

발아 특수미의 항산화 활성

강미영¹ · 김설이 · 고희종² · 진중현^{2,3} · 남석현*

¹경북대학교 식품영양학과, ²서울대학교 농학과, ³(주)신지, 아주대학교 생명과학과

Antioxidative Activity of Germinated Specialty Rices

Mi-Young Kang¹, Sulyi Kim, Hee-Jong Koh², Joong-Hyun Chin^{2,3}, and Seok-Hyun Nam*

¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

²Department of Agronomy, Seoul National University

³Shinji Corp.

Department of Biological Science, Ajou University

Functionality changes by germination of giant embryonic rice and pigmented rice were evaluated with focusing on antioxidative activities of 70% ethanolic extracts. Overall, reducing power of giant embryonic rice and pigmented rice was higher than that of normal brown rice, and the germination of rices tend to enhance their reducing powers. *In vitro* and *ex vivo* experiments employing linoleic acid peroxidation and rabbit erythrocyte membrane peroxidation systems, respectively, revealed inhibitory effect on lipid peroxidation was highest in pigmented rice, followed by giant embryonic rice, and normal brown rice from high to low order. Superoxide radical-scavenging activity decreased in order of pigmented rice > giant embryonic rice > normal brown rice, and germination also enhanced their superoxide scavenging ability compared to non-germinated controls. Hydroxyl radical-scavenging ability was highest in pigmented rice, followed by giant embryonic rice, and normal brown rice. Despite marked enhancement in hydroxyl radical-scavenging ability of normal brown rice by germination, order of scavenging ability was not altered among germinated rices. Same trend as with *in vitro* ROS scavenging was observed for *ex vivo* scavenging potency on ROSs generated by TPA stimulation in HL-60 cells. Germination-associated differential increase in ROS scavenging ability of pigmented rice and giant embryonic rice, characterized by no induction of cytotoxicity, was observed.

Key words: specialty rice, germination, antioxidation, reactive oxygen species, radical scavenging

서 론

쌀의 과잉생산과 소비감소, 그리고 쌀시장 개방으로 인한 농촌의 경제·사회적 문제점을 해결하기 위해서는, 단순히 에너지 공급 또는 영양소 공급원으로서가 아니라 생리활성 기능성이 풍부한 건강보조식품으로 개발될 수 있는 가능성까지 구비하는 쌀 품종이 개발되어야 할 필요성이 대두되었다. 이와 같은 필요성에 부응하여 유색미, 거대배아미, 발효미 등 다양한 종류의 기능성 쌀들이 개발되고 있다. 유색미는 취반용 백미에 비해서 식미는 다소 떨어지는 편이지만 생육이 왕성하고 다수확성이며 종자의 발아력이 우수하며, 미강층에서 항산화 활성이 뛰어난 수용성 색소성분인 Isovitexin 등(1,2)이 보고되었으며, 약 30여종의 에탄올 추출물 및 색소분획의 *in vitro* 항변이

원성 및 항암활성에 대한 연구(3-5)가 진행되었다. 또한 거대배아미는 배아의 크기가 큰 만큼 배유 부분이 위축된 상태의 쌀로서, 배유의 등숙상태가 충실하지 못한 경향이 있기 때문에 취반용으로 이용하기보다는 가공품 형태로의 이용이 기대되는 품종이다. 그러나 쌀 배아에는 영양성분 중 양질의 단백질과 비타민 그리고 필수지방산이 종실의 어느 부분보다도 다량 집적되어 있다는 사실을 감안하면(6), α -tocopherol, γ -oryzanol, 피틴산 등 생리활성 물질의 함량이 거대배아미가 일반미에 비하여 상대적으로 높을 것이 예상되기 때문에, 배아 크기가 큰 쌀 품종의 개발은 영양가의 면에서 뿐만 아니라 건강 기능성 식품용 신소재 개발이라는 의미에서 중요하다고 하겠다.

일반적으로 식물종자는 발아가 진행됨에 따라 생리적 활성이 증대되고 성분의 변화가 일어나기 때문에 생리활성 측면에서는 발아에 의하여 처리 전에는 측정되지 않는 생리활성이 나타날 가능성이 있다. 따라서 발아에 의한 영양소 및 생리활성 물질의 유효도를 극대화하기 위한 연구들이 곡류 및 두류를 중심으로 활발하게 진행되어 왔다. 그 결과, 단백질과 아미노산(7,8), 지방산(9,10), 탄수화물(11), 무기질(12), 비타민(8,9) 및 피틴산(14,15)의 함량 변화와 더불어 각종 효소나 효소 저해제

*Corresponding author: Seok-Hyun Nam, Department of Biological Science, Ajou University, 5 Wonchon-dong, Yongtong-gu, Suwon 443-749, Korea
Tel: 82-31-219-2619
Fax: 82-31-219-1615
E-mail: shnam@ajou.ac.kr

의 하나인 트립신 저해제의 변화(11,13)에 관한 연구들이 수행되어 왔다. 쌀의 경우에도 발아와 더불어 특수성분인 아라비녹실산, 감마아미노낙산 등의 성분이 증가하는 것으로 알려져 있다(16,17). 이에 본 연구에서는 전적으로 취반용으로만 소비되기에 부적합한 특수미 품종인 유색미와 거대배아미를 대상으로 발아에 따른 생리활성 물질의 함량 및 생리활성의 변화를 조사하고자 하였다. 이와 같은 목적으로 현재 시판 중인 유색미와 거대배아미를 3일 간 발아시켰을 때 나타나는 총체적인 항산화활성의 변화를 환원력과 지질과산화 억제활성을 측정하고 *in vitro*의 실험계와 배양세포계에서 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)에 대한 소거활성의 변화를 평가하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

실험에 사용한 벼 종자는 모두 (주)신지에서 제공받았다. 종자를 벤레이트 수화제로 소독한 후, 15°C 증류수에 48시간 침지 후, 27°C에서 3일간 발아시켜, 왕겨 껍질을 제거하고, 분쇄 후, 5배량의 70% EtOH로 80°C에서 3시간 동안 reflux하면서 추출하여 감압건조 후 DMSO에 용해시켜 200 mg/mL의 농도로 만들어 -20°C에 냉동 보관하면서 사용하였다. 실험에 사용한 화학시약은 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 ACS의 시약을 구입하여 추가적인 정제과정 없이 실험에 사용하였다.

환원력의 측정

Oyaizu 등의 방법(18)에 의거하여 특수미의 환원력을 측정하였다. 즉, 농도별로 조절한 시료 20 μ L를 50 mM 인산 완충액(pH 6.6)과 1%의 potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$]와 1.4:1로 혼합된 용액 1.2 mL에 첨가한 다음, 50°C에서 20분간 반응시킨다. 반응 후, 0.5 mL의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 3,000 rpm 10분간의 원심분리를 통하여 얻어진 상정액에 0.1%의 $FeCl_3$ 100 μ L를 넣어서 발색반응을 유도시킨 다음, UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 700 nm의 흡광도에서 측정하였다.

Linoleic acid 자동과산화 억제활성의 측정

Linoleic acid peroxidation model system을 이용한 지질과산화 억제활성은 0.13% linoleic acid 5 mL, 탈이온수 2.4 mL, 50 mM 인산완충액(pH 7.0) 5 mL 및 시료 2 mg(100 μ L)을 cap tube에 넣고 40°C incubator에 10일간 보관 후 지질과산화 정도를 thiocyanate법(19)에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 반응액 100 μ L에 4.7 mL의 75% EtOH, 100 μ L의 30% NH_4SCN 용액을 넣고 20 mM의 $FeCl_2$ 용액으로 발색시켰다. 반응의 결과 나타난 발색정도는 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 517 nm의 흡광도에서 측정하였다.

토끼 적혈구막 지질과산화 억제활성의 측정

토끼 적혈구막 지질분획의 조제 및 이를 이용한 지질과산화 억제활성의 측정은 주로 Ames 등(20) 및 Tsuda 등(21)이 확립한 방법에 따라 시행하였다. 토끼의 혈액은 cardiac punching으로 얻었고, 저장액 조건(10 mM 인산 완충액, pH 7.4)에서 얻어진 erythrocyte membrane분획을 Bradford법(22)으로 측정하여 단백질의 양이 2 mg/mL가 되도록 조정된 다음 -70°C에 보관하며 사용하였다. 지질과산화 억제활성의 측정방법은 다음과 같다. 최종적으로 막지질 분획 0.94 mL와 24 mM의 *tert*-butylhy-

droperoxide 50 μ L, 시료 2 mg가 포함된 반응액 1 mL를 37°C에서 30분간 교반하면서 반응하였다. 여기에 TCA와 thiobarbituric acid(TBA)를 최종농도가 각각 4% 및 0.11%가 되도록 순차적으로 첨가한 후, 100°C에서 5분간 열처리하였다. 생성된 침전을 원심분리로 제거한 상정액의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer(V-550, JASCO, Japan)를 사용하여 535 nm에서 측정하였다.

Superoxide radical($\cdot O_2^-$) 소거활성의 측정

Superoxide radical 소거활성의 측정에 사용된 superoxide radical은 hypoxanthine(HPX)을 기질로 xanthine oxidase(XOD)를 사용하는 발생시스템(HPX/XOD system)을 이용하여 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 spin trap agent인 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide(DMPO)과 반응시킨 후 Electron spin resonance(ESR) spectrometer(TE-200, JEOL, Japan)로 정량하였다(23). 즉, 적당량의 시료를 35 μ L의 5.5 mM diethylenediamine-pentaacetic acid(DETAPAC), 15 μ L의 9.2 M DMPO와 0.02 unit의 xanthine oxidase와 혼합하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)로 반응용량을 1 mL로 조절하였다. ESR spectroscopy를 위한 기기 설정조건은 다음과 같다. modulation amplitude, 0.1 mT; recording range, 4 mT; recording time, 1 min; time constant, 0.1 s; microwave power, 1.8 mW; microwave frequency, 9.40432.

Xanthine oxidase 억제활성의 측정

Xanthine oxidase의 억제활성은 Noro의 방법에 따라 수행하였다(24). 200 mM 인산완충액(pH 7.5)에 0.4 unit/mL의 xanthine oxidase를 첨가하여 37°C에서 10분간 pre-incubation 시킨 후, 2 mM hypoxanthine 50 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 생성되는 uric acid의 양을 UV/VIS spectrophotometer(V-550, Jasco, Japan)를 사용하여 295 nm에서의 흡광도에서 측정하였다.

Hydroxyl radical($\cdot OH$) 소거활성의 측정

Hydroxyl radical은 $FeSO_4$ 와 H_2O_2 를 사용하여 Fenton 반응(25)을 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 superoxide radical 소거활성의 측정과 마찬가지로 spin trap agent인 DMPO와 반응시킨 후 ESR spectrometer(TE-200, JEOL, Japan)로 정량하였다(26). 즉, 적당량의 시료를 50 μ L의 0.3 M DMPO와 50 μ L의 10 mM $FeSO_4$, 50 μ L의 10 mM의 H_2O_2 와 혼합하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)으로 전체 용량을 200 μ L로 조절하였다. ESR spectroscopy에 의한 hydroxyl radical의 정량은 superoxide radical 측정 시와 동일한 기기 작동조건에서 수행하였다.

Fe^{2+} chelation 활성 측정

발아거대배아미 추출물이 Fenton 반응에 필요한 Fe^{2+} 의 포착 여부를 Carter의 방법(27)에 따라 측정하였다. 10 mM 인산완충액(pH 7.4) 20 μ L에 시료 10 μ L, 10 mM $FeSO_4$, 10 μ L, 탈이온수 60 μ L, 10% ammonium acetate 400 μ L로 구성된 반응액에 발색시약(3 mg/mL ferron-3 mg/mL neocuprion) 100 μ L를 첨가하여 잘 혼합한 후, 562 nm에서의 흡광도를 측정한다. 반응액에 잔존하는 Fe^{2+} 의 양은 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 를 이용하여 동일한 반응 조건에서 수행하여 얻은 표준곡선에 의하여 산출하였다.

세포 내 ROS 소거활성의 측정

인간의 premyeloblastoma cell line인 HL-60는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum

(Hyclone, Logan, UT, USA)를 첨가시킨 phenol red가 없는 RPMI 1640 배지(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 5% CO₂ 조건의 포화습도의 공기에서 배양하였다. HL-60를 호중구 계열의 세포로 분화시키기 위하여 mL당 5×10⁵의 세포에 최종농도가 1.4%가 되도록 DMSO를 첨가한 다음, 6일간 배양하여 분화를 유도하였다(28). 현미경으로 분화된 세포의 특징인 세포의 위축상태를 확인한 다음, 세포를 회수하여 PBS(phosphate-buffered saline)로 잘 세척하고, 1 mL의 PBS에 현탁된 5×10⁴의 세포에 적당한 양의 시료와 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 첨가하여 37°C에서 15분간 배양하며, 배양 후, TPA를 160 nM이 되도록 첨가하여 세포의 호흡폭발을 유도하였다. 다시 37°C에서 30분간 배양 후, FACS-vantage(Benton Dikison, NJ, USA)를 이용하여 세포 내 ROS의 생성 수준을 측정하였다(29).

세포독성의 측정

쌀 추출물이 세포의 생존에 미치는 효과는 Mosmann이 보고한 MTT colorimetric reduction assay에 의하여 수행하였으며(30), 이미 기술한 세포 내 ROS 소거활성의 측정방법과 동일한 조건으로 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 다음, 상정액을 제거하고 5 mg/mL의 MTT 시약을 96 well당 100 µL씩 분주하여 3시간 동안 배양기에 보관하였다. 반응 후, 잔여 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 µL씩 분주하여 침전물을 충분히 용해시킨 다음, ELISA reader(Model 550, BioRad, USA)에서 570 nm의 측정파장 및 650 nm의 reference 파장을 기준으로 흡광도를 측정하였다.

통계분석

3회 실험의 평균치는 mean±SD로 표시하였으며, 반복실험 평균값 간의 유의성은 SAS software를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해서 검증하였고 $p < 0.05$ 에서 평균값 간의 유의적 차이를 구하였다.

결과 및 고찰

품종 간 환원력의 비교

발아처리 유무에 따른 품종 별 쌀겨 70% 에탄올 추출물이 보유한 항산화 활성도를 비교하는 가장 간편한 지표로서 환원력을 측정하였다. 각 에탄올 추출물을 0.16 mg/mL에서 3.3 mg/mL까지 농도별로 첨가하였을 때 측정된 품종별 환원력을 Table 1에 나타내었다. 전반적으로 발아, 무발아 조건에 관계없이 환원력은 유색미가 가장 높았고, 그 다음이 거대배아미 > 일반현

미의 순서였다. 유색미를 제외하고는 발아처리에 의하여 환원력이 증가하였는데, 특히 발아처리된 거대배아미와 유색미에서 농도증가에 따라 환원력은 급격히 증가하는 현상을 볼 수 있었다. 기술한 바와 같이, 발아처리는 유색미의 환원력을 저하시키지만, 발아 유색미의 전체적인 환원력은 타 품종의 쌀보다 월등히 높았다. 이와 같은 결과는 이미 보고된 바와 같이 유색미에는 cyanidine 3-O-β-D-glucoside 및 peonidine 3-O-β-D-glucoside와 같은 일반미에는 없는 항산화 활성이 증명된 색소체가 다량 함유되어 있기 때문에 색소체가 없는 거대배아미보다도 환원력이 높게 관찰된 것으로 보인다(31,32). 특히 발아처리에 의하여 거대배아미의 Fe 이온에 대한 환원 능력이 크게 증대되었다는 것은 발아 거대배아미의 항산화능이 무발아 대조군에 비하여 증가되었다는 의미하므로, 발아 거대배아미를 건강기능성 식품소재로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

지질과산화 억제효과의 비교

위에서 기술한 각 쌀 추출물이 세포의 산화적 손상에서 가장 중요한 지질과산화를 억제할 수 있는가 여부를 조사하였다. 시료의 지질과산화 억제활성을 정확하게 평가하기 위해서 *in vitro*에서 linoleic acid의 자동산화에 대한 억제능을 측정하였고, 세포 내에서 일어나는 지질과산화에 대한 억제활성을 보다 정확히 측정하기 위한 수단으로서 토끼 적혈구(ghost cell) 막지질 분획을 사용하여 *ex vivo*의 조건에서 지질과산화에 대한 억제활성을 측정하였으며, 각 시료의 지질과산화 억제활성을 평가하는 지표로서 항산화제인 BHT와 vitamin E를 대조군으로 사용하였다. 우선 linoleic acid peroxidation 실험계의 결과를 보면, 무발아 조건에서도 거대배아미와 유색미의 억제활성은 대조군인 무발아 현미에 비하여 유의하게 높았으며(Table 2), 일반현미의 경우 발아에 의하여 그 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 유색미와 거대배아미의 지질과산화 억제활성은 발아 처리에 의하여 유의성있게 증가하지는 않았다. 토끼 적혈구 막지질 분획을 이용한 실험계의 결과는 linoleic acid peroxidation 실험계서 관찰된 결과와는 약간의 차이가 있었다. 발아 처리는 거대배아미와 일반현미의 지질과산화 억제활성을 유의하게 증가시킨 것을 알 수 있었는데, 특히 거대배아미에서 활성이 가장 현저하게 증가하였고 거의 대조군으로 사용한 vitamin E 수준의 지질과산화 억제활성을 보여주었다. 반면, 유색미에서는 현저한 활성증가는 관찰되지 않았다(Table 2). *In vitro*의 결과에서 발아 일반현미의 억제활성이 72%로 나타났지만, *ex vivo*의 실험계서는 57% 정도로 나타났다. 세포 내에서 발생하는 지질과산화 반응은 막에 함유된 각종 항산화성 물질이나 효소들에 의하여 제어되고 있는 반면, *in vitro*의 실험계는 이와

Table 1. Reducing power of rice extracts

Experiments		Absorbance (700 nm)			
		0.16 mg/mL	0.83 mg/mL	1.6 mg/mL	3.3 mg/mL
Brown rice	Not-germinated	0.077 ± 0.011 ^b	0.110 ± 0.034 ^b	0.142 ± 0.039 ^c	0.179 ± 0.053 ^d
	Germinated	0.091 ± 0.002 ^a	0.080 ± 0.020 ^b	0.114 ± 0.016 ^c	0.227 ± 0.033 ^d
Giant embryonic rice	Not-germinated	0.092 ± 0.003 ^a	0.088 ± 0.020 ^b	0.178 ± 0.032 ^c	0.250 ± 0.067 ^c
	Germinated	0.099 ± 0.006 ^a	0.121 ± 0.014 ^b	0.291 ± 0.087 ^c	0.764 ± 0.266 ^c
Pigmented rice	Not-germinated	0.094 ± 0.005 ^a	0.404 ± 0.119 ^a	1.055 ± 0.144 ^a	1.962 ± 0.164 ^a
	Germinated	0.095 ± 0.004 ^a	0.174 ± 0.066 ^b	0.596 ± 0.204 ^b	1.538 ± 0.200 ^b

Results are expressed as means ± SD (n=3).

Values not sharing common superscript letter were significantly different at $p < 0.05$.

Table 2. Inhibitory effect of rice extracts on lipid peroxidation

Experiments		Linoleic acid peroxidation system		Reticulocyte membrane lipid peroxidation system	
		Absorbance (517 nm)	Inhibition (%)	Absorbance (535 nm)	Inhibition (%)
Control		1.074 ± 0.292 ^c	0	3.412 ± 0.187 ^c	0
BHT ¹⁾		0.176 ± 0.182 ^a	83.6	nd ³⁾	nd
Vitamin E ²⁾		nd	nd	0.889 ± 0.019 ^a	74.0
Brown rice	Not-germinated	0.648 ± 0.017 ^b	39.7	1.983 ± 0.057 ^d	42.0
	Germinated	0.298 ± 0.092 ^a	72.3	1.475 ± 0.013 ^c	56.9
Giant embryonic rice	Not-germinated	0.255 ± 0.038 ^a	76.3	1.598 ± 0.020 ^c	53.3
	Germinated	0.232 ± 0.042 ^a	78.4	0.967 ± 0.023 ^b	71.7
Pigmented rice	Not-germinated	0.205 ± 0.025 ^a	80.9	1.107 ± 0.043 ^b	67.6
	Germinated	0.195 ± 0.011 ^a	81.8	1.013 ± 0.028 ^{ab}	70.4

^{1,2)}At a concentration of 1 and 10%, respectively.

³⁾Not determined.

Results are expressed as means ± SD (n=3).

Values not sharing common superscript letter were significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Scavenging ability of rice extracts on superoxide radicals

Experiments		· O ₂ ⁻ scavenging (%)		XOD inhibition (%)	
		0.5 mg/mL	5 mg/mL	0.5 mg/mL	5 mg/mL
Brown rice	Not-germinated	18.378 ± 0.743 ^c	11.552 ± 1.155 ^c	-3.862 ± 0.021 ^c	-47.507 ± 0.016 ^d
	Germinated	-15.444 ± 0.215 ^f	25.523 ± 3.029 ^d	21.130 ± 0.358 ^a	15.176 ± 2.188 ^b
Giant embryonic rice	Not-germinated	1.704 ± 0.175 ^e	25.560 ± 1.526 ^d	23.927 ± 1.325 ^a	16.489 ± 0.959 ^b
	Germinated	12.527 ± 0.113 ^d	43.172 ± 4.036 ^c	8.281 ± 0.549 ^b	7.882 ± 0.160 ^c
Pigmented rice	Not-germinated	66.200 ± 1.922 ^a	91.537 ± 1.204 ^a	22.866 ± 1.318 ^a	35.417 ± 2.053 ^a
	Germinated	53.529 ± 1.257 ^b	85.754 ± 0.430 ^b	6.005 ± 0.567 ^b	26.736 ± 0.092 ^a

Results are expressed as means ± SD (n=3).

Values not sharing common superscript letter were significantly different at $p < 0.05$.

같은 세포 내 제어기작을 반영하지 못하는 것을 감안한다면, 토끼 적혈구 막지질을 기질로 사용한 *ex vivo*의 실험계서 얻어진 결과가 *in vitro*의 결과보다 신뢰성이 있다고 생각된다. *In vitro* 실험계서 얻어진 결과가 *ex vivo*에서의 결과보다 다소 높은 것은 아마도 추출물 내에 존재하는 물질들이 가지는 pro-oxidant로서의 활성이 *in vitro*계에서 길항적으로 조절되지 못한 상태에서 발현된 결과일 가능성이 있다(33). 이 실험을 통하여 특수미인 거대배아미와 유색미의 지질과산화 억제활성은 발아처리에 의하여 잘 알려진 항산화제인 BHT나 vitamin E 수준까지 증가한다는 사실을 알 수 있었다.

Superoxide radical(· O₂⁻) 소거활성

산소호흡으로 대사 에너지를 획득하는 생물들에 있어서 호흡과정의 부산물로 발생하는 유해한 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)이 생체 고분자의 산화를 유발함으로써 세포의 노화나 암과 같은 만성질환의 원인이 된다는 사실이 보고되어 있다(34). 따라서 이들 쌀 추출물의 품종 별 ROS 소거활성의 차이 및 발아처리에 의한 ROS 소거활성의 변화를 체계적으로 조사할 필요가 있기 때문에 ROS 중에서도 세포 내에서 가장 널리 작용하는 superoxide radical과 hydroxyl radical에 초점을 두고 실험을 수행하였다. 우선 superoxide radical에 대한 소거활성을 조사하기 위하여, 본 실험에서는 기질과 효소로서 hypoxanthine 및 xanthine oxidase를 사용하는 HPX/XOD sys-

tem으로 생성된 superoxide radical을 실험에 이용하였다. 생성된 radical은 반감기가 매우 짧고 불안정하기 때문에 spin trapping agent인 DMPO와 반응시켜서 생성된 DMPO-O₂ adduct를 ESR spectrometry로 측정하는 가장 직접적이고 신뢰성 있는 라디칼 측정법을 이용하여 시료가 가지는 superoxide radical 소거활성을 측정하였다. Table 3에 나타나 있듯이, 무발아 일반현미의 경우만 제외하고는 전반적으로 발아처리의 유무에 관계없이 시료의 농도가 증가하면 superoxide radical 소거활성은 증가하였다. 또한 발아처리는 거대배아미와 일반미의 라디칼 소거활성을 증가시키는 경향이 있었다. 반면, 유색미는 발아에 의하여 활성이 감소되었지만 반응에 사용된 농도나 발아처리 여부에 관계없이 측정된 쌀 시료 중에서 전체적인 superoxide radical 소거활성이 가장 높았다. 실험에 사용된 superoxide radical은 *in vitro*에서 xanthine oxidase의 작용에 의하여 만들어진 것이므로, 관찰된 라디칼 소거활성이 시료가 직접적으로 라디칼을 소거한 것이 아니라, xanthine oxidase의 활성을 blocking함으로써 radical 생성이 불가능하게 된 결과일 가능성도 있다. 이와 같은 가능성을 배제하기 위하여 시료가 xanthine oxidase의 활성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). 결과에 나타난 바와 같이, 시료가 직접적으로 효소활성의 억제에 미치는 영향은 크지 않았다. 발아처리에 의하여 xanthine oxidase 활성에 대한 시료의 억제도는 거대배아미와 유색미에서 감소하였으나, 일반현미에서는 오히려 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과를

Table 4. Scavenging ability of rice extracts on hydroxyl radicals

Experiments		·OH scavenging (%)		Fe ²⁺ chelation (%)	
		0.5 mg/mL	5 mg/mL	0.5 mg/mL	5 mg/mL
Brown rice	Not-germinated	-4.955 ± 2.265 ^c	3.703 ± 2.567 ^d	-1.575 ± 0.009 ^{bc}	-2.179 ± 0.002 ^b
	Germinated	20.270 ± 7.246 ^{bc}	59.366 ± 2.665 ^c	-4.257 ± 0.634 ^d	-4.567 ± 0.758 ^d
Giant embryonic rice	Not-germinated	6.061 ± 1.430 ^d	61.485 ± 5.161 ^c	-2.577 ± 0.136 ^{cd}	-2.996 ± 0.187 ^c
	Germinated	17.402 ± 0.196 ^c	83.035 ± 0.624 ^{ab}	1.317 ± 0.034 ^a	0.918 ± 0.015 ^a
Pigmented rice	Not-germinated	26.153 ± 0.230 ^b	76.166 ± 2.073 ^b	-2.949 ± 1.247 ^{cd}	-3.106 ± 0.589 ^c
	Germinated	44.151 ± 5.162 ^a	84.397 ± 0.339 ^a	-0.485 ± 0.008 ^b	0.869 ± 0.013 ^a

Results are expressed as means ± SD (n=3).

Values not sharing common superscript letter were significantly different at $p < 0.05$.

Table 5. Scavenging ability of rice extracts on ROS generated in HL-60 cells

Experiments		ROS scavenging (%)		
		40 µg/mL	80 µg/mL	120 µg/mL
Normal rice	Not-germinated	28.58 ± 4.03 ^{bc}	33.40 ± 6.07 ^d	83.90 ± 7.29 ^c
	Germinated	24.00 ± 3.54 ^c	27.08 ± 3.31 ^d	91.10 ± 2.45 ^{bc}
Giant embryonic rice	Not-germinated	30.62 ± 2.95 ^{bc}	48.01 ± 3.12 ^c	85.48 ± 6.54 ^c
	Germinated	44.18 ± 4.21 ^a	65.61 ± 4.61 ^b	99.01 ± 6.93 ^{ab}
Pigmented rice	Not-germinated	33.91 ± 4.25 ^b	53.10 ± 1.81 ^c	90.62 ± 4.81 ^{bc}
	Germinated	34.72 ± 4.25 ^{ab}	88.03 ± 6.51 ^a	101.53 ± 2.50 ^a

Results are expressed as means ± SD (n=3).

Values not sharing common superscript letter were significantly different at $p < 0.05$.

불 때, 거대배아미와 유색미의 superoxide radical 소거활성이 부분적으로는 시료에 의한 xanthine oxidase 활성 억제 때문에 일어났음을 부인할 수 없지만, 직접적인 radical 소거가 더 중요한 요인임을 암시하였다. 또한, 발아, 또는 무발아 일반현미의 superoxide radical 소거활성과 xanthine oxidase 활성 억제능을 볼 때, 일반현미는 두 가지 특수미 품종과는 다른 작용을 통하여 superoxide radical을 소거할 가능성이 시사되었다.

Hydroxyl radical (·OH) 소거활성

생체에서 발생하는 활성산소종 중에서 산화적 손상에 관여된 가장 유해한 라디칼이 hydroxyl radical이기 때문에, 시료의 hydroxyl radical에 대한 소거활성을 평가하였다. 본 실험에서는 hydrogen peroxide와 Fe²⁺의 존재 하에서 hydroxyl radical이 발생하는 Fenton반응을 이용하여 실험을 수행하였다. 위에서 기술한 것과 같은 과정으로 반감기가 짧은 hydroxyl radical을 DMPO와 반응시켜 생성된 DMPO-OH adduct를 ESR spectrometry로 측정함으로써 가장 직접적인 실험방법에 의거하여 hydroxyl radical의 상대적인 수준을 정량하였다. Table 4에 나타난 실험 결과와 같이, hydroxyl radical 소거활성도 역시 시료 농도의 증가와 더불어 증가하였다. 그리고 지금까지 기술한 산화화 활성 및 라디칼 소거활성의 경우와 비슷하게 발아처리에 의하여 시료의 소거활성은 모든 경우에서 증가하는 경향을 보였다. 발아 처리에 의한 시료의 활성 증가율은 일반현미가 가장 높았으나, 발아 처리된 쌀의 전체적인 소거활성은 5 mg/mL에서 유색미 > 거대배아미 > 일반현미의 순서로 나타났다. 본 실험에서는 Fenton 반응을 이용하여 hydroxyl radical을 생성하였기 때문에, 실험에서 측정된 hydroxyl radical 소거효과활성이 직접적인 radical에 대한 소거작용의 결과인지, 또는 Fenton반응에서 핵심적인 역할을 하는 Fe²⁺를 시료가 포획한 결과인지에 대한 답을 얻기

위하여 시료의 Fe²⁺ 포획능을 측정하였다(Table 4). 실험 결과가 나타내듯이, 쌀 추출물에서 적극적으로 Fe 이온을 포획하는 능력을 검출할 수 없었다. 이 결과는 본 실험에 사용된 쌀 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 직접적인 radical quenching의 결과일 가능성을 강력하게 시사하였다.

세포 내 ROS 소거활성의 측정

이상의 실험을 통하여 *in vitro*의 실험계서 조사된 특수미의 산화화 활성이 살아있는 세포 내에서도 작용할 수 있는지 여부를 검토하기 위해서 이들 쌀 추출물이 세포 내에서 발생된 ROS를 소거할 수 있는지를 측정하였다. 이를 위하여 premyeloblastoma cell line인 HL-60 세포를 지시세포로 한 배양세포계서의 활성 산소종 소거활성을 측정하였다. HL-60은 DMSO 자극으로 호중구로 분화하며, 분화된 호중구계의 세포는 TPA의 자극으로 호흡폭발(respiratory burst)를 일으켜, superoxide radical이나 hydroxyl radical과 같은 다량의 ROS가 세포 내에 축적되는 것으로 알려져 있다. 이때, 세포 내에 도입된 DCFH-DA는 생성된 ROS와 산화반응을 일으켜 형광을 방출하게 되는데, 세포가 방출하는 형광을 flow cytometry로 측정함으로써, 간접적으로 세포 내 ROS의 수준을 정량할 수 있다(28). 이 실험계를 사용하여 각 쌀 추출물의 ROS 소거활성을 측정된 결과가 Table 5이다. 쌀 추출물을 농도 별로 첨가하였을 때, 발아 처리한 일반현미를 제외하고는 ROS 소거활성은 농도 증가에 따라 증가하는 경향이 있었고 120 µg/mL의 농도에서 활성은 포화상태에 도달하였다. 일반미를 포함한 모든 쌀이 발아 처리에 의하여 ROS 소거활성이 증가한다는 사실을 알았으며, 발아 처리와 관계없이 ROS 소거활성은 유색미 > 거대배아미 > 일반현미의 순서를 보였다. 그러나 특수미인 거대배아미와 유색미는 모든 시료 농도에서 발아에 의하여 ROS 소거활성이 유의하게 증가한

Table 6. Cytotoxic effect of rice extracts on the growth of HL-60 cells

Experiments		Cell viability (%)		
		40 µg/mL	80 µg/mL	120 µg/mL
Normal rice	Not-germinated	65.18	74.22	70.18
	Germinated	59.72	26.18	27.53
Giant embryonic rice	Not-germinated	50.54	36.10	30.03
	Germinated	59.78	85.90	65.79
Pigmented rice	Not-germinated	83.94	95.01	90.96
	Germinated	62.28	111.98	119.50

Results are expressed as means ± SD (n=3).

다는 사실을 발견하였다. 시료 간 ROS 소거활성의 차이가 시료 처리로 인한 HL-60 세포의 사멸 때문일 가능성을 배제하기 위하여 MTT법에 의거, 시료의 독성을 조사하였다. Table 6의 실험 결과와 같이, 거대배아미와 유색미는 발아 처리에 의하여 세포의 생존율이 증가하는데 비하여, 일반미는 발아에 의하여 세포의 생존율이 현저하게 감소하였다(80 µg/mL에서 일반현미는 74.2%에서 26.2%로 감소). 전반적으로 발아 처리 조건에서 세포독성은 일반현미 > 거대배아미 > 유색미의 순서를 보였다. 본 실험에 사용된 DMSO로 자극한 HL-60 세포와 같이 일반적으로 분화된 세포는 사멸되기 쉬운 경향은 있으나, 발아 현미나 무발아 거대배아미 추출물에 사멸을 촉진시키는 인자가 있는지 여부를 구명하기 위해서는 보다 체계적인 연구가 요구되며, 특히 정상세포에 대한 세포독성의 유도여부를 판별하기 위해서는 primary cell이나 이와 유사한 세포주를 사용하여 검증할 필요가 있다.

이상의 실험을 통하여 우리는 일반적인 취반용 쌀로서 적합하지 않은 특수미인 거대배아미와 유색미의 생리활성을 항산화 활성을 중심으로 발아 및 무발아 조건에서 조사하였다. 현대 의학이 직면하고 있는 난치병 가운데 만성관절 류머티즘, 동맥경화증과 같은 질병이 사회 전반적인 산업화와 고령화 추세와 더불어 증가하기 때문에 최근 만성염증성 증식성 질환(CIPD; chronic inflammatory proliferative disease)이라는 독립된 카테고리 분류하여 다루고 있는 실정이다(35). 이 유형의 질병은 만성염증의 관여, 병리조직의 세포증식이라는 공통적인 패턴을 보이며, 기타의 난치병과 마찬가지로 예방이 질병의 통제에 유효하다고 알려져 있기 때문에, 특히 일상적인 식습관의 개선을 통한 예방이 고령화 사회에서 경제적인 예방책이 될 것으로 예상된다. 따라서 항산화 기능이 우수한 식품소재의 개발 및 일상적 섭취법의 개발은 중요한 의미를 갖게 될 것으로 본다. 이와 같은 의미에서 본 실험에서는 이미 육성된 쌀 품종 가운데 취반 목적으로 소비하기에는 부적합한 특수미를 건강 기능성 식품소재로 이용하기 위한 시도의 일환으로서 발아 처리한 특수미의 항산화 활성의 변화를 조사하였다. 그 결과, 발아 처리에 의하여 일반현미와 특수미인 거대배아미와 유색미 모두에서 활성산소종에 대한 소거활성이 *in vitro* 및 배양세포 계서 크게 증가되는 것이 관찰되었다. 본 실험의 결과, 특수미 중에서 거대배아미와 유색미는 발아 처리에 의하여 세포 내 ROS 소거활성이 증진될 뿐 아니라, 세포 독성도 낮아지기 때문에 기능성이나 독성의 측면에서 건강기능성 식품소재로 이용 가치가 높다고 하겠다.

요 약

발아에 의한 거대배아미와 유색미의 기능성 변화를 항산화 활성에 중점을 두고 조사하였다. 전반적으로 환원력은 일반현미보다 거대배아미와 유색미가 높았고, 발아처리는 환원력을 증가시키는 경향이 있었다. 지질과산화에 대한 억제효과를 조사한 결과, *in vitro*의 linoleic acid peroxidation system 및 *ex vivo*의 토끼 적혈구 막지질 과산화 system 모두에서 억제효과도 유색미가 가장 높았고, 그 다음이 거대배아미, 일반현미의 순서로 나타났다. Superoxide radical에 대한 소거활성은 유색미 > 거대배아미 > 일반현미의 순서로 낮아졌으며, 무발아 조건과 비교할 때 발아처리는 라디칼에 대한 소거활성을 증진시켰다. Hydroxyl radical 소거활성도 유색미가 가장 높았으며, 그 다음이 거대배아미, 일반현미의 순서였다. 발아에 의하여 일반현미의 hydroxyl radical 소거활성을 급격히 증가되었지만, 발아미 간에 소거활성의 순위는 변하지 않았다. *In vitro*에서 조사된 ROS 소거활성과 같은 경향이 HL-60 세포에서 TPA로 자극으로 발생된 ROS에 대한 소거활성에서도 나타났다. 실험 결과, 유색미와 거대배아미에서는 발아와 연관되어 세포독성의 증가가 발견되지 않는 차별적인 ROS 소거활성의 증가 현상이 발견되었다.

감사의 글

본 연구는 농림기술특정과제의 연구비 지원(과제번호: 201030-03-2-HD120)에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ramarathnam N, Osawa T, Namiki M, Kawakishi S. Chemical studies on novel antioxidants I. Isolation, fractionation and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* 36: 727-732 (1988)
- Ramarathnam N, Osawa T, Namiki M, Kawakishi S. Chemical studies on novel antioxidants II. Identification of isovitexin C-glycosyl flavonoid. *J. Agric. Food Chem.* 37: 316-319 (1989)
- Kang MY, Choi YH, Nam SH. Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen Mitomycin C. *Agri. Chem. Biotechnol.* 39: 424-429 (1996)
- Nam SH, Kang MY. *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agri. Chem. Biotechnol.* 40: 307-312 (1997)
- Choi SW, Nam SH, Choi HC. Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Sci. Biotechnol.* 5: 305-309 (1996)

6. Juliano BO. Rice-Chemistry and Technology. AACC Press, London, UK. pp. 295-311 (1985)
7. Cho BM, Yoon SK, Kim WJ. Changes in amino acid and fatty acids composition during germination of rapeseed. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 371-376 (1985)
8. Hsu D, Leung HK, Finney PL, Morad MM. Effect of germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils and faba beans. J. Food Sci. 45: 87-91 (1980)
9. Choi KS, Kim ZU. Changes in lipid components during germination of mungbean. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 271-275 (1985)
10. Colmenarse DRAS, Bressani R. Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. Cereal Chem. 67: 519-523 (1990)
11. Lee MH, Son HS, Choi OK, Oh SK, Kwon TB. Changes in physico-chemical properties and mineral contents during buckwheat germination. Korean J. Food Nutr. 7: 267-273 (1994)
12. Kim IS, Kwon TB, Oh SK. Study on the chemical change of general composition fatty acids and minerals of rapeseed during germination. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 371-376 (1985)
13. Ikeda K, Arioka K, Fujii S, Kusano T, Oku M. Effect on buckwheat protein quality of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. Cereal Chem. 61: 236-240 (1984)
14. Kim WJ, Kim NM, Sung HS. Effect of germination on phytic acid and soluble minerals in soymilk. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 358-362 (1984)
15. Ahn B, Yang CB. Effects of soaking, germination, incubation and autoclaving on phytic acid in seed. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 516-521 (1985)
16. Lee MH, Shin JC. New techniques for the cultivation of quality rice. pp. 239-263. In: Conference on Rediscovering Korea Rice and Development Direction. Korean Society of Rice Research, Seoul, Korea (1999)
17. Nakagawa K, Onota A. Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ. Food Proc. 31: 43-46 (1996)
18. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44: 301-315 (1986)
19. Osawa T, Namiki M. A novel type antioxidant isolated from leaf wax of Eukalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 45: 735-740 (1981)
20. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provide an antioxidant defense in human against oxidant-and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6858-6862 (1981)
21. Tsuda T, Horio F, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside increases *ex vivo* oxidation resistance of serum in rats. Lipids 33: 583-588 (1998)
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Chem. 72: 248-254 (1976)
23. Mitsuta K, Mizuta Y, Kohno M, Hiramatsu M. The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63: 187-190 (1990)
24. Noro T, Noro K, Miyase T, Koyanagi M, Umehara K, Ueno A, Fukushima S. Inhibition of xanthine oxidase by anthraquinones. Chem. Pharm. Bull. 35: 4314-4316 (1987)
25. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc. 65: 899-910 (1894)
26. Rosen GM, Rauckman EJ. Spin trapping of free radicals during hepatic microsomal lipid peroxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7346-7349 (1981)
27. Carter P. Spectrometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (Ferrozine). Anal. Chem. 40: 450-458 (1971)
28. Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. J. Agric. Food Chem. 48: 2736-2743 (2000)
29. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. J. Immunol. 130: 1910-1917 (1983)
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. J. Immunol. Meth. 65: 55-63 (1983)
31. Choi SW, Kang WW, Osawa T. Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. Foods Biotechnol. 3: 131-135 (1994)
32. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Kawakishi S, Choi SW, Osawa T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. J. Agric. Food Chem. 42: 2407-2411 (1994)
33. Yamauchi R, Miyate N, Kato K, Ueno Y. Reaction of α -tocopherol with alkyl and alkylperoxy radicals of methyl linoleate. Lipids 28: 201-206 (1993)
34. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. Science 221: 1256-1264 (1983)
35. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. Cytokine Growth Factor Rev. 13: 357-368 (2002)

(2004년 2월 20일 접수; 2004년 6월 16일 채택)