

융복합적인 웰리스를 위한 미강추출물의 항산화 활성

이재혁*, 박정숙**

남부대학교 한방제약개발학과^{*}, 남부대학교 간호학과^{**}

Antioxidant Activities of Rice Bran Extracts for Wellness Convergence

Jae-Hyeok Lee^{*}, Jeong-Suk Park^{**}

Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju, 506-706, South Korea^{*}

Department of Nursing Science, Nambu University, Gwangju, 506-706, South Korea.^{**}

요약 이 논문의 목적은 미강추출물 및 탈지미강추출물의 항산화력과 피부에 대한 안전성을 살펴보는데 목적이 있다. 미강과 탈지미강은 물과 에탄올로 추출하여 사용하였다. 미강추출물의 항산화능을 보기위해 DPPH로 유도된 free radical의 소거능에 의한 항산화 활성, 리보플라빈에 의해 유도된 Superoxide 생성 억제 활성, Xanthine Oxidase 저해활성을 측정하였으며 피부에 대한 안전성을 보기위해 인간 섬유아세포의 세포독성을 MTS방법을 통하여 살펴 보았다. 본 연구결과는 미강추출물과 탈지미강추출물 중에서 특히 에탄올추출물은 탁월한 항산화력을 보였으며 인간 섬유아세포에서 세포독성 없이 안전하였다. 이상의 결과로 미강 및 탈지미강 추출물 중 에탄올 추출물은 화장품과 같은 미용산업 분야에서 기능성 소재로 활용과 스킨케어분야에 융복합 할 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 미강추출물, 탈지미강, 항산화능, 섬유아세포, 융복합

Abstract The aim of present study is to investigate antioxidative effect of the Rice Bran Extracts and Defatted Rice Bran Extracts. Rice Bran Extracts used Rice Bran Water Extract, Rice Bran Ethanol Extract, Defatted Rice Bran Water Extract, Defatted Rice Bran Ethanol Extract. This study was carried out to examine quenching effects of Rice bran extracts on DPPH-, Riboflavin-, and Xanthin oxidase- originated superoxide activities. In addition, in order to determine whether Rice Bran Extract can be safely applied to human skin, the cytotoxic effects of Rice Bran Extract in Human Dermal Fibroblast cells were determined using MTS Assay. These results demonstrated that RBE and DRBE had anti-oxidative properties and did not induce the cytotoxic effects in Human Dermal Fibroblast cells. Therefore, these findings suggest that anti-oxidative properties of RBE and DRBE may be considered convergence with skin care.

Key Words : Rice bran extracts, Defatted Rice Bran, DPPH, Fibroblast, convergence

Received 3 December 2014, Revised 15 January 2015
Accepted 20 February 2015
Corresponding Author: Jeong-Suk Park(Nambu University)
Email: pk0207@nambu.ac.kr

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ISSN: 1738-1916

1. 서론

쌀(*Oryza sativa* L.)은 우리나라의 주곡 작물로 인체 활동에 필요한 다양한 영양분을 공급하며, 미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물로 쌀의 영양분 95%를 가지고 있다[1]. 미강은 양질의 단백질과 식이섬유 및 각종 비타민, 미네랄을 함유하고 있으며, Phytic Acid, γ -oryzanol, α -tocopherol, α -tocotrienol과 같은 항산화물질 등 다양한 생리활성물질들을 가지고 있다[2]. 이들 성분들은 혈중 콜레스테롤을 저하시켜 만성질환의 예방에 효과가 있으며[3], HepG2 간암세포주와 자궁경부암 세포주에서 Tocotrienol이 암세포 증식 억제에 의한 항암활성[4], 항산화효과[5,6]와 혈압상승억제 효과[7,8] 등 다양한 생리적 기능에 대한 효과가 보고되어 왔다. 특히 Akihisa 등[9]은 미강분획추출물을 마우스에 투여하여 유의성 있는 항염성을 보고하였다. 또한 한방화장품과 기능성화장품시장이 확대됨에 따라 미강과 같은 천연 소재를 이용한 제품들이 개발되고 있으며 활성산소와 자외선에 의한 피부노화를 지연시키는 소재를 찾기 위해 천연물에서 탐색이 활발히 진행되고 있다.

체내의 에너지 대사 과정에서 산소의 대부분은 산화적 인산화를 통해 정상적으로 환원되지만 그 중 일부는 인체에 유해한 활성산소나 유리기를 형성하여 인체에 장해를 일으키는 것으로 알려져 있다[10]. 활성 산소는 노인성 질환과 노화를 비롯한 많은 질환의 중요 원인으로 보고되어 있으며, 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고, 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 뇌졸중, 암, 동맥경화, 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등 다양한 질병을 유발하게 된다. 생물학적 반응으로 생성된 Free Radical을 제거시켜 생체를 보호하는 생리적 항산화효소로는 Superoxide Dismutase(SOD), Catalase, Glutathione peroxidase(GSHpx) 및 Glutathione S-transferase(GST) 등이 있으며, 저분자로서 항산화제 혹은 free Radical Scavenger 역할을 하는 것으로 α -tocopherol, β -carotene, Ascorbic Acid 및 Glutathione 등이 알려져 있다. 이에 미강, 탈지미강 추출물의 항산화 활성을 살펴보고 피부미용기능성 소재로 가능성을 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 미강추출물제조

2.1.1 시료

본 실험에 사용한 시료는 2009년 전남순천에서 생산된 친환경 벼를 2010년 8월 순천미곡처리장(MC-90A, Wakayama Co. Ltd., Japan)에서 도정하여 제공받은 즉시 미강시료로 사용하였으며, *n*-hexane 등으로 탈지한 미강을 탈지미강시료로 사용하였다.

2.1.2 물 추출법

분쇄한 미강시료와 탈지미강시료 200g을 정제수와 혼합한 후 4시간 동안 가열하여 추출하여 Whatman No. 2(USA) 여과지로 여과하고 여액을 60℃에서 감압 농축(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)후, 동결 건조하여 Rice Bran Water Extract(RBW), Defatted Rice Bran Water Extract(DRBW)로 사용하였다.

2.1.3 에탄올 추출법

분쇄한 미강시료와 탈지미강시료 200g을 95% Ethanol(HPLC-grade)과 혼합한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였다. 이 조작을 3회 반복하여 얻은 추출액을 Whatman No. 2(USA) 여과지로 여과하고 여액을 60℃에서 감압 농축(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)후, 동결 건조 하여 추출물 23.89g을 얻었다. 추출물은 1,000mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 상온에서 보관하여 시료 Rice Bran Ethanol Extract(RBE), Defatted Rice Bran Ethanol Extract(DRBE)로 사용하였다.

2.2 시약 및 기기

2.2.1 시약

1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), Xanthine, Xanthine Oxidase, Riboflavin, EtOH, L-ascorbic acid, Pyrogallol, Sodium Phosphate, EDTA, Methionine, PBS 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

2.2.2 세포주 및 세포배양

인간의 피부섬유아세포는 전남대학교 의과대학 생리학 교실에서 분양받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과

1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

2.3 안전성실험

2.3.1 Cytotoxicity Assay

Rice Bran Extract의 세포에 대한 독성은 Mitochondrial Dehydrogenases에 의하여 MTS가 Formazan으로 전환되는 것을 측정하는 방법(MTS Assay)으로 96 well plate에 1.0×10^5 cell/well의 Human Dermal Fibroblasts를 분주하고 18시간 동안 배양한 후 Rice Bran Extract를 10ug/mL, 100ug/mL, 1,000ug/mL 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 20ul의 MTS Solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 4시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.4 항산화 활성실험

2.4.1 DPPH Free Radical 소거능에 의한 항산화 활성

96 well plate에 시료를 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 1.5×10^{-4} M의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 EtOH을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분간 방치한 후 Microplate Reader를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH Free Radical 소거능을 3회 반복하여 측정하였다[11].

2.4.2 Superoxide 억제 활성

시료의 Superoxide 억제능력은 Methionine, Riboflavin, Nitro Blue Tetrazolium (NBT)로 구성된 평가 시스템을 이용하여 광화학작용을 측정하는 것이다. 반응 혼합액은 2.6 μM Riboflavin, 13 μM Methionine, 75 μM NBT, 0.1mM EDTA, 0.05 M Sodium Phosphate(pH 7.8) PBS(pH 7.4) 및 여러 농도의 시료로 이루어 졌다. 혼합물은 Light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 넣어 두었다. Light box 안의 온도

는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 빛의 밝기는 5500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 Blue Formazan으로 환원되어지는데, 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다. Blue Formazan의 형성 억제제가 Superoxide 억제능력이 된다[12,13].

2.4.3 Xanthine Oxidase 저해활성 측정

Xanthine/xanthine Oxidase System에 의해 발생하는 Superoxide Anion Radical을 항산화제가 제거시키는 정도를 확인하는 실험으로 Nitro Blue Tetrazolium (NBT)의 감소 정도를 항산화력으로 측정한다. 0.48 mM NBT와 1.6 mM Xanthine를 함유한 Phosphate Buffer(pH 7.8)에 시료를 가하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 Xanthine Oxidase(0.05 U/mL) 100 μL를 가한 다음, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthin Oxidase저해 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다[14].

2.5 통계처리

실험결과와 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였고, 각 군간의 유의성 검증은 Students' *t*-test를 사용하였다. 이 *t*-검정에서 $p < 0.05$ 일 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Rice Bran Extract의 Human Dermal Fibroblast에 대한 세포독성

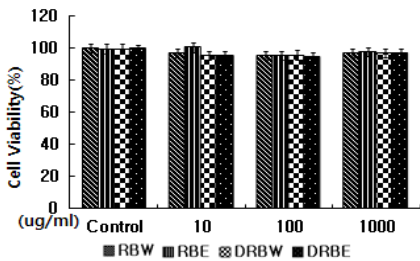
Rice Bran Extract의 Human Dermal Fibroblast에서 독성을 평가하기 위하여 Rice Bran Extract을 농도 의존적으로 처리한 후 MTS Assay를 실시하여 Cell Viability를 측정하였다. 실험 결과 10ug/mL, 100ug/mL, 1,000ug/mL 모든 농도에서 RBW, RBE, DRBW 및 DRBE는 세포독성을 나타내지 않았다[Fig. 1].

3.2 DPPH Free Radical 소거능에 의한 항산화 활성

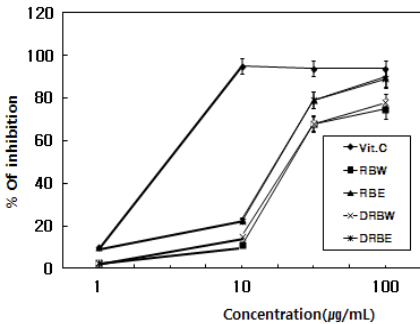
DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 화합물내 질소 중심의 radical로 Free Radical의 안정화된 물질이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 Free Radical의 소거

반응이 진행 되고 있음을 알 수 있고 지질과산화의 초기 반응의 억제정도를 예측할 수 있다. DPPH는 517 nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어진다[15]. 따라서 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려있다. 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 Vitamin C 를 이용하여 Rice Bran Extract 의 항산화 효과를 비교하였다.

그 결과 Vitamin C의 95.04% DPPH Radical 소거능에 비해 RBW는 67.12%, DRBW는 71.15%, RBE는 89.43%, DRBE는 92.38%의 DPPH Radical 소거능을 보였다. 특히 RBE, DRBE는 대조군인 vitamin C와 거의 유사한 DPPH Radical 소거능을 나타내었다[Fig. 2].



[Fig. 1] Effects of Rice Bran Extract on the Cell Viability of Human Dermal Fibroblast. Human Dermal Fibroblast were treated with Rice Bran Extract for 1 hr. Cell viability was determined by MTS Assay. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments(SD=bars) and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells.



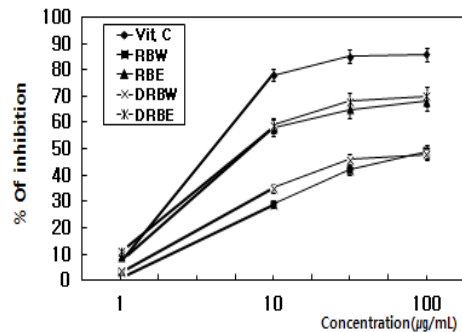
[Fig. 2] Inhibitory Effects of Rice Bran Extract on DPPH-Originated Free Radical Production

3.3 Superoxide 억제 활성

유해산소라 불리는 활성산소(ROS:Reactive Oxygen species)는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과 산화 반응을 일으켜 체내에 과산화 지질을 축적하여 인체 기능을 저하시키고 색소침착, 노화 및 성인병 등의 여러 가지 질환을 유발한다고 알려져 있다[10].

SOD(Superoxide dismutase)는 생체 내에서 Superoxide Radical을 과산화수소로 전환시키는 역할을 하여 산화방지와 노화 억제에 밀접한 관계가 있다. Riboflavin은 5,500 Lux의 빛에서 분해되어 Singlet Oxygen 과 Superoxide Anion이 생성되며 이는 NBT(Nitro Blue Tetrazolin)을 환원시켜 NBT의 환원 물질인 Blue Formazan을 생성하며 560 nm에서 최대 흡광도를 가진다. 이때 EDTA를 가하여 금속에 의한 Riboflavin의 변화를 억제하고 Methionine을 가하여 Singlet Oxygen을 제거하여 순수한 Superoxide Anion에 의한 반응을 측정하였다.

대조군인 Vitamin C가 88.45%의 억제활성을 나타내었으며 RBW는 52.12%, DRBW는 53.05%, RBE는 72.23%, DRBE는 71.18%의 Superoxide억제활성을 농도 의존적으로 보여주었다.특히 RBE, DRBE는 유의성 있는 Superoxide 억제활성이 나타났다[Fig. 3].



[Fig. 3] Riboflavin Originated Superoxide Quenching Activities of Rice Bran Extract

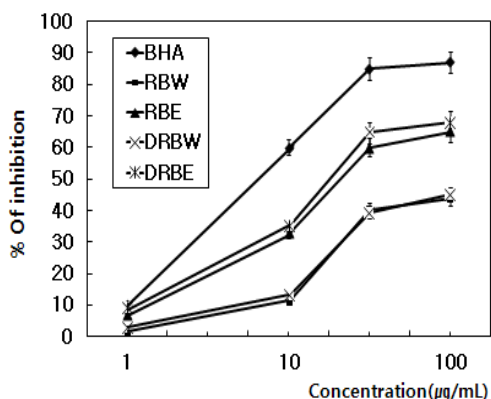
3.4 Xanthine Oxidase 저해활성

Xanthine Oxidase는 모든 Purine의 Terminal Oxidation에서 Rate-limiting Enzyme으로 작용하며 Superoxide Radical이나 Hydrogen peroxide와 같은 산화제의 source

로서 작용하는 효소이다.

Xanthine/Xanthine Oxidase의 효소에 의한 Superoxide Radical 저해작용은 Superoxide Radical 소거작용과 Xanthine Oxidase 효소 저해에 의해 나타나며 통풍억제 및 Free Radical의 생성 억제를 통해 생물학적으로 중요한 의미를 갖는다[16,17]. 즉 Xanthine은 Xanthine Oxidase에 의해 발생되는 Superoxide Anion Radical이 NBT를 환원시켜 환원 생성 물질인 Blue Formazan을 생성하고, 시료가 이를 제거시키는 정도를 560 nm에서 확인하는 방법으로서의 blue formazan 생성 감소 정도를 항산화력으로 측정한다.

대조군인 BHA가 91.45%의 저해활성을 나타내었으며 RBW는 40.12%, DRBW는 43.45%, RBE는 62.73%, DRBE는 68.18%의 Xanthine oxidase 저해활성을 보였다. 특히 RBE, DRBE는 유의성 있는 Xanthine oxidase 저해활성이 나타났다[Fig.4].



[Fig. 4] Xanthine Originated Superoxide Scavenging Effects of Rice Bran Extract

4. 결론

화장품과 같은 미용산업 분야에서 기능성 소재로 활용될 수 있는 Rice Bran Extracts에 대한 항산화력에 대한 기초적인 생리 활성을 측정하였다. 항산화활성을 보기 위하여 DPPH Free Radical 소거능에 의한 항산화활성, Superoxide 억제 활성, Xanthine Oxidase 저해활성 측정을 통하여 활성산소 제거능을 확인한 결과 RBE와 DRBE가 우수한 항산화력을 보였다.

REFERENCES

- [1] Shin HG. : Development and Research Trends of Functional Food. Food Science and Industry, Korean Society of Food Science and Technology 30, 2 (1997).
- [2] Bae SM, Kim JH, Cho CW, Jeong TJ, Yook HS, Byun MW, Lee SC. : Effect of irradiation on the antioxidant activity of rice hull, rice bran and barley bran. J Korean Soc Food Sci Nutr. 31, 246 (2002).
- [3] Qureshi AA, Mo H, Packer L, Peterson DM. : Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. J Agric Food Chem. 48, 3130 (2000).
- [4] Choi HI, Ye EJ, Kim SJ, Bae MJ, Yee ST, Park EJ, Park EM. : Anticancer (in vitro) and antiallergy effects of rice bran extracts. J Korean Soc Food Sic Nutr. 35, 1297 (2006).
- [5] Osawa T, Narashima R, Kawakishi S, Namaki M, Tashiro T. : Antioxidative defense system in rice hull against damage caused by oxygen radicals. Agric Biol Chem. 49, 3085 (1985).
- [6] Lai P, Li KY, Lu S, Chen HH. : Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. Food Chem. 117, 538 (2009).
- [7] Muramoto G, Kawamura S. : Rice protein and anti-hypertensive peptide (angiotensin converting enzyme inhibitor) from rice. Nippon Shokuhin Kogyo, 34, 18 (1991).
- [8] Lee KY, Kim JH, Son JR, Lee JS. : Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of Heugjinju rice (*Oryza sativa* L). Korean J Postharvest Sci Technol. 8, 296 (2001).
- [9] Toshihiro Akihisa, Ken Yasukawa, Miho Yamaura, Motohiko Ukiya, Yumiko Kimura, Naoto Shimizu, and Koichi Arai :Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects, J. Agric. Food Chem. 48, 2313 (2000).

- [10] Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord, J. M., Harman, D.. Oxygen Radical and Human Diseases, Ann. Intern. Med. Vol.107, pp.526-545. (1987).
- [11] Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y., and Okuda, T.. Studies Oninhibition Mechanism of Autooxidation by Tannins and Flavonoids. V.- Radical Scavenging Rffects of Tannins and Rrelated Polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. Chem. Pharm. Bull. Vol.37, pp.1919-1921. (1989).
- [12] Choi, D. S., Kim, S. J., Jung, M. Y.. Inhibitory Activity of Berberine on DNA Strand Cleavage Induced by Hydrogen Peroxide and Cytochrome C, Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol.65, pp.452-455. (2001).
- [13] Ginnopolitis, C. N., Ries, S. K.. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. Vol.59, pp.309-314. (1977).
- [14] Stirpe, F., Della, Corte, E.. The Regulation of Rat Liver Xanthine Oxidase. Conversion in Vitro of the Enzyme Activity from Dehydrogenase(type D) to Oxidase(type O), J. Biol Chem. Vol.244(14), pp.3855-3863. (1969).
- [15] Blois, M. S.. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical, Nature. Vol.181, pp.1199-1200. (1958).
- [16] You, H. J., Woo, E. R.. The Suppressive Effect of medicinal herbs on the H₂O-induced hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mutation, Kor. J. Pharmacogn. Vol.35, pp.28-34. (2004).
- [17] Dziezak, J. D.. Antioxidants, Food Technology Vol.40, pp.94-102.1986.16You, H. J., Woo, E. R.. The Suppressive Effect of medicinal herbs on the H₂O-induced hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mutation, Kor. J. Pharmacogn. Vol.35, pp.28-34. (2004).

박 정 숙(Park Jeong Suk)



- 1994년 2월 : 원광대학교 약학과(약학사)
- 1996년 2월 : 원광대학교 약학과(약학석사)
- 2002년 2월 : 원광대학교 약학과(약학박사)
- 2006년 3월 ~ 현재 : 남부대학교 간호과 교수

· 관심분야 : 생약학, 대체의학
 · E-Mail : pk0207@nambu.ac.kr

이 재 혁(Lee, Jae Hyeok)



- 1987년 2월 : 우석대학교 약학과(약학사)
- 1989년 2월 : 우석대학교 약학과(약학석사)
- 2005년 2월 : 우석대학교 약학과(약학박사)
- 2005년 2월 ~ 현재 : 남부대학교 한방 제약개발학과 교수

· 관심분야 : 천연물
 · E-Mail : jhlee@nambu.ac.kr