

효소 처리에 의한 흑미 호분 추출물의 산화방지와 항염증 활성 증진

이미경¹ · 유수인^{1,2} · 이민호^{1,2,*}

¹을지생명과학(주), ²을지대학교 식품산업외식학과

Improvement of anti-oxidant and anti-inflammatory activities of aleurone layer extracts of black rice (*Oryza sativa* L.) by enzyme treatment

Mi Kyoung Lee¹, Soo In Ryu^{1,2}, and Min Ho Lee^{1,2,*}

¹Eulji Life Science Co., Ltd.

²Department of Food Technology and Services, Eulji University

Abstract The current study investigated the effects of enzyme treatment on black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer extracts. Different enzymes (lipase, lecithase ultra and lipopan 50BG) were used to test anti-oxidant and anti-inflammatory activities in vitro. The antioxidant activities of enzyme treated or non-enzyme treated extracts of black rice bran were evaluated via 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity. Lipase treated extracts of black rice bran showed higher antioxidant activity compared to that of non-enzyme treated extracts. Anti-inflammatory activities of enzyme treated black rice bran extracts on nitrite production and tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion, were tested using a nitric oxide (NO) colorimetric assay kit and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The ethanolic extract of enzyme treated black rice bran decreased the levels of nitric oxide production and pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α , in a lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cell culture. These findings indicate that enhanced anti-oxidant and anti-inflammation activities of the ethanolic extracts of enzyme treated black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layers, may be attributed to molecular conversion of ingredients in enzyme catalyzed reactions.

Keywords: black rice aleurone layer, enzyme, anti-oxidant activity, anti-inflammatory effect

서 론

현대사회는 경제발전과 더불어 소득증대로 생활수준은 향상되고 있지만 많은 스트레스와 식생활 불균형으로 인해 다양한 질병이 증가하는 추세이며 건강기능식품을 통해 이를 예방하고 관리하기 위한 수요가 증가하고 있는 추세이다(Bae, 2003). 최근 자연물 및 식품소재를 가지고 산화방지 및 항염증 효과 평가에 다양한 연구가 진행되고 있다. 항산화는 노화 및 암 발병의 주된 원인 중 하나인 활성산소의 작용을 억제하는 것으로 자유라디칼에 의한 산화적 스트레스를 억제하기 위해서 항산화 물질의 개발에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다(Sung 등, 2014). 염증반응은 정상적인 방어 메커니즘이기는 하나, 염증 반응이 지속적으로 일어나게 되면 조직이 손상되고 관절염, 당뇨병, 동맥경화 등과 같은 퇴행성 면역질환의 원인이 된다(Kim 등, 2016). 이러한 염증반응을 매개하는 인자들로는 산화질소(II)(NO), TNF- α , IL-6 같은 염증성 사이토카인들이 관여하게 되는데, 이들의 생성을 억

제하고 조절할 수 있는 물질은 염증질환을 치료하는데 쓰이거나 예방하는 자원으로 이용하는데 활용될 수 있다(Lee, 2000; Shon 등, 2012).

흑미(*Oryza sativa* L.)는 독특한 향기와 맛, 각종 무기질, 바이타민, 식품섬유를 비롯하여 감마 오리지놀(γ -oryzanol), 폴리페놀, 안토시아닌(anthocyanin) 등의 기능성 성분을 또한 함유하고 있다(Kong 등, 2008; RDA 2011; Muramoto와 Kawamura, 1991). 흑미는 다른 특수미에 비해 총 산화력, 환원력, 지방질과산화 억제력 등이 우수하다(Seo 등, 2008; Serbinova와 Packer, 1994). 고지방식을 섭취한 C57BL/6J mice에서 지방산의 산화를 증가시키는 것으로 간 조직의 지방질 축적을 효과적으로 억제하였다(Jang 등, 2012). 또한 흑미 미강 색소를 첨가한 배아젤리를 투여한 흰쥐의 체중증가량 및 식이효율이 낮게 나타났고, 혈장과 간조직의 지방질대사가 효과적으로 개선되었다(Cho 등, 2008). 특히 흑미의 미강에는 항산화 성분으로 cyanidin 3-O- β -D-glucoside 및 peonidine 3-O- β -D-glucoside 등의 색소 성분이 함유되어 있다(Choi 등, 1996). 흑미 쌀겨 에탄올 추출물과 색소 분획의 산화방지, 항암 및 항염증 활성이 백미보다 우수하다고 보고되었다(Nam과 Kang, 1997; Nam과 Kang, 1998; Nam 등, 2006).

최근에는 기존의 용매 추출로부터 시료를 제조했던 방식에서 한걸음 나아가 다양한 종류의 효소들을 처리하여 수율증대, 기능성 성분함량의 증가 및 생리활성 효능을 극대화시키기 위한 연구들이 보고되고 있다. 효소를 이용한 인삼 추출물에서의 항당뇨성 증진(Yuan 등, 2011), 효소 처리한 콩나물 추출물의 산화방지

*Corresponding author: Lee, Min Ho, Department of Food Technology and Services of Eulji University, Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea

Tel: +82-31-740-7433

Fax: +82-31-740-7499

E-mail: agroman@naver.com

Received July 25, 2018; revised September 7, 2018;

accepted September 7, 2018

활성 증대(Sung 등, 2014), 효소 처리한 감태 분획물의 항비만 효과(Kim 등, 2014) 등의 연구가 진행된 바 있다.

흑미를 도정하는 과정에서 생기는 부산물인 흑미 호분층은 우수한 생리활성에도 불구하고 지방함량이 많아(15-20%) 변질되기 쉽고, 특유의 향미와 섭취의 번거로움으로 인해 기능성 소재로 이용하는데 많은 어려움이 있다. 이를 극복하기 위해 지방질 가수분해 효소인 lipase, lipopan 50BG, lecithase ultra를 이용한 효소처리과정을 거쳐 추출물을 제조하였다. 본 연구에서는 각각의 효소 처리과정을 거친 흑미 호분층 에탄올 추출물의 건강기능식품 소재로의 기초자료를 제공하고자 산화방지 활성을 측정하였으며, RAW 264.7 큰 포식세포를 이용하여 항염증 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 흑미 호분은 전라남도 진도군에서 구입한 국내산 흑미 호분(*Oryza sativa* L.) aleurone layer를 사용하였고, 효소 추출물을 제조하기 위해 지방질 가수분해 효소인 lipase, lipopan 50BG, lecithase ultra는 Novozymes Co. (Bagsvard, Denmark)로부터 구입하였다. 추출용매로 사용된 주정(발효에탄올)은 Samchun Co. (Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 냉동 건조 추출물을 희석하는데 사용한 다이메틸 설펝사이드(DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 사용한 기기로는 회전감압농축기(N-1200A, EYELA, Tokyo, Japan), 동결건조기(PVTFD20R, Ilshin, Gyeonggi, Korea)가 있다.

시료 제조

본 연구에서 사용된 흑미 호분은 전라남도 진도군에서 재배 수확한 흑미를 도정하는 과정에서 생길 부산물로 살균하여 흑미 호분에 존재하는 미생물을 제거한 후, 효소처리를 하였다. 효소처리 조건을 Table 1에 나타내었다. 10배수의 50% 주정으로 24시간 동안 추출하여 냉동 건조한 후 실험에 사용하였다. 각 효소처리 조건마다의 추출 효율을 Table 2에 나타내었다. 이 추출물은 -20°C에서 보관하면서 사용되었다.

DPPH 라디칼 제거 활성

시료의 DPPH 라디칼 제거 활성은 Choi 등(2003)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 0.6 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Calbiochem, San Diego, CA, USA) 용액 0.1 mL에 시료를 동량으로 첨가하고, 실온에서 암상태로 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(TECAN infinite m200, Mannedorf, Switzerland). 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거 활성으로 나타내었다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 제거 활성}(\%) = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료첨가구의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

ABTS⁺ 라디칼 제거 활성

효소 처리한 흑미 호분 추출물 시료의 ABTS 라디칼 제거활성은 Dewanto 등(2002)의 방법을 응용하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma, USA)과 2.7 mM potassium persulfate을 섞어 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡

Table 1. Preparation of extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme

Sample No.	Enzyme treated condition
OLA	Non-treated
OLAE-1	Lipase (2%), 37°C, 2 h incubation
OLAE-2	Lecitase ultra (2%), 30°C, 8 h incubation
OLAE-3	Lipase (2%), 37°C, 2 h incubation+Lecitase ultra (2%), 30°C, 8 h incubation
OLAE-4	Lipopan 50BG (2%), 40°C, 8 h incubation

Table 2. The yield of enzyme treated Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer extractions

Sample	Yield (% w/w) ¹⁾
OLA	10.99
OLAE-1	17.02
OLAE-2	11.97
OLAE-3	19.55
OLAE-4	18.43

¹⁾Yield(% w/w)=(weight of dried extract/weight of dried raw material)×100

광도 값이 0.8-1.0가 되도록 희석해서 사용하였다. 희석된 ABTS 용액에 시료를 동량으로 넣고, 5-10분 반응시킨 후에 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성으로 나타냈다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 제거 활성}(\%) = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료첨가구의 흡광도, B: 대조구의 흡광도

RAW 264.7 세포 배양

마우스 유래의 큰 포식세포주인 RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA), 1% 항생물질(100 unit/mL penicillin과 100 unit/mL streptomycin)가 포함된 RPMI 배지(Gibco)를 사용하여 37°C에서 5% 이산화탄소 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)를 이용하여 배양하였다.

세포독성 평가

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.)방법을 이용하여 효소 처리 흑미 호분 주정 추출물들이 RAW 264.7 세포의 생존에 미치는 영향을 측정하였다. 96-well plate에 5×10⁵ cells/mL 농도로 RAW 264.7 세포를 분주하여 24시간 동안 배양한 후 농도별로 시료를 처리한 다음 하루 동안 배양하였다. 이후 기존 배지를 제거한 다음 MTT 용액(5 µg/mL) 10 µL를 포함하는 RPMI 배지 100 µL를 각각의 well에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 3-4시간 반응시켰다. 다시 반응배지를 제거하고 다이메틸설펝사이드(Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL 넣어 20분간 교반한 후 ELISA reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 백분율로 세포 독성을 평가하였다.

Nitric oxide 생성량 측정

Griess 반응을 이용하여 배양액 내의 아질산 농도를 측정하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10⁵ cells/mL 농도로 24-well plate에 접종하

고 5% 이산화탄소배양기에서 하루 전 배양하였다. 그 후 효소 처리한 흑미 호분 추출물 시료를 세포에 처리하고, 1 µg/mL의 LPS로 자극하여 24시간 분 배양하였다. 배양 상층액을 회수한 뒤, 원심분리 하여 정량 실험에 사용하였다. Griess reagent (sulfanilamide solution+naphthalendiamine dihydrochloride)와 배양 상층액을 1:1 비율로 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내의 NO농도는 아질산소듐(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 계산되었다.

염증성 사이토카인 분비량 측정

RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 후, 생성된 염증 관련 사이토카인의 분비량을 측정하기 위해 RPMI 1640 배지를 이용하여 2×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% 이산화탄소배양기에서 12-18시간 전배양한 후 1 µg/mL의 LPS와 효소 처리한 흑미 호분 추출물 시료(OLA, OLAE-1, OLAE-2, OLAE-3, OLAE-4)를 100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 재배양하였다. 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 사이토카인의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 그 후 본 배양을 거쳐 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. Anti-mouse TNF-α와 anti-mouse IL-6가 코팅된 ELISA 마이크로플레이트에 상층액들을 50 µL씩 분주하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 마이크로플레이트를 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α와 IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 분주하여 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 다시 PBST로 세척하고 TMB 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 반응 종료를 시킨 후 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복 측정하였고, 평균과 표준오차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS program (IBM, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였으며, 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 던

컨의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 제거 활성

DPPH 라디칼 제거 활성은 대표적인 산화방지 활성을 나타내는 척도로 이용되고 있는데, 그 원리를 보면 항산화 물질의 전자공여능은 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 보라색을 띠다가 산화방지 활성을 갖는 물질을 만나면 노란색으로 변색되며 흡광도가 감소되게 나타난다(Joung 등, 2010). 효소 처리 방법에 따른 흑미 호분층 추출물의 DPPH 라디칼 제거 활성 결과는 Fig. 1과 같다. 실험 결과를 보면, 효소 처리하지 않은 추출물에 비해 효소 처리한 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가됨을 확인하였다. 특히 라이페이스를 단독으로 처리한 추출물인 OLAE-1 시료의 경우엔 추출물의 농도가 250 µg/mL의 경우 라디칼 소거능이 42%, 500 µg/mL의 경우엔 67.5%로 무처리군 보다 약 12%, 19.5%씩 증가하는 효과를 나타내었다. 지방질분해 효소인 라이페이스의 처리로 인해 흑미 미강의 지방이 화학적으로 급격하게 변화되면서 유용활성 성분의 용출이 증가되어 DPPH 라디칼 제거가 OLAE-1 시료에서 더 높았을 것으로 사료된다. 산화방지 활성과 관련된 효소 처리 추출물 연구 보고로는 인삼에 효소를 처리한 것이 처리하지 않은 인삼보다 DPPH 라디칼 제거 활성이 현저히 증가되는 것을 보고하였고(Kim 등, 2007), 또 Sung 등(2014)은 효소 처리한 콩나물 추출물이 유효성분과 페놀 함량이 더 높아 DPPH 라디칼 제거 활성을 증가시킨 결과를 보여주었다. 이것은 앞서 실험을 통해 확인해 본 지방질 가수분해 효소 처리에 따른 흑미 호분층 추출물의 DPPH 라디칼 제거 활성을 증가시킨 것과 동일한 결과이다.

ABTS 라디칼 제거능

ABTS 라디칼 제거능은 ABTS 라디칼이 산화방지 물질과 반응하여 라디칼 특유의 청록색이 탈색되어 흡광도의 변화를 나타내므로 이를 분석하여 산화방지 능력을 확인해 볼 수 있다(Kim

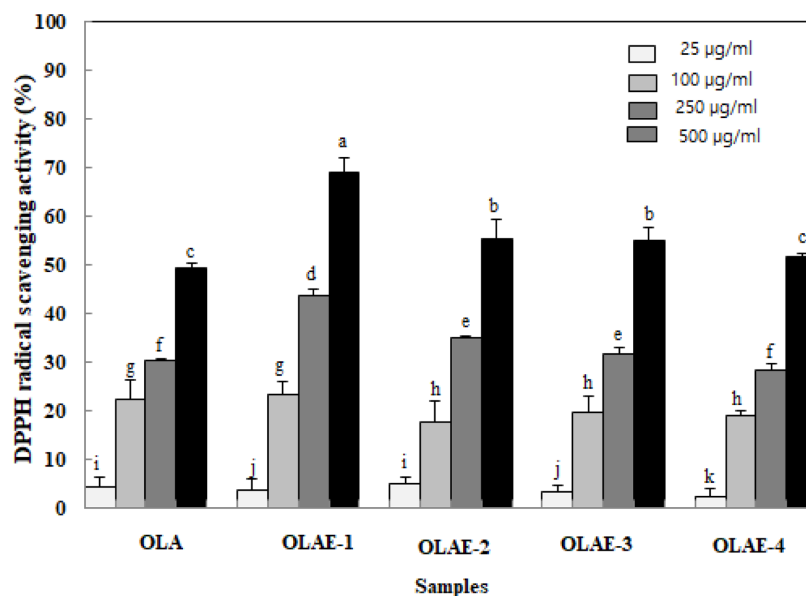


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (%) of ethanol extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme. Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

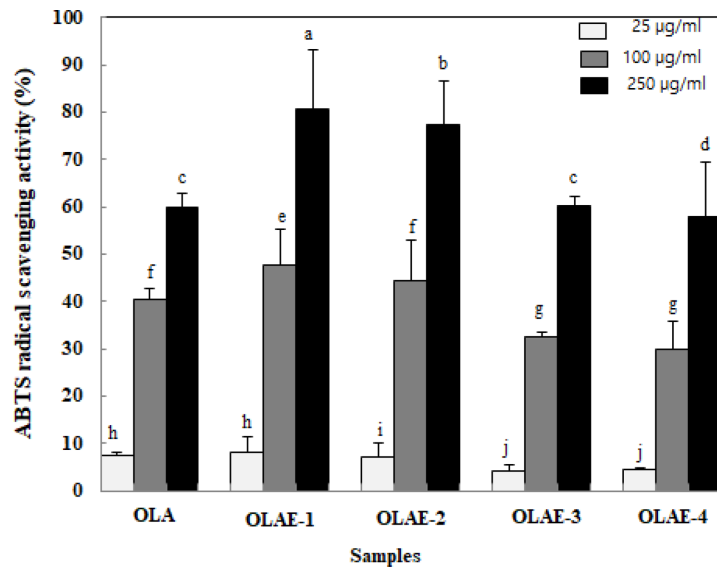


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity (%) of ethanol extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme. Different small letters on the error bar indicate a significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

등, 2013). ABTS 라디칼 제거능의 경우에도 DPPH 라디칼 제거능과 유사한 경향을 보였다(Fig. 2). ABTS 라디칼 제거 활성은 효소를 처리한 시료의 경우에 특히 OLAE-1와 OLAE-2 시료들의 경우엔 효소를 처리하지 않은 흑미 호분층 추출물 보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 250 µg/mL의 농도에서는 ABTS 라디칼 제거능이 라이페이스를 처리한 시료의 경우엔 81%와 lecitase를 처리한 시료의 경우엔 78%로 무처리 시료 OLA에 비해 높은 활성을 보였다. DPPH 라디칼 제거능에 비하여 ABTS 제거능이 더 높게 나타났는데, 이것은 두 라디칼 각각의 특성과 추출 시료들과의 반응에 따라 라디칼 제거능의 차이가 생길 수도 있었을 것이라 여겨지며(Lee 등, 2016), ABTS의 경우엔 친수성과 소수성 시료의 성분에 모두 적용 가능하여 DPPH 라디칼 제거 활성보다 더 민감하게 나타난 것으로 생각된다(Kwak 등, 2010). 효소 처리한 흑미 호분 추출물의 경우 DPPH 및 ABTS 라디칼 제거 활성을 통하여 효소 처리한 추출물에서 항산화 효과가 증가한 것을 확인하였으며 이러한 효과는 부산물인 흑미 호분층을 효소 처리 과정을 통해 재활용함으로써 산화방지 관련 식품으로의 잠재적인 가치를 확인했다고 여겨진다.

세포독성

RAW 264.7 세포의 생존율을 MTT assay를 통해 측정하여 효소 처리조건이 다른 흑미 호분층 추출물들(100 µg/mL, 200 µg/mL)의 세포독성을 비교하였다(Fig. 3). 그 결과 100 µg/mL의 처리 농도에서 음성 대조군과 비교 시 세포생존율이 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였다($p > 0.05$). 그러나 각 시료를 200 µg/mL의 농도로 처리했을 때 OLAE-2 시료의 경우에 약 18%의 세포독성을 보였기 때문에 100 µg/mL 이하의 농도로 시료를 처리하여 항염증 활성에 대해 측정하였다.

NO 생성량 측정

체내에 존재하는 산화질소(II)(NO)는 적절한 수준에서는 혈소판 억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등의 역할을 하지만 과도한 NO량의 증가는 염증성 질환을 발생시킬 수 있으며 산소와 결합하여 생성된 peroxynitrite는 세포와 조직에 산화적 손상을 입힌

다(Jeong 등,2012). 그러므로 적절한 농도의 NO를 유지하는 것이 매우 중요하기 때문에 본 연구에서는 효소 처리한 흑미 호분 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 지방질다당류(LPS)를 처리하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유도해 NO를 과량 생성하는 조건을 만들고 이와 동시에 효소 처리 흑미 호분 추출물을 처리하여 NO 생성이 억제되는지 관찰하였다(Fig. 4). LPS (1 µg/mL) 단독 처리군은 처리하지 않은 군에 비해 생성된 NO의 양이 약 90% 정도 증가하여 염증 반응이 충분히 활성화 된 것을 알 수 있었다. LPS와 효소 처리 흑미 호분 추출물 시료를 같이 처리한 군 중에서 OLAE-3 (lipase+lecitase)와 OLAE-4 (lipopan) 시료의 경우에 NO 생성 억제 활성을 보였는데, 100 µg/mL로 처리하였을 경우 LPS 단독 처리군과 비교 시 약 50, 40% 감소함을 나타내었고, 효소 처리하지 않은 OLA시료의 경우와 비교했을 때 약 58%의 감소함을 보였다. 특히 비교적 낮은 농도인 50 µg/mL로 처리하였을 경우엔 LPS 단독 처리군과 비교 했을 때, OLAE-3와 OLAE-4 시료 각각 40, 25%의 NO량 감소를 보였다. 효소 무처리 시료인 OLA의 NO생성량과 비교하면 약 34, 17%의 감소율을 나타내었다. 따라서 효소 처리한 흑미 호분 추출물은 무처리 흑미 호분 추출물에 비해 LPS로 유도된 큰 포식세포에서 증가한 NO의 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

염증성 사이토카인 분비량 측정

LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에 효소 처리 흑미 호분 추출물을 처리하여 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-6의 분비량 변화를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. LPS로 인해 생성되는 주요 염증성 사이토카인으로 TNF-α와 IL-6 등이 있는데, 이러한 사이토카인의 발현은 NO의 발현으로 이어지게 되어 과도한 염증성 사이토카인의 분비량 증가로 인해 전신성 염증반응 증후군, 패혈증 및 조직 손상을 야기한다(Hyun 등, 2015). TNF-α는 초기 염증 반응의 주요 매개자로 염증 부위의 백혈구의 양을 증가시키는 다른 사이토카인들과 내피세포 부착 분자의 발현 증가를 유도해 T 세포과 큰 포식세포를 활성화해 자가 면역 반응을 발생시키기 때문에 지속적인 염증 반응에 있어서 중요한 사이토카인이다(Chen 등, 2015). IL-6는 T 세포 활성화를 유도하고 염증 때

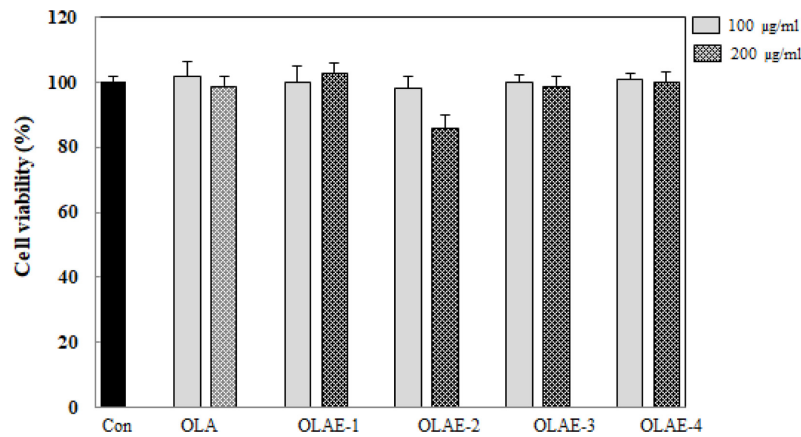


Fig. 3. Effects of extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme on the viability in RAW 264.7 macrophage cells. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay as described in the method. The results are expressed as means±SD of three independent experiments triplicate in each run.

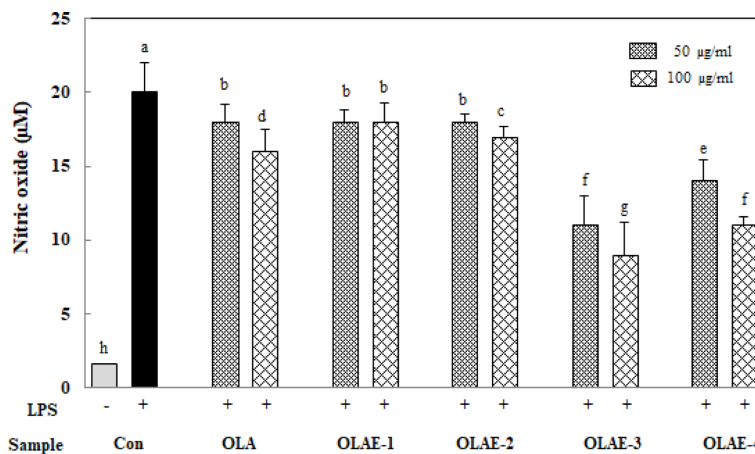


Fig. 4. Effect of extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme on NO production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with extract at 100 µg/mL concentration for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. Means with different letters (a-h) above the bars significantly different ($p < 0.05$).

개 물질의 발현을 통해서 후천성 면역을 개시하는 물질이다(Kim 등 2016). 따라서 인체 내의 염증반응에서 이러한 사이토카인들의 발현을 조절하는 물질은 다양한 질병을 조절할 가능성이 있으므로 중요하다고 할 수 있다. 본 실험에서는 효소 처리 흑미 호분 추출물(OLAE)이 염증성 사이토카인의 발현 정도를 ELISA kit를 통해 확인해보았다. 그 결과를 보면(Fig. 5), LPS를 처리한 대조군에서는 TNF- α 와 IL-6의 분비량이 각각 1,390 및 320 pg/mL로 높은 분비량을 보였다. OLA 시료를 100 µg/mL의 농도로 처리했을 때는 대조군과 비교했을 때에 비해 크게 감소효과를 나타내지는 않았다. 그러나 같은 농도로 OLAE-3와 OLAE-4 시료를 처리한 결과, 그 발현량이 TNF- α 의 경우엔 848 pg/mL와 1,002 pg/mL로 각각 약 40%와 약 29%의 억제효과를 보임을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 IL-6의 분비량의 변화를 보면, 효소 무처리군(OLA) 시료의 경우 300 pg/mL의 분비량을 보인 반면, OLAE-3 시료를 처리시에 189 pg/mL으로 분비 감소 효과를 보였다(Fig. 5B). 이것은 치차 추출물이 효소처리(β -glucosidase)에 의해 염증성 사이토카인의 분비량을 효과적으로 억제한 결과(Shon 등, 2012)와 유사하다.

요 약

본 연구에서는 흑미 호분을 실험소재로 선택하여, 흑미 호분에 효소(lipase, lecithase, lipopan)를 처리함으로써 산화방지와 항염증 활성을 증진하고자 하였다. 항산화 활성을 확인해보고자 DPPH 라디칼 제거능과 ABTS 라디칼 제거능을 실시하였다. 그 결과 효소 처리군이 무 처리군에 비해 산화방지 활성이 증가됨을 확인할 수 있었고, 특히 라이페이스를 처리한 후 추출한 시료에서 산화방지활성 증진이 가장 효과적이었다. 이것은 총 안토시아노사이드 함량 측정 결과와 일치한 것을 확인하였다. 이러한 산화방지 활성의 증가에서 라이페이스의 작용이 흑미 호분 겉면의 지방 분해를 도와 산화방지와 관련된 유효성분들을 효과적으로 추출한 것으로 생각된다. 항염증 활성을 비교하기 위해서는 효소 처리한 흑미 호분 추출물(OLAE)과 LPS를 함께 처리하여 RAW 264.7 세포가 생산하는 NO의 양과 염증성 사이토카인의 분비량을 측정해 보았다. 효소 처리를 한 경우, 라이페이스와 lecithase를 연이어 처리한 경우의 시료에서 NO의 생성이 억제되고, 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 분비량이 감소됨을 확인하였다. 항염증 활성의 증진은 두 가지의 효소를 처리하는 과정 중에 일어나는 유효성분의 변화 또는 성분의 전환이 되었기 때문이라 여겨

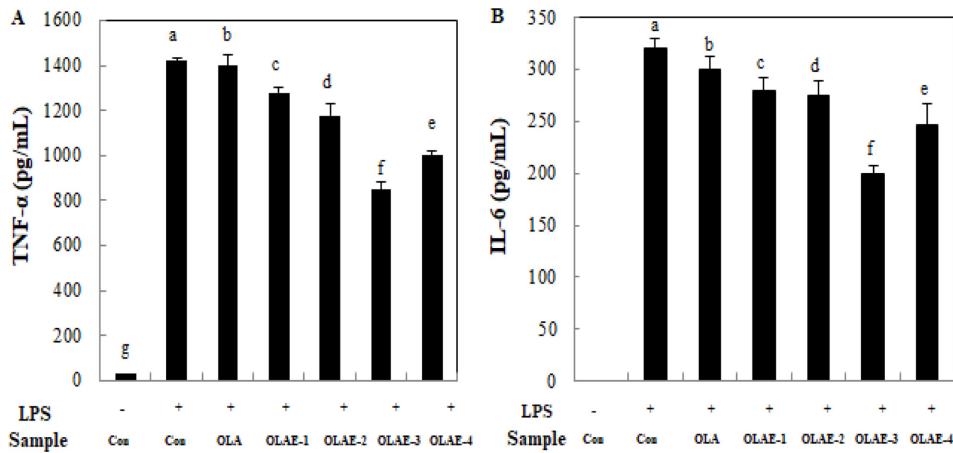


Fig. 5. Effect of extracts from Black rice (*Oryza sativa* L.) aleurone layer by the treatment enzyme on LPS-induced (A) TNF- α and (B) IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cell were incubated in the presence of LPS (1 μ g/mL) alone or in combination with extract at 100 μ g/mL concentration for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. Means with different letters above the bars significantly different ($p < 0.05$).

지며, 이를 확인하는 후속연구가 필요하다고 생각된다. 이상의 결과는 부산물로 버려지는 흑미 호분을 효소 처리 과정을 이용하여 만든 흑미 호분층 추출물(OLAE)로 활용하면 유용하고 안정하고 효과적인 산화방지 및 항염증 기능성 식품 소재 개발로 가능성을 제시할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 정부재원(과학기술정보통신부 여성과학기술인 R&D 경력복귀 지원 사업: WISSET 2017-556)으로 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원을 받아 연구되었습니다.

References

Bae SJ. The antimicrobial activities of waste food fractions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 825-828 (2003)

Chen X, Miao J, Wang H, Zhao F, Hu J, Gao P, Wang Y, Zhang L, Yan M. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway. *J. Ethnopharmacol.* 170: 72-80 (2015)

Cho MK, Kim MH, Kang MY. Effects of rice embryo and embryo jelly with black rice bran pigment on lipid metabolism and antioxidant enzyme activity in high cholesterol-fed rats. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 200-206 (2008)

Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727 (2003)

Choi SW, Nam SH, Choi HC. Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotechnol.* 5: 305-309 (1996)

Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutrition value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agr. Food chem.* 50: 3010-3014 (2002)

Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM, Kim JS. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax moribifera* leaf extracts. *Ind. Crops Prod.* 74: 263-270 (2015)

Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Choi JS, Ahn DH. Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* holmes ethanolic extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 181-187 (2016)

Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho J. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36:1482-1485 (2007)

Kim YH, Lee YJ, Park SO, Lee SJ, Lee OH. Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45:262-266 (2013)

Kim SY, Yun IJ, Kwon CJ, Choi JW, Kim YM, Kang MH, Lee MK, Nam TJ. The effects of anti-obesity on enzyme-treated *Ecklonia cava* extracts. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 47: 363-369 (2014)

Kong S, Choi Y, Lee SM, Lee J. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of black rice. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 815-819 (2008)

Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J. Agric. Life Sci.* 44:57-66 (2010)

Jang HH, Park MY, Kim HW, Lee YM, Hwang KA, Park JH, Park DS, Kwon O. Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. *Nutri. Metab.* 30: 9-27 (2012)

Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res.* 25: 299-307 (2012)

Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. Antioxidative and antimicrobial activities of *Lilium* species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 452-457 (2010)

Lee SH, Jang MR, Kim GH. Antioxidant effects of extracts from different parts of *Epimedium koreanum* Nakai. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 188-193 (2016)

Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 342-328 (2000)

Muramoto G, Kawamura S. Rice protein and antihypertensive peptide (angiotensin conversion enzyme inhibitor) from rice. *Nippon Shokuhin Kougyo Gakkaishi* 34: 18-26 (1991)

Nam SH, Cho SP, Kang MY, Koh HJ, Kozukue N, Friedman M. Antioxidant activities of bran extracts from twenty one black rice cultivars. *Food Chem.* 94: 613-620 (2006)

Nam, SH, Kang MY. *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agri. Chem. Biotechnol.* 40: 307-312 (1997)

Nam, SH, Kang MY. Comparison of effect of rice bran extracts if the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Agri. Chem. Biotechnol.* 41: 78-83 (1998)

RDA. Food Composition Table. 8th ed. Rural Development administration, Jeonju, Korea. pp. 28-29 (2011)

Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 129-135 (2008)

- Serbinova EA, Packer L. Antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Methods Enzymol.* 234: 354-366 (1994)
- Shon DH, Choi DW, Kim MH. Improvement of anti-inflammation activity of gardeniae fructus extract by the treatment β -glucosidase. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 331-336 (2012)
- Sung HM, Kim SJ, Kim KM, Yun SK, Jung HJ, Kim TY, Wee JY. Antioxidant activity of soy-sprout extracts prepared by enzyme and ultra high pressure. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1228-1235 (2014)
- Yuan HD, Quan HY, Jung MS, Kim SJ, Huang B, Kim DY, Chung SH. Anti-diabetic effect of pectinase-processed ginseng radix (GINST) in high fat diet-fed ICR mice. *J. Ginseng Res.* 35: 308-314 (2011)