

## 왕겨에서 Tricin과 Tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) Ether(TTGE) 추출 조건의 최적화

- 연구노트 -

윤나라 · 이상훈 · 장귀영 · 이윤정 · Li Meishan · 김민영 · 이준수 · 정헌상  
충북대학교 식품생명공학과

### Optimum Extraction of Tricin and Tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) Ether (TTGE) from Rice Hull (*Oryza sativa* L.)

Nara Yoon, Sang Hoon Lee, Gwi Yeong Jang, Yoon Jeong Lee, Meishan Li,  
Min Young Kim, Junsoo Lee, and Heon Sang Jeong

Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

**ABSTRACT** This study was conducted to evaluate the effects of extraction conditions on tricin and tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE) extracted from rice hull (*Oryza sativa* L.). Extraction conditions were an ethanol concentration of extraction solvent of 50~90%, extraction time of 0.5~48 h, and ultrasonic-assisted and agitated extraction as extraction methods. The total tricin and TTGE contents of rice hull were 82.20 μg/g and 53.12 μg/g, respectively. Recovery of tricin and TTGE increased to 76.11% and 71.42% with increasing ethanol concentration until 70% and then decreased above 80%, respectively. In ultrasonic-assisted extraction, highest recovery of tricin was 83.30% after 2 h of extraction and TTGE was 71.80% after 1 h of extraction. In agitated extraction, highest recovery of tricin was 92.34% after 48 h and TTGE was 76.89% after 24 h of extraction. Therefore, optimum extraction conditions for tricin and TTGE of rice hull were 70% ethanol concentration and ultrasonic-assisted extraction for 1 h.

**Key words:** rice hull, tricin, tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether, extraction condition

## 서 론

한국을 비롯한 아시아, 남미, 아프리카의 국가들은 쌀을 주식으로 하고 있으며, 벼를 쌀로 가공하는 과정에서 왕겨, 벼질, 미강 등이 부산물로 생산된다(1,2). 우리나라에서는 연간 100만 톤 이상의 왕겨가 생산되며, 품종마다 차이가 있으나 벼의 약 18~20%를 차지한다(3). 왕겨는 동물사료, 퇴비, 연료용 등 대부분 부가가치가 낮은 소재로 이용되고 있고 썩지 않는 특성 때문에 부산물이 아닌 폐기물로 분류해서 관리되고 있으며 매년 45만 톤 정도가 소각 또는 폐기되고 있는 실정이다(4,5).

왕겨에 함유된 천연 항산화 성분으로는 flavonoid, cyanidin, phytic acid, ferulic acid, vanillin, syringaldehyde 등이 있다고 알려져 있다(6,7). 그중 대표적인 생리활성물질로 flavonoid인 tricin과 flavonolignan인 tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether(TTGE)는 벼과 식물인 *Oryza sativa* L.로부터 분리 동정된 물질로 강력한 항암,

항염 및 항산화 활성 등을 가지고 있다(8). Tricin은 미강뿐만 아니라 밀, 보리, 옥수수과 같은 초종에서 glycosidic 형태로 존재하는데 안정성이 높아 암 예방제로 임상적 개발을 고려하고 있으며, 잠재적 암 예방제의 역할에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(9). 또한 TTGE는 고대 인도 의학(Ayurveda)에서 추천된 많은 약효 성분들 중 하나로 특별한 쌀 품종인 Njavara로부터 분리되었다(10). Njavara는 관절염, 신경계 질환, 마비, 결핵, 피부 질환 등의 치료제로 사용되어 왔으며, 최근 연구에서도 항염 활성, 활성산소종 및 NO 생성 억제 등의 다양한 생리활성을 나타내는 연구들이 진행되고 있다(10,11).

그러나 왕겨에 함유된 tricin과 TTGE는 미량일 뿐만 아니라 왕겨의 구조적 특성상 추출이 까다롭기 때문에 기능성 소재로 사용하기 위한 분리가 어려운 실정이다(12). 따라서 본 연구에서는 왕겨를 기능성 소재로 활용할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 왕겨에 함유된 tricin과 TTGE의 함량을 확인하고, 산업적으로 사용할 수 있는 추출조건을 확립하기 위하여 추출용매의 농도, 추출방법 및 추출시간을 달리하여 이들 조건에 따른 tricin과 TTGE의 함량을 살펴보았다.

Received 19 August 2015; Accepted 23 September 2015

Corresponding author: Heon Sang Jeong, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea

E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2570

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 벼는 2014년에 충북 증평군에서 재배 생산된 일반 벼인 일품벼(*Oryza sativa* L. var Ilpumbyeo)를 구매하여 사용하였으며, 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨 층을 분리하였다. 분리된 왕겨는 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swiss)를 이용하여 80 mesh의 크기로 분쇄한 후 사용하였다.

### 왕겨의 tricin과 TTGE 함량 분석

왕겨 중의 tricin 함량을 살펴보기 위하여 Mohanlal 등(10)의 방법을 변형하여 추출하였다. 즉 분쇄한 왕겨 5 g을 Soxhlet 추출방법을 이용하여 16시간 동안 탈지한 후 메탄올을 100 mL로 3회 초음파 추출하였다. 추출액을 여과(Filter paper no. 4, Whatman, Buckinghamshire, UK)한 다음 농축하여 물 25 mL로 정용하고 디에틸에테르로 50 mL씩 3회 추출한 다음 분석용 시료로 사용하였다. 또한 TTGE 함량은 분쇄한 왕겨 5 g을 70% 에탄올로 3회 추출한 후 농축하여 물 25 mL로 정용하고 석유에테르 50 mL로 3회 탈지 후 클로로포름 50 mL로 3회 추출한 다음 분석용 시료로 사용하였다(13).

### 추출용매 농도별 추출물 제조

Tricin 및 TTGE의 추출에 미치는 추출용매 농도의 영향을 살펴보기 위하여 에탄올 농도를 50, 60, 70, 80 및 90%로 조절한 다음 왕겨의 20배량을 첨가하고 1시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 추출물은 여과 및 농축한 후 5 mL로 정용하여 헥산으로 탈지하고, 클로로포름으로 분획한 다음 농축하여 HPLC로 분석하였다.

### 추출 방법 및 시간별 추출물 제조

Tricin 및 TTGE의 추출에 미치는 추출 방법 및 시간의 영향을 살펴보기 위하여 왕겨에 70% 에탄올 20배량을 첨가하고 shaking water bath(JSSB 30-T, JSR, Gongju, Korea)를 이용하여 150 rpm에서 0.5, 1, 2, 6, 12, 24 및 48시간 동안 3회 교반 추출하였으며, 다른 방법으로는 초음파 추출기(Ultrasonic Cleaner SD-350H, Seong Dong, Seoul, Korea)를 이용하여 추출기 내에 시료를 담은 튜브가 잠길 정도로 물을 채운 뒤 튜브를 랙에 고정하여 40 kHz로 0.5, 1 및 2시간별로 각각 3회 추출하였으며, 추출시간 동안 연속으로 초음파로 처리하였다. 추출물은 여과 및 농축한 후 5 mL로 정용하여 헥산으로 탈지하고, 클로로포름으로 분획한 다음 농축하여 HPLC로 분석하였다.

### Tricin 함량 측정

추출방법별 시료를 HPLC용 메탄올에 용해한 다음 0.2

µm syringe filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 HPLC(ACME 9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하였다. 분석조건으로 이동상은 아세트니트릴(A)과 1% 아세트산(B)을 gradient 조건으로 흘려주었고, gradient 조건은 A : B를 초기 15:85(% V/V)에서 25분에 40:60, 60분에 15:85로 설정하였으며, 유속은 1 mL/min으로 하였고, 주입량은 20 µL로 설정하였다. 검출기는 UV 330 nm에서 검출하였으며, 칼럼은 Mightysil RP-18 GP column(4.6×250 mm)을 사용하였다(9).

### TTGE 함량 측정

추출방법별 시료를 HPLC용 메탄올에 용해한 다음 0.2 µm syringe filter(Millipore)로 여과하여 HPLC(ACME 9000 system)로 분석하였다. 분석조건으로 이동상은 아세트니트릴(A)과 물(B)을 gradient 조건으로 흘려주었고, gradient 조건은 A : B를 초기 70:30(% V/V)에서 30분에 50:50, 40분에 0:100, 50분에 70:30으로 설정하였으며, 유속은 0.6 mL/min으로 하였고 주입량은 20 µL로 설정하였다. 검출기는 UV 206 nm에서 검출하였으며, 칼럼은 Mightysil RP-18 GP column(4.6×250 mm)을 사용하였다(13).

### 통계 처리

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 왕겨의 tricin 및 TTGE 함량

왕겨의 tricin과 TTGE 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같이 tricin 함량은 82.20 µg/g이었으며, TTGE 함량은 53.11 µg/g이었다. Mohanlal 등(10)은 Njavara, Sujatha 및 Palakkadam의 3가지 품종의 벼에 대한 미강 중의 tricin 함량이 각각 1,930.50, 48.60 및 119.80 µg/g이었으며, TTGE는 Njavara에서는 646.20 µg/g 그리고 Sujatha에서는 27.10 µg/g이었지만 Palakkadam에서는 검출되지 않았다고 하였다. 또한 Kim 등(14)은 국내산 품종인 Ilpumbyeo의 TTGE 함량이 16.35 µg/g이었다고 보고하였다. 왕겨에서의 tricin과 TTGE에 관한 연구는 찾아보기 어려워 직접적인 비교가 어려웠으나 벼의 품종에 따라 tricin과 TTGE의 함량에는 많은 차이가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에

**Table 1.** Total tricin and tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether (TTGE) contents of rice hull

Tricin (µg/g)	TTGE (µg/g)
82.2±3.3	53.1±1.1

Mean±SD of triplicate determination.

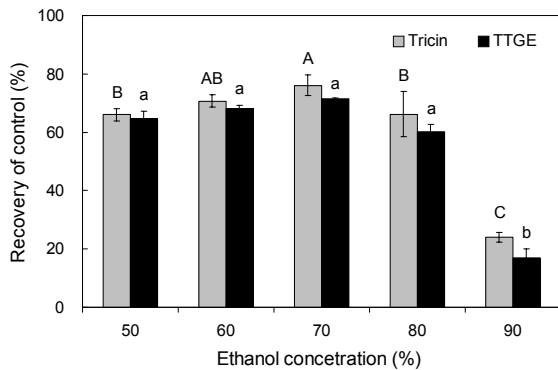
서는 tricin과 TTGE의 기능성 식품 소재 및 적용 가능성을 고려하여 추출용매인 에탄올의 농도, 추출 방법 및 시간에 따른 추출율을 살펴보았다.

**추출용매 농도의 영향**

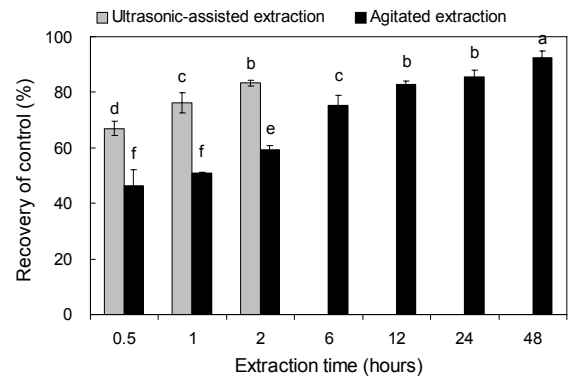
추출용매의 농도가 tricin 및 TTGE 추출에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 에탄올 농도를 50, 60, 70, 80 및 90%로 조절한 후 추출한 결과는 Fig. 1과 같다. Tricin은 에탄올 농도에 따라 원료 함량에 대해 각각 66.03, 70.70, 76.11, 66.16 및 23.99%의 회수율을 나타내었고 70% 에탄올에서 가장 높은 회수율을 나타내었으며, TTGE는 각각 64.56, 68.14, 71.42, 60.29 및 16.84%로 70% 에탄올에서 가장 높은 회수율을 나타내었다. Park 등(15)의 연구에 의하면 천연물의 에탄올 추출 시 에탄올 농도가 수율에 큰 영향을 미친다고 보고하였는데 본 실험에서도 에탄올 농도에 따라 많은 차이를 나타내었다. Huang 등(16)은 수수에서 90% 에탄올 추출의 경우 TTGE가 3.44 µg/g 함유되어 있다 하였으며, Chang 등(17)은 창포(*Calamus quiquesetinervius*)에서 95% 에탄올 추출하였을 때 tricin을 1.12 µg/g 분리하였다고 보고하였으나 사용한 원료가 달라 직접 비교하기에는 어려움이 있었다. 본 연구에서는 70% 에탄올 추출이 가장 높은 회수율을 보여 추출용매의 농도는 70%로 결정하였다.

**Tricin 추출에 미치는 추출 방법 및 시간의 영향**

추출 방법 및 시간이 tricin의 회수율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 초음파 추출기로 0.5, 1 및 2시간 동안 추출하였고, 교반 추출기로 0.5, 1, 2, 6, 12, 24 및 48시간 동안 추출한 결과는 Fig. 2와 같다. 초음파 추출 시 추출시간에 따라 각각 66.99, 76.11 및 83.30%로 2시간 추출 시 가장 높은 회수율을 나타내었으며, 교반 추출의 경우 추출시간에 따라 46.52~92.34% 범위로 48시간 추출 시 가장 높은 회수율을 나타내었다. Choi 등(18)은 무의 sulforaphane를 추출하였을 때 초음파 처리 후 진탕 교반한 것이 진탕 교반만



**Fig. 1.** Changes in tricin and tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE) contents of rice hull with ethanol concentration of extraction solvent. Different letters on the bars of same items indicate significant difference ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

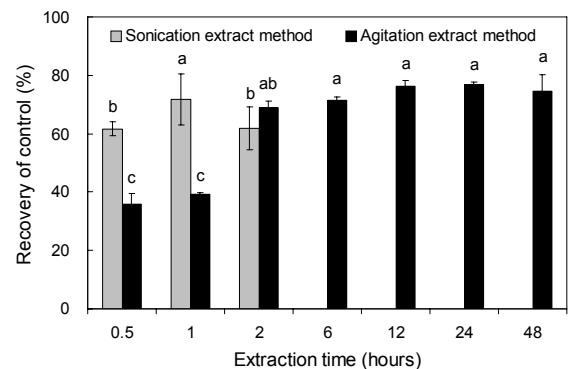


**Fig. 2.** Changes in tricin contents of rice hull with extraction methods and time. Different letters on the bars indicate significant difference ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

한 경우보다 추출효율을 2.7배 향상시켰다고 보고하였으며, Shin과 Lee(19)는 청나래고사리의 성엽을 추출하였을 때 6시간 동안 교반한 것과 30분 동안 초음파 처리한 함량이 비슷하다고 보고하였는데 시료는 다르지만 초음파로 추출하는 것이 단기간에 추출효율을 증가시킬 수 있는 효과적인 추출방법인 것으로 판단되었다.

**TTGE 추출에 미치는 추출 방법 및 시간의 영향**

추출 방법 및 시간이 TTGE의 회수율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 초음파 추출기로 0.5, 1 및 2시간 동안 추출하였고, 교반 추출기로 0.5, 1, 2, 6, 12, 24 및 48시간 동안 추출한 결과는 Fig. 3과 같다. 초음파 추출 시 추출시간에 따라 각각 61.63, 71.80 및 61.97%로 1시간 추출 시 가장 높은 회수율을 나타내었으며, 교반 추출의 경우 추출시간에 따라 35.77, 39.17, 68.94, 71.57, 76.16, 76.89 및 74.45%로 24시간 추출 시 가장 높은 회수율을 나타내었다. 24시간 동안 교반 추출할 경우 회수율이 가장 높았지만 초음파로 1시간 추출했을 때와 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 참취를 비롯한 다양한 식물체로부터 유효 성분 추출을 위하여 교반 추출과 초음파 추출을 하였을 경우



**Fig. 3.** Changes in tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE) contents of rice hull with extraction methods and time. Different letters on the bars of same items indicate significant difference ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

초음파 추출의 추출효율이 우수하다는 연구 결과(20,21)와 비교해볼 때 시료는 다르지만 초음파로 추출하는 것이 단기간에 추출효율을 증가시킬 수 있는 가장 효과적인 추출방법인 것으로 판단된다. 본 실험 결과 교반 추출에서 높은 회수율을 얻었지만 장시간의 추출에 따른 공정 및 추출비용의 증가를 고려할 때 초음파로 1시간 추출하는 것이 효과적일 것으로 판단된다. 따라서 tricin과 TTGE를 가장 효율적으로 추출할 수 있는 최적 조건으로 70% 에탄올 농도에서 1시간 초음파 추출하는 것이 적합하였다.

## 요 약

본 연구에서는 왕겨 중의 tricin과 TTGE의 함량을 확인하고, 추출용매의 에탄올 농도(50, 60, 70, 80 및 90%), 추출방법(교반 및 초음파 추출) 및 추출시간(0.5~48시간)이 tricin과 TTGE의 추출에 미치는 영향을 살펴보았다. 왕겨의 tricin과 TTGE의 함량은 각각 82.20 µg/g 및 53.12 µg/g이었다. Tricin 및 TTGE의 최적 추출용매의 에탄올 농도 50, 60, 70, 80 및 90%에 따라 tricin은 각각 66.03, 70.70, 76.11, 66.16 및 23.99%를, TTGE는 각각 64.56, 68.14, 71.42, 60.29 및 16.84%의 회수율을 보여 70% 농도가 가장 높았다. 초음파 추출 시 tricin 회수율은 2시간 처리에서 83.30% 그리고 TTGE는 1시간 처리 시 71.80%로 높았다. 교반 추출 시 추출시간의 증가에 따라 회수율은 증가하였으며, tricin은 48시간 추출 시 92.34% 그리고 TTGE는 24시간 추출 시 76.89%로 높았다. 이상의 결과로부터 tricin과 TTGE를 가장 효율적으로 추출할 수 있는 조건은 추출용매의 에탄올 농도 70%로 1시간 초음파 추출이라 판단된다.

## REFERENCES

1. Lee YJ, Jung WK, Sung YJ. 2011. Investigation of the effects of environment friendly digestion process on the rice hull. Spring Meeting of Korea Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Gyeongnam, Korea. p 139-150.
2. Park JH, Jin JH, Kim HJ, Park HR, Lee SC. 2005. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of extracts from rice hulls. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 131-134.
3. Park SJ, Kim MH, Shin HM. 2005. Chemical compositions and thermal characteristics of rice husk and rice husk ash in Korea. *J Biosystems Eng* 30: 235-241.
4. Oh SW, Kang CH. 1999. Studies on the physical properties of molded packaging material using rice-straw pulp. *J Korean Wood Sci Technol* 27: 79-87.
5. No SY. 1998. Effective utilization methods of rice husk. *J Biosystems Eng* 23: 507-518.
6. Ramarathnam N, Osawa T, Namiki T, Kawakishi S. 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid. *J Agric Food Chem* 37: 316-319.
7. Rho YD, Baek NI, Lee MH. 2001. Separation and identification of natural herbicidal substance from rice hull. *Kor J Weed Sci* 21: 49-57.
8. Jeong RH, Lee DY, Cho JG, Lee SM, Kang HC, Seo WD, Kang HW, Kim JY, Baek NI. 2011. A new flavonolignan from the aerial parts of *Oryza sativa* L. inhibits nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54: 865-870.
9. Jiao J, Zhang Y, Liu C, Liu J, Wu X, Zhang Y. 2007. Separation and purification of tricic from an antioxidant product derived from bamboo leaves. *J Agric Food Chem* 55: 10086-10092.
10. Mohanlal S, Parvathy R, Shalini V, Helen A, Jayalekshmy A. 2011. Isolation, characterization and quantification of tricic and flavonolignans in the medical rice Njavara (*Oryza sativa* L.), as compared to staple varieties. *Plant Foods Hum Nutr* 66: 91-96.
11. Jung YS, Kim DH, Hwang JY, Yun NY, Lee YH, Han SB, Hwang BY, Lee MS, Jeong HS, Hong JT. 2014. Anti-inflammatory effect of tricic 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether, a novel flavonolignan compound isolated from Njavara on in RAW264.7 cells and in ear mice edema. *Toxicol Appl Pharmacol* 277: 67-76.
12. Sung YJ, Shin SJ, Oh MT. 2009. Chemical composition of rice hull and morphological properties of rice hull fibers. *Journal of Korea TAPPI* 41: 22-28.
13. Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim S, Lee YR, Noh YH, Lee J, Jeong HS. 2015. Effects of high hydrostatic pressure treatment on the enhancement of functional components of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chem* 166: 86-92.
14. Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Woo KS, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee J, Lee YR, Jeong HS. 2012. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. *Food Chem* 134: 288-293.
15. Park NY, Kwon JH, Kim HK. 1998. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1189-1196.
16. Huang H, Liu Y, Meng Q, Wei S, Cui H, Zhang C. 2010. Flavonolignans and other phenolic compounds from *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Biochem Syst Ecol* 38: 656-658.
17. Chang CL, Wang GJ, Zhang LJ, Tsai WJ, Chen RY, Wu YC, Kuo YH. 2010. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquetnerivus*. *Phytochemistry* 71: 271-279.
18. Choi AR, Lee GS, Chae HJ. 2008. Effects of ultrasonication on the analysis of sulforaphane content in vegetables. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society* 9: 794-799.
19. Shin SL, Lee CH. 2011. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci* 21: 56-61.
20. Kim MK, Jeong CS, Shin YK, Park KH, Lee WJ, Lee EJ, Paek KY. 2010. Effects of extraction condition on extraction efficiency of rubiadin in adventitious roots of Noni (*Morinda citrifolia*). *Kor J Hort Sci Technol* 28: 685-690.
21. Kim JW, Youn KS. 2014. Polyphenolic compounds, physiological activities, and digestive enzyme inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extracts according to different extraction processes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1701-1708.