

## C3G색소 고함유 벼품종의 자유라디칼 소거작용 및 항염효과

박순직<sup>†</sup> · 류수노

한국방송통신대학교 자연과학대학 농학과

### Free Radical Scavenging and Inflammatory from the Rice Varieties Contained High C3G pigment

Sun-Zik Park<sup>†</sup> and Su-Noh Ryu

Department of Agricultural Science, Korea National Open Univerisity, Seoul 110-791, Korea

**ABSTRACT** Free Radical Scavenging and inflammatory of the methanol extracts, which were prepared from 6 different bran of rice, were evaluated to investigate bioactive substances. Among them, the extract of C3GHibyee and Heugjinjubyee showed strong DPPH scavenging activities (73.25% and 50.38% at 0.4 mg/ml, respectively). The extract of C3GHibyee and Heugjinjubyee showed strong thrombin inhibition activities (258.76% and 243.52% inhibition at 5 mg/ml, respectively). The result of antibacterial activity by Zone assay showed that C3GHi rice extract (250 µg and 500 µg) inhibited attachment of *Helicobacter pylori* on the ATCC48504 and COO1 cell line. But no effect on the SEO cell line. Cytotoxicity of blackish purple rice extract on the *H. pylori* doesn't showed. These result support a functional superiority of rice-base livelihood, and suggest that the development of healthy food using functional ingredients of rice is possible.

**Keywords** : antioxidative activity, inflammatory, DPPH scavenging activity, C3GHibyee, *Helicobacter pylori*

근래에 들어 소득수준의 향상과 함께 식생활 패턴의 서구화로 인해 비만증, 동맥경화증 등 식생활과 관련이 깊은 성인병의 발병이 증가하고 있다(Han, 2004a). 이에 따라 일반인들의 건강식품, 기능성식품에 관한 관심이 크게 높아지고 있어 쌀의 경우에도 현미를 비롯하여 유색미, 향미 같은 특수미의 이용이 늘어나고 있다(Ha, 1995). 유색미의 경우 부산물인 쌀겨에 기능성 색소가 함유되어 있기 때문에 이를 효율적으로 활용하는 것은 쌀가공식품의 고급화 및 다양화

면에서나 환경보건적 차원에서 매우 중요한 일이다.

유색미 품종 중 흑자색미는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등에서 건강식품으로 인식되어 왔다. 흑자색미에 속하는 품종은 흑진주벼, 길림흑미, 흑남벼 등이 재배되고 있다. 이들 흑자색미에 함유되어 있는 주성분은 anthocyanin 성분의 하나인 cyanidin 3-O-glucoside(C3G)로 밝혀졌다(Ryu et al., 1998). Cyanidin 3-O-glucoside(C3G)는 항산화성분 및 항변이원성효과, 항염증효과, 심장질환억제효과 등이 우수한 것으로 알려졌다(Higashi-okai et al., 2004). 흑자색미 중 C3G색소가 흑진주벼보다 7배 정도 높은 C3GHi벼는 다른 흑자색미 품종에 비해 항산화효과가 탁월한 것으로 확인되었다(Han et al., 2004b, Ryu et al., 2006).

본 연구는 흑진주벼, C3GHi벼, 흑남벼 등 흑자색미와 일품벼, 추청벼, 동진벼 등 일반미 품종을 대상으로 하여 80% MeOH 추출물에 대한 자유라디칼 소거작용, 항혈전작용 및 항염작용의 활성을 검색하였으며 그 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 시료 및 시약

흑진주벼, C3GHi벼, 흑남벼, 일품벼, 추청벼, 동진벼 등 실험에 공시한 6품종은 농촌진흥청 작물과학원에서 2005년에 재배한 재료를 사용하였다. 시료는 현미 100 g을 분쇄기로 마쇄한 후 80% MeOH 용액 250 ml을 가하여 색소가 거의 용출되지 않을 때까지 냉침하였으며, 색소 용출액을 감압 농축하여 Table 1과 같이 추출물을 얻었다.

#### Free radical 소거 활성 측정

자유라디칼 소거활성은 DPPH(1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-2-3668-4632  
(E-mail) szpark@knou.ac.kr

Table 1. Tested rice varieties and their extracts.

Varieties	Pericarp color	Dry wt (g)	80% MeOH Extracts (g)
Heugjinjubyeo	Blackish purple	106.3	3.2
C3GHibyeo	Blackish purple	105.9	5.2
Heugnambyeo	Blackish purple	104.6	3.8
Ipumbyeo	Brown	103.5	2.9
Chucheongbyeo	Brown	103.6	2.8
Dongjinbyeo	Brown	102.7	2.7

radical에 전자를 공여하여 자유기를 소거하는 활성을 측정하였다. 다양한 농도의 시료를 DPPH용액(200  $\mu$ M)에 첨가하고 상온에서 30분간 반응 후 잔존 DPPH의 흡광도를 515 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

대조구로는 butylhydroxytoluene, Vitamin C 및 Vitamin E(Sigma Co., USA)를 사용하였다. DPPH radical 소거능은 시료 첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였으며, IC50는 50% 소거능을 나타내는 농도로 계산하였다.

DPPH scavenging activity(%) = (1-시료첨가구 OD/비첨가구 OD)  $\times$  100

### 항혈전 활성

Hsieh의 방법(1997)에 따라 항혈전활성을 thrombin time을 측정하여 평가하였다(Sohn *et al.*, 2004). Thrombin time은 37°C에서 0.5  $\mu$ M thrombin(Sigma Co., USA) 50  $\mu$ l와 20  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l, 다양한 농도의 시료추출액 10  $\mu$ l를 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후 혈청 10  $\mu$ l를 가하여 혈장이 응고될 때까지 시간을 측정하였다. 이때 대조시약으로는 아스피린(Sigma Co.)를 사용하였으며 용매대조군으로는 시료대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 32.1초의 응고시간을 나타내었다. Thrombin 저해효과는 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며 시료첨가시의 응고시간을 용매대조군의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

### Cyclooxygenase 활성

#### 1) 비만세포의 배양

Moon 등의 방법(1999)으로 male Balb/c mice로부터 채취한 골수세포를 50% enriched medium(RPMI 1640 containing 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10 mg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids and 10% fetal bovine serum)과 50% WEHI-3 cell-conditioned medium을 사용하여 3주이상 배양하여 95% 이

상의 homogenous한 bone marrow-derived mast cell(BMMC)를 얻었다.

#### 2) Assay of PGD2 Generation

Chang 등의 방법(1994)으로 BMMC를  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 하였으며 자극제로는 100 ng/ml KL(c-kit ligand), 100 U/ml IL-10, 100 ng/ml LPS를 처리하였다. COX(cyclooxygenase)-1의 활성의 측정은 시료를 일정 농도로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 자극제를 가한 후 2시간 후 배양 상등액 중에 생성되는 PGD2(prostaglandin D2)의 생성량을 측정하였다. COX-2의 측정은 자극제를 가하여 8시간 동안 배양 후 PGD2의 생성량을 측정하여 COX-2 활성으로 판정하였다. 이때 COX-2의 효소활성은 미리 10  $\mu$ g/ml aspirin을 2시간 처리하여 COX-1을 불활성화 시킨 후 실험을 행하였다. 반응이 끝난 후 120 $\times$ g, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상등액을 PGD2 생성량의 측정에 이용하였다. PGD2는 PGD2 enzyme immuno-assay kit(Cayman Co., USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 항염증작용

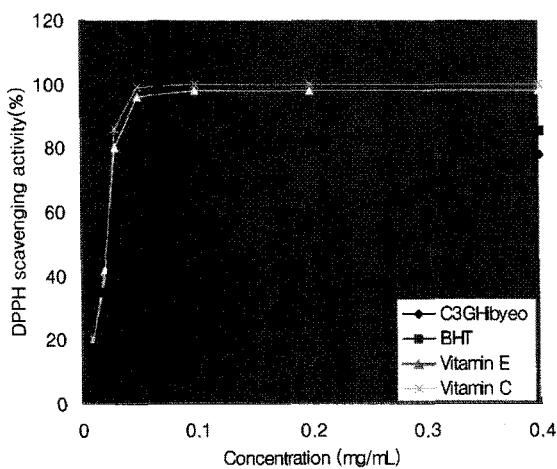
항균활성의 조사방법은 *H. pylori* 균이 위점막 세포주인 AGS cell line에 부착하는 정도로 측정하는 방법과 평판디스크법에 의한 *H. pylori* 균에 대한 직접적인 살균효과를 측정하는 방법에 의해 수행하였다(Kim *et al.*, 2004). Zone assay를 통해서 *H. pylori* 균에 대한 직접적 항균활성을 조사하였으며, 이 때 사용된 균으로는 공시균주인 *H. pylori* ATCC 43504균주와 위염환자로부터 분리되어 카톨릭의대 의과학연구소에서 분양받은 *H. pylori* COO1, *H. pylori* SEO 2가지 균주 등 총 3개 균주에 대한 항균활성을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

체내에서 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)이나 hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>) 같은 활성산소종은 어느 면에서는 필수적인 방어수단이 될

**Table 2.** Antioxidant activities and antithrombosis of extracts from the different bran of rice.

Compounds/ Varieties	Anthocyanin pigment C3G Content (mg/100 g seed)	Antioxidant activity (%)			Antithrombosis activity (%)	
		Concentration (mg/mL)			Concentration (mg/mL)	
		0.0125	0.02	0.05	0.5	1.5
Asprin	-	-	-	-	136.20	297.15
BHT	-	20.25	34.12	48.94	-	-
Vitamin C	-	27.32	48.15	76.72	-	-
Vitamin E	-	43.52	79.11	96.36	-	-
Heugjinjubyeo	380	12.74	27.30	50.38	103.31	448.24
C3GHibyeo	2300	20.45	43.51	73.25	149.25	886.24
Heugnambyeo	230	15.61	29.35	46.79	106.49	415.25
Ilpumbyeo	-	7.66	13.35	22.28	-	120.54
Chucheongbyeo	-	6.13	11.16	22.25	-	133.45
Dongjinbyeo	-	4.74	11.02	20.44	-	110.49

**Fig. 1.** Comparison of antioxidant activities between the methanol extract of C3GHibyeo and well-known antioxidants measured by DPPH scavenging activity.

수 있으나, 때로는 조직손상과 염증, 노화, 암, 동맥경화, 고혈압 및 당뇨병 같은 질병을 유발할 수 있다. 그리고 항산화활성을 갖는 방어수단인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT)등은 효소적인 수단으로 중요하며, 비효소화적 수단으로서는 비타민 C,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, glutathione, flavonoid 등이 항산화제로서 잘 알려져 있다. 한편 세포독성이 적고 강한 항산화효과를 나타내는 새로운 물질들을 천연으로부터 분리하려는 노력이 지속되어 왔다(Han *et al.*, 2004).

따라서 일상의 식생활을 통한 항산화물질의 섭취는 질병 예방에 중요한 의미를 갖는다. 특히 식생활관련 성인병이 증가하는 현실에서 최근 육성된 흑진주벼 품종을 비롯한 흑자색미 품종의 기능성 평가는 매우 중요한 일이다.

공시한 쌀 품종의 항산화활성을 측정한 결과를 보면 Table

2와 같다. 0.4 mg/mL의 농도에서 C3GHi 벼, 흑진주벼, 흑남벼 추출물이 각각 73.25%, 50.38%, 46.79%의 우수한 자유라디칼 소거능을 보였으며 이러한 활성은 C3G 색소농도의 존성을 나타내었다. 이는 잘 알려진 항산화제인 BHT, Vitamin C 및 Vitamin E의 0.05 mg/mL의 농도에 상당하는 활성으로 쌀이 우수한 항산화성분을 함유하고 있음을 의미한다.

특히 항산화활성이 우수한 C3GHi벼에 대해 다양한 농도에서의 항산화활성을 측정한 결과, 농도 의존적 항산화 활성을 확인하였다. 0.2 mg/mL의 농도에서도 51% 정도의 DPPH 소거능을 나타내어 BHT의 0.20~0.40 mg/mL 농도의 항산화활성에 상당하였고, IC<sub>50</sub>은 0.315 mg/mL로 확인되었다(Fig. 1).

조제된 쌀 추출물의 항혈전 활성을 측정한 결과를 보면 C3GHi벼, 흑진주벼, 흑남벼, 일반벼의 추출물에서 각각 886.24%, 448.24%, 415.25%, 120.54~110.49%로 나타나서 품종 간에 큰 차이가 있는 것으로 확인되었다(Table 2).

한편, 2.5 mg/mL의 농도에서는 유색미에서 103.31~166.49%의 활성을 나타내었다. 실제 혈액개선제로 사용되고 있는 아스피린은 1.5 mg/mL의 농도에서 약 250~300%의 저해활성, 0.5 mg/mL의 농도에서 136.20%의 활성을 나타내었다. 이는 실험에 사용된 흑자색미 추출물이 정제되지 않은 상태임을 고려할 때 흑자색미 추출물의 항혈전 활성이 매우 강력함을 알 수 있다.

천연색소들은 LDL의 산화를 억제하여 동맥경화를 예방시켜 주며, 혈전을 억제하여 응집과정에 관여하는 혈소판 응집을 방해하여 혈액순환을 용이하게 한다(Frankel, 1999). 과다한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있는 것으로 thrombin의

**Table 3.** Inhibitory activity of rice extracts against human thrombin determined by thrombin time.

Varieties	Thrombin time (%) <sup>*</sup>		
	Concentration (mg/ml)		
	0.5	1.0	3.0
Heugjinjubyeo	113.24	138.35	243.52
C3GHibyeo	118.25	141.25	258.76
Heugnabyeo	107.11	118.25	108.24
Ilpumbyeo	103.51	108.73	110.85
Chucheongbyeo	104.36	113.24	103.76
Dongjinbyeo	102.35	114.25	104.72
Aspirin	139.00	316.00	398.00

<sup>\*</sup>Thrombin time for DMSO was 32.1 second

**Table 4.** Cyclooxygenase (COX) inhibitory activities of the rice extracts.

Varieties	Inhibition (%)	
	COX-1	COX-2 <sup>*</sup>
Heugjinjubyeo	-85.0	8.0
C3GHibyeo	-72.6	-7.4
Heugnabyeo	-70.6	-14.1
Ilpumbyeo	-119.0	-33.3
Chucheongbyeo	-98.3	-35.4
Dongjinbyeo	-100.4	-29.4

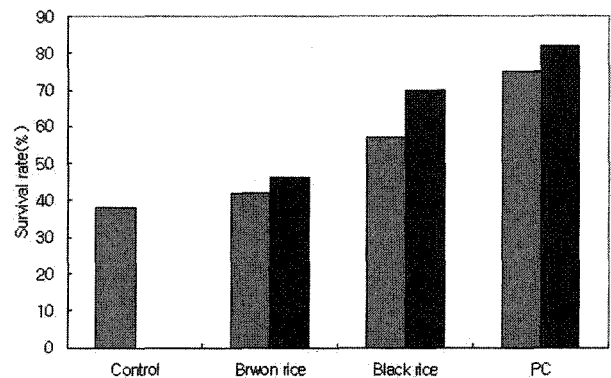
<sup>\*</sup>Final concentration : 12.5 µg/ml

활성저해물질은 매우 중요하다.

MeOH 추출물에 대하여 혈액응고 저해활성을 Hsieh의 방법(1997)에 의하여 thrombin time을 측정된 결과는 Table 3 과 같다. 흑진주벼와 C3GH벼의 추출물만이 3 mg/ml 농도에서 각각 243.52%, 258.76% 정도의 thrombin 저해활성을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 흑자색미의 저해활성은 대조약물로 사용한 아스피린보다는 약하게 나타났다.

Arachidonic acid cascade(지방산 반응단계)에 관련된 효소들에 식물색소들이 강한 억제활성이 있는 것으로 보고되어 있다(Potterat, 1997). 본 실험에 공시한 흑자색미는 강한 항산화활성을 나타내며, 이들 품종으로부터 얻은 추출물의 cyclooxygenase(COX)에 대한 활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 공시 흑자색미 품종들을 비롯한 일반쌀의 COX-1 과 COX-2에 대한 활성은 보이지 않았다.

Fig. 2는 *H. pylori* 균에 의해서 나타나는 AGS cell line에 대한 독성을 조사한 결과, 흑자색미 추출물은 250 µg과 500 µg 처리군에서 모두 *H. pylori* 균의 AGS cell line에 대한 부착을 억제하는 활성이 있는 것으로 판명되었으며, 일반쌀 추출물은 *H. pylori* 균에 대한 억제작용은 없는 것으로 나타났다.



**Fig. 2.** Inhibition of attachment of blackish purple rice treated *H. pylori* on the AGC cell line.

Fig. 3은 Zone assay를 통해서 *H. pylori* 균에 대한 직접적 항균활성을 조사한 결과이다. C3GH 쌀 추출물은 200 µg/mL의 농도에서 ATCC 43504 및 COO1 균주에 대해서 clear zone이 검출되어 항균활성이 있는 것으로 판명되었으나 SEO 균주에 대해서는 항균활성이 검출되지 않았다. SEO균주와 COO1 균주는 모두 위험한자로부터 분리된 *H. pylori* 균주이나 한 균주에서는 항균활성이 검출되었고 또한 균주에서

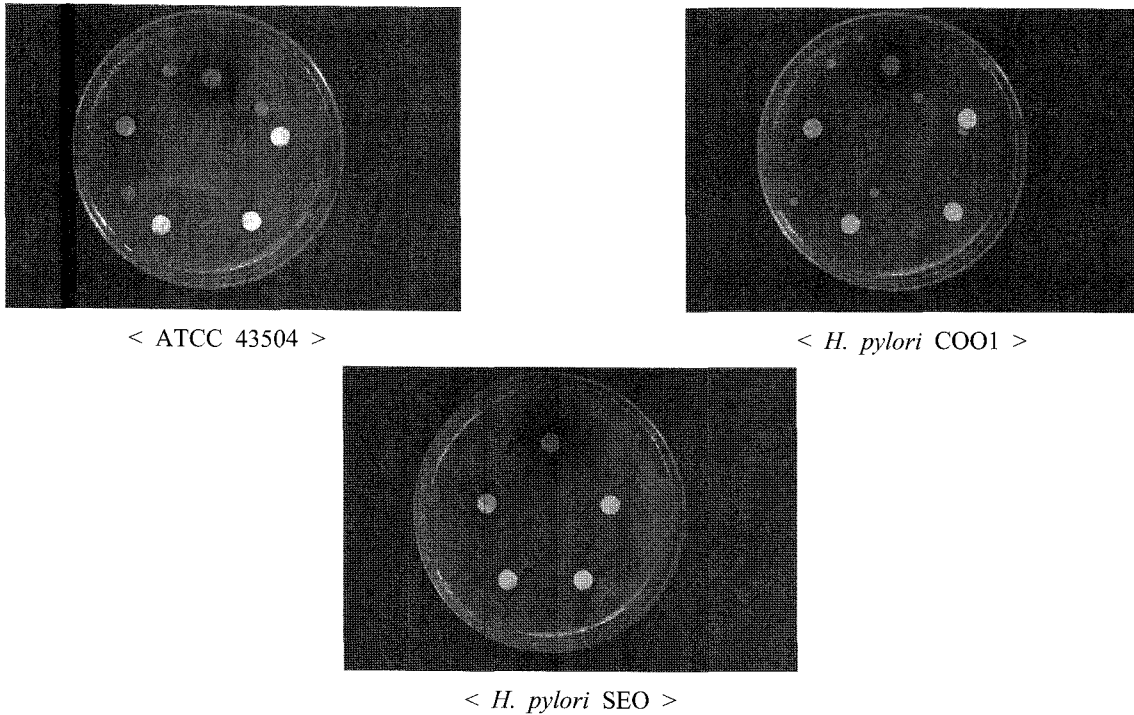


Fig. 3. Anti-bacterial activity of C3GHi blackish purple rice extract against *H. pylori*.

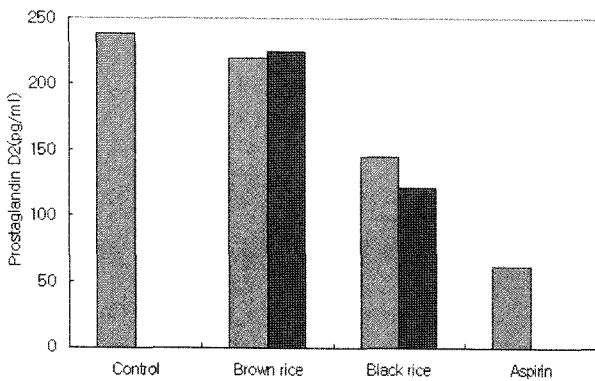


Fig. 4. Inhibition of prostaglandin D2(PD2) secretion by C3GHi blackish purple rice extract.

는 항균활성이 검출되지 않아 흑자색미 추출물의 *H. pylori* 균에 대한 항균스펙트럼에 대한 추가조사가 필요한 것으로 생각된다.

Fig. 4는 C3GHi 쌀의 항염활성을 면역세포가 분비하는 prostaglandin D2(PD2)의 함량을 조사한 결과이다. 그림에서 C3GHi쌀 추출물은 음성대조군 대비 prostaglandin D2의 분비량을 감소시켜 항염활성이 있는 것으로 조사되었으나 현재 까지 알려진 NSAIDs인 aspirin에 비해서는 그 활성이 낮은 것으로 나타났다.

이상의 결과는 C3GHi쌀의 기능적 우수성을 확인하고 기능성 쌀 개발의 가능성을 시사하며 아울러 쌀 중심 식생활의 우수성을 입증한다고 볼 수 있다.

### 적 요

국내육성 흑자색미(흑진주벼, 흑남벼, C3GHi벼)와 일반미(일품벼, 추청벼, 동진벼) 품종의 메탄올 추출물을 대상으로 항산화·항혈전·항염증활성을 검토하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 0.4 mg/mL 농도에서 C3GHi벼와 흑진주벼 추출물이 73.25%, 50.38%의 우수한 자유라디칼 소거능을 나타내었다.
2. 메탄올추출물의 혈액응고 저해활성을 측정된 결과, C3GHi벼는 258.76%, 흑진주벼는 243.52%의 강한 트롬빈 저해활성을 보였다. 그러나 대조약물로 사용한 아스피린보다는(398%) 약하게 나타났다.
3. 공시한 흑자색미와 일반미 품종들은 COX-1과 COX-2에 대한 활성이 나타나지 않았으나, C3GHi벼는 PD2에 대한 항염활성을 보였다.
4. *H. pylori* 균에 의해서 나타나는 AGS cell line에 대한 독성을 조사한 결과 흑자색미 추출물은 250  $\mu$ g과 500  $\mu$ g 처리군에서 모두 *H. pylori* 균의 AGS cell line에 대한 부착

을 억제하는 활성이 있는 것으로 판명되었으며 일반미 추출물은 *H. pylori* 균에 대한 저해작용은 없는 것으로 나타났다.

5. Zone assay에 의한 항균실험결과 흑자색미 추출물은 200 µg/mL의 농도에서 ATCC 43504 및 COO1 균주에 대해서 clear zone이 검출되어 항균활성이 있는 것으로 판명되었으나 SEO 균주에 대해서는 항균활성이 검출되지 않았다.

## 사 사

본 논문은 2006년도 전기 한국방송통신대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부임.

## 인용문헌

- Chang, H. W., S. H. Baek, K. W. Chung, K. H. Son, H. P. Kim, and S. S. Kang. 1994. Inactivation of phospholipase A<sub>2</sub> by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Bio-Chem. Biophys. Res. Commun.* 205 : 843-849.
- Choi, S. W., S. H. Nam, and H. C. Choi. 1996. Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotechnol.* 5 : 305-309.
- Choi, S. P., M. Y. Kang, S. H. Nam. 2004. Inhibitory activity of the extracts from the pigmented rice brans on inflammatory reactions. *J. Korean Soc. Appl Biol Chem.* 47 : 222-227.
- Frankel, E. N. 1999. Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Fett/Lipid.* 101 : 450-455.
- Ha, T. Y. and Y. Y. Kim. 1995. A study on the nutritional properties of rice, '94 Annual Report, Korean Food Research Institute. p 25.
- Han, S. J., J. S. Kim, S. W. Chae, S. S. Kang, S. N. Ryu, J. W. Hyun, K. H. Son, H. Y. Shon, and H. W. Chang. 2004a. Biological screening of extracts from the colored rice cultivars. *Kor. J. Pharmacogn.* 35(4) : 346-349.
- Han, S. J., S. N. Ryu, and S. S. Kang. 2004b. A new 2-Arylbenzofuran with antioxidant activity from the black colored rice (*Oryza sativa* L.) bran. *Chem. Pharm. Bull.* 52 : 1365-1366.
- Hsieh, K.-H. 1997. Thrombin interaction with fibrin polymerization sites. *Thrombosis Res.* 86 : 301-316.
- Kang, M. Y., Y. H. Choi, and S. H. Nam. 1996. Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen Mitomycin C. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39 : 424-429.
- Kang, M. Y., S. Y. Shin, and S. H. Nam. 2003. Antioxidant and antimutagenic activity of solvent-fractionated layers of colored rice bran. *Korea J. Food Sci. Technol.* 35(5) : 951-958.
- Kim, H. P., K. H. Son, H. W. Chang, and S. S. Kang. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96 : 229-245.
- Moon, T. C., M. Murakami, I. Kudo, K. H. Son, H. P. Kim and H. W. Chang. 1999. A new class of Cox-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. *Inflammation Res.* 48 : 621-625.
- Nam, S. H. and M. Y. Kang. 1997. *in vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agric. Chem. Biotechnol.* 40 : 307-312.
- Nam, H. H. and M. Y. Kang. 1997. Comparison of effect of rice bran extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41 : 78-83.
- Potterat, O. 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Org. Chem.* 1 : 415-440.
- Ryu, S. N., S. Z. Park, and C. T. Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food Drug Anal.* 6 : 729-736.
- Ryu, S. N., S. J. Han, S. Z. Park, and H. Y. Kim. 2006. Antioxidant activity of blackish purple rice. *Korean J. Crop Sci.* 51(2) : 173-178.
- Sohn, H. Y., Y. S. Kwon, Y. S. Kim, H. Y. Kwon, G. S. Kwon, K. J. Kim, C. S. Kwon, and K. H. Son. 2004. Screening of Thrombin Inhibitors from Medicinal and Wild Plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 35 : 52-61.
- Tsuda, T., M. Watanabe, K. Ohshima, S. Norinobu, S. Kawakishi, S. W. Choi, and T. Osawa. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 2407-2411.