

## 흑미의 종자 발달에 따른 색소발현 양상

이점식\* · 장재기\* · 천아름\* · 정명근\*\*\* · 김혜원\* · 오세관\* · 이정희\* · 윤미라\* · 김대중\* · 송유천\*\*†

\*농촌진흥청 국립식량과학원, \*\*농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부, \*\*\*강원대학교 생약자원개발학과

## Expression of Pigments in Black Rice during Kernel Development

Jeom-Sig Lee\*, Jae-Ki Jang\*, Areum Chun\*, Myoung-Gun Choung\*\*\*, Hye Won Kim\*, Sea-Kwan Oh\*,  
Jeong-Heui Lee\*, Mi-Ra Yoon\*, Dae-Jung Kim\*, and You-Chun Song\*\*†

\*Rice Research Division, NICS, RDA, Suwon 441-857, Korea

\*\*Dept. of Functional Crop, NICS, RDA, Gyeongnam 627-803, Korea

\*\*\*Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea

**ABSTRACT** In this study we examined the changes in expression of pigments in black rice during kernel development, which were sampled at 2~3-day intervals to the 40th day after flowering. The first expression of pigment on kernels was observed on the seed coat about 5 days after flowering. At that times, the ratio of pigment expression was 0.08% of total area. The order in expression of pigments in black rice during kernel development was top first, followed by bottom, dorsal side, then ventral side. Maximum percentage of the total colored area in kernel was about 25 days after flowering. After that, the color has changed to dark purple from pale purple during kernel development after flowering. After harvesting, the non-uniform color kernels were observed. As a result, the ventral side in a kernel was a position of the non-uniform color such as a mixture of pale purple and dark purple. Also, we could be concluded that patten of pigment expression was similar in kernel development.

**Keywords** : pigments, black rice, grain development, anthocyanin

**검정** 쌀은 일반 쌀과 다르게 현미의 과피와 종피 부분에 흑자색의 안토시아닌계 색소를 함유한 것이다. 이러한 안토시아닌 색소의 중요한 성질은 항산화작용이며, 항산화활성이 높아 암, 당뇨 등의 예방에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Osawa, 1995, Wang *et al.*, 1997). 벼 등의 식물에서 추출한 안토시아닌은 생활수준의 향상과 건강에 대한 관심증대에 따라 합성색소를 대체하기 위한 천연색소로

써 식품에 이용과 수용성물질과 쉽게 결합하는 성질로 인해 산업적 사용의 괄목한 증가를 예상하고 있다(Araceli, 2009). 이러한 효과로 인해 흑미를 일반 쌀과 혼식, 발아현미 등으로 판매되고 있으나, 소비자의 요구는 외관상으로 균일하게 짙은 검은색을 띠는 것을 선호한다. 그러나 동일한 품종임에도 불구하고 흑자색이 짙은 것과 연한 것이 섞여 있어 흑미가 소비자로부터 외면 받는 주요한 요인인 되기도 한다. 흑미를 천연 기능성식품이나 산업적 소재로 이용을 확대시키기 위해서는 유전적으로 색소 함량을 많이 생성하는 품종을 생리 생태적 특성에 맞게 재배 하는 것이 중요하다.

그 동안 흑미의 색소와 관련된 조성, 유전, 재배법에 대한 연구결과를 살펴보면, 색소의 조성은 cyanidin 3-glucoside(C3G), peonidin 3-glucoside(P3G), malvidin 3-galactoside(M3G) 등이며, 그 중에서 전체 색소의 80%정도가 C3G라고 하였다(Nagai *et al.*, 1960; Lee, 1997, Lee, 2010, Ryu *et al.*, 1998). 이러한 색소발현의 유전적 근거는 화청색소유전자(C)와 활성유전자(A) 및 자색염분포유전자(PI<sup>w</sup>)의 상호작용에 의한 것으로 알려져 있다(Nagai *et al.*, 1960, Park *et al.*, 2000).

색소의 함량을 높이기 위해 재배적인 방법으로 시비량 조절에 관한 연구(Park *et al.*, 2000)가 이루어져 왔으며, 이양 시기나, 재배지역을 달리하여 연구된 결과에 따르면 동일한 품종임에도 불구하고 2배 이상의 C3G 함량의 차이를 보고하였고, 이양 시기 간에는 늦을수록 높았고, 지역 간에는 등숙 기간 중의 평균기온이 낮고, 일사량이 많은 지역에서 높았다(Kim *et al.*, 1998. Ryu *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2008). 이와 같이 재배법에 의해 흑미 색소함량의 차이에 대해 온

†Corresponding author: (Phone) +82-55-350-1165 (E-mail) songyc@rda.go.kr

<Received 14 April, 2012; Revised 3 June, 2012; Accepted 12 June, 2012>

도, 일사량, 시비량에 대해서는 많은 연구가 되어왔다.

그러나, 동일한 흑미 품종임에도 불구하고, 외관상으로 개별 종자 간에 색깔이 짙은 종자와 연한 종자가 있었으며, 한 알의 종자(kernel) 내에서도 어떤 부위는 짙은 흑자색을, 또 다른 부위는 연한 자색을 띠는 색소발현 현상에 대한 세부적인 연구결과는 보고된 바가 없다. 그래서 본 연구는 개화 후 일수별 흑미의 종자 발달에 따른 색소발현 현상을 조사하여 품종육성 및 재배법 확립을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험의 목적인 흑미의 종자 내 혹은 종자 간의 색소가 불균일하게 발현하는 현상을 정밀하게 조사하기 위해 첫째, 흑미품종의 고유특성이 종자의 외형적 색소발현의 균일도가 높고 둘째, 색소함량이 많으며 셋째, 색소 형성과정을 관찰하기에 현미의 길이가 짧은 것보다는 긴 장립이 유리함을 고려하여 중국산인 한산흑미를 실험재료로 선정한 결과는 Table 1과 같다. 재배는 밀양에서 30일 묘를 5월 30일에 이양하여 실험재료로 이용하였다.

### Cyanidin-3-Glucoside(C3G) 분석

흑미의 C3G 함량 분석은 100 ml volumetric 플라스크

에 현미가루 0.4 g을 넣은 후 0.1% HCL-80% MeOH 용액을 10 ml씩 가하여 4℃에서 1,000 rpm으로 원심분리 후 주사기에 부착된 0.45  $\mu$ m syringe filter를 이용하여 부피를 맞췄다. 실험에 사용된 표준물질인 C3G는 Choung *et al.*,(2001)의 방법에 따라 순수 분리된 표준물질을 분양받아 분석하였으며, HPLC 작업 조건은 Table 2와 같다.

### 색소발현 조사

개화 후 2~3일부터 수확기 까지 종자별 색소의 발현 여부와 종자의 길이와 너비인 외형발달을 조사하였다. 색소 발현 비율과 종자의 외형발달은 현미경으로 17배 확대하여 사진 촬영 후 촬영된 사진을 프린터 하여 색소발현 부분과 색소가 없는 부분으로 나누어 엽 면적측정기(Model LI-3100, USA)로 단면적에 대한 색소발현 면적의 비율로 계산 하였다. 또한, 개별 종자의 길이와 너비도 동일한 방법으로 측정 하였다. 매 조사 시기별 대상 종자는 이삭을 1/3로 구분하여 중간 부분에 해당하는 이삭 내 1차 지경에 해당하는 종자를 대상으로 반복 당 10립씩 총 30립을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 종자의 최초 색소발현 부위

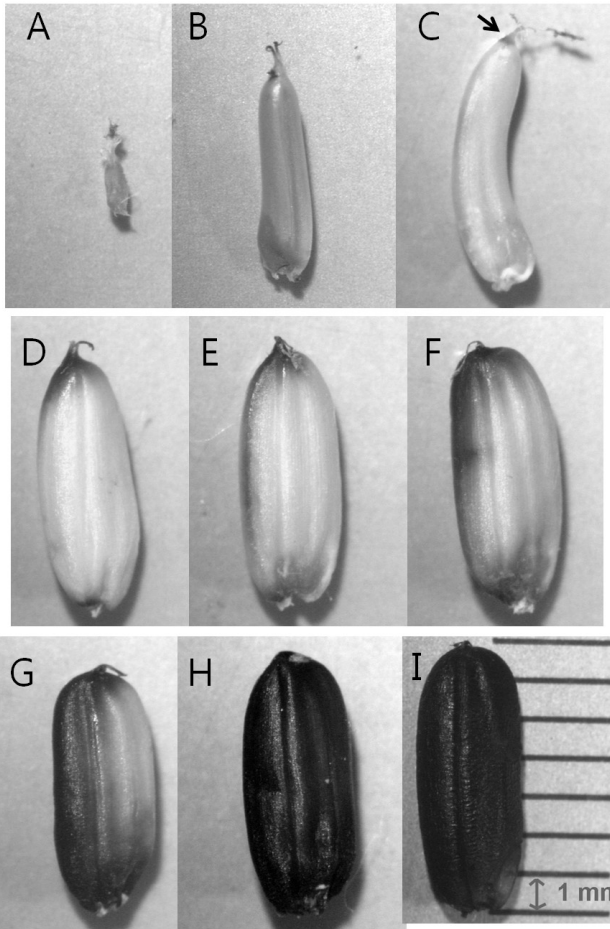
개화 후 5일경에 종자의 정단(top)에서 연한 적자색을 처음 관찰 할 수 있었으며, 이때 색소가 발현된 정도는 종자의

**Table 1.** Hansanheugmi and ranges low and high value of physicochemical properties in blackish purple brown rice(n=40).

Property	Hansanheugmi	Low (variety name)	High (variety name)
Uniformity of colored kernel (1-9)	9	1 (Yeonongheug 1)	9 (Hansanheugmi)
C3G content (mg/100g)	530	102 (Yeonongheug 1)	1,250 (Perurutung)
Ratio of length/width of brown rice	2.82	1.77 (Yeonongheug 1)	2.82 (Hansanheugmi)

**Table 2.** HPLC operation condition for the analysis of cyanidin-3-glucoside.

HPLC	HITACH CO.
Colum	TSK-GEL ODS-120T(150×4.6 mm i.d., Japan)
Detector	UV 530 nm
Sensitive	0.05 AUFS
Mobil phase	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH:HCOOH=7:2.5:0.5(v/v/v)
Flow rate	0.7 mL/min
Chart speed	2.5 cm/min



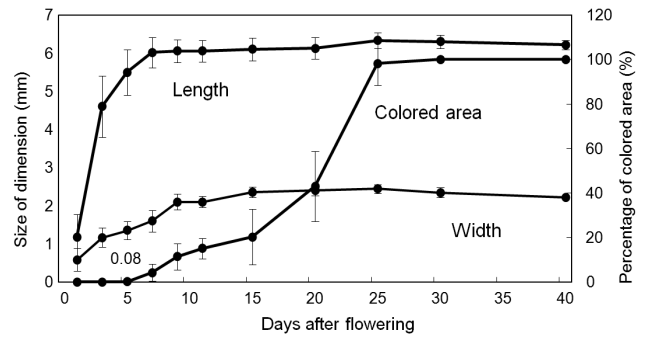
**Fig. 1.** Changes in expression of pigments in blackish purple rice during kernel development.  
 a : 1 day after flowering, b : 3 DAF, c : 5 DAF,  
 d : 7 DAF, e : 9 DAF, f : 11 DAF,  
 g : 15 DAF, h : 30 DAF, I : 40 DAF

총 단면적 대비 0.08%였다(Fig. 1의 C). 흑미에서 종자의 발달단계에 따라 색소가 처음 발현하는 시기와 어느 부위에서 발현하는지에 대한 선행연구 결과는 보고된 바 없다. 반면, 검정콩에서 개화 후 35일 경에 안토시아닌 색소(C3G)가 발현되었다는 보고는 있다(Yi *et al.*, 2010).

**종자의 색소발현 순서**

흑미의 개화 후부터 성숙기까지 안토시아닌 색소발현의 순서를 관찰한 결과(Fig. 1), 최초 종자의 정단(top)에서 발현되었고, 두 번째는 기부(bottom)에서, 그리고 배면(dorsal side)에서 나타난 색소가 마지막에는 복면(ventral side)으로 색소가 흘러 내려가는 형태로 발현 되었다(Fig. 1의 C-I).

그리고, 개화 후 25일 경에는 총 30립을 조사한 결과 29립인 97%에서 발현하여 종자 전체에서 색소가 발현된 시점



**Fig. 2.** Changes in dimension of grain filling and percentage of colored area in blackish purple rice kernel during days after flowering.

으로 간주하였다. 종자의 색소 발현 비율이 급격히 증가하는 시기는 개화 후 15일 부터 25일경이었으며, 종자 내 적자색 색소가 흑자색으로 윤기가 나면서 진하게 되는 시기는 개화 후 25일에서 40일경 이었다(Fig. 1, Table 2). 따라서 개화 후 15일 부터 25일경에는 색소의 발현 정도를 결정하는 시기이며, 색소의 농도에 영향을 미치는 시기는 주로 개화 후 25일 이후라고 생각된다.

Hoshikawa(1989)는 일반 종자의 외형발달을 조사한 결과, 길이는 5~6일 이후, 너비는 15~16일 경, 두께는 20~25일에 외형적 종자의 크기가 완료된다고 하였다. 이후부터는 종자의 두께가 주로 충실해지는 시기라고 하였다. 그리고 종자의 외형발달은 길이, 너비, 두께 순이라고 하였다.

본 실험에서 수확 한 흑미의 색소와 외형발달이 95%이상으로 완료되는 개화 후 일수는 색소발현은 25일경, 현미 길이는 7일경, 너비는 11일 경이었다. 따라서 흑미의 색소 발현순서는 종자의 길이와 관련된 정단에서 기부로 너비와 두께와 관련된 배면에서 복면으로 발현되는 것을 고려 할 때 일반 쌀 종자의 외형발달 순서와 동일한 형태로 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 종자 전체에 색소가 발현되는 개화 후 25일경은 종자의 두께가 전장에 도달하는 시기와의 유사하였다.

**종자의 색소발현이 불균일한 부위**

수확 후 가시적인 종자 간 및 종자 내 색소발현이 불균일한 것을 골라 관찰한 결과, 종자 내 복면부분이 다른 부위에 비해 상대적으로 연한 적자색을 띠었다(Fig. 1).

이러한 현상은 앞에서 언급한 색소발현의 순서로 볼 때 복면부분이 마지막에 색소가 발현된 부위로, 색소발현 중에 종자 간 양분경쟁 이나, 온도, 일사량 등의 환경조건에 상대적으로 더 많은 영향을 받을 수 있기 때문인 것으로 생각되

었다. 이러한 현상에 대한 선행 연구결과가 보고된 바가 없어, 일반 쌀 종자의 발달과정에서 온도, 양분, 일사량 등 환경조건이 불량한 경우 마지막에 발달하는 종자의 두께가 가장 많은 영향을 받아 두께가 얇아지거나, 또는 종자의 천립중이 가벼워져 결국은 수량감소로 이어진다고 알려져 있다 (Hoshikawa, 1989, Kim *et al.*, 2009, Ko *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 1984).

이상의 결과로 볼 때, 색소발현이 불균일한 종자 내에서 복면부분이 정단, 배면 등 다른 부위에 비하여 연한 적자색을 띠는 것은 색소발현 순서로 볼 때, 마지막에 색소가 발현하는데 기인된 결과라고 생각된다. 따라서 색소발현 중에 양분공급이나, 온도, 일사량 등 환경조건이 불량한 경우에 이러한 현상들이 더 많이 발생 할 수 있음을 추론 할 수 있다.

향후, 추가적인 연구로는 안토시아닌 색소의 종류가 C3G, P3G, M3G 등 이라고 밝혀져 있다(Nagai *et al.*, 1960; Lee, 2010, Ryu *et al.*, 1998). 이 중에서 색소발현 순서가 분자량이 적고 안토시아닌 합성이 빠른 것을 고려 할 때 C3G > P3G > M3G 순인지, 혹은 동시에 발현되는 지 여부에 대한 구명이 필요 할 것이다. 이를 통해 색소 종류별로 발현 순서가 다르다면, 먼저 발현되는 색소의 조성 비율이 높거나, 단일 색소를 발현하는 품종인 경우에는 환경적 요인에 의한 색소의 불균일한 발현을 줄이는데 더 유리할 것 같다.

## 적 요

본 연구는 흑미의 종자 발달에 따른 색소발현 현상을 조사하여 품종육성 및 재배법의 기초자료를 제공하기 위해 최초 어느 시기에 색소가 발현하고, 이러한 색소의 발현순서와 종자 내에서 색깔의 차이가 나타나는 부위에 대해 시험한 결과는 다음과 같다.

최초 색소발현은 개화 후 5일경에 종자의 정단에서 연한 적자색을 관찰 하였으며, 이때 색소가 발현된 정도는 종자의 총 단면적 대비 0.08%였다.

색소발현 순서는 종자의 정단에서 기부로, 그리고 배면에서 마지막에는 복면 순이었으며, 색소가 종자 전체에 발현된 시점은 개화 후 25일 경이었다. 그 이후는 색이 적자색에서 흑자색으로 진해지는 시기였다.

수확 후 가시적인 종자 간 및 종자 내 색소발현이 불균일한 것을 골라 조사한 결과, 종자 내 복면부위가 다른 부위에 비해 상대적으로 연한 적자색을 띠었으며, 종자의 색소발현이 불균일한 부위는 복면 부위였다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ9069502012)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Araceli C. O. 2009. Chemical studies of anthocyanins : A review. Food. Chemistry. 113 : 859-871.
- Choung, M. G., I. Y. Baek, S. T. Kang, W. Y. Han, D. C. Shin, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max (L.) Merr.*). J. Agric. Food Chem. 49 : 5845-5851.
- Hoshikawa, K. 1989. The growing rice plant : An anatomical monograph. Noubunkyo Tokyo : 1-350.
- Kim, C. K., C. Y. Kim, J. I. Lee, J. C. Shin, and M. H. Lee. 1998. Effect of transplanting dates and nitrogen fertilizer levels on the dry matter production and yields of a pigmented rice 'Heugjinjubyeo'. RDA. J. Agro-Envir. Sci. 40(2) : 48-55.
- Kim D. S., J. S. Kim, J. I. Le , A. Chun, E. G. Jeong, J. T. Kim, O. S. Hur, S. L. Kim, and S. J. Suh, 2009. Rice quality characterization according to damaged low temperature in rice plant. Korean J. Crop Sci., 54(4) : 452-457.
- Ko. J. K. 1997. Characteristics of grain quality at different transplanting times among rice cultivars. I. variation of heading and yield related characteristics. Korean J. Crop Sci., 10(4) : 386-391.
- Lee, H. J. 1997. Identification of anthocyanin from pigmented rice seeds. Seoul National University(Master's thesis). 1-74.
- Lee, H. L. 2010. Identification and quantification of anthocyanins from the grains of black rice(*Oryza sativa L.*) varieties. Food Sci. Biotechnol. 19(2) : 391-397.
- Lee, Y. S., J. K. Lee, S. Y. Lee, T. Yun, and S. H. Woo. 2008. Effects of different transplanting dates and agroclimatic zones on quality of brown rice and yield of a pigmented rice variety 'Josaengheugchal'. Korean J. Crop Sci, 53(S) : 9-14.
- Nagai, I. G., G. Suzushino, and Y. Tsuboki. 1960. Anthoxanthins and anthocyanins in *Oryzaceae*. Jpn. J. Breed 10(4) : 47-56.
- Osawa T. 1995. Antioxidative defense systems present in higher plant, and chemistry and function of antioxidative components. Food and Food Ingredients J. of Jpn. 1963 : 19-29.
- Park, S. Z., H. Y. Kim, S. J. Han, and S. N. Ryu. 2000. Cyanidin -3-glucoside content in F1, F2 and F3 grains of pigmented rice Heugjinjubyeo crosses. Korean J. Breed. 32(3) : 285-290.
- Ryu, S. N., S. Z. Park, and C. T. Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments

- in some varieties of black rice. *Journal of Food and Drug analysis* 6(4) : 729-736.
- Ryu, S. N., H. Y. Kim, S. Z. Park, S. J. Han, and B. I. Ku. 2002. Environmental variation of C3G content in Heugjinjubyeo. *Korean J. Breed. Suppl.* 2. p. 125.
- Wang H, G. Gao, and Prior R. L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanin. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 3.4-309.
- Yang S. J., H. G. Hwang, and J. K. Sohn. 1984. Studies on the yield potential increment by grain weight in rice. *Korean J. Crop Sci.*, 29(2) : 109-113.
- Yi, E. S., Y. H. Kim. 2010. Changes of anthocyanin contents during maturity stages in black soybean. *Korean J. Crop Sci.*, 55(1) : 19-23.