

## 흑진미(*Oryza sativa* cv. Heugjinmi) 추출물의 항산화 및 미백 효능 연구

이 주 성<sup>\*,†</sup> · 최 은 영<sup>\*\*,††</sup>

\*대구한의대학교 화장품약리학과, 석사 대학원생

\*\*대구한의대학교 화장품약리학과, 교수

(2024년 4월 25일 접수, 2024년 6월 17일 수정, 2024년 6월 18일 채택)

### Anti-oxidant and Whitening Effects of *Oryza sativa* cv. Heugjinmi Extracts

Ju Seong Lee<sup>†</sup> and Eun Young Choi<sup>††</sup>

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, 285-10,  
Eobongji-gil, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38578, Korea

(Received April 25, 2024; Revised June 17, 2024; Accepted June 18, 2024)

**요약:** 본 연구에서는 흑진미(*Oryza sativa* cv. Heugjinmi) 추출물을 이용하여 항산화 및 미백 관련 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 검증하고자 항산화 및 미백 관련 인자들의 효능을 분석하였다. 그 결과, SOD 유사 활성, FRAP, 환원력, xanthine oxidase 저해 활성, elastase 저해 활성에서 대조군과 유사한 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성은 열수 추출물에서는 효과가 없었고 에탄올 추출물에서는 59%의 억제 활성을 나타내었다. 에탄올 추출물은 B16F10 세포주에서 생존율에 영향을 미치지 않을 농도인 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 cellular tyrosinase와 멜라닌 생합성을 저해하는 것으로 확인되었다. 또한, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현을 확인한 결과는 최고농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 37%, 51%, 34%의 억제율을 보였다. 따라서 흑진미(*O. sativa*) 추출물은 항산화 및 미백 관련 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

**Abstract:** In this study, the efficacy of antioxidant and whitening factors was analyzed in order to verify the possibility of use as functional cosmetic materials related to antioxidant and whitening by using the extract of *Oryza sativa* cv. Heugjinmi. As a result, SOD-like activity, FRAP, reducing power, xanthine oxidase inhibitory activity, and elastase inhibitory activity were similar to those of the control group. Tyrosinase inhibitory activity had no effect in hydrothermal extract and 59% inhibitory activity in ethanol extract. Ethanol extract was found to inhibit cellular tyrosinase inhibitory activity and melanin biosynthesis at concentrations of 25, 50, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which will not affect survival in the B16F10 cell line. In addition, the results of confirming the mRNA expression of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 showed inhibition rates of 37%, 51%, and 34%, respectively, at the highest concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Therefore, it is believed that *O. sativa* extract has potential to be utilized as a functional cosmetic material related to antioxidant and whitening.

**Keywords:** cosmetic, *Oryza sativa* cv. Heugjinmi, anti-oxidant, whitening, melanin

†주 저자 (e-mail: wntjd2578@gmail.com)  
call: 053-819-7745

†† 교신저자 (e-mail: eychoi@dhu.ac.kr)  
call: 053-819-7745

## 1. 서 론

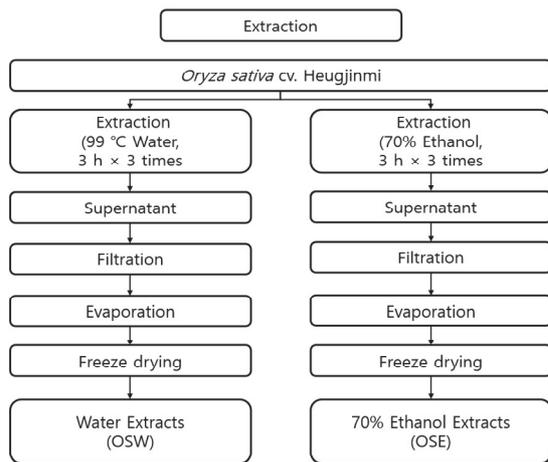
흑진미(*Oryza sativa* cv. Heugjinmi)는 보통의 쌀과 비교하였을 때 맛과 색깔 및 기능적 측면에서보다 더 높은 가치를 나타내어 그 수요가 꾸준히 증가하고 있으며, 흑진미를 매일 섭취하였을 때 인체 기능과 면역 기능을 향상해 질병 예방 등에 효과가 있다고 전해지고 있다[1]. 흑진미는 새로운 품종의 유색 쌀을 개발하기 위해 개발된 품종으로 흑미와 적미가 교배되었다. 주요 색소 성분인 cyanidin-3- $\beta$ -glucoside의 항산화[2], 항 미생물[3] 작용이 보고되었다. 또한 흑미의 성분 중 안토시아닌은 cyanidin, peonidin의 배당체가 다량 함유되어 있고 적미의 성분 중 proanthocyanidin은 flavonoid 생합성 과정에서 flavan-3-ol의 polymer이며, catechin 및 epicatechin 등으로 구성되어 있다고 알려진다[4,5]. 따라서 흑진미의 미백 개선 효과에 대해서는 지금까지 연구되어 있지 않아 본 연구에서 흑진미 추출물이 피부 미백에 관여하는 tyrosinase 저해 활성 효과와 세포 독성 미치는 영향 및 melanin contents에 대한 효과와 작용 기전이 나타나는지 연구하고 이를 항산화 및 미백 화장품에 적용할 수 있는지 검토하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시료 및 기기

#### 2.1.1. 시료 추출

본 연구에서 사용한 흑진미(*O. sativa* cv. Heugjinmi)는 한



**Figure 1.** The procedure for extraction from *Oryza sativa* cv. Heugjinmi (*O. sativa*).

국 농촌진흥청(Korea)에서 제공받아 사용하였으며 Figure 1과 같은 방법으로 추출하였다. 흑진미 추출물의 제조는 분쇄한 흑진미 300 g에 6 L의 용매를 넣어서 추출하였다. 흑진미 열수 추출물(*O. sativa* cv. Heugjinmi water extract, OSW)은 99 °C의 D.I.W 에서 3 h 동안 3 회 반복하여 추출하였고, 흑진미 70% ethanol 추출물(*O. sativa* cv. Heugjinmi ethanol extract, OSE)은 실온에서 24 h 3 회 반복하였다. 각 추출액을 여과지(No. 20 filter paper, Hyundai micro Co., Ltd., Korea)로 여과한 후 농축, 동결 건조하여 분말 시료를 획득하여 실험에 사용하였다. 열수 추출물(OSW) 수율은 4.08%, 에탄올 추출물(OSE) 수율은 2.8%이었다. 획득한 시료는 -80 °C에 보관하며 사용하였다.

#### 2.1.2. 효능평가에 사용된 시약

본 연구에 사용된 trizma base, pyrogallol, xanthine oxidase, xanthine, potassium ferricyanide, ferric chloride, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide, elastase, L-DOPA, tyrosinase, thiazolyl blue tetra-zolium bromide (MITT), oleanolic acid, RIPA lysis buffer의 경우 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. Ethanol, hydrochloric acid, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic dihydrate, sodium phosphate dibasic anhydrous, dimethyl sulfoxide (DMSO)의 경우 DUKSAN Chemical Co. (Korea)에서 구입하여 사용하였다. Trichloride acid (TCA)의 경우 JUNSEI Chemical Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2.1.2. 실험에 사용된 기기

본 연구에 사용된 기기는 ELISA reader (SpectraMax 190, Molecular devices, USA), freeze dryer (FD8512, IlshinBioBase, Korea), microscope (BX53, Olympus Co., Ltd., Japan), rotary vacuum evaporator (N-12, Rikakikai Co., Ltd., Japan), autoclave (JSAT-65 jsr, Hanbaek Scientific Co., Korea), CO<sub>2</sub> incubator (VS-9160GC, Hanbaek Scientific Co., Korea), UV/vis spectrophotometer (UV-1280, Shimadzu Co., Japan), pH meter (Lab 850, SCHOTT Instruments, Korea), CA analyzer ver. 3.00 software (ATTO, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

## 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. SOD 유사 활성 측정

Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정은 Marklund

등[6]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 각 시료 용액 0.1 mL, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) 0.1 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.1 mL을 혼합하여 30 min 동안 실온에서 차광한 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사 활성은 시료 용액 첨가 구와 무첨가구의 흡광도 감소 비율로 나타내었다.

### 2.2.2. Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP) 환원성 항산화능 측정

FRAP은 Oyaizu 등[7]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. FRAP 시약을 0.3 M sodium acetate 완충액 (pH 3.6), 10 mM TPTZ 용액과 20 mM ferric chloride를 10 : 1 : 1의 비율로 희석하고 37 °C에서 30 min 동안 반응하여 제조하였다. 각 시료 용액 0.3 mL, FRAP 시약 1.5 mL을 혼합하여 37 °C에서 30 min 동안 반응하였다. 반응 용액은 ELISA reader를 이용하여 590 nm에서 측정하였다. 높은 흡광도의 값은 높은 항산화 활성을 의미한다.

### 2.2.3. 환원력(Reducing Power Assay) 측정

환원력 측정은 Carmichael[8]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 0.2 M phosphate buffer 0.3 mL, 1% potassium ferricyanide 0.3 mL, 각 시료 용액 0.3 mL 혼합하여 제조하였다. 혼합물을 50 °C에 20 min 간 방치하였다. 반응액에 10% TCA 0.3 mL 첨가하여 반응을 중단시킨 후 10 min 간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리한 상층액 0.5 mL, D.I.W 0.5 mL, 0.1% ferric chloride 0.1 mL을 혼합하여 10 min 동안 반응하고 ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 측정하였다.

### 2.2.4. Xanthine Oxidase 저해 활성 측정

Xanthine oxidase 저해 활성 측정은 Stripe 등[9]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 각 시료 용액 0.1 mL, 0.1 M potassium buffer 0.6 mL, 2 mM xanthine 0.2 mL, 0.049 units xanthine oxidase 0.1 mL 혼합하여 37 °C에서 15 min 동안 반응한 후, 1 N HCl 0.1 mL를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 반응액을 분광 광도계를 이용하여 290 nm에서 측정하였다.

### 2.2.5. Elastase 저해 활성 측정

Elastase 저해 활성 측정은 Cannell 등[10]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 8.6)

0.05 mL, 각 시료 용액 0.1mL, 0.6 units/mL elastase 0.05 mL을 혼합하여 37 °C에서 30 min 동안 반응하였다. 반응액에 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 0.1 mL을 주입하여 실온에서 차광한 상태로 20 min 동안 반응시킨 후 405 nm에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 시료 용액 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소 비율로 나타내었다.

### 2.2.6. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Yagi 등[11]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.08 mL에 25 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.04 mL 및 시료 용액 0.04 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (125 U/mL) 0.04 mL을 첨가하여 37 °C에서 30 min 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 측정하였다.

### 2.2.7. B16F10 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등[8]의 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. B16F10 cell은 American type culture collection (ATCC, CRL-6475, USA)로부터 분양받아 사용하였으며 B16F10 cell을 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 농도별로 희석한 시료 용액을 0.02 mL 첨가하여 24 h 동안 배양하였다. 24 h 동안 배양한 후 각 well에 MTT (5 mg/mL) 시약을 0.02 mL 첨가하여 4 h 동안 반응하였다. 반응 후, 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO 0.1 mL씩 첨가하여 30 min 동안 반응시켰다. 반응시킨 뒤 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

### 2.2.8. Cellular Tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 cell을 6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 각 plate에 농도별로 희석한 시료를 첨가하고  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH)를 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48 h 동안 배양하였다. 배양한 후 PBS로 2회 세척하고 각 plate에 RIPA lysis buffer를 각각 100  $\mu$ L 첨가하여 얼음에 방치한 다음 세포를 수거하였다. 수거한 세포를 12,000 rpm, 10 min 동안 원심분리하고 얻은 상등액과 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 1 mM L-DOPA 160  $\mu$ L를 96 well plate에 분주하였다. 37 °C, 20 min간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

### 2.2.9. Melanin Contents 측정

B16F10 cell을 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되도록 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 24 h 후, 각 plate에 농도별로 희석한 시료를 첨가하고  $\alpha$ -MSH를 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48 h 동안 배양하였다. PBS로 3 회 세척한 후, 4 °C, 12,000 rpm으로 세팅된 원심분리기를 이용하여, 30 min 동안 원심분리하고 상등액은 제거하였다. 상등액이 제거된 침전물에 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 150  $\mu$ L를 첨가하고 60 °C에서 1 h 동안 용해시킨 후, 405 nm에서 측정하여 실험군의 멜라닌 양을 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

### 2.2.10. RNA 추출 및 Reverse Transcription

#### Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 측정

RNA는 high pure RNA isolation kit (Roche, Switzerland)을 사용하여 total RNA를 추출한 후, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 transcriptor first stand cDNA synthesis kit (Roche, Switzerland)을 이용하여 역전사를 진행해 cDNA를 합성시켰다. 이 분석에서 internal control은 GAPDH를 사용하였고 primer의 sequence는 다음과 같다. Tyrosinase (forward, 5'-GATGAGTACATGGGAGGTCAGC-3'; reverse, 5'-GTACICCTCAATCGGCTACAG-3'); TRP-1 (forward, 5'-GATGAGTACATGGGAGGTCAGC-3'; reverse, 5'-TCAGTGAGGAGAGGCTGGTT-3'); TRP-2 (forward, 5'-GATGAGT ACATGGGAGGTCAGC-3'; reverse, 5'-CTTGAGAATCCAGAGTCCCATC-3'); GAPDH (forward, 5'-GATGAGTACATG GGAGGTCAGC-3'; reverse, 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'). PCR의 증폭 조건은 다음

과 같다. 95 °C에서 600 s 동안 cDNA denaturation 한 후, 45 cycles를 증폭시켰다. 94 °C에서 10 s 동안 denaturation, 60 °C에서 10 s 동안 annealing, 72 °C에서 15 s 동안 extension 시켰다. RT-PCR 증폭으로 생성된 DNA는 1.2% agarose gels에서 전기영동 하여 분석하고 핵산 염색 용액으로 염색하였다. DNA 밴드의 발광 강도는 CA analyzer ver. 3.00 software를 이용하여 확인하였다.

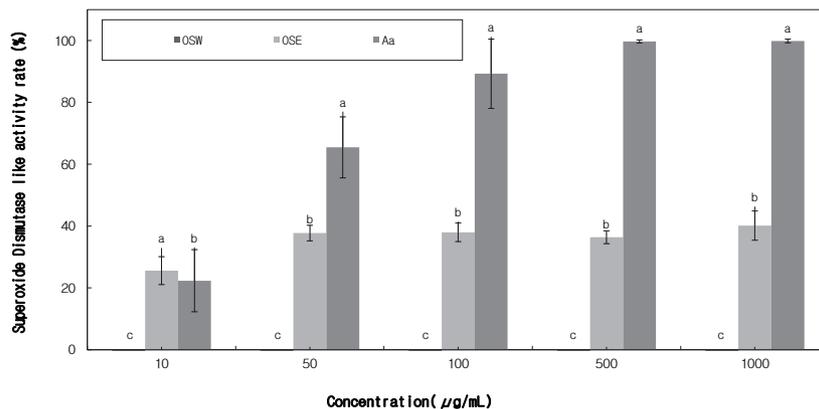
### 2.2.11. 통계처리

모든 실험은 3 회 반복하여 측정하였다. 결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 통계분석은 statistical package for the social sciences (SPSS) software package (Version 27.0; IBM, USA)을 사용하였고 각 시험군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 유의성을 확인 후,  $p < 0.05$  수준에서 duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. SOD 유사 활성 측정 결과

Superoxide dismutase (SOD)는 생체 내에서 O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoxide)의 소거에 관여하는 효소이다. SOD 유사 활성 반응에서 pyrogallol은 물에 존재하는 superoxide radical에 의해 자동 산화가 일어나 갈변되며, 이를 분광광도계 이용하여 측정한다. Superoxide 포착 활성이 있는 물질이 존재할 경우, pyrogallol의 산화 속도가 느려지는 원리를 이용하여 SOD 유사 활성을 측정할 수 있다[12]. SOD 유사 활성 측정 결



**Figure 2.** SOD-like activity assay of *O. sativa* extracts. OSW : *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, Aa : ascorbic acid. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.

과는 OSW를 제외하고 모든 농도 구간에서 농도 의존적으로 상승하는 효과를 보였다. 최고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 OSE는 약 40%, ascorbic acid는 약 100%의 저해 활성이 나타났다(Figure 2).

### 3.2. Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP)

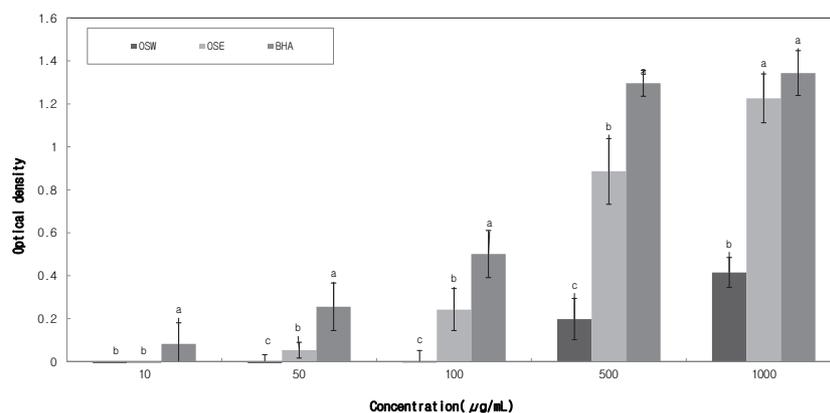
#### 환원성 항산화능 측정 결과

FRAP은 낮은 pH에서  $\text{Fe}^{3+}$ 를 항산화 작용으로 인해 TPTZ를 환원시킨다는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다[13]. 측정 결과는 모든 추출물이 농도 의존적으로 상승하는 효과를 보였다. 최고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 OSW는 0.4, OSE는 1.22의 활성을 보였으며,

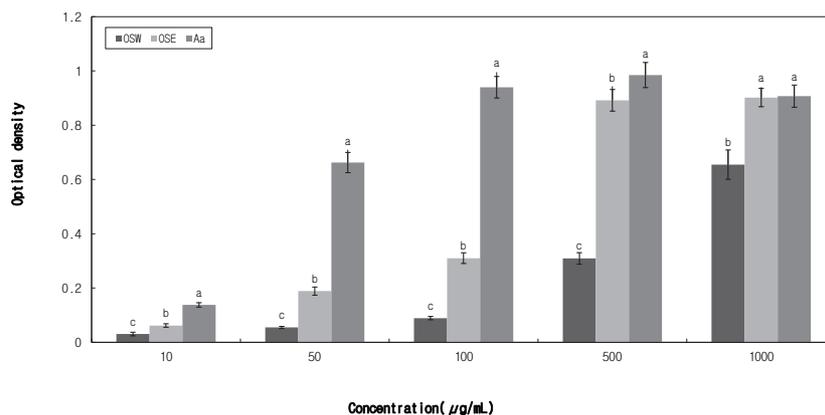
Moon 등이 보고[14]한 미강과 밀기울 추출물의 5 mg/mL과 비교하였을 때, 미강 추출물 0.805, 밀기울 추출물 1.521로 OSE가 낮은 농도임에도 유사한 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한, OSE가 같은 농도의 BHA와 유사한 활성을 보여 항산화능이 높은 것으로 나타났다(Figure 3).

### 3.3. 환원력(Reducing Power Assay) 측정 결과

Reducing power는 항산화 활동의 다양한 메커니즘 중 활성산소와 free radical에 전자를 제공하는 능력 즉, 환원력을 측정하는 실험이다[15]. 측정 결과는 모든 추출물이 농도 의존적으로 상승하는 효과를 보였다. 최고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 OSW는 약 0.7, OSE는 약 0.9, ascorbic acid는



**Figure 3.** FRAP reducing antioxidant power assay of *O. sativa* extracts. OSW : *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, BHA : butylated hydroxy anisole. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.



**Figure 4.** Reducing power assay of *O. sativa* extracts. OSW : *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, Aa : ascorbic acid. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.

약 0.9로 나타났다(Figure 4). Ham 등의 보고[16]에 따르면, 귀리를 도정 부위별로 메탄올로 추출하여 환원력 시험을 시행한 것과 비교하였을 때, 겨 추출물이 0.76으로 OSE가 우수한 환원력을 갖고 있으며, 대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때 500  $\mu\text{g/mL}$ 부터 유사한 활성을 보여 유의한 결과임을 확인할 수 있었다.

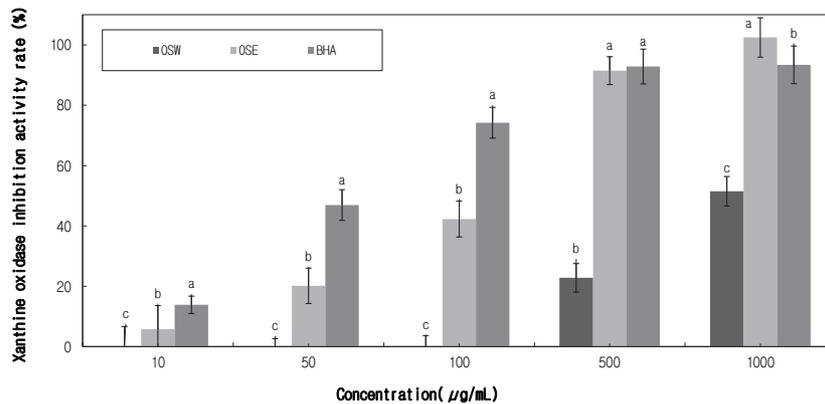
### 3.4. Xanthine Oxidase 저해 활성 측정 결과

Xanthine oxidase는 생체 내 퓨린 대사에 관여하는 효소로 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 산소를 제거하여 과산화수소를 생성하여 체내의 활성산소를 제거하는 원리를 이용하였다[17]. Xanthine oxidase 저해 활성 측정 결과는

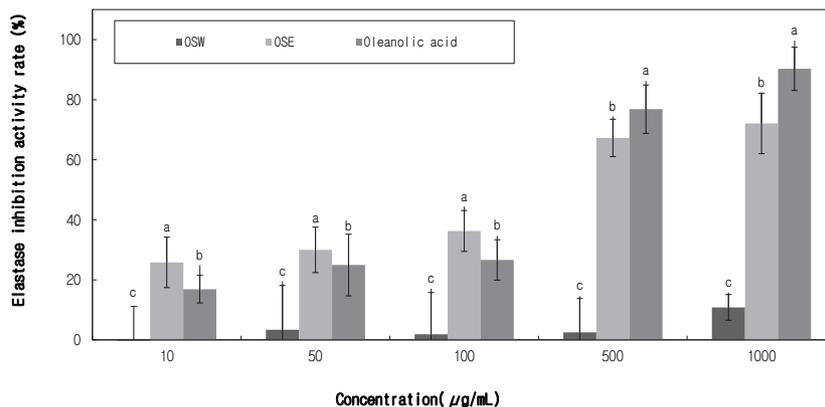
모든 추출물이 농도 의존적으로 상승하는 효과를 보였다. Cho 등의 보고[18]에서 현미 추출물 10 mg/mL에서 열수 추출물 39.0%, 에탄올 추출물 72.9%와 비교하였을 때, OSW와 OSE는 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 약 51%, 약 100%였으며, BHA는 약 93%의 저해 활성을 나타내었다(Figure 5).

### 3.5. Elastase 저해 활성 측정 결과

Elastin은 피부 진피와 피부 탄력섬유를 구성하는 중요한 성분으로 elastin의 감소는 피부 주름을 생성하고 피부 탄력을 감소시켜 피부 노화를 촉진시키고 노화 과정과 주름 형성에 elastin을 분해하는 elastase의 작용이 관여한다[19]. Elastase 저해 활성 측정 결과는 Figure 6과 같다. 최



**Figure 5.** Xanthine oxidase inhibition assay of *O. sativa* extracts. OSW : *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, BHA : butylated hydroxy anisole. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.



**Figure 6.** Elastase inhibition activity of *O. sativa* extracts. *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, Oa : oleanolic acid. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.

고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에 OSW는 10%, OSE는 72%로 대조군인 oleanolic acid (90%)에 근접하여 유의한 결과를 나타내었다.

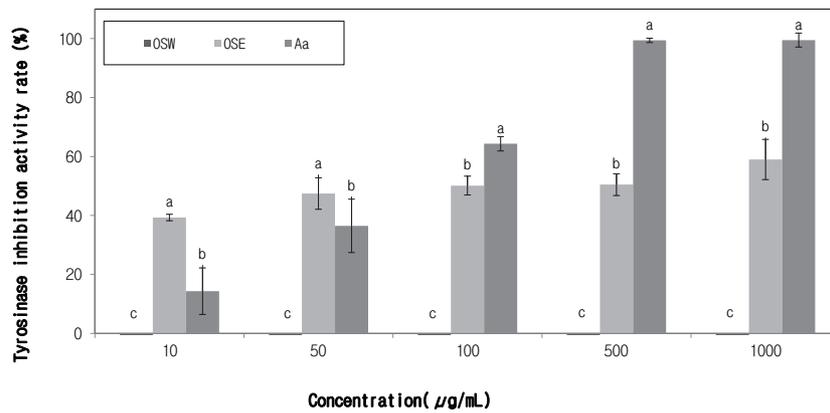
3.6. Tyrosinase 저해 활성 측정 결과

사람의 피부색을 정하는데 가장 중요한 요인인 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체로 알려져 있다[20]. Tyrosinase는 멜라닌 생합성과 관련된 효소이며, 멜라닌 생합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 저해 활성을 본 실험에서 진행하였다. OSW에서는 tyrosinase 저해 활성이 나타나지 않고 OSE에서 tyrosinase 저해 활성이 최고농도인 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 에서

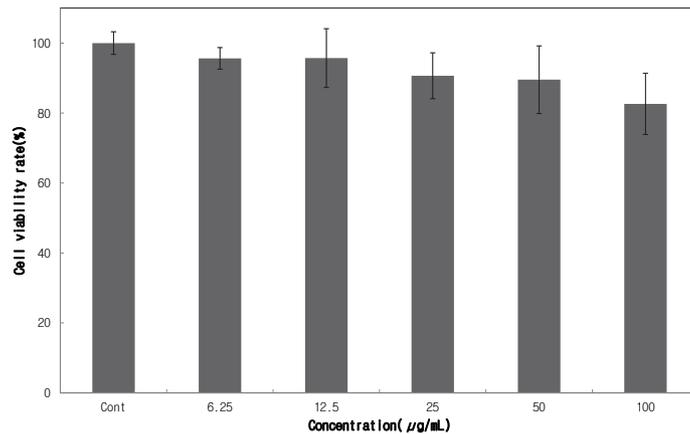
59%로 Figure 7과 같다. 따라서 OSE가 대조군인 ascorbic acid와 유사한 저해 활성을 나타내 미백 소재로서 개발 가능성이 있음을 보였다.

3.7. B16F10 세포 생존율 측정 결과

MIT assay는 세포 생존율을 측정하는 방법이며, 세포 독성에 관하여 다양한 시료를 신속, 정확 및 객관성 있게 판독할 수 있어 널리 사용되고 있다. 본 실험은 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노란색을 띄는 tetrazolium salt를 환원시켜 보라색을 띄는 formazan 결정을 생성하는 원리를 이용한 것이다. 생성된 formazan의 양은 세포 생존율과 비례하며, 생성된 formazan의 흡광도를 측정하여 세포



**Figure 7.** Tyrosinase inhibition of *O. sativa* extracts. OSW : *O. sativa* water extract, OSE : *O. sativa* 70% ethanol extract, Aa : ascorbic acid. The different letters indicate statistical difference at the  $p < 0.05$  by Duncan’s multiple range test. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.



**Figure 8.** Cytotoxicity of *O. sativa* ethanol extract (OSE) on B16F10 cells. Cont : B16F10 cells were not treated OSE. B16F10 cells were preincubated for 24 h and then treated with variable concentrations of OSE. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.

의 성장 및 사멸도를 평가할 수 있다[21]. 이러한 원리를 이용하여 MTT assay를 진행하였다. OSE를 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 B16F10 cell에 처리하였을 때, 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내었다 (Figure 8).

### 3.8. Cellular Tyrosinase 저해 활성 측정 결과

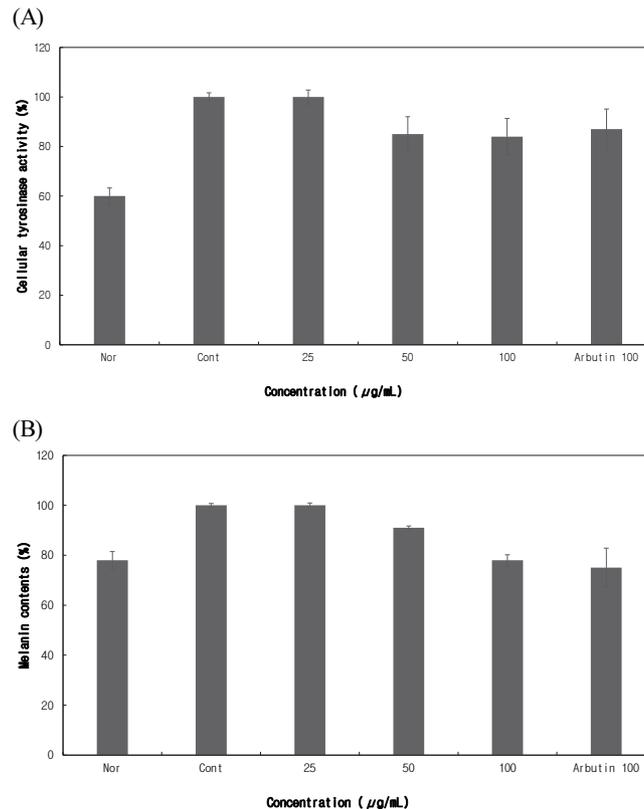
OSE가 B16F10 cell에서 저해 활성을 측정하기 위해 독성이 나타나지 않으면서 높은 농도인 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였으며, 멜라닌 생성을 증가시키기 위해  $\alpha\text{-MSH}$ 를 200 nM를 처리하여 cellular tyrosinase 저해 활성을 확인한 결과는 Figure 9A와 같다. OSE의 최고 처리 농도 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 87%의 cellular tyrosinase가 생성되었으며, 15.7%의 억제 효과가 관찰되었다. 대조군으로 사용된 arbutin (18.5%)과 유사한 cellular tyrosinase 저해 효과가 확인되었다.

### 3.9. Melanin Contents 측정 결과

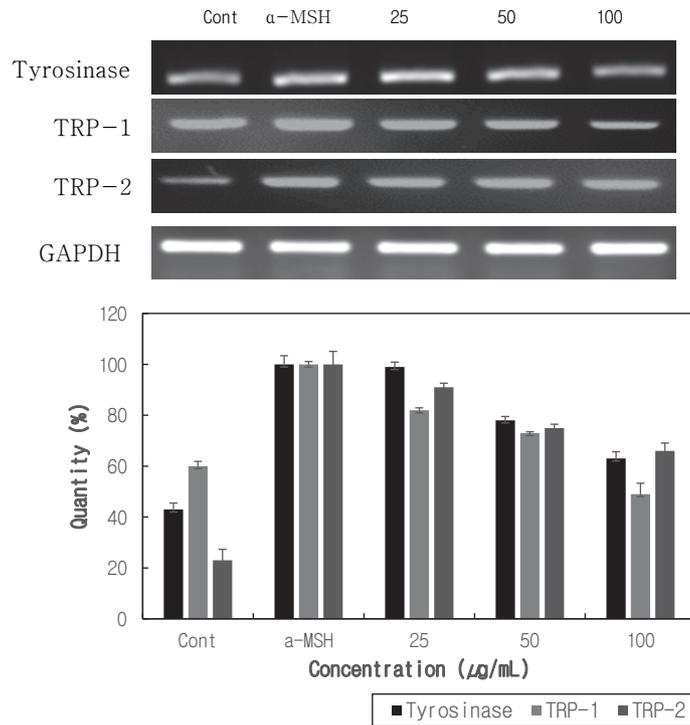
OSE가 멜라닌 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해 독성이 나타나지 않으면서 높은 농도인 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 를 B16F10 cell에 처리하였으며, 멜라닌 생성을 증가시키기 위해 200 nM의  $\alpha\text{-MSH}$ 를 처리하여 멜라닌 생성률을 확인한 결과는 Figure 9B와 같다. OSE의 최고 처리 농도 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 75%의 멜라닌 생성량으로 25%의 억제 효과가 관찰되었다. OSE는 대조군으로 사용된 arbutin 보다 멜라닌 억제 효과가 뛰어남이 확인되었다. 따라서 OSE는 높은 멜라닌 생성 억제율을 보여 효과적인 미백 활성이 나타났음을 확인하였다.

### 3.10. RT-PCR 측정 결과

OSE의 tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위해 RT-PCR을 통한 mRNA 발현량을 알아본 결과는 Figure 10과 같다.  $\alpha\text{-MSH}$  자극군과 대비하여



**Figure 9.** (A) Cellular tyrosinase inhibition of *O. sativa* ethanol extract (OSE) on B16F10 cells. (B) Melanin production of *O. sativa* ethanol extract on B16F10 cells. Arbutin 100 : positive control, 100  $\mu\text{g/mL}$ . Nor : B16F10 cells were treated  $\alpha\text{-MSH}$  and OSE. Cont : B16F10 cells were only treated  $\alpha\text{-MSH}$  (200 nM) B16F10 cells were preincubated for 24 h and the cells were stimulated  $\alpha\text{-MSH}$  (200 nM) in the presence of OSE for 48 h. Result are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate data.



**Figure 10.** RT-PCR of *O. sativa* ethanol extract (OSE). TRP-1 : tyrosinase related protein 1, TRP-2 : tyrosinase related protein 2, Cont : B16F10 cells were not treated a-MSH and OSE. B16F10 cells were treated with α-MSH (200 nM) and OSE. Result are representative data. Result are expressed as means ± SD of triplicate data.

OSE는 최고농도인 100 μg/mL에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA의 발현은 각각 37%, 51%, 34%의 억제율을 나타내었다. 따라서 흑진미 에탄올 추출물의 활용을 통해 미백 관련 인자의 저해 활성을 확인하였기에 본 연구에서 활용한 흑진미 에탄올 추출물은 미백 기능에 있어 긍정적인 기대를 가진 소재로 판단된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 흑진미를 물과 70% 에탄올을 용매로 사용하여 흑진미 열수 추출물(OSW)과 흑진미 에탄올 추출물(OSE)을 얻었다. 이를 이용하여 항산화, 항주름 및 미백 효능에 대해 분석하였다. 실험은 SOD 유사 활성능, FRAP 환원성 항산화능, 환원력, xanthine oxidase 저해 활성능, elastase 저해 활성능, tyrosinase 저해 활성능, 세포 생존율, cellular tyrosinase 저해 활성능, melanin contents, RT-PCR을 통하여 분석하였다. SOD 유사 활성능은 OSW는 0%로 대조군과 비교하여 활성이 미미하지만, OSE는 약 40로 비교적 높은 활성을 보였다. FRAP과 환원력 실험에서는 OSW 제외하

고 OSE가 대조군과 비슷한 환원력을 가지고 있음을 확인하였다. Xanthine oxidase 저해활성능 실험 또한, OSW 제외하고 OSE가 대조군과 비슷한 활성을 나타내었다. Elastase 저해 활성에서는 대조군과 비슷한 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성능의 경우에는 OSW와 OSE가 1,000 μg/mL에서 각각 0%와 59%의 활성을 보였다. 따라서 OSW가 tyrosinase 저해 활성능이 나타나지 않아 OSE만 미백 추가 실험을 진행하였다. OSE를 농도별로 멜라노마 B16F10 cell에 처치한 결과, 100 μg/mL의 농도까지 독성을 나타내지 않아, 향후 100 μg/mL 이하의 농도에서 실험을 수행하였다. Cellular tyrosinase 저해 활성능을 확인하였을 때, 100 μg/mL에서 OSE가 13%의 억제 효과를 나타내었다. 멜라닌 생성 억제 활성은 최고농도인 100 μg/mL에서 OSE가 25%의 억제 효과를 나타내었다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현은 RT-PCR을 이용하여 측정하였으며, 그 결과, OSE는 각각 37%, 51%, 34%의 억제율을 나타내었다. 흑진미는 흑미와 적미가 교배된 새로운 품종의 유색 쌀로 흑미의 안토시아닌 중 cyanidin, peonidin 성분과 적미의 proanthocyanidin 중 catechin 및 epicatechin 성분이 높은 항산

화 활성[22]을 갖고 있으며, Oh 등의 보고[23]에 따르면 13.65 mg GAE/g으로 유색미 중 가장 높은 total polyphenol 함량을 나타내었고, 4.62 mg CE/g의 total flavonoid 함량을 나타냈으며, 2.29 mg CE/g(total proanthocyanidin), 1.87 mg/g(total anthocyanidin)으로 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 이를 바탕으로 흑진미가 일반적인 쌀 품종보다 높은 항산화와 미백 효과가 있음을 시사한다. 따라서 본 연구의 실험 결과를 통해 흑진미 추출물은 항산화 및 미백 관련 기능성 화장품 소재로서 활용 가능성이 있을 것으로 사료되어 향후 항주름 효능을 추가 연구하여 다양한 기능성을 가진 화장품 소재로서 경쟁력이 있음을 밝히고자 한다.

## References

- M. S. Kim, T. R. Hahn, and H. H. Yoon, Saccharification and sensory characteristics of *Sikhe* made of pigmented rice, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(3), 483 (2000).
- S. W. Choi, W. W. Kang, and T. Osawa, Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice, *Food Biotechnol.*, **3**(3), 131 (1994).
- J. Y. Cho, J. H. Moon, K. Y. Seong, and K. H. Park, Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid isolated and identified from rice hull, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(11), 2273 (1998).
- H. K. Bae, S. H. Oh, J. D. Hwang, J. H. Seo, S. Y. Lim, and M. K. Oh, Polyphenol content and yield variation of red-colored cultivars depends on transplanting date in southern plain region of Korea, *Korean J. Crop Sci.*, **62**(3), 166 (2017).
- P. Goufo and H. Trindade, Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid, *Food Sci Nutr.*, **2**(2), 75 (2014).
- S. Marklund and G. Marklund, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**(3), 468 (1974).
- M. Oyaizu, Studies on product of browning reaction : Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese. J. Nutrition*, **44**(6), 307 (1986).
- J. Carmichael, W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Michell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, **47**(4), 936 (1987).
- F. Stirpe, E. D. Corte, The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O), *J. Biol. Chem.*, **244**(14), 3855 (1969).
- R. J. Cannell, S. J. Kellam, A. M. Owsianka, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors, *Plant Medica.*, **54**(1), 10 (1988).
- A. Yagi, T. Kanbara and N. Morinobu, Inhibition of mushroom-tyrosinase by alone extract, *Plant Medica.*, **53**(6), 515 (1987).
- W. A. Pryor, Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Ann. Rev. Physiol.*, **48**, 657 (1986).
- K. S. Cho, ABTS<sup>+</sup> radical, hydroxy radical (OH), nitric oxide (NO), and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) effects of ethanol extracts from four seaweed species for noodles, *Kor. J. Life Sci.*, **27**(10), 1121 (2017).
- J. S. Moon, S. S. Choi, S. Y. Lee, and D. S. Yim, Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of rice bran and wheat bran extracts, *Kor. J. Pharmacogn.*, **46**(2), 140 (2015).
- I. C. F. R. Ferrira, P. Baptista, M. V. Boas, and L. Barros, Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity, *Food Chemistry*, **100**(4), 1511 (2007)
- H. M. Ham, K. S. Woo, J. Y. Park, B. W. Lee, H. S. Choi, Y. H. Choi, J. S. Lee, and Y. Y. Lee, Antioxidant compounds and antioxidant activities of methanolic extracts from milling fractions of Oat, *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, **45**(11), 1681 (2016).
- J. Rudidavets, P. Teissedre, J. Ferriesres, S. Carando, G. Bougard, and J. Cabanis, Catechin in the mediterranean diet: vegetables, fruit or wine?, *Atheroscleros.*, **153**(1), 107 (2000).
- E. K. Cho, K. I. Jung, and Y. J. Choi, Anti-inflammatory and antidiabetic effects of brown rice (*Oryza sativa* L.) extracts, *Kor. J. Life Sci.*, **22**(1), 126 (2012).

19. F. Antonicelli, G. Bellom, L. Delbelle, and W. Horebeck, Elastin-elasases and inflamm-aging, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **79**, 99 (2007).
20. S. H. Kim, D. H. Jun , M. J. Jang, J. T. Lee, C. E. Lee, J. G. Han, J. C. Kim, and D. H. Lee, Study of cosmeceutical activities of *Hovenia dulcis* var. *koreana* Nakai extracts, *Jour. Korean. For. Soc.*, **99**(6), 836 (2010).
21. J. H. Kim and J. I. Hong, Effects of various lights, solvents, and zinc protoporphyrin on the chemical behavior of MIT formazan, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **50**(1), 1 (2018).
22. R. A. Moyer, K. E. Hummer, C. E. Finn, B. Frei, and R. E. Wrolstad, Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes, *Agric Food Chem.*, **50**(3), 519 (2002).
23. Y. G. Oh, J. W. Kang, J. H. Lee, J. S. Lee, J. E. Kwak, H. J. Park, and Y.C. Choi, Comparison of antioxidant components and activities of Korean colored rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **52**(7), 701 (2023).