

발아 거대배아미 에탄올 추출물의 항산화 활성

강미영¹ · 김설이 · 고희종² · 남석현*

¹경북대학교 식품영양학과, ²서울대학교 농학과, 아주대학교 생명과학과

(2004년 2월 11일 접수, 2004년 7월 26일 수리)

거대배아미 에탄올 추출물의 항산화활성을 지질과산화 억제활성 및 활성산소종의 소거활성을 중심으로 일반미와 대조하여 검토하였다. 연구 결과, 발아처리는 전반적으로 환원력 및 지질과산화 억제활성, superoxide radical 및 hydroxyl radical 소거활성을 상승시켰으며, 발아처리에 의한 항산화 활성의 증가현상이 화청거대배아미에서 가장 뚜렷하였다. Superoxide radical 소거작용에 있어서는 남풍거대배아미가 전체적인 소거활성은 높았으나, 발아처리에 의한 활성의 상승률은 역시 화청거대배아미가 가장 높았고, 그 작용기작은 시료에 의한 직접적인 radical 소거에 있는 것으로 나타났다. 생체 독성이 가장 큰 hydroxyl radical 소거활성을 조사한 결과, 화청거대배아미가 전체적인 소거활성 뿐 아니라, 발아처리에 의한 소거활성의 증가율도 가장 높았으며, 그 작용기작도 Fe²⁺의 포착이 아닌 직접적인 라디칼 소거임이 밝혀졌다. 이와 같은 *in vitro*에서 관찰된 시료의 ROS 소거활성은 TPA하여 유도된 HL-60 세포의 ROS 생산을 억제하는데 유효하게 작용하였다.

Key words: 거대배아미, 발아미, 지질과산화, 라디칼 소거활성, 활성산소종

서 론

생리활성 가능성이 풍부한 쌀 품종이 개발되어야 할 필요성에 의해서 돌연변이 육종 기술의 발달과 더불어 기존의 유전자원 중 배아의 크기가 큰 품종을 찾으려는 노력의 결과, 거대배 변이체가 개발되었다.^{1,2} 일반적으로 식물종자는 발아가 진행됨에 따라 생리적 활성이 증대되고 성분의 변화가 일어나기 때문에 발아에 의한 영양소 및 생리활성 물질의 유효도를 극대화하기 위한 연구들이 활발하게 진행되어 곡류 및 두류를 중심으로 단백질과 아미노산,^{3,4} 지방산,^{5,6} 탄수화물,⁷ 무기질,⁸ 비타민^{4,5} 및 효소활성의 변화,⁷ 트립신저해제⁹ 나 피틴산^{10,11}의 변화 등에 관한 연구들이 이루어져 왔다. 쌀의 경우에도 발아와 더불어 특수성분으로서 아라비녹실산, 감마아미노낙산 등의 성분이 증가하는 것으로 알려져 있다.^{12,13} 한편 식품에 함유되어 있는 항산화 성분에 대한 연구 대상은 주로 야채 및 과일에 함유되어 있는 polyphenol류, 엽산, 식이섬유, ascorbic acid, phytosterol류, catechine류 등이 다양하게 검토되고 있다. 쌀의 경우에도 미강층에 주로 함유되어 있는 불검화물로서 tocopherol, oryzanol, phytic acid 등에 의한 항산화 효과가 보고되고 있다. 쌀 미강층 중 배아에는 영양성분 중 양질의 단백질과 비타민 그리고 필수지방산이 종실의 어느 부분보다도 다량 축적되어 있으며,¹⁴ α-tocopherol, γ-oryzanol, 피틴산 등 생리활성 물질의 보고로서도 의미가 있는 쌀 부위이다. 그러므로 배아의 크기가 큰 쌀 품종을 개발함은 영양가의 면에서 뿐만 아니라 건강 기능성 식품용 신소재로서도 의미가 있는 일이다. 그 이유는 생활습관병인 성인성 만성질환의 원인이 주로 활성

산소 등 유리가가 관여하는 만성적인 염증반응일 경우가 많다. 따라서, 건강 기능성 식품을 일상적으로 섭취하고자 할 때에는 섭취하는 식품이 가지는 항산화 활성에 주목할 필요가 있으며,¹⁵ 실제로 다양한 항산화 효과는 결국 신진대사 조절 능력 및 암과 순환기 계통의 질환에 대한 예방·치료효과를 나타내고 있음이 속속 밝혀지고 있다.^{16,17} 따라서 본 연구에서는 남풍벼 및 화청벼에 각각 MNU(methylnitrosourea)를 처리하여 육종 개발한 남풍거대배아미 및 화청거대배아미를 3일간 발아처리 후, 항산화 활성을 다양한 방법으로 평가함으로써 이들 발아거대배아미의 건강기능성 식품 제조용 신소재로서의 가능성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 시약. 남풍거대배아미 및 화청거대배아미 등 거대배 돌연변이 계통 쌀 2종류 및 일반미 종자를 서울대 농생대로부터 제공 받아, 벤레이트수화제로 소독한 후, 15°C 증류수에 48시간 침지 후, 27°C에서 3일간 발아시켜, 왕겨 껍질을 제거하고, 분쇄 후, 5배량의 70% EtOH로 80°C에서 3시간 동안 reflux하면서 추출하여 감압건조 후 DMSO에 용해시켜 100 mg/ml의 농도로 만들어 -20°C에 냉동 보관하면서 사용하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), 2-dextrose, linoleic acid, TBA(thiobarbutyric acid), FeSO₄, ascorbic acid, α-tocopherol, BHT(butylated hydroxytoluene), 등은 시험에 사용한 화학시약은 모두 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

DPPH 자유라디칼에 대한 전자공여능 측정. 에탄올 1 ml, 시료 10 μl, 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990 μl를 분주한 시험관에 0.5 mM DPPH 용액(Abs. EtOH soln.) 0.5 ml를 넣고 교반, 30초간 반응을 유도한 후, 잔존 radical 농도

*연락처

Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

를 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능(%)은 $[(1 - As/Ac) \times 100]$ 으로 산출하였고, As와 Ac는 각각 실험군과 대조군의 흡광도를 나타내었다.¹⁸⁾

지질과산화 억제활성 측정. Linoleic acid model system을 이용한 지질 과산화 억제효과는 5 ml의 0.13% linoleic acid, 2.4 ml의 탈이온수, 5 ml의 50 mM 인산완충액(pH 7.0)과 시료 100 ml를 cap tube에 넣고 40°C incubator에 10일간 보관한 후 지질 과산화 정도를 thiocyanate법¹⁹⁾에 의해서 다음과 같이 측정하였다. 반응액 100 μ l에 4.7 ml의 75% EtOH, 100 μ l의 30% NH_4SAN 용액을 넣고 20 mM의 $FeCl_2$ 용액으로 발색시켰으며, 반응에서 나타난 발색 정도는 UV/VIS spectrophotometer(V-550, Jasco, Japan)를 사용하여 500 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Superoxide radical(O_2^-) 생성 및 ESR 측정조건. Superoxide radical 소거활성의 측정에 사용된 superoxide radical은 hypoxanthine(HPX)을 기질로 xanthine oxidase(XOD)를 사용하는 발생시스템(HPX/XOD system)을 이용하여 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 spin trap agent인 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide(DMPO)과 반응시킨 후 ESR spectrometer(TE-200, JEOL, Japan)로 정량하였다.²⁰⁾ 즉, 적당량의 시료를 35 μ l의 5.5 mM diethylenediamine-pentaacetic acid(DETAPAC), 15 μ l의 9.2 M DMPO와 0.02 unit의 xanthine oxidase와 혼합하여 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)로 용량을 1 ml로 조절하였다. ESR spectroscopy를 위한 기기 설정조건은 다음과 같다. modulation amplitude, 0.1 mT; recording range, 4 mT; recording time, 1 min; time constant, 0.1 s; microwave power, 1.8 mW; microwave frequency, 9.40432.

Xanthine Oxidase에 대한 억제활성 측정. Xanthine oxidase의 억제활성은 Noro의 방법²¹⁾에 따라 수행하였다. 200 mM 인산완충액(pH 7.5)에 0.4 unit/ml의 xanthine oxidase를 첨가하여 37°C에서 10분간 preincubation 시킨 후, 2 mM hypoxanthine 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 생성되는 uric acid의 양을 UV/VIV spectrophotometer(V-550, Jasco, Japan)를 사용하여 295 nm에서의 흡광도에서 측정하였다.

Hydroxy radical 생성 및 ESR 측정조건. Hydroxyl radical은 $FeSO_4$ 와 H_2O_2 를 사용하여 Fenton 반응²²⁾을 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 superoxide radical 소거활성의 측정과 마찬가지로 spin trap agent인 DMPO와 반응시킨 후 ESR spectrometer(TE-200, JEOL, Japan)로 정량하였다.²³⁾ 즉, 적당량의 시료를 50 μ l의 0.3 M DMPO와 50 μ l의 10 mM $FeSO_4$, 50 μ l의 10 mM의 H_2O_2 와 혼합하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.4)으로 전체 용량을 200 μ l로 조절하였다. ESR spectroscopy에 의한 hydroxyl radical의 정량은 superoxide radical 측정 시와 동일한 기기 작동조건에서 수행하였다.

Fe^{2+} chelation 활성 측정. 발아거대배아미 추출물이 Fenton 반응에 필요한 Fe^{2+} 의 chelating 여부를 다음과 같이 측정하였다. 10 mM 인산완충액(pH 7.4) 20 μ l에 시료 10 μ l, 10 mM $FeSO_4$, 10 μ l, 탈이온수 60 μ l, 10% ammonium acetate 400 μ l로 구성된 반응액에 발색시약(3 mg/ml ferron-3 mg/ml neocupron) 100 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후, 562 nm에서의 흡광도를 측정한다. 반응액에 잔존하는 Fe^{2+} 의 양은

$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 을 이용하여 작성한 표준곡선에 의하여 산출하였다.

배양세포를 이용한 세포 내 활성산소 소거활성 측정. 세포 내에서 발생하는 활성산소의 소거에 미치는 시료의 효과는 premyeloblastoma cell line인 HL-60을 사용하여 측정하였다.²⁴⁾ 10% PBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5×10^5 cell/ml의 밀도로 HL-60세포의 세포수를 조정된 다음, 1.4% DMSO를 첨가하여 5일간 배양하여 호중구로 분화시킨 다음, PBS에 현탁하고 50 μ M dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 및 적절한 양의 시료추출물을 첨가하여 37°C에서 15 분간 반응시킨다. 반응 후, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를 160 nM이 되도록 첨가하고 30분간 반응시킨 세포의 형광 발현 정도를 FACSvantage(Becton Dickinson, NJ, USA)를 사용한 flow cytometry로 측정하였다. 한편 시료의 세포독성은 최종농도 1 μ g/ml의 propidium iodide(PI) incorporation를 척도로 flow cytometry법으로 활성산소 소거활성의 측정과 동시에 측정하였다.

통계분석. 3회 이상 실험의 평균치는 mean \pm SE로 표시하였으며, 반복실험 평균치간의 유의성은 SAS software를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검증하였다. $p < 0.05$ 에서의 차이를 유의수준의 차이로 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical에 대한 전자공여능. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 화학적으로 유도되는 radical로서, 어떠한 반응계에서 전자를 공여받으면 고유의 청남색이 없어지는 특성이 있다. 그러므로 이 색차를 비색 정량하여 시료의 전자공여능을 측정할 수 있다. 비록 화학적으로 유도되는 radical이지만 lipoxygenase에 의한 지방 산화 반응계에서의 항산화 활성 측정 결과와도 잘 부합되는 등 간편하면서도 신뢰성이 높은 항산화 활성 측정 방법이다.⁷⁾ 본 실험계에서 대조군으로 사용한 항산화제인 ascorbic acid 및 합성 항산화제인 BHT의 경우 10 μ g이 약 89%정도의 전자공여 효과를 나타내고 있는데 비해서 일반미는 2 mg은 약 33%의 전자공여 효과를 나타내고 있었다(Table 1). 0.2 mg의 경우에도 5% 정도의 전자공여효과를 보였고, 또한 발아에 의하여 전자공여능은 크게 증가하는 것으로 나타났다(0.2 mg 시료첨가에서 약 2배 증가). 거대배아미의 전자공여능은 무발아조건에서 2 mg의 남풍거대배아미 추출물의 경우를 제외하고 일반미보다 낮게 나타났지만 발아처리에 의하여 활성이 크게 상당 수준 증가하였다. 즉, 발아처리한 경우 총 전자공여 활성은 0.2 mg과 2 mg의 시료첨가 조건에서 모두 일반미 > 화청거대배아미 > 남풍거대배아미의 순서를 보였지만, 전자공여능의 증가율은 화청거대배아미 > 일반미 > 남풍거대배아미의 순서로서 화청거대배아미의 활성증가가 뚜렷하였다. 이와 같은 발아된 종자의 전자공여 활성은 본 연구와 동일한 조건에서 수행된 두류 중 검은콩, 쥐눈이콩, 팥 들(약 80%의 전자공여능)보다는 전자공여능이 낮지만 완두콩, 잠두, 나물콩 들(약 30%의 전자공여능) 보다는 전자공여 효과가 높았다.²⁵⁾ 이상의 실험 결과는 취반용으로 부적합한 거대배아미를 단순한 발아처리에 의하여 건강기능성을 증진시킴으로써 거대배아미를

Table 1. Electron donating activity of 70% ethanolic extracts from rice seeds on the DPPH radicals

| Sample dose | Experiments | Absorption at 517 nm | Electron donation (%) | |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| Control | | 1.010±0.041 | 0 | |
| BHT | 1% [#] | 0.137±0.002 | 86.04 | |
| | 0.1% | 0.763±0.007 | 23.62 | |
| 2 mg | Normal rice | Not-germinated | 0.624±0.054 | 33.27 ^e |
| | | Germinated for 3 days | 0.351±0.021 | 64.25 ^a |
| | Nampung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.595±0.037 | 40.09 ^d |
| | | Germinated for 3 days | 0.412±0.061 | 58.21 ^c |
| | Hwachung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.744±0.050 | 25.34 ^f |
| | | Germinated for 3 days | 0.410±0.050 | 58.41 ^b |
| 0.2 mg | Normal rice | Not-germinated | 0.945±0.035 | 5.44 ^g |
| | | Germinated for 3 days | 0.841±0.029 | 15.74 ^h |
| | Nampung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.937±0.021 | 5.24 ^g |
| | | Germinated for 3 days | 0.915±0.032 | 8.41 ^e |
| | Hwachung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.974±0.020 | 2.57 ^f |
| | | Germinated for 3 days | 0.893±0.015 | 10.59 ^b |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean±SE.
 Values not sharing common letters are significantly different at $p < 0.05$.
[#]indicating the final concentration in reaction.

Table 2. Antioxidant activity of 70% ethanolic extracts from rices in the linoleic acid autoxidation system

| Sample dose | Experiments | Absorption at 517 nm | Inhibition (%) | |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|----------------|--------------------|
| Control | | 1.074±0.292 | 0 | |
| | BHT | 0.176±0.182 | 76.72 | |
| 2 mg | Normal rice | Not-germinated | 0.648±0.017 | 33.77 ^e |
| | | Germinated for 3 days | 0.088±0.006 | 84.91 ^c |
| | Nampung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.078±0.001 | 85.84 ^b |
| | | Germinated for 3 days | 0.071±0.025 | 86.49 ^a |
| | Hwachung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.135±0.028 | 80.54 ^d |
| | | Germinated for 3 days | 0.092±0.042 | 84.54 ^c |
| 0.1 mg | Normal rice | Not-germinated | 0.794±0.092 | 19.21 ^g |
| | | Germinated for 3 days | 0.349±0.172 | 60.61 ^b |
| | Nampung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.610±0.385 | 36.31 ^g |
| | | Germinated for 3 days | 0.508±0.180 | 45.81 ^c |
| | Hwachung gaint embryonic rice | Not-germinated | 0.608±0.090 | 36.49 ^g |
| | | Germinated for 3 days | 0.218±0.166 | 72.81 ^b |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean±SE.
 Values not sharing common letters are significantly different at $p < 0.05$.

기능성 식품소재로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

Linoleic acid 자동산화에 대한 지질과산화 억제효과.
 Linoleic acid 자동산화 모델계를 이용하여 품종별 에탄올 추출물 시료에 대한 지질과산화물의 생성 억제효과를 농도별로 측정하였고, 대조군으로 사용한 합성 항산화제 BHT와 그 활성을 비교하였다. Table 2에서 알 수 있듯이 *in vitro*에서 지질 자동산화에 대한 억제하는 효과는 발아를 시키지 않은 조건에서 일반품종의 쌀보다 거대배아미 품종들이 상당히 높았다. 이들 거대배아미의 항산화 효과는 건강식품이라고 일반적으로 인식되어 있는 쥐눈이콩, 팥, 검은콩 등 두류와 유사한 정도로서 장기간 일상적인 섭취에 의해서 생체 내 산화적 스트레스를 낮출 수 있는 가능성을 시사한다고 할 수 있겠다.²⁵⁾ 발아에 의한 지

질과산화 억제활성은 일반미 품종이 약 2배 정도의 상승하는데 비해서 0.1 mg의 시료조건에서 화청거대배아미가 거의 100%의 활성증가로 지질과산화 억제활성이 발아된 일반미보다 높게 나타난 반면, 남풍거대배아미는 발아에 의한 활성 증가도가 높지 않았으나 2 mg의 시료처리에서는 일반미보다 활성이 높게 나타났다. 본 실험에 의하여 발아처리는 일반미뿐 아니라 거대배아미의 지질과산화 활성을 유의하게 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

Superoxide radical(O₂⁻) 소거활성. 산소호흡으로 세포에너지를 획득하는 생물에 있어서 호흡과정의 부산물로 발생하는 유해 활성산소종(ROS; Reactive Oxygen Species)이 생체 고분자의 산화를 통하여 노화나 암발생 등 만성질환의 원인이 된다

Table 3. Scavenging effect of 70% ethanolic extracts from rices on superoxide radicals

| Experiments | | Scavenging (%) | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 0.5 mg/ml | 5 mg/ml |
| Normal rice | Not-germinated | -7.56 ± 1.59 ^f | 11.0 ± 2.04 ^f |
| | Germinated for 3 days | -2.51 ± 0.82 ^d | 19.0 ± 1.19 ^d |
| Nampung giant embryonic rice | Not-germinated | 9.13 ± 0.92 ^b | 40.0 ± 1.98 ^b |
| | Germinated for 3 days | 10.8 ± 1.98 ^a | 48.2 ± 1.19 ^a |
| Hwachung giant embryonic rice | Not-germinated | 1.24 ± 0.89 ^e | 14.4 ± 1.04 ^e |
| | Germinated for 3 days | 9.24 ± 0.96 ^c | 23.9 ± 1.98 ^c |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean ± SE.

Values not sharing common letters in column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Inhibitory effect of 70% ethanolic extracts from rices on the XOD activity

| Experiments | | XOD Inhibition (%) | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 0.5 mg/ml | 5 mg/ml |
| Normal rice | Not-germinated | 25.02 ± 0.20 ^e | -5.24 ± 0.15 ^e |
| | Germinated for 3 days | 31.72 ± 2.18 ^e | -4.92 ± 1.11 ^e |
| Nampung giant embryonic rice | Not-germinated | 25.83 ± 0.79 ^e | -1.67 ± 2.07 ^e |
| | Germinated for 3 days | 29.38 ± 1.63 ^a | 18.81 ± 3.54 ^a |
| Hwachung giant embryonic rice | Not-germinated | 35.30 ± 1.67 ^b | 6.41 ± 1.34 ^b |
| | Germinated for 3 days | 27.93 ± 1.56 ^b | 10.84 ± 4.26 ^b |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean ± SE.

Values not sharing common letters in column are significantly different at $p < 0.05$.

는 사실이 알려져 있기 때문에,¹⁷⁾ 거대배아미 추출물이 ROS를 소거할 수 있는지 여부를 조사하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 실험계는 HPX/XOD system으로서 hypoxanthine과 xanthine oxidase에 의해서 uric acid가 생성되는 과정에서 superoxide radical이 생성되는데, 반감기가 매우 짧은 이 superoxide radical(ROS)을 spin trapping agent와 반응시켜서 안정화시킨 다음, ESR spectroscopy로서 측정하는 것이기에 때문에 superoxide radical을 측정하는데 있어서 가장 직접적이고 신뢰성이 있는 방법이며, spectrogram에서 나타난 DMPO-O₂ adduct의 peak가 시료처리로 변화된 높이를 측정함으로써 radical 소거효과를 계산하였다. Table 3에서 알 수 있듯이 0.5 mg/ml의 무발아 조건의 시료농도에서는 남풍거대배아미가 9% 정도의 superoxide radical 소거활성이 있었을 뿐 일반미 및 화청거대배아미의 경우 소거 효과가 없는 결과를 나타내고 있었다. 그러나 시료의 농도를 10배 증가시킨 5 mg/ml의 농도에서는 일반미 및 화청거대배아미도 약 11-14% 정도의 소거효과를 나타내고 있었으며, 남풍거대배아미의 경우에는 약 40% 정도로서, 상당한 superoxide radical 소거활성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 효과는 동일한 조건에서 측정된 두류 중 백태 청태, 동부 등과 유사한 정도의 효과라고 추정할 수 있다.²⁶⁾ 한편 이들의 발아에 따른 활성의 변화를 살펴보면, 일반미와 남풍거대배아미는 발아에 의하여 유의하게 활성이 증가하였고, 특히 화청거대배아미는 발아에 의하여 7배 정도 superoxide radical 소거활성 대폭적으로 증가된다는 사실을 알았다.

Xanthine Oxidase에 대한 억제활성. 본 실험에서 superoxide radical 소거활성은 HPX/XOD에서 발생하는 superoxide radical을 실험에 사용하였기 때문에, 관찰된 시료의 소거활성이

xanthine oxidase의 활성 자체를 blocking 함으로써 원천적으로 radical의 생성을 불가능하게 만든 결과일 가능성이 있다. 따라서, 이러한 가능성을 배제하기 위해서 쌀 추출물의 xanthine oxidase에 대한 억제효과를 측정하였다. Table 4에서 알 수 있듯이 본 실험에서 사용한 쌀시료들의 경우에는 낮은 농도에서는 xanthine oxidase의 활성을 20~30% 정도 억제하고 있으나, 고농도의 경우에는 오히려 억제효과가 감소하는 현상이 관찰되었다. 한편 발아에 따른 활성의 변화를 보면, 일반미 및 남풍거대배아미의 경우에는 발아와 더불어 xanthine oxidase의 억제활성이 증가하였으나 화청거대배아미의 경우에는 오히려 xanthine oxidase의 억제활성이 오히려 낮아지거나, 완만히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 시료 농도에 따른 xanthine oxidase 억제활성의 변화와 superoxide radical 소거활성의 변화가 상반되는 것을 보아, 본 실험에서 시료의 superoxide radical 소거활성은 xanthine oxidase의 억제에 의한 인위적인 실험결과가 아님을 확인할 수 있었다.

Hydroxyl radical(·OH) 소거활성. 본 실험에서는 Fe²⁺의 존재하에서 Fenton 반응을 이용하여 생성된 hydroxyl radical을 실험에 사용하였으므로, superoxide radical 소거활성의 측정과 마찬가지로 hydroxyl radical를 DMPO와 반응시켜 안정화시킨 DMPO-OH adduct를 spectrogram에서 나타난 peak의 높이를 측정함으로써, 시료를 처리하지 않은 조건에 대한 상대적인 radical 소거활성을 측정하였으며, 그 결과를 Table 5에 나타내었다. Hydroxyl radical에 대한 소거활성은 0.5 mg/ml의 시료 첨가 조건에서 일반미 품종은 약 4%의 억제활성을 나타내는데 비해서 거대배아미 품종들은 약 20% 정도의 억제효과를 나타내고 있었으며, 일반미는 발아에 의한 hydroxyl radical 소거효

Table 5. Scavenging effect of 70% ethanolic extracts from rices on hydroxyl radical

| Experiments | | Scavenging (%) | |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 0.5 mg/ml | 5 mg/ml |
| Normal rice | Not-germinated | 4.90±0.70 ^d | 40.14±2.21 ^d |
| | Germinated for 3 days | 4.02±0.91 ^f | 27.26±2.59 ^f |
| Nampung giant embryonic rice | Not-germinated | 22.12±3.01 ^b | 57.91±1.19 ^b |
| | Germinated for 3 days | 38.87±1.70 ^e | 47.59±0.01 ^c |
| Hwachung giant embryonic rice | Not-germinated | 21.11±1.06 ^c | 38.18±0.53 ^e |
| | Germinated for 3 days | 32.97±1.77 ^a | 64.41±0.66 ^a |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean±SE.
 Values not sharing common letters in column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 6. Fe²⁺ chelation effect of 70% ethanolic extracts from rices

| Experiments | | Chelation (%) | |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0.5 mg/ml | 5 mg/ml |
| Normal rice | Not-germinated | -5.03±0.69 ^{cd} | -3.45±0.91 ^{cd} |
| | Germinated for 3 days | -4.13±0.35 ^{cd} | -3.73±0.44 ^{cd} |
| Nampung giant embryonic rice | Not-germinated | -2.12±0.44 ^d | -4.51±1.03 ^d |
| | Germinated for 3 days | -6.76±0.66 ^b | -1.51±0.77 ^b |
| Hwachung giant embryonic rice | Not-germinated | -6.42±1.59 ^{bc} | -2.49±0.20 ^{bc} |
| | Germinated for 3 days | -2.01±2.07 ^a | 0.06±0.66 ^a |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean±SE.
 Values not sharing common letters in column are significantly different at $p < 0.05$.

과의 증가가 관찰되지 않음에 반하여 거대배아미 품종들은 발아처리에 의하여 hydroxyl radical 소거효과가 50% 이상 증가하고 있음을 알 수 있다. 또한 고농도(5 mg/ml) 시료처리 조건에서 남풍거대배아미 품종의 활성이 가장 높았으나, 발아와 더불어 일반 품종 및 남풍거대배아미의 경우에는 hydroxyl radical 소거효과가 오히려 감소하고 있는데 비해서 화청거대배아미는 경우에는 증가하는 효과가 관찰되었다. 남풍거대배아미에 비해서 화청거대배아미는 거대배아미 자체의 항산화 효과는 낮지만, 이것을 발아시키면 그 효과가 남풍거대배아미와 유사하거나 오히려 증가하는 것으로 나타났다.

Fe²⁺ 이온에 대한 소거활성 측정. 시료에서 측정된 hydroxyl radical 소거활성이 Fenton 반응의 유발에 절대적으로 요구되는 Fe²⁺을 시료가 포착함으로써 나타나는 현상인지, 또는 시료가 radical을 직접적으로 소거하는 현상인지에 대한 의문을 명확히 하기 위하여 쌀 추출물들이 Fe²⁺을 특이적, 비특이적으로 chelation 하는가에 대해서 조사하였다. Table 6에서 알 수 있듯이 고농도의 처리조건에서도 Fe²⁺ 이온에 대한 chelation의 효과가 음의 수치를 나타내는 것으로 보아, 거대배아미 및 발아 거대배아미시료들은 Fe²⁺의 포착을 통해서가 아니라 hydroxyl radical에 대한 직접적인 소거작용을 통하여 hydroxyl radical 소거효과를 나타내고 있음을 알 수 있다.

배양세포를 이용한 ROS 소거활성 측정. 이상의 실험 결과, 거대배아미와 발아된 거대배아미는 전반적으로 항산화 효과가 우수해지고 있음이 *in vitro* 실험계에서 나타났다. 그러나 이러한 결과가 생체 내에서도 발현되는가의 여부를 검토하기 위해서 이들 쌀 추출물이 세포 내 산화수준을 저하시킬 수 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 premyeloblastoma cell line

인 HL-60 세포를 지시세포로 사용하여 배양세포계에서 ROS 소거활성 측정계를 이용하였다. HL-60은 DMSO의 자극으로 호중구로 분화하며, 분화된 호중구계 세포를 TPA로 자극하면 포식세포의 호흡폭발(respiratory burst)이 일어나, 세포 내에 superoxide radical 및 hydroxyl radical과 같은 ROS가 다량 축적되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 ROS의 산화작용으로 세포 내에 침투한 DCFH-DA는 산화되어 형광을 방출하게 되기 때문에, 세포가 방출한 형광을 flow cytometry로 측정함으로써, 시료가 가지는 세포 내 ROS에 대한 소거활성을 정량적으로 측정할 수 있다. Table 7은 이 system을 이용하여 거대배아미 및 발아거대배아미 추출물의 세포 내 ROS에 대한 소거활성을 측정된 결과이다. 쌀 추출물을 농도별로 실험계에 첨가한 결과, 농도의 증가와 더불어 hydroxyl radical의 소거활성이 증가하고 있었으며, 120 µg/ml 이상의 농도에서는 거의 100%에 가까운 소거활성이 있음을 알 수 있었다. 본 실험에 의하여 발아처리가 일반미보다 거대배아미들의 ROS 소거활성을 뚜렷하게 증가시킨다는 사실을 발견하였다.

이상의 연구를 통하여 거대배아미 에탄올 추출물의 항산화활성을 특히 지질과산화 억제활성 및 생체 고분자의 산화작용을 촉발시키는 것으로 알려진 각종 활성산소종의 소거활성을 중심으로 일반미와 대조하여 검토하였다. 연구 결과, 발아처리는 특히 일반미에서 DPPH radical에 대한 전자공여능 및 지질과산화 억제활성을 대폭 상승시키는 것을 볼 수 있었다. 거대배아미의 경우도 발아에 의하여 유의한 수준의 활성 증가가 나타났으나 화청거대배아미를 제외하고 발아에 의한 활성도의 증가율이나 전반적인 총 활성도가 일반미보다 상대적으로 낮았다. Superoxide radical 소거작용에 있어서는 남풍거대배아미가 전체

Table 7. Scavenging activity to ROS generated in HL-60 cells

| Experiments | | Scavenging (%) | | |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 40 µg/ml | 80 µg/ml | 120 µg/ml |
| Normal rice | Not-germinated | 28.58±4.03 ^{cd} | 33.40±6.07 ^d | 83.90±7.29 ^b |
| | Germinated for 3 days | 34.46±2.89 ^{bc} | 42.27±4.85 ^d | 91.10±2.45 ^{ab} |
| Nampung giant embryonic rice | Not-germinated | 36.10±4.82 ^b | 51.78±3.44 ^{bc} | 88.56±7.63 ^{ab} |
| | Germinated for 3 days | 52.25±3.79 ^a | 78.87±6.54 ^a | 99.59±8.35 ^a |
| Hwachung giant embryonic rice | Not-germinated | 25.13±1.07 ^d | 44.23±2.79 ^{cd} | 82.40±5.45 ^b |
| | Germinated for 3 days | 36.10±4.62 ^b | 52.34±2.67 ^b | 98.52±5.50 ^a |

Values obtained though triplicate experiments are expressed as mean±SE.

Values not sharing common letters in column are significantly different at $p < 0.05$.

적인 소거활성은 높았으나, 발아처리에 의한 활성의 상승률은 역시 화청거대배아미가 가장 높았다. 그러나 전반적으로 xanthine oxidase 억제활성은 시료의 첨가량이 증가할 때 오히려 감소하는 것으로 나타나, 시료에 의한 xanthine oxidase 활성 억제가 superoxide radical 소거능의 직접적 원인이 아님을 알 수 있었다. 산화적 손상에 의한 생체 독성이 가장 큰 hydroxyl radical 소거활성을 조사한 결과, 화청거대배아미가 전체적인 소거활성 뿐 아니라, 발아처리에 의한 소거활성의 증가율도 가장 높았지만, 시료가 이 실험계에서 radical 발생의 중추적 역할을 담당하는 Fe^{2+} 를 포획한다는 결과를 얻지 못하였기 때문에 시료의 hydroxyl radical 소거활성은 직접적인 radical 소거에 기인할 가능성이 높다. 이와 같은 시료의 ROS 소거활성은 *in vitro*의 실험계 내 뿐 아니라 세포 내 산화수준을 감소시키는 데도 유효하였고, 특히 발아 거대배아미의 세포 내 ROS 소거활성은 일반미보다 높았다. 거대배아미는 특이한 배유의 형태 등의 특성 때문에 품종으로 육성된 후 그 소비방법이 거의 개발되지 못하였다. 그러나 종자의 발아라는 단순한 처리에 의하여 거대배아미의 라디칼에 대한 전자공여능 및 지질과산화 억제능을 대폭 증가시킬 수 있다는 본 연구의 결과와 더불어, 발아된 거대배아미에서 식이섬유의 양이 증가한다든지, 신경조절물질의 하나인 GABA의 양이 증가한다는 실험결과(미발표 결과)나 배아크기에 따른 미량영양소 함유량의 우월성 등으로 볼 때, 거대배아미가 건강기능성 식품이나 식품첨가물 제조용 원료로서 소비될 수 있는 가능성은 매우 크다고 보겠다. 화청 거대배아미는 발아처리에 의하여 각종 항산화 지표활성, 특히 생체 내 산화적 손상의 주 원인인 hydroxyl radical에 대한 소거활성이 크게 증가하는 것을 볼 때, 향후 화청거대배아미를 건강기능성 식품소재로 개발하기 위한 기초 및 응용방면의 다양한 시도가 검토되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림특정연구과제의 연구비 지원(과제번호: 201030-03-2-HD120)에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Sato, H. and Omura, T (1981) New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oriza sativa*, L. *Jap. J. Breed.* **31**, 316-326.
- Kim, K. H., Park, S. Z., Koh, H. J. and Heu, M. H. (1992) In *Proc. of SABRAO Intern. Symp. on the Impact of Biological Research on Agricultura Productivity*, New mutants for endosperm and embryo characters in rice: Two dull endosperm and giant embryo. pp. 125-131.
- Cho, B. M., Yoon, S. K. and Kim, W. J. (1985) Changes in amino acid and fatty acids composition during germination of rapeseed. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17**, 371-376.
- Hsu, D., Leung, H. K., Finney, P. L. and Morad, M. M. (1980) Effect of germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils and faba beans. *J. Food Sci.* **45**, 87-91.
- Choi, K. S. and Kim, Z. U. (1985) Changes in lipid components during germination of mungbean. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17**, 271-275.
- Colmenarse De Ruiz, A. S. and Bressani, R. (1990) Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. *Cereal Chem.* **67**, 519-523.
- Lee, M. H., Son, H. S., Choi, O. K., Oh, S. K. and Kwon, T. B. (1994) Changes in physico-chemical properties and mineral contents during buckwheat germination. *Korean J. Food Nutri.* **7**, 267-273.
- Kim, I. S., Kwon, T. B. and Oh, S. K. (1985) Study on the chemical change of general composition fatty acids and minerals of rapeseed during germination. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17**, 371-376.
- Ikeda, K., Arioka, K., Fujii, S., Kusano, T. and Oku, M. (1984) Effect on buckwheat protein quality of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. *Cereal Chem.* **61**, 236-240.
- Kim, W. J., Kim, N. M. and Sung, H. S. (1984) Effect of germination on phytic acid and soluble minerals in soymilk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**, 358-362.
- Ahn, B. and Yang, C. B. (1985) Effects of soaking, germination, incubation and autoclaving on phytic acid in seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17**, 516-521.
- Lee, M. H. and Shin, J. C. (1999) In *Proc. Korean Society of Rice Research Conference*, Rediscovering Korea Rice and Development Direction: New techniques for the cultivation of quality rice. pp. 239-263.
- Nakagawa, K. and Onoto, A. (1996) Accumulation of γ -aminogutyric acid (GABA) in the rice germ. *Food Processing* **31**, 43-46.

14. Juliano, B. O. (1985) In *Rice-Chemistry and Technology*. AACC, New York.
15. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
16. Lin, R. I. S. (1994) In *functional Foods: Phytochemicals and antioxidants*. Chapman & Hall, New York.
17. Troll, W., Lim, J. S. and Frenkel, K. (1994) In *Food Phytochemicals for Cancer prevention: Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants*. ACS Symp. Series 547, American Chemical Society, Washington D.C.
18. Yen, G. C. and Chen, H. Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 27-32.
19. Osawa, T and Namiki, M. (1981) A novel type antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-740.
20. Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M. and Hiramatsu, M. (1990) The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63**, 187-190.
21. Noro, T., Noro, K., Miyase, T., Kuroyanagi, M., Umehara, K., Ueno, A and Fukushima, S. (1987) Inhibition of xanthine oxidase by anthraquinones. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4314-4316.
22. Feldberg, P. S., Carew, J. A. and Paradise, R. (1985) Probing Cu(II)/H₂O₂ damage in DNA with a damage-specific DNA binding protein. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 459-466.
23. Rosen, G. M. and Rauckman, E. J. (1981) Spin trapping of free radicals during hepatic microsomal lipid peroxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7346-7349.
24. Lin, J.-K., Chen, P.-C., Ho, C.-T. and Lin-Shiau, S.-Y. (2000) Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2736-2743.
25. Chang, S. M., Nam, S. H. and Kang, M. Y. (2002) Screening of the antioxidative activity, antimutagenicity and mutagenicity of the ethanolic extracts from legumes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 1115-1122.
26. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (2003) Screening of antioxidative activity of legume species. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 32-38.

Antioxidant Activity of Ethanolic Extract from Germinated Giant Embryonic Rices

Mi Young Kang¹, Sulyi Kim, Hee Jong Koh² and Seok Hyun Nam* (*Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea; ¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701; ²Department of Agronomy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*)

Abstract: Antioxidant activity of ethanolic extract of two giant embryonic rices, Nampung giant embryonic rice and Hwachung giant embryonic rice, were investigated mainly focusing on their ability to inhibit lipid peroxidation and scavenge reactive oxygen species in comparison with those of general rice. The results showed that germination process increased reducing power, inhibitory activity on lipid peroxidation and scavenging ability either on superoxide or hydroxyl radicals. Among the cultivars tested, increase in antioxidative action was found to be most prominent for Hwachung giant embryonic rice cultivar. For scavenging of superoxide radicals, the extract from Nampung giant embryonic rice has the most potent activity, however, increasing rate of scavenging activity by germination process was also found to be the greatest for Hwachung giant embryonic rice. We found that the scavenging mechanism for superoxide radicals was attributed to the direct scavenging of the radicals. The scavenging of hydroxyl radicals, the most toxic oxygen radical to biological system, by the rice extracts were also examined, and the results showed that either overall activity or the increasing rate of the activity to scavenge hydroxyl radicals by germination process was the greatest for Hwachung giant embryonic rice. Moreover, the results suggested that the scavenging action to hydroxyl radicals might be mediated by direct quenching of the radicals, not by chelating Fe²⁺. Further studies showed that the antioxidant action of the rice extracts tested *in vitro* was also operative for suppressing ROS production induced in TPA-stimulated HL-60 cells.

Key words: giant embryonic rice, germinated rice, lipid peroxidation, radical scavenging, reactive oxygen species

*Corresponding author