

추출방법에 따른 미강 추출물의 항산화 활성 비교

— 연구노트 —

함현미¹ · 우관식¹ · 이유영¹ · 박지영¹ · 이병원¹ · 최용환¹ · 김인환² · 이준수³

¹농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부

²고려대학교 식품영양학과

³충북대학교 식품생명·축산과학부

Comparison of Antioxidant Activities of Rice Bran Extracts by Different Extraction Methods

Hyeonmi Ham¹, Koan Sik Woo¹, Yu-Young Lee¹, Ji-Young Park¹, Byongwon Lee¹,
Yong-Hwan Choi¹, In-Hwan Kim², and Junsoo Lee³

¹Department of Central Area, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration

²Department of Food and Nutrition, Korea University

³Department of Food and Animal Sciences, Chungbuk National University

ABSTRACT The objective of this study was to determine the antioxidant activities of rice bran extracts by three different extraction methods. Rice bran was extracted by solvent extraction, saponification extraction, and supercritical fluid extraction. The antioxidant activities of the rice bran extracts were determined based on ABTS and DPPH radical scavenging activities, reducing power, and lipid peroxidation inhibitory activity. The unsaponifiable matter (USM) extracted by the saponification method showed higher ABTS (671.7 mg Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g) and DPPH (330.7 mg TEAC/g) radical scavenging activities as well as reducing power ($A_{700}=1.14$) than those of the solvent extract (ME) and supercritical fluid extract (SFE). Inhibitory effect on lipid peroxidation was higher in USM (68.7%) and SFE (75.4%) compared to ME (47.8%). USM indicated relatively higher antioxidant activities compared with those of SFE and ME. These results show that the saponification method for extraction of USM from rice bran extracted was the most effective method for enhancement of antioxidant activity. In addition, these extracts from rice bran could be used as functional ingredients in the food industry.

Key words: rice bran, unsaponifiables, antioxidant, extraction method

서 론

미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물로 현미의 약 7~10%를 차지한다. 미강의 조성은 벼의 품종, 재배 환경 및 도정 방법 등에 따라 차이가 있으나 수분 함량 14%를 기준으로 할 때 단백질 11~17%, 지방 15~20%, 탄수화물 34~52%인 것으로 보고되어 있다(1). 미강에는 미강유 기준 약 4%의 비검화물이 함유되어 있으며 미강의 비검화물에는 주로 tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, phytosterol 및 policosanol 등의 생리활성 성분이 포함되어 있다(2). 또한, 미강은 항산화 활성, 항염증 활성, 항암 활성, 콜레스테롤 저하 효과, 혈압 상승 억제 효과 등 다양한 생리활성이 보고되어 있다(3-7). 연간 미강 생산량은 약 60만

톤으로 추정되며, 이 중 약 30%는 미강유 제조에 사용되고 나머지는 사료나 비료 등 저 부가가치 형태로 이용되거나 폐기물로 처리되고 있어 생리활성 자원으로서 미강의 다양한 활용방안이 필요한 실정이다(8,9). 또한, 식품의 기호성 증진을 위해 과거보다 더 정교해지는 곡류의 도정 과정으로 인해 미강 발생량은 계속 증가할 것으로 예상하고 있다(10). 따라서 미강으로부터 생리활성이 높은 추출물을 제조하는 방법이 개발된다면 미강의 부가가치를 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

곡류 내 생리활성 성분을 추출하기 위한 방법으로는 용매 추출법, 검화 추출법 및 초임계 유체 추출법 등이 이용되고 있다. 특정 용매에 대한 구성물의 용해도 차이를 이용하는 용매 추출법이 널리 사용되고 있으나 추출 효율이 낮고 추출 시간이 오래 걸리는 단점이 있다(11). 비검화물의 추출을 위한 검화추출법은 알칼리 가수분해를 통해 트리글리세라이드(triglycerides), 인지질(phospholipids) 및 스테롤(sterols)의 ester 결합을 분리하여 생리활성 성분을 추출하는 방법이다(12). 또한, 초임계 유체 추출법은 추출 또는 농축

Received 19 July 2016; Accepted 22 September 2016

Corresponding author: Junsoo Lee, Department of Food and Animal Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea

E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2566

후 용매를 제거하는 공정이 필요 없으며 저온에서 조작할 수 있어 열에 불안정한 물질의 추출에 용이하다(13). 하지만 초임계 유체 추출의 생산비용이 높기 때문에 일부에서만 사용되고 있다(14).

미강의 항산화 활성에 관한 연구는 추출온도에 따른 미강 추출물의 항산화 활성 비교(15), 미강으로 제조한 tocotrienol rich fraction의 항산화 효과(16), 미강 페놀산 농축물의 항산화 활성(17), 미강 효소 추출물의 항산화 활성(6) 등 많은 연구가 진행되고 있으나 추출 방법에 따른 미강의 항산화 활성을 비교한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 용매 추출법, 검화 추출법, 초임계 유체 추출법을 이용하여 추출 방법에 따른 미강 생리활성 농축물의 항산화 활성을 비교하여 효과적인 추출방법을 제시하고, 기능성 소재를 개발하는 데 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 미강은 경기 수원 소재의 국립식량과학원에서 생산된 다산 1호 품종을 사용하였다. 항산화 성분 분석에 사용된 gallic acid, Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate와 항산화 활성 측정에 사용된 Trolox, ABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), potassium persulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride, DMSO(dimethyl sulfoxide) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. *Candida antarctica* lipase Novozyme 435는 Novo Nordick(Bagsvaerd, Denmark)에서 구매하였으며 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

추출물의 제조

미강 생리활성물질 농축물의 제조를 위하여 용매 추출법, 검화 추출법, 초임계 유체 추출법을 이용하여 각각 methanol extract(ME), unsaponifiable matter(USM), supercritical fluid extract(SFE)를 제조하였다. ME는 분쇄된 미강 10 g에 methanol 150 mL를 가한 후 상온에서 24시간 교반하면서 추출하였다. USM은 Ham 등(18)의 방법에 의해 추출하였다. 즉 분쇄된 미강 2 g에 에탄올 10 mL를 첨가하고 질소가스로 충전한 후, 60% KOH 용액 8 mL를 첨가하고 다시 질소가스로 재충진하여 냉각기를 연결하였다. 이를 70°C 수욕상에서 50분 검화시킨 후 냉각하고 2% NaCl 용액 30 mL를 가하였다. 추출용매(n-hexane : ethyl acetate, 85:15, v/v) 20 mL를 첨가하여 3회 반복 추출하였으며 추출액은 무수 MgSO₄을 통하여 수분을 제거하였다. SFE는 Kim 등(19)의 방법에 의해 추출하였다. 즉 분쇄된 미강 무게의 5배 부피의 헥산으로 6시간 동안 교반하고 여과지(What-

man No.5, Whatman International Limited, Kent, UK)로 여과한 후 진공 증발시켜 조미강유를 제조하였다. 추출한 조미강유와 에탄올을 1:40몰의 비율로 혼합하여 50°C에서 400 rpm으로 교반하면서 시료의 10%(w/w)에 해당하는 *C. antarctica* lipase Novozyme 435를 첨가한 후 12시간 동안 반응하여 미강유 에틸에스터를 제조하였다. 초임계 반응기에 미강유 에틸에스터 12 g을 넣은 후 반응 온도 55°C, 압력 9.65 Mpa의 조건에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 미강유 에틸에스터를 분리하고 생리활성물질을 농축하였다. 각 추출물은 Whatman NO. 2 filter paper(Whatman International Limited)를 이용하여 여과하고 감압 농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 -80°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

ABTS 라디칼 제거능

ABTS 라디칼 제거능은 Re 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 물 흡광계수($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 라디칼 용액 1 mL에 추출물 50 μL 를 가하여 60분 후에 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 계산하였으며, mg TEAC/g으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 제거능

DPPH 라디칼 제거능은 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 추출물 50 μL 를 가하고 30분 후에 흡광도의 변화를 520 nm에서 측정하였다(21). DPPH 라디칼 제거능은 Trolox를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(TEAC)을 계산하였으며, mg TEAC/g으로 나타내었다.

환원력

환원력은 Oyaizu(22)의 방법을 응용하여 측정하였다. 추출물 250 μL 에 200 mM sodium phosphate buffer(pH 6.6) 250 μL , 1%(w/v) potassium ferricyanide 250 μL 를 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 10%(w/v) trichloroacetic acid 250 μL 를 가하였다. 위 반응액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상등액 500 μL 에 증류수 500 μL 를 혼합하고, 0.1%(w/v) ferric chloride 100 μL 를 가하여 700 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 반응액은 Fe³⁺과 Fe²⁺ 간의 상호 전환에 의하여 청록색을 나타내며 흡광도 값이 클수록 높은 환원력을 의미한다.

지질과산화 억제능

β -Carotene-linoleic acid system을 이용한 지질과산화 억제능의 측정에는 Elzaawely 등(23)의 방법을 변형하여

측정하였다. β -Carotene 25 mg을 chloroform 50 mL로 용해하여 β -carotene 용액을 만든 후 β -carotene 용액 3 mL에 linoleic acid 40 mg 및 Tween 40 400 mg을 첨가하고 진탕하였다. 감압 농축기(N-1000, EYELA)를 이용하여 chloroform을 제거하고 증류수 100 mL를 첨가하여 emulsion 용액을 제조하였다. 시료 100 μ L에 emulsion 용액 1 mL를 가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 470 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였고 결과는 억제율(%)로 나타내었다.

통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 결과에 대한 유의성 검정은 SAS version 9.2(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능

미강에는 tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol 등의 생리활성물질이 많이 함유되어 있으며, 이러한 성분들이 항산화 활성, 콜레스테롤 저하 효과, 심혈관계 질환 예방 효과 등의 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(24). 본 연구에서는 미강을 이용하여 일반적으로 널리 사용되고 있는 용매 추출법과 함께 감화 추출법 및 초임계 유체 추출법으로 추출한 생리활성물질 농축물의 항산화 활성을 비교하고자 하였다. Lai 등(25)은 미강의 생리활성 성분을 추출하기 위하여 methanol, ethyl acetate, hexane으로 추출하여 각 추출물의 항산화 활성을 비교한 결과 methanol 추출물의 항산화 활성이 다른 두 용매 추출물에 비하여 우수함을 보고하였다. 따라서 용매 추출물은 methanol을 이용하여 추출하였다. Ham 등(18)은 감화 방법을 이용하여 미강에 많이 함유되어 있는 비검화물을 추출함으로써 tocopherols, tocotrienols, policosanols, phytosterols 및 γ -oryzanol이 많이 함유되어 있는 생리활성물질 농축물인 USM을 제조하였고 HepG2 세포에서 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있음을 보고하였다. 또한, Kim 등(19)은 초임계 이산화탄소를 이용하여 미강유 내의 생리활성물질 농축을 위하여 온도 조건 45°C, 50°C, 55°C 및 압력 조건 9.65 MPa, 10.34 MPa, 11.03 MPa에서 농축한 결과 55°C, 9.65 MPa 조건에서 생리활성물질인 tocopherols, tocotrienols, policosanols, phytosterols 및 γ -oryzanol의 농축률이 가장 높은 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 55°C, 9.65 MPa 조건에서 미강 생리활성물질 농축물인 SFE를 제조하였으며 USM, SFE 및 ME의 항산화 활성을 비교하고자 하였다.

생리활성물질 농축물의 ABTS 라디칼 제거능은 mg TEAC/g으로 나타내었으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. ABTS 라

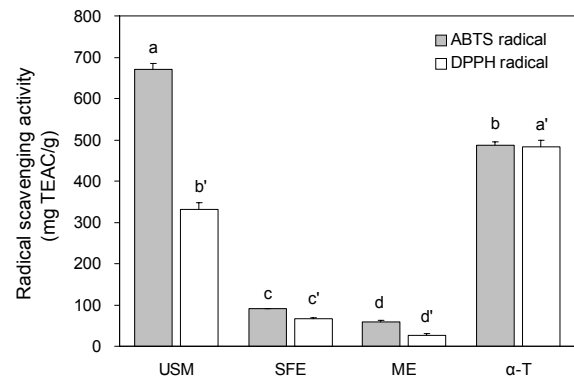


Fig. 1. ABTS and DPPH radical scavenging activities of various extracts from rice bran. Different letters above same kind of bars indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. USM, unsaponifiable matter; SFE, supercritical fluid extract; ME, methanol extract; α -T, alpha-tocopherol.

디칼을 이용한 항산화 활성의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정 방법이다. 측정 결과 USM이 671.7 mg TEAC/g으로 가장 높았으며 SFE 91.3 mg TEAC/g, ME 59.1 mg TEAC/g의 순서로 나타났고 positive control로 사용된 α -tocopherol은 487.5 mg TEAC/g으로 나타났다. DPPH 라디칼 제거능은 DPPH 라디칼 특유의 보라색이 추출물의 항산화 물질에 의해 수소 혹은 전자를 받음으로써 안정한 형태의 화합물로 전환되어 옅은 노란색으로 변하는 원리로 측정하였다. DPPH 라디칼 제거능 역시 mg TEAC/g으로 나타내었으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 측정 결과 USM이 330.7 mg TEAC/g으로 높은 활성을 보였고 SFE 66.4 mg TEAC/g, ME 25.3 mg TEAC/g의 순서로 나타났다. Positive control로 사용된 α -tocopherol은 482.0 mg TEAC/g으로 나타났다. Chotimarkorn 등(26)은 미강이 라디칼 제거능 등 항산화 활성이 우수하며 tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol 등 항산화 성분이 많이 함유되어 있음을 보고하였다. Lee 등(27)은 초임계 이산화탄소를 이용하여 지방산 메틸에스터를 제거하여 제조한 미강 추출물에 vitamin E 1% 및 γ -oryzanol 26%가 함유되어 있었으며 라디칼 제거능 측정 결과 α -tocopherol과 비슷한 활성을 나타내었음을 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 USM이 SFE 및 ME보다 높은 라디칼 제거능을 보였으며 이는 USM에 많이 함유되어 있는 tocopherol, tocotrienol 및 γ -oryzanol과 연관이 있을 것으로 생각된다.

환원력

생리활성물질 농축물의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 환원력은 항산화 물질의 수소 공여능에 의한 것으로 potassium ferricyanide reduction 방법을 이용하여 측정하였으며, 700 nm에서의 흡광도 값으로 나타내었

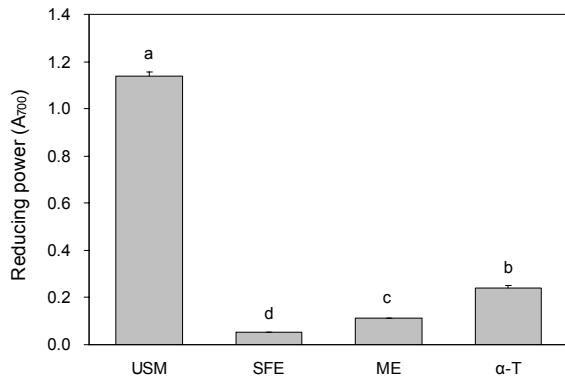


Fig. 2. Reducing power of various extracts from rice bran. Different letters above bars indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. USM, unsaponifiable matter; SFE, supercritical fluid extract; ME, methanol extract; α-T, alpha-tocopherol.

다. 측정 결과 환원력은 USM이 $A_{700}=1.14$ 로 positive control로 사용된 α-tocopherol의 $A_{700}=0.24$ 보다 뛰어난 활성을 보였고 SFE 및 ME는 각각 $A_{700}=0.05$ 및 $A_{700}=0.11$ 의 낮은 활성을 보였다. Oh 등(3)은 벼 품종별 미강 에탄올 추출물의 환원력 측정 결과 $A_{700}=0.03\sim 0.35$ 로 나타났음을 보고하였으며 본 연구에서 측정된 ME의 환원력인 $A_{700}=0.11$ 과 유사한 수준을 보였다. 본 연구 결과 USM이 SFE 및 ME보다 높은 환원력을 보였으며, 따라서 USM에는 수소를 공여함으로써 유리라디칼을 안정화시키고 산화반응을 종결시킬 수 있는 reductone이 많이 함유되어 있는 것으로 생각된다.

지질과산화 억제능

Linoleic acid의 자동산화시스템을 이용하여 생리활성물질 농축물의 지질과산화물의 생성 억제 효과를 측정하였으며 Fig. 3에 나타내었다. ABTS 및 DPPH 라디칼 제거능, 환원력과는 상이하게 SFE가 75.4%의 높은 지질과산화 억제능을 보였고 이는 positive control로 사용된 α-tocoph-

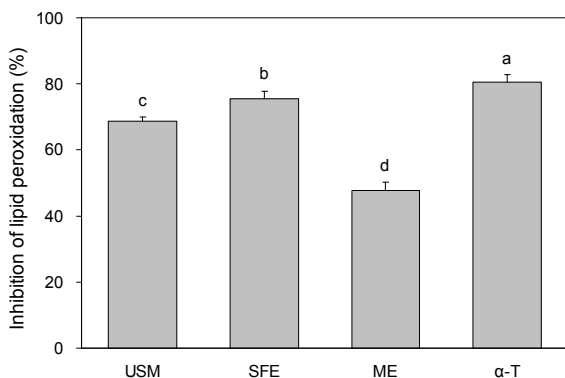


Fig. 3. Inhibition of lipid peroxidation of various extracts from rice bran. Different letters above bars indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. USM, unsaponifiable matter; SFE, supercritical fluid extract; ME, methanol extract; α-T, alpha-tocopherol.

erol의 80.6%와 유사한 수준으로 나타났다. USM은 68.7%의 억제능을 보였고 ME는 47.8%의 가장 낮은 활성을 보였으며 USM은 SFE보다는 낮지만 ME보다 우수한 지질과산화 억제능을 나타내었다. Linoleic acid는 생체막 구성 지방산의 하나이므로 지질과산화 억제능이 높은 USM 및 SFE는 생체 내 산화적 스트레스에 의해 유발되는 만성 질환을 예방하는 데 도움을 주는 소재가 될 수 있을 것으로 생각된다.

요약

본 연구에서는 미강의 산업적 이용 증대 및 고부가가치 소재 개발을 목적으로 항산화 활성을 증가시킬 수 있는 추출 방법을 개발하기 위하여 용매 추출법, 검화 추출법 및 초임계 유체 추출법을 이용하여 제조한 미강 생리활성물질 농축물의 항산화 활성을 비교하였다. 항산화 활성은 ABTS 및 DPPH 라디칼 제거능, 환원력, 지질과산화 억제능을 이용하여 측정하였다. ABTS 및 DPPH 라디칼 제거능, 환원력 모두 unsaponifiable matter(USM)가 각각 671.7 mg TEAC/g, 330.7 mg TEAC/g 및 $A_{700}=1.14$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 지질과산화 억제능은 USM 및 supercritical fluid extract(SFE)가 각각 68.7% 및 75.4%로 methanol extract(ME)의 47.8%보다 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 검화 추출법으로 제조한 USM은 SFE 및 ME보다 상대적으로 우수한 항산화 활성을 가지며 미강을 기능성 소재로 개발하기 위한 추출 방법으로 활용 가능할 것으로 생각된다. 또한, 미강 생리활성물질 농축물은 기능성 증진을 위한 다양한 식품 소재로의 활용 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구비 지원(과제번호 PJ011037 2016)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Nagendra Prasad MN, Sanjay KR, Shrayya Khatokar M, Vismaya MN, Nanjunda Swamy S. 2011. Health benefits of rice bran—A review. *J Nutr Food Sci* 1: 1-7.
2. Hu W, Wells JH, Shin TS, Godber JS. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *J Am Oil Chem Soc* 73: 1653-1656.
3. Oh SK, Kim DJ, Chun AR, Yoon MR, Kim KJ, Lee JS, Hong HC, Kim YK. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of ethanol extracts from milling by-products of rice cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 624-630.
4. Park JS, Kim MH. 2011. Anti-inflammatory effects of rice bran ethanol extract in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 55: 456-461.
5. Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. 2005. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays.

- J Agric Food Chem* 53: 816-822.
6. Revilla E, Maria CS, Miramontes E, Bautista J, Garcia-Martínez A, Cremades O, Cert R, Parrado J. 2009. Nutritional composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res Int* 42: 387-393.
 7. Hegsted M, Windhauser MM, Morris SK, Lester SB. 1993. Stabilized rice bran and oat bran lower cholesterol in humans. *Nutr Res* 13: 387-398.
 8. Kim YH, Lee SS. 1995. The effect of diet containing different fiber sources on the serum lipid level and bowel function in rats. *Korean J Nutr* 28: 825-833.
 9. Kim JY, Shin M, Heo YR. 2014. Effects of stabilized rice bran on obesity and antioxidative enzyme activity in high fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1148-1157.
 10. Choi HI, Ye EJ, Kim SJ, Bae MJ, Yee ST, Park EJ, Park EM. 2006. Anticancer (*in vitro*) and antiallergy effects of rice bran extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1297-1303.
 11. Lee EJ, Yang SA, Choi HD, Im HG, Whang K, Lee IS. 2011. Comparison of gingerols in various fractions and the antioxidant effects of supercritical fluid extracts from ginger. *Korean J Food Sci Technol* 43: 469-474.
 12. Lee SM, Lee HB, Lee J. 2006. Comparison of extraction methods for the determination of vitamin E in some grains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 248-253.
 13. Kim JE, Lee S, Yoo KM, Lee KH, Kim KT, Lee MH, Hwang IK. 2014. Quality characteristics of ginseng seed oil obtained by different extraction methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 439-445.
 14. Hedrick JL, Mulcahey LJ, Taylor LT. 1992. Supercritical fluid extraction. *Microchimica Acta* 108: 115-132.
 15. Lee JH, Oh SK, Kim DJ, Yoon MR, Chun A, Choi IS, Lee JS, Kim YG. 2013. Comparison of antioxidant activities by different extraction temperatures of some commercially available cultivars of rice bran in Korea. *Korean J Food Nutr* 26: 1-7.
 16. Minhajuddin M, Beg ZH, Iqbal J. 2005. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 43: 747-753.
 17. Jung EH, Hwang IK, Ha TY. 2010. Properties and antioxidative activities of phenolic acid concentrates of rice bran. *Korean J Food Sci Technol* 42: 593-597.
 18. Ham H, Yoon SW, Kim IH, Kwak J, Lee JS, Jeong HS, Lee J. 2015. Protective effects of unsaponifiable matter from rice bran on oxidative damage by modulating antioxidant enzyme activities in HepG2 cells. *LWT - Food Sci Technol* 61: 602-608.
 19. Kim I, Yoon SW, Lee J, Lee JS, Kim IH. 2013. Concentration of rice bran lipid soluble bioactive substances using supercritical carbon dioxide. *Food Eng Prog* 17: 362-368.
 20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
 21. Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 113: 1202-1205.
 22. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
 23. Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT. aerial parts. *Biol Pharm Bull* 28: 2225-2230.
 24. Cicero AFG, Derosa G. 2005. Rice bran and its main components: Potential role in the management of coronary risk factors. *Curr Top Nutraceutical Res* 3: 29-46.
 25. Lai P, Li KY, Lu S, Chen HH. 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from *Japonica* rice bran. *Food Chem* 117: 538-544.
 26. Chotimarkorn C, Benjakul S, Silalai N. 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food Chem* 111: 636-641.
 27. Lee JW, Lee SW, Kim MK, Rhee C, Kim IH, Lee KW. 2005. Beneficial effect of the unsaponifiable matter from rice bran on oxidative stress *in vitro* compared with α -tocopherol. *J Sci Food Agric* 85: 493-498.