활성이 92.3%로 분획물 중 가장 높게 나타났으며, ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 측정 결과 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성이 53.9%로 분획물 중 가장 높게 나타났다. FRAP 환원력은 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물이 6,130 μmol ascorbic acid equivalent/g extract로 분획물 중 가장 높게 나타났으며, 총 페놀 함량은 FRAP 환원력의 결과와 마찬가지로 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물이 770 μmol tannic acid equivalent/g extract로 분획물 중 가장 높은 결과를 나타내었다. 오레가노 종자 분획물 간 헤드스페이스 산소 함량은 80분 이상 산화가 진행되면서 오레가노 종자 헥세인, 에틸 아세테이트, 80% 에탄올 분획물을 첨가한 시료군이 대조군에 비해 각각 1.25, 1.05, 1.02배 많은 산소 함량 차이를 보였다. 유지의 일차 및 이차 산화생성물을 평가한 CDA, ρ -AV의 실험결과 CDA는 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물을 첨가하였을 때 대조군에 비해 conjugated dienes 생성이 1.5배 유의적으로 감소한 것을 관찰하였다. ρ -AV의 결과 또한 CDA와 마찬가지로 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물을 첨가한 유지 시료의 이차 산화물 양이 대조군에 비해 1.2배 유의적으로 감소된 것이 관찰되었다. 이와 더불어 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물의 GC 분석 결과 주요 휘발성 성분은 카바크롤, 타이모퀴논 등으로 나타났다. 이러한 오레가노 종자의 항산화 활성은 에틸 아세테이트를 사용한 분획물에서 크게 나타났으며, 이는 오레가노 종자가 가지고 있는 향기 성분 속 항산화 물질이 실험에서 사용한 다른 용매들 보다 에틸 아세테이트 속에 다량 용출되어 높은 항산화 활성을 나타낸 것으로 사료되며, 오레가노 종자 에틸 아세테이트 분획물 속에 포함된 테르펜 및 폴리페놀 등의 물질로부터 기인하는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구 결과, 향후 오레가노 종자를 천연항산화제로 활용하기 위하여 에틸 아세테이트 분획물의 활용이 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2018RID1A3B07045467).

References

- Ahn CK, Lee YC, Yeon CA. Antioxidant and mixture effects of curry spices extracts obtained by solvent extraction. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 491-499 (2000)
- Almeida-Doria RF, Regitano-Darce MAB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 20: 197-203 (2000)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 230: 70-79 (1996)
- Boroski M, Giroux H, Sabik H, Petit H, Visentainer J, matumoto-Pintro P, Britten M. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *Food Sci. Tech-Brazil.* 47: 167-174 (2012)
- Boskovic M, Glisic M, Djordjevic J, Starcevic M, Glamoclija N, Djordjevic V, Baltic MZ. Antioxidative activity of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils and their effect on oxidative stability of minced pork packaged under vacuum and modified atmosphere. *J. Food Sci.* 84: 2467-2474 (2019)
- Bouaziz A, Khenouf S, Zarga MA, Abdalla S, Baghiani A, Charef N. Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pac. J. Trop Biomed.* 5: 19-28 (2015)
- Cho SM, Choi YS, Park SY, Park TS. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 23: 192-201 (2012)
- Cho M, Kim H, Chae Y. Analysis of volatile compounds in leaves and fruits of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. & *Zanthoxylum piperitum* DC. by headspace SPME. *Korean J. Med. Crop. Sci.* 11: 40-45 (2003)
- Choi MY, Rhim TJ. Antimicrobial effect of oregano (*Origanum majorana* L.) extract on food-borne pathogens. *Korean J. Plant Res.* 21: 352-356 (2008)
- Deleanu M, Popa EE, Popa ME. Chemical composition and active properties evaluation of wild oregano (*Origanum vulgare*) and ginger (*Zingiber officinale-Roscoe*) essential oils. *Rev. Chim.* 69: 1927-1933 (2018)
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316 (2000)
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Method Enzymol.* 299: 379-389 (1999)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compound as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
- Ham H, Woo KS, Lee B, Park JY, Sim EY, Kim BJ, Lee CW, Kim SJ, Kim WH, Lee JS, Lee YY. Antioxidant compound and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1660-1665 (2015)
- Han CH, Kim MA, Kim MJ. Korean antioxidant properties and oxidative stability of oregano seed ethanol extract. *J. Food Preserv.* 26: 165-173 (2019)
- Hu X, Chen L, Shi S, Cai P, Liang X, Zhang S. Antioxidant capacity and phenolic compounds of *Lonicerae macranthoides* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS. *J. Pharmaceut. Biomed.* 124: 254-260 (2016)
- Jadid N, Hidayati D, Hartanti SR, Arraniry BA, Rachman RY,

- Wikanta W. Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay. AIP Conf. Proc. 1854: 020019-1-020019-6 (2017)
- Ji CI, Byun HS, Kang JH, Lee TG, Kim SB, Park YH. The Antioxidative activities of spices extracts on edible soybean oil. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 21: 551-556 (1992)
- Kang DR, Shim KS, Choe HS, Na CS. Antioxidant, antimicrobial activities and cytotoxicity of hot water extracts of major herbs in Korea. Korean J. Org. Agric. 25: 821-830 (2017)
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94: 550-557 (2006)
- Kim MA, Kim MJ. Isoflavone profiles and antioxidant properties in different parts of soybean sprout. J. Food Sci. 85: 689-695 (2020)
- Kouri G, Tsimogiannis D, Bardouki H, Oreopoulou V. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. Innov. Food Sci. Emerg. 8: 155-162 (2007)
- Lee MR, Lim SB. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Pteridium aquilinum* in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. J. Agric. Life Sci. 49: 209-219 (2015)
- Rhim TJ, Choi MY. The Antioxidative effects of oregano (*Origanum majorana* L.) extracts. Korean J. Plant Res. 22: 425-430 (2009)
- Ruben O, Valeria N, Ruben GN. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. Food Chem. 156: 212-219 (2014)
- Ryu KY, Kim AG, Kim TS, Lee HH, Seo KW, Cho BS. Inhibition effect of herbs on the rancidity of soybean oil. Korean J. Food Preserv. 25: 36-43 (2018)
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J. Agric. Food Chem. 53: 7749-7759 (2005)
- Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem. 113: 1202-1205 (2009)
- Sridhar K, Charles AL. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: estimation methods for EC₅₀ using advanced statistical programs. Food Chem. 275: 41-49 (2019)
- Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. J. Food Protect. 63: 620-624 (2000)
- Yoshino K, Higashi N, Koga K. Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract. J. Health Sci. 52: 169-173 (2006)
- Yu MH, Chae IG, Jung YT, Jeong YS, Kim HI, Lee IS. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions. J. Life Sci. 21: 375-384 (2011)