

품종별 유색미 및 현미 추출물의 항산화 활성 및 지방축적 억제 효과

김민영 · 박혜영* · 이유영* · 이병원* · 김미향* · 이진영* · 이종희** · 강문석*** · 구본철*** · †김현주*

국립식량과학원 증부작물부 수확후이용과 전문연구원, *국립식량과학원 증부작물부 수확후이용과 농업연구사,
국립식량과학원 남부작물부 논이용작물과 농업연구관, *국립식량과학원 증부작물부 수확후이용과 농업연구관

Antioxidant and Anti-Adipogenic Effects of Colored and Brown Rice Extracts Depending on Cultivars

Min Young Kim, Hye Young Park*, Yu-Young Lee*, Byong Won Lee*, Mi Hyang Kim*, Jin Young Lee*,
Jong Hee Lee**, Moon-Suk Kang***, Bon Cheol Koo*** and †Hyun-Joo Kim*

Post-Doctor, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16613, Korea

*Researcher, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16613, Korea

**Senior Researcher, Department of Southern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Miryang 50424, Korea

***Senior Researcher, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16613, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate antioxidant characteristics and anti-adipogenic effects of colored rice and brown rice extracts in 3T3-L1 adipocyte depending on cultivar (Josaengheugchal, Heugjinmi, Hongjinju, Geongganghongmi, Seolgaeng, Milyang 320, Sindongjin, Baegjinju). Colored rice and brown rice was extracted with 100% ethanol, followed by the analysis of polyphenol, flavonoid, anthocyanin, antioxidant, and anti-adipogenic activity. Total polyphenol and flavonoid content ranged from 6.86~314.08 mg GAE/g and 1.47~56.88 mg CE/g the highest total polyphenol and flavonoid content was observed in Heugjinmi cultivar. Anthocyanin composition was analyzed by HPLC, cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside was found in black rice including Josaengheugchal and Heugjinmi. Also, the ABTS and DPPH radical scavenging activity of colored rice cultivars was higher than that of brown rice cultivars, the highest ABTS radical scavenging activity also was observed in Heugjinmi (128.20 mg TE/g). The anti-adipogenic effects of colored rice and brown rice extracts on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes evaluated that extracts of Heugjinmi cultivar significantly reduced intracellular lipid accumulation. These results provide valuable information for the use of Korean colored rice cultivar as a functional food materials relative to anti-obesity.

Key words: colored rice, brown rice, antioxidant activity, anti-adipogenesis

서론

최근 기능성 식품에 대한 사회적 관심 증가로 쌀에 있어 서도 현미를 비롯하여 유색미와 같은 특수미의 섭취가 증가하고 있다(Salvin 등 1999). 유색미는 차진 질감과 독특한 향미를 지녔을 뿐 아니라, 적갈색, 흑자색, 녹색 등의 과피에는 안토시아닌, 탄닌과 같은 다양한 천연색소를 함유하고 있다(Huang & Lai 2016). 특히 흑미는 페놀화합물을 비롯하여

cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside 종류의 안토시아닌과 같은 플라보노이드 등의 기능성분을 함유하고 있어 강한 산화 방지 활성이 있고(Hou 등 2013), 적미는 탄닌계 색소뿐만 아니라, 카테킨 및 카테콜 등의 다양한 기능성분을 함유하고 있다고 보고되었다(Gunaratne 등 2013). 이외에도 Lee 등(2006)의 연구에 따르면 유색미 품종의 단백질, 식이섬유 및 미네랄이 각각 8.4~10.7%, 3.5~5.9% 및 0.75~0.79%로 일반백미 품종의 4.4~5.8%, 3.5~4.8% 및 0.60~

† Corresponding author: Hyun-Joo Kim, Researcher, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16613, Korea. Tel: +82-31-695-0614, Fax: +82-31-695-0609, E-mail: thrtod@korea.kr

0.66%에 비해 영양적 가치가 월등히 높다. 또한 유색미는 항산화 활성 및 활성산소종에 대한 소거활성(Park 등 2016), DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성(Nam & Kang 1997), 콜레스테롤 흡수 억제(Yao 등 2013), 항암활성(Suganyadevi 등 2013), 면역활성(Kim 등 2011) 및 항노화 효과(Choi & Lee 2018) 등의 생리활성을 가진 것으로 보고되었다.

비만은 과량의 에너지 섭취 또는 에너지 소비 저하로 인한 열량대사의 불균형으로 체내에 지방이 축적되고, 이로 인해 다양한 만성 퇴행성 질환들을 유발하는 원인이 됨으로써 장기적인 관리가 필요한 만성질환 중 하나이다(Eckel RH 1997). 비만의 발생은 지방전구세포의 분화과정에 의하여 지방세포 내의 triglyceride 축적으로 발생된다(Farmer SR 2006; Kim 등 2015). 이러한 지방전구세포의 분화를 저해하기 위하여 운동이나 식이요법을 이용한 방법들이 사용되고 있으며, 특히 식이조절에서 탄수화물 식품류의 종류나 섭취형태가 비만 및 당뇨병 예방과 치료에 중요한 요소로 지적되고 있다. 따라서 한국인이 일상적으로 섭취하는 대표적인 탄수화물 식품인 쌀에 있어서도 지방세포의 분화 및 축적을 억제할 수 있는 특수미에 대한 다양한 연구가 필요한 실정이다.

현재까지 현미 및 유색미의 다양한 기능성이 구명되어 있지만, 국내 육성 유색미의 품종별 안토시아닌을 비롯한 페놀화합물 함량에 따른 항비만 활성 비교에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 육성된 조생흑찰, 흑진미, 홍진주, 건강홍미, 설갱, 밀양 320호, 신동진 및 백진주 등의 유색미 및 일반미 품종의 현미 추출물에 대하여 기능성 성분, 항산화 활성 및 지방분화 억제효과를 검토함으로써 국내 육성 유색미로부터 항비만 관련 기능성 식품 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출물 제조

본 연구에서 사용한 유색미 및 일반미는 총 8종으로 국립식량과학원 중부작물부(경기 수원) 및 남부작물부(경남 밀양) 시험용 포장에서 2017년도에 재배, 수확한 것을 사용하였다. 유색미로는 조생흑찰(cv. Josaengheugchal; JSHC), 흑진미(cv. Heuginmi; HGM), 홍진주(cv. Hongjinju; HJJ) 및 건강홍미(cv. Geongganghongmi; GGHM)로 4종을 분석하였고, 일반미로는 설갱(cv. Seolgaeng; SG), 밀양 320호(cv. Milyang 320; MY320), 신동진(cv. Sindongjin; SDG) 및 백진주(cv. Baegjinju; BGJ)로 4종을 분석하였다. 종피에 색이 있는 유색미는 일반적으로 현미상태로 섭취하기 때문에 유색미의 이용특성을 반영하여 일반미 품종의 현미를 실험재

료로 추가하여 유색미와 비교하였다. 유색미와 일반미는 모두 제현기(Model SY88-TH, Ssangyong Ltd, Incheon, Korea)를 이용하여 왕겨를 분리한 현미 상태로 분쇄하여 추출 시료로 사용하였다. 유색미 및 일반현미는 시료 중량 대비 20 배량의 에탄올(w/v)를 첨가하여 1시간 동안 3회 반복하여 교반추출(Daihan Scientific, Seoul, Korea)하고, 이 추출물을 여과한 후에 감압농축(N-1000, Eycla, Tokyo, Japan)하여 추출물을 100 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해한 다음 증류수 또는 배지로 희석하여 생리활성 측정용 시료로 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(2002)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 각 추출물 100 μ L에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L를 가하였다. 실온에서 30분 방치 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 표준물질로 gallic acid(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL 농도로 희석하여 사용하였으며, 검량선 작성 후 총 폴리페놀 함량은 추출물 1 g 중의 mg gallic acid equivalent(mg GAE/g)로 나타내었다.

3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 변형하여 분석하였다. 추출물 250 μ L에 증류수 1 mL와 5% NaNO_2 75 μ L를 가한 다음 5분 후 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 μ L를 가하여 6분간 방치하고, 1 M 수산화나트륨(NaOH) 500 μ L를 가하여 11분간 방치한 후, 반응액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 (+)-catechin hydrate(Sigma Aldrich)를 사용하여 검량선을 작성 후 총 플라보노이드 함량은 추출물 1 g 중의 mg catechin equivalent(mg CE/g)로 나타내었다.

4. 안토시아닌 함량 분석

안토시아닌 함량은 Choung 등(2008)의 방법에 따라 HPLC(ACME9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하였다. 즉, 일정량의 시료에 0.3% HCl을 포함한 80% 메탄올을 가한 후 25°C에서 1시간 동안 3회 초음파 추출하였으며, 추출물은 2,200 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 100 mL로 정용한 다음 0.45 μ m syringe filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 이동상은 5% formic acid가 포함된 아세트니트릴(A)과 5% formic acid가 포함된 증류수(B)를 gradient 조건으로 흘려주

었고, gradient 조건은 A:B를 초기 10:90(% v/v)에서 24분에 40:60, 25분에 100:0, 28분에 100:0, 29분에 10:90, 40분에 10:90으로 설정하였으며, 유속은 1 mL/min으로 하였고, 주입량은 20 μ L로 설정하였다. 검출기는 UV 520 nm에서, 칼럼은 C-18 column(Mightysil RP-18 GP column, 4.6 \times 250 mm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 칼럼 온도는 30 $^{\circ}$ C로 설정하였다. 표준물질로는 delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-soporoside, cyanidin-3-sambubioside, cyanidin-3-O-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, cyanidin 및 peonidin을 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

5. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS cation decolorization assay 방법(Choi 등 2006)에 의하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulphate를 하루 동안 암소에서 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4가 되도록 물 흡광계수 ($\epsilon=3.6\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 추출액 50 μ L를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 60분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 trolox(Sigma Aldrich)를 사용하였다. 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 mg trolox equivalent(mg TE/g)로 표현하였다.

6. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Hwang 등(2006)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 10 mg/mL 농도의 추출물 0.2 mL에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.8 mL를 가하여 실온에서 60분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 mg trolox equivalent(mg TE/g)로 표현하였다.

7. 세포배양 및 독성 측정

본 실험에서 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% bovine calf serum(Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)와 100 U/mL penicillin G, 50 μ g/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기(EYELA, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)에서 배양하였으며, 세포 밀도가 80% 이상으로 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하였다. 추출물의 세포독성은 Ishiyama 등(1996)의

방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 cell를 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 일정농도가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지를 제거하고, 배지에 일정농도로 희석된 시료를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10 μ L씩 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO 100 μ L를 가한 후 상온에서 발색시킨 다음, ELISA microplate reader(ELx 808, Bio-Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 세포독성은 대조구 대비 세포생존률로 표시하였고, 3T3-L1 cell에서 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 지방축적 억제 효과를 측정하였다.

8. 3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도

실험에 사용된 3T3-L1 preadipocyte의 분화유도 및 성숙 배지로는 10% fetal bovine serum(FBS, HyClone, Logan, UT, USA)과 100 units/mL penicillin 및 50 μ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하였다. Preadipocyte를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 seeding한 뒤 세포가 confluent stage에 도달하면 5 μ g/mL의 insulin(Sigma Aldrich)과 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma Aldrich) 및 1 μ M dexamethasone(Sigma Aldrich)을 첨가한 10% FBS-DMEM을 사용하여 이틀간 분화 유도하였으며, 분화 유도 후 2일 동안 insulin만 첨가한 배지를 이용함으로써 지방세포를 성숙시켰다. 이후 2일 간격으로 10% FBS만이 함유된 DMEM으로 배지를 교환하면서 세포의 지방분화 상태를 확인하였다. 이때 시료의 지방축적 및 분화억제력을 확인하기 위해 다양한 농도로 배지에 첨가하였다.

9. Oil Red O staining

Preadipocyte의 분화 및 성숙 6일 후에 배지를 제거한 뒤 phosphate-buffered saline(PBS)을 이용하여 수차례 세척한 뒤 10% formalin 용액을 이용하여 세포를 고정하고, 세포 내 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 0.3% Oil Red O 용액을 이용하여 염색하였다. 염색된 세포는 현미경 관찰 후 isopropanol을 이용하여 용해한 뒤 495 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

10. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을

이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 산출하고, 품종간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 뒤 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

품종에 따른 유색미 및 현미 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석 결과는 Table 1과 같다. 유색미 추출물의 총 폴리페놀 함량은 19.03~314.08 mg GAE/g 범위로 나타났으며, 현미 추출물은 6.86~10.49 mg GAE/g 범위를 보여 유색미 추출물이 일반 현미 추출물에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 벼 품종별 현미 에탄올 추출물의 항산화성분 및 활성에 대한 Kim 등(2010)의 연구에서 일반 백미 품종인 화선찰벼, 하이아미, 설갱벼, 일품벼 및 삼광벼에 비해 유색미 품종인 홍진주벼 및 흑광벼의 현미 추출물이 미강에 함유되어 있는 안토시아닌 및 탄닌 계열 색소에 의해 총 폴리페놀 함량이 3~5배 이상 높게 나타났다는 결과와 유사하였다. 특히 흑미 메벼 품종인 흑진미 추출물의 총 폴리페놀 함량이 314.08 mg GAE/g으로 유의적으로 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), 홍진주(178.05 mg GAE/g), 건강홍미(123.05 mg GAE/g), 조생흑찰(19.03 mg GAE/g), 신동진(10.49 mg GAE/g), 설갱(8.58 mg GAE/g), 백진주(7.67 mg GAE/g) 및 밀양 320호(19.03 mg

Table 1. Antioxidant component contents of brown and colored rice depending on cultivar

Cultivar	Antioxidant component		
	Total polyphenol content (mg GAE/g)	Total flavonoid content (mg CE/g)	
Colored rice	JSHC ¹⁾	19.03±1.02 ^d	1.47±0.37 ^e
	HGM	314.08±11.76 ^a	56.88±1.56 ^a
	HJJ	178.05±2.77 ^b	35.21±0.53 ^b
	GGHM	123.05±5.08 ^c	25.33±0.50 ^c
Brown rice	SG	8.58±0.28 ^e	1.25±0.43 ^e
	MY320	6.86±0.34 ^e	2.78±0.73 ^d
	SDG	10.49±0.34 ^e	3.28±0.17 ^d
	BGJ	7.67±0.11 ^e	2.85±0.19 ^d

Values are mean±S.D. of three replicates. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different cultivar.

¹⁾ JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heuginmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

GAE/g) 순으로 높은 함량을 보였다. 이는 Park 등(2016)의 연구에서 14종의 유색미에 대한 항산화 활성 분석 결과, 조은흑미 및 신토흑미와 같은 흑미 메벼 품종이 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 보였고, 적미 중에서는 홍진주가 높았으며, 녹원찰과 같은 녹미가 유색미 중 총 폴리페놀 함량이 가장 낮았다는 결과와 유사하였다. 총 플라보노이드 함량은 유색미 품종의 추출물이 1.47~56.88 mg CE/g으로 나타났지만, 일반 백미 품종의 경우 플라보노이드가 1.25~3.28 mg CE/g으로 전체적으로 낮은 범위로 나타났다. 유색미 품종 중에는 흑진미 품종이 56.88 mg CE/g으로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 홍진주(35.21 mg CE/g), 건강홍미(25.33 mg CE/g) 및 조생흑찰(1.47 mg CE/g) 순으로 총 폴리페놀 함량 분석결과와 유사한 경향을 보였다. Kwak 등(2013)은 유색미인 홍진주벼 및 흑광벼에서 일반 현미인 화선벼보다 최대 8배 이상의 높은 플라보노이드 함량을 보여 폴리페놀 함량보다 품종 간 변이가 크다고 보고하였다. 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물은 과일, 채소, 곡류 등의 식품에 함유되어 있는 효과적인 항산화 물질 중 하나이며, 분자 내에 phenolic hydroxyl group이 free radical을 안정화시키기 때문에 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있어(Zang & Tsao, 2016) ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성을 비롯한 다양한 생리활성에 영향을 줄 것으로 판단된다.

2. 안토시아닌 함량

품종에 따른 유색미 및 현미의 안토시아닌 함량 분석 결과는 Table 2와 같이 품종별 유의적인 차이를 나타내었다. 적미 품종인 홍진주 및 건강홍미와 설갱, 밀양320호, 신동진 및 백진주 등의 일반현미에서는 안토시아닌 색소가 검출되지 않았고, 조생흑찰 및 흑진미와 같은 흑미 품종에서는 cyanidin-3-O-glucoside와 peonidin-3-O-glucoside가 검출되었다(Fig. 1). 일반적으로 유색미 종실의 안토시아닌 조성은 cyanidin-3-glucoside, cyanidin 3-rhamnoside, malvidin 3-galactoside, peonidin 3-glucoside 등이 있는데, 이 중 우리나라 유색미 종자에 함유된 안토시아닌은 cyanidin 3-glucoside와 peonidin 3-glucoside가 주된 성분이라고 하였다(Park 등 1998). 안토시아닌이 검출된 흑미 중에는 흑진미 품종의 총 안토시아닌 함량이 2.061 mg/g으로 조생흑찰(0.858 mg/g)에 비해 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$). 또한 구성 안토시아닌 함량의 경우, 흑진미 품종의 cyanidin 3-glucoside와 peonidin 3-glucoside 함량은 각각 1.882 및 0.179 mg/g이었고, 조생흑찰 품종은 각각 0.803 및 0.055 mg/g으로 나타났다. 이러한 결과는 쌀의 안토시아닌 조성은 자색을 나타내는 cyanidin-3-O-glucoside가 90% 이상을 차지하고 있으며, peonidin-3-O-glucoside가 10% 정도를 차지하고 있고, 적미

Table 2. Anthocyanin contents of brown and colored rice depending on cultivar

Cultivar	Anthocyanin content (mg/g)		
	Cyanidin-3-O-glucoside	Peonidin-3-O-glucoside	Total
Colored rice	JSHC ¹⁾	0.803±0.027 ^b	0.858±0.026 ^b
	HGM	1.882±0.045 ^a	2.061±0.050 ^a
	HJJ	ND ²⁾	ND
	GGHM	ND	ND
Brown rice	SG	ND	ND
	MY320	ND	ND
	SDG	ND	ND
	BGJ	ND	ND

Values are mean±S.D. of three replicates. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among different cultivar.

1) JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heuginmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

2) ND: Not detected.

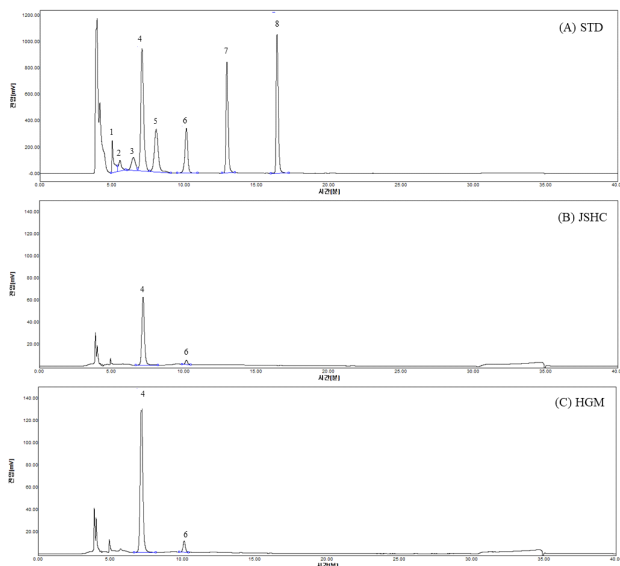


Fig. 1. HPLC chromatogram of anthocyanin standard (A) and sample (B~C) at 520 nm. 1: delphinidin-3-glucoside, 2: cyanidin-3-soporoside, 3: cyanidin-3-sambubioside, 4: cyanidin-3-O-glucoside, 5: petunidin-3-glucoside, 6: peonidin-3-O-glucoside, 7: cyanidin, 8: peonidin. JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heuginmi.

에서는 안토시아닌이 검출되지 않는다는 Seo 등(2011)과 유색미 품종 14종의 안토시아닌 함량 분석결과, 흑미 품종에서 14.83~194.26 mg/100 g 범위로 분포한다는 Park 등(2016)의 연구와 유사한 결과를 보였다. 특히 cyanidin 3-glucoside을 비롯한 안토시아닌 함량이 높게 나타난 흑진미 품종은 흑미와 적미를 교잡 육성하여 흑미의 안토시아닌

과 적미의 폴리페놀을 동시에 다량 함유한 고기능성 품종으로(Bae 등 2019) 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 등의 기능성분에 대한 연구는 다양하게 보고되었지만, 이에 따른 생리활성은 항산화 활성에 대해서만 한정적으로 진행되어 다양한 생리활성에 대한 검토가 필요하다.

3. 항산화 활성

품종에 따른 유색미 및 현미 추출물의 항산화 활성을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 유색미 추출물의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능은 각각 20.24~128.20 mg TE/g 및 9.31~24.83 mg TE/g 범위로 나타났으며, 현미 추출물은 6.36~10.56 및 3.88~5.95 mg TE/g 범위로 나타나 유색미 품종이 일반현미 추출물에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p<0.05$). 이러한 결과는 백미에 비해 유색미에 함유되어 있는 안토시아닌, 탄닌계열 색소에 의해 총 페놀함량이 높게 나타났고, 이에 따라 항산화 활성 또한 우수하다는 Kim 등(2010)의 연구결과와 일치하였다. 유색미 품종 중에는 흑진미의 ABTS 라디칼 소거능이 128.20 mg TE/g으로 가장 높았으며, 홍진주(109.47 mg TE/g), 건강홍미(92.99 mg TE/g) 및 조생흑찰(20.24 mg TE/g) 순으로 높게 나타났는데, 이러한 결과는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 경과와 유사하였다. DPPH 라디칼 소거능의 경우, 흑진미, 홍진주 및 건강홍미가 24.42~24.83 mg TE/g 범위로 나타났고, 조생흑찰이 9.31 mg TE/g으로 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과는 흑진미를 비롯한 흑미 메벼 품종의 총 항산화력과 환원력이 백미, 현미, 적미, 흑미 찰벼 품종에 비해 높았다는 Seo 등(2011)의 결과와 유사하였다. 또한, Park 등(2016)은 적미와 흑미의 라디칼 소거능은 유색미의 종류보다는 품종 간 변이

Table 3. Antioxidant activity of brown and colored rice depending on cultivar

Cultivar	Antioxidant activity	
	ABTS radical scavenging activity (mg TE/g)	DPPH radical scavenging activity (mg TE/g)
Colored rice		
JSHC ¹⁾	20.24±0.95 ^d	9.31±0.21 ^c
HGM	128.20±0.54 ^a	24.42±0.05 ^b
HJJ	109.47±3.15 ^b	24.83±0.03 ^a
GGHM	92.99±1.43 ^c	24.81±0.07 ^a
Brown rice		
SG	8.21±0.15 ^{ef}	4.74±0.17 ^e
MY320	6.36±0.23 ^f	3.88±0.13 ^f
SDG	10.56±0.85 ^e	5.95±0.13 ^d
BGJ	8.61±0.09 ^{ef}	4.79±0.13 ^e

Values are mean±S.D. of three replicates. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among different cultivar.

¹⁾ JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heuginmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

가 크고, 적진주 및 홍진주 등의 적미가 보석흑찰, 눈큰흑찰 등의 일부 흑미 품종보다 항산화 활성이 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 페놀화합물과 안토시아닌을 다량 함유하고 있는 고기능성 유색미 품종인 흑진미에서 항산화 활성이 가장 우수하게 나타난 것으로 판단되며, 이러한 특성은 항비만을 비롯한 다양한 생리활성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

4. 세포 내 지방축적 억제 효과

Lipid droplet은 지방전구세포에서 지방세포로의 분화과정 중 나타나는 비활성 소낭으로 phospholipid monolayer에 둘러싸인 중성지방으로 구성되어 있으며, 중성지방으로 알려진 triglyceride는 음식물로 섭취되어 중요 에너지원으로 사용되나, 여분의 triglyceride는 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용하기 때문에 lipid droplet 생성을 억제하는 것이 항비만 활성의 척도가 된다(Ji 등 2012). 먼저 품종별 유색미 및 현미 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 증식 및 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정된 결과, 200 µg/mL 이하의 농도에서 세포생존율이 모두 90% 이상으로 측정됨에 따라 세포독성이 없음을 확인하여 3T3-L1 세포내의 지방구 축적 억제효과 검증 실험을 진행하였다(Fig. 2). 3T3-L1 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화 유도도와 함께 품종별 유색미 및 현미 추출물을 처리하였으며, 분화 완료된 성숙지방세포

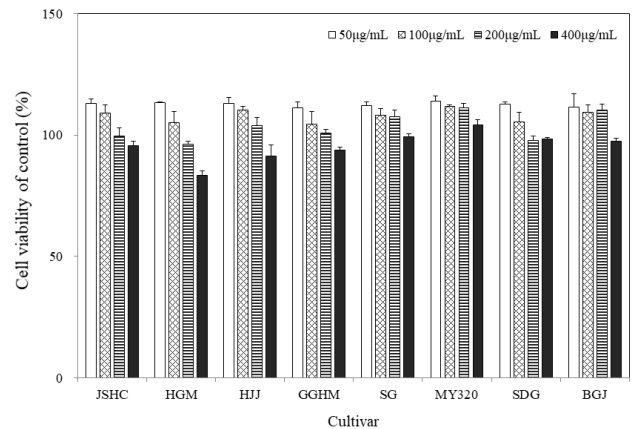


Fig. 2. Cell viability for 3T3-L1 adipocyte cell of brown and colored rice extracts depending on cultivars. Value are mean±S.D. of 4 replicates. Treatment with ≤ 200 µg/mL of brown and colored rice extracts did not affect 3T3-L1 adipocyte cell viability. JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heuginmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

에서 Oil Red O 염색 후 관찰한 결과, 분화 유도제만 처리한 대조군에 비해 모든 품종의 추출물을 처리한 군에서 세포내 lipid droplet 형성이 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한, 조생흑찰을 제외한 유색미 품종의 추출물을 처리한 실험군에서 일반 현미 추출물을 처리한 실험군에 비해 지방구가 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다($p<0.05$). 특히 유색미 중 흑진미 추출물을 성숙세포의 분화유도와 함께 처리할 경우 농도 의존적으로 지방구 생성을 억제하였고, 200 µg/mL 농도로 처리 시에는 대조군에 비해 약 52% 지방구 축적을 저해하여 가장 우수한 항비만 활성을 보였다(Fig. 4). 흑미와 적미를 교잡 육성한 흑진미 품종의 항비만 활성에 대한 연구는 보고된 바 없지만, Callcott 등(2018)은 안토시아닌과 수용성 페놀화합물 함량이 높은 유색미 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 PPAR γ 의 발현량을 억제하여 지방구 생성을 감소시키고, 지방세포의 분화를 억제하였다고 보고하였다. 또한, Tsuda 등(2003)에 따르면 흑진미에 다량 함유되어 있는 cyanidin-3-glucoside와 peonidin-3-glucoside은 adipogenesis의 전사조절인자와 단백질인 C/EBP α , PPAR γ , aP2의 단백질 발현 수준을 감소시켰고, AMPK 활성화를 통해서 지방합성 핵심인자인 PPAR γ 를 억제함으로써 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제한다고 하였다. 이러한 연구결과로 미루어 볼 때, 본 연구에서 3T3-L1 세포내의 지방축적을 억제한 효과는 흑진미 품종에 다량 함유되어 있는

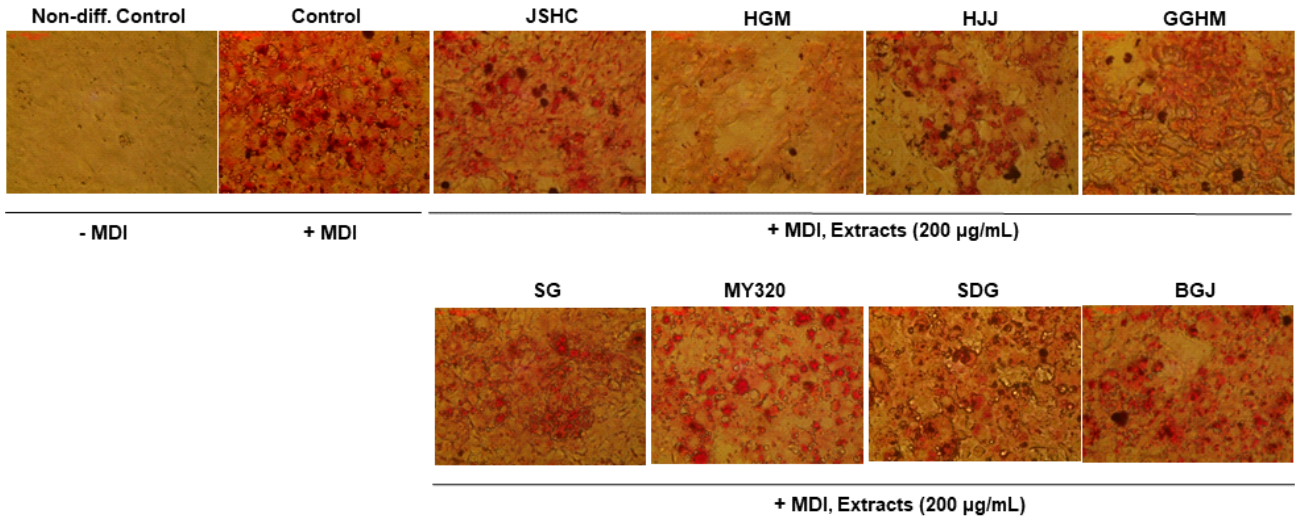


Fig. 3. Effect of brown and colored rice extracts on lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocyte. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Lipid content was measured on day 8 by Oil-Red-O staining method. JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heugjinmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

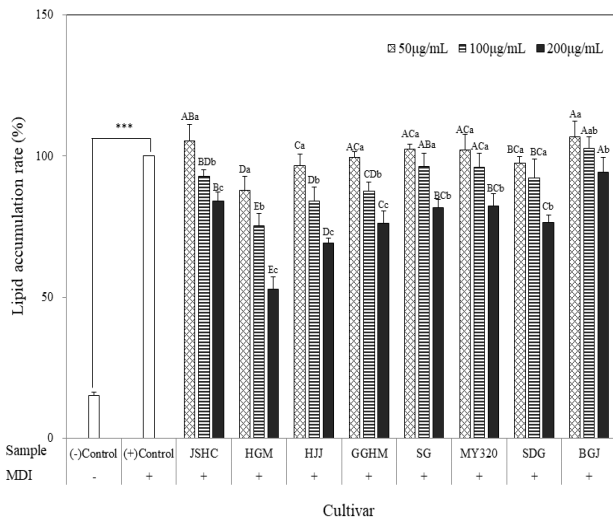


Fig. 4. Effect of brown and colored rice extracts on lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (0~4 days) during differentiation. Assays were performed in triplicate for each treatment. Values are mean±S.D. of 3 replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different cultivars. Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different treatment concentration. JSHC: Josaengheugchal, HGM: Heugjinmi, HJJ: Hongjinju, GGHM: Geongganghongmi, SG: Seolgaeng, MY320: Milyang 320, SDG: Sindongjin, BGJ: Baegjinju.

안토시아닌과 페놀화합물이 adipogenesis의 전사조절인자와 단백질을 조절함으로써 나타난 결과로 판단되므로 향후 이러한 항비만 성분과 메커니즘 구명에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

5. 상관관계 분석

품종에 따른 유색미 및 현미 추출물의 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드함량 및 안토시아닌 함량, cyanidin-3-glucoside (C3G) 및 peonidin-3-glucoside(P3G) 함량, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능, 3T3-L1 세포 내의 지방 축적률 간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 4와 같이 항산화 성분 및 라디칼 소거능이 유의적인 양의 상관관계를 나타내었고, 3T3-L1 세포 내 지방 축적률과는 유의적인 음의 상관관계를 보였다. 즉, 폴리페놀은 ABTS 라디칼 소거능(0.654**), DPPH 라디칼 소거능(0.583**)과 높은 양의 상관관계를 나타내었으며, 플라보노이드 또한 ABTS 라디칼 소거능(0.972**), DPPH 라디칼 소거능(0.905**)과 높은 양의 상관관계를 나타내었고, 안토시아닌은 ABTS 라디칼소거능(0.514**)과 높은 양의 상관관계를 나타내어 항산화 성분과 활성간의 높은 상관성을 확인하였다. 또한, 3T3-L1 세포 내의 지방 축적률과 항산화 성분 간의 상관관계를 살펴보면, 폴리페놀(-0.549**), 플라보노이드(-0.862**), 안토시아닌(-0.664**), C3G(-0.660**) 및 P3G(-0.703**)과 모두 유의적으로 높은 음의 상관관계를 보여, 안토시아닌을 비롯한 페놀화합물 함량이 높은 품종일 수록 3T3-L1 지방전구세포 내의 지방 축적률이 감소하여

Table 4. Correlation coefficients among total polyphenol (TPC), flavonoid contents (TFC), cyanidin-3-O-glucoside (C-3-G), peonidin-3-O-glucoside (P-3-G), total anthocyanin contents (TAC), ABTS and DPPH radical scavenging activity, lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes of colored and brown rice depending on cultivars

Factor	TPC	TFC	C-3-G	P-3-G	TAC	ABTS	DPPH	Lipid accumulation
TPC	1	0.734**	0.701**	0.746**	0.705**	0.654**	0.583**	-0.549**
TFC		1	0.651**	0.697**	0.655**	0.972**	0.905**	-0.862**
C-3-G			1	0.993**	1.000**	0.510*	0.398	-0.660**
P-3-G				1	0.995**	0.548**	0.424*	-0.703**
TAC					1	0.514*	0.400	-0.664**
ABTS						1	0.978**	-0.800**
DPPH							1	-0.715**
Lipid accumulation								1

Significant at ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

항비만 활성이 우수하게 나타난 것으로 확인하였다.

요약 및 결론

본 연구에서는 국내 육성 유색미 및 현미 추출물의 생리 활성을 검토하기 위하여 품종별 유색미와 현미의 항산화 성분, 항산화 활성 및 항비만 활성을 측정하였다. 품종은 조생 흑찰, 흑진미, 홍진주, 건강홍미 등의 유색미 4종과 설갱, 밀양 320호, 신동진 및 백진주 등의 일반현미 4종을 사용하였고, 에탄올 추출물의 총 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌, ABTS 라디칼 소거능, DPPH 라디칼 소거능 및 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방축적 억제효과를 분석하였다. 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량 모두 일반 현미에 비해 유색미의 함량이 높았으며, 특히 흑미와 적미를 교잡 육성한 흑진미 품종에서 각각 314.08 mg GAE/g, 56.88 mg CE/g, 2.061 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 구성 안토시아닌은 조생흑찰 및 흑진미와 같은 흑미 품종에서만 cyanidin-3-O-glucoside와 peonidin-3-O-glucoside가 검출되었다. 이에 따라 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능 또한 유색미 품종의 추출물에서 각각 20.24~128.20 mg TE/g 및 9.31~24.83 mg TE/g 범위로 우수하게 나타났다. 또한, 항비만 활성을 검증하기 위해 3T3-L1 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화 유도과 함께 품종별 유색미 및 현미 추출물을 처리한 결과, 유색미 중 흑진미 추출물을 처리할 경우 농도 의존적으로 지방구 생성을 억제하였고, 200 µg/mL 농도로 처리 시에는 대조군에 비해 약 52% 지방구 축적을 저해하여 가장 우수한 항비만 활성을 보였다. 이상의 연구 결과로부터 국내 육성 유색미 품종의 페놀화합물, 항산화 활성 및 항비만 활성의 우수함을 확인할 수 있었으며, 그 중 흑진미 품종이 안토시아닌을 비롯한 페놀화합물이 가장 높았고,

ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능 등의 항산화 활성과 3T3-L1 세포 내의 지방축적 억제효과에도 긍정적인 영향을 미친 것으로 생각된다. 이러한 결과는 국내 육성 유색미로부터 고부가가치의 기능성 식품소재로서 개발하기 위한 기초자료로 활용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 흑진미 품종의 항비만 성분과 메커니즘 구명에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 AGENDA 연구사업(과제번호: PJ01348802)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Bae HK, Seo JH, Hwang JD, Kim SY. 2019. Variation in grain quality and yield of black-colored rice affected by the transplanting time and temperature during ripening stage. *Korean J Crop Sci* 64:63-69
- Callcott ET, Santhakumar AB, Strappe P, Luo J, Blanchard CL. 2018. Polyphenols from Australian-grown pigmented red and purple rice inhibit adipocyte differentiation. *J Cereal Sci* 81:140-146
- Choi EY, Lee JT. 2018. The effects of antioxidant and anti-aging treatment of UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes with ethanol extracts of colored rice varieties. *Korean J Food Sci Technol* 50:653-659
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*)

- mushroom. *Food Chem* 99:381-387
- Choung MG. 2008. Optimal HPLC condition for simultaneous determination of anthocyanins in black soybean seed coats. *Korean J Crop Sci* 53:359-368
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:4959-4964
- Eckel RH. 1997. Obesity and heart disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 96:3248-3250
- Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263-273
- Gu D. 1992. A study on special nutrient of purple black glutinous rice. *Sci Agric Sin* 25:36-41
- Gunaratne A, Wu K, Li D, Bentota A, Corke H, Cai YZ. 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chem* 138:1153-1161
- Hou Z, Qin P, Zhang Y, Cui S, Ren G. 2013. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Res Int* 50:691-697
- Huang YP, Lai HM. 2016. Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran. *J Food Drug Anal* 24:564-574
- Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38:342-347
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520
- Ji HH, Jeong HY, Jin S, Kwon HJ, Kim BW. 2012. Inhibition of adipocyte differentiation by methanol extract of *Oenanthe javanica* seed in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci* 22:1688-1696
- Kim DJ, Oh SK, Yoon MR, Chun AR, Hong HC, Lee JS, Kim YK. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown and milled rice by cultivar. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:467-473
- Kim DJ, Ryu SN, Han SJ, Kim HY, Kim JH, Hong SG. 2011. *In vivo* immunological activity in fermentation with black rice bran. *Korean J Food Nutr* 24:273-281
- Kim MH, Kim JG, Choi JH. 2015. Antioxidant and anti-obesity activity of ethanol extracts from fermented *Arctium lappa* L. *Korean J Food Nutr* 28:752-758
- Koh HJ, Won YJ, Cha GW, Heu MH. 1996. Varietal variation of pigmentation and some nutritive characteristics in colored rices. *Korean J Crop Sci* 41:600-607
- Kwak J, Oh SK, Kim DJ, Lee JH, Yoon MR, Kim HW, Lee JS. 2013. Effects of heat-treated brown rice on total phenolics and antioxidant activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:534-541
- Lee HH, Kim HY, Koh HJ, Ryu SN. 2006. Varietal difference of chemical composition in pigmented rice varieties. *Korean J Crop Sci* 51:113-118
- Nam SH, Kang MY. 1997. *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agric Chem Biotechnol* 40:307-312
- Park JY, Oh SH, Han SI, Lee YY, Lee BW, Ham HM, Choi YH, Oh SK, Cho JH, Song YC. 2016. Starch structure and physicochemical properties of colored rice varieties. *Korean J Crop Sci* 61:153-162
- Park SZ, Lee JH, Han SJ, Kim HY, Ryu SN. 1998. Quantitative analysis and varietal difference of cyanidin 3-glucoside in pigmented rice. *Korean J Crop Sci* 43:179-183
- Seo WD, Kim JY, Han SI, Ra JE, Lee JH, Song YC, Park MJ, Kang HW, Oh SK, Jang KC. 2011. Relationship of radical scavenging activities and anthocyanin contents in the 12 colored rice varieties in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54:693-699
- Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR Jr, Marquart L. 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70:459-463
- Suganyadevi P, Saravanakumar KM, Mohandas S. 2013. The antiproliferative activity of 3-deoxyanthocyanins extracted from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran through P53-dependent and Bcl-2 gene expression in breast cancer cell line. *Life Sci* 92:379-382
- Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. 2003. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr* 133:2125-2130

Yao SL, Xu Y, Zhang YY, Lu YH. 2013. Black rice and anthocyanins induce inhibition of cholesterol absorption *in vitro*. *Food Funct* 4:1602-1608

Zhang H, Tsao R. 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8:33-42

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The deter-

mination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555-559

Received 11 February, 2020

Revised 16 March, 2020

Accepted 26 March, 2020