

## Research Article



# 큰눈자미 배아의 식물성 스테롤 함량 및 성숙기 흰쥐에서 항산화 효과

량지에 , 마징원 , 정수임 <sup>1,2</sup>, 강미영 

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과  
<sup>2</sup>경북대학교 농업과학기술연구소

## OPEN ACCESS

Received: Nov 6, 2019

Revised: Mar 6, 2020

Accepted: Mar 13, 2020

### Correspondence to

Mi Young Kang

Department of Food Science and Nutrition,  
Kyungpook National University, 80 Daehak-ro,  
Buk-gu, Daegu 41566, Korea.  
Tel: +82-53-950-6235  
E-mail: mykang@knu.ac.kr

© 2020 The Korean Nutrition Society

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.

### ORCID iDs

Jie Liang 


<https://orcid.org/0000-0001-9479-0485>

Jing Wen Ma 

<https://orcid.org/0000-0003-1752-943X>

Soo Im Chung 

<https://orcid.org/0000-0002-1452-7191>

Mi Young Kang 

<https://orcid.org/0000-0002-9053-8650>

### Funding

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (project No. PJ013140)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

### Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

## Phytosterols content of Keunnunjami germ and its antioxidative effects in adult rats

Jie Liang , Jing Wen Ma <sup>1</sup>, Soo Im Chung <sup>1,2</sup>, and Mi Young Kang 

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea  
<sup>2</sup>International Agricultural Training Center, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

## ABSTRACT

**Purpose:** The rice germ fraction is a better source of protein, lipid, and fiber than the rice endosperm. Furthermore, the rice germ is rich in bioactive phytochemicals such as  $\gamma$ -aminobutyric acid, tocopherols, tocotrienols, phytic acid, and so on. In this study, the phytosterol content and antioxidant activity of Keunnunjami germ (KG) or normal rice germ supplement were investigated in healthy adult rats.

**Methods:** In vitro, quantitative assessment of phytosterols, including  $\beta$ -sitosterol, campesterol, cycloartenol, and stigmasterol, was performed. Comparative antioxidant activities of 2 rice germs were measured based on DPPH radical scavenging activity, reducing power, and ABTS radical scavenging capacity. In vivo, male Sprague-Dawley rats (30-weeks-old) were randomly assigned a diet of normal control (NC, AIN-93M diet), AIN-93M diet supplemented with normal rice germ 3% (NG3), or AIN-93M diet supplemented with KG 3% (KG3) and fed for 8 weeks.

**Results:** KG contained significantly higher campesterol and stigmasterol contents and antioxidant activity than normal rice germ. The KG3 group exhibited significantly lower body weight gain as well as inguinal and total white adipose tissue weights. There were no significant differences in plasma glucose, insulin, C-peptide, or homeostasis model assessment of insulin resistance level among the 3 groups. The plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentration was significantly lower while leptin, advanced oxidation protein products, and interleukin-6 showed downward trends in the KG3 group. In addition, the superoxide dismutase level of the KG3 group was significantly higher compared to the NC and NG3 groups.

**Conclusion:** This study indicates that KG can be considered as a valuable source of phytosterol components. Lastly, KG has strong antioxidant properties and may have potential to ameliorate elevation of proinflammatory cytokine production with age.

**Keywords:** antioxidants, functional food, cytokines, phytosterols, rice

## 서론

쌀은 아시아 국가의 주요 식량자원으로서 생활에 필요한 에너지 공급을 위한 영양원으로 인식이 되었으나, 최근 쌀의 생리적 효능이 다양하게 규명되면서 쌀의 고부가가치화를 위하여 쌀의 2차, 3차 기능성을 증진시키는 방향으로의 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 즉 품종 개량을 통하여 기능이 강화된 신품종 개발 [1-5]과 가공성 증진 병용 [6,7]에 의한 건강증진용 쌀가공 식품의 다양화 그리고 생리활성 효능 검증을 통한 건강기능성 신소재로서의 개발 [8-10] 등이 진행되고 있다. 이러한 노력의 결과 품종 개량을 통하여 아밀로오스 함량이 높은 고아미 2호 [5], 일반 품종 보다 배아가 큰 거대배아미 [3] 및 안토시아닌 색소 함량이 증대된 자미 품종 [1,2,4] 등이 육종되었고, 이들 쌀 품종을 활용하여 다양한 종류의 쌀가공 식품 개발 [11-13] 및 쌀의 건강기능성 식품 소재화 등이 이루어지고 있다.

쌀과 쌀의 부산물 생산량을 볼 때 1 kg 당 배유 700 g, 왕겨 200 g, 미강 80 g, 배아 20 g 정도이다 [14]. 쌀의 일반 성분을 비교해 보면 배아는 수분과 당질을 제외한 lipid, protein, fiber, ash의 함량이 배유보다 월등히 많다고 보고되었으며 [15], flavonoid, carotenoids, phenolic compounds, phytosterols, vitamin E isoforms,  $\gamma$ -oryzanol, coumaric acid, phytic acid, tricin 등 대부분 생리활성 성분은 미강과 배아에 함유되어 있다 [16]. 또한 쌀의 주요 phytosterols은  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol 및  $\Delta^7$ -avenasterol로 구성되어 있으며 [17], Yoshida와 Niki [18]의 연구에 따라 phytosterols은 화학적으로 항산화제, radical scavenger, 물리적으로 세포막에서 stabilizer로 작용한다고 보고되었다. 한편, 배아를 소재로 한 연구에서 일반미 품종의 배아오일을 보충 급여하는 경우에 당뇨 개선 및 지질대사 개선 효과를 보였다는 결과가 있었다 [19,20]. Cho 등 [21]의 연구에서 고콜레스테롤 식이 흰쥐 모델에 쌀 배아를 첨가함으로써 간의 항산화효소의 활성을 증가시켜 지질과산화물 축적을 감소시켰음을 확인하였다.

본 연구의 소재로 사용한 큰눈자미는 기능성 유색미로서 cyanidin 3-glucoside 함량이 높을 뿐 아니라 배아의 크기가 일반 벼에 비해 약 3배정도 큰 것이 특징이다 [22]. 과피의 색소가 흑자색이므로 높은 플라보노이드 화합물 함량으로 인해 생리활성 효능이 더욱 긍정적인 것이라 기대된다. 따라서 본 연구자들은 고기능성 쌀 품종으로 육종한 큰눈자미벼를 분획별로 나누어 건강 증진용 식품으로의 활용 방안을 모색하는 것이 쌀의 고부가가치화를 이끌 수 있을 것이라 생각하며, 영양가치가 높은 배아 분획의 phytosterols 함량, 항산화 활성을 측정하고, 성숙기 흰쥐에게 보충 급여하였을 때의 당질 대사, 항산화능 및 일부의 cytokines 개선 여부를 각각 검증하여 중년 이후 성인의 항산화 관련 대사 개선을 위한 건강 기능성 식품 소재화 가능성을 검토하고자 한다.

## 연구방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 큰눈자미는 한국방송통신대학교 농학과에서 현미상태로 제공을 받았다. 도정 과정을 걸쳐 미강 부분을 제외한 배아와 배유가 섞인 상태에서 수작업으로 배유를 걸러낸 후에 배아를 거두어 실험에 사용하였다. 일반현미 배아는 국내 일반마트 (Emart, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 시약

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), n-hexane, dimethyl sulfoxide (DMSO), 5-cholestane, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium hydroxide (KOH), sodium phosphate, potassium hexacyanoferrate (III) (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), trichloroacetic acid (TCA), iron (III) chloride (FeCl<sub>3</sub>), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, L-ascorbic acid, β-sitosterol, campesterol, cycloartenol, stigmasterol는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, methanol (MeOH), ethanol는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

### 배아 추출물 제조

Phytosterols 정량 분석용 배아는 일부 수정한 Kwon 등 [23]의 방법에 따라 추출하였다. CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1, v/v) 혼합용매 100 mL에 배아 파우더 10 g을 첨가한 후 sonicator (Sinhan-Sonic, Incheon, Korea)에 넣어 상온에서 2시간 동안 추출하였다. 추출은 총 2회 실시하였고 추출액을 모아 Whatman GF/A glass fiber filter paper (Whatman, Maidstone, UK)로 필터링한 후에 rotary evaporator (N-1110; EYELA, Tokyo, Japan)에 넣어 30°C에서 농축시켰다. N-hexane 10 mL를 가하고 필터링 처리하며 다시 농축시켜 oil 형태를 얻었다. Oil 시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

항산화 효과 측정용 배아 추출은 Butsat과 Siriamornpun [24]의 방법에 따라 수정하여 진행하였다. Eighty percent MeOH 20 mL에 배아 파우더 2 g을 가하고, incubator (WSB-45; DAIHAN Scientific, Wonju, Korea)에 넣어 상온에서 150 rpm로 16시간 동안 교반 시키면서 총 2번 추출하였다. 추출액을 centrifuge (Mega 17R; Hanil Scientific Inc, Gimpo, Korea)로 4°C, 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 Whatman No.4 filter paper (Whatman)로 필터링하였다. 여과액을 rotary evaporator에 넣어 40°C에서 농축한 후 동결건조하여 분석전까지 -70°C에 보관하였다.

### Phytosterols 정량 분석

Phytosterols 함량은 Kwon 등 [23], Park과 Lee [25]의 방법에 따라 수정하여 분석하였다. 2 N KOH (dissolved in ethanol)용액 2 mL에 배아 oil 샘플 0.1 g을 가하고 incubator (WB-11, DAIHAN Scientific)에 넣어 100°C에서 15분간 비누화시켰다. 샘플을 냉각시켜 증류수와 n-hexane을 각각 2 mL를 가하고 상층액인 n-hexane 층을 분리한 후 다시 n-hexane 2 mL를 넣었다. 분리된 n-hexane 층을 모아 sodium sulfate anhydrous로 탈수시켜 5-cholestane (1 mg/1 mL in n-hexane) 100 µL를 넣은 후 GC-MS (Gas Chromatograph Mass Spectrometer, 7890B-5977B GC/MSD; Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다.

**항산화 활성 측정**

DPPH radical 소거 활성을 이용하는 전자공여능 측정은 Blois [26]의 방법에 따라 수정하여 진행하였다. 동결건조된 배아 샘플을 농도별로 DMSO에 녹인 후 0.12 mM DPPH (dissolved in ethanol) 용액 500 µL를 가하고 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 시료무첨가군의 흡광도의 차이를 백분율 (%)로 나타냈으며, 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{electron donating ability (\%)} = \left[ \frac{1 - (\text{absorbance value of sample} - \text{absorbance value of sample control})}{\text{absorbance value of control}} \right] \times 100$$

환원력 (reducing power) 측정은 Oyaizu [27]의 방법에 따라 수정하여 진행하였다. 배아 샘플과 0.2 M phosphate buffer 100 µL, 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 100 µL를 혼합하고 incubator에 넣어 50°C에서 20분간 반응시킨다. 이후 10% TCA 100 µL를 가하여 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 100 µL를 분리하고 증류수 100 µL와 0.1% FeCl<sub>3</sub> 20 µL를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS radical 소거능 측정은 Re 등 [28]의 방법에 따라 수정하여 진행하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 상온 암소에서 하루 동안 방치하여 ABTS 이온을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 1.4-1.5까지 될 때까지 증류수로 희석하였다. 배아 샘플과 standard인 L-ascorbic acid에 ABTS 용액 10 mL를 가하여 30분간 반응시키다가 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료첨가군과 시료무첨가군의 흡광도의 차이를 µg ascorbic acid equivalents (AAE)로 나타내었다.

**실험동물 및 실험디자인**

생후 30주령 수컷 Sprague-Dawley rats 30마리를 (주)중앙실험동물 (Seoul, Korea)에서 공급받아 1주일간 고형식이를 급여하여 주변환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 동물 사육실 환경은 온도 25 ± 2°C, 습도 50 ± 5%, 명암주기 12시간 간격으로 유지하였다. 동물 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (승인번호: 2018-0036)을 받아 진행하였다. 1주일 후 체중을 유사하도록 randomized block design을 이용하여 10마리씩 3군으로 배분하였다. 실험식이 디자인은 Kawabata 등 [29]의 diet 구성을 참고하여 수행하였다. 식이 조성은 Table 1과 같다. 일반식이 (AIM-93M)를 급여한 정상대조군 (normal control, NC), 일반식이에 일반현미배아 3%를 첨가한 군 (AIM-93M + normal rice germ 3%, NG3), 일반식이에 큰눈자미배아 3%를 첨가한 군 (AIM-93M + Keunnunjami germ 3%, KG3)으로 나누어 고형식이와 식수를 제한없이 8주간 사육하였다. 식이 섭취량은 매일 일정한 시간에 기록하였으며, 체중 및 혈당 변화는 2주마다 측정하였다.

**시료수집**

8주 후 희생 전날 실험동물을 12시간 절식시켜 CO<sub>2</sub> 가스로 흡입 마취한 후 헤파린이 처리된 주사기로 복부 하대 정맥에서 채취한 혈액을 4°C, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 얻은 후 분석전까지 -70°C에 보관하였다.

**Table 1.** Composition of experimental diets (%)

Components	Experimental diets		
	NC	NG3	KG3
Casein	14.00	13.48	13.32
Sucrose	10.00	10.00	10.00
Dextrose	15.50	15.50	15.50
Corn starch	46.57	45.14	45.59
Cellulose	5.00	4.68	4.41
Soybean oil	4.00	3.27	3.26
NG	-	3.00	-
KG	-	-	3.00
Mineral mix	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.18	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
TBHQ	0.0008	0.0008	0.0008
Total	100.00	100.00	100.00

NC, normal control diet (AIN-93M); NG3, AIN-93M + normal rice germ 3%; KG3, AIN-93M + Keunnunjami germ 3%; NG, normal rice germ; KG, Keunnunjami germ; TBHQ, tertiary butylhydroquinone.

### 혈액의 생화학적 분석

혈중 glucose 수준은 kit (Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)로 측정하였고, 혈중 인슐린, 당화혈색소, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD)는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (MyBioSource, San Diego, CA, USA)로 측정하였다. 혈중 C-peptide, leptin, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 수준은 ELISA kit (Fine Biotech Co., Wuhan, China)로 측정하였다. 혈장 advanced oxidation protein products (AOPP)는 ELISA kit (Sunlong Biotech Co., Hangzhou, China)를 구입하여 측정하였다.

### 통계분석

통계분석은 SPSS (ver.25; IBM Corp., Armonk, NY, USA) 프로그램을 사용하여 실험결과를 mean  $\pm$  SE로 구하였다. In vitro 실험에서 배아군들 간의 유의성 검정은 Independent samples t-test로 하였고, In vivo 실험에서 대조군 및 배아 섭취군들 간 유의성 차이는 p < 0.05 수준에서 Tukey's range test를 이용하여 실시하였다.

## 결과

### Phytosterols 함량

일반현미 배아 (NG)와 큰눈자미 배아 (KG)의 phytosterols 함량 측정결과는 **Table 2**에 나타내었다.  $\beta$ -sitosterol의 함량은 NG가 0.83 mg/g, KG가 0.80 mg/g로 나타났으며, cycloartenol의 함량은 NG가 0.28 mg/g, KG가 0.27 mg/g로 유의적인 차이가 없었다. Campesterol의 함량은 NG

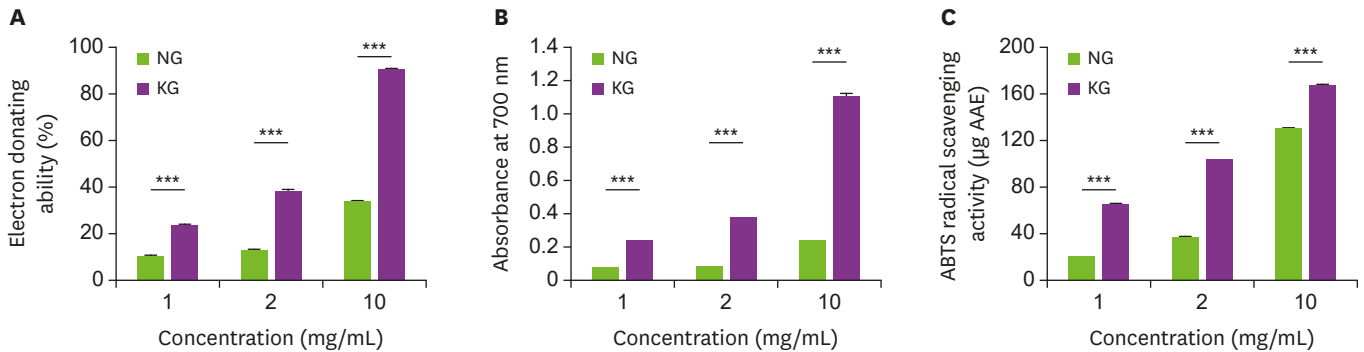
**Table 2.** Phytosterol contents of NG and KG powder (mg/g powder)

Phytosterols	NG	KG
$\beta$ -sitosterol	0.83 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.04
Campesterol	0.15 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.02**
Cycloartenol	0.28 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02
Stigmasterol	0.10 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01*

Values are expressed as means  $\pm$  SE.

NG, normal rice germ; KG, Keunnunjami germ.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 by independent sample t-test.



**Fig. 1.** Antioxidant activities measurement of KG. (A) electron donating ability, (B) reducing power, (C) ABTS radical scavenging activity. Values are expressed as means  $\pm$  SE. NG, normal rice germ; KG, Keunnunjami germ;  $\mu$ g AAE,  $\mu$ g ascorbic acid equivalents. \*\*\* $p < 0.001$  by independent sample t-test.

가 0.15 mg/g에 비해 KG가 0.33 mg/g로 2배 높게 나타났다 ( $p < 0.01$ ). Stigmasterol의 함량은 NG가 0.10 mg/g, KG가 0.14 mg/g로 나타났으며 KG가 유의하게 높았다 ( $p < 0.05$ ).

### 항산화 활성 측정

일반현미와 큰눈자미 배아 메탄올 추출물에 대한 항산화 활성 측정결과는 Fig. 1과 같다. 전자공여능은 10, 2, 1 mg/mL 농도에서 NG는 33.60%, 12.81%, 10.52%, KG는 90.42%, 38.40%, 23.66%으로 나타나 큰눈자미 배아군에서 유의하게 높은 활성을 보였다 ( $p < 0.001$ ). 환원력을 측정할 결과 10, 2, 1 mg/mL 농도에서 NG의 흡광도 값은 0.24, 0.08, 0.07로 나타났으며, KG는 1.11, 0.38, 0.24로 나타나 NG에 비해 유의적으로 높았다 ( $p < 0.001$ ). ABTS radical 소거능도 10, 2, 1 mg/mL 농도에서 NG가 각각 130.34  $\mu$ g AAE, 36.95  $\mu$ g AAE, 19.66  $\mu$ g AAE로 측정되었으며, KG는 각각 167.57  $\mu$ g AAE, 103.00  $\mu$ g AAE, 65.49  $\mu$ g AAE로 유의적 높은 값으로 나타났다 ( $p < 0.001$ ).

### 체중 변화, 식이 효율 및 부위별 지방 무게

체중 변화, 식이 효율 및 부위별 지방 무게 측정결과는 Table 3과 같다. 실험을 시작할 때와 종료 시의 체중은 세 군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 체중 증가량은 NC군이 0.92 g/day, NG3군이 1.03 g/day에 비해 KG3군이 0.55 g/day로 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 식이

**Table 3.** Changes in body weight, food intake and white adipose tissue weight of aged rats treated with Keunnunjami germ

Group	NC	NG3	KG3
<b>Body weight</b>			
Initial weight (g)	546.78 $\pm$ 7.87 <sup>3)</sup>	541.08 $\pm$ 13.54	543.16 $\pm$ 14.13
Final weight (g)	598.44 $\pm$ 11.13	599.00 $\pm$ 6.71	573.92 $\pm$ 12.95
Weight gain (g/day)	0.92 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Food intake (g/day)	21.47 $\pm$ 0.06	21.25 $\pm$ 0.66	22.19 $\pm$ 0.47
FER (%) <sup>1)</sup>	4.30 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	4.91 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	2.48 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
<b>White adipose tissue weight</b>			
Perirenal (g)	23.49 $\pm$ 1.14	21.79 $\pm$ 1.03	20.13 $\pm$ 0.91
Inguinal (g)	17.91 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	15.96 $\pm$ 0.80 <sup>ab</sup>	14.02 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>
Total (g) <sup>2)</sup>	41.40 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	37.75 $\pm$ 1.30 <sup>ab</sup>	34.15 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>

Values with different letters in the same row are significantly different by Tukey's range test ( $p < 0.05$ ).

NC, normal control diet (AIN-93M); NG3, AIN-93M + normal rice germ 3%; KG3, AIN-93M + Keunnunjami germ 3%; FER, food efficiency ratio.

<sup>1)</sup>FER (%) =  $\frac{\text{weight gain per day (g)}}{\text{food intake per day (g)}} \times 100$  <sup>2)</sup>Total = perirenal + inguinal. <sup>3)</sup>Means  $\pm$  SE of 10 rats per group.

**Table 4.** Plasma insulin, C-peptide level and HOMA-IR of aged rats treated with Keunnunjami germ

Group	NC	NG3	KG3
Glucose (mg/dL)			
Initial	95.70 ± 2.57	95.49 ± 1.60	96.52 ± 2.21
Final	98.36 ± 1.06	105.12 ± 3.56	93.44 ± 3.75
Insulin (μIU/mL)	5.39 ± 0.06	5.55 ± 0.19	5.40 ± 0.07
C-peptide (ng/mL)	1.07 ± 0.04	1.14 ± 0.06	1.18 ± 0.04
HOMA-IR <sup>1)</sup>	1.31 ± 0.03	1.44 ± 0.06	1.24 ± 0.06

Values are expressed as means ± SE.

NC, normal control diet (AIN-93M); NG3, AIN-93M + normal rice germ 3%; KG3, AIN-93M + Keunnunjami germ; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

$$^1) \text{HOMA-IR} = \left[ \frac{\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose (mg/dL)}}{405} \right]$$

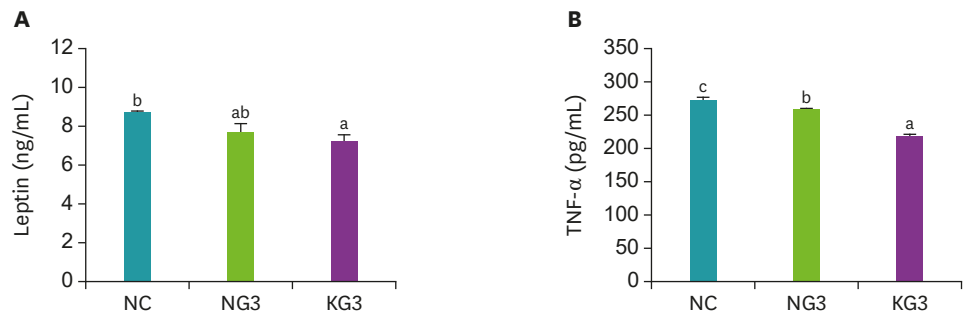
섭취량은 차이가 없었으며, 식이효율 (food efficiency ratio)은 KG3군이 2.48%로 NC군이 4.30%, NG3군이 4.91%에 비해 유의하게 낮았다 ( $p < 0.05$ ). 지방조직들의 무게의 경우 신장주위의 지방은 세 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 사타구니와 총지방은 NC군이 각각 17.91 g, 41.40 g에 비해 KG3군이 14.02 g, 34.15g로 유의하게 낮았다 ( $p < 0.05$ ).

### 혈당 변화, 인슐린 및 C-peptide 수준

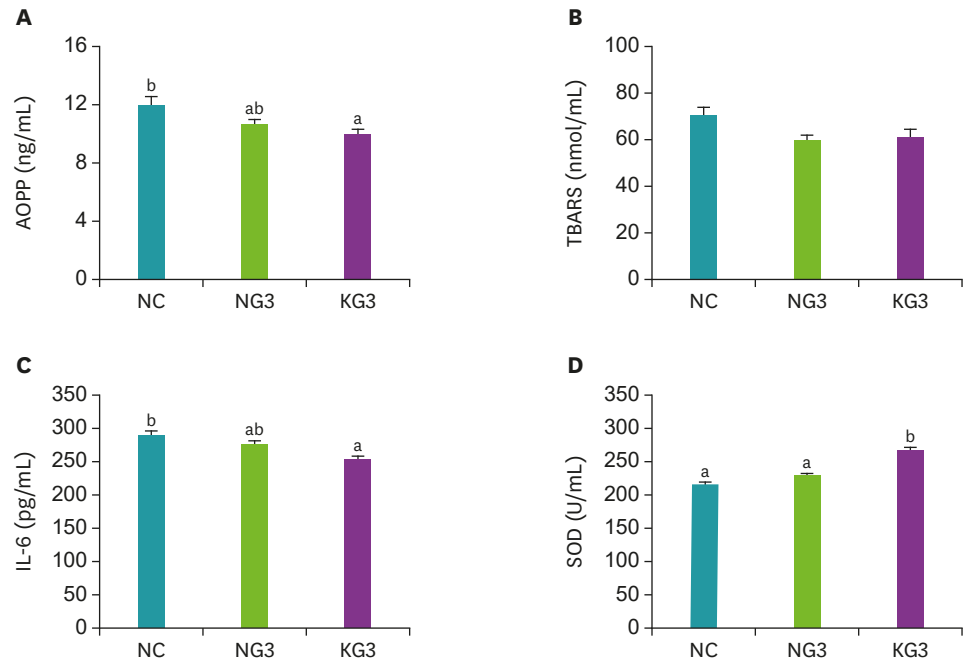
혈당 변화는 실험 시작한 시점이 종료한 시점과 비교했을 때 세 군 사이에 유의적 차이가 없었으나, NG3군에서 약간 증가하는 경향을 보였다. 인슐린, C-peptide 및 인슐린저항성 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)은 모든 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 4).

### Leptin, TNF-α 수준

혈장 leptin과 TNF-α의 측정 결과는 Fig. 2에 나타냈다. Leptin 수준은 NC군이 8.69 ng/mL, NG3군이 7.68 ng/mL, KG3군이 7.23 ng/mL로 나타나 NC군에 비하여 NG3군이 유의적인 차이를 보이지 않았으나, KG3군이 유의하게 낮은 값으로 나타났었다 ( $p < 0.05$ ). TNF-α 수준은 NC군이 273.77 pg/mL, NG3군이 259.42 pg/mL에 비해 KG3군이 219.01 pg/mL로 나타나 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Plasma leptin, TNF-α concentration of aged rats treated with Keunnunjami germ. Values are expressed as means ± SE. Mean values with the different letters are significantly different by Tukey's range test ( $p < 0.05$ ). NC, normal control diet (AIN-93M); NG3, AIN-93M + normal rice germ 3%; KG3, AIN-93M + Keunnunjami germ 3%; TNF-α, tumor necrosis factor-α.



**Fig. 3.** Plasma AOPP, TBARS, IL-6, SOD concentration of aged rats treated with Keunnunjami germ. Values are expressed as means ± SE. Mean values with the different letters are significantly different by Tukey's range test ( $p < 0.05$ ). NC, normal control diet (AIN-93M); NG3, AIN-93M + normal rice germ 3%; KG3, AIN-93M + Keunnunjami germ 3%; AOPP, advanced oxidation protein products; TBARS, thiobarbituric acid reactive substance; IL-6, interleukin-6; SOD, superoxide dismutase.

### AOPP, TBARS, IL-6 및 SOD 수준

혈장 AOPP, TBARS, IL-6 및 SOD의 측정 결과는 Fig. 3에 나타내었다. AOPP는 NC군이 11.97 ng/mL에 비해 NG3군이 10.62 ng/mL로 유의적인 차이가 없었으나, KG3군이 10.01 ng/mL로 나타나 유의하게 낮았다 ( $p < 0.05$ ). TBARS는 세 군 사이에 통계학적 유의성을 보이지 않았다. IL-6은 NC군이 288.20 pg/mL에 비해 NG3군이 274.51 pg/mL로 유의한 차이를 보이지 않았으나, KG3군이 251.91 pg/mL로 나타나 유의적으로 낮은 값을 보였다 ( $p < 0.05$ ). SOD는 NC군이 214.29 U/mL, NG3군이 229.10 U/mL, KG3군이 266.33 U/mL로 나타났다. NC군에 비해 NG3군이 유의적 차이가 없었으나, KG3군이 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

### 고찰

노화가 진행되면서 항산화 방어의 감소로 생성된 체내 과산화물은 산화성 스트레스를 증가시켜 세포막 등 조직에 손상을 줄 수 있고, 이는 대사질환의 주요 요인 중 하나이다 [30]. Phytosterols는 식물성 식품에서 발견되는 스테롤로 장내 콜레스테롤 흡수를 억제하고, 지질 과산화 저해효과가 있으며,  $\beta$ -linoleoyl- $\gamma$ -palmitoyl phosphatidylcholine liposomal membranes에서  $\alpha$ -tocopherol이 산화를 방지하여 항산화뿐만 아니라 관상동맥 질환을 예방할 수 있다 [18,31]. 쌀에 함유되어 있는 phytosterols은  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol 순으로 비율이 높는데 [17], 본 실험결과 이와 유사한 경향을 보였으며 특히, 일반현미에 비해 큰눈자미에서 유의하게 높은 것으로 확인되었다.



현미의 phytosterol을 포함한 혼합 식이를 고혈압 쥐에게 3주간 섭취시키면서 혈압과 지질변화를 측정하고, 체중 및 부고환지방, 간조직 중 총 지질, 중성지방 및 콜레스테롤 함량, 신장 TBARS 수준이 감소하였고, HDL 콜레스테롤이 증가하여 항고혈압성 효과, 지질 대사 개선, 항산화 효과를 보고하였다 [32]. 이외에 campesterol은 콜레스테롤 강하, 항발암성, 항혈관 형성 (antiangiogenic) [33] 작용이 있으며 stigmasterol은 항관절염 [34], 혈당 강하 [35], 기억력 개선 [36], 호르몬 합성 참여 [37] 등 효능이 있다는 보고가 있다.

DPPH radical 소거 활성 측정은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화를 억제하는 방법으로 사용되고, 환원력은 항산화 작용의 다양한 메커니즘에서 활성 산소종 및 유리 라디칼에 전자를 공여하는 능력을 말하며, ABTS radical 소거능 측정은 ABTS를 peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS<sup>+</sup>이 형성되는데 추출물의 항산화 물질에 의해 양이온 라디칼이 소거되어 항산화 활성을 평가할 수 있다 [38]. Wang 등 [39]은 쌀 미강에서 추출한 오일 보다 쌀 배아에서 추출한 오일에서 더 우수한 항산화 활성을 있음을 보고 하였고, Moongnarm 등 [40]의 연구에서 쌀 배아는 겨, 미강에 비해 α-tocopherol과 γ-tocopherol이 더 많이 함유되어 있을 뿐 아니라 이는 높은 항산화능이 있다고 보여주었다. 또한 쌀 배아를 첨가한 스낵은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성이 높은 결과를 보였다는 결과를 나타내었다 [41]. 이어 본 연구에서 DPPH radical 소거 활성, 환원력, ABTS radical 소거능을 측정하고, 일반 현미 배아 보다 큰눈자미 배아의 항산화 활성이 더 우수함을 확인하였다.

Cytokines 중 하나인 leptin은 지방 조직에서 합성되는 호르몬으로 뇌에 작용하여 체지방률 조절에 대한 메시지를 전달하는데, 체지방량과 양의 상관성을 가지기 때문에 체지방량이 감소에 따라 혈중 leptin의 농도도 줄어든다 [42]. 한편, leptin은 macrophages를 자극하여 TNF-α, IL-6, IL-12와 같은 염증사이토카인의 발현을 유도시킨다 [43]. TNF-α는 염증반응의 주요 초기 인자로 세포를 공격하여 조직 손상을 유발시키고, IL-6는 염증반응과정에서 정상 상태에서 낮은 수준으로 유지하고 있으나, 감염, 천식, 스트레스 등의 원인으로 의해 발현이 유도되어 증가하게 된다 [44]. 본 실험결과 큰눈자미 배아 보충급여에 의해 체중 증가가 감소되었고, TNF-α 수준은 유의적으로 낮았으며, leptin과 IL-6 수준은 일반 현미 배아보다 유의적 차이를 보이지 않았지만 감소하는 경향을 보인 것으로 관찰되었다.

산화는 신진대사의 중요한 부분 중 하나로 면역반응, 세포사멸 및 유전자 발현 등 체내 생화학적 과정에서 자유 라디칼 (free radicals)이 자연적으로 생성되는데, 이것은 활성산소종 (reactive oxygen species), 반응성 질소종 (reactive nitrogen species)을 포함하고, 정상 생리학적 조건에서 활성산소 (oxygen free radicals) 발생과 항산화 방어 간에 균형을 유지하고 있는데 균형을 깨뜨리는 주요 원인은 산화스트레스 (oxidative stress)이다. 자유 라디칼은 DNA를 비롯한 단백질과 지질세포 등의 산화적 손상을 초래한다 [45]. 산화매개성 단백질 손상지표인 AOPP는 아미노산 잔기 즉, tyrosine이 dityrosine으로 산화되면서 단백질이 aggregation, cross-linking 또는 fragmentation을 형성하면서 정상적인 단백질 분해가 일어나지 않아 생성되는데, 비만과 당뇨병 환자에게서 증가하기 때문에 산화스트레스와 염증으로 유발되는 조직 손상의 신뢰성 있는 마커로 알려져 있다 [46]. 본 연구에서 일반 현미와 큰눈자미 배아 보충급여를 했을 때 AOPP 수준은 유의적 차이가 없었지만 감소하는 경향을 보였다. TBARS는 활성산소가 세포막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 반응물인 malondialdehyde (MDA)를 측정함으로써 세포의 산화적 스트레스 및 과산화 정도를 확인할 수 있는데,

MDA가 축적되면 세포막의 형태가 변형되어 이온수송, 효소활성 및 세포표면 부착상태를 변형시키고, 또한 DNA의 염기와 반응하여 돌연변이성 병변을 일으킨다고 알려져 있다. SOD는 세포내에서 생성되는 superoxide anion radical을 과산화수소로 전환시킴으로써 catalase, glutathione peroxidase와 함께 세포의 손상을 스스로 보호한다 [47]. 노화가 진행되고 있는 성숙쥐 모델에서 항산화 대사 활성 및 biomarker 분석을 통해 큰눈자미 배아 섭취군에서 항산화 활성이 높은 것으로 확인하였고 이는 항산화 관련 기능성 식품소재로서의 가능성이 있을 것으로 판단된다.

연구 결과를 종합하면 in vitro 실험에서 큰눈자미 배아의 campesterol, stigmasterol 함량이 높고, DPPH radical 소거 활성, 환원력, ABTS radical 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 그리고 성숙기 흰쥐 모델에서 큰눈자미 배아 보충급여는 체중 증가량과 체지방량이 감소된 것을 관찰하였으나, 혈당 변화, insulin 및 C-peptide 수준으로 평가한 당질 대사에 미치는 영향은 제한적이다. 또한, TNF- $\alpha$ 의 유의적 감소 및 SOD 활성이 유의하게 차이가 있음을 확인하였으며, leptin, AOPP 및 IL-6 수준이 감소되는 경향을 보였다.

## 요약

본 연구에서는 고기능성 쌀인 큰눈자미 배아의 phytosterols 함량 및 in vitro 항산화 활성을 평가하고, 성숙기 흰쥐에게 보충 급여한 당질 대사, 항산화 활성 및 일부 cytokines 개선 효과 여부를 검증하였다. Phytosterols 분석에서 NG보다 KG의 campesterol과 stigmasterol의 함량이 유의하게 높았다. NG에 비해 KG가 DPPH radical 소거 활성, 환원력 및 ABTS radical 소거능 측정에서 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 실험동물은 각 10마리씩 3군으로 나누어 일반 식이를 급여하는 NC군, 일반현미배아 3%를 첨가하는 NG3군, 큰눈자미배아 3%를 첨가하는 KG3군으로 나누어 사육하였다. 그 결과 KG3군에서 체중증가량, 신장주위 및 총 지방량이 유의하게 감소하였다. 당질 대사에서 실험군들 간에 glucose, 인슐린, C-peptide 및 HOMA-IR의 수준이 유의적인 차이가 나타나지 않았다. KG3군에서 혈중 TNF- $\alpha$  수준이 NG3에 비해 유의적으로 감소하고, SOD 활성이 유의하게 증가하였으며, leptin, AOPP 및 IL-6 수준이 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로부터 큰눈자미 배아는 높은 함량의 phytosterols과, 우수한 in vitro 항산화활성, 그리고 in vivo 실험에서 일부의 cytokine 개선 및 항산화에 긍정적인 효과가 있음을 제시하였고 향후 더 많은 생리활성물질 분석, 대사 지표 개선, 작용 기전 규명 등 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Kim HY, Kim JH, Lee SA, Ryu SN, Han SJ, Hong SG. Antioxidative and anti-diabetic activity of C3GHi, novel black rice breed. Korean J Crop Sci 2010; 55(1): 38-46.
2. Ham TH, Kwon SW, Ryu SN. A early maturing and high contents of cyanidin 3-glucoside(C3G) rice variety 'Pareunsuperjami'. Korean J Breed Sci 2016; 48(4): 535-540.
3. Koh HJ, Park SJ, Won YJ, Heu MH. Nutritional and agronomic characteristics of super-giant embryo mutant in rice. Korean J Crop Sci 1993; 38(6): 537-544.
4. Park DS, Hwang UH, Park SK, Lee JH, Han SI, Cho JH, et al. A waxy black giant embryo early maturing rice variety 'Nunkeunheugchal'. Korean J Breed Sci 2015; 47(1): 68-74.

CROSSREF

5. Kim KS, Kang HJ, Hwang IK, Hwang HG, Kim TY, Choi HC. Fibrillar microfilaments associated with a high-amylose rice, goami 2, a mutant of ilpumbyeo, a high-quality japonica rice. *J Agric Food Chem* 2005; 53(7): 2600-2608.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Lee EJ, Seo HS, Lee SY, Kim SH, Hwang IK. Quality characteristics of black sesame gruel with high-dietary fiber rice 'Goami 2'. *Korean J Food Cook Sci* 2006; 22(6): 940-948.
7. Han JA. Digestive, physical and sensory properties of cookies made of dry-heated OSA-high amylose rice starch. *Korean J Food Sci Technol* 2009; 41(6): 668-672.
8. Chung SI, Kwon YI, Kang MY. Effects of 'Superhongmi' rice bran extracts on biochemical markers of glycolysis and bone metabolism in ovariectomized rats. *Prev Nutr Food Sci* 2019; 24(2): 144-149.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Nam SJ, Chung SI, Kang MY. Effects of improving plasma lipid profiles and antioxidant metabolism of Superjami extract supplementation. *Korean J Food Nutr* 2019; 32(3): 179-188.
10. Chung SI, Lee SC, Kang MY. Physicochemical properties of giant embryo rice Seonong 17 and Keunnunjami. *Biosci Biotechnol Biochem* 2017; 81(5): 972-978.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Shin DS, Yoo YM, Han GJ, Oh SG. Quality of Tteokbokki tteok prepared by adding various concentration of brown rice. *Korean J Food Preserv* 2016; 23(2): 194-203.  
[CROSSREF](#)
12. Park BH, Jeon ER, Kim SD, Cho HS. Cooking quality characteristics of cooked rice of YenipSambab with pigmented rice. *Korean J Food Preserv* 2012; 19(2): 185-192.  
[CROSSREF](#)
13. Lee YR, Choi YH, Koh HJ, Kang MY. Quality characteristics of brown rice flakes prepared with giant embryonic rice and normal rice cultivars. *Korean J Food Sci Technol* 2001; 33(5): 540-544.  
[CROSSREF](#)
14. Nagendra Prasad MN, Sanjay KR, Shrayva Khatokar M, Vismaya MN, Nanjunda Swamy S. Health benefits of rice bran - a review. *J Nutr Food Sci* 2011; 1: 108.  
[CROSSREF](#)
15. Choi OK, Yun SK, Hwang SY. The chemical components of Korean rice germ. *Korean J Diet Cult* 2000; 15(4): 253-258.
16. Verma DK, Srivastav PP. Bioactive compounds of rice (*Oryza sativa* L.): review on paradigm and its potential benefit in human health. *Trends Food Sci Technol* 2020; 97: 355-365.  
[CROSSREF](#)
17. Zubair M, Anwar F, Ashraf M, Uddin MK. Characterization of high-value bioactives in some selected varieties of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.). *Int J Mol Sci* 2012; 13(4): 4608-4622.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Yoshida Y, Niki E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003; 49(4): 277-280.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
19. Lee SH, Chun HK, Chang SO, Lee YS. Supplementary effect of the rice germ oil on lipid metabolism in diabetic KK mice. *Korean J Community Living Sci* 2003; 14(3): 47-57.
20. Raghuram TC, Rao UB, Rukmini C. Studies on hypolipidemic effects of dietary rice bran oil in human subjects. *Nutr Rep Int* 1989; 39(5): 889-895.
21. 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* 2008; 51(3): 200-206.
22. Han SJ, Kwon SW, Chu SH, Ryu SN. A new rice variety 'Keunnunjami', with high concentrations of cyanidin 3-glucoside and giant embryo. *Korean J Breed Sci* 2012; 44(2): 185-189.
23. Kwon YJ, Lee KT, Yun TM, Choi SW. Effect of heat pretreatment on the functional constituents of rice germ. *J Food Sci Nutr* 2004; 9(4): 330-335.
24. Butsat S, Siriamornpun S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chem* 2010; 119(2): 606-613.  
[CROSSREF](#)
25. Park RK, Lee KT. Optimization for the phytosterol extraction and production of structured lipids from safflower seed. *Korean J Food Preserv* 2003; 10(2): 219-223.
26. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181(4617): 1199-1200.  
[CROSSREF](#)

27. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidant activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr Diet* 1986; 44(6): 307-315.  
**CROSSREF**
28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-1237.  
**PUBMED | CROSSREF**
29. Kawabata K, Tanaka T, Murakami T, Okada T, Murai H, Yamamoto T, et al. Dietary prevention of azoxymethane-induced colon carcinogenesis with rice-germ in F344 rats. *Carcinogenesis* 1999; 20(11): 2109-2115.  
**PUBMED | CROSSREF**
30. Ali SS, Xiong C, Lucero J, Behrens MM, Dugan LL, Quick KL. Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress. *Aging Cell* 2006; 5(6): 565-574.  
**PUBMED | CROSSREF**
31. Ostlund RE Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002; 22(1): 533-549.  
**PUBMED | CROSSREF**
32. Hong KH, Kim IH, Choue EK, Ahn JY, Ha TY. Brown rice phytosterol improves hypertension and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Cult* 2012; 27(5): 535-543.  
**CROSSREF**
33. Choi JM, Lee EO, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Shim BS, et al. Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytother Res* 2007; 21(10): 954-959.  
**PUBMED | CROSSREF**
34. Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(1): 106-116.  
**PUBMED | CROSSREF**
35. Panda S, Jafri M, Kar A, Meheta BK. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia* 2009; 80(2): 123-126.  
**PUBMED | CROSSREF**
36. Park SJ, Kim DH, Jung JM, Kim JM, Cai M, Liu X, et al. The ameliorating effects of stigmasterol on scopolamine-induced memory impairments in mice. *Eur J Pharmacol* 2012; 676(1-3): 64-70.  
**PUBMED | CROSSREF**
37. Kaur N, Chaudhary J, Jain A, Kishore L. Stigmasterol: a comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res* 2011; 2(9): 2259-2265.
38. Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park E, Park HR, et al. Antioxidant activity and inhibition activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of *viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(4): 405-409.  
**CROSSREF**
39. Wang H, Geng H, Tang H, Wang L, Yu D, Wang J, et al. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil from rice germ and its physicochemical properties and antioxidant activity. *J Oleo Sci* 2019; 68(9): 881-891.  
**PUBMED | CROSSREF**
40. Moongngarm A, Daomukda N, Khumpika S. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEE Procedia* 2012; 2: 73-79.  
**CROSSREF**
41. Wu X, Kim E, Choi K, Kim H. Antioxidative and physical characteristics of rice germ added sweet pumpkin rice snack for infants. *J Korean Soc Food Cult* 2018; 33(1): 62-69.
42. Seong SH, Ahn EM, Sohn HS, Baik SH, Park HW, et al. Genistein combined with exercise improves lipid profiles and leptin levels in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *Food Sci Biotechnol* 2007; 16(5): 910-917.
43. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998; 12(1): 57-65.  
**PUBMED | CROSSREF**
44. Choi SP, Kang MY, Nam SH. Inhibitory activity of pigmented rice bran extract to the allergic inflammation in basophilic cell line and peritoneal mast cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2005; 48(4): 315-321.
45. Muller GC, Gottlieb MG, Luz Correa B, Gomes Filho I, Moresco RN, Bauer ME. The inverted CD4:CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. *Cell Immunol* 2015; 296(2): 149-154.  
**PUBMED | CROSSREF**
46. So YS, Kim MI, editors. Effects of walking on AOPP and proinflammatory factors in obese adolescents. *Proceedings of Korean Entertainment Industry Association 2014 Spring Conference*; 2014 May 22-23; Pocheon, Korea. Seoul: Korean Entertainment Industry Association; 2014.
47. Lee SM, Park SY, Jang GS, Ly SY. The protective effects of ethanol extract of wild simulated ginseng on carbon tetrachloride induced acute hepatic injury in mouse. *Korean J Nutr* 2008; 41(8): 701-710.