

갓과 흑미강 혼합물의 항산화 활성 및 지방세포 억제 효과

임지현 · 임준석* · 한웅호 · 문 호 · 오 건 · 조근희* · 최선일** · 황운상*** · †이옥환****

강원대학교 식품환경융합학과 대학원생, *강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공 학부생,
강원대학교 농업생명과학연구원 박사후 연구원, *(주)에스티알 바이오텍 연구원, ****강원대학교 식품환경융합학과 교수

Antioxidant Activity and Anti-Obesity Effects of Mixture of *Brassica juncea* and Black Rice Bran

Ji-Heon Im, June seok Lim*, Xionggao Han, Xiao Men, Geon Oh, Geun hee Cho*,
Sun-Il Choi**, Woonsang Hwang*** and †Ok-Hwan Lee****

Graduate School Student, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

*Undergraduate Student, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

**Postdoctoral Researcher, Agricultural and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

***Researcher, STR Biotech Co., Ltd., Chuncheon 24232, Korea

****Prfoessor, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract

This study was conducted to provide basic data on the antioxidant activity, inhibition of adipocyte differentiation and reactive oxygen species (ROS) production of a mixture of *Brassica juncea* extract (BJE) and fermented black rice fraction (BRF). We investigated the total phenol content, total flavonoid content, antioxidant effects (DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, reducing power, FRAP and ORAC assay) and anti-obesity activity of the mixture in 3T3-L1 cells. Our results showed that the total phenol and flavonoid content increased with increasing BRF mixture ratio. The antioxidant activity increased as the BRF mixture ratio increased. In addition, BJE and BRF mixtures did not show any cytotoxicity during the 3T3-L1 differentiation period. During adipocyte differentiation, BJE and BRF mixtures significantly inhibited lipid accumulation and ROS production compared to the control group. These results warrant further experiments to develop an anti-obesity functional food using a mixture of BJE and BRF.

Key words: *Brassica juncea*, black rice bran, mixture, antioxidant, anti-obesity

서 론

현대 산업사회에서는 서구화된 식생활, 유전적요인, 내분비 장애로 인해 전 세계적으로 비만이 심각한 질환으로 대두되고 있다(Visscher & Seidell 2001). 비만은 칼로리 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환의 일종으로, 심혈관계 질환, 고혈압, 제2형 당뇨병 및 각종 암 등의 대사성 질환 발생 가능성을 증가시키는 요인으로 지적되고 있다(Spiegelman & Flier 2001). 따라서 건강한 삶을 위해서는 비만의 예방과 치료가 매우 중요하다(Mason EE 1992). 시중에는 다양한 비만

관련 치료제들이 판매되고 있지만, 두통, 소화불량 등의 부작용이 보고된 바 있다(Ballinger & Peikin 2002; Cheung 등 2013). 따라서 부작용을 최소화하면서 우수한 효능을 가진 천연 유래 소재를 통한 비만 치료제 개발이 요구되고 있다.

Reactive oxygen species(ROS)는 체내에서 진행되는 대사과정에서 산화·환원 반응에 의해 발생하며 신호전달 매개체로서 긍정적인 역할을 하지만 과도한 수준의 ROS는 세포 단백질, 지질 및 핵산에 손상을 일으켜 잠재적으로 기능 장애를 일으킬 수 있다(McMurray 등 2016). 한편 Lee 등(2012a)의 연구에 의하면 지방세포 형성과 ROS가 밀접한 관계를 가지

† Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Prfoessor, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea. Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561, E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

고 있다고 보고되었다. 전지방 세포가 지방세포로 분화하는 동안 세포 내로 유입되는 포도당을 저장하기 위해 지방합성과 관련된 에너지 대사 경로를 거치게 된다. 이 중 hexose monophosphate(HMP) shunt는 G6PDH를 통해 지방합성에 필요한 NADPH를 생성하게 된다. 이와 같이 생성된 NADPH는 NADPH oxidase(NOX)에 의해 NADP+로 전환되고 이때 세포 내 superoxide와 같은 ROS가 생성된다(Lee 등 2009a). 체내 여러 세포에서 생성되는 ROS는 다양한 대사과정에서 지속적으로 생성되며, ROS와 항산화 효소 간의 항상성이 무너지면서 산화적 스트레스에 의한 당뇨, 비만, 노화 등의 각종 질병들을 유발하게 된다(Halliwell B 1996). 지방세포에서 과도하게 생성되는 ROS는 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 촉진하거나 지방세포 주변에 위치한 대식세포를 자극하여 또 다른 ROS를 생성하기 때문에 비만의 주요 원인 중에 하나라고 보고된 바 있다(Yamashita 등 2008). 따라서 효과적인 항비만 소재 탐색을 위해서는 지질 축적 억제 효과와 함께 ROS 소거 효과에 대한 항산화 활성을 함께 평가하는 것은 중요하다.

갯(*Brassica juncea*)은 원산지가 중국이지만 한국과 일본에서 널리 재배되고 있는 십자화과(*Brassicaceae*)에 속하는 채소이다(Kwon 등 2020). 갯은 2차 식물성 대사산물인 플라보노이드, 폴리페놀 및 유황 함유 화합물이 풍부한 것으로 보고되었다(Cho 등 1993). 게다가 sinigim, 기타 glucosinolate 화합물 및 isothiocyanate 화합물은 항암 등 다양한 효능이 있다고 알려져 있다(Talalay & Fahey 2001). 따라서 *B. juncea*에 대한 다양한 연구에서 sinigrin을 갯의 지표 성분으로 설정하여 많은 연구가 이루어졌으며, 최적의 추출조건이 확립된 갯 추출물의 경우 항비만에 탁월한 효능이 있는 것으로 보고된 바 있다(Kwon 등 2021).

흑미강(Black rice bran)은 흑미를 도정한 후 남겨진 겨층을 말하며, 다른 곡류에 비해 다양한 페놀성 화합물 및 anthocyanin이 풍부하다(Cheigh 등 2010). 이러한 anthocyanin은 delphinidin flavylum, cyanidin, malvidin, pheonidin, pelargonidin 및 이들의 glycosides로 α -tocopherol과 유사한 수준의 항산화 활성을 지니고 있다고 보고되고 있다. 이와 같은 항산화 화합물들은 superoxide anion radical, singlet oxygen, hydroxyl radicals을 포함한 ROS를 효과적으로 제거하는 것으로 보고되어 있다(Slavin 등 1999; Choi 등 2007). 흑미강은 항산화 활성 이외에도 다양한 생리 활성을 갖는 소재이다(Chumchochart & Sutthanut 2020). 특히, 흑미강을 발효하였을 때 항암, 항균 작용, 면역 활성 등 다양한 생리활성의 증가가 보고된 바 있다(Kim 등 2014; Safrida 등 2022).

따라서 본 연구에서는 우수한 생리활성 소재인 갯과 흑미강 발효액을 활용하여 혼합 소재를 제조하였고, 이에 항산화 활성, 지질 축적 억제 및 ROS 생성 억제 활성을 평가하여 새로

운 항비만 기능성 소재 개발 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 갯원료와 발효 흑미강 분획물은 (주)에스티알바이오텍(Chuncheon, Korea)으로부터 제공 받아 사용하였다. 갯 추출물(*Brassica juncea* extract, BJE)의 제조 방법은 Kwon 등(2021)의 방법을 참고하였다. 갯 5 kg에 60% 주정을 30배 첨가하였고 70°C에서 3시간 동안 환류 추출한 후 여과하여 감압 농축하고 동결건조하여 분말을 얻었다. 발효 흑미강 분획물(fermented black rice fraction, BRF)은 (주)에스티알바이오텍의 흑미강(표고균사) 발효액을 연속원심분리(15,000×g)하여 시료의 고형분을 제거하고, 수용성 상등액 부피의 4배에 해당하는 95% 주정을 첨가하여 4°C 냉장고에서 8~10시간 동안 정치시켰다. 이후, 원심분리(10,000×g, 10분)를 통해 주정 침전물을 회수하였고, 증류수를 사용하여 녹인 뒤 이를 동결건조하여 얻었다(Kim 등 2013). BJE와 BRF를 일정 비율로 혼합하여 최적 혼합비를 확인하고자 하였으며, BJE와 BRF를 각각 8:2(BRM1), 5:5(BRM2), 2:8(BRM3) 비율로 혼합하여 시료로 사용하였다. 본 연구에서 사용된 시약인 Quercetion, ascorbic acid, gallic acid, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH), 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl radical(DPPH), potassium ferricyanide, sodium carbonate, potassium persulfate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), folin & ciocalteu's phenol reagent, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin, Oil red O (ORO) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고 Bovine serum, penicillinstreptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium과 trypsin - ethylenediaminetetraacetic acid는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

총 페놀 함량은 Na 등(2022)의 방법을 변형하여 측정하였다. BRM1, BRM2, BRM3을 각 1 mL씩 취한 후, 2% sodium carbonate 1 mL와 10% Folin-Ciocalteu's reagent 1 mL를 첨가하여 혼합하고 1시간 동안 암소에서 반응시켰다. 반응 후 microplate reader(Spectramax i3, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 작성한 표준 검량 곡선($y=16.901x-0.0416$, $R^2=0.9982$)으로부터 함량을 계산하였다. 총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(2000)의 방법을 참고

하여 측정하였다. BRM1, BRM2, BRM3 각 0.5 mL씩 취해 증류수 2.8 mL, 1 M potassium acetate 및 10% aluminum nitrate를 첨가하고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 microplate reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Quercetin을 사용하여 표준 검량 곡선($y=3.245x - 0.006$, $R^2=0.9998$)을 작성하고 함량을 계산하였다.

3. 항산화 활성

DPPH radical 소거능은 Cho 등(2011)의 방법을 참고하여 측정하였다. BRM1, BRM2, BRM3 각 0.2 mL씩 취해 0.0004 M DPPH 시약을 0.8 mL 넣고 혼합하였다. 혼합물은 암소에서 10분간 반응시키고 microplate reader를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음 계산식에 의하여 DPPH radical 소거능을 구하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거능은 Choi 등(2022)의 방법을 참고하였다. 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS를 혼합하여 암소에서 16시간 동안 반응시켜 radical을 형성시켰다. 이후, 혼합물을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 희석하였다. BRM1, BRM2, BRM3 각 10 μL 씩 취해 ABTS 용액 1 mL를 첨가하여 상온에서 6분 반응시켰다. 이후 반응물은 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였고 다음 계산식에 의하여 ABTS radical 소거능을 구하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

FRAP 활성 측정은 Benzie & Strain(1996)의 방법을 참고하였다. 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10:1:1의 비율로 혼합한 용액 1.5 mL와 50 μL 씩 취한 BRM1, BRM2, BRM3 그리고 증류수 150 μL 를 섞어 37°C에서 4분간 반응시켰다. 반응 후, microplate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reducing power는 Yen & Duh(1993)의 방법에 따라 측정하였다. BRM1, BRM2, BRM3 각 0.1 mL, 200 mM sodium phosphate buffer 0.5 mL 및 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 trichloroacetic acid 0.5 mL를 가하였다. 위 용액을 원심분리기(Hanil Science Industrial Co., Ltd., MICTRO, Daejeon, Korea)를 이용하여 1,790×g로 10분간 원심분리하여 상등액 0.5 mL 취해 3차 증류수 0.5 mL, 0.1% Iron(III) chloride 0.1 mL와 혼합하고

microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ORAC value은 BRM1, BRM2 및 BRM3를 75 mM phosphate buffer에 녹여 peroxy radical의 생성과 소멸에 따른 fluorescent의 감소율을 측정하였다. 과산화 라디칼의 생성하기 위해 AAPH를 사용하였고, Ou 등(2001)의 방법을 응용하여 ORAC value를 평가하였다. 표준물질은 trolox를 사용하였다. 시료는 75 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 농도별로 제조하고, 18 mM AAPH를 37°C에서 15분 동안 방치하였다. 그 후 40 nM fluorescein 150 μL 에 시료 25 μL 를 넣고 바로 AAPH 25 μL 를 첨가하였다. 측정하기 전 shaking 하고 형광분광광도계로 형광물질의 감소 수준을 37°C에서 90분 동안(3분당 1회) 485 nm에서 전자가 들뜬상태가 되고 530 nm에서 방출되게 설정하여 측정하였다. 표준물질로 사용된 trolox의 농도를 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 μM 로 하였고, 시료의 저해 능력은 trolox equivalents로 표현하고 시료의 the area under the curve(AUC)를 표준곡선($y=1.3342x+0.3955$)에 의해 정량을 하였다.

4. 3T3-L1 세포배양 및 분화

3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)로부터 구매하여 사용하였다. 3T3-L1는 실험목적에 맞춰 24-well 및 96-well plate에 각각 1×10^6 cells/well을 seeding한 후, BS(10%) 및 P/S(1%)를 첨가한 DMEM(89%)에서 100% confluence에 도달할 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후, 지방세포 분화유도 물질(0.5 mM IBMX, 1 μM DEX, 1 $\mu\text{g/mL}$ insulin), FBS(10%) 및 P/S(10%)를 첨가한 DMEM을 각 well에 처리하여 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화(day 0)시 분화 유도 배지에 BRM1, BRM2 및 BRM3를 400 $\mu\text{g/mL}$ 씩 처리하였고, 양성 대조군(positive control)으로는 가르시니아 캄보지아 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 비교하였다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 다음 2일마다 10% FBS, 1% P/S 및 1 $\mu\text{g/mL}$ insulin를 첨가한 DMEM 즉, 분화유지 배지를 첨가하여 6일 동안 분화상태를 유지하면서 지방생성량과 ROS의 생성량을 관찰하였다. 세포 실험에서 시료의 처리농도는 Kwon 등(2021) 및 Ghasemzadeh 등(2018)의 연구를 참고하여 세포독성이 나타나지 않으면서 생리활성 기능이 극대화될 것으로 기대되는 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 설정하였다.

5. XTT assay를 이용한 세포독성평가

XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit를 사용하여 3T3-L1 세포에 대한 BRM1, BRM2 및 BRM3의 세포독성을 평가하였다. 3T3-L1 지방세포를 96-well plate에 seeding하고 분화 6일째에 1 mL의 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-

5-carboxanilide (XTT) 시약과 20 μ L의 phenazine methosulfate (PMS) 시약을 혼합한 working solution을 준비하였다. 준비된 working solution을 배지 부피의 20%로 각 well에 첨가했다. CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양한 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도 값에서 690 nm에서의 흡광도 값을 빼 세포독성을 계산하였다(Furukawa 등 2004).

6. Oil red O staining을 이용한 지방 축적량 관찰

6일 동안 분화 과정을 거친 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 분석하고자 BRM1, BRM2 및 BRM3를 처리하여 24-well에서 6일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거하고 멸균된 PBS(pH 7.4)를 각 well에 500 μ L씩 첨가하여 2회 세척하였다. 세척 후 500 μ L의 10% formalin을 첨가하였고 실온에서 5분간 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 10% formalin을 첨가하였고 1시간 이상 실온에서 방치함으로써 분화된 3T3-L1 세포들을 plate에 고정시켰다. 10% formalin을 완전히 제거하기 위해 60% isopropyl alcohol 용액 500 μ L로 세척하고 세척된 세포들을 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조한 Oil red O working solution(DDW : Oil red O = 4 : 6)으로 지방세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색하였다. 염색 후 증류수를 사용하여 세포를 3회 세척하고 하루동안 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방을 염색한 Oil red O은 100% isopropyl alcohol을 사용하여 모두 용출시킨 후, microplate reader를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다(Lee 등 2012b).

7. NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

6일 동안 분화 과정을 거친 3T3-L1 세포 내 ROS 생성량을 측정하기 위하여 24-well에 분화된 3T3-L1 세포의 분화유지 배지를 모두 제거한 후 멸균된 PBS(pH 7.4)를 각 well에 500 μ L씩 첨가하여 2회 세척하였다. 세척 후 0.2% NBT 용액 0.2 mL씩 각 well 마다 첨가하고 CO₂ incubator안에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 1 N KOH와 DMSO를 3:7로 혼합한 혼합용액을 사용하여 dark blue formazan을 모두 용출하고 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Lee 등 2012b).

8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 진행하였으며 평균값과 표준편차를 구하였고 실험의 결과값에 대한 통계처리는 통계 소프트웨어 SPSS statistics ver 26.0(IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. 또한, 유의성 분석은 ANOVA 검정을 시행하여 Duncan의 다중 범위 검정법(Duncan's multiple range

test)으로, 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였으며, 상관관계는 Pearson의 적률 상관계수(Pearson's correlation coefficient)를 이용하여 유의성을 표기하였다.

결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

BRM1, BRM2 및 BRM3의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 결과는 Table 1과 같다. 총 페놀 함량은 표준물질로 gallic acid를 사용하여 그 함량을 계산하였다. 총 페놀 함량은 BRM1(8.51 \pm 0.05 mg GAE/g), BRM2(9.37 \pm 0.07 mg GAE/g), BRM3(10.03 \pm 0.07 mg GAE/g)순으로 BRF의 비율이 높아질수록 총 페놀 함량이 증가하였다. 총 플라보노이드 함량은 표준물질로 Quercetin을 사용하여 그 함량을 확인하였다. 총 플라보노이드 함량 역시 BRM1(4.45 \pm 0.19 mg QE/g), BRM2(5.22 \pm 0.24 mg QE/g), BRM3(6.25 \pm 0.12 mg QE/g)순으로 BRF의 비율이 높아질수록 총 플라보노이드 함량이 증가하였다. Jun 등(2012)은 흑미강 및 적미강과 같은 유색미강에서 높은 페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 갖는다고 하였으며, Cheigh 등(2010)은 흑미강을 최적의 조건에서 추출하였을 때 최대 7.08 mg QE/g의 플라보노이드 함량을 갖는다고 보고하였다. 따라서 BRM1, BRM2 및 BRM3의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 변화는 BRF의 영향을 받았을 것으로 판단된다.

2. 항산화 활성

BRM1, BRM2 및 BRM3의 항산화 활성 평가는 다양한 *in vitro* 모델(DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, FRAP,

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of BRM1, BRM2, BRM3

Sample	Total phenolic content (mg GAE ⁴ /g)	Total flavonoid content (mg QE ⁵ /g)
BRM1 ¹⁾	8.51 \pm 0.05 ^c	4.45 \pm 0.19 ^f
BRM2 ²⁾	9.37 \pm 0.07 ^b	5.22 \pm 0.24 ^b
BRM3 ³⁾	10.03 \pm 0.07 ^a	6.25 \pm 0.12 ^a

¹⁾ *Brassica juncea* extract and black rice bran fraction were mixed with 2:8 (v/v) ratio.

²⁾ *Brassica juncea* extract and black rice bran fraction were mixed with 5:5 (v/v) ratio.

³⁾ *Brassica juncea* extract and black rice bran fraction were mixed with 8:2 (v/v) ratio.

⁴⁾ Galic acid equivalent content.

⁵⁾ Quercetin equivalent content.

^{a-c} Means \pm SE within same column with different superscript letters differ significantly at $p < 0.05$.

Reducing power, ORAC value)을 이용하여 측정하였다. DPPH radical 소거능의 경우(Fig. 1A) 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid는 42.03~74.64%로 나타났으며, BRM1, BRM2 및 BRM3에서 각각 38.12±1.63%, 43.45±1.39% 및 48.93±1.11%의 DPPH radical 소거활성을 보였다. ABTS radical 소거능의 경우에도 DPPH radical 소거능과 유사한 경향을 보였다(Fig. 1B). BRM1, BRM2 및 BRM3의 ABTS radical 소거능은 각각 18.02±0.16%, 18.88±0.27% 및 20.25±0.02%로 나타나 BRM3에서 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. Reducing power의 경우에도 BRM3, BRM2, BRM1 순으로 BRF의 비율이 높을수록 항산화 활성이 유의적으로 증가하였다(Fig. 1C). FRAP 역시 DPPH, ABTS 및 reducing power의 결과와 같은 경향을 나타냈다(Fig. 1D). 한편, 수소의 전자전달과 관련하여 APFH로 인해 생성된 peroxy radical이 항산화물질에 의해 형광도가 감소하는 것을 사용하여 항산화 활성을 측정하는 ORAC assay의 경우 시료의 항산화 활성으로 시간이 흐를수록 형광물질이 감소하며 decay curve를 나타내는데 Fig. 1E는 시간에 따른 혼합물들과 표준물질로 사용한 trolox의 형광물질의 감소를 나타낸 것이다. 또 trolox로부터 표준 검량 곡선($y=1.3342x+0.3955$, $R^2=0.9948$)을 작성하여 BRM1, BRM2 및 BRM3의 ORAC value를 측정하여 BRM3(26.34±0.11 $\mu\text{M TE/mg}$), BRM2(23.65±0.99 $\mu\text{M TE/mg}$), BRM1(19.41±1.07 $\mu\text{M TE/mg}$)순으로 나타났다.

BRM1, BRM2, BRM3의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 다양한 *in vitro* 모델에서의 항산화 활성 간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 2와 같다. 총 폴리페놀과 항산화 활성 간의 상관성은 $R^2=0.723\sim 0.956$ 로 높은 양(+)의 관계를 나타냈으며, 총 플라보노이드의 경우에도 $R^2=0.787\sim 0.924$ 로 높은 양(+)의 관계를 나타냈다. 이와 같은 결과를 볼 때, BRM1, BRM2, BRM3의 항산화 활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 두 물질에서 기인하는 것으로 판단된다.

3. 세포독성평가

Bioreduction을 증가시키기 위해 XTT에 PMS(phenazine methosulfat)를 첨가하고 세포에 XTT와 PMS의 혼합물을 처리하면 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 XTT의 tetrazilium ring이 분해되고 formazan crystal을 형성하게 된다. 형성된 formazan crystal은 수용액에 녹아 노란색을 띠게 된다(Adan 등 2016). 이 노란색을 ELISA로 측정하여 세포 독성 평가에 이용하였다. XTT 분석에 의해 400 $\mu\text{g/mL}$ 혼합물의 농도에서 세포독성 또는 형태 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 따라서 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 하여 혼합물들의 항비만 활성을 평가하였다.

4. Oil red O staining을 이용한 지방 축적량 관찰

BRM1, BRM2 및 BRM3의 지방세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 Oil red O를 통해 지질을 붉은색으로 염색시키고 용출하여 3T3-L1 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정하여 Fig. 3과 같다. 대조군(con)에 비해 양성대조군인 가르시니아 캄보지아 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 42.89±3.94%로 세포 내 지질 축적량이 감소하였고 BRM1, BRM2 및 BRM3 처리군에서 각각 90.03±0.69%, 88.67±0.75% 및 71.75±4.36%로 세포 내 지질 축적량이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 비만은 지방전구세포의 분화 과정 중 세포 내 중성지방이 축적됨으로써 발생하고 이러한 지방 생성 기전의 조절을 통해 비만을 억제할 수 있다(Chen & Farese 2005). Aranaz 등(2019)에 따르면 PPAR γ 수용체는 지방 생성을 지시하고 인슐린 감수성을 조절하는 능력을 담당하는데, 폴리페놀은 PPAR γ 수용체와 상호 작용하여 지방 생성의 초기 단계를 억제함으로써 지방 생성 기전을 조절한다고 보고된 바 있다. 따라서, BRM1, BRM2, BRM3의 지질 축적 억제 효과는 폴리페놀 및 플라보노이드와 같은 생리활성 물질에 기인된 것으로 생각되며, BRM3의 폴리페놀 함량이 가장 높았기 때문에 지질 축적 억제효과 또한 높았던 것으로 판단된다. 이러한 결과는 메틸 추출물의 항산화 및 지방세포 분화에 대해 연구한 Yoon 등(2012)의 결과와 동일한 경향성을 나타내었다.

5. NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

지방세포 내 축적된 ROS는 NBT 용액과 반응하여 dark blue formazan을 생성한다. 생성된 dark blue formazan을 용출하여 세포 내 생성된 ROS의 양을 측정할 수 있다(Lee 등 2021). 3T3-L1 분화 과정 중 BRM1, BRM2 및 BRM3의 ROS 생성억제 효과를 NBT assay를 사용하여 측정하여 Fig. 4와 같다. 대조군(con)에 비해 양성대조군인 가르시니아 캄보지아 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 51.95±1.13%로 유의적으로 ROS 생성량이 감소하였고 BRM1, BRM2 및 BRM3 처리군에서 각각 91.67±3.21%, 89.45±3.05%, 84.26±5.44%로 모든 복합 비율에서 대조군에 비해 유의적으로 ROS 생성량이 감소하였다. Lee 등(2009b)의 연구에 의하면 3T3-L1 세포에서 항산화제의 처리로 인해 PPAR γ 의 발현이 감소되고, 결과적으로 지방세포의 분화를 억제 및 ROS 생성량 감소 효과가 나타난다고 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서도 BRM1, BRM2, BRM3의 ROS 생성 억제 효과는 BJE와 BRF 혼합물의 항산화 활성에 의한 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구는 BJE와 BRF 혼합물의 항산화 활성, 지질 축적

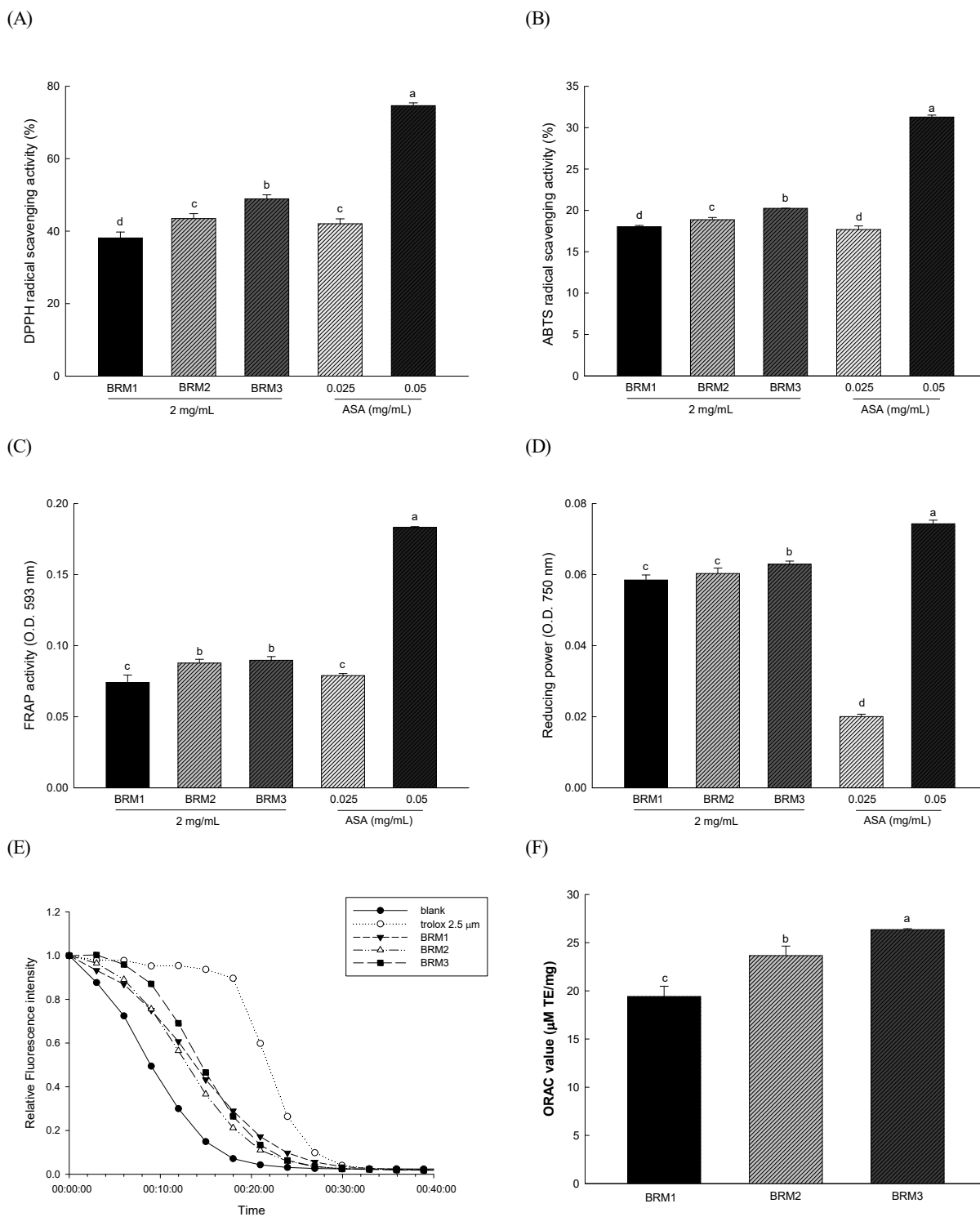


Fig. 1. Antioxidant activity of BRM1, BRM2 and BRM3 and ascorbic acid (ASA). (A) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, (B) 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, (C) FRAP activity, (D) reducing power, (E) Decay curve of fluorescence in the presence or absence of samples, (F) Radical scavenging activity of BRM1, BRM2 and BRM3 expressed as Trolox equivalents. Each value is expressed as the mean \pm S.D. of triple determination. The other letters on the bar indicate a significant difference of $p < 0.05$ in the Duncan multi-range test.

Table 2. Correlation coefficients among total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), DPPH radical scavenging (DPPH), ABTS radical scavenging (ABTS), FRAP, reducing power (RP) and ORAC value of mixtures of *Brassica juncea* and black rice bran

	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP	RP	ORAC
TPC	-	-	-	-	-	-	-
TFC	0.917 ^{**1)}	-	-	-	-	-	-
DPPH	0.944 ^{**}	0.910 ^{**}	-	-	-	-	-
ABTS	0.956 ^{**}	0.924 ^{**}	0.972 ^{**}	-	-	-	-
FRAP	0.723 ^{*2)}	0.858 ^{**}	0.768 [*]	0.824 ^{**}	-	-	-
RP	0.779 [*]	0.787 [*]	0.870 ^{**}	0.817 ^{**}	0.821 ^{**}	-	-
ORAC	0.928 ^{**}	0.923 ^{**}	0.896 ^{**}	0.951 ^{**}	0.776 [*]	0.724 [*]	-

Significantly different at ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$.

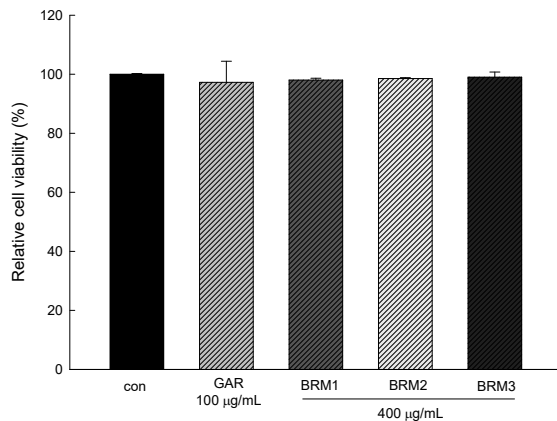


Fig. 2. Effect of BRM1, BRM2, and BRM3 on cell viability on 3T3-L1 preadipocytes. Each value is expressed the mean±S.D. of the results from five different plates (n=5). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA ($p < 0.05$).

억제 및 ROS 생성 억제 활성을 확인하였다. 총 페놀 및 플라보노이드는 BRM3, BRM2, BRM1 순으로 높은 함량을 나타내었으며, 이에 따라 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, FRAP, Reducing power, ORAC value와 같은 항산화 분석에서 동일한 경향을 나타내었다. 상관관계 분석 결과, 항산화 활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 두 물질에서 기인하는 것으로 판단된다. 3T3-L1 세포에서 400 µg/mL 농도의 BRM1, BRM2, BRM3를 처리하였을 때 세포생존율에 영향을 미치지 않았으며, Oil red O를 이용한 지방세포 분화 억제 효과는 BRM1, BRM2, BRM3 모든 혼합물에서 유의적인 지질축적 억제 효과가 나타났으며 이는 폴리페놀 및 플라보노이드와 같은 생리활성 물질의 영향을 받은 것으로 판단된다. 특히, BRM3에서 71.75±4.35%로 가장 낮은 지질 축적율을 나타내

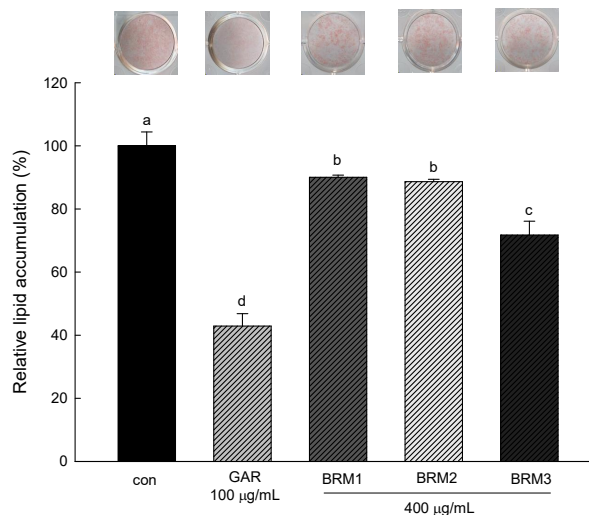


Fig. 3. Effect of BRM1, BRM2, and BRM3 on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Oil red O staining at day 6. Lipid accumulation determined by optical density at 490 nm. The result is presented as the mean±S.D. of 3 independent in triplicate. Bars with different letters indicate significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

었다. 모든 복합비율에서 대조군보다 유의적으로 ROS 생성량을 억제하였고, BRM3에서 84.26±5.44%로 가장 낮은 ROS 생성을 확인하였다. 따라서 BRM1, BRM2, BRM3 모두 지질 축적 억제 효과 및 ROS 생성 억제 효과가 확인되었으며, 이는 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 및 항산화 활성에 기인한 결과로 판단된다. 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 항비만 기능성 식품 개발을 위한 새로운 소재로서 갖 추출물과 발효 흑미강 분획물의 혼합물은 항비만 억제 기전과 *in vivo* 실험을 추가적으로 진행할 가치가 있을 것으로 생각되

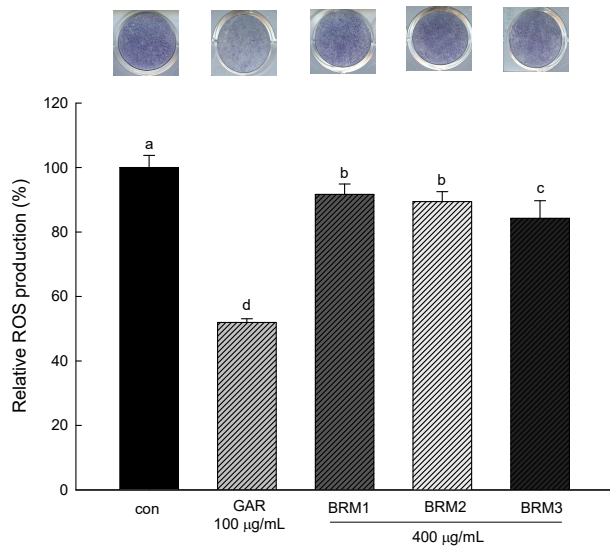


Fig. 4. Effect of BRM1, BRM2 and, BRM3 on ROS production during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Dark-blue formazan was dissolved and the optical density was determined at 570 nm. The result is presented as the mean±S.D. of 3 independent in triplicate. Bars with different letters indicate significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

며, BJE 및 BRF 최적 혼합비율은 2:8인 것으로 확인되었다. 하지만 본 연구에서 갯 추출물과 발효 흑미강 분획물의 단일성분과 혼합물에 대한 비교 평가가 이루어지지 못한 제한점이 있었으며, 이에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 과학기술정보통신부와 연구개발특구진흥재단의 “연구개발특구육성(R&D, 2022-IT-RD-0236-01)” 사업의 지원 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

References

- Adan A, Kiraz Y, Baran Y. 2016. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr Pharm Biotechnol* 17:1213-1221
- Aranaz P, Navarro-Herrera D, Zabala M, Miguélez I, Romo-Hualde A, López-Yoldi M, Martínez JA, Vizmanos JL, Milagro FI, González-Navarro CJ. 2019. Phenolic compounds inhibit 3T3-L1 adipogenesis depending on the stage of differentiation and their binding affinity to PPAR γ . *Molecules* 24:1045
- Ballinger A, Peikin SR. 2002. Orlistat: Its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol* 440:109-117
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Cheigh CI, Chung EY, Ko MJ, Cho SW, Chang PS, Park YS, Lee KA, Paik HD, Kim KT, Hong SI, Chung MS. 2010. Effect of subcritical water for the enhanced extraction efficiency of polyphenols and flavonoids from black rice bran. *Food Eng Prog* 14:335-341
- Chen HC, Farese RV Jr. 2005. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: Lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:482-486
- Cheung BMY, Cheung TT, Samaranyake NR. 2013. Safety of antiobesity drugs. *Ther Adv Drug Saf* 4:171-181
- Cho ML, Lee HS, Kang IJ, Won MH, You SG. 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem* 127:999-1006
- Cho YS, Ha BS, Park SK, Chun SS. 1993. Contents of carotenoids and chlorophylls in dolsan leaf mustard (*Brassica juncea*). *Korean J Diet Cult* 8:153-157
- Choi H, Lee M, Kwak S, Choi D. 2022. Antioxidant effect of tea tree root extracts using various extraction methods. *Korean J Food Nutr* 35:313-323
- Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem* 103:130-138
- Chumchoochart W, Sutthanut K. 2020. Anti-obesity potential of glutinous black rice bran extract: Anti-adipogenesis and lipolysis induction in 3T3-L1 adipocyte model. *Songklanakarwin J Sci Technol* 42:284-291
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761
- Ghasemzadeh A, Karbalaii MT, Jaafar HZE, Rahmat A. 2018. Phytochemical constituents, antioxidant activity, and anti-proliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chem Cent J* 12:17
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16:33-50
- Jun HI, Song GS, Yang EI, Youn Y, Kim YS. 2012. Antioxidant

- activities and phenolic compounds of pigmented rice bran extracts. *J Food Sci* 77:C759-C764
- Kim SP, Park SO, Lee SJ, Nam SH, Friedman M. 2014. A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction. *J Agric Food Chem* 62: 2384-2391
- Kim YH, Lee YJ, Park SO, Lee SJ, Lee OH. 2013. Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions. *Korean J Food Sci Technol* 45:262-266
- Kwon HY, Choi SI, Park HI, Choi SH, Sim WS, Yeo JH, Cho JH, Lee OH. 2020. Comparative analysis of the nutritional components and antioxidant activities of different *Brassica juncea* cultivars. *Foods* 9:840
- Kwon HY, Choi SI, Han X, Men X, Jang GW, Choi YE, Lee OH. 2021. Antiobesity effect of *Brassica juncea* cultivated in Jeongseon with optimized sinigrin content using 3T3-L1 adipocytes. *J Food Biochem* 45:e13650
- Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim J. 2009b. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 284: 10601-10609
- Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC. 2009a. Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52:70-75
- Lee OH, Seo MJ, Choi HS, Lee BY. 2012a. Pycnogenol® inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes with the modulation of reactive oxygen species (ROS) production associated with antioxidant enzyme responses. *Phytother Res* 26:403-411
- Lee S, Na UJ, Choi SI, Han X, Men X, Lee YH, Kim HD, Kim YJ, Lee OH. 2021. Anti-obesogenic effect of *Brassica juncea* extract on bisphenol-A induced adipogenesis of 3T3-L1 cells. *J Food Hyg Saf* 36:528-536
- Lee YJ, Yoon BR, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2012b. Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Food Preserv* 19:455-461
- Mason EE. 1992. Methods for voluntary weight loss and control. *Obes Surg* 2:275-276
- McMurray F, Patten DA, Harper ME. 2016. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity-Recent findings and empirical approaches. *Obesity* 24:2301-2310
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71:109-114
- Na Y, Song YJ, Lee JJ. 2022. Quality characteristics and antioxidant effects of rice cookies enriched with dried plum (*Prunus domestica* L.) powder. *Korean J Food Nutr* 35: 499-512
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49:4619-4626
- Safrida, Budijanto S, Nuraida L, Priosoeryanto BP, Saepuloh U, Marya SS, Ardiansyah, Shirakawa H. 2022. Fermented black rice bran extract inhibit colon cancer proliferation in WiDr cell lines. *Food Sci Technol* 42:e14422
- Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR Jr, Marquart L. 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70:459S-463S
- Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
- Talalay P, Fahey JW. 2001. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* 131:3027S-3033S
- Visscher TLS, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22:355-375
- Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F. 2008. DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int J Obes* 32:1725-1729
- Yen GC, Duh PD. 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Am Oil Chem Soc* 70:383-386
- Yoon BR, Cho BJ, Lee HK, Kim DJ, Rhee SK, Hong HD, Kim KT, Cho CW, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2012. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from tartary and common buckwheats. *Korean J Food Preserv* 19:123-130

Received 10 July, 2023

Revised 24 July, 2023

Accepted 28 July, 2023