

## 흑진주벼 미강으로부터 생리기능성 물질의 탐색 및 추출조건

이국영 · 김재호 · 손종록\* · 이종수  
배재대학교 유전공학과, \*작물시험장

### Detection and Extraction Condition of Physiological Functional Compounds from Bran of Heugjinju rice (*Oryza sativa* L.)

Kuk-Young Lee, Jae-Ho Kim, Jong-Rok Son\* and Jong-Soo Lee  
Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejon 302-735, Korea  
\*National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

#### Abstract

Physiological functionalities in various extracts of Heugjinju rice bran were determined and its optimal extraction condition were also investigated. Angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitory activity, fibrinolytic activity and tyrosinase inhibitory activity were higher in water extracts than those of 80% ethanol and methanol, hexane. Electron donating abilities were 97.8% in hexane extract and 83% in water extracts. ACE inhibitor was maximally extracted from Heugjinju rice bran when it was treated with 20 times of distilled water for 12 h at 20°C. Fibrinolytic compound was also maximally extracted by treatment of 10 times of distilled water for 18 h at 20°C. Electron donating compound and tyrosinase inhibitor were maximally extracted by treatment of 20 times of hexane and 10 times of distilled water at 20°C for 18 h, respectively

**Key words** : extraction, Heugjinju rice bran, physiological functionality

#### 서 론

근래 건강에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데 국내 외에서 생리기능성 물질에 대한 탐색과 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 이들 가운데 엔지오텐신 (I)을 (II)로 전환시켜 혈관수축을 억제시킴으로 고혈압을 유발시키는 엔지오텐신 전환효소(Angiotensin- converting enzyme, ACE)의 활성을 저해시키는 물질에 대한 탐색이 곡류와 수산물 및 축산가공물 등을 대상으로 활발히

이루어지고 있고(2), 식품에서 유래된 ACE 저해제로서는 우유, 대두, 옥수수, 정어리, 참치 등의 단백질 가수 분해물, 돼지혈장에서 분리된 peptide류, 감귤 및 과실류의 flavonoid 배당체류, 차성분의 카테킨류 등이 알려져 있다(3-4). 그러나 이들의 ACE 저해활성이 Captopril 보다 최저 20배 이상 낮아 강력한 ACE 저해활성을 가진 천연물질에 대한 탐색과 개발이 필요하다.

한편, 혈전(fibrin)은 상처복구시 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다. 이러한 혈전이 뇌혈관에 생성 되면 뇌혈전증이 일어나 반신불수가 되고, 심장혈관이 막히면 심부전증이나 심장마비가 되어 사망의 원인이 된다. 현재 혈전증(thrombosis)의 치료제로는 urokinase,

Corresponding author : Jong-Soo Lee, Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejon 302-735, Korea  
E-mail : biotech8@mail.paichai.ac.kr

streptokinase, tPA(tissue type plasminogen activator) 등이 있고 일본의 전통 대두 발효식품인 natto로부터 분리된 nattokinase와 우리 나라의 청국장에서 분리된 혈전용해 능이 우수한 plasminogen activator 등이 알려져 있다(5). 그 밖에도 노화에 관련된 항산화 물질(전자공여물질)과 SOD-유사활성을 가진 물질, 피부미백에 관련되어있고 식품의 효소적 갈변을 일으키며 생체 내에서 멜라닌 생합성을 촉매하는 효소인 tyrosinase의 저해활성 물질 등이 중요한 생리기능성 물질이며 천연물이나 식품 재료로부터 이들을 개발하려는 연구도 근래에 많이 진행되고 있다(6).

한편, 흑미(*Oryza sativa* L., Indica type)는 주로 중국을 비롯한 동남아시아 지역에서 재배되며 우리나라에서는 진도군 지산면에서 처음으로 약 80ha가 재배되었고 현재는 강원, 충북 등 전국적으로 재배가 확산되고 있으며 그 생산량도 점차 늘어나고 있다. 흑미는 진한 자주색을 띄며 이들 안토시아닌 색소들이 고온이나 태양광선에 매우 안정하여 아이스크림이나 음료제조 등에 널리 이용되고 있다(7). 그러나 흑미에 관한 연구는 매우 미흡하여 흑미 중에 함유되어 있는 색소류의 추출과 이용에 관한 연구와 흑미 추출물이 들깨기름의 산화안정성에 미치는 영향(8) 등 몇 편의 논문만이 보고되어 있을 뿐이다.

따라서 본 연구에서는 흑진주벼 미강으로부터 고부가가치의 생리기능성 물질을 탐색하고 추출하여 이들을 이용한 생리기능성 제품을 개발하고자 먼저 각종 용매로 흑진주벼 미강층의 유용물질을 추출한 후 이들의 생리기능성을 탐색하였고 이들의 추출 최적 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

공시재료로는 1999년 작물시험장에서 재배된 흑진주벼를 10분도로 도정하여 얻은 미강을 사용하였으며, 일반성분 함량은 수분 11.1%, 회분 8.9%, 조단백질 13.9%, 조지방 16.8%, 탄수화물 49.3% 이었다.

### 시료의 제조 및 추출

흑진주벼 미강을 분쇄하여 분말로 만든 후 일정량을

각각 물(1 : 10), 80% 에탄올 (1 : 5), 80% 메탄올 (1 : 5), hexane (1 : 4) 등에 현탁시켜 상온에서 12~16시간 진탕시킨 후 여과하고 동결건조시켜 생리기능성 물질을 추출하였다.

### Angiotensin-converting enzyme(ACE)저해활성

Cushman 등 (9)의 방법을 일부 수정하여 먼저 추출물에 일정량의 borate 완충용액을 첨가하여 현탁시킨 후 동일 용량의 ethyl acetate를 첨가하여 30초간 진탕시킨 다음 원심분리하여 얻은 여과액 50 $\mu$ l를 rabbit lung powder에서 추출한 ACE용액 150 $\mu$ l와(약 2.8~3 unit) 기질 용액 (pH 8.3의 100mM borate 완충용액에 300mM NaCl과 23mM Hip-His-Leu을 녹인 것) 50 $\mu$ l를 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음 1N HCl로 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 유리되어 나온 hippuric acid의 량을 분광분석기로 228nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후 이를 시료를 첨가하지 않은 대조구에서 생성되는 hippuric acid량과 비교하여 저해활성을 계산하였다. 여기서 ACE 효소활성의 1 unit는 37 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 1 $\mu$ M의 hippuric acid를 Hip-His-Leu로부터 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

### 혈전용해활성

Fayek 등(10) 방법에 따라 0.6% fibrin 용액 3ml에 추출액 500 $\mu$ l를 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 0.4M TCA 용액 3ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 여과하였다. 이 여과액 중에 용출되어 있는 tyrosine의 양을 1N folin 시약으로 발색시켜서 정량하였다. 이때 효소 1단위는 조효소액 1ml가 1분동안 tyrosine 1 $\mu$ g을 생산하는 활성으로 하였다.

### SOD-유사활성

Marklund 등(11)의 방법에 따라 추출액 20ml에 55mM Tris-cacodylic acid buffer(TCB, pH 8.2) 20ml를 가한 후 균질화하고 원심분리한 다음 상등액의 pH를 8.2로 조정한 후 TCB를 사용하여 50ml로 정용한 후 시료액으로 사용하였다. 이 시료액 0.95ml에 50 $\mu$ l의 24mM pyrogallol을 첨가하여 420nm에서 초기 2분간의 흡광도 증가율을 측정하여 대조구와 비교하였다.

### 전자공여능

$\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazine(DPPH)의 환원력을 이용하는 Blois(12)와 이 등(13)의 방법으로 측정하였다. 시료 0.2ml에 DPPH 용액(DPPH 12.5mg을 에탄올 100ml에 용해) 0.8ml을 가한 후 10분간 반응시키고 525nm에서 흡광도를 측정하여 시료액 무침가구와 활성을 비교하였다.

### Tyrosinase 저해활성

성 등(14)의 방법에 따라 추출액 0.5ml에 5mM L-DOPA 0.2ml, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0) 0.2ml를 혼합한 후 tyrosinase 11U를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

### 아질산염소거활성

Kato 등(15)의 방법에 따라 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액 2ml에 시료액 1ml을 첨가한 후 총 부피를 10ml로 조정하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액 1ml을 취하여 2% 초산용액 5ml, Griess시약 0.4ml을 가한 후 혼합하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

### 각종 protease 처리

물 추출액에 protease 2A, protease S, protease M, protease N, nutraseIII, Trypsin, protease E를 0.25U 첨가한 후 각 효소의 반응최적온도인 50°C와 70°C로 1시간 반응시킨 다음 75°C에서 20분간 처리하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 여과 한 후 위와 같은 방법으로 ACE 저해활성과 혈전용해활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출물의 생리기능성

흑진주벼 미강을 각종 용매로 추출하여 생리기능성을 측정한 결과 ACE 저해활성과 혈전용해활성은 각각 물 추출 하였을 때 38%와 30U로 가장 높았고, 다른 유기 용매로 추출한 시료에서는 활성이 매우 낮거나 거의 없었다(Table 1). 이러한 ACE 저해활성은 대조구로 일반 미 미강에서 동일한 방법으로 추출한 추출물의 25%보

다 높은 결과이었으나 두류 단백질의 펩신 가수분해물의 활성 (40~100%)(2)과 전통된장의 열수 추출물의 활성 (70~90%)(16) 및 술잎과 쑥의 열수 추출물의 활성 (61%, 75.1%)(17) 보다는 낮은 결과이었다.

Table 1. Physiological functionalities of extracts from eugjinju rice bran by various solvents

Solvents	ACE inhibitory activity(%)	Fibrinolytic activity(u)	Electron donating ability(%)	SOD-like activity(%)	Tyrosinase inhibitory activity(%)	Nitrite scavenging ability(%)
Distilled water	38(25)*	30(14)	83(69.6)	(-)	98.3(22.6)	1(-)
Ethanol	(-)	4(2)	2.6(54)	-7.5)	92(61.8)	6(2)
Methanol	(-)	23(16)	3.8(50)	-15.3)	48.4(93.2)	20(5)
Hexane	(-)	0.5(0.6)	97.8(95.9)	5(25)	15(-)	(-)

\* ( ) : physiological functionalities of extract from brown rice bran

또한 혈전용해활성도 일반미 미강의 추출물의 활성 (14U) 보다 약 2배 이상 높았으나 버섯(18)이나 몇 종의 Bacillus 속 균(19)의 활성과는 비슷하거나 다소 낮았다.

전자공여능은 흑진주벼 미강과 일반미 미강 모두 hexane 추출물에서 96~98%로 높게 나타났고 물추출에서도 83%의 활성을 보였는데 이는 쑥과 술잎의 열수 추출물에서의 전자공여능(80%, 50%)(20)과 일반미 미강의 활성(69.6%)보다 높은 결과이었다.

SOD유사활성은 hexane 추출물에서 25%의 활성을 보였고 tyrosinase 저해활성은 물추출물에서 약 94%의 높은 활성을 보였다. 그러나 아질산염소거활성은 모든 추출물에서 거의 보이지 않았다. 정 등(21)은 엽경채류에서는 무순이, 근채류와 다류에서는 무, 마늘, 표고버섯 등이 50% 이상의 tyrosinase 저해활성을 보였고 과채류에는 홍고추가 가장 높은 tyrosinase 저해활성을 보였음을 보고하였다. 또한 김 등(22)은 한국산 녹차에서 분리한 탄닌이 강한 tyrosinase 저해활성물질임을 보고한 바 있다.

### 추출조건에 따른 생리기능성

ACE 저해물질 추출을 위한 흑진주벼 미강에 대한 물 추출 조건을 검토한 결과 물 첨가 비율을 1 : 20으로 했을 때 38.9%의 ACE 저해활성을 보였고(Table 2), 12시간 추출하였을 때 최대 활성을 나타내었으며 추출 시간이 길어짐에 따라 오히려 ACE 저해활성은 낮아졌다(Fig. 1). 이는 추출시간이 길어짐에 따라 이미 추출된, 펩타이드로 추정되는 ACE 저해물질들이 단백질분해효

소 등에 의해 일부 분해되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 20℃에서 12시간 추출하였을 때 가장 높은 ACE저해 활성을 보였고(Table 3), 이 등(23)이 미강단백질을 분리하여 펩신으로 처리하였을 때 ACE저해효과가 높게 나타났다는 보고와는 달리 흑진주벼 미강 단백질에 대한 각종 protease 처리는 ACE 저해활성에 아무런 영향을 주지 않았다(data not shown).

혈전용해활성물질 추출 조건을 검토한 결과, 물을 1 : 10으로 첨가하여 추출하였을 때 혈전용해활성이 가장 높았고(Table 2), 추출 최적시간은 18시간이었으며(Fig. 1), 온도는 35℃ 이었다(Table 3). 이를 ACE 저해물질 생산조건과 비교했을 때 물 첨가량은 적었으나 추출온도는 훨씬 높았고 추출시간도 약 6시간 길었다.

Table 2. Physiological functionalities of extracts from Heugjinju rice bran under various addition ratio of distilled water

Ratio of D.W (rice bran, g : D.W, mL)	ACE inhibitory activity(%)	Fibrinolytic activity(u)	Tyrosinase inhibitory activity(%)
1 : 5	-	-	-
1 : 10	14.8	30.3	96.4
1 : 20	38.9	30.2	96.3
1 : 40	39.3	24	95.7

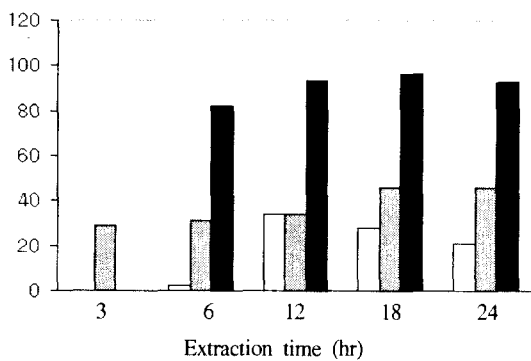


Fig. 1. Effect of extraction times of ACE inhibitor, fibrinolytic compound and tyrosinase inhibitor from Heugjinju rice bran.

ACE inhibitory activity were assayed after addition of 20 times D.W in black rice and extracted for indicated time. Fibrinolytic activity and tyrosinase inhibitory activity were assayed after addition of 10 times D.W.

ACE inhibitory activity(%)  
 Fibrinolytic activity(U)  
 Tyrosinase inhibitory activity(%)

Table 3. Physiological functionalities of extracts from Heugjinju rice bran under various temperature.

Extraction temperature(°C)	ACE inhibitory activity(%) <sup>1)</sup>	Fibrinolytic activity(u) <sup>2)</sup>	Tyrosinase inhibitory activity(%) <sup>2)</sup>
4	29	29.5	73.2
20	37	46	95.8
35	36.3	45	94.8
50	30	32	89.1
60	-	-	88.6

<sup>1)</sup> ACE inhibitory activity was assayed after addition of 20 times D.W in rice bran and extraction for 12 hr.

<sup>2)</sup> Fibrinolytic activity and tyrosinase inhibitory activity were assayed after addition of 10 times D.W in rice bran and extraction for 18 hr.

Hexane을 흑진주벼 미강층에 1 : 4~1 : 40까지 일정 농도로 첨가하여 35℃에서 10시간 추출한 후 DPPH로 이들의 전자공여능을 측정된 결과 hexane을 1 : 20으로 첨가하여 추출하였을 때 98%의 전자공여능을 보였으나 hexane을 1 : 5, 1 : 10으로 첨가하여 추출하였을 때와도 큰 차이가 없었다(Table 4). 또한, 18시간 추출까지는 전자공여능이 증가하였으나 그 이상의 추출에서는 변화가 없었다(Fig. 2). 지금까지 전자공여능을 가진 물질로는 단백질, 폴리페놀물질 등 다양한 성분들이 알려져 있고 특히 참깨 탈지박의 항산화물질이 hexane에 의해서 추출되는 지용성 lignan류 라는 보고(24)와 같이 흑진주벼 미강에서 추출되는 전자공여물질도 이와 유사한 물질로 추정되어 현재 이들을 분리하여 특성을 조사중에 있다.

Table 4. Effect of hexane on the extraction of electron donating compound from Heugjinju rice bran

Ratio of hexane (rice bran, g : hexane, mL)	Electron donating ability(%)
1 : 5	97.0
1 : 10	97.2
1 : 20	98.2
1 : 40	92.6

Tyrosinase 저해물질 추출을 위한 추출 최적 조건을 검토한 결과, 물을 1:10으로 첨가하여 20℃에서 18시간 추출하였을 때 약 97.2%의 높은 tyrosinase 저해활성을 보였(Table 2, 3, Fig. 1).

## 요 약

흑진주벼 미강으로부터 생리기능성 물질을 추출하여 이들을 이용한 생리기능성 제품을 개발하기 위하여 먼저 흑진주벼 미강에 함유되어있는 유용물질들을 추출한 후 이들의 생리기능성을 측정하였고 미강 중에 많이 함유되어있는 ACE저해활성물질과 혈전용해활성물질, 전자공여물질과 tyrosinase 저해물질들의 추출최적조건을 검토하였다. ACE 저해활성과 혈전용해활성 및 tyrosinase 저해활성은 물 추출액에서 높았고 전자공여능은 hexane 추출액에서 높았다. 그러나 SOD 유사활성과 아질산염 소거활성은 없거나 매우 미약하였다. 흑진주벼 미강에 물을 1 : 20으로 첨가하여 20℃에서 12시간 추출하였을 때 ACE 저해활성물질이 가장 많이 추출되었고 물을 1 : 10으로 하여 35℃에서 18시간 추출하였을 때 혈전용해활성물질이 가장 많이 추출되었다. 또한 전자공여 물질은 20배의 hexane으로 20℃에서 18시간, tyrosinase 저해제는 10배의 물로 20℃에서 18시간 추출하였을 때 가장 많이 용출 되었다.

## 참고문헌

1. 한국식품과학회(1997) 건강 보조식품 심포지움. 요약집, 3-140.
2. Rhyu, M.R., Nam, Y.J. and Lee, H.Y. (1996) Screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. *Foods and Biotechnology*, 5, 334-347
3. 조완일, 문태화 (1997) 미강 단백질 가수분해물에서 담즙산 결합 획득의 분리 및 특성 구명. 한국식품과학회지, 29, 417-426
4. Mamdooh G. (1998) Anti-HIV activity in vitro of MGN-#, an activated arabinoxylane from rice bran. *Bioch and Biophy Res*, 243, 25-29
5. 최상원, 남석현, 최해천 (1996) 쌀겨의 에탄올 추출물의 ACE 효소 저해활성. 한국식품과학회지, 5, 305-309
6. 생체 기능조절 천연소재 연구회 (1995) 생체 기능조절 천연소재 심포지움, 요약집, 1-33.
7. Yoshinaga, K., Yakahashi, K. and Yoshizawa, K.(1986) Liquors with pigments of red rice. *J. Brew. Soc. Japan*, 81, 337-441
8. 김귀영, 박필숙, 강우원, 박모라, 김종국(1997) 정제 들깨기름의 산화안정성에 미치는 흑미 추출물의 영향. 한국농산물저장유통학회지, 4, 311-315
9. Cushman D.W. and Cheung H.S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648
10. Fayek, K.I. and El-Sayed S.T. (1980) Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Zeit. fur Allgem. Mikrobiol.*, 20, 375-382
11. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474
12. Blois, M.S. (1985) Antioxidant determination by use of stable free radical. *Nature*, 191, 1199-1203
13. 이종수, 이성훈, 권수진, 안 철, 유진영(1996) 채래식 메주에서 분리한 효모들의 각종 효소 활성과 기능성. 한국산업미생물학회지, 25, 448-453
14. Sung, C.K. and Cho, S.H. (1992) Studies on the purification and characteristics of tyrosinase from *Dios*, 28. 162-165
15. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.(1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1333-1339
16. 김승호, 이윤진, 권대영 (1999) 전통된장으로부터 Angiotensin converting enzyme 저해물질의 분리. 한국식품과학회지, 31, 848-854
17. 강운한, 박용곤, 오상용, 문광덕 (1996) 술잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. 식품과학회지, 27, 978-984
18. 최낙식, 서승염, 김승호 (1999) 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색. 한국식품과학회지, 31, 553-557
19. 장영렬, 김원국, 권익부, 이현용 (1998) 젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, 30, 655-659
20. 김수민, 김은주, 조영석, 성삼경 (1999) 제조방법별 술잎 추출물의 항산화성 검토. 한국식품과학회지, 31, 527-534
21. 정승원, 이남경, 김석중, 한 대석 (1995) Tyrosinase 활성을 저해하는 식물체의 탐색. 한국식품과학회지, 27, 891-896

22. 김진구, 차원섭, 박준희, 오상룡, 조영제, 천성숙, 최 청 (1996) 한국산 녹차로부터 분리한 축합형 탄닌의 tyrosinase 저해효과. 한국식품과학회지, **29**, 173-177
23. 이현유, 류미라, 김혜영 (1995) 농산물활용 신기능 천연물 소개 탐색 및 개발연구(미곡부산물의 혈압 강하 및 혈당강하 기능소재 탐색 및 개발). 한국 식품 개발 연구원 1차년도 최종 보고서(과기처)
24. 김인원, 신동화, 최 응 (1999) 한약재로부터 선발된 옷나무 수피 추출물로부터 항산화활성물질의 분리. 한국식품과학회지, **31**, 855-863

---

(접수 2001년 5월 25일)