발간등록번호
11-1543000-001022-01

발아 벼를 이용한 당뇨병 예방 식품개발 및 산업화
(Industrialization and Development of Foods for Prevention of Diabetes using Germinated Rough Rice)

충북대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발아 벼를 이용한 당뇨병 예방 식품개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 17일

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단
주관연구책임자 : 정 헌 상
세부연구책임자 : 정 헌 상
선 임 연 구 원 : 이 연 리
연 구 원 : 이 상 훈
연 구 원 : 장 귀 영
연 구 원 : 강 유 리
연 구 원 : Li Meishan
연 구 원 : 김 민 영
연 구 원 : 박 혜 진
연 구 원 : 김 성 태
연 구 원 : 이 지 현
연 구 원 : 류 재 면
협동연구기관명 : (주)에프앤피
협동연구책임자 : 남 호 창
연 구 원 : 김 제 환
연 구 원 : 김 소 현

요 약 문

Ⅰ. 제 목

발아 벼를 이용한 당뇨병 예방 식품개발 및 산업화

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구과제는 발아 벼로부터 항당뇨 효능 물질의 추출 및 분리를 통하여 발아 벼의 항당뇨 효능을 구명하고 기능성 식품 소재로 활용하여 시제품을 개발하는 것에 그 목표가 있다. 연구결과를 바탕으로 4건의 항당뇨 물질 함유 시제품의 제형을 개발하였고, 이 중 1건을 상품화하여 품목제조보고를 실시하였다. 항당뇨 물질 고함유 발아 및 추출조건 확립과 제조조건 최적화와 관련된 내용으로 2건을 기술이전 하였다. 또한 3건의 특허출원, 2건의 언론홍보, 2건의 SCI급 논문 및 5건의 비SCI급 논문에 연구결과를 게재하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

- 발아 벼의 혈당강하효과 규명 (*in vitro* 및 *in vivo*)
- 발아 벼에 함유된 항당뇨 물질 분리·동정 및 효능 평가
- 활성물질의 항당뇨 메카니즘 규명 및 표준화 연구
- 항당뇨 물질 다량 생성 발아조건 및 대량생산 방법 연구
- 시제품 개발 및 최적 제형 제조조건 설정

Ⅳ. 연구개발결과

1. 세부연구과제 : 충북대학교

항당뇨 관련 효소 저해활성 및 포도당 유입활성 평가를 통해 발아 벼 추출물의 in vitro 항당뇨 효능을 평가하였고 activity-guided purification법에 의한 여러 단계의 정제과정을 거쳐 활성분획(C5)를 얻었으며 지표물질로 ferulic acid를 선정하였다. 당뇨유발 마우스 모델을 이용하여 활성분획의 in vivo 항당뇨 효능을 평가하였고, 발아 벼 추출물이 IRS-1, PI3K 및 Akt의 활성화로 인해 세포내 GLUT4의 발현량을 증가시켜 혈당 농도를 감소시키는 작용기작을 규명하였다. 제조공정에 따른 지표물질의 함량변이를 조사하여 기준을 제시하였으며, 온도, 빛, pH에 따른 활성분획의 저장안정성을 평가하였다.

2. 협동연구과제 : (주)에프앤피

발아온도 및 기간, 추출용매 및 온도에 따라 항당뇨 물질을 다량 함유하는 조건을 확립하였으며, 발아 벼 분말, 선식, 음료 및 캡슐의 시제품 제형을 개발하였다. 시제품의 in vitro 항당뇨 효능 평가를 통해 활성이 이행되는 것을 확인하였다. 동물실험 결과를 바탕으로 발아 벼 분말 또는 추출물의 섭취량을 결정하였고 이의 경제성 및 적용가능성을 검토하여 기존 선식 제형을 리뉴얼하여 시제품을 개발하였다. 대량생산을 위한 시제품의 집단특성 평가를 통한 물성을 개

선하였으며, 항당뇨 효능 및 지표물질의 함량 유지를 위한 저장성을 평가하였다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

- 발아 벼에 함유된 유용성분 분리 기술 확보
- 우수 벼품종 선발을 위한 자료활용
- 발아 벼에 함유된 항당뇨활성 물질분리 및 동정기술의 특허 출원을 통한 지적재산권 확보
- 동물 실험을 통한 항당뇨 예방효과기술의 논문 발표
- 국민보건 증진을 위한 기능성식품 소재화

(1) 기술적 측면

○ 발아 벼에 함유된 유용성분의 최대 생산조건 및 분리 기술 확립

○ 항당뇨 효능이 높은 벼 품종선발 및 물질다량생산조건 확립

○ 당뇨예방 및 치료용 소재로 기능성 쌀의 이용성증대를 위한 기본 자료제공

(2) 경제적 · 산업적 측면

○ 신수요 창출에 따른 벼 소비 증가로 안정적 농가소득 보장

○ 당뇨예방 식품 및 소재 개발을 통한 국민건강증진에 기여

○ 발아 벼의 당뇨 예방 효과 규명 및 활용가능성 제시로 이용가치와 소비확대 유도

○ 의약품과 식품의 중간형태로서 소비창출을 유도할 수 있는 새로운 산업분야의 활성화

SUMMARY

Ⅰ. Title

Industrialization and Development of Foods for Prevention of Diabetes using Germinated Rough Rice

Ⅱ. The purpose of the study and performance against targets

The purpose of the this study was to investigated the antidiabetic effects of germinated rough rice through the isolation and identification of the antidiabetic substance and to developed a prototypes to serve as a functional food materials. Based on the results, we developed a formulation of the 4 cases of antidiabetic substances containing prototypes (powder, *Sunsik*, beverage and capsule) and 1 cases was commercialized. Optimized the germination and extraction conditions for high containing the antidiabetic substances and activities. The 2 cases was technology transferred to company. Also, three patents was pending, two case of media relations, two of SCI grade and five of KSCI grade of papers was published.

Ⅲ. The contents and the scopes of the study

- Investigation of the antidiabetic effects of germinated rough rice extracts
- Isolation and identification of the antidiabetic substance from germinated rough rice
- Investigation of the antidiabetic mechanism and standardization of active compound
- Optimization of the germination and extraction conditions
- Mass production methods study
- Development of the prototype and optimum formulation setting

Ⅳ. Results of the study

Part 1 : Chungbuk National University

Investigation of the *in vitro* and *in vivo* antidiabetic effects of germinated rough rice extracts through the antidiabetic related enzyme inhibition activity and glucose uptake on the 3T3-L1 adipocytes. We obtained active fraction from germinated rough rice and identified the ferulic acid as remarkable substance through the several purification steps using activity-guided purification method. We evaluated the *in vivo* antidiabetic effect using diabetic mouse model and revealed the antidiabetic mechanism in the cells and mouse model. The germinated rough rice extract activated the IRS-1, PI3K, Akt and GLUT4 gene expression. we investigated the content variation of the remarkable substance according to the manufacturing process and presented the standard and references. We evaluated the storage stability of remarkable

substance and prototypes related the temperatures, light expose and pH.

Part 2 : Fungi and Plants

We optimized the germination conditions (temperature and period) and extraction methods (temperature and solvent). We developed a formulation of the 4 cases of antidiabetic substances containing prototypes (powder, *Sunsik*, beverage and capsule) and 1 cases was commercialized. The *in vitro* antidiabetic effect and remarkable substance content of the germinated rough rice prototypes was evaluated. Based on the *in vivo* study, the human equivalent dose of rough rice was expected and the *Sunsik* prototype was reformulated. Development of the prototype and optimum formulation setting and mass production methods study. The storage stability of prototypes were evaluated.

Ⅴ. The outcomes of the study and further plans

- Securing technique for separating the useful components contained in the germination rice
- Data utilized for superior selection rice cultivars
- Securing the patent related to extraction of the antidiabetic substance form germinated rice
- Publishing the papers of antidiabetic effect of germinated rice extract
- Health promotion in accordance with the functional food development

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- 9

Chapter 2. Overview of current research status of in this field ---------- 14

Chapter 3. Contents and results of research and development ---------- 16

Chapter 4. Achievement of goals and implications for related research ---------- 158

Chapter 5. Research and development outcomes and their application plans ---- 160

Chapter 6. Scientific and technical information from abroad ---------- 163

Chapter 7. References ---------- 168

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 ---------- 9

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 14

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 16

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 158

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ---------- 160

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 163

제 7 장 참고문헌 ---------- 168

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서 ---------- 172

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

최근 서구화된 식생활과 생활습관으로 인하여, 암, 뇌혈관질환, 심장질환 등 각종 성인병이 증가하고 있으며, 그중 대사성 질환인 당뇨병은 현재 전 세계적으로 급증하고 있는 추세이다. 또한 국제당뇨병연맹에서는 전 세계 당뇨병 환자가 전체 인구의 약 6%에 해당하는 약 2억8500만 명이며, 20년 내에 4억3800만 명이 될 것이라고 예측하고 있다. 전 세계적으로 “luxury disease"라고 불리는 당뇨가 급증하면서, 2008년 세계당뇨병학회에서는 당뇨와의 전쟁을 선포하고, 매년 당뇨의 위험성을 경고하고 있다. 2009년 통계청의 사망원인 통계연보에 따르면 인구 10만 명당 196명이 당뇨병으로 사망하고 있어 국내 10대 사망원인 중 당뇨병이 5위를 차지하고 있다.

최근 제2형 당뇨는 과도한 식품섭취 및 운동부족으로 인한 비만에서 비롯된 생활습관성질환(lifestyle disease)으로 정의되고 있으며, 제2형 당뇨의 경우에도 진단 당시에는 50% 정도 베타세포의 기능이 남아 있더라도 유병기간이 길어질수록 과도한 인슐린 생산으로 점차 베타세포의 파괴가 진행되면서 제1형 당뇨환자처럼 혈액 내 인슐린이 부족하게 된다. 현재 국내에서 진단 확정된 제2형 당뇨환자의 약 35% 정도가 1차 선택약물로 인슐린 분비를 유도하는 약물을 사용하고 있으며, 제2형 당뇨의 치료제로 많이 사용되는 설폰요소제(sulfonylurea drug)의 경우, 일차적으로는 췌장 베타세포의 ATP-denditive K+(KATP) channel의 감극(depolarization)을 유도하고 volt-age-dependent Ca2+ channels를 열어 세포내 Ca2+농도를 증가시켜 인슐린 분비를 촉진하고, 이차적으로는 근육이나 지방의 인슐린 수용체의 수를 늘려 포도당의 세포내 전달을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 인슐린 분비촉진과 인슐린 저항성을 개선시키는 약물 중 이러한 강력한 작용으로 인해 유병기간이 긴 당뇨병 환자나 알코올 중독간이나 신장 질환을 동반한 당뇨병 환자의 경우 저혈당을 유발하는 등 여러 가지 부작용이 유발되고 있다.

최근 이러한 약물과 유사한 효능을 가지고 있으면서도 안전하게 혈당을 조절하는 천연기능성 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식생활 변화에 따른 국민 1인당 연간 쌀 소비량의 감소 및 수년간 유지되어온 평년작 이상의 쌀 생산에 따라 재고가 누적되고 있으며, 이에 따라 쌀 소비 확대를 위하여 다양한 쌀 가공제품이 개발되고 있으나, 보다 많은 쌀 소비 확대를 위한 연구가 필요하다. 우리나라는 쌀을 주식으로 하는데 있어서, 벼 도정시 발생하는 부산물들이 자원으로 다양한 가치가 있으므로 부가가치가 있는 소재로서의 개발가능성이 있다.

발아현미는 현미에 비해 취반성과 조직감이 개선되고 GABA, γ-oryzanol 등의 기능성 성분이 증진되거나 새로이 생성되는 것으로 알려져 있으며, 기능성 뿐만 아니라 기호성, 편의성 등이 현미에 비해 크게 증진되어 있다. 종자의 발아에 관한 연구는 수년 전부터 이루어져 왔으나, 그 연구는 대부분 발아현미에 의한 관심증대로 다른 종자 및 발아전곡에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 왕겨와 쌀겨는 다양한 영양소가 존재함에도 불구하고 극히 일부만이 가공되어질 뿐 대부분 사료용 또는 농업폐기물로 처리되고 있는 실정이다. 본 연구진은 발아에 의해 왕겨층의 화학성분들의 변화가 발생하고, 유용물질들이 생성됨을 확인하였으며, 또한 선행연구에서 발아 벼의 항당뇨 효능에 관한 연구를 진행하였지만 물질분리 및 기능성식품에 관한 연구는 부족한 실정이다. **따라서 당뇨병을 예방하고 당뇨에 효과가 있는 물질을 발아 벼로부터 추출/분리하고 그 물질이 가지고 있는 항당뇨 메카니즘을 규명하는 연구가 필요하다.**

제2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표

본 연구과제는 발아 벼로부터 항당뇨 효능 물질의 추출 및 분리를 통하여 발아 벼의 항당뇨 효능을 구명하고 기능성 식품 소재로 활용하여 시제품을 개발하는 것에 그 목표가 있으며, 구체적인 연구 목표는 다음과 같다.

- 발아 벼의 혈당강하효과 규명 (*in vitro* 및 *in vivo*)
- 발아 벼에 함유된 항당뇨 물질 분리·동정 및 효능 평가
- 활성물질의 항당뇨 메카니즘 규명 및 표준화 연구
- 항당뇨 물질 다량 생성 발아조건 및 대량생산 방법 연구
- 시제품 개발 및 최적 제형 제조조건 설정

연구결과를 바탕으로 4건의 항당뇨 물질 함유 시제품의 제형을 개발하고, 이 중 1건을 상품화하여 품목제조보고를 실시할 계획이며, 항당뇨 물질 고함유 발아 및 추출조건 확립과 제조조건 최적화와 관련된 내용으로 2건의 기술실시를 할 계획이다. 또한 3건의 특허출원, 2건의 언론홍보, 3건의 SCI급 논문 및 4건의 비SCI급 논문에 연구결를 게재할 계획이다.

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

세 부 과 제 명	주 요 연 구 내 용	연도별 연구목표	년차
세부연구과제 발아 벼로부터 항당뇨 물질분리동정 및 표준화	○ 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가 - 일품 발아 벼 및 발아현미 추출물 제조 - α-Amylase 억제 활성 평가 - α-Glucosidase 억제 활성 평가 - DPP-4 억제 활성 평가 - β-cell line(HIT-T15)의 insulin 분비능 측정 - 3T3-L1 지방세포를 이용한 포도당 흡수율 측정	발아 벼의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가 및 물질분리	1년차
	○ 발아 벼로부터 항당뇨 물질 분리·동정 - 용매분획(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물) - 물질분리(TLC, MPLC, Prep. HPLC, Open column chromatography 등) - 물질동정(LC/MS, NMR 등)		1년차
	○ 활성물질의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘 규명 - 3T3-L1의 세포분화 영향요인 분석 - FABP4, SCD1, PPARγ, C/EBPα, GLUT4, Akt 등의 전사인자의 발현량 평가	활성물질의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘 규명 및 *in vivo* 효능 평가	2년차
	○ 활성물질에 대한 *in vivo* 항당뇨 효능 평가 - db/db mouse를 이용한 동물실험 - 체중 및 식이섭취량, 혈중 포도당 및 인슐린 농도, 조직학적 소견 및 당부하 평가 - 동물실험 결과를 통한 섭취량 결정		2년차
	○ 활성물질의 *in vivo* 항당뇨 메커니즘 규명 - 시험동물의 간, 췌장, 신장 조직을 이용 - FABP4, SCD1, PPARγ, C/EBPα, GLUT4, Akt 등 전사인자의 발현량 평가	발아 벼의 *in vivo* 항당뇨 메커니즘 규명 및 항당뇨 물질 표준화	3년차
	○ 항당뇨 물질 분리조건 최적화 - 용매분획, Open column chromatography, MPLC, prep. HPLC 등의 분리조건 최적화 - HPLC 분석조건 최적화 ○ 발아 벼 항당뇨 물질의 안정성 평가 - 빛, 온도, pH 등에 대한 안정성 - 저장조건 및 일수에 따른 안정성		3년차

세 부 과 제 명	주 요 연 구 내 용	연도별 연구목표	년차
협동연구과제 발아 벼를 이용한 당뇨예방 식품개발 및 제조공정 최적화	○ 항당뇨 물질을 다량 함유하는 발아조건 및 추출조건 최적화 - 발아조건(품종, 온도, 습도, 기간) - 추출조건(용매, 시간, 첨가량, 온도) - 항당뇨 물질 생성량 및 추출수율 평가	발아·추출조건 최적화 및 시제품 제형개발	1년차
	○ 발아 벼를 이용한 시제품 제형개발 - 분말,과립 : 세척-건조-분쇄-충진 - 음료 : 세척-건조-초미분쇄-추출/분산음료 - 선식 : 세척-건조-분쇄-혼합-충진 - 캡슐 : 세척-건조-초미분쇄-추출-충진 - 품질평가 : 입도, 용해도, 고형분함량 등 - 소화율, 물결합력 및 팽윤력 평가 - 소비자 패널 평가 - 시제품 제형별 안정성 평가		1년차
	○ 시제품에 대한 *in vitro* 항당뇨 효능 평가 - α-Amylase 억제 활성 평가 - α-Glucosidase 억제 활성 평가 - DPP-4 억제 활성 평가	시제품에 대한 *in vitro* 항당뇨 효능 평가 및 최적 제형 선정	2년차
	○ 시제품 최적 제형 및 제조조건 선정 - 시제품에 대한 물성실험 및 관능검사 실시 - 시제품의 제형, 중량 및 형태 결정 - 최적 제형 제조조건 설정		2년차
	○ 대량생산공정 확립 (Pilot 생산공정 확립) - 최적 발아/추출조건 적용가능성 평가 - 최적생산조건 수행을 위한 시스템 확립	산업화공정 확립	3년차
	○ 당뇨예방 식품 제조조건 최적화 - 활성물질 효능 유지를 위한 제형 및 포장설계 - 제품의 유통기한설정실험		3년차

제3절 연구성과 목표 대비 실적

1. 정성적 성과 목표 및 실적

년차	주요연구내용	달성도	기타
1년차	○ 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가	100	
	○ 발아 벼로부터 항당뇨 물질 분리·동정	100	
	○ 항당뇨 물질을 다량 함유하는 발아조건 및 추출조건 최적화	100	
	○ 발아 벼를 이용한 시제품 제형개발	100	
2년차	○ 활성물질의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘 규명	100	
	○ 활성물질에 대한 *in vivo* 항당뇨 효능 평가	100	
	○ 시제품에 대한 *in vitro* 항당뇨 효능 평가	100	
	○ 시제품 최적 제형 및 제조조건 선정	100	
3년차	○ 활성물질의 *in vivo* 항당뇨 메커니즘 규명	100	
	○ 항당뇨 물질 분리조건 최적화	100	
	○ 발아 벼 항당뇨 물질의 안정성 평가	100	
	○ 대량생산공정 확립	100	
	○ 당뇨예방 식품 제조조건 최적화	100	

2. 정량적 성과 목표 및 실적

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용 등)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	언론홍보	
최종목표	3		2	1						3	4	6				2	
연구기간 내 달성실적	3		1	1						2	5	8				2	
달성율(%)	100		50	100						66	125	133				100	

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 기술개발 현황

일반적으로 식물종자는 발아가 진행됨에 따라 생리활성이 증가되고 성분변화가 일어나기 때문에 발아 전에는 적거나 없던 물질이 증가하거나 생성되므로, 발아에 의한 영양소 및 생리활성 물질의 함량을 증가시키기 위한 연구들이 곡류 및 두류를 중심으로 활발하게 진행되어 왔다. 곡류에 대한 연구로는 발아 중 탄수화물 변화, 단백질과 아미노산 변화, 지방산 변화, 무기질 변화, 비타민 변화 등과 각종 효소나 효소 저해제의 일종인 트립신 저해제의 변화에 관한 연구들이 수행되었다.

벼의 발아에 관한 연구는 대부분 현미에 의하여 진행되어 왔으며, 현미의 발아 정도에 의한 항산화활성 변화, 비만 억제 활성, 항돌연변이 작용, 생리활성, 발아음료 및 제빵의 품질특성 등과 같이 여러 분야에서 진행되고 있으며, 메밀, 들깨, 대두 및 유채 등의 종자에 대한 발아기간별 성분변화에 대한 연구도 수행되었다.

벼 자체를 발아시킨 연구는 한국산 발아 벼 추출물의 항암활성, 발아맥류의 화학성분 변화, 발아벼 품종별 70% 에탄올추출물의 생리활성변화, 발아 벼 품종별 항산화활성의 변화, 발아벼 품종의 혈당강하효과 등의 연구가 현재 일부 수행되었다.

제2절 문제점 및 전망

1. 문제점

식품에 함유되어 있는 유용성 성분에 관한 기능성 연구들이 다양한 식품소재 및 약용식물로 진행되고 있으나, 벼 자체를 발아시켜서 항 당뇨성 물질을 분리·동정하여 그 작용기전에 관한 연구가 시도되는 것은 전무하다. 특수미 중 거대배아미의 발아에 따른 단백질대사와 관련된 효소 및 대사산물에 기인하는 생리활성물질인 GABA의 함량이 증가한다는 일본 농림수산청 식품연구소의 연구가 있다. 발아현미의 대표적인 기능성물질인 GABA는 혈압상승억제, 혈류개선, 신경전달물질로 의약품 및 기능성 소재로 관심이 증대되어 다른 종자 및 발아 전곡에 관한 연구는 매우 미비한 실정이므로, 본 연구진은 발아 벼에서 혈당강하 메카니즘을 규명할 수 있는 새로운 물질에 관한 연구를 수행하고자 한다.

발아현미를 이용한 건강기능성 식품으로 발아현미차가 일본에서 제품화되어 있으며, 버섯쌀을 비롯한 발효쌀들에 대한 연구도 국내 및 국외에서도 이루어지고 있다. 그러나 이들 제품은 현미를 발아시킨 것으로, 본 연구팀은 발아전곡에서부터 항 당뇨성 물질을 분리하여 식품학적, 영양학적, 메카니즘 등 생리활성 효과에 관한 다각적인 연구를 수행할 계획이다.

일본에서는 혈당강하 효과가 확인된 미강의 수용성 식이섬유 및 자일로올리고당을 분리 정제하여 상품화하고 있으나, 미곡부산물을 비롯한 곡류의 혈당강하효과에 대한 연구는 거의 없다. 이밖에 당뇨환자 치료를 위해 경구혈당강하제로 사용하고 있는 설폰요소제(sulfonylurea drug)와 바아구니드계(biguanide)의 화합물은 부작용 등이 문제시되고 있어 천연물로부터 생산된 혈당강하효과를 가진 기능성 식품의 개발이 필요하다.

2. 전망

본 연구에 의해 확립되어지는 항당뇨 물질에 관한 기능성 제품개발의 우위를 선점하리라 전망되며, 본 연구에 의해 개발되어지는 항 당뇨성 물질의 메카니즘 연구가 검증되고, 이러한 과학적 연구근거를 바탕으로 신뢰성 있는 생산업체에서 기능성식품이 생산되어 국가기관으로부터의 공인하에 시판된다면, 엄청난 부가가치를 창출할 수 있으며, 매년 누적되는 국내 쌀 재고량 감소에도 기여를 하게 되며, 이에 따라 농민의 소득증대는 물론 국민건강증진에도 크게 기여할 것으로 전망된다.

당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등 생활습관병은 식품섭취조절로 치유가 될 가능성이 높은 질병이므로, 천연 농산식품의 건강기능성 파악과 이들로부터 제조된 기능성식품에 대한 소비자의 요구도 증대될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 및 생리활성 평가

1. 연구방법

가. 실험재료 및 발아

실험에 사용된 벼는 2011년도에 충북 증평에서 생산된 한국산의 일반 벼 품종인 일품(*Oryza sativa* L.; *Ilpum*)을 구매하여 실험에 사용하였다. 발아는 Lee 등(2008)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 벼를 물로 수차례 수세하며 이물질을 제거하고 물을 1일 2회씩 교환하며 암소에서 3일간 침지시켰다. 온도(37℃)와 상대습도(85%)가 유지되는 발아기(WGC-450, Dahan Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 6일간 발아시켰으며, 1일 2회씩 세척하였다. 발아시키지 않은 벼를 대조구(무발아)로 하였으며, 무발아 및 발아 벼는 50℃의 열풍건조기(WFO-459PD, EYELA, Tokyo, Japan)에서 2일간 건조시켜 시료로 사용하였다.

나. 발아 벼의 부위별 분리 및 추출물 제조

건조된 무발아 및 발아 벼는 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨와 싹을 혼합한 분획(hull & sprout; HS)과 현미(Brown rice; BR)로 나누어 분리한 뒤, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Switzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄한 후 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 시료 중에 함유된 유용성분을 추출하기 위해 물 및 에탄올 추출물을 제조하였다. 물 및 에탄올 추출은 각각 시료 중량 대비 10배의 증류수와 80% 에탄올(v/v)를 첨가하여 80℃에서 3시간동안 환류추출하고, 이 추출물을 감압여과, 진공농축 및 동결건조한 후 -20℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

다. 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가

(1) α-Glucosidase 저해활성 평가

α-Glucosidase 저해활성은 Tibbot와 Skadsen (1996)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, α-Glucosidase과 ρ-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (ρNPG)는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 각각의 추출물 50 μL를 0.35 unit/mL α-glucosidase 효소액 100 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 1.5 mM ρNPG 50 μL를 가하여 37℃에서 20분간 반응시켰다. 1 M Na_2CO_3 1 mL을 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)을 계산하였으며, positive control로 acarbose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

(2) α-Amylase 저해활성 평가

α-Amylase 저해활성은 Lim 등(2005)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 각각의 추출물 125 μL에 12 unit/mL pancreatin 기원의 α-amylase 효소액 62.5 μL, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 62.5 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 1% starch를 125 μL 가하여 37℃에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 48 mM DNS (3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartrate in 0.5 M NaOH) 발색시약 125 μL를 넣고 100℃에서 15분간 끓여 발색을 시킨 후 충분히 냉각시키고, 이 반응액에 3배량의 증류수를 가한 후 ELISA를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)을 계산하였다.

(3) Dipeptidyl peptidase-4 저해활성 평가

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해활성은 DPP-4 Inhibitor Screening Kit (Cat. K780-100, Biovision Co., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 시험법에 따라 측정하였다. 즉, DPP-4 enzyme 1 μL와 enzyme buffer 49 μL를 혼합하여 enzyme buffer를 준비하고 DPP-4 Substrate 2 μL와 enzyme buffer 23 μL를 혼합하여 substrate 용액을 준비하였다. 96-Well plate에 각각의 추출물 25 μL를 DPP-4 Enzyme buffer 50 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 Substrate 용액 25 μL을 가하여 0~30분동안 37℃에서 kinetic 반응하여 360 nm와 460 nm의 흡광도를 측정하였고 저해율(%)을 계산하였다.

(4) 3T3-L1 지방세포의 포도당 유입활성 평가

(가) 3T3-L1 지방세포 배양 및 분화 유도

3T3-L1 전지방세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포의 배양과 유지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 조건에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포가 80~90% confluence 되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기에서 세포를 모은 후 suspension 용액을 만들어 세포 배양용 6-well plate에서 confluent 상태까지 배양한 후 포화상태에 이른 것을 확인한 다음 48시간 더 배양하였다. 세포가 post-confluent하게 되면 IBMX (0.5 mM)와 dexamethasone (0.25 μM), insulin (5 μg/mL), 10% FBS를 첨가된 differentiation medium을 처리하여 분화를 유도하였다. 분화유도 2일 후에는 5 μg/mL의 insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였다. 그 후 4, 6일째 10% FBS DMEM으로 배양액을 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다.

(나) 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 유입활성 평가

배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 고농도 포도당 DMEM 용액으로 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 7~10일 사이에 포도당 흡수 실험을 포도당 유입 실험을 하였다. 분화가 유도된 지방세포를 PBS로 세척한 후 Serum-free DMEM으로 37℃에서 6시간 동안 배양한 후 Krebs Ringer Phospate Hepes buffer (KRPH buffer; 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.3 mM $CaCl_2$, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7.5)로 세척한 후에 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 대조구 및 시료를 희석하여 3T3-L1 지방세포내로의 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit (COSMO BIO CO., LTD, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 즉, 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 시료와 1 uM insulin, 1 mM 2-Deoxyglucose를 같이 분화가 유도된 지방세포에 처리한 후 37℃에서 20분동안 배양한 다음 배지를 제거한 후 200 uM phloretin이 포함된 cooled PBS로 세척한다. 그 후, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 각 well에 3 mL 넣은 뒤 세포를 파쇄한다. Cell lyssate를 tube로 모아준 후 80℃에서 15분동안 열처리를 실시한 다음 4℃ 15,000×*g*로 20분동안 원심분리를 실시한 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨준 후 상등액을 1×sample diluent buffer (1:4)로 희석한 다음 kit 안의 solution을 사용해 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit 방법에 준하여 실험을 순차적으로 진행한 다음 420 nm, 25~30℃의 조건에서 30분동안 5분 간격의 kinetic 반응으로 흡광도를 측정하였다(Zou, Wang & Shen, 2005).

라. 발아 벼 추출물의 생리활성

(1) Angiotensin converting enzyme I 저해활성 평가

각각의 추출물에 대한 Angiotensin converting enzyme I (ACE) 저해활성은 Kwon 등(2006)의 방법을 변형하여 측정하였다. ACE 저해활성 측정에 사용된 5 mM HHL (Hippuryl-His-Leu) 기질은 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.3)에 용해하였으며, 0.2 mU ACE 정제효소는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 용해하여 사용하였다. 추출물 100 μL에 0.2 mU ACE 정제효소액 80 μL와 5 mM HHL 기질 100 μL를 가한 뒤 37℃에서 60분 방치하였다. 반응을 정지시키기 위하여 1 M HCl 250 μL를 가한 다음 0.45 μm syringe filters로 여과하였으며, HPLC (ACME 9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하여 ACE 저해율(%)을 계산하였다. 칼럼은 C-18 column (Mightysil RP-18 GP column, 4.6×250 mm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan), mobile phase는 A를 10 mM phosphoric acid (pH 2.5), B를 methanol로 사용하여 A:B의 초기비율을 100:0으로 시작하여 12분에 40:60, 19분에 0:100, 25분에 100:0의 비율로 단계적인 gradient system을 사용하였다. Flow rate는 1.0 mL/min의 유속으로 흘려주었고, injection volume은 20 μL, detector는 UV-detector (228 nm)를 사용하였다.

(2) Xanthine oxidase 저해활성 평가

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte (1969)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 각 추출물 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL, 2 mM xanthine 0.2 mL, 0.2 unit/mL xanthine oxidase 0.1 mL를 가하여 37℃에서 5분간 반응 시킨시켰다. 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 ELISA를 사용하여 흡광도 292 nm에서 측정하고 저해율(%)을 계산하였다.

(3) Pancreatic lipase 저해활성 평가

Lipase 저해활성은 Kim 등(2007)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, porcine pancreatic lipase 0.3 mg에 10 mM MOPS/1 mM EDTA (pH 6.8) 60 μL를 분주하고 100 mM Trice-HCl/ 5 mM $CaCl_2$ (pH 6.8) 800 μL를 첨가하여 enzyme buffer를 준비하였다. Enzyme buffer에 추출물 100 μL를 첨가하여 37℃에서 15분간 전배양한 후 10 mM ρ-NPB 40 μL를 첨가하여 37℃에서 15분간 반응시켰다. ρ-NPB가 ρ-nitrophenol로 가수분해된 정도를 ELISA를 사용하여 흡광도 400 nm에서 측정하고 저해율(%)을 계산하였다.

마. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리조건에 따른 유의차를 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석한 뒤 신뢰구간 $P<0.05$에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

2. 연구결과

가. 발아 벼 추출물의 특성

(1) 발아기간에 따른 발아 벼 현미와 왕겨의 비율 변화

건조된 무발아 및 발아 일품을 현미기를 사용하여 왕겨와 싹을 포함한 분획(Hull & sprout : HS)과 현미 분획(Brown rice : BR)으로 나누어 분리한 결과는 Table 1-1과 같이 나타났다. 무발아 일품의 HS 분획은 19.61%로 나타났으며, 발아 1일차에는 20.37%로 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p>0.05$), 발아 2일차부터 증가하여 발아 6일차에는 32.60%로 높은 함량을 나타냈다($p<0.05$). HS 분획과 BR 분획의 비율의 경우에도 무발아와 발아 1일차에는 0.244와 0.256으로 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p>0.05$), 발아 2일차부터는 HS 분획의 비율이 크게 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$).

Table 1-1. Changes in the contents of brown rice and hull & sprout with different germination time, and the ratio of hull & sprout and brown rice.

Germination time (day)	Brown rice (BR, %)	Hull & sprout (HS, %)	HS/BR
0	80.39±1.08[a1)]	19.61±1.08[f]	0.244±0.017[f]
1	79.63±0.69[a]	20.37±0.69[f]	0.256±0.011[f]
2	77.67±1.05[b]	22.33±1.05[e]	0.288±0.017[e]
3	74.46±1.10[c]	25.54±1.10[d]	0.343±0.020[d]
4	72.35±0.59[d]	27.65±0.59[c]	0.382±0.011[c]
5	69.47±0.82[e]	30.53±0.82[b]	0.440±0.017[b]
6	67.40±0.71[f]	32.60±0.71[a]	0.484±0.016[a]

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(2) 발아기간, 부위 및 추출용매에 따른 발아 벼의 수율 변화

일품 벼의 발아 일수별 전곡(RR), 현미(BR), 왕겨와 싹을 포함한 분획(HS)의 물과 에탄올을 이용하여 추출한 결과 추출 수율은 Table 1-2, 1-3과 같이 나타났다. 물 추출물의 경우 BR(7.20~21.37%), RR(7.07~20.03%), HS(6.55~14.56%)의 순서로 추출 수율이 높게 나타났으며, 발아 기간이 증가함에 따라 추출 수율이 증가하였다($p<0.05$). 에탄올 추출의 경우에도 BR(6.56~17.36%), RR(6.31~16.21%), HS(5.31~11.59%)의 순서로 추출 수율이 높게 나타났으며, 발아 기간이 증가함에 따라 추출 수율이 증가하였다($p<0.05$). 또한 에탄올 추출보다 물 추출의 수율이 높게 나타났다.

Table 1-2. Changes in the water extraction yields of rough rice, brown rice and hull & sprout with different germination time.

Germination time (day)	Rough rice (RR, %)	Brown rice (BR, %)	Hull & sprout (HS, %)
0	7.07±0.15[f1)]	7.20±0.21[f]	6.55±0.17[f]
1	7.41±0.28[f]	7.47±0.34[f]	7.14±0.07[e]
2	9.35±0.31[e]	9.83±0.36[e]	7.44±0.13[e]
3	12.02±0.21[d]	12.91±0.31[d]	8.47±0.21[d]
4	14.74±0.12[c]	15.51±0.20[c]	11.68±0.27[c]
5	17.69±0.71[b]	18.74±0.88[b]	13.50±0.27[b]
6	20.03±0.74[a]	21.37±0.85[a]	14.66±0.53[a]

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

Table 1-3. Changes in the ethanol extraction yields of rough rice, brown rice and hull & sprout with different germination time.

Germination time(day)	Rough rice (RR, %)	Brown rice (BR, %)	Hull & sprout (HS, %)
0	6.31±0.11^{g}	6.56±0.16^{g}	5.31±0.13^{g}
1	7.73±0.19^{f}	8.12±0.23^{f}	6.18±0.05^{f}
2	9.86±0.21^{e}	10.45±0.27^{e}	7.48±0.07^{e}
3	11.57±0.23^{d}	12.42±0.32^{d}	8.19±0.16^{d}
4	14.32±0.26^{c}	15.54±0.36^{c}	9.46±0.11^{c}
5	15.43±0.16^{b}	16.73±0.17^{b}	10.26±0.15^{b}
6	16.21±0.56^{a}	17.36±0.65^{a}	11.59±0.55^{a}

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

나. 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가

(1) α-Glucosidase 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1-1과 같다. 각각의 저해활성은 물 추출물과 에탄올 추출물 각각 시료 20 mg/mL와 10 mg/mL의 농도에서 측정한 것으로 발아 4일차까지 발아 일수가 증가함에 따라 모든 부위 발아 벼 추출물의 α-glucosidase 저해활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며($p<0.05$), 발아 일수와는 상관없이 HS 분획에서 a-glucosidase 저해활성이 높게 나타났다($p<0.05$). 물 추출물(Fig. 1-1. (A))에서는 20 mg/mL농도의 발아 4일차 HS 분획이 38.35%으로 가장 높은 α-glucosidase 저해활성을 나타냈으며, 에탄올 추출물(Fig. 1-1. (B))에서는 10 mg/mL농도의 발아 5일차 HS 분획이 39.41%로 가장 높은 저해활성을 나타냈다.

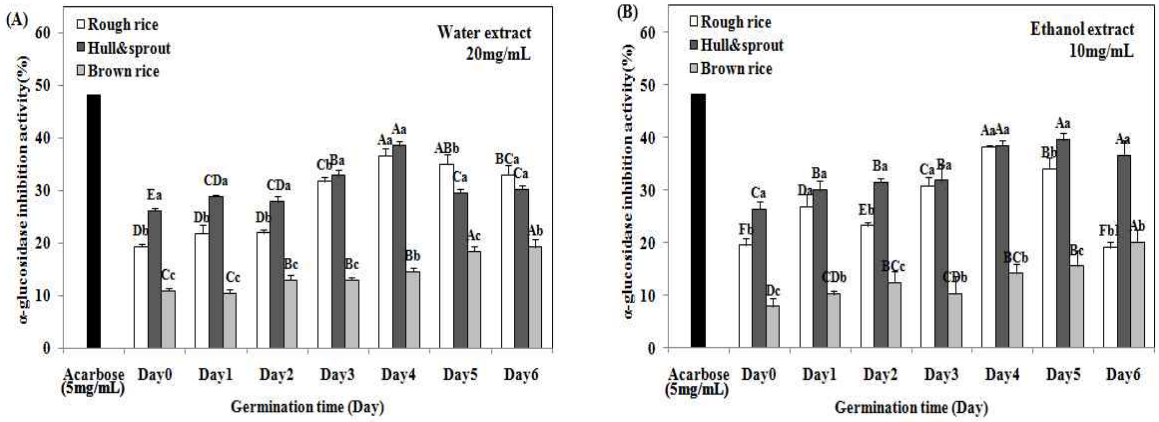


Fig. 1-1. Changes in α-Glucosidase inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

(2) α-Amylase 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 α-amylase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1-2와 같다. 각각의 저해활성은 열수추출물과 에탄올추출물 각각 시료 2 mg/mL와 0.5 mg/mL의 농도에서 측정한 것으로 추출용매에 상관없이 발아초기(Day 0~2)비해 발아후기(Day 3~6)의 부위별 벼추출물의 α-amylase 저해활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈으며, 부위에 따른 α-amylase의 저해활성의 변화는 BR 추출물에 비해 HS 추출물에서 유의적으로 높게 나타났다. 물 추출물(Fig. 1-2. (A))에서는 발아후기(Day 3~6)의 HS 추출물이 72.96~76.75% 범위의 α-amylase 저해활성을 나타내어 가장 우수한 저해능을 보였으며, 에탄올 추출물(Fig. 1-2. (B))에서 또한 유사한 경향을 나타내어 발아후기의 HS 추출물에서 72.37~75.32%의 α-amylase 저해능을 보였다.

(3) Dipeptidyl peptidase-4 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해활성을 측정한 결과 Fig. 1-3에서 보는 바와 같이 모든 부위의 발아 벼 추출물이 발아 4, 5일까지는 증가하다가 그 이후 감소하는 경향을 보였으며, 부위에 따라서는 HS 분획이 BR보다 유의적으로 높게 나타났고, 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 우수한 DPP-4 저해활성을 보였다. 물 추출물(Fig. 1-3. (A))에서는 HS 분획이 발아 4일차가 40.97%로 무발아 시료의 34.09%보다 유의적으로 증가하였으며, BR 추출물의 경우 발아후기가 6.87%~19.32%로 무발아 BR 2.93%에 비해 높게 나타났다. 에탄올 추출물(Fig. 1-3. (B))에서는 발아 0일차 HS 분획의 DPP-4 저해활성은 34.09%이었지만, 발아4, 5일차에서 각각 45.88 및 47.77%로 증가하였으며, BR의 경우 발아 전에는 활성이 없었으나 발아 4, 5일차에서 각각 4.01% 및 8.96%의 저해활성이 나타났다.

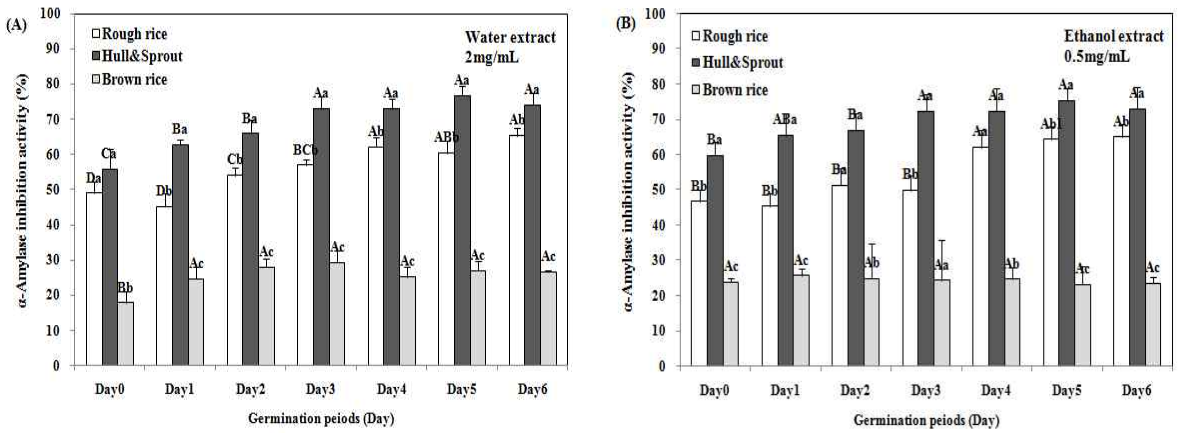


Fig. 1-2. Changes in α-amylase inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

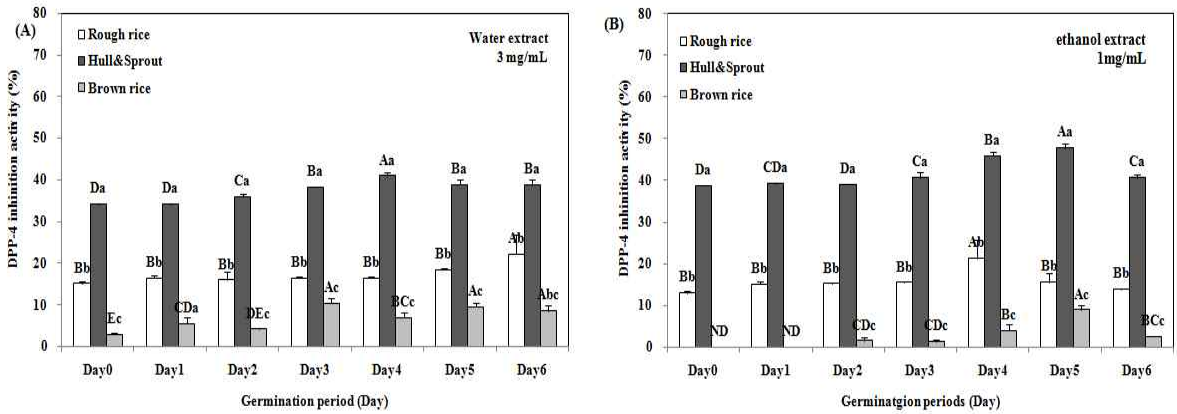


Fig. 1-3. Changes in dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

(4) 3T3-L1 지방세포의 포도당 유입활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성을 평가하기 위하여 건조된 일품 벼로부터 현미(BR), 왕겨와 싹을 포함한 분획(HS)을 분리한 후 물과 에탄올을 이용하여 추출한 결과 추출 수율은 Table 1-4와 같이 나타났다. 무발아의 경우 BR가 HS 분획보다 추출 수율이 높았으며, 에탄올보다 물 추출의 추출수율이 높았다. 발아의 경우도 유사하게 나타났으며, 발아에 따라서 추출수율이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

Table 1-4. Extraction yields of rough rice with different germination time, parts and extraction solvents.

Treatments	Parts	Extraction		Sample code	Yields (%)
		Solvents	Condition		
Non-germination	Brown rice (BR)	80% EtOH	80℃, 3 hr, 1 times	IP-BR_E	6.56±0.16[e1)]
		Water		IP-BR_W	7.20±0.21[e]
	Hull & sprout (HS)	80% EtOH		IP-HS_E	5.31±0.13[f]
		Water		IP-HS_W	6.55±0.17[e]
Germination (6 day)	Brown rice (BR)	80% EtOH		GIP-BR_E	17.36±0.65[b]
		Water		GIP-BR_W	21.37±0.85[a]
	Hull & sprout (HS)	80% EtOH		GIP-HS_E	11.59±0.55[d]
		Water		GIP-HS_W	14.66±0.53[c]

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

각 추출물의 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성을 MTT colorimetric assay로 살펴본 결과는 Fig. 1-4와 같다. 모든 처리구에서 세포독성을 보이지 않아 추후 3T3-L1 지방세포를 이용한 포도당 유입활성 평가에서 각 추출물의 농도를 500 μg/mL의 농도에서 처리하였다. 발아 유무, 부위 및 추출용매에 따른 일품 벼 추출물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 500 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 1-4와 같이 나타났다. 1 μM의 인슐린과 1 mM의 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG-6-phosphate)를 처리한 대조구(control)의 포도당 유입활성을 기준으로 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물(GIP-HS_E)만이 발아 전후에 40.97%에서 157.53%로 증가하였다. 부위와 추출용매에 따라서는 일품 무발아 에탄올 추출물을 제외하고 큰 차이를 보이지 않았으며, 대체적으로 물 추출물의 포도당 유입활성이 높게 나타났다. 그러나 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물(GIP-HS_E)이 가장 높은 활성을 나타냈기 때문에 이후 추가적인 정제 실험에 이용하였다. 또한 현미와 발아현미, 발아 벼로부터 분리한 현미와 왕겨 추출물의 포도당 유입활성을 평가한 결과 왕겨 추출물에서 유의적으로 높은 활성을 보였다(Fig. 1-5).

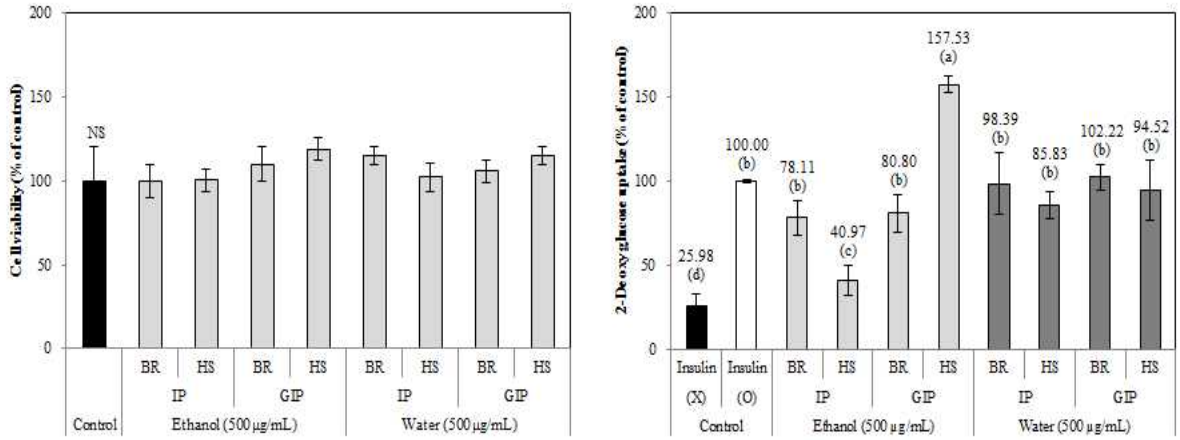


Fig. 1-4. Effect of rough rice extracts with different germination time, parts and extraction solvents on the cell viability and glucose uptake by 3T3-L1 adipocyte. Different small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$).

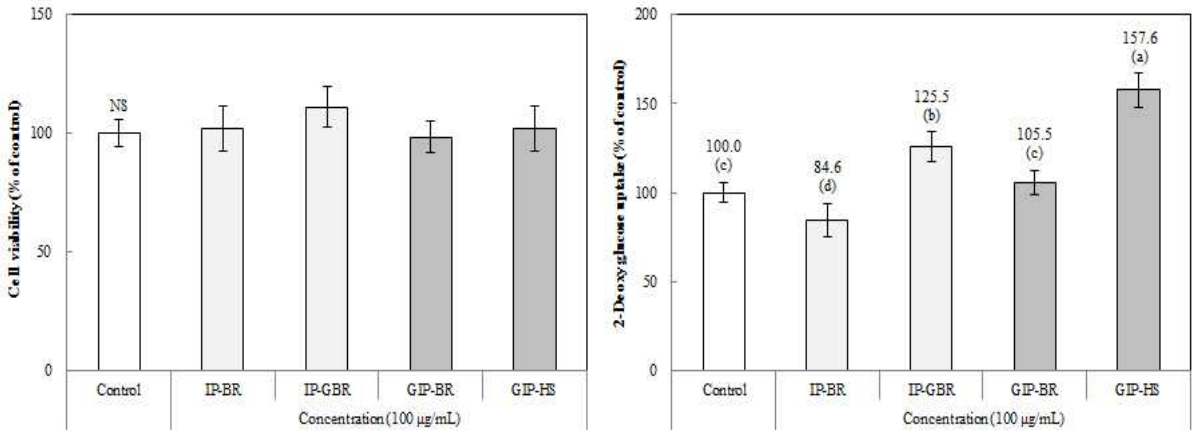


Fig. 1-5. Effect of brown rice (IP-BR), germinated brown rice (IP-GBR) and germinated rough rice extracts (GIP-BR and GIP-HS) on the cell viability and glucose uptake by 3T3-L1 adipocyte. Different small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$).

다. 발아 벼 추출물의 생리활성

(1) Angiotensin converting enzyme I 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 angiotensin converting enzyme 1 (ACE) 저해활성을 측정한 결과 Fig. 1-6에서 보는 바와 같이 발아 5일까지는 증가하다가 그 이후 감소하는 경향을 나타내었으며, 부위에 따른 발아 벼의 ACE 저해활성의 변화는 HS 분획이 BR에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p<0.05$). 물 추출물에서(Fig. 1-6. (A))는 HS 추출물의 경우 발아 5일차가 40.23%로 무발아의 29.38%에 비해 증가하였고, BR 추출물은 발아5일차가 4.63%로 무발아의 0.56%에 비해 증가하였다. 또한 에탄올 추출물(Fig. 1-6. (B))에서는 물 추출물과 유사한 경향을 나타내었지만, HS 추출물에서 43.16~58.60%범위의

ACE 저해율을 보여 물 추출물에 비해 높게 나타났다.

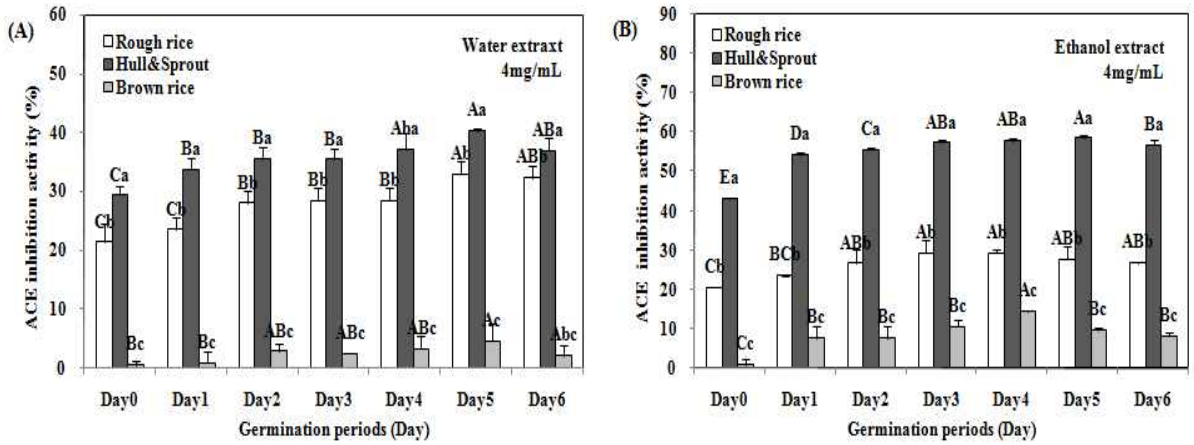


Fig. 1-6. Changes in angiotensin converting enzyme 1 (ACE) inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

(2) Xanthine oxidase 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 xanthine oxidase (XO) 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1-7과 같다. Xanthine oxidase 저해활성은 물 추출물에 비해 에탄올 추출물이 저농도에서 우수한 XO 저해능을 나타냈으며, 발아초기에 비해 발아가 진행됨에 따라 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($p<0.05$). 부위에 따라서는 BR에 비해 HS에서 높게 나타났다($p<0.05$). 물 추출물(Fig. 1-7. (A))에서는 무발아의 HS가 45.17%로 가장 높은 XO 저해활성을 나타냈으며, 발아시킨 HS의 경우 36.54~42.58%로 발아기간이 증가함에 따라 XO 저해활성이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 에탄올 추출물(Fig. 1-7. (B))에서는 발아 1일차의 HS가 64.49%로 무발아 시료 62.02%보다 유의적으로 증가하였지만 이후 감소하는 경향을 보여, 발아 6일차에는 50.83%의 저해율을 나타냈다.

(3) Pancreatic lipase 저해활성

발아기간 및 부위별 벼 추출물에 대한 lipase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 1-8과 같다. 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 저농도에서 높은 저해활성을 나타냈으며, 추출용매에 상관없이 발아일수가 증가함에 따라 발아 벼 추출물과, 왕겨와 싹을 혼합한 추출물의 lipase 저해활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였다($p<0.05$). 또한 HS 추출물이 BR 추출물에 비해 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 물 추출물(Fig. 1-8. (A))에서는 BR 추출물의 경우 4.83~7.36% 범위의 lipase 저해활성으로 발아에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, HS 추출물의 경우 발아 4일차가 36.78%로 무발아 31.72%에 비해 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 또한, 에탄올 추출물(Fig. 1-8. (B))에서는 BR 추출물의 경우 발아 전에는 활성이 없었

으나 발아 후기(day 4~6)에 12.43~13.70%범위의 저해활성이 나타났으며, 발아 5일차 HS 추출물이 55.17%로 가장 높은 lipase 저해활성을 나타냈다.

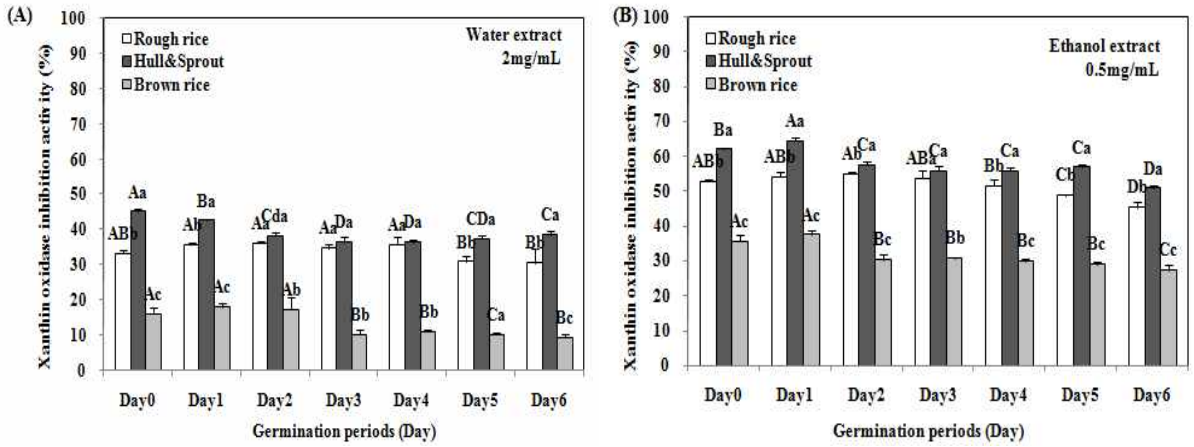


Fig. 1-7. Changes in xanthine oxidase (XO) inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

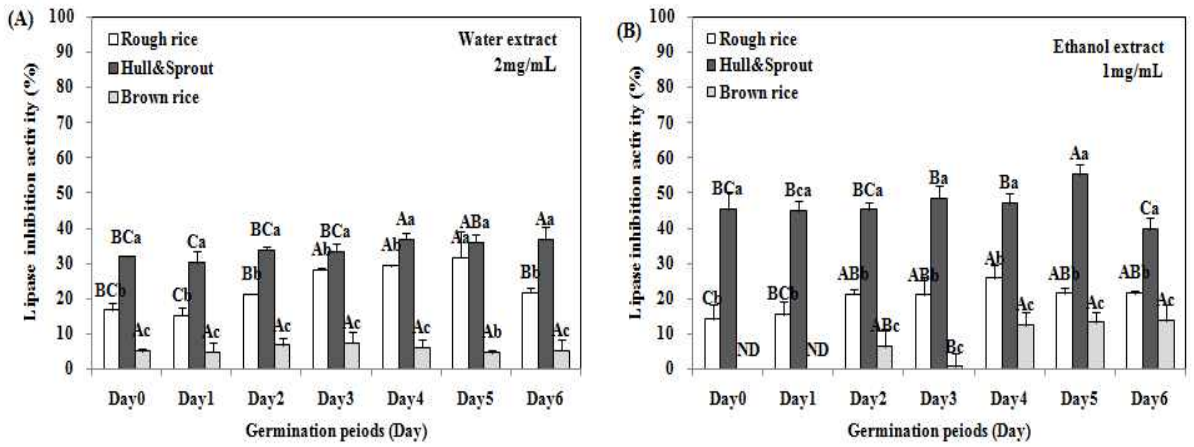


Fig. 1-8. Changes in pancreatic lipase inhibition activities of germinated rough rice extracts with different germination times and parts. (A) water extracts, (B) ethanol extracts. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination times and parts, respectively.

제2절 발아 벼로부터 항당뇨 물질 분리 및 동정

1. 연구방법

가. 3T3-L1 지방세포의 포도당 유입활성 평가

3T3-L1 전지방세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포의 배양과 유지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 조건에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포가 80~90% confluence 되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기에서 세포를 모은 후 suspension 용액을 만들어 세포 배양용 6-well plate에서 confluent 상태까지 배양한 후 포화상태에 이른 것을 확인한 다음 48시간 더 배양하였다. 세포가 post-confluent하게 되면 IBMX (0.5 mM)와 dexamethasone (0.25 μM), insulin (5 μg/mL), 10% FBS를 첨가된 differentiation medium을 처리하여 분화를 유도하였다. 분화유도 2일 후에는 5 μg/mL의 insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였다. 그 후 4, 6일째 10% FBS DMEM으로 배양액을 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다.

배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 고농도 포도당 DMEM 용액으로 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 7~10일 사이에 포도당 흡수 실험을 포도당 유입 실험을 하였다. 분화가 유도된 지방세포를 PBS로 세척한 후 Serum-free DMEM으로 37℃에서 6시간 동안 배양한 후 Krebs Ringer Phospate Hepes buffer (KRPH buffer; 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.3 mM $CaCl_2$, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7.5)로 세척한 후에 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 대조구 및 시료를 희석하여 3T3-L1 지방세포내로의 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit (COSMO BIO CO., LTD, Tokyo, Japan)롤 사용하여 측정하였다. 즉, 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 시료와 1 uM insulin, 1 mM 2-Deoxyglucose를 같이 분화가 유도된 지방세포에 처리한 후 37℃에서 20분동안 배양한 다음 배지를 제거한 후 200 uM phloretin이 포함된 cooled PBS로 세척한다. 그 후, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 각 well에 3 mL 넣은 뒤 세포를 파쇄한다. Cell lyssate를 tube로 모아준 후 80℃에서 15분동안 열처리를 실시한 다음 4℃ 15,000×*g*로 20분동안 원심분리를 실시한 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨준 후 상등액을 1×sample diluent buffer (1:4)로 희석한 다음 kit 안의 solution을 사용해 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit 방법에 준하여 실험을 순차적으로 진행한 다음 420 nm, 25~30℃의 조건에서 30분동안 5분 간격의 kinetic 반응으로 흡광도를 측정하였다(Zou, Wang & Shen, 2005).

나. 실험재료 및 발아

실험에 사용된 벼는 2011년도에 충북 증평에서 생산된 한국산의 일반 벼 품종인 일품(*Oryza sativa* L.; *Ilpum*)을 구매하여 실험에 사용하였다. 발아는 Lee 등(2008)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 벼를 물로 수차례 수세하며 이물질을 제거하고 물을 1일 2회씩 교환하며 암소에서 3일간 침지시켰다. 온도(37℃)와 상대습도(85%)가 유지되는 발아기(WGC-450, Dahan Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 6일간 발아시켰으며, 1일 2회씩 세척하였다. 발아 벼는 50℃의 열풍건조기(WFO-459PD, EYELA, Tokyo, Japan)에서 2일간 건조시켜 시료로 사용하였다.

다. 발아 벼의 부위별 분리, 에탄올 추출물 및 용매분획물 제조

건조된 발아 벼는 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨와 싹을 혼합한 분획(hull & sprout; HS)과 현미(Brown rice; BR)로 나누어 분리한 뒤, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Switzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄한 후 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 건조 발아 벼 분말 1 kg에 20배의 80% 에탄올(v/v)를 가한 후 impeller type 교반기(PL-SS20, Punglim Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 400 rpm으로 12시간 교반추출하였다. 추출물을 6시간동안 방치하여 침전물을 가라앉힌 후 여과지(Adventec No. 2)로 여과하고 45℃에서 감압농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 농축액을 고형분함량 10% 정도로 희석하여 용매분획에 사용하였다. 증류수로 재용해시킨 발아 벼 추출농축액에 동량의 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butanol을 순차적으로 가하여 3회 분획한 후 이를 감압 및 질소농축하여 활성 평가용 시료로 사용하였다.

라. 부탄올 분획물로부터 항당뇨 물질 분리

(1) 1차 실리카겔 칼럼 정제 분획물 제조

Methanol로 활성화시킨 실리카겔을 36×260 mm의 칼럼에 충진하고 초기용매인 ethyl acetate로 치환시켜 준비하였다. 활성분획을 메탄올에 재용해시킨 후 200 mg/mL의 농도로 주입한 후 MPLC system을 이용하여 ethyl acetate와 methanol을 10분까지 100:0, 40분까지 50:50, 50분까지 0:100, 60분까지 0:100으로 50 mL/min의 속도로 용출시켰으며, 100 mL씩 분취하였다. 분획물을 ethyl acetate와 methanol 50:50의 전개용매로 TLC 전개한여 바닐린/황산으로 발색시켜 패턴이 유사한 분획물들끼리 집단화하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

(2) 2차 용매분획물 제조

활성분획을 증류수 10 mL에 재용해시킨 후 ethyl acetate, *n*-butanol 및 water를 30 mL씩 3회 순차적으로 가해 분획한 후 이를 감압 및 질소농축하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

(3) 2차 실리카겔 컬럼 분획물 제조

Methanol로 활성화시킨 실리카겔을 36×260 mm의 컬럼에 충진하고 초기용매인 ethyl acetate로 치환시켜 준비하였다. 활성분획을 메탄올에 재용해시킨 후 120 mg/mL의 농도로 주입한 후 ethyl acetate와 methanol을 10분까지 100:0, 40분까지 50:50, 50분까지 0:100, 60분까지 0:100으로 50 mL/min의 속도로 용출시켰으며, 100 mL씩 분취하였다. 분획물을 ethyl acetate와 methanol 75:25의 전개용매로 TLC 전개한여 바닐린/황산으로 발색시켜 패턴이 유사한 분획물들끼리 집단화하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

(4) 1차 박층크로마토그라피 분획물 제조

활성분획물을 메탄올에 25 mg/mL의 농도로 재용해시킨 후 실리카겔 박층크로마토그라피용 플레이트에 로딩하였다. Ethyl acetate와 methanol을 75:25의 조성으로 전개시킨 후 플레이트의 양 끝단을 절단 및 바닐린/황산으로 발색시킨 후 발색점을 기준으로 5개의 분획물을 분취하였다. 분획한 실리카겔에 메탄올 40 mL을 가한 후 30분간 3회 초음파 추출한 후 여과 및 농축하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

(5) 2차 박층크로마토그라피 분획물 제조

활성분획물을 메탄올에 10 mg/mL의 농도로 재용해시킨 후 실리카겔 박층크로마토그라피용 플레이트에 로딩하였다. Ethyl acetate와 hexane을 50:50의 조성으로 전개시킨 후 플레이트의 양 끝단을 절단 하였다. 바닐린/황산에 의한 발색과 UV 254와 365 nm에서 발색하는 것을 기준으로 6개의 분획물을 분취하였다. 분획한 실리카겔에 메탄올 40 mL을 가한 후 30분간 3회 초음파 추출한 후 여과 및 농축하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

(6) 활성분획의 HPLC 분석

활성분획의 특성을 확인하기 위하여 HPLC system(Acme 9100 series)를 사용하여 크로마토그램을 작성하였다. 즉, 분석에 사용된 칼럼은 ODS column(5 μm, 46×250 mm, Agilent Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, USA)을 사용하였으며, 0.1% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 용출용매 (A)로, 0.1% acetic acid가 함유된 water를 용출용매 (B)로 설정한 후 A와 B의 비율을 초기에 8 : 92, 2분까지 10 : 90, 27분까지 30 : 70, 50분까지 90 : 10, 51분까지 100 : 0, 60분까지 100 : 0, 70분까지 8 : 92로 설정하였다. 메탄올에 재용해시킨 활성분획을 10 μL 주입한 후 전개용매를 1.0 mL/min의 유속으로 용출시켰으며, 280 nm에서 검출하였다.

마. 헥산 분획물로부터 항당뇨 물질 분리

1차년도 연구과제 수행 결과 일품 발아 벼의 왕겨와 싹을 포함하는 분획(GIP-HS)의 에탄올 추출물이 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성 증가로 인하여 항당뇨 활성을 보이는

것을 확인하였다. 또한 에탄올 추출물을 용매분획, silica gel 칼럼 및 TLC 정제 등의 방법으로 얻은 최종 활성분획(GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1)이 10 μg/mL의 농도에서 대조구 대비 146.98%의 포도당 유입활성 증가를 보였으나 이후 정제과정이 진행됨에 따라 활성이 소실되었다. 활성분획에 함유된 *trans*-cinnamic acid (1.14 mg/g fraction)의 경우 *in vitro* 및 *in vivo* 항당뇨 활성의 평가 및 그 메커니즘의 규명에 관한 연구가 다수 보고되었지만 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성은 동일농도의 활성분획보다 낮게 평가되어 실질적인 활성물질로 보기 어려웠다. 따라서 *trans*-cinnamic acid를 비롯한 항당뇨 효능을 갖는다고 보고된 phenolic acid인 caffeic acid, *p*-coumaric acid 및 ferulic acid를 지표물질로 발아조건 및 추출조건을 결정한 바 있다. 그러나 2, 3차년도의 항당뇨 메커니즘 연구를 위하여 발아 벼로부터 항당뇨 활성물질을 분리 및 정제하는 것이 필요하다고 판단되어 2차년도에도 활성물질을 탐색하는 연구를 진행하였다. 일품 발아 벼의 왕겨와 싹을 포함하는 분획(GIP-HS)의 에탄올 추출물을 다양한 방법으로 분리하였으며, 분리과정의 이해를 돕기 위하여 자세한 분리 및 정제 과정은 연구결과 부분에서 설명하였다.

바. 지표물질의 구조동정

지표물질의 분자량 확인을 위하여 LC-ESI-MS를 실시하였다. LC의 분석조건은 Agilent 1100 series (Agilent Technologies, USA)을 사용하였고, column은 ZORBAX 300SB_C18 (1×150 mm, 3.5 μm, Agilent, USA)를 사용하였다. Mobile phase는 0.2% TFA를 함유한 water를 A, 0.2% TFA를 함유한 acetonitrile을 B로 하여 A와 B의 초기비율을 95 : 5로 시작하여, 5분에 95 : 5, 7분에 85 : 15, 25분에 50 : 50, 27분에 5 : 95, 34분에 5 : 95, 35분에 95 : 5, 45분에 95 : 5의 비율로 35 μL/min의 flow rate로 용출시켜 분석을 종료하였다. MS는 Hybrid Quadrupole TOF LC/MS/MS Mass Spectrometer (AB Sciex Instrument, CA, USA)를 사용하여 ESI mode로 분석하였다. Scan range는 200~2,000 MHz, scan rate는 1 sec/scan, source temperature는 120℃로 분석하였다.

지표물질의 구조 동정을 위하여 분리한 물질을 D_2O에 용해하여 ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR)과 ^{13}C NMR (500, 900 MHz), 2D-HMBC (two Dimension Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spectra는 Advance 500 spectrometer (Bruker Analytic GmbH, Karlsruhe, Germany) 분석에 의해 얻었다.

사. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리조건에 따른 유의차를 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석한 뒤 신뢰구간 $P<0.05$에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

2. 연구결과

가. 용매분획물의 수율과 포도당 유입활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 일품 발아 벼의 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물(GIP-HS_E)를 순차적으로 용매분획 하였을 때 수율은 Table 2-1과 같다. 에탄올 추출물의 경우 왕겨와 싹을 포함한 분획에 대하여 11.59%의 추출수율을 보였으며, 이를 전량 용매분획 하였을 때 물 분획이 6.50%로 가장 높게 나타났으며, 에틸아세테이트와 부탄올 분획이 각각 0.76%와 1.12%로 낮게 나타났다. 또한 용매분획의 회수율은 97.51%로 나타났다.

Table 2-1. Extraction yields of 1st solvent fractionation fractions of germinated rough rice with various fractionation solvents.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Hexane	GIP-HS_E_H	1.62±0.12[b1)]
	Chloroform	GIP-HS_E_C	1.14±0.08[bc]
	Ethyl acetate	GIP-HS_E_E	0.76±0.02[c]
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07[bc]
	Water	GIP-HS_E_W	6.50±0.42[a]

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물(GIP-HS_E)의 1차 용매분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 100 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-1과 같이 나타났다. 에탄올 추출물의 경우 500 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 116.54%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 용매분획물의 경우 100 μg/mL의 농도에서 물 층(80.43%)을 제외한 모든 분획물이 활성증가를 보였으며, 특히 헥산, 클로로포름 및 부탄올의 경우 각각 113.09, 109.32 및 116.61%로 유의적으로 높은 포도당 유입활성 증가를 보였다($p<0.05$). 용매분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 중 부탄올 분획물(GIP-HS_E_B)를 이후의 정제 실험에서 시료로 사용하였다.

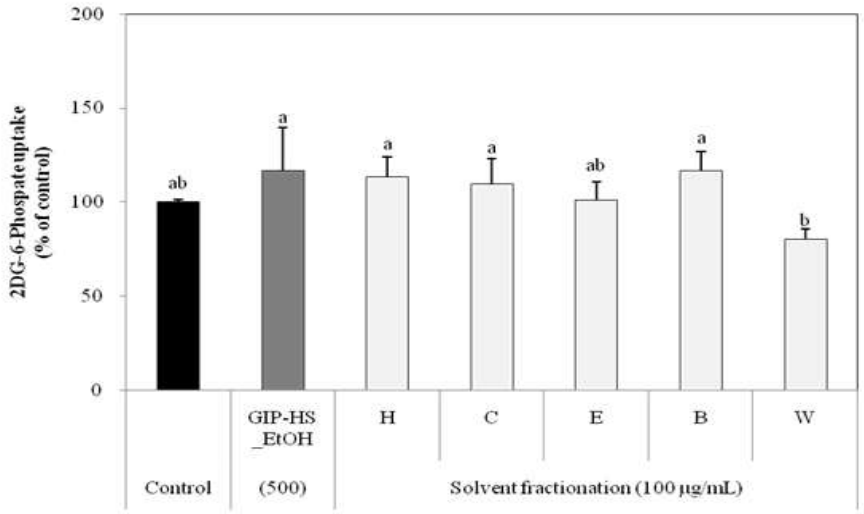


Fig. 2-1. Effects of 1st solvent fractionation fractions of germinated rough rice with various fractionation solvents on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-1. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

나. 부탄올 분획물로부터 항당뇨 물질 분리

(1) 1차 silica gel 칼럼 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물의 부탄올층(GIP-HS_E_B)을 에틸아세테이트와 메탄올을 용출용매로 실리카겔 칼럼 정제하였을 때 수율은 Table 2-2와 같다. 왕겨와 싹을 포함한 분획에 대하여 S2분획이 0.375%로 가장 높은 수율을 보여 초기에 약 40%가 용출되었다. 또한 1차 실리카겔 정제의 회수율은 69.74%로 나타났다.

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올의 1차 실리카겔 분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 50 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-2와 같다. 부탄올 분획물의 경우 100 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 121.29%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 1차 실리카겔 분획물의 경우 50 μg/mL의 농도에서 S6 (100.72%)을 제외한 모든 분획물이 유의적인 활성증가를 보였다($p<0.05$). 특히 S2와 S3의 경우 각각 125.08%와 132.24%로 유의적으로 높은 포도당 유입활성 증가를 보였다($p<0.05$). 따라서 1차 실리카겔 분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 분획물 중 실리카겔 정제 3번 분획물(GIP-HS_E_B_S3)를 이후의 정제 실험에서 시료로 사용하였다.

Table 2-2. Extraction yields of 1st silica gel column chromatography fractions of germinated rough rice with different ethyl acetate concentrations.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07
	Ethyl acetate : Methanol	GIP-HS_E_B_S1	0.087
		GIP-HS_E_B_S2	0.375
		GIP-HS_E_B_S3	0.114
		GIP-HS_E_B_S4	0.108
		GIP-HS_E_B_S5	0.054
		GIP-HS_E_B_S6	0.028
		GIP-HS_E_B_S7	0.016

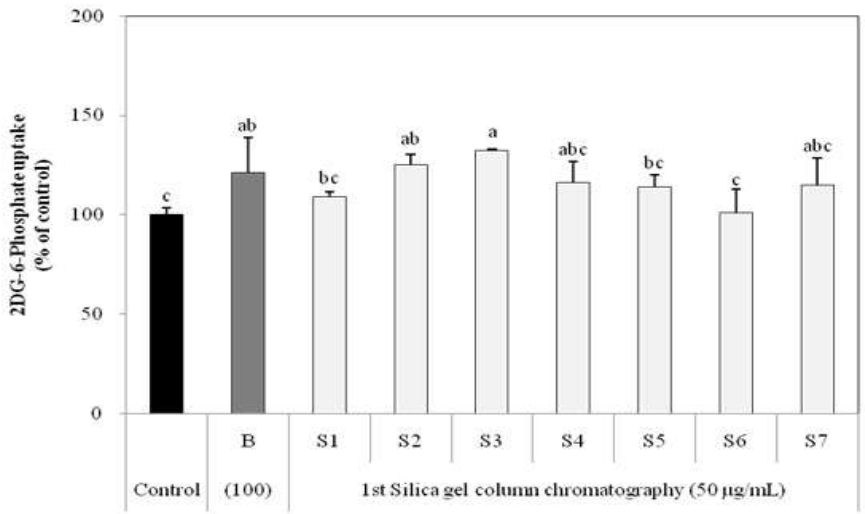


Fig. 2-2. Effects of 1st silica gel column chromatography fractions of germinated rough rice with different ethyl acetate concentrations on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.
Sample code is shown in Table 2-2. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(2) 2차 용매분획물의 수율과 포도당 유입 활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 1차 실리카겔 분획물(GIP-HS_E_B_S3)을 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 2차 용매분획 하였을 때 수율은 Table 2-3과 같다. 왕겨와 싹을 포함한 분획에 대하여 에틸아세테이트 분획물이 0.016%로 가장 낮은 수율을 보였으며, 부탄올과 물 분획물이 각각 0.053%와 0.050%로 높게 나타났다. 또한 2차 용매분획물의 회수율은 95.46%로 나타났다.

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 실리카겔 3번 분획물에 대한 2차 용매분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 50 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-3과 같이 나타났다. 1차 실리카겔 3번 분획물의 경우 50 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 137.56%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 2차 용매분획물의 경우 50 μg/mL의 농도에서 부탄올 분획물이 137.40%로 1차 실리카겔 3번 분획물과 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p>0.05$), 에틸아세테이트와 물 분획물의 경우 각각 178.74%와 146.19%로 유의적인 활성 증가를 보였다($p<0.05$). 따라서 2차 용매분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 분획물 실리카겔 3번 분획물의 에틸아세테이트 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E)를 이후의 정제 실험에서 시료로 사용하였다.

Table 2-3. Extraction yields of 2nd solvent fractionation fractions of germinated rough rice with various fractionation solvents.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3	0.114
	Ethyl acetate	GIP-HS_E_B_S3_E	0.016
	Butanol	GIP-HS_E_B_S3_B	0.053
	Water	GIP-HS_E_B_S3_W	0.050

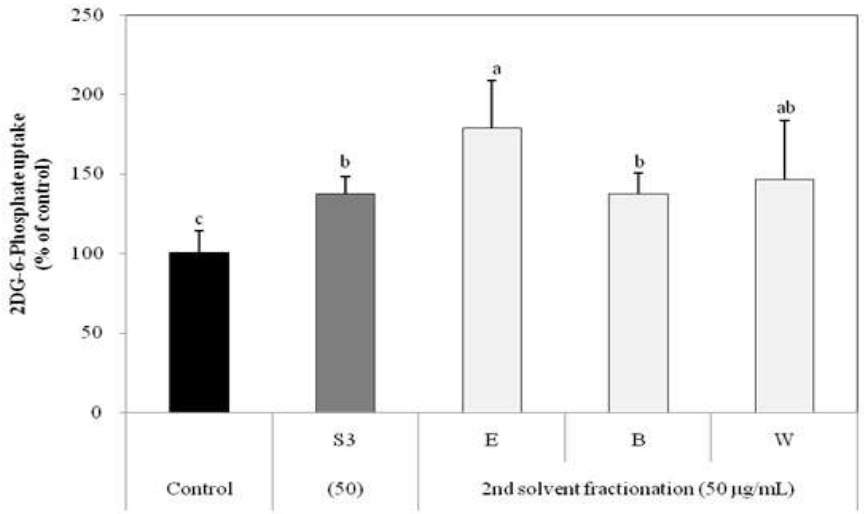


Fig. 2-3. Effects of 2nd solvent fractionation fractions of germinated rough rice with various fractionation solvents on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-3. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(3) 2차 silica gel 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 2차 용매분획물(GIP-HS_E_B_S3_E)을 에틸아세테이트와 메탄올을 용출용매로 2차 실리카겔 칼럼 정제하였을 때 수율은 Table 2-4와 같다. S2와 S3 분획에서 각각 0.0037%와 0.0046%로 높은 수율을 보였으며, S1, S4 및 S5는 0.0019%, 0.0022% 및 0.0021%로 유사한 수율을 보였다. 또한 2차 용매분획물의 회수율은 91.27%로 나타났다.

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물에 대한 2차 실리카겔 칼럼 분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 25 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-4와 같이 나타났다. 2차 용매분획의 에틸아세테이트 분획물의 경우 50 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 139.84%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 2차 실리카겔 칼럼 분획물의 경우 25 μg/mL의 농도에서 S1~S3 분획물이 각각 105.14%, 98.20% 및 90.96%로 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으나($p>0.05$), S4와 S5 분획물의 경우 각각 163.62%와 172.57%로 유의적인 활성증가를 보였다($p<0.05$). 따라서 2차 실리카겔 칼럼 분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 분획물 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물의 실리카겔 5번 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E_S5)을 이후의 정제 실험에서 시료로 사용하였다.

Table 2-4. Extraction yields of 2nd silica gel column chromatography fractions of germinated rough rice with different ethyl acetate concentrations.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3	0.114
	Ethyl acetate	GIP-HS_E_B_S3_E	0.016
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3_E_S1	0.0019
		GIP-HS_E_B_S3_E_S2	0.0037
		GIP-HS_E_B_S3_E_S3	0.0046
		GIP-HS_E_B_S3_E_S4	0.0022
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5	0.0021

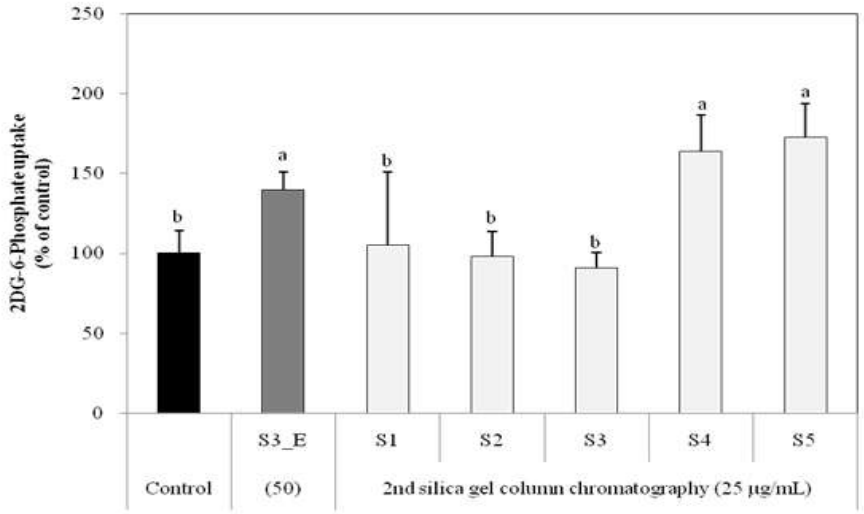


Fig. 2-4. Effects of 2nd silica gel column chromatography fractions of germinated rough rice with different ethyl acetate concentrations on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-4. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(4) 1차 TLC 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 2차 실리카겔 칼럼 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E_S5)을 에틸아세테이트와 메탄올을 전개용매로 1차 박층크로마토그라피 정제하였을 때 수율은 Table 2-5와 같다. 왕겨와 싹을 포함한 분획에 대하여 T1 분획물에서 0.00077%로 가장 높은 수율을 보였으며, 다른 분획물에서는 0.00020~0.00039%의 수율을 보였다. 또한 1차 박층크로마토그라피의 회수율은 96.00%로 나타났다.

Table 2-5. Extraction yields of 1st thin layer chromatography fractions of germinated rough rice with different elution distances.

Sample	Solvent	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3	0.114
	Ethyl acetate	GIP-HS_E_B_S3_E	0.016
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3_E_S5	0.0021
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T1	0.00077
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T2	0.00036
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T3	0.00020
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T4	0.00039
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5	0.00029

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물 실리카겔 5번 분획물에 대한 1차 박층크로마토그라피 분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 10 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-5와 같이 나타났다. 2차 실리카겔 5번 분획물의 경우 25 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 141.51%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 1차 박층크로마토그라피 분획물의 경우 10 μg/mL의 농도에서 T1 분획물이 111.14%로 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으며($p>0.05$), T2~T4 분획물은 각각 51.39%, 51.12% 및 47.89%로 대조구에 비해 포도당 유입활성을 보이지 않았다. 그러나 T5 분획물의 경우 162.31%로 유의적인 활성증가를 보였다($p<0.05$). 따라서 1차 박층크로마토그라피 분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 분획물 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물 실리카겔 5번 분획물의 박층크로마토그라피 5번 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5)을 이후의 정제 실험에서 시료로 사용하였다.

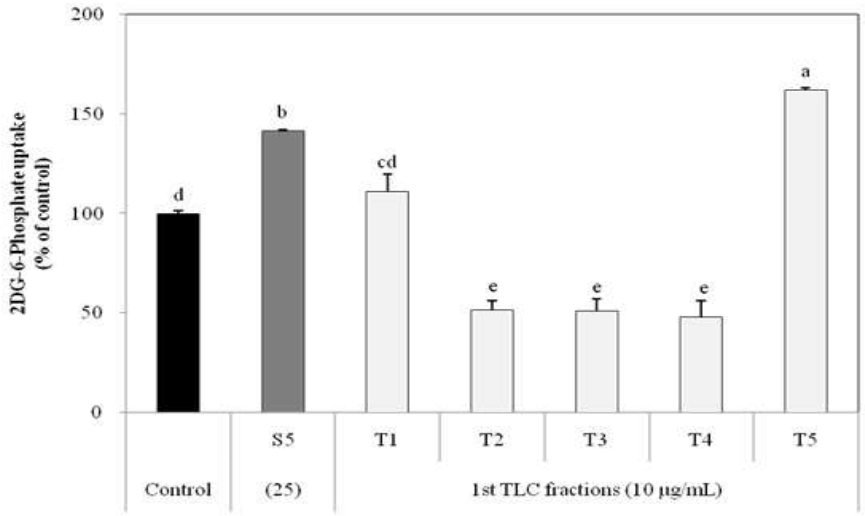


Fig. 2-5. Effects of 1st thin layer chromatography fractions of germinated rough rice with different elution distances on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-5. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(5) 2차 TLC 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

3T3-L1 지방세포로의 포도당 유입활성이 높게 나타난 1차 박층크로마토그라피 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5)을 에틸아세테이트와 헥산을 전개용매로 2차 박층크로마토그라피 정제하였을 때 수율은 Table 2-6과 같다. 왕겨와 싹을 포함한 분획에 대하여 T6 분획물에서 0.000061%로 가장 높은 수율을 보였으며, 다른 분획물에서는 0.000020~0.000055%의 수율을 보였다. 또한 1차 박층크로마토그라피의 회수율은 90.59%로 나타났다.

Table 2-6. Extraction yields of 2nd thin layer chromatography fractions of germinated rough rice with different elution distances.

Sample	Solvent	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	11.59±0.55
	Butanol	GIP-HS_E_B	1.12±0.07
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3	0.114
	EtOAc	GIP-HS_E_B_S3_E	0.016
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3_E_S5	0.0021
	EtOAc : MeOH	GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5	0.00029
	EtOAc : Hexane	GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1	0.000044
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T2	0.000031
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T3	0.000051
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T4	0.000020
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T5	0.000055
		GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T6	0.000061

일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물 실리카겔 5번 분획물 박층크로마토그라피 5번 분획물에 대한 2차 박층크로마토그라피 분획물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 10 μg/mL의 농도에서 평가한 결과 Fig. 2-6과 같이 나타났다. 1차 박층크로마토그라피 5번 분획물의 경우 10 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 150.82%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 2차 박층크로마토그라피 분획물의 경우 10 μg/mL의 농도에서 T3 분획물이 102.59%로 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았으며($p>0.05$), T3 분획물은 71.19%로 대조구에 비해 포도당 유입활성을 증가시키지 못하였다. 그러나 T2, T5 및 T6 분획물은 각각 112.59%, 132.84% 및 119.46%로 로 유의적인 활성증가를 보였다($p<0.05$). 특히, T1 분획물은 146.98%의 포도당 유입활성 증가를 보여 1차 박층크로마토그라피 5번 분획과 유의적인 차이가 없었으며($p>0.05$), 양성대조구로 사용된 pioglitazone (1 μg/mL)의 119.90%에 비하여 높은 활성 증가를 보였다. 따라서 2차 박층크로마토그라피 분획물 중 활성이 가장 높았던 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 부탄올 분획물 실리카겔 3번 분획물 에틸아세테이트 분획물 실리카겔 5번 분획물 박층크로마토그라피 5번 분획물의 2차 박층크로마토그라피 1번 분획물(GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1)에 대하여 HPLC 분석을 실시하였다.

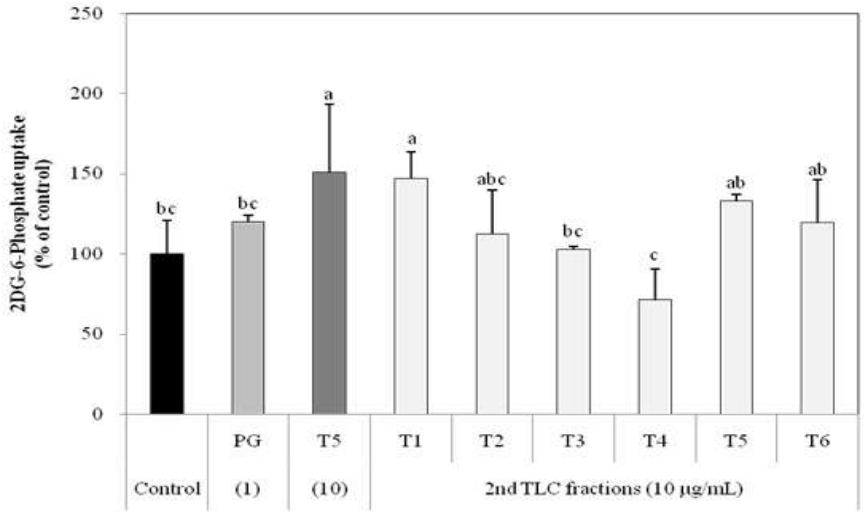


Fig. 2-6. Effects of 2nd thin layer chromatography fractions of germinated rough rice with different elution distances on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-6. Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(6) 2차 TLC 분획물의 HPLC 분석

1차 박층크로마토그라피 분획물에서 활성을 나타내었던 T5 분획물을 2차 박층크로마토그라피로 정제한 분획물들의 HPLC chromatogram을 작성한 결과는 Fig. 2-7과 같다. 모든 분획물에서 공통적으로 17.32분에 피크가 관찰되었으며, 분획물마다 그 함량이 달랐으나 포도당 유입활성과의 연관성을 찾을 수 없어(Fig. 2-6) 활성에 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다. 2차 박층크로마토그라피 분획물 중 포도당 유입활성을 보인 T1 분획물 중 12번 피크는 머무름 시간(32.72 min)과 UV spectrum (212 and 280 nm) 분석 결과 *trans*-cinnamic acid로 확인되었으며(Fig. 2-8), 그 함량은 T1 분획물 중 1.14 μg/mg으로 나타났다. *trans*-Cinnamic acid는 곡류에서도 검출되었으며, *in vitro* 및 *in vivo* 항당뇨 활성의 평가 및 그 메커니즘의 규명에 관한 연구가 다수 보고되고 있다. 따라서 최종적으로 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 보인 GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1 분획물을 활성분획으로 추정하고 이후 추가적인 분리 및 정제과정을 거쳐 활성물질을 분리 및 규명할 것이며, 벼 추출물에 대하여 *trans*cinnamic acid를 비롯한 항당뇨 활성이 보고된 phenolic compound들의 함량 평가가 필요하다고 판단된다. 또한, HPLC chromatogram에서 UV 흡광양상과 포도당 유입활성과 뚜렷한 연관성을 보이지 않아 UV 이외의 다른 검출기를 이용한 재분석이 필요하다고 판단된다.

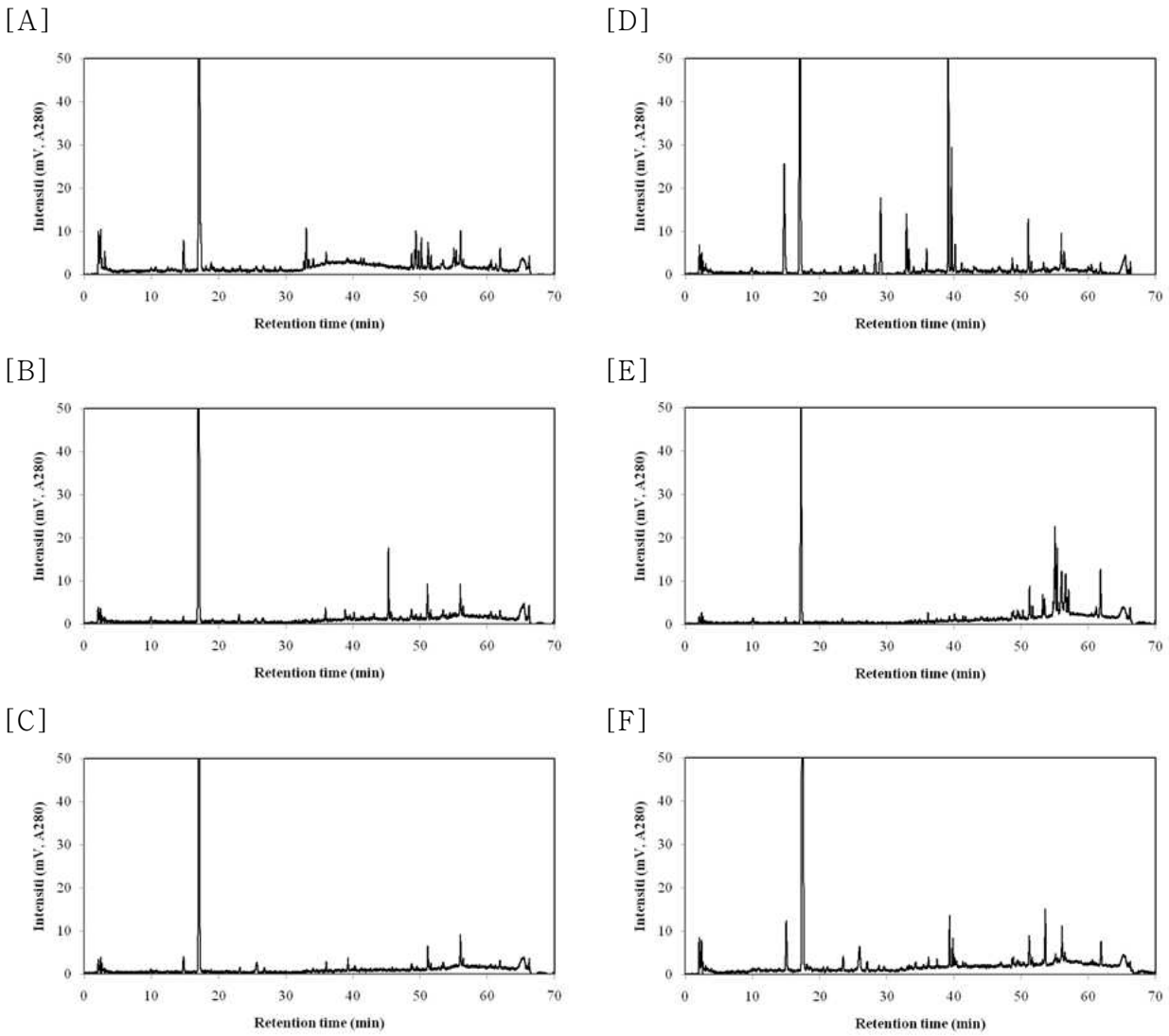
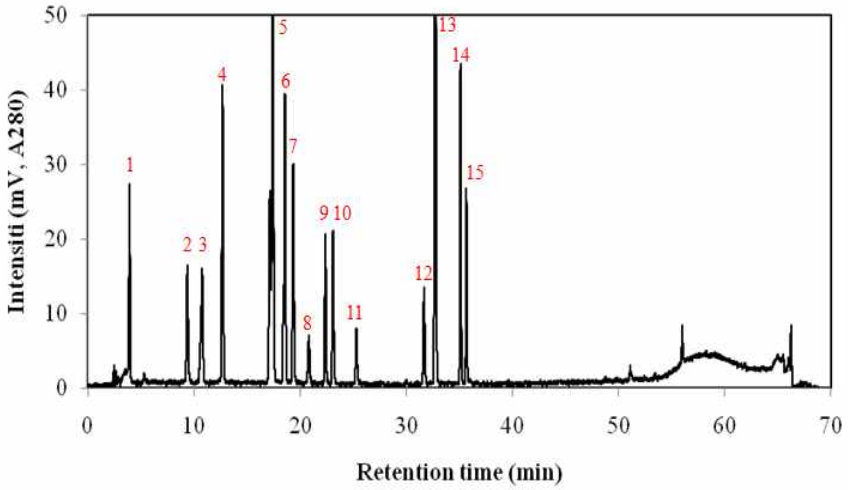
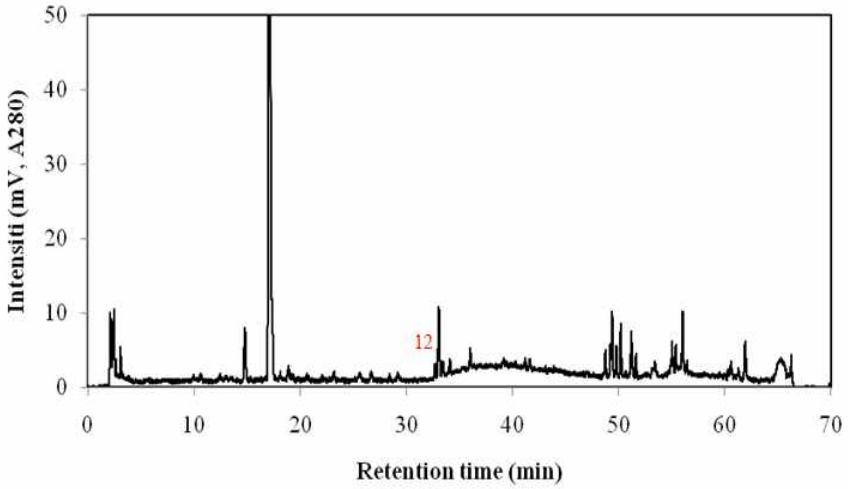


Fig. 2-7. HPLC chromatograms of 2nd thin layer chromatography fractions of germinated rough rice. [A]: T1, [B]: T2, [C]: T3, [D]: T4, [E]: T5, and [F]: T6 fraction. Sample code is shown in Table 2-6.

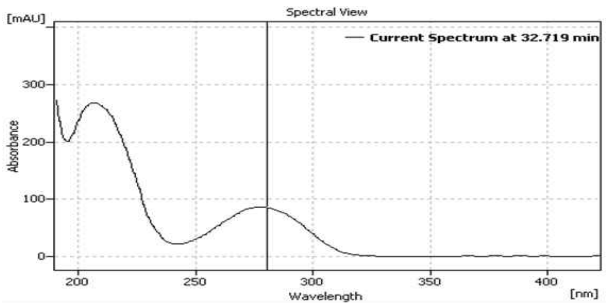
[A]



[B]



[C]



[D]

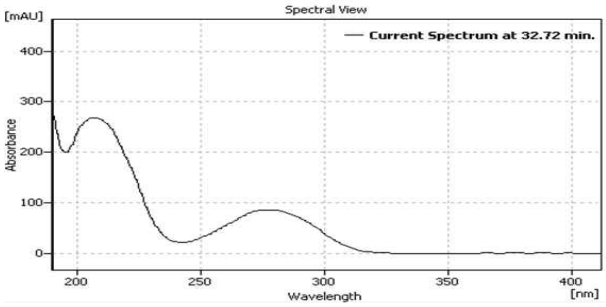


Fig. 2-8. Comparison with HPLC chromatograms of 2nd thin layer chromatography #1 fractions and phenolic compounds found in standard mixture and UV spectrums of cinnamic acid in standard mixture and germinated rough rice. [A]: phenolic compound standard mixture, [B]: GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1, [C]: UV spectrum of *trans*-cinnamic acid (12) in standard mixture at 32.72 min, [D]: UV spectrum of *trans*-cinnamic acid in GIP-HS_E_B_S3_E_S5_T5_T1 at 32.72 min.

다. 헥산 분획물로부터 항당뇨 물질 분리

(1) 1차 silica gel 칼럼 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

발아 벼 에탄올 추출물 헥산 분획(GIP-HS_E_H) 약 200 mg을 2 mL의 hexane에 재용해한 후 methanol (MeOH)로 활성화 및 dichloromethane (DCM)로 치환시킨 실리카겔이 충진 된 칼럼(36×260 mm)에 주입하였다. 용출용매는 MeOH, DCM, hexane을 사용하여 0~8분까지 2:98:0, 24분까지 20:80:0, 32분까지 100:0:0, 40분까지 100:0:0의 비율로 50 mL/min의 속도로 용출시켰으며, 이후 20분의 100% MeOH과 100% hexane으로 추가 세척하여 200 mL씩 총 12개의 분획물을 분취하였다. 분획물들을 감압 여과 및 농축한 후 DCM과 MeOH 혼합용매(20:1, v/v)로 silica gel TLC 전개하였다. 전개된 TLC를 바닐린/황산으로 발색시켜 패턴이 유사한 분획물들을 집단화하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

1차 실리카겔 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_S1~S5)의 추출수율은 Table 2-7과 같다. GIP-HS_E_H에 대하여 S1와 S3가 각각 36.53%와 21.75%로 높은 수율을 보였으며($p<0.05$), S2, S4 및 S5는 각각 8.86%, 11.13% 및 9.71%로 나타났다. 특히, hexane을 이용한 세척구간에서도 10% 이상의 물질이 검출되었다.

Table 2-7. The extraction yields of 1st silica gel column chromatography fractions of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Sample	Fraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	s1	GIP-HS_E_H_S1	36.53±0.84[a1)]
	s2	GIP-HS_E_H_S2	8.86±0.42[e]
	s3~s6	GIP-HS_E_H_S3	21.75±0.35[b]
	s7~s9	GIP-HS_E_H_S4	11.13±0.27[c]
	s10~s12	GIP-HS_E_H_S5	9.71±0.31[d]

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

1차 실리카겔 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_S1~S5)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-9와 같이 나타났다. GIP-HS_E_H의 경우 10 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 168.47%로 포도당 유입을 증가시켰으며, 실리카겔 분획물의 경우 S5를 제외한 모든 분획에서 농도의존적인 활성 증가를 보였다. S1의 경우 10과 25 μg/mL의 농도에서 대조

구 대비 활성 증가를 보이지 않았으며, 50 μg/mL의 농도에서 132.34%의 활성 증가를 보였지만 GIP-HS_E_H와 비교 시 높은 농도에서 낮은 활성을 보였다. S2와 S3의 경우 모든 농도에서 대조구에 비해 높은 활성을 보였지만 고농도에서 GIP-HS_E_H와 유사한 활성을 보였다. S4의 경우에도 모든 농도에서 대조구에 비해 높은 활성을 보였지만 고농도에서 GIP-HS_E_H 보다 높은 활성을 보였다. S5는 10 μg/mL의 농도에서 209.94%로 동일 농도의 GIP-HS_E_H 보다 높은 활성을 보였지만 농도의존적으로 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 1 μg/mL의 농도에서 131.11%로 활성이 크게 감소하였다(data not shown). 높은 활성을 보인 S5는 대부분이 hexane을 이용한 세척구간에서 용출된 분획이므로 비극성 물질을 효과적으로 분리하기 위하여 일품 발아 왕겨와 싹을 포함한 분획의 에탄올 추출물 중 헥산 분획물(GIP-HS_E_H)을 C18 resin을 이용하여 칼럼 분리·정제를 진행하였다.

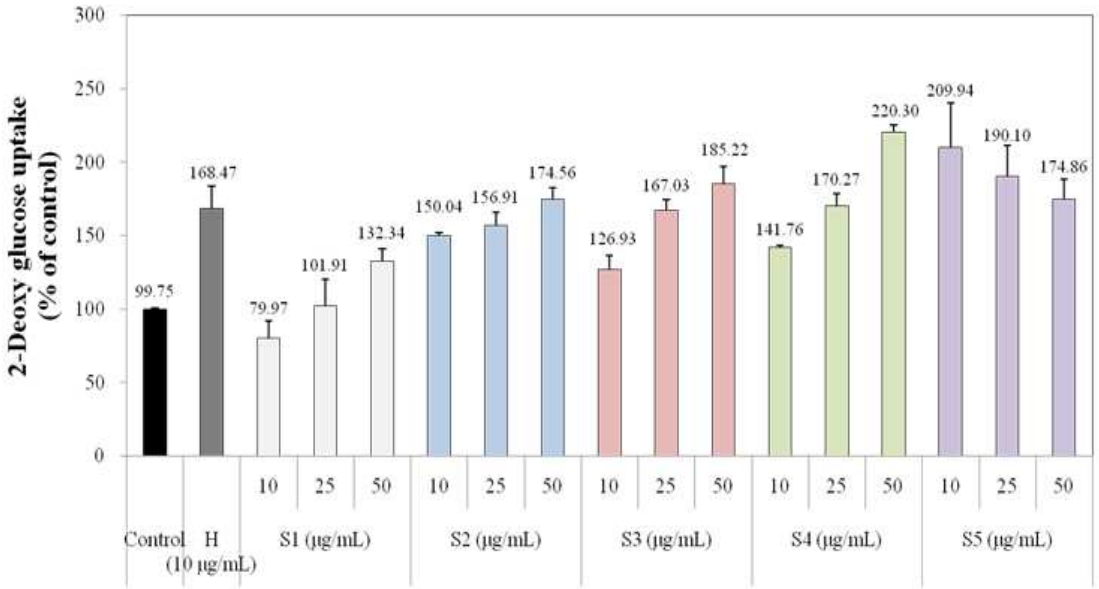


Fig. 2-9. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) and their 1st silica gel column chromatography fractions (GIP-HS_E_H_S1~S5) with different concentrations on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-7.

(2) C18 칼럼 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

발아 벼 에탄올 추출물 헥산 분획(GIP-HS_E_H) 약 500 mg을 2 mL의 hexane에 재용해한 후 methanol (MeOH)로 활성화 및 증류수로 치환시킨 C18이 충진된 칼럼(36×260 mm)에 주입하였다. 용출용매는 MeOH, water, hexane을 사용하여 초기 0:100:0에서 30분까지 50:50:0, 40분까지 100:0:0, 50분까지 100:0:0, 50분까지 100:0:0, 60분까지 0:0:100으로 50 mL/min의 속도로 용출시켰다. 분획물들을 농축한 후 DCM과 MeOH 혼합용매(20:1, v/v)로 silica gel TLC 전개하 패턴이 유사한 분획물들을 집단화하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

C18 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C1~C5)의 추출수율은 Table 2-8과 같다. GIP-HS_E_H에 대하여 C4가 28.71% 가장 높은 수율을 보였으며($p<0.05$), C2와 C3는 각각 22.58%와 23.43%로 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). C1이 5.07%로 가장 작은 수율을 보였으며, 특히 hexane을 이용한 세척구간인 C5에서도 12%의 수율을 보였다.

Table 2-8. The extraction yields of C18 column chromatography fractions of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Sample	Fraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	c1	GIP-HS_E_H_C1	5.07±0.02$^{d1)}$
	c2	GIP-HS_E_H_C2	22.58±0.20^{b}
	c3	GIP-HS_E_H_C3	23.43±1.10^{b}
	c4	GIP-HS_E_H_C4	28.71±0.87^{a}
	c5	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06^{c}

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

C18 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C1~C5)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-10과 같이 나타났다. GIP-HS_E_H의 경우 10 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 158.79%로 포도당 유입을 증가시켰으며, C18 분획물의 경우 10 μg/mL의 농도에서 C1과 C4가 각각 94.53%와 103.29%로 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). C2와 C3는 각각 135.53%와 140.41%로 대조구에 비해 활성이 증가하였으나, 동일농도의 GIP-HS_E_H에 비해 낮은 활성을 보였다. C5는 194.69%의 활성을 보여 동일농도의 GIP-HS_E_H 보다 높은 활성을 보였다($p<0.05$).

또한 GIP-HS_E_H_C5의 농도를 달리하여 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-11과 같이 농도의존적인 활성 증가를 보였으며, 5 μg/mL의 농도에서는 147.27%로 10 μg/mL의 농도에서 145.54%의 활성을 보인 GIP-HS_E_H와 유사한 활성을 보였다($p>0.05$). C5는 C18 칼럼에서 methanol과 증류수에 의해 극성물질이 제거되고 칼럼 내에 잔류하는 비극성 물질을 hexane으로 세척하여 얻은 분획이므로 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입 활성물질이 비극성에 가까울 것으로 추정하였다. 따라서 GIP-HS_E_H_C5를 이용하여 추가적인 분리·정제 실험을 진행하였으며, 그에 따라 제조된 분획물의 포도당 유입활성 평가 시 비교구로 GIP-HS_E_H_C5 10 μg/mL을 사용하였다.

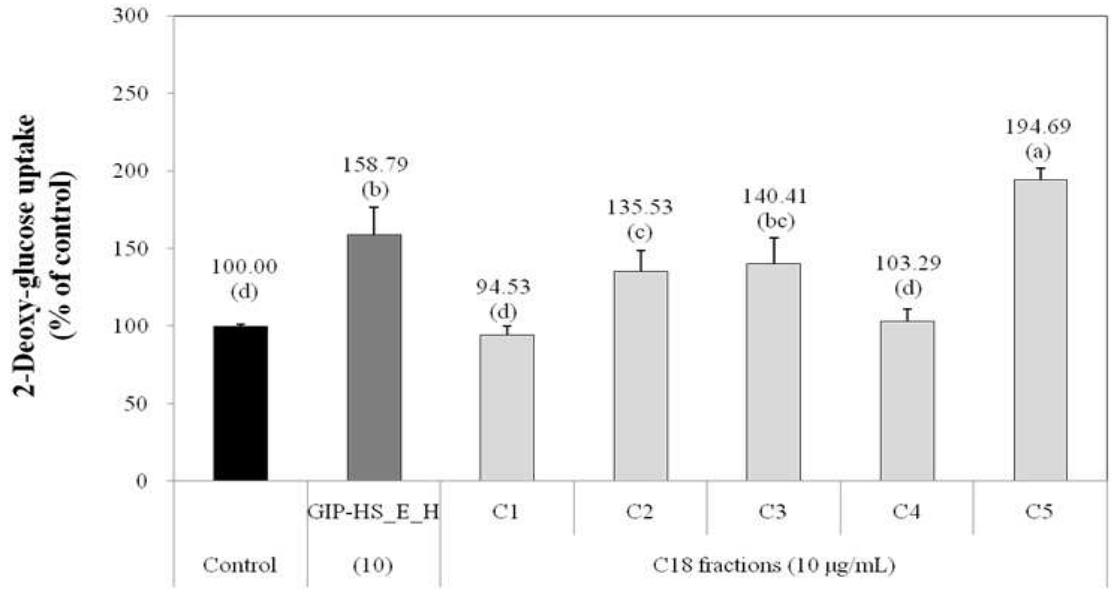


Fig. 2-10. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) and their C18 column chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C1~C5) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-8. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

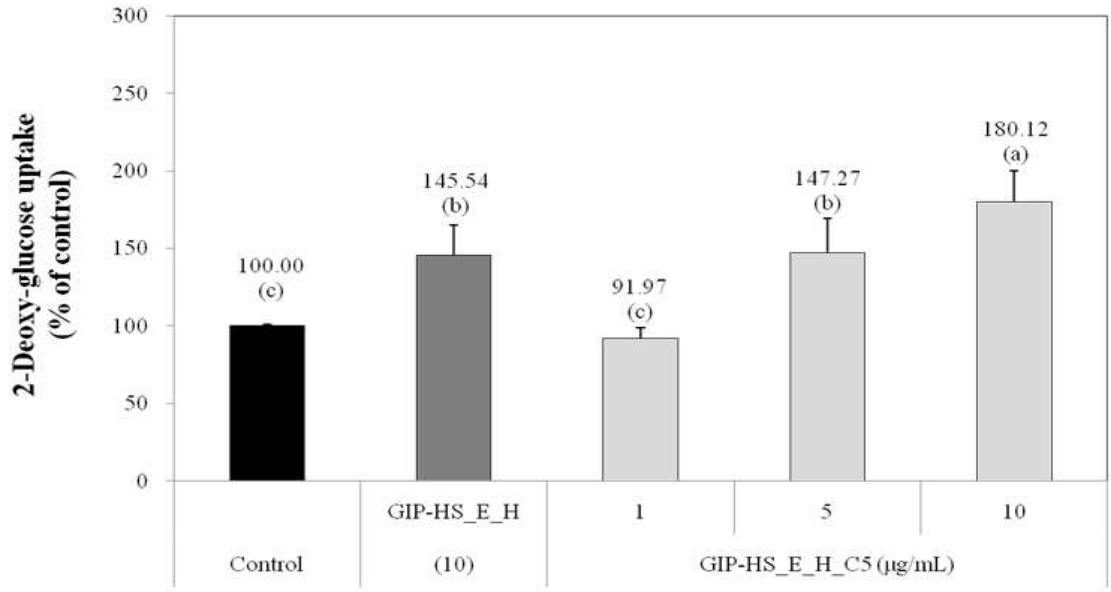


Fig. 2-11. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) and their C18 column chromatography fraction (GIP-HS_E_H_C5) with different concentrations on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-8. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

(3) 1차 TLC 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

활성분획(GIP-HS_E_H_C5) 약 100 mg을 1 mL의 hexane에 재용해한 후 silica gel TLC plate (Silica gel 60 F^{254} Glass plate, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 1 μL씩 로딩 하였다. DCM과 MeOH 혼합용매(5:95, v/v)로 포화시킨 TLC plate chamber에 TLC plate를 넣은 후 16 cm를 전개시키고 TLC plate의 양 끝단을 절단하여 바닐린/황산에 의한 발색과 UV 254와 365 nm에서 발색하는 것을 기준으로 분취한 후 분획한 silica gel에 MeOH 40 mL을 가한 후 30분간 3회 초음파 추출하고 이를 여과 및 농축하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

1차 박층크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_T1~T3)의 추출수율은 Table 2-9와 같다. GIP-HS_E_H_C5에 대하여 T3가 45.3%로 가장 높은 수율을 보였으며, T1과 T2는 각각 36.0%와 13.3%로 나타났다.

Table 2-9. The extraction yields of 1st thin layer chromatography fractions of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Sample	Fraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	C5	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06
	t1	GIP-HS_E_H_C5_T1	36.0
	t2	GIP-HS_E_H_C5_T2	13.3
	t3	GIP-HS_E_H_C5_T3	45.3

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

1차 박층크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_T1~T3)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 8과 같이 나타났다. 이전 정제과정의 활성분획인 GIP-HS_E_H와 GIP-HS_E_H_C5의 경우 10 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 각각 115.55%와 135.64%로 포도당 유입을 증가시켰으며, TLC 분획물의 경우 5 μg/mL의 농도에서 T1과 T3는 각각 106.72%와 99.82%로 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). T2는 126.94%로 대조구에 비해 활성이 증가하였으나, 10 μg/mL의 농도의 GIP-HS_E_H_C5 (135.64%)와 유사한 활성을 보였다($p>0.05$). 따라서 GIP-HS_E_H_C5_T2를 이용하여 추가적인 분리·정제 실험을 진행하였다.

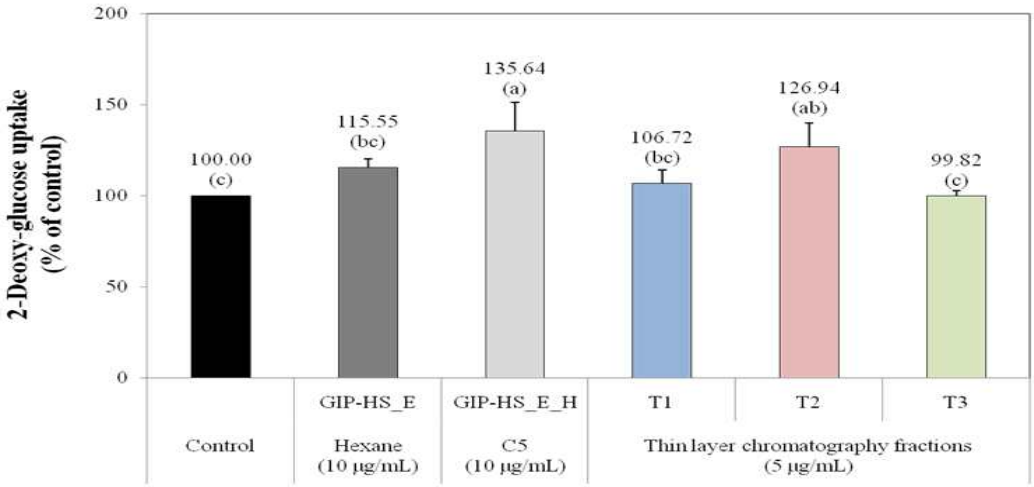


Fig. 2-12. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and their 1st thin layer chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C5_T1~T3) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-9. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

(4) Preparative HPLC 분획물의 수율과 포도당 유입 활성

활성분획(GIP-HS_E_H_C5_T2)을 약 100 mg/mL로 용해시킨 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 Preparative HPLC (SP930D, Younglin, Anyang, Korea)로 분취하였다. 이때 칼럼은 HECTOR-M (250×21.2 mm, RStech Co., Daejeon, Korea), 이동상은 acetonitrile, 유속은 3.0 mL/min, 검출기는 UV-detector (Younglin instrument, 203 nm), 주입량은 100 μL로 하여 총 8개의 분획을 분취하였다(Fig. 2-13). 크로마토그램 상에서 main과 minor peak로 나누어 총 4개의 분획으로 압축하였으며, 이들을 감압여과 및 농축하여 포도당 유입활성을 측정하였다.

분취용 고성능액체크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_T2_P1~P4)의 추출수율은 Table 2-10과 같다. GIP-HS_E_H_C5_T2에 대하여 모든 분획이 22~26% 범위의 수율을 보여 분리되 물질의 분산도가 고른 것으로 나타났다.

분취용 고성능액체크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_T2_P1~P4)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-14와 같이 나타났다. 이전 정제과정의 활성분획인 GIP-HS_E_H_C5와 GIP-HS_E_H_C5_T2의 경우 10과 5 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 각각 148.59%와 131.96%로 포도당 유입을 증가시켰으며, Prep. HPLC 분획물의 경우 5 μg/mL의 농도에서 P1과 P2는 각각 113.87%와 117.01%로 유사한 활성 증가를 보였다. P3와 P4 역시 각각 135.79%와 165.53%로 대조구에 비해 활성이 증가하였으며($p<0.05$), 두 분획물간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($p>0.05$). 또한 수율을 고려할 때 활성물질이 4배 정도 농축

되었음에도 불구하고 이전 활성분획인 GIP-HS_E_H_C5_T2와 동일농도에서 활성 차이를 보이지 않아 활성물질이 완전히 분리되지 않았다고 판단하였다.

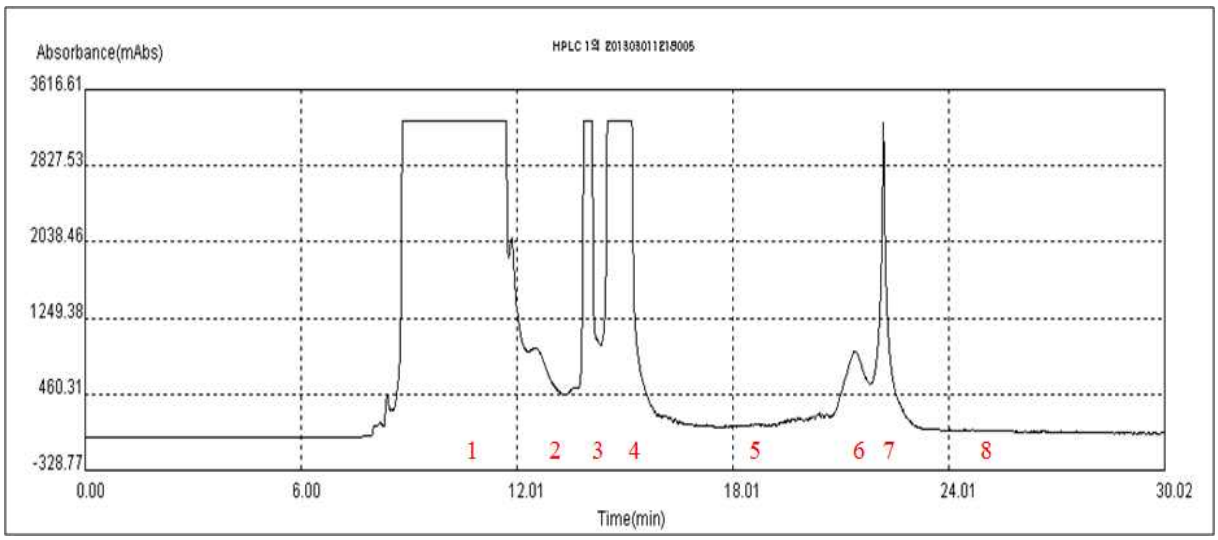


Fig. 2-13. Preparative high performance liquid chromatography (Prep. HPLC) chromatogram of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5_T2) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Table 2-10. The extraction yields of preparative high performance liquid chromatography (Prep. HPLC) fractions of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5_T2) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Sample	Fraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	C5	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06
	t1	GIP-HS_E_H_C5_T2	13.3
	p1	GIP-HS_E_H_C5_T2_P1	26.48
	p3, p4	GIP-HS_E_H_C5_T2_P2	22.33
	p6, p7	GIP-HS_E_H_C5_T2_P3	24.61
	p2, p5, p8	GIP-HS_E_H_C5_T2_P4	26.58

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

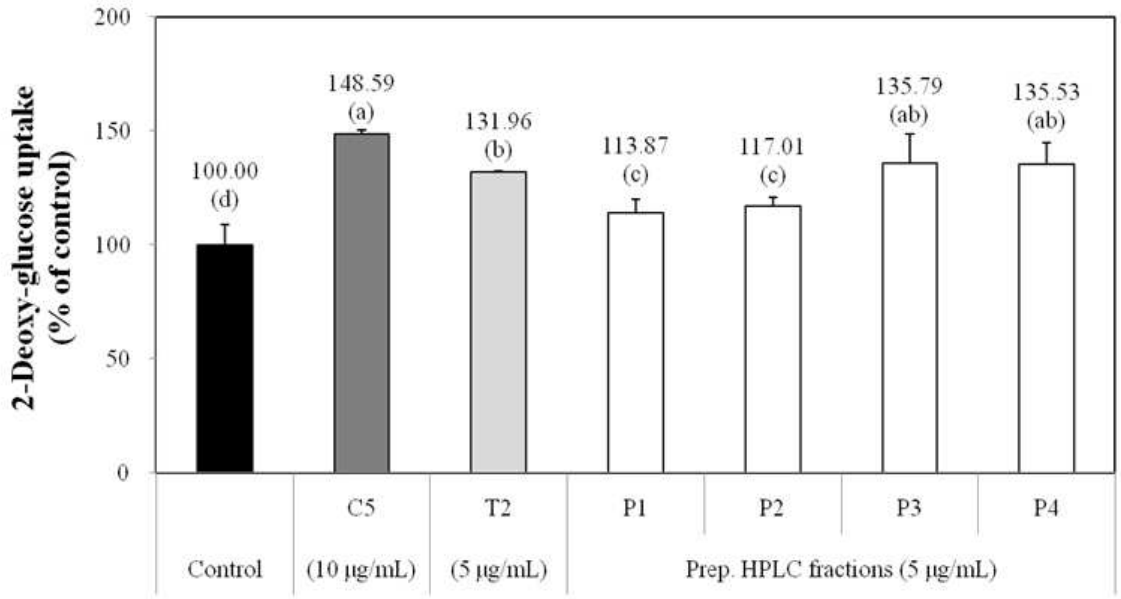
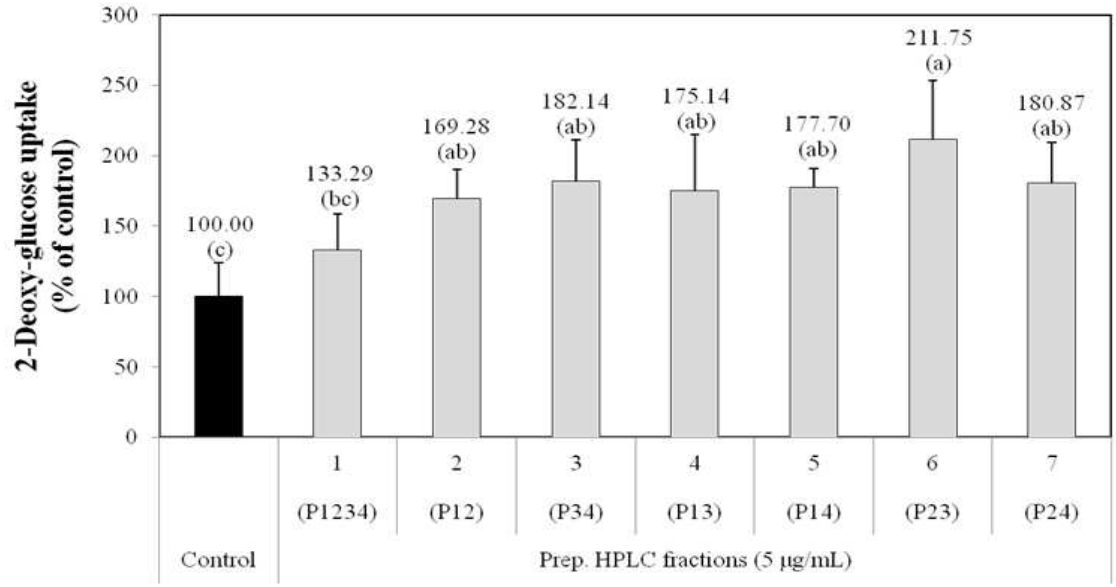


Fig. 2-14. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5_T2) and their preparative high performance liquid chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C5_T2 _P1~P4) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-10. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

분취용 고성능액체크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_T2_P1~P4)들의 시너지 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과는 Fig. 2-15와 같다. GIP-HS_E_H_C5_T2와 이들의 Prep. HPLC 분획물들을 수율을 고려하여 혼합한 후 동일 농도에서 활성을 평가한 결과 각각 153.41%와 148.20%로 유사하게 나타났다(Fig. 2-15[B]). 각 분획물들을 2개씩 혼합한 후 5 μg/mL의 농도에서 활성을 평가한 결과 모든 처리구에서 대조구에 비하여 높은 활성을 보였으며($p<0.05$), 특히 6번 분획물(P2+P3)에서 211.75%의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2-15[A]). 또한 각 분획물들을 3개씩 혼합한 후 5 μg/mL의 농도에서 활성을 평가한 결과 모든 처리구에서 대조구에 비하여 높은 활성을 보였으며($p<0.05$), 특히 2번 분획물(P1+P2+P4)에서 183.41%의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 2-15[B]). 이상의 결과를 바탕으로 활성분획(GIP-HS_E_H_C5_T2)에 다수의 활성물질이 함유되어 있거나 또는 단일활성물질이 아닌 여러 성분에 의한 시너지 효과로서 항당뇨 활성이 나타난다고 판단된다. 또한 용매분획, silica gel 및 C18 칼럼 정제를 통하여 활성물질의 극성이 낮을 것으로 예상됨에 따라 GIP-HS_E_H_C5를 검화하여 지방산 등을 제거하는 등의 분리·정제 실험을 진행하였다.

[A]



[B]

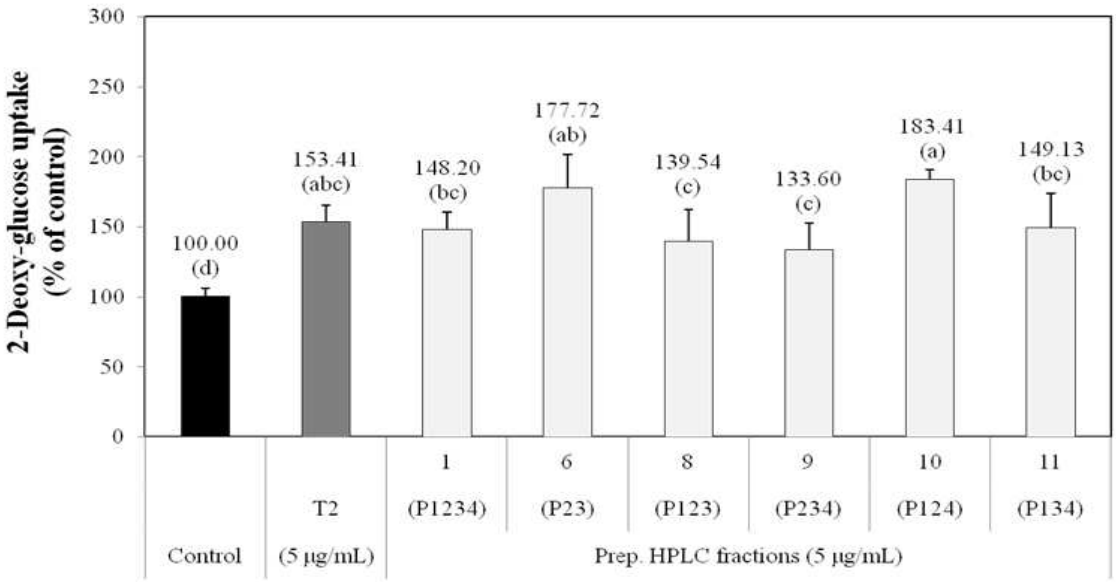


Fig. 2-15. Effects of combination fractions with preparative high performance liquid chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C5_T2 _P1~T4) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-10. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

(5) 활성분획(C5)의 지방산 조성 분석 및 지방산의 포도당 유입활성

발아 벼 에탄올 추출물 헥산분획(GIP-HS_E_H)과 그 C18 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5)의 지방산 조성을 GC로 분석한 결과 14종의 지방산 중 8종의 지방산이 검출되었으며(Table 2-10), C5분획의 크로마토그램은 Fig. 2-16과 같이 나타났다. GIP-HS_E_H의 경우 oleic acid가 27.60%로 가장 높은 조성을 보였으며, plamitic acid와 palmitoleic acid는 23.75%로 동일한 조성을 보였고, myristic acid, stearic acid 및 linolenic acid로 검출되었다. 헥산 분획물을 이용하여 분리된 GIP-HS_E_H_C1~C5 분획물 중 활성분획인 C5는 palmitic acid가 36.46%로 가장 높은 조성을 보였으며, linoleic acid도 32.17%로 높은 조성을 보였다. 특히 c9,11t-conjugated linoleic acid (CLA)가 검출되었으며, 그 조성은 0.26%이었다.

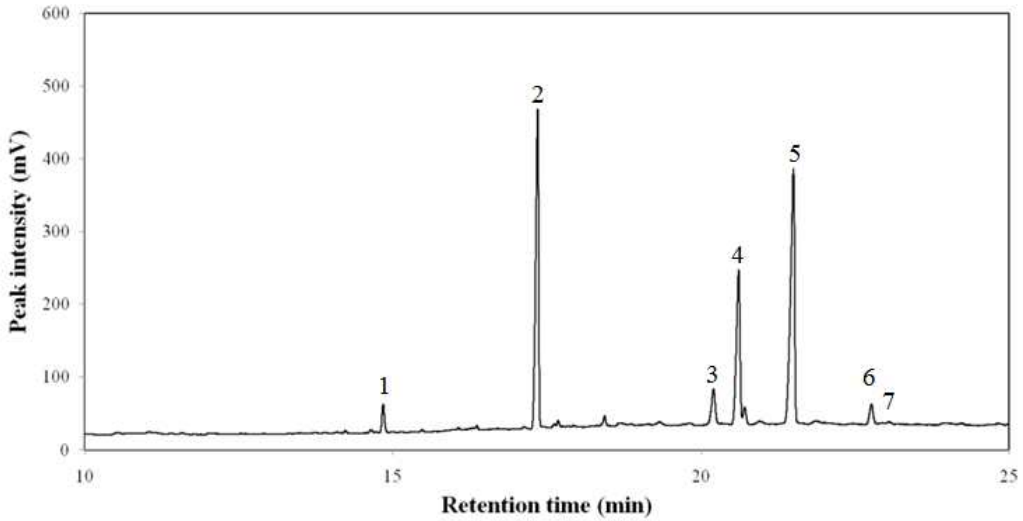


Fig. 2-16. Gas chromatogram of germinated rough rice active fractions (GIP-HS_E_H_C5) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Peak 1 : myristic acid, Peak 2 : palmitic acid, Peak 3 : stearic acid, Peak 4 : oleic acid, Peak 5 : linoleic acid, Peak 6 : linolenic acid, Peak 7 : c9, t11-conjugated linoleic acid.

CLA는 PPARγ의 활성화를 통하여 GLUL4 전위 유발에 의하여 세포내로 포도당 흡수를 증가시키는 활성이 보고되고 있으며, c9,t11-CLA는 PI3-kinase 활성화에 따른 AS160 활성화로 GLUT4를 활성화시키고, t10,c12-CLA의 경우에는 AMPK 활성화에 따른 GLUT4 활성화로 둘의 항당뇨 메커니즘에 차이를 보이고 있다. 활성분획 C5에 가장 높은 조성으로 함유된 linoleic acid와 C5에서 검출된 c9,t11-CLA의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과는 Fig. 2-17과 같다. Linoleic acid는 농도의존적인 활성증가를 보였지만 5 μg/mL 농도에서 150.09%로 C5 분획보다 낮았으며, CLA의 경우 1 μg/mL 농도에서 180.09%로 C5와 유사한 활성을 보였다. CLA의 조성비로 볼 때 활성물질일 가능성이 희박하며 지방산 및 지방산 에스터를 효과적을 제거하기 위하여 검화를 실시하였다.

Table 2-10. The fatty acid compositions of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) and their C18 column chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C1~C5) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Fatty acid		Fatty acid composition (%)		
		GIP-HS_E_H	GIP-HS_E_H_	
			C1~4	C5
Myristic acid	(14:0)	0.50 ± 0.01[e1)]	0.40 ± 0.01[e]	2.67 ± 0.01[e]
Palmitic acid	(16:0)	23.75 ± 0.04[b]	19.18 ± 0.03[c]	36.46 ± 0.04[a]
Palmitoleic acid	(16:1)	23.75 ± 0.03[b]	19.18 ± 0.01[c]	nd
Stearic acid	(18:0)	2.07 ± 0.01[d]	1.68 ± 0.02[d]	4.34 ± 0.03[d]
Oleic acid	(18:1)	27.60 ± 0.02[a]	28.26 ± 0.04[b]	19.67 ± 0.05[c]
Linoleic acid	(18:2)	20.27 ± 0.04[c]	29.66 ± 0.05[a]	32.17 ± 0.04[b]
Linolenic acid	(18:3)	2.07 ± 0.01[d]	1.65 ± 0.02[d]	2.64 ± 0.03[f]
c9,t11-CLA	(18:2)	nd	nd	0.26 ± 0.01[g]
t10,c12-CLA	(18:2)	nd	nd	nd
Total		100.00	100.00	100.00

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test. nd : not detected.

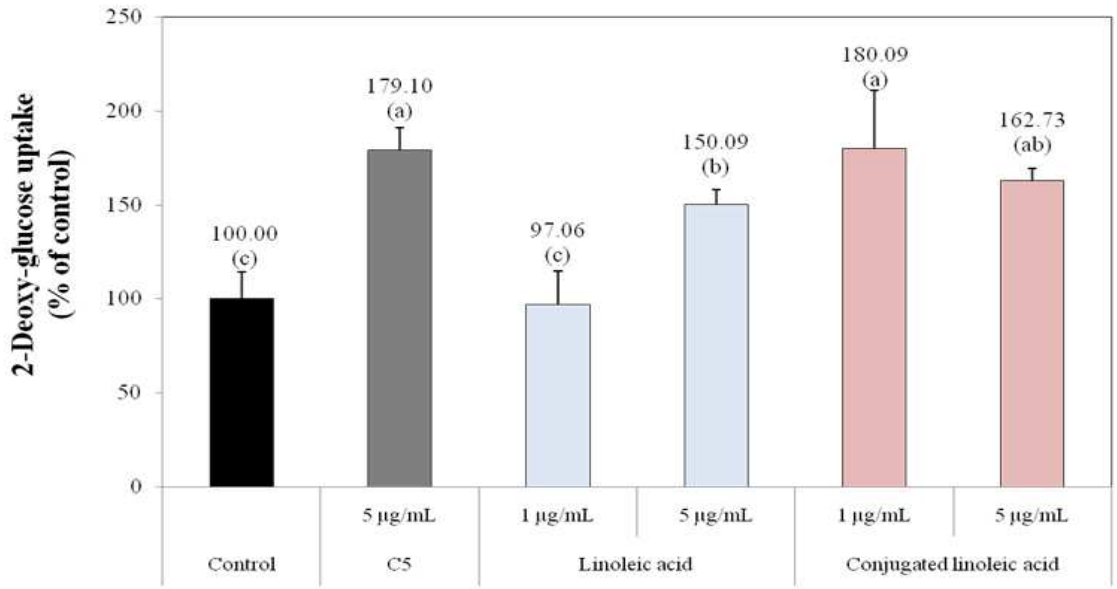


Fig. 2-17. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5), linoleic acid and conjugated linoleic acid with different concentrations on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The small letters on the error bars means significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple test.

(6) 활성분획(C5)의 비검화물의 포도당 유입활성

활성분획(GIP-HS_E_H_C5)에 함유된 지방산 및 그 유도체를 제거하기 위하여 검화를 실시하였으며, 검화 시 KOH의 농도에 따른 비검화물의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입 활성을 평가한 결과는 Fig. 2-18과 같다. 10 M KOH로 검화시킨 비검화물의 경우 1 μg/mL의 농도에서 대조구 대비 포도당 유입활성을 136.59% 증가시켰으며, 5 μg/mL의 C5와 유사한 활성을 보였다($p>0.05$). 따라서 검화가 활성분획의 유용성분 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

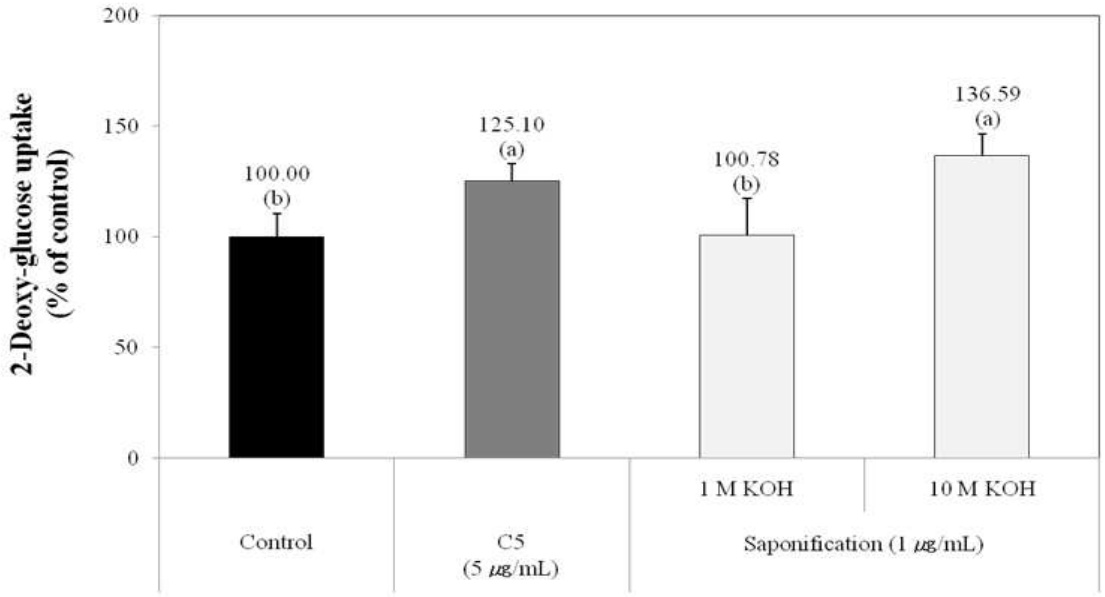


Fig. 2-18. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and their unsaponifiable matters (USM) with different KOH concentrations on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple test.

(7) 검화에 따른 활성분획의 γ-oryzanol과 phytosterol 함량 변화

발아 벼 에탄올 추출물 헥산분획(GIP-HS_E_H)과 그 C18 칼럼 정제 분획물들(GIP-HS_E_H_C1~C5)을 10 M KOH로 검화시켜 얻은 비검화물(USM)의 γ-oryzanol 함량을 분석한 결과는 Table 2-11과 같다. γ-Oryzanol 유도체 중 cycloartenyl ferulate, 2,4-methylene cycloartenyl ferulate, campesteryl ferulate, sitosteryl ferulate 및 campestanyl ferulate가 검출되었으며 이들의 총 합으로 γ-oryzanol 함량을 나타내었다. GIP-HS_E_H에는 총 470.97 mg/100 g이 함유되어 있었으며, C18 칼럼 정제 분획물 중 비활성분획(GIP-HS_E_H_C1~C4)에는 806.07 mg/100 g, 활성분획(GIP-HS_E_H_C5)에는 107.61 mg/100 g으로 γ-oryzanol의 상당량이 비활성분획에 존재하는 것으로 나타났다. 또한 이들의 비검화물에는 각각 139.53 mg/100 g, 255.76 mg/100 g 및 14.94 mg/100 g으로 나타나 검화에 의해 γ-oryzanol의 함량이 크게 감소

하는 것으로 나타났으며, 이는 검화 시 ferulate가 떨어지면서 phytosterol로 전환되기 때문이다. C5의 경우 비검화물의 활성이 더 높게 나타난 결과와 검화 시 γ-oryzanol 함량이 감소한다는 점으로 볼 때 γ-oryzanol은 항당뇨 활성물질로 볼 수 없으며, 검화 시 증가하는 phytosterol의 함량 변화를 살펴볼 필요가 있다.

Table 2-11. The γ-oryzanol contents of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H) and their C18 column chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C1~C5) for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Sample code	γ-Oryzanol content (μg/100 g each fraction)					Total
	Cycloartenyl ferulate	2,4-methylene-cycloartenyl ferulate	Campesteryl ferulate	Sitosteryl ferulate	Campestanyl ferulate	
GIP-HS_E_H	68.30$^{c1)}$	56.00^{c}	94.00^{b}	89.03^{b}	163.63^{b}	470.97^{b}
GIP-HS_E_H_C1~4	115.37^{a}	96.74^{c}	125.91^{a}	156.62^{a}	311.43^{a}	806.07^{a}
GIP-HS_E_H_C5	17.14^{e}	11.90^{e}	56.45^{c}	16.10^{e}	6.01^{e}	107.61^{e}
GIP-HS_E_H_USM	42.50^{d}	42.93^{d}	3.17^{e}	20.90^{d}	30.03^{d}	139.53^{d}
GIP-HS_E_H_C1~4_USM	74.63^{b}	76.31^{b}	6.14^{d}	40.55^{c}	58.14^{c}	255.76^{c}
GIP-HS_E_H_C5_USM	7.82^{f}	6.98^{f}	nd	nd	0.13^{f}	14.94^{f}

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test. nd : not detected.

일품 벼로부터 항당뇨 활성물질을 분리하고 진행하였던 분리공정에 따른 total 및 free phytosterol의 함량과 비율 변화를 분석한 결과는 Table 2-12와 같다. 일품 벼의 total 및 free phytosterol 함량은 41.23 및 6.31 mg/100 g이었으며, free phytosterol의 비율은 15.31%이었다. 발아에 의해 total 및 free phytosterol은 각각 55.02 및 9.13 mg/100 g으로 증가하였으며, free phytosterol의 비율도 16.59%로 증가하였다. 발아 벼를 현미기로 분획 시 BR 분획이 76.10 mg/100 g으로 HS 분획의 14.49 mg/100 g보다 높아 많은 양의 phytosterol이 BR 분획으로 이행되는 것을 확인하였다. 에탄올 추출 시 24.25 mg/100 g의 total phytosterol이 추출되었고, 용매 분획 시 헥산분획(GIP-HS_E_H)이 154.50 mg/100 g으로 가장 많은 total phytosterol 함량을 보였으며, 이때 free phytosterol의 비율도 20.36%로 크게 증가하였다. GIP-HS_E_H의 칼럼 정제 시 GIP-HS_E_H_C5에서 total phytosterol 함량과 free phytosterol의 비율이 각각 1004.41 mg/100 g과 23.04%로 크게 증가하였다.

Table 2-12. Changes in the total and free phytosterol contents of rough rice with different isolation procedure for the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

Isolation procedure	Sample code	Phytosterol content (mg/100 g each fraction)		Free phytosterol (% of total)
		Total	Free	
Germination	IP	41.23	6.31	15.31
	GIP	55.02	9.13	16.59
Partition	GIP-BR	76.10	12.06	15.85
	GIP-HS	14.90	2.46	16.48
Extraction	GIP-HS_E	24.25	4.10	16.89
Solvent fractionation	GIP-HS_E_H	154.50	31.45	20.36
	GIP-HS_E_C	17.46	3.13	17.92
	GIP-HS_E_E	11.11	1.75	15.79
	GIP-HS_E_B	nd	nd	nd
	GIP-HS_E_W	nd	nd	nd
C18 column chromatography	GIP-HS_E_H_C1	18.83	3.01	16.00
	GIP-HS_E_H_C2	49.70	8.11	16.33
	GIP-HS_E_H_C3	70.03	11.73	16.74
	GIP-HS_E_H_C4	15.16	2.39	15.79
	GIP-HS_E_H_C5	1004.41	231.40	23.04

[1)]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple test. nd : not detected.

이상의 결과에서 발아 벼로부터 항당뇨 활성물질을 분리하기 위하여 진행하였던 각 분리공정에서 활성분획의 phytosterol 함량이 높게 나타났으며, total 및 free phytosterol의 함량과 비율이 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성에 미치는 영향을 상관관계분석을 통하여 알아본 결과(Table 2-13), 포도당 유입활성에 대하여 total 및 free phytosterol 함량이 각각 0.785 ($p<0.01$)와 0.851 ($p<0.01$)로 양의 상관관계를 보였으며, 특히 free phytosterol의 경우 포도당 유입활성과 높은 양의 상관관계를 보였다(0.924, $p<0.01$). 따라서 발아 벼 비검화물의 total phytosterol 함량을 항당뇨 활성 지표물질 고함유 발아조건 및 추출조건 최적화 실험에 지료물질로 이용하였다.

Table 2-13. Correlation coefficients among total and free phytosterol content, ratio of free phytosterol and glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

	Free phytosterol content	Free phytosterol ratio	Glucose uptake
Total phytosterol content	0.999^{***}	0.628^{*}	0.785^{**}
Free phytosterol content	1.000	0.756^{*}	0.851^{**}
Free phytosterol ratio		1.000	0.924^{**}
Glucose uptake			1.000

*, **, *** and ^{ns} are indicates significant differences among factors by t-test and there are means $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ and *not significant*, respectively.

(8) 활성분획(C5)의 Diaion HP-20 컬럼 분획물의 수율 및 포도당 유입활성

발아 벼 에탄올 추출물 헥산 분획(GIP-HS_E_H) 약 200 mg을 2 mL의 증류수에 재용해한 후 methanol (MeOH)로 활성화 및 증류수로 치환시킨 Diaion HP-20이 충진된 칼럼(36×260 mm)에 주입하였다. 용출용매는 0% MeOH, 50% MeOH, 100 MeOH 및 100% $CHCl_3$를 사용하여 1 L 씩 용출시켰다. 분획물들을 농축한 후 포도당 유입활성을 측정하였다.

Diaion Hp-20 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D1~D4)의 추출수율은 Table 2-14와 같다. GIP-HS_E_H_C5에 대하여 D4가 50.57% 가장 높은 수율을 보였으며($p<0.05$), D1은 22.13%, D2와 D3는 각각 17.15%와 9.15%로 나타났다.

Table 2-14. Extraction yields of Diaion HP-20 column chromatography fractions of GIP-HS_E_H_C5.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	C18	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06
	0% methanol	GIP-HS_E_H_C5_D1	22.13±0.85b
	50% methanol	GIP-HS_E_H_C5_D2	17.15±0.12c
	100% methanol	GIP-HS_E_H_C5_D3	9.15±0.08d
	100% chloroform	GIP-HS_E_H_C5_D4	50.57±1.04a

1)Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

Diaion Hp-20 칼럼 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D1~D4)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-19와 같이 나타났다. 이전 정제과정의 활성분획인 GIP-HS_E_H_C5의 경우 5 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 144.74%로 포도당 유입을 증가시켰으며, Diaion Hp-20 분획물의 경우 5 μg/mL의 농도에서 D3가 204.39%로 가장 높은 활성 증가를 보였다($p<0.05$). D1과 D4는 각각 165.79%와 159.65%로 유사한 활성을 보였으며($p>0.05$), D2는 140.35%의 활성 증가를 보였다. 수율을 고려할 때 D3 분획에 활성물질이 다량 농축되어 있을 것으로 판단되어 GIP-HS_E_H_C5_D3 분획을 이후의 정제 실험에 사용하였다.

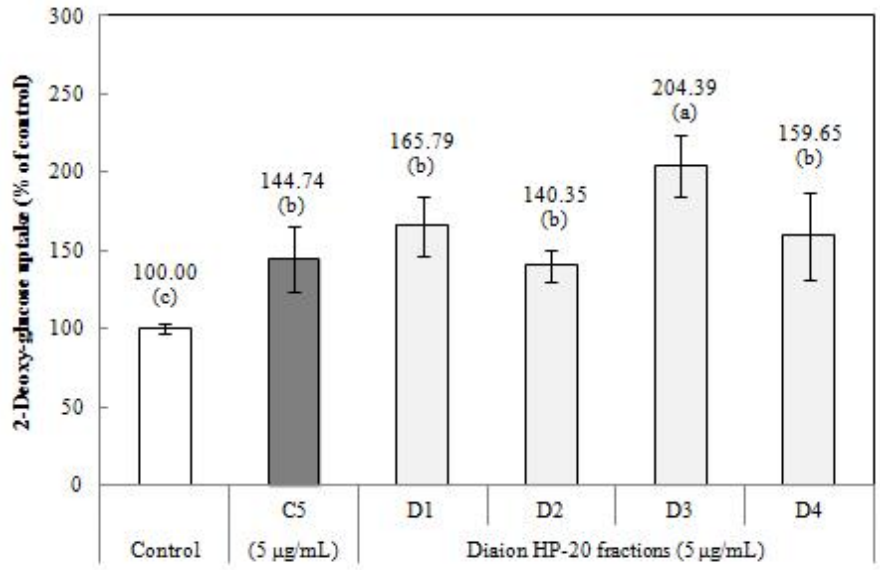


Fig. 2-19. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and their Diaion HP-20 column chromatography fractions (GIP-HS_E_H_C5_D1~4) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-14. The small letters on the error bars means significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple test.

(9) Prep. HPLC 분획물의 수율 및 포도당 유입활성

활성분획(GIP-HS_E_H_C5_D3)을 약 100 mg/mL로 용해시킨 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 Preparative HPLC (SP930D, Younglin, Anyang, Korea)로 분취하였다. 이때 칼럼은 HECTOR-M (250×21.2 mm, RStech Co., Daejeon, Korea), 이동상은 acetonitrile을 A, water를 B로 하여 초기 0-10분까지 9:95, 30분까지 30:70, 50분까지 100:0, 90분까지 100:0, 100분까지 5:95의 조건으로 하였으며, 유속은 3.0 mL/min, 검출기는 UV-detector (Younglin instrument, 203 nm), 주입량은 100 μL로 하여 총 4개의 분획을 분취하였다.

분취용 고성능액체크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D3_P1~P4)의 추출수율은 Table 2-15와 같다. GIP-HS_E_H_C5_D3에 대하여 P4가 54.08% 가장 높은 수율을 보였으며 ($p<0.05$), P3은 26.21%, P2와 P1는 각각 15.14%와 4.57%로 나타났다.

분취용 고성능액체크로마토그라피 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D3_P1~P4)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-20과 같이 나타났다. 이전 정제과정의 활성분획인 GIP-HS_E_H_C5와 GIP-HS_E_C5_D3의 경우 5 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 각각 136.21%와 163.55%로 포도당 유입을 증가시켰다. Prep. HPLC 분획물의 경우 5 μg/mL의 농도에서 P3가 1194.85%로 가장 높은 활성 증가를 보였다($p<0.05$). P2과 P4는 각각 141.30%와

156.52%로 유사한 활성을 보였으며(p>0.05), P1는 122.83%의 활성 증가를 보였다. 수율을 고려할 때 D3 분획에 활성물질이 다량 농축되어 있을 것으로 판단되어 GIP-HS_E_H_C5_D3_P3 분획을 이후의 정제 실험에 사용하였다.

Table 2-15. Extraction yields of preparative HPLC fractions of GIP-HS_E_H_C5_D3.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	C18	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06
	Diaion HP-20	GIP-HS_E_H_C5_D3	9.15±0.08
	p1	GIP-HS_E_H_C5_D3_P1	4.57±0.12d
	p2	GIP-HS_E_H_C5_D3_P2	15.14±0.09c
	p3	GIP-HS_E_H_C5_D3_P3	26.21±0.17b
	p4	GIP-HS_E_H_C5_D3_P4	54.08±1.11a

1)Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple test.

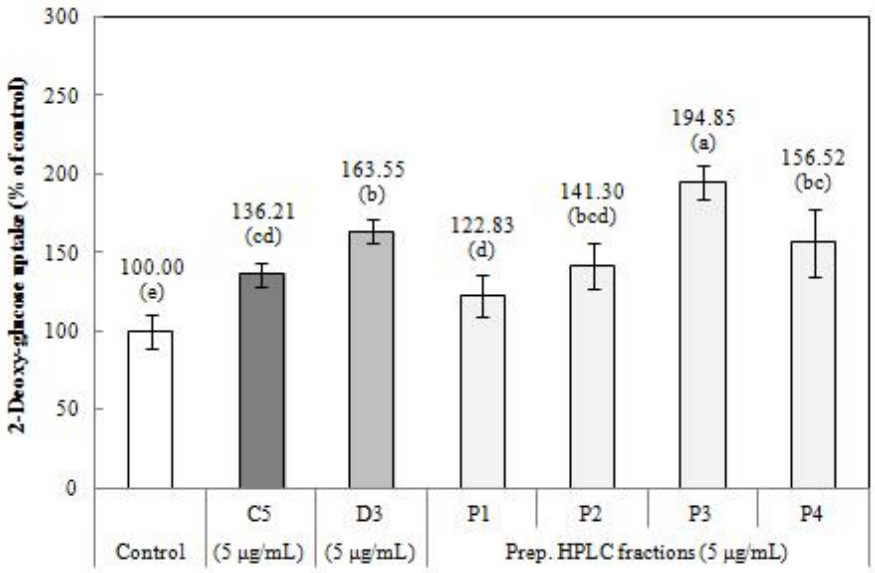


Fig. 2-20. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5_D3) and their preparative HPLC fractions (GIP-HS_E_H_C5_D3_P1~4) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-15. The small letters on the error bars means significant difference at P<0.05 by Duncan's multiple test.

(10) Recycling prep. HPLC 분획물의 수율 및 포도당 유입활성

활성분획(GIP-HS_E_H_C5_D3_P3)을 약 100 mg/mL로 용해시킨 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 Recycling preparative HPLC (JAI, Tokyo, Japan)로 분취하였다. 이때 칼럼은 HECTOR-M (250×21.2 mm, RStech Co., Daejeon, Korea), 이동상은 methanol로 하였으며, 유속은 3.0 mL/min, 검출기는 UV-detector (Younglin instrument, 203 nm), 주입량은 100 μL로 하여 총 2개의 분획을 분취하였다. Re. HPLC 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1~R2)의 추출수율은 Table 2-16과 같다. GIP-HS_E_H_C5_D3_P3에 대하여 R1이 23.42%, R2는 76.58%로 나타났다.

Re. HPLC 정제 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1, R2)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가한 결과 Fig. 2-20과 같이 나타났다. 이전 정제과정의 활성분획인 GIP-HS_E_H_C5와 D3 및 P3의 경우 5 μg/mL의 농도에서 대조구에 대하여 각각 139.19%, 156.89% 및 174.89%로 포도당 유입을 증가시켰다. Re. HPLC 분획물의 경우 5 μg/mL의 농도에서 R1이 169.64%로 P3 분획과 유의적인 차이를 보이지 않았으며($p>0.05$), R2는 123.20%로 활성이 낮게 나타났다. R2 이후의 정제과정에서 활성 감소가 두드러져 정제를 진행하지 않고 분광분석기기들을 이용하여 분자량 확인 및 구조동정을 실시하였다.

Table 2-16. Extraction yields of recycling HPLC fractions of GIP-HS_E_H_C5_D3_P3.

Sample	Extraction	Sample code	Yields (%)
Hull & sprout fraction of germinated *Ilpum* (GIP-HS)	80% Ethanol	GIP-HS_E	28.88±1.00
	Hexane	GIP-HS_E_H	13.52±0.58
	C18	GIP-HS_E_H_C5	12.10±0.06
	Diaion HP-20	GIP-HS_E_H_C5_D3	9.15±0.08
	Prep. HPLC	GIP-HS_E_H_C5_D3_P3	26.21±0.17
	r1	GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1	23.42±0.42b
	r2	GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R2	76.58±1.48a

1)Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

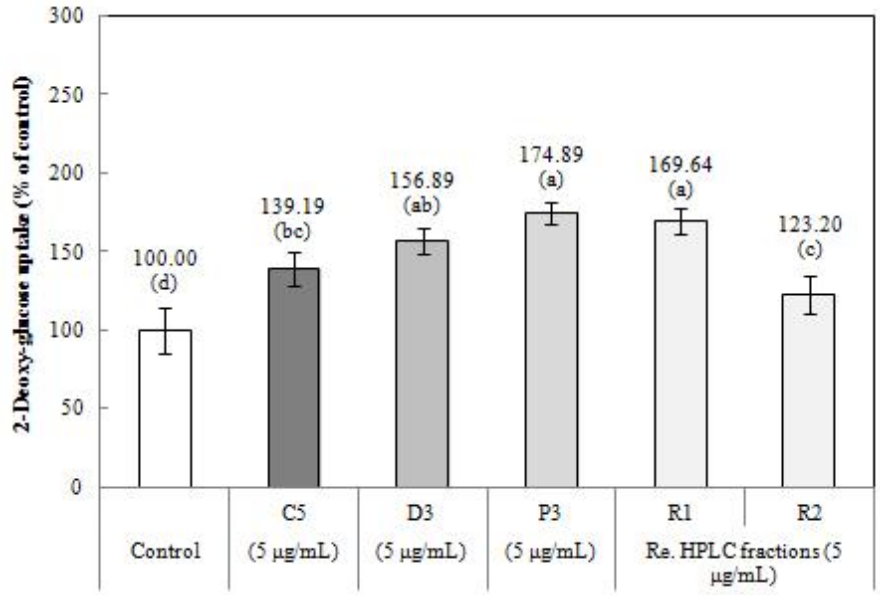


Fig. 2-21. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5_D3_P3) and their recycling HPLC fractions (GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1~2) on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Sample code is shown in Table 2-15. The small letters on the error bars means significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple test.

라. 지표물질의 구조동정

정제 최종 분획물(GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1)의 HPLC chromatogram을 확인한 결과 단일물질로 확인되었다(Fig. 2-22 [A]). LC-ESI-MS를 통한 분자량 측정 결과 194로 나타났으며 (Fig. 2-22 [B]), ^{1}H-NMR (Fig. 2-22 [C])과 ^{13}C-NMR (Fig. 2-22 [D]) 결과 지표물질은 최종적으로 ferulic acid로 동정되었다(Fig. 2-22 [E]).

바. 지표물질 및 주요 페놀산의 포도당 유입활성

지표물질이 phenolic acid의 일종인 ferulic acid로 밝혀지면서 활성분획(C5)에 존재하는 phenolic acid 중 항당뇨 효능이 있다고 알려진 것들의 포도당 유입활성을 측정한 결과는 Fig. 2-23 [A]과 같다. C5에서는 caffeic acid, *trans*-cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid 및 sinapic acid가 검출되었으며, 이 중에서 gallic acid의 활성이 10 μg/mL의 농도에서 186.8%로 가장 높았지만 ferulic acid는 동일농도에서 103.5%로 대조구에 비해 포도당 유입활성을 증가시키지 못하였다. 또한 ferulic acid와 gallic acid를 1, 5 및 10 μg/mL의 농도에서 활성을 평가한 결과 ferulic acid는 5 μg/mL에서 174.7%를 보였고, gallic acid는 10 μg/mL에서 169.8%의 활성을 보여 특정 농도에서 포도당 유입활성이 증가함을 나타내었다. C5 분획이 정제된 ferulic acid와 동일농도에서 유사한 활성을 보이는 것운 C5 분획 내 다른 물질들과의 시너지 효과라 생가되며, ferulic acid를 C5의 지표물질로 결정하였다.

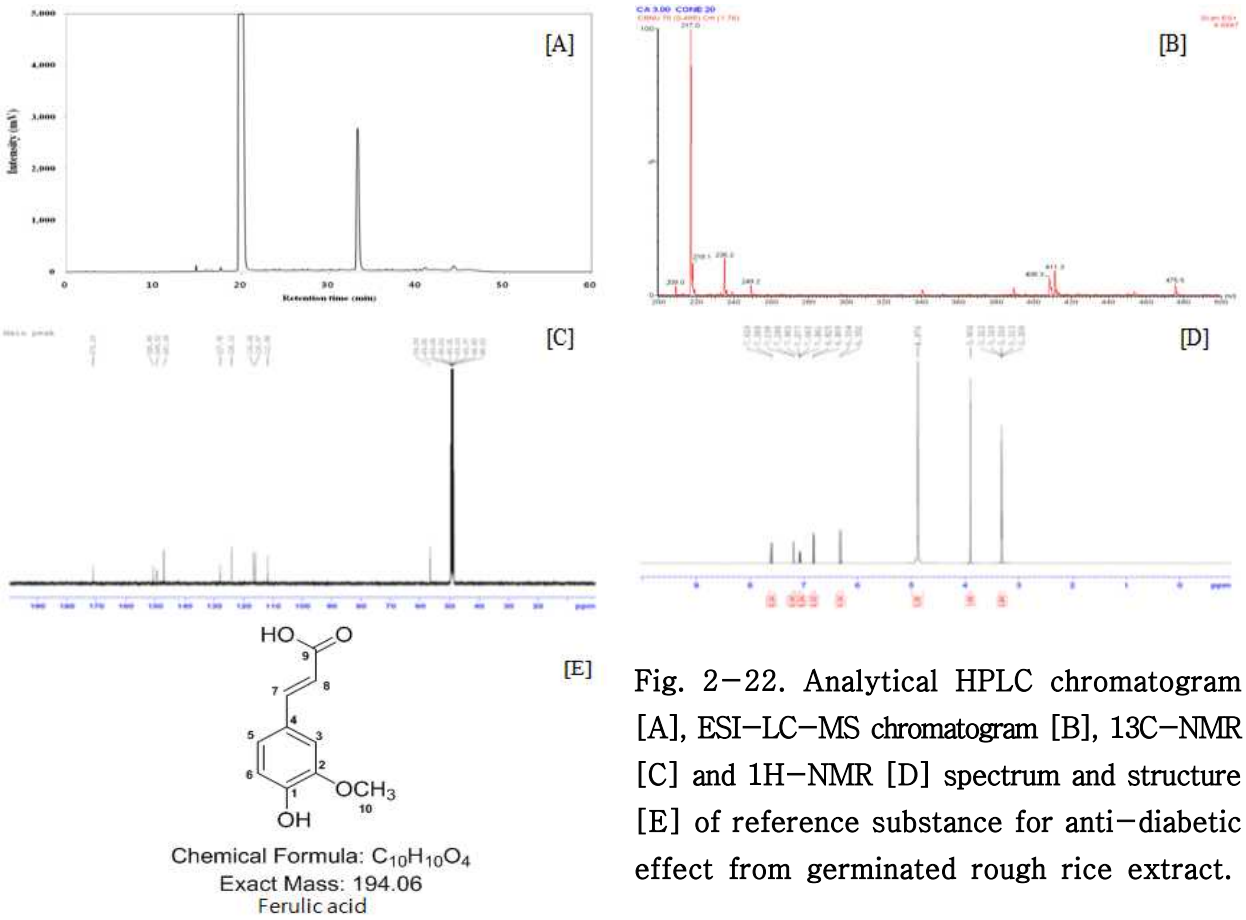


Fig. 2-22. Analytical HPLC chromatogram [A], ESI-LC-MS chromatogram [B], 13C-NMR [C] and 1H-NMR [D] spectrum and structure [E] of reference substance for anti-diabetic effect from germinated rough rice extract.

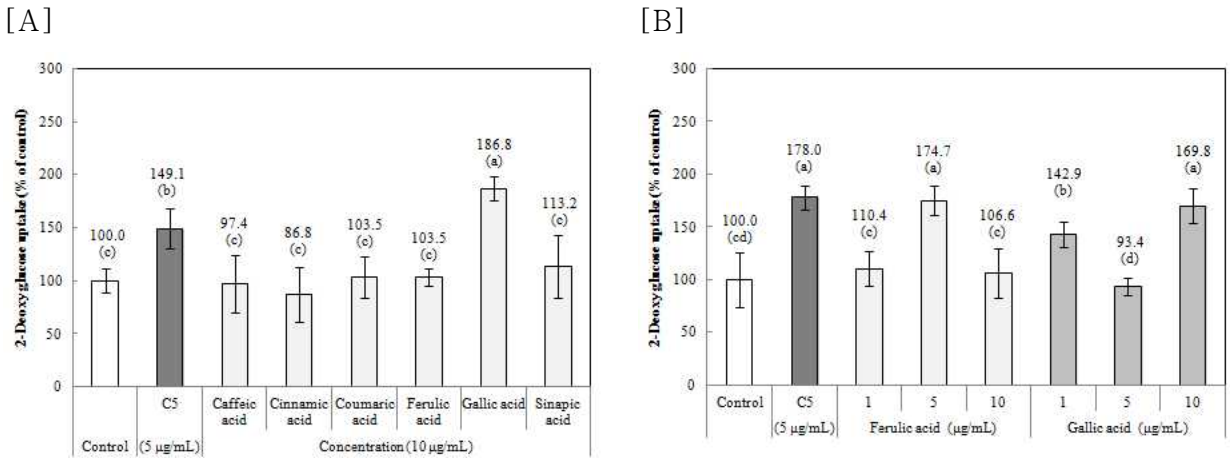


Fig. 2-23. Effects of active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and major phenolic acids on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes with different concentrations. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

제3절 발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘 규명

1. 연구방법

가. 시험물질 및 비교대조물질

시험물질은 발아 벼로부터 분리·정제된 발아 벼 추출물의 활성분획(GIP-HS_E_H_C5; 이하 C5)을 사용하였다. 시험물질은 갈색의 점성이 있는 액상으로, 시험기간 중 갈색 시약병에 담아 차광하여 실온에서 보관하였다. 비교대조물질은 현재 임상에서 당뇨 치료제로 사용 중인 Pioglitazone hydrochloride (pioglitazone, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

나. 세포배양과 지방세포 분화

3T3-L1 전지방세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포의 배양과 유지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 조건에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포가 80~90% confluence 되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기에서 세포를 모은 후 suspension 용액을 만들어 세포 배양용 6-well plate에서 confluent 상태까지 배양한 후 포화상태에 이른 것을 확인한 다음 48시간 더 배양하였다. 세포가 post-confluent하게 되면 IBMX (0.5 mM)와 dexamethasone (0.25 μM), insulin (5 μg/mL), 10% FBS를 첨가된 differentiation medium을 처리하여 분화를 유도하였다. 분화유도 2일 후에는 5 μg/mL의 insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였다. 그 후 4, 6일째 10% FBS DMEM으로 배양액을 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다.

배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 고농도 포도당 DMEM 용액으로 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 7~10일 사이에 포도당 흡수 실험을 포도당 유입 실험을 하였다. 분화가 유도된 지방세포를 PBS로 세척한 후 Serum-free DMEM으로 37℃에서 6시간 동안 배양한 후 Krebs Ringer Phospate Hepes buffer (KRPH buffer; 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.3 mM $CaCl_2$, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7.5)로 세척한 후에 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 대조구 및 시료를 희석하여 3T3-L1 지방세포내로의 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit (COSMO BIO CO., LTD, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 즉, 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 시료와 1 uM insulin, 1 mM 2-Deoxyglucose를 같이 분화가 유도된 지방세포에 처리한 후 37℃에서 20분동안 배양한 다음 배지를 제거한 후 200 uM phloretin이 포함된 cooled PBS로 세척한다. 그 후, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 각 well에 3 mL 넣은 뒤 세포를 파쇄한다. Cell lyssate를 tube로 모아준 후 80℃에서 15분동안 열처리를 실시한

다음 4℃ 15,000×*g*로 20분동안 원심분리를 실시한 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨준 후 상등액을 1×sample diluent buffer (1:4)로 희석한 다음 kit 안의 solution을 사용해 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit 방법에 준하여 실험을 순차적으로 진행한 다음 420 nm, 25~30℃의 조건에서 30분동안 5분 간격의 kinetic 반응으로 흡광도를 측정하였다(Zou, Wang & Shen, 2005).

다. 면역형광법(Immuno-fluorescence method)

계대 배양한 후 3T3-L1 섬유아세포를 8 well chamber slide에 완전히 채워질 때까지 배양하고 2일 후에 분화유도 물질을 넣고 7일간 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 high glucose DMEM 배지를 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 시점에서 실험을 실시하였다. 지방세포로 완전히 분화된 세포를 serum free DMEM 배지에 3% bovine serum albumin (BSA)를 첨가하여 12시간 배양한 뒤, 시험물질을 5시간 처리하였다. 5시간 후 인슐린을 1과 50 μg/mL의 농도로 10분간 처리하였다. 처리가 끝난 세포를 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후 4% formaldehyde in PBS로 10분간 고정하였다. 10% normal goat serum in 0.1% PBS-tween 20, 1% BSA, 0.3 M glycine으로 1 시간동안 실온에서 blocking을 실시하고, 1차 항체인 GLUT-4 (1:100, abcam Plc. Boston, MA.) pIRS-1 (1:100, Santa cruz biotechnology, Inc. Dallas, Texas)를 4℃에서 overnight 반응시켰고, 2차 항체 Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit IgG (1:1000, green, abcam Plc. Boston, MA)를 1시간동안 반응시켰다. 대조염색으로 핵에는 DAPI stain을 실시하였고, 세포질은 abcam사의 Alexa Fluor 594WGA (red)를 사용하였다.

라. Western blot assay

계대 배양한 후 3T3-L1 섬유아세포를 75 cm^2 flask에 완전히 채워질 때까지 배양하고, 2일 후에 분화유도 물질을 넣고 7일간 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 high glucose DMEM 배지를 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 시점에서 실험을 실시하였다. 지방세포로 완전히 분화된 세포를 serum free DMEM 배지에 3% bovine serum albumin (BSA)를 첨가하여 12시간 배양한 뒤, 시험물질을 5시간 처리 하였다. 5시간 후 인슐린을 1과 50 μg/mL의 농도로 10분간 처리하였다. 처리가 끝난 세포를 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후 lysis buffer (50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 100 μg/mL PMSF, 1 μg/mL Aprotinin, 1% Triton X-100)로 세포를 용해시킨 후 12,000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 얻었다. Bradford법을 이용하여 단백질 정량을 실시하고, 30 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동 한 후, 분리된 protein을 PVDF membrane에 80 V로 1시간동안 transfer하였다. 그 후에 5% skim milk in TBS-Tween 20를 사용하여 1시간동안 실온에서 blocking하였다. IRS-1, pIRS-$1^{(Tyr632)}$ (Santa cruz biotechnology, Inc. Dallas, Texas), PI_3 kinase, AKT, pAKT$^{(Ser473)}$, PPAR-γ (Cell signalling technology. Beverly, MA), GLUT4 (Santa cruz

biotechnology, Inc. Dallas, Texas)을 1차 antibody로 이용하여 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰고, HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit IgG (1:2000), anti-goat (1:3000)를 2차 antibody로 사용하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, ECL Kit (WEST-one™, iNtRONBiotechnology)로 검출하였다.

2. 연구결과

가. 시험물질 및 비교대조물질의 포도당 유입활성

일품 발아 벼로부터 추출된 활성분획(GIP-HS_E_H_C5, 이하 C5)과 비교대조물질(Pioglitazone, 이하 PG)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 농도별로 평가한 결과는 Fig. 3-1과 같다. 1 μM의 인슐린과 1 mM의 2-deoxy-glucose-6-phosphate를 처리한 대조구(control)의 포도당 유입활성을 기준으로 C5는 1 μg/mL에서는 활성을 보이지 않았지만, 농도가 5와 10 μg/mL으로 증가함에 따라 각각 147.27%와 180.12%로 포도당 유입활성을 증가시켰다. PG의 경우에는 농도가 0.5, 1 및 0.2 μg/mL로 증가함에 따라 각각 106.20%, 149.88% 및 220.32%로 증가하였다. 따라서 C5와 PG 모두 주어진 농도범위에서 농도의존적으로 3T3-L1 지방세포 내로 포도당 유입활성을 증가시키는 것으로 나타났다(p<0.05).

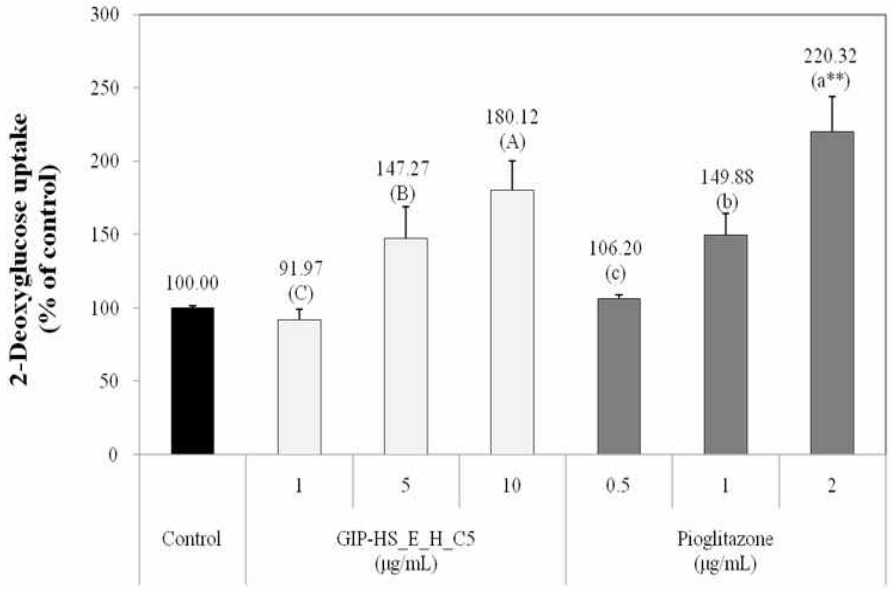


Fig. 3-1. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and pioglitazone with different concentrations on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference (p<0.05) among concentrations by Duncan's multiple range test, respectively. *, **, *** and ns are indicates significant differences among factors by t-test and there are means p<0.05, p<0.01, p<0.001 and *not significant*, respectively.

나. 면역형광법과 Western blot assay을 통한 항당뇨 메커니즘 규명

인슐린 민감성 물질을 탐색하는데 3T3-L1 섬유아세포를 사용한 이유는 3T3-L1세포가 *in vivo*에 존재하는 대사성 피이드백 루프와 관련된 복잡한 문제와 연관되어 있지 않으면서 인슐린 수용체와 GLUT4를 세포질에 가지고 있어 인슐린에 민감하게 반응하기 때문에 인슐린을 처리하면 3T3-L1세포의 세포막에 존재하는 인슐린 수용체에 인슐린이 결합하고 이것은 인슐린 신호전달체계인 IRS-1 → PI3 kinase → AKT의 과정을 증폭시킨다. 이 결과로 GLUT-4가 세포막으로 translocation 되는 것이 증가하게 되어 포도당의 흡수를 증가시킨다. 일품 발아 벼로부터 추출된 활성분획(GIP-HS_E_H_C5, 이하 C5)과 비교대조물질(pioglitazone, 이하 PG)의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성 증대를 통한 항당뇨 효능 메커니즘을 규명하고자 면역 형광법과 western blot을 이용하였다. 면역 형광 실험에서 보면 GLUT-4의 발현이 C5를 처리한 세포에서 증가함을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3-2), 또한 pIRS-1의 발현도 C5의 처리에 의해 증가함이 관찰되었다(Fig. 3-3).

주요 전사인자에 대한 western blot을 통한 단백질의 발현에 있어서도 인슐린 1 ng/mL만을 처리한 세포에 비해 C5를 처리한 군에서 pIRS, PI3 kinase, pAKT, GLUT-4의 발현이 증가함을 확인되었다(Fig. 3-4). 이는 C5가 인슐린 수용체의 민감성을 증가시켜 나타난 결과로 생각된다. 또한 대조 물질로 사용한 pioglitazone은 대표적인 항당뇨 치료제로 PPAR-γ agonist로 작용하여 지방세포에서 포도당의 흡수를 증가시킨다고 알려져 있다. C5를 처리하였을 때 PPAR-γ의 발현이 증가됨은 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시키는 분획층로 정확한 물질은 밝히지 못하였지만 PPAR-γ의 활성을 향상시키는 것으로 판단된다.

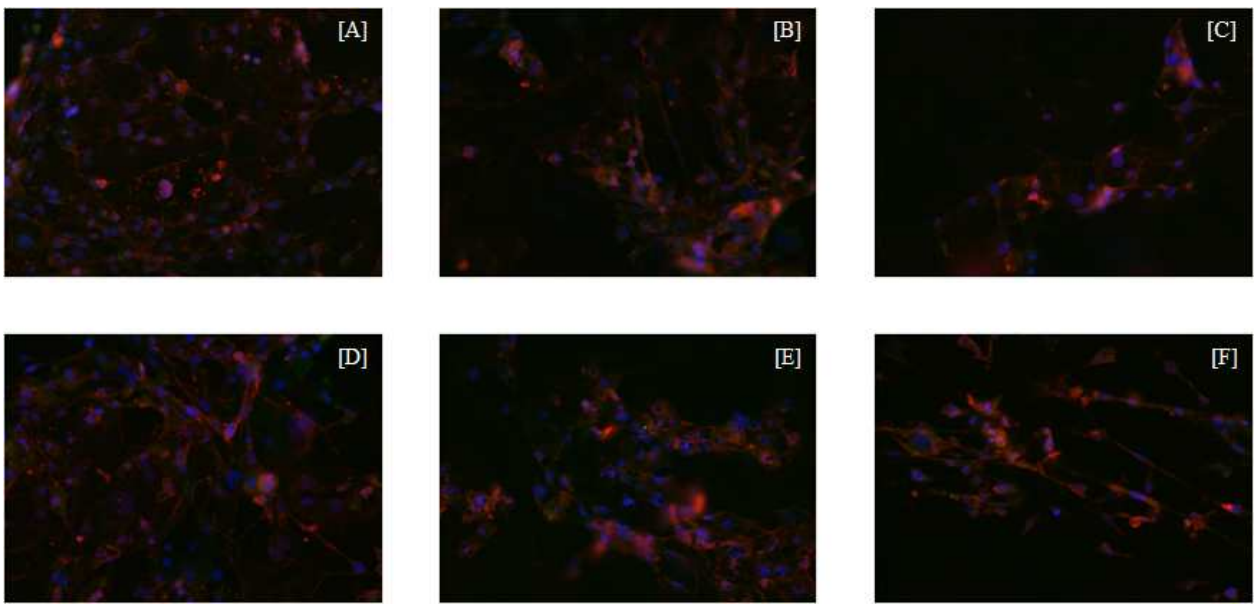


Fig. 3-2. Immunofluorescence study of the glucose transporter 4 (GLUT-4). A : control, B : pioglitazone 1 μg/mL, C : insulin 50 ng/mL, D, E and F : germinated rough rice extract (GIP-HS_E_H_C5) at concentrations of 1, 5 and 10 μg/mL, respectively.

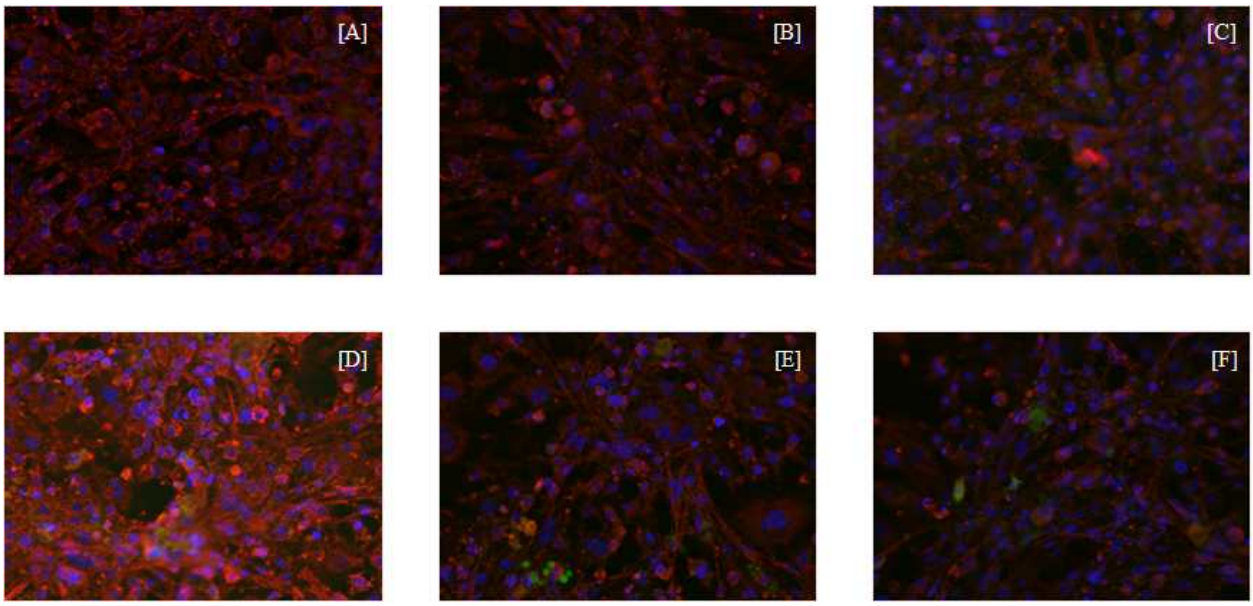


Fig. 3-3. Immunofluorescence study of the activated insulin receptor substrate 1 (IRS-1). A : control, B : pioglitazone 1 μg/mL, C : insulin 50 ng/mL, D, E and F : germinated rough rice extract (GIP-HS_E_H_C5) at concentrations of 1, 5 and 10 μg/mL, respectively.

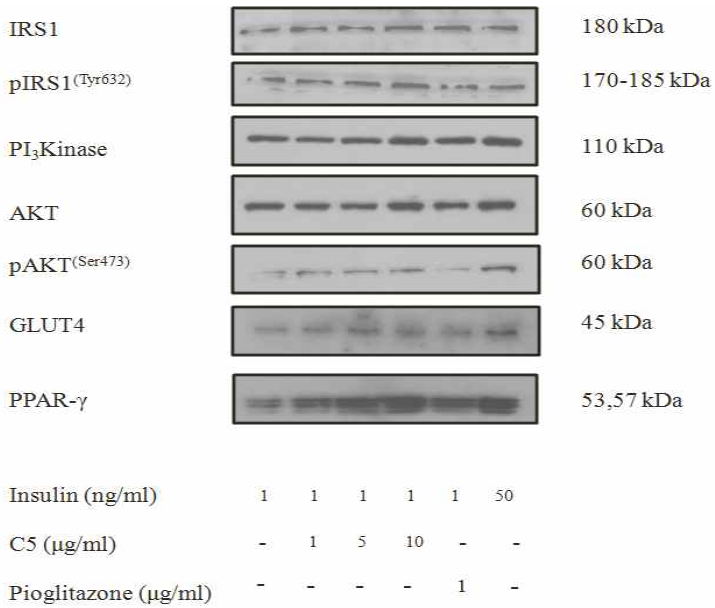


Fig. 3-4. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS1), activated IRS1 (pIRS1$^{(Tyr632)}$)), phosphoinositide 3-kinase (PI_3Kinase), protein kinase B (AKT) and activated AKT (pAKT$^{(Ser473)}$), glucose transporter 4 (GLUT4) and peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) expression of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5) and pioglitazone.

제4절 발아 벼 추출물의 *in vivo* 항당뇨 효능 평가 및 메커니즘 규명

1. 연구방법

가. 시험물질 및 비교대조물질

시험물질은 발아 벼로부터 분리·정제된 발아 벼 추출물의 활성분획(GIP-HS_E_H_C5; 이하 C5)을 사용하였다. 시험물질은 갈색의 점성이 있는 액상으로, 시험기간 중 갈색 시약병에 담아 차광하여 실온에서 보관하였다. 비교대조물질은 현재 임상에서 당뇨 치료제로 사용 중인 Pioglitazone hydrochloride (pioglitazone, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

나. 실험동물

6주령 수컷 C57BLKS/J-*db/db* 마우스와 C57BLKS/J-*db/m*+ 마우스 (Shizuoka Laboratory Animal Center; SLC, Shizuoka, Japan)를 중앙실험동물(주)로부터 공급받아 약 1주간 검역·순화 과정을 거치고, 3주간 1회/주 혈당을 측정하여 모든 C57BLKS/J-*db/db* 마우스의 공복혈당이 평균 150 mg/dL에 도달한 것을 확인한 후, 동물이 10주령이 되는 시점에 군분리를 실시하였다. 동물은 마우스용 사육상자 (220×200×145 mm^3)에 2~3마리씩 수용하였으며, 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명주기 12시간/일 (07:00~19:00) 및 조도 150~300 Lux로 조절하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Teklad certified irradiated global 18% protein rodent diet, Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.)를 급여하여 자유섭취하게 하였고, 음수는 충북대학교 실험동물연구지원센터에서 공급되는 멸균 정제수를 자유섭취하게 하였다. 본 시험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호 : CBNUA-623-13-01).

다. 군분리 및 투여

제 2형 당뇨가 유발되는 C57BLKS/J-*db/db* 마우스의 혈당이 평균 150 mg/dL에 도달한 것을 확인한 후에 다음과 같이 5군으로 군분리 하였다. 1) 정상대조군, 2) 양성대조군, 3) C5 50 mg/kg 투여군, 4) C5 100 mg/kg 투여군, 5) 비교대조군 (pioglitazone 5 mg/kg 투여군). 정상대조군에는 당뇨증상이 나타나지 않은 C57BLKS/J-*db/m*+ 마우스를 6마리, 그 외의 군은 C57BLKS/J-*db/db* 마우스를 음성대조군 및 용량별 C5 투여군은 각각 10마리씩, 비교대조군은 7마리로 설정하였다(Table 4-1). 시험물질인 C5는 각 용량별로 부형제인 5% cremophor EL 용액에 고르게 현탁되도록 혼합하여 투여하였으며, pioglitazone은 100 mg/mL의 용량으로 dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich Inc., USA.)에 용해한 후에 이를 부형제 1 mL에 5 μL씩의 비율로 용해하여 투여하였다. 정상대조군 및 음성대조군은 5% cremophor EL 용액을 투여하였으며, 투여액량은 10 mL/kg으로 설정하여 개체별 투여액량은 투여 일에 가깝게 측정된 체중을

기준으로 산출하였다. 투여는 경구투여용 존데를 이용하여 1회/일 9주간 반복 경구투여하였다.

Table 4-1. Experimental treatment groups for identification of anti-diabetic effect of germinated rough rice extract C5-fraction (GIP-HS_E_H_C5 ; C5) in C57BLKS/J-*db/m*+ mice and C57BLKS/J-*db/db* mice

No.	Treatment	No. of animals
G1	Normal control	6
G2	Positive control	10
G3	C5 50 mg/kg	10
G4	C5 100 mg/kg	10
G5	Pioglitazone 5mg/kg	7

G1 : C57BLKS/J-*db/m*+ mice, G2~G : C57BLKS/J-*db/db* mice

라. 일반증상 관찰 및 체중 측정

실험기간 동안 1회/일 외관, 행동 및 배설물 등의 일반증상을 관찰하고, 사망동물의 유무를 확인하였다. 체중은 시험물질투여 전 부터(0주) 시험물질투여 종료 시점까지 1회/주 9주간 총 10회 측정하였다.

마. 사료 및 음수섭취량 측정

음수 및 사료섭취량은 관찰기간 동안 1회/주, 2일간의 섭취량을 측정하였다. 사육상자별로 공급일에 음수 및 사료에 대하여 공급량을 측정한 후, 약 48시간 후에 잔량을 측정하여 각 사육상자 내의 한 개체당 1일 평균 섭취량을 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Feed / Water intake} = \frac{(\text{A gram of the supplying 0 h}) - (\text{A gram of the remaining 48 h})}{2\ \text{Days} \times \text{The number of animal in a cage}}$$

바. 혈당 측정 및 포도당 내성검사

혈당은 군분리 후 시험물질 투여 0주(시험물질투여 전), 1주, 3주, 5주, 7주 및 9주차에 총 6회 측정하였다. 측정 방법은 모든 동물을 혈당 측정 전 약 16시간 이상 절식시키고, 시험물질을 투여한 후, 약 1시간 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 간이혈당측정기 (GlucoDr PlusTM AGM-3000, Allmedicus Co., Ltd., Anyang, Korea)를 사용하여 측정하였다.

포도당 내성검사는 시험물질 투여 8주에 마우스를 약 16시간 절식시킨 후 수행하였다. 각 군별로 부형제, 시험물질 및 양성대조물질을 투여하고 1시간 후에 포도당(1 g/kg, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO. USA.)을 경구로 투여하였다. 포도당 투여 0(투여전), 30, 60, 90 및 120분에 꼬리정맥에서 채혈하여 간이혈당측정기를 이용하여 측정하였다.

사. 조직/혈액 채취 및 혈액생화학적 검사

모든 실험동물은 마지막 시험물질 투여 다음날에 diethyl ether를 사용하여 흡입마취시킨 후에 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고 안락사 시켰다. 안락사 후 실험동물로부터 간, 지라, 콩팥, 이자, 지방조직 및 대퇴근육을 적출하였다. 간, 지방조직, 대퇴근육의 일부는 액체질소를 사용하여 동결시킨 후에 초저온고에 보관하였고, 이외 나머지 조직은 10% 중성완충포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다. 간, 지라, 콩팥은 장기중량을 측정한 후, 체중에 대한 상대장기 중량을 산출하였다.

혈액생화학적 검사를 위하여 채취된 혈액은 serum separating tube에 넣고 원심분리하여(3,000 rpm, 15분, 4℃) 혈청을 분리하였다. 분리한 혈장에서 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (T Chol.), triglyceride, low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL)을 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 녹십자의료재단에서 측정하였다.

아. 혈중 인슐린 농도 측정

분리한 혈청의 일부에서 혈중 인슐린 농도(Insulin, ng/mL)는 Mouse Insulin ELISA kit (Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan)를 이용하여 kit 제조사에서 제공하는 manual에 따라 측정하였다.

자. 조직병리학적 검사

고정시킨 조직 중 간, 콩팥 및 이자는 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 3~4 μm 두께로 박절한 후, Hematoxylin & Eosin (HE) 염색을 실시하였다. HE 염색된 슬라이드를 광학현미경하에서 관찰하여 각 군 간의 이상소견의 유무를 비교하였다.

차. 통계분석

혈당 측정 결과, 포도당 내성검사 결과 및 인슐린농도 측정 결과는 평균±표준오차로 표시하였고, 체중 측정 결과, 음수 및 사료 섭취량 측정 결과, 장기 중량 측정 결과, 혈액생화학적 분석 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각각의 실험결과에 대해 음성대조군과 정상대조군, 용량별 GRE-C5 투여군 및 5 mg/kg 용량의 Pioglitazone 투여군 간의 통계학적 유의성을 확인하기 위하여 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)를 실시하였다 (P<0.05). 그 후, 등분산성을 확인하기 위해 Levene test를 실시하여 분산이 동질성을 갖는 경우에 음성대조군과 유의적인 차이가 있는 시험군을 확인하기 위해 Duncan test를 실시하였고 (유의수준 : 0.05 및 0.01), 비등분산인 경우에 Games-Howell test를 실시하였다(유의수준 : 0.05 및 0.01).

카. 발아 벼 추출물의 *in vivo* 항당뇨 효능 메카니즘 규명

(1) 검체

9주간 시험물질인 경구투여한 C57BLKS/J-*db/m*+ 마우스와 C57BLKS/J-*db/db* 마우스의 장딴지근 (gastrocnemius muscle)을 적출하여 액체질소에서 동결하였고, 이를 초저온고에 보관한 후에 분석에 사용하였다.

(2) Western blot analysis

동결된 근육조직 약 50 mg을 tube에 옮기고, protease inhibitor cocktail, phosphatase을 혼합한 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 일정량 넣은 후에 homogenizer를 사용하여 조직을 분쇄하였고, 이를 원심분리 (13,000 rpm, 10분, 4℃)한 후에 상층액 만을 취하여 단백질을 추출하였다.

Detergent compatible bradford assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 사용하여 각 추출한 용액의 단백질 농도를 측정하였고, 측정한 단백질의 농도에 따라 일정량을 6% 및 10% polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 크기별로 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Whatman GmbH, Germany)에 transfer한 후, 5% skim milk (Becton Dickinson and Company, U.S.A.)를 사용하여 blocking 하였다. Blocking 후에 rabbit anti-insulin receptor substrate 1 (IRS1) IgG (Abcam, UK) 1:800 희석용액, rabbit anti-phospho-insulin receptor substrate 1 Tyr608 (pIRS1) IgG (EMD Millipore, USA) 1:800 희석용액, rabbit anti-phosphatidylinositol 3 kinases (PI_3K) IgG (Cell Signaling Technology, Inc., USA) 1:800 희석용액, rabbit anti-Akt IgG (Cell Signaling Technology, Inc., USA) 1:1,000 희석용액, rabbit anti-phospho-Akt Ser473 (pAKT) IgG (Cell Signaling Technology, Inc., U.S.A.) 1:800 희석용액, rabbit anti-glucose transporter type 4 (GLUT4) IgG (Abcam, UK) 1:2,500 희석용액 및 rabbit anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) IgG (Cell Signaling Technology, Inc., USA) 1:2,500 희석용액을 1차 항체로 하여 4℃에서 약 16시간 이상 (overnight) 반응시켰다. 1차 항체 반응 후에 goat anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology, Inc., USA) 1:3,000 희석용액을 2차 항체로 상온에서 약 1시간 동안 반응시켰고, Luminata Crescendo Western HRP substrate (EMD Millipore, U.S.A.)를 사용하여 발광시켰으며, 이를 Chemidoc (Lugen Sci. Inc., Korea)을 사용하여 이를 촬영하였다. Blocking 용액의 조제 및 transfer 이후 각 단계 간에 membrane을 5분씩 3-4회 washing하는데 tris buffered saline-0.1% tween 20, pH 7.6 (TBS-T)를 이용하였고, 1차 및 2차 항체의 원액은 각 항체의 data sheet에 따라 5% skim milk 또는 5% BSA를 용해시킨 TBS-T에 희석하였다.

촬영한 단백질 밴드는 ImageJ 프로그램 (http://http://imagej.nih.gov/ij/)을 사용하여 각각의 발현정도 (intensity)를 측정하였고, 정상대조군인 C57BLKS/J-*db/m*+ 마우스의 근육조직 내 단백질의 발현량을 100으로 하였을 때의 상대적인 발현량으로 표시하였다.

(3) 면역형광법(Immuno-fluorescence)

동결된 근육조직을 동결절편기 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Germany)를 사용하여 근육조직의 가로 단면이 나타나도록 8 μm 두께로 박절하였고, 이를 acetone:ethanol = 3:1 혼합용액에 -20℃에서 약 10분간 고정시켰다. 이를 phosphate buffered saline (PBS, GE Healthcare HyClone Laboratories, USA)에 3회 washing 하였으며, GLUT4 염색 조직은 5% triton X-100 (Sigma Aldrich Co., LLC., USA) PBS에 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후에 5% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich Co., LLC., USA) PBS를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. 그리고 rabbit anti-Akt IgG 1:50 희석용액, rabbit anti-pAKT IgG 1:50 희석용액 및 rabbit anti-GLUT4 IgG 1:200 희석용액을 1차 항체로 하여 Akt 및 pAkt는 4℃에서 약 16시간 이상 (overnight) 반응시켰고, GLUT4는 상온에서 4시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 Akt 및 GLUT4 염색조직에는 goat anti-rabbit IgG fluorescein conjugate (EMD Millipore, USA) 1:1,000 희석용액을 사용하였고, pAkt 염색조직에는 goat anti-rabbit IgG rhodamine conjugate (EMD Millipore, USA) 1:1,000 희석용액을 사용하였다. 2차 항체 반응을 마친 후에 1 μg/mL 농도의 4',6-diamidino-2 -phenylindole (DAPI; Sigma Aldrich Co., LLC., USA)를 상온에서 5분간 반응시켜 근육세포의 핵을 염색하였고, fluorescence mounting medium (Agilent Technologies DAKO, Denmark)를 사용하여 봉입하였다. Blocking 이후 각 단계 간에 TBS-T를 사용하여 조직절편을 5분씩 3-4회 washing하였고, 1차 및 2차 항체의 원액은 5% normal goat serum (Vector Laboratories, Inc., USA)을 혼합한 PBS에 희석하였다.

봉입을 마친 조직슬라이드는 confocal microscopy (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany)를 사용하여 사진을 촬영하였고, 세포내에서 각각의 단백질이 발현된 위치와 염색된 정도를 비교하였다.

2. 연구결과

가. 일반증상관찰 및 체중 변화

시험기간 동안 시험물질 투여로 인한 이상증상은 관찰되지 않았으며, 사망개체 또한 발생하지 않았다. 시험기간 동안 정상대조군의 체중은 평균 28.9~32.9 g의 변동을 나타내었고, 양성대조군의 체중은 평균 43.5~50.2 g의 변동을 나타내어 양성대조군에서 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4-1, $p<0.01$). 50 및 100 mg/mL 용량의 C5 투여군의 체중은 각각 평균 42.0~47.2 g 및 43.6~47.5 g의 변동을 나타내었으며, 양성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 체중은 평균 43.8~63.3 g의 변동을 나타내었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 5주부터 9주까지 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 확인되었다($p<0.01$).

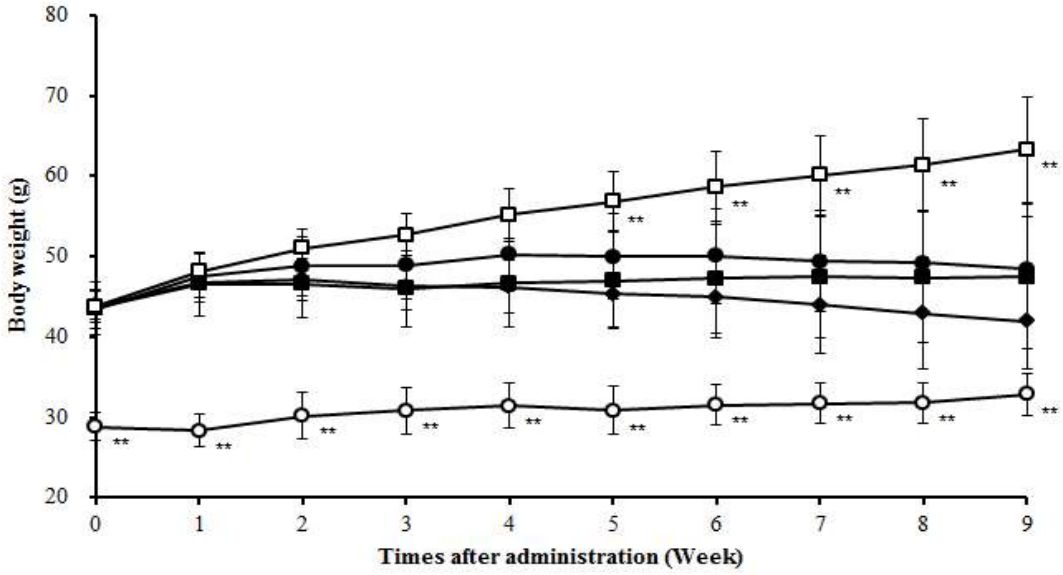


Fig. 4-1. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on changes of body weights in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks. ○: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m*+ mice), ●: Positive control group, ◆: C5 50 mg/kg group, ■: C5 100 mg/kg group, □: Pioglitazone 5mg/kg group. Data are mean ± standard deviation. **Significantly different from positive control, P<0.01.

나. 사료 및 음수섭취량 변화

시험기간 동안 정상대조군은 1일 평균 3.1~4.3 g의 사료를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군은 1일 평균 6.6~8.6 g의 사료를 섭취한 것으로 측정되어 양성대조군에서 통계학적으로 유의하게 사료를 많이 섭취하는 것으로 확인되었다(Table 4-2, $p<0.01$). 50 mg/mL 용량의 C5 투여군은 1일 평균 7.2~8.6 g의 사료를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 3주, 5주 및 8주차에 통계학적으로 유의하게 많은 양의 사료를 섭취한 것으로 확인되었고($p<0.05$), 100 mg/mL 용량의 C5 투여군은 1일 평균 5.9~8.5 g의 사료를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 9주차에 통계학적으로 적은 양의 사료를 섭취한 것으로 확인되었다($p<0.05$). 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군은 1일 평균 4.1~8.4 g의 사료를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 3주, 6주, 7주 및 9주차에 통계학적으로 유의하게 적은 양의 사료를 섭취한 것으로 확인되었다($p<0.05$: 7주, $p<0.01$: 3주, 6주 및 9주).

Table 4-2. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on changes of feed consumption in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks.

Group	Feed consumption (g)									
	Week									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normal control	4.3 ± 0.3**	4.1 ± 0.7**	3.9 ± 0.4**	3.9 ± 0.7**	3.5 ± 0.4**	3.3 ± 0.4**	3.7 ± 0.6**	3.8 ± 0.3**	3.1 ± 0.2**	3.3 ± 0.3**
Positive control	8.6 ± 1.8	7.2 ± 0.9	6.6 ± 0.7	6.9 ± 0.6	6.6 ± 0.8	6.8 ± 1.3	7.6 ± 1.1	7.3 ± 1.1	6.6 ± 0.6	6.7 ± 0.9
C5 50 mg/kg	8.1 ± 1.0	7.7 ± 0.9	7.6 ± 0.8	7.7 ± 1.3*	7.4 ± 1.0	8.5 ± 1.4*	8.6 ± 1.1	8.2 ± 0.9	7.7 ± 0.9*	7.2 ± 0.8
C5 100 mg/kg	8.5 ± 0.5	8.1 ± 0.8	7.0 ± 0.8	7.0 ± 1.1	7.5 ± 0.7	7.3 ± 0.6	7.1 ± 1.4	6.6 ± 0.7	6.5 ± 0.7	5.9 ± 0.9**
Pioglitazone 5 mg/kg	8.4 ± 0.4	7.9 ± 0.3	6.6 ± 0.3	5.9 ± 0.2**	6.5 ± 0.5	6.3 ± 0.4	5.8 ± 0.4**	5.7 ± 0.5*	5.8 ± 1.4	4.1 ± 1.2**

Data are mean ± standard deviation.

*Significantly different from positive control, P<0.05.

**Significantly different from positive control, P<0.01.

시험기간 동안 정상대조군은 1일 평균 1.8~6.2 mL의 음수를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군은 1일 평균 12.1~25.3 mL의 음수를 섭취한 것으로 측정되어 양성대조군에서 통계학적으로 유의하게 많은 양의 음수를 섭취하는 것으로 확인되었다(Table 4-3, $p<0.05$: 5주, $p<0.01$: 그 외 기간). 50 mg/mL 용량의 C5 투여군은 1일 평균 15.9~29.1 mL의 음수를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 1주차에 통계학적으로 유의하게 많은 양의 음수를 섭취한 것으로 확인되었고($p<0.05$), 100 mg/mL 용량의 C5 투여군은 1일 평균 11.6~16.3 mL의 음수를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 9주차에 음수섭취량이 통계학적으로 유의하게 감소한 것으로 확인되었다($p<0.05$). 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군은 1일 평균 7.3~13.9 mL의 음수를 섭취한 것으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 2주, 7주, 8주 및 9주차에 통계학적으로 유의하게 적은 양의 음수를 섭취한 것으로 확인되었다($p<0.05$: 7주 및 8주, $p<0.01$: 3주 및 9주).

Table 4-3. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on changes of water consumption in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks.

Group	Water consumption (g)									
	Week									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normal control	6.2 ± 0.7**	5.4 ± 1.5**	5.4 ± 1.2**	4.0 ± 0.9**	2.9 ± 0.5**	1.8 ± 0.1*	3.4 ± 1.7**	2.6 ± 0.3**	2.3 ± 0.1**	2.0 ± 0.3**
Positive control	12.4 ± 2.1	12.1 ± 1.9	13.3 ± 2.9	17.3 ± 2.7	18.5 ± 3.4	20.3 ± 4.7	22.9 ± 5.4	22.9 ± 4.2	23.4 ± 3.9	25.3 ± 3.8
C5 50 mg/kg	15.9 ± 2.8	17.6 ± 3.2*	18.4 ± 4.1	23.0 ± 7.9	24.7 ± 7.8	27.2 ± 8.9	28.8 ± 10.1	29.1 ± 10.7	27.9 ± 9.9	27.4 ± 9.1
C5 100 mg/kg	11.6 ± 3.2	13.8 ± 1.7	13.1 ± 3.5	16.0 ± 4.1	16.3 ± 3.6	15.4 ± 3.8	16.0 ± 4.5	15.7 ± 4.8	15.3 ± 4.9	14.6 ± 5.3*
Pioglitazone 5 mg/kg	13.9± 2.6	10.1 ± 3.0	8.2 ± 3.6**	8.8 ± 4.0	7.3 ± 4.2	7.4 ± 4.8	7.4 ± 4.8	7.7 ± 4.7*	7.7 ± 4.8*	8.0 ± 5.8**

Data are mean ± standard deviation.

*Significantly different from positive control, P<0.05.

**Significantly different from positive control, P<0.01.

다. 혈당 변화

시험기간 동안 정상대조군의 혈당은 평균 70.2~85.0 mg/dL의 변동을 나타내었고, 양성대조군의 혈당은 평균 175.2~512.9 mg/dL의 변동을 나타내어 양성대조군에서 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4-2, $p<0.01$). 50 용량의 C5 투여군의 혈당은 평균 174.0~499.3 mg/dL의 변동을 나타내었으며, 양성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았고, 100 mg/mL 용량의 C5 투여군의 혈당은 평균 176.5~315.7 mg/dL의 변동을 나타내었으며, 양성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 낮은 것으로 확인되었다($p<0.05$: 7주 및 9주). 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 혈당은 평균 181.1~182.7 mg/dL의 변동을 나타내었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 1주부터 9주까지 통계학적으로 유의하게 낮아진 것으로 확인되었다($p<0.05$: 1주, $p<0.01$: 3주-9주).

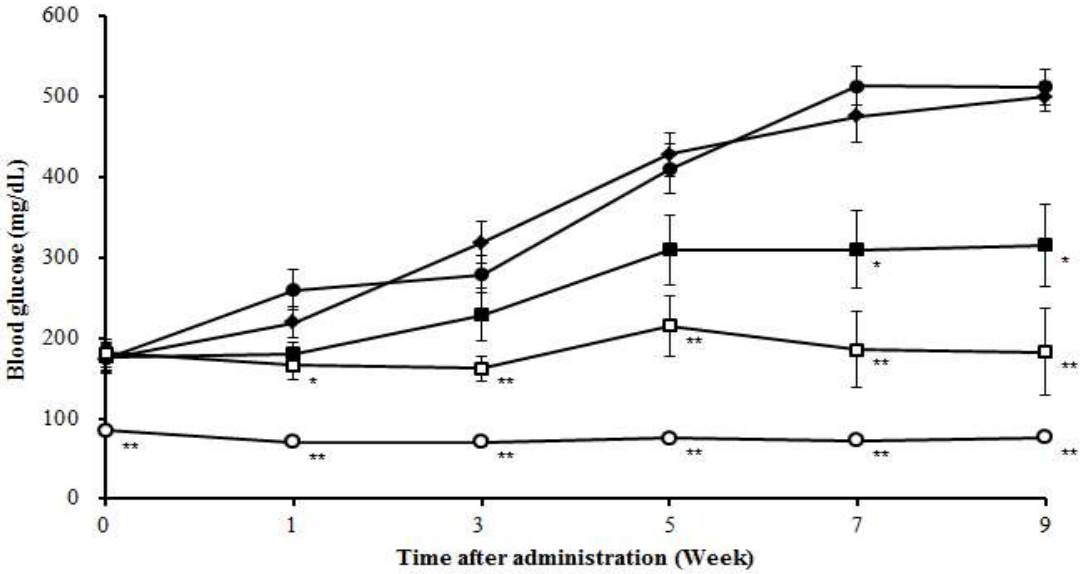


Fig. 4-2. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on changes of blood glucose in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks. ○: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m*+ mice), ●: Positive control group, ◆: C5 50 mg/kg group, ■: C5 100 mg/kg group, □: Pioglitazone 5mg/kg group. Data are mean ± standard deviation. *Significantly different from positive control, P<0.05. **Significantly different from positive control, P<0.01.

라. 포도당 내성 변화

시험물질 투여 8주차에 실시한 포도당내성 검사에서 정상대조군의 glucose 투여 0분(투여전), 30분, 60분, 90분 및 120분의 혈당농도는 각각 평균 70.3 mg/dL, 155.3 mg/dL, 126.5 mg/dL, 119.3 mg/dL 및 102.2 mg/dL로 측정되었으며, 양성대조군의 혈당농도는 각각 평균 547.2 mg/dL, 737.2 mg/dL, 712.5 mg/dL, 654.6 mg/dL 및 636.0 mg/dL로 측정되어 양성대조군의 혈당농도가 모든 시점에서 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 나타내었다(Fig. 4-3, $p<0.01$). 50 mg/mL 용량의 C5 투여군의 혈당은 각 시점별로 평균 475.1 mg/dL, 757.1 mg/dL, 675.0 mg/dL, 635.7 mg/dL 및 615.6 mg/dL로 측정되었고, 100 mg/mL 용량의 C5 투여군의 혈당은 각 시점별로 평균 419.1 mg/dL, 628.3 mg/dL, 585.6 mg/dL, 560.8 mg/dL 및 527.4 mg/dL로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 다소 감소하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 혈당은 각 시점별로 평균 256.1 mg/dL, 385.1 mg/dL, 368.1 mg/dL, 364.1 mg/dL 및 349.1 mg/dL로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 투여 0분 및 120분에서 통계학적으로 유의하게 혈당이 낮은 것으로 확인되었다($p<0.05$).

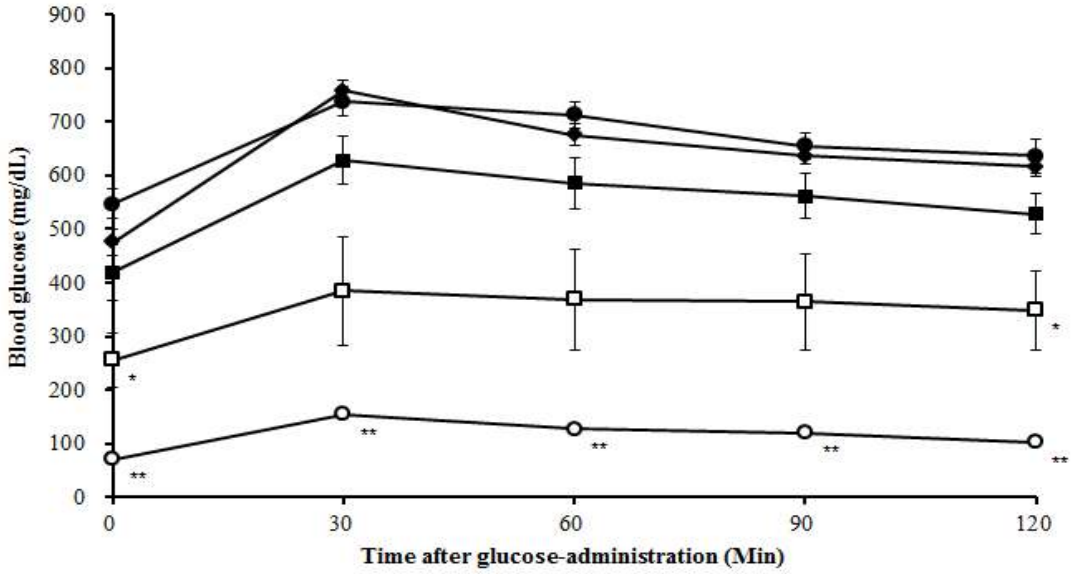


Fig. 4−3. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP−HS_E_H_C5; C5) on glucose tolerance test in type II diabetic C57BLKS/J−*db/db* mice for 9 weeks. ○: Normal control group (C57BLKS/J−*db/m*+ mice), ●: Positive control group, ◆: C5 50 mg/kg group, ■: C5 100 mg/kg group, □: Pioglitazone 5mg/kg group. Data are mean ± standard deviation. *Significantly different from positive control, $P<0.05$. **Significantly different from positive control, $P<0.01$.

마. 절대 및 상대 장기중량 변화

조직적출 시 측정한 절대장기중량에서 정상대조군의 간, 콩팥(양측 평균) 및 지라는 각각 평균 1.476 g, 0.081 g 및 0.196 g으로 측정되었고, 양성대조군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 2.444 g, 0.067 g 및 0.204 g으로 측정되었으며, 양성대조군에서 간의 절대장기중량이 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다(Table 4−4). 50 mg/kg 용량의 C5 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 2.153 g, 0.061 g 및 0.226 g으로 측정되었고, 100 mg/kg 용량의 C5 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 2.547 g, 0.063 g 및 0.196 g으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 4.234 g, 0.086 g 및 0.184 g으로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 체중에 대한 절대장기중량의 비율인 상대장기중량에서 정상대조군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 4.83%, 0.27% 및 0.64%로 나타났고, 양성대조군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 5.25%, 0.15% 및 0.44%으로 나타났으며, 양성대조군에서 콩팥의 상대장기중량이 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다. 50 mg/kg 용량의 C5 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 5.32%, 0.17% 및 0.58%로 나타났고, 100 mg/kg 용량의 C5 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 5.58%, 0.15% 및 0.46%로 나타났으며, 양성대조군과 비교하여 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 간, 콩팥 및 지라는 각각 평균 7.02%, 0.14% 및 0.31%로 나타났으며, 양성대조군과 비교하여 간의 상대장기중량이 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다.

Table 4-4. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on absolute and relative organ weight in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks.

Group	Absolute organ weight (g)			Relative organ weight (%)		
	Liver	Spleen	Kidney (mean)	Liver	Spleen	Kidney (mean)
Normal control	1.476 ± 0.114**	0.081 ± 0.014	0.196 ± 0.029	4.83 ± 0.40	0.27 ± 0.05	0.64 ± 0.07*
Positive control	2.444 ± 0.498	0.067 ± 0.042	0.204 ± 0.041	5.25 ± 0.96	0.15 ± 0.13	0.44 ± 0.08
C5 50 mg/kg	2.153 ± 0.380	0.061 ± 0.051	0.226 ± 0.035	5.32 ± 0.74	0.17 ± 0.20	0.58 ± 0.22
C5 100 mg/kg	2.547 ± 0.809	0.063 ± 0.027	0.196 ± 0.038	5.58 ± 0.94	0.15 ± 0.06	0.46 ± 0.19
Pioglitazone 5mg/kg	4.234 ± 0.484**	0.086 ± 0.031	0.184 ± 0.025	7.02 ± 0.76**	0.14 ± 0.05	0.31 ± 0.08

Data are mean ± standard deviation.

*Significantly different from positive control, $P<0.05$.

**Significantly different from positive control, $P<0.01$.

바. 혈중 인슐린 농도 변화

조직적출 시 채취한 혈액으로부터 측정한 혈중 인슐린농도에서 정상대조군은 평균 4.83 ng/mL로 측정되었고, 양성대조군은 평균 2.26 ng/mL로 측정되었으며, 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 50 및 100 mg/kg 용량의 C5 투여군은 각각 평균 1.54 ng/mL 및 3.48 ng/mL로 측정되었고, 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군은 8.43 ng/mL로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다(Fig. 4-4).

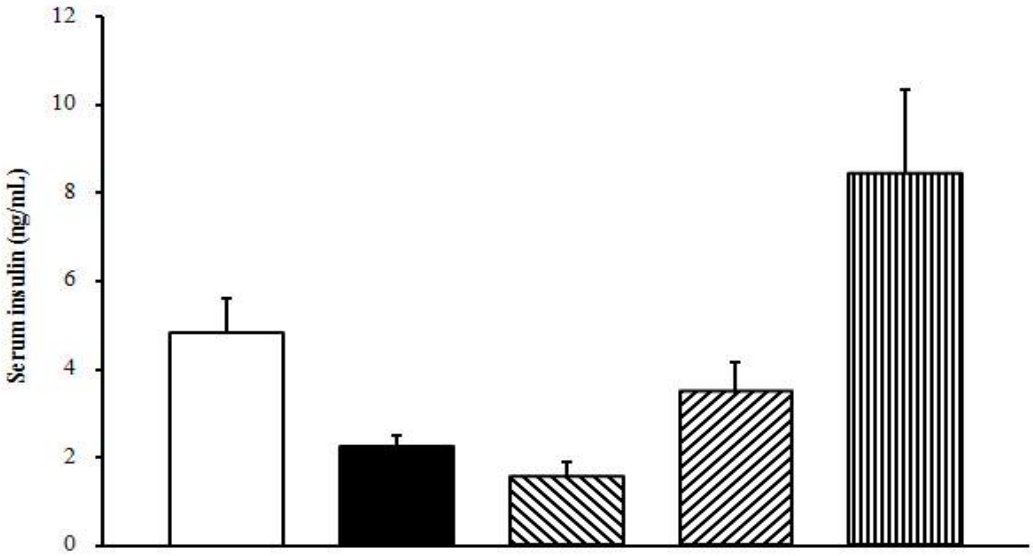


Fig. 4-4. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on serum insulin concentrations in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks. ○: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m+* mice), □: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m+* mice), ■: Positive control group, ▧: GRE-C5 50 mg/kg group, ▨: GRE-C5 100 mg/kg group, ▥: Pioglitazone 5mg/kg group.

사. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사에서 정상대조군의 aspartate transaminase (AST)는 평균 43.5 U/L, alanine transaminase (ALT)는 평균 28.3 U/L, total cholosterol (T Chol.)는 평균 119.7 mg/kg, triglyceride는 평균 94.2 mg/kg, low density lippoproteins (LDL)는 평균 14.3 mg/kg 및 high density lippoproteins (HDL)는 평균 106.2 mg/kg로 측정되었고, 양성대조군의 AST는 평균 310.3 U/L, ALT는 평균 252.4 U/L, T Chol.는 평균 191.6 mg/kg, triglyceride는 평균 133.6 mg/kg, LDL은 평균 31.2 mg/kg 및 HDL은 평균 120.0 mg/kg로 측정되었으며, 양성대조군에서 AST, ALT, T Chol. 및 HDL이 통계학적으로 유의하게 증가한 것으로 확인되었다(Table 4-5, $p<0.05$: HDL, $p<0.01$: AST, ALT 및 T Chol.). 50 mg/kg 용량의 C5 투여군의 AST는 평균 330.1 U/L, ALT는 평균 197.8 U/L, T Chol.는 평균 140.9 mg/kg, triglyceride는 평균 145.9 mg/kg, LDL은 평균 12.0 mg/kg 및 HDL은 평균 114.1 mg/kg로 측정되었고, 100 mg/kg 용량의 C5 투여군의 AST는 평균 277.2 U/L, ALT는 평균 195.6 U/L, T Chol.는 평균 174.3 mg/kg, triglyceride는 평균 105.1 mg/kg, LDL은 평균 31.1 mg/kg 및 HDL은 평균 110.8 mg/kg로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 50 mg/kg 용량의 C5 투여군의 T Chol.에서만 통계학적으로 유의하게 감소한 것이 확인되었다. 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 AST는 평균 243.4 U/L, ALT는 평균 293.1 U/L, T Chol.는 평균 186.1 mg/kg, triglyceride는 평균 111.7 mg/kg, LDL은 평균 48.7 mg/kg 및 HDL은 평균 111.0 mg/kg로 측정되었으며, 양성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

Table 4-5. Effects of germinated rough rice active fraction (GIP-HS_E_H_C5; C5) on serum biochemistry in type II diabetic C57BLKS/J-*db/db* mice for 9 weeks.

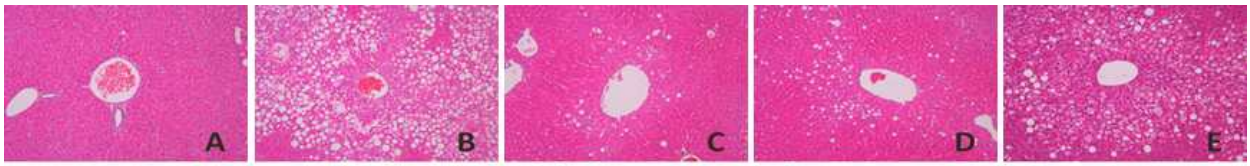
Group	Serum biochemistry					
	AST (U/L)	ALT (U/L)	T Chol. (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
Normal control	43.5 ± 2.4**	28.3 ± 1.3**	119.7 ± 4.2**	94.2 ± 8.1	14.3 ± 1.3	106.2 ± 3.4*
Positive control	310.3 ± 45.0	252.4 ± 42.1	191.6 ± 11.9	133.6 ± 9.8	31.2 ± 6.8	120.0 ± 0.0
C5 50 mg/kg	330.1 ± 63.1	197.8 ± 28.7	140.9 ± 8.0*	145.9 ± 16.6	12.0 ± 2.8	114.1 ± 3.7
C5 100 mg/kg	277.2 ± 54.4	195.6 ± 16.9	174.3 ± 20.9	105.1 ± 13.3	31.1 ± 9.5	110.8 ± 5.8
Pioglitazone 5mg/kg	243.4 ± 57.1	293.1 ± 56.3	186.1 ± 25.7	111.7 ± 10.7	48.7 ± 11.9	111.0 ± 9.0

Data are mean ± standard deviation.
*Significantly different from positive control, $P<0.05$.
**Significantly different from positive control, $P<0.01$.

아. 조직병리학적 검사

각 군별 간 조직을 현미경으로 관찰한 결과, 양성대조군에서 간세포의 세포질 내에 심각한 지방 축적 및 공포성 변성 소견이 관찰되었으며, 각 용량별 C5 투여군에서는 이러한 소견이 완화된 것으로 관찰되었다(Fig. 4-5). 특히, 50 mg/kg 용량 투여군에서 100 mg/kg 용량 투여군보다 일부 개체간 다소 차이는 있으나 전반적으로 이상 소견의 정도가 감소한 것이 관찰되었다. 이자 및 콩팥 조직을 현미경으로 관찰한 결과, 인슐린을 분비하는 β-cell을 포함하는 이자샘(pancreatic islet) 및 소화효소를 생산하는 이자꽈리(pancreatic acinus)에서 군 간의 특이적인 차이는 관찰되지 않았고, 콩팥조직 또한 콩팥소체(renal corpuscle), 세관(proximal or distal tubule) 및 집합관을 포함하여 콩팥 속질(cortex) 및 겉질(medullar)에서 군 간의 특이적인 차이는 관찰되지 않았다.

[Liver]



[Pancreas]

[Kidney]

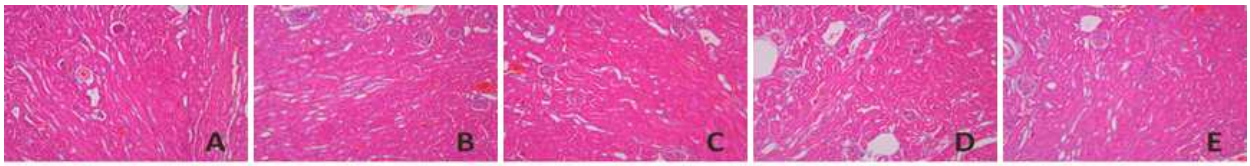


Fig. 4-5. Representative observations of histopathological lesions of liver, pancreas and kidney in C57BLKS/J-*db/m*+ mice (A) and C57BLKS/J-*db/db* mice (B-E). A: Normal control group, B: Positive control group, C: C5 50 mg/kg group, D: C5 100 mg/kg group, E: Pioglitazone 5 mg/kg group.

자. 종합결론

본 시험의 결과에서 정상대조군의 C57BLKS/J-*db/m*+ 마우스와 비교하여 비만형 2 형 당뇨 모델인 C57BLKS/J-*db/db* 마우스는 양성대조군에서 약 40%의 체증증가와 함께 혈당측정 결과 및 포도당내성검사 결과에서 뚜렷하게 혈당이 증가된 것으로 나타났다. 또한, 사료 및 음수섭취량이 약 2배 이상 증가된 것으로 관찰되어 비만형 제 2형 당뇨의 전형적인 임상증상이 관찰된 것과 더불어 간의 조직병리학적 검사결과에서 간조직내 지방침착과 같은 조직병리학적 이상소견이 관찰되었고, 혈액생화학적 검사에서도 간 손상의 지표인 AST와 ALT의 유의한 상승과 총 콜레스테롤을 비롯한 혈중지질 지표의 상승이 관찰되었다. 비교대조군인 5 mg/kg 용량의 piolgitazone 투여군에서 pioglitazone의 대표적인 부작용 중 하나인 체중증가가 관찰되었으나 사료 및 음수섭취량의 감소와 기간별 혈당측정 및 포도당내성검사 결과에서 유의적인 혈당강하가 나타나 당뇨증상이 호전되었음이 확인되었다. 비록 간의 절대 및 상대장기중량이 양성대조군에 비해 유의하게 증가하였으나 이는 체중증가에 따라 신체내부의 장기도 크기가 증가하였기에 나타나는 것이고, 더불어 상대장기중량이 증가한 것은 pioglitazone에 의한 인슐린 저항성 개선으로 간에 포도당을 비롯한 에너지 영양원이 다량 축적되었기 때문인 것으로 사료된다.

C5 투여군은 50 mg/kg 용량에서 양성대조군과 비교하여 혈당측정 및 포도당내성검사 결과에서 주목할 만한 혈당 감소가 관찰되지 않았고, 체중을 비롯한 사료 및 음수섭취량에서 주목할 만한 차이가 관찰되지 않아 당뇨증상을 개선하는데 특이적인 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다. 다만 혈중 총 콜레스테롤이 유의하게 감소한 것과 간 조직의 조직병리학적 이상 소견이 다소 개선된 것이 흥미로운 점이라 사료된다. 반면, 100 mg/kg 용량에서는 양성대조군과 비교하여 투여기간 동안 약 30% 가량의 평균 음수섭취량을 감소시켰고, 특히 투여 7주 및 9주차에서 평균 혈당을 통계학적으로 유의하게 강하시켰으며, 포도당내성검사 결과에서 비록 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았으나 전반적으로 혈당 상승을 시점별로 약 14~23% 감소시킴으로써 당뇨증상을 개선시키는데 효과적인 것으로 사료된다. 혈중 인슐린 측정결과에서 양성대조군과 비교하여 5 mg/kg 용량의 pioglitazone 투여군의 평균 혈중인슐린 농도가 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았으나 약 3.7배 월등히 상승된 것은 pioglitazone의 장기간 투여에 의한 효과이며, 50 및 100 mg/kg 용량의 C5 투여군에서 주목할 만한 차이가 관찰되지 않은 것으로 보아 C5가 인슐린 분비에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 50 및 100 mg/kg 용량의 C5 투여군에서 양성대조군과 비교하여 일반증상에서 이상이 관찰되지 않았고, 조직적출 시 육안적으로 확인한 내부 장기의 이상 소견이나 절대 및 상대장기 중량에서 유의할 만한 차이가 관찰되지 않은 점으로 보아 50 및 100 mg/kg 용량의 C5 투여로 인한 독성 징후의 발생 가능성은 미약할 것으로 사료된다.

이상의 결과로, C5는 100 mg/kg 용량 투여는 C57BLKS/J-*db/db* 마우스에서 발생한 혈당 상승과 당뇨와 관련하여 나타나는 음수섭취량 증가를 유의하게 억제시키는 것이 확인되어 제 2형 당뇨 증상을 개선하는데 효과적인 것으로 판단되며, 따라서 제 2형 당뇨병 환자를 위한 건강기능성 식품의 가능성이 높을 것으로 사료된다.

차. 인체적용량 결정

발아 벼로부터 항당뇨 물질을 분리·정제하기 위하여 다양한 방법을 이용하였으며, 동물실험에 사용된 활성분획(GIP-HS_E_H_C5)의 분리공정별 수율을 측정한 결과(Table 4-6), C5는 발아 벼(GIP)에 0.16%, 왕겨와 싹을 포함하는 분획(GIP-HS)에 0.47% 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 에탄올 추출물(GIP-HS_E)과 헥산분획(GIP-HS_E_H)에는 각각 1.64%와 12.10%의 수율을 보였다.

동물실험 결과 C5는 100 mg/kg 용량 투여 시 C57BLKS/J-*db/db* 마우스에서 발생한 혈당 상승과 당뇨와 관련하여 나타나는 음수섭취량 증가를 유의하게 억제시키는 것이 확인되어 제 2형 당뇨 증상을 개선할 수 있는 것으로 나타났다. 동물실험에서 활성을 보인 농도(100 mg/kg/day in mouse)와 FDA Draft Guideline을 바탕으로 인체적용량을 설정하였다. 즉, 마우스의 K_m factor인 3과 성인의 K_m factor인 37을 이용하여 체중이 60 kg인 성인에 대한 1일 C5의 적용량은 486.5 mg으로 나타났다. 발아 벼, 에탄올 추출물 및 헥산분획 등의 수율을 고려하여 각각의 C5 섭취량을 계산한 결과 Table 16과 같이 나타났다.

Table 4-6. Changes in the extraction yields of rough rice and isolated active fractions wigh different isolation procedure for the glucose uptake by 3T3-L1.

Purification steps	Weight (g)	Yield (% of each fraction)						
		GIP	HS	E	H	C5	D3	P3
GIP (4 day)	1,000.000							
After polishing	992.608	99.261						
BR	657.008	65.701						
HS	335.599	33.560						
After grinding of HS	331.352	33.135	98.734					
GIP-HS_E	96.922	9.692	28.880					
GIP-HS_E_H	13.103	1.310	3.904	13.519				
GIP-HS_E_H_C5	1.585	0.158	0.472	1.635	12.096			
GIP-HS_E_H_C5_D3	0.145	0.015	0.043	0.150	1.107	9.149		
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3	0.038	0.004	0.011	0.039	0.290	2.398	26.207	
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1	0.009	0.001	0.003	0.009	0.068	0.562	6.138	23.421

Table 4-7. Changes in the human equivalent dose of rough rice and isolated active fractions with different isolation procedure for improving the anti-diabetic.

Active fraction	Human equivalent dose (g/60 kg/day)	Yield (%)
GIP-HS_E_H_C5	0.4865	
GIP-HS_E_H	4.0220	12.10
GIP-HS_E	29.7502	1.64
GIP-HS	103.0126	0.47
GIP	306.9511	0.16

카. 발아 벼 추출물의 *in vivo* 항당뇨 메커니즘 규명

비만 및 당뇨증상이 나타나지 않는 C57BLKS/J-*db/m+* 마우스(hetero; 정상대조군)와 비교하여 C57BLKS/J-*db/db* 마우스에 9주간 시험물질인 발아 벼 추출물(GIP-HS_E_H_C5, 이하 C5)을 50 mg/kg 및 100 mg/kg 용량으로, 비교물질인 pioglitazone을 5 mg/kg 용량으로 각각 경구투여하고, 각 동물의 골격근육을 채취하여 세포의 인슐린 저항성 기전과 관련된 단백질의 발현정도를 비교함으로써 시험물질이 이에 미치는 영향을 확인하였다. 결과로서 각 군별 IRS1의 발현량에 대해 정상혈당을 유지하는 정상대조군의 발현량을 100%로 하였을 때와 비교해보면 시험물질 및 비교물질을 투여하지 않은 C57BLKS/J-*db/db* 마우스(음성대조군)에서 31% 수준으로 발현량이 낮은 것으로 확인되었고, C5 100 mg/kg 투여군은 81% 수준으로 발현량이 증가한 것으로 확인되었다(Fig. 4-6, 4-7). pIRS의 발현량은 정상대조군(100%)과 비교하여 음성대조군에서는 큰 차이가 관찰되지 않았으나 C5 50 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군에서 각각 127% 및 142%로 발현량이 용량의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었다(Fig. 4-6, 4-7). PI3K의 발현량은 정상대조군(100%)과 비교하여 음성대조군에서 165%로 발현량이 다소 증가한 것으로 관찰되었으며, C5 50 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 190% 및 301%로 발현량이 더욱 큰 폭으로 증가한 것이 관찰되었다(Fig. 4-6, 4-8). PI3K의 증가로 인하여 Akt 및 pAkt 또한 GRE-C5의 투여로 인하여 증가하는 경향이 관찰되었는데, Akt 발현량은 정상대조군(100%)과 비교하여 음성대조군에서 78%의 수준으로 낮은 발현량을 나타낸 것에 대해 C5 50 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군에서 각각 97% 및 108%로 발현량이 높아진 것으로 확인되었고, pAkt 발현량은 정상대조군(100%)과 비교하여 음성대존군에서 50%의 수준으로 낮은 발현량을 나타낸 것에 대해 C5 50 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군에서 각각 105% 및 180%로 발현량이 높아진 것이 확인되었다(Fig. 4-6, 4-8). Akt는 세포내에서 활성화되면 세포막에 인접한 부위로 이동하는 현상이 관찰되는데, 각 군별 근육세포에 Akt를 면역형광염색한 결과에서 음성대조군과 비교하여 C5 투여군에서 세포막 주변부위에 Akt의 분포가 더욱 높아진 것이 관찰되었고(Fig. 4-9), 각 군별 근육세포에 pAkt를 면역형광염색한 결과에서 음성대조군과 비교하여 C5 투여군에서 세포질 내에 전반적으로 pAkt의 분포가 더욱 높아진 것이 관찰되었다(Fig. 4-10). 혈당의 세포내 이동과 가장 직접적인 관련이 있는 GLUT4 발현량을 정상대조군(100%)과 비교하였을 때, 음성대조군은 65% 수준으로 발현량이 낮은 것으로 확인되었고, C5 50 mg/kg 투여군 및 100 mg/kg 투여군에서 각각 85 및 94%로 발현량이 용량의존적으로 증가하여 정상대조군의 수준에 가까워지는 경향이 관찰되었다 (Fig. 4-6, 4-8). 발현량의 비교뿐만 아니라 면역형광염색에서 관찰한 GLUT4의 발현 위치도 음성대조군에서는 세포막에 상대적으로 가장 낮은 분포가 관찰된 반면, C5 투여군은 용량의존적으로 세포막에서 더 많이 분포하는 것이 관찰되어 근육세포의 세포질 내에서 존재하는 GLUT4가 세포막으로 이동 (translocation)된 것이 확인되었다(Fig. 4-10). pioglitazine 5

mg/kg 투여군은 위에 언급한 모든 단백질들의 발현량이 정상대조군과 유사하거나 높은 것으로 나타났을 뿐만 아니라, 음성대조군과 비교하여 높은 수준의 발현량을 나타내었고, 면역형광염색에서 확인한 발현부위도 각 단백질이 활성화된 상태일 때 세포내에서 위치하는 곳에서 강하게 발현된 것으로 확인되었다(Fig. 4-11).

이상의 결과에서 발아 벼 추출물(C5)의 투여는 비만형 제 2형 당뇨모델인 C57BLKS/J-*db/db* 마우스의 골격근육 내 IRS1/PI3K pathway를 활성화시키고, Akt를 활성화시켜 세포내 포도당 유입 통로인 GLUT4의 발현증가 및 세포막으로 이동하는 것을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 감소시키고, 이로 인하여 혈당 농도를 저하시킴으로써 당뇨증상을 개선하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

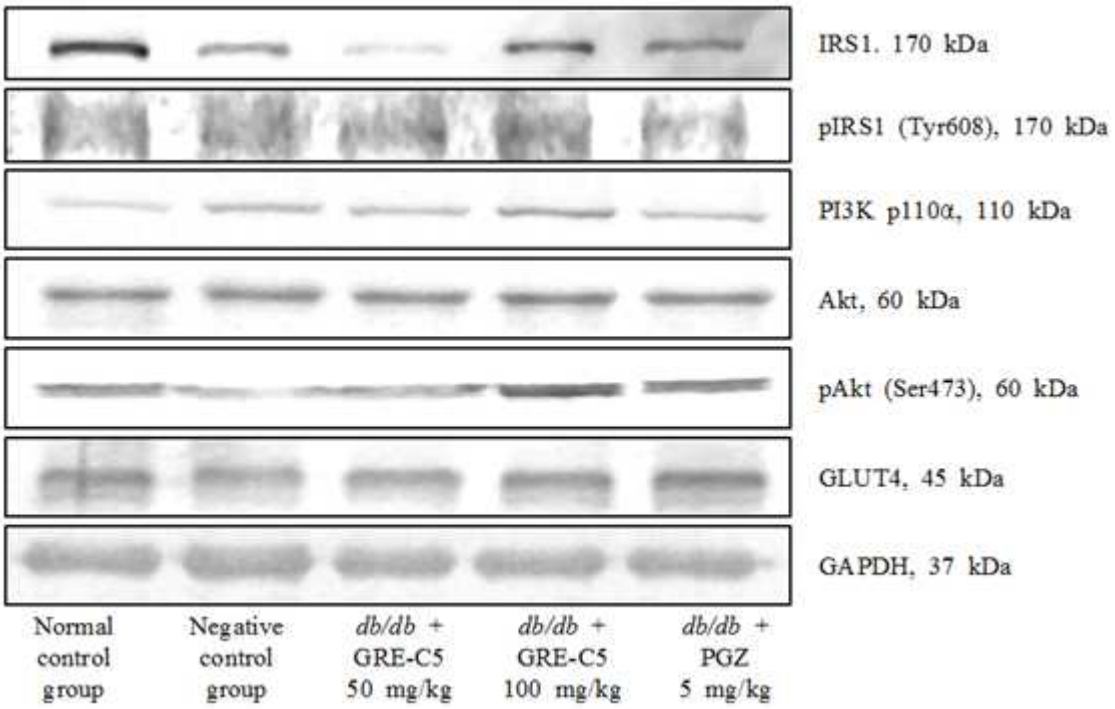


Fig. 4-6. Effects of active fraction from germinated rough rice on the expressions of the insulin receptor substrate 1 (IRS1), phospho-IRS1 (pIRS1) Tyr 608, phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K), Akt, phospho-Akt (pAkt)Ser473, glucose transporter type 4 (GLUT4) and glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) in skeletal muscles of C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. Normal control group: C57BLKS/J-*db/m*+ mice, Positive control group: C57BLKS/J-*db/db* mice, db/db: C57BLKS/J-*db/db* mice.

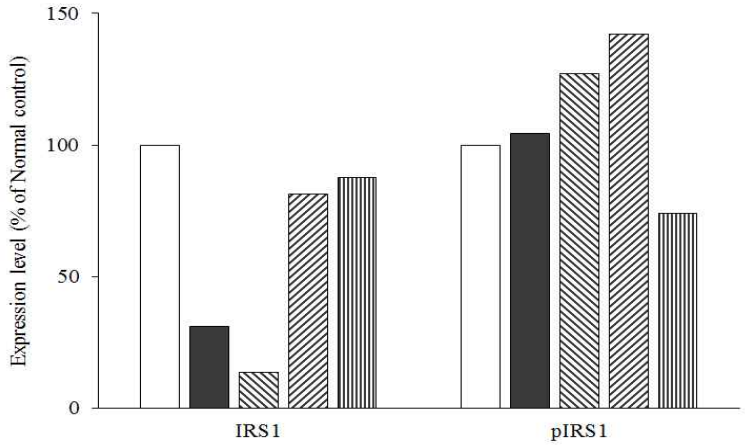


Fig. 4-7. Effects of germinated rice extract C5 fraction (GRE C5) on the expression levels of the insulin receptor substrate 1 (IRS1) and phospho-IRS1 Tyr608 (pIRS1) in skeletal muscles of C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. □: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m+* mice), ■: Positive control group (C57BLKS/J-*db/db* mice), ▧: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 50 mg/kg group, ▨: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 100 mg/kg group, ▥: C57BLKS/J-*db/db* mice + Pioglitazone 5mg/kg group.

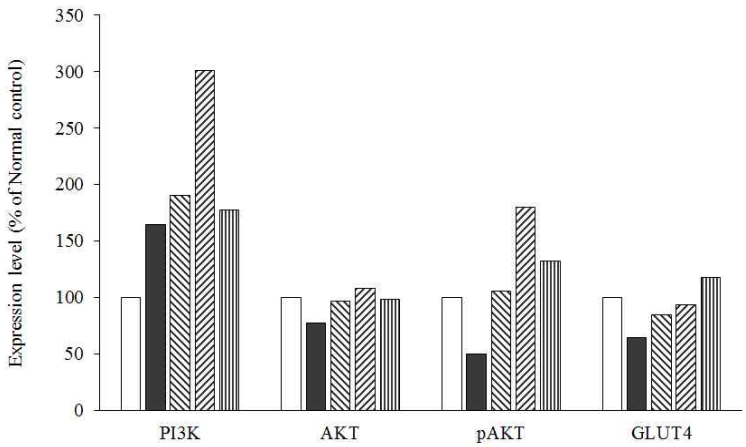


Fig. 4-8. Effects of germinated rice extract C5 fraction (GRE C5) on the expression levels of phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K), Akt, phospho-Akt Ser473 (pAkt) and glucose transporter type 4 (GLUT4) in skeletal muscles of C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. □: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m+* mice), ■: Positive control group (C57BLKS/J-*db/db* mice), ▧: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 50 mg/kg group, ▨: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 100 mg/kg group, ▥: C57BLKS/J-*db/db* mice + Pioglitazone 5mg/kg group.

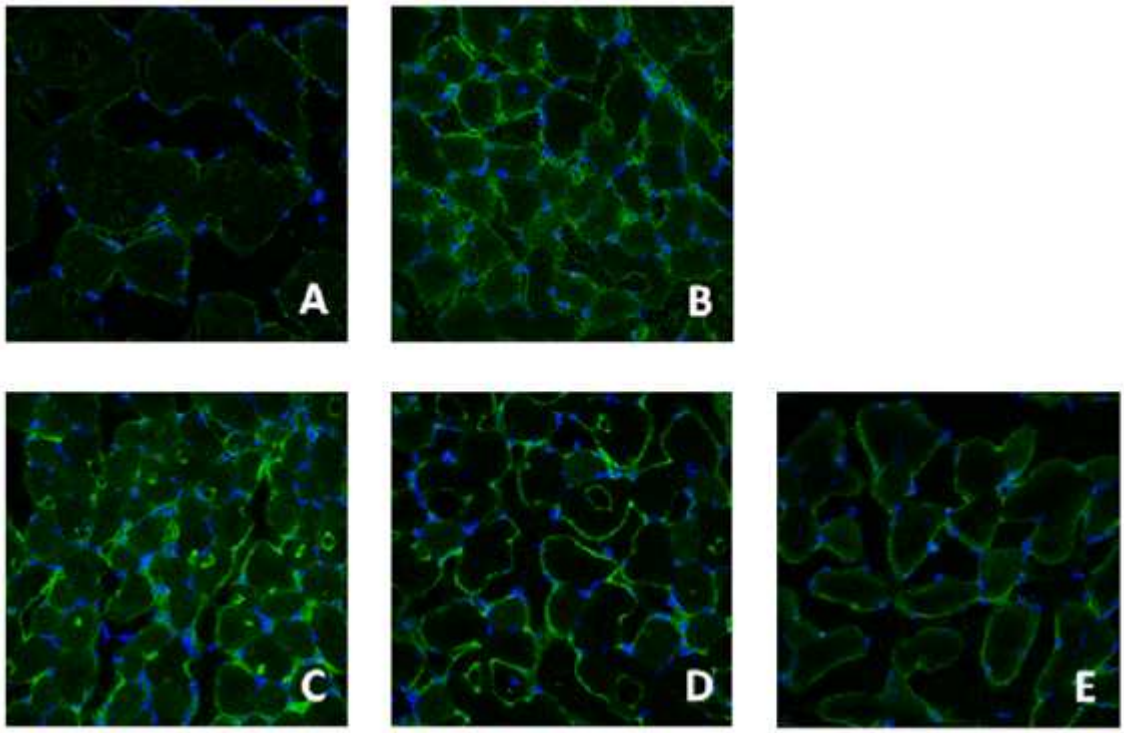


Fig. 4-9. Representative observations of skeletal muscles stained with Fluorescein sothiocyanate (FITC) for Akt in C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. A: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m*+ mice), B: Positive control group (C57BLKS/J-*db/db* mice), C: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 50 mg/kg group, D: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 100 mg/kg group, E: C57BLKS/J-*db/db* mice + Pioglitazone 5mg/kg group. Green (FITC): Akt, Blue (DAPI): nucleus.

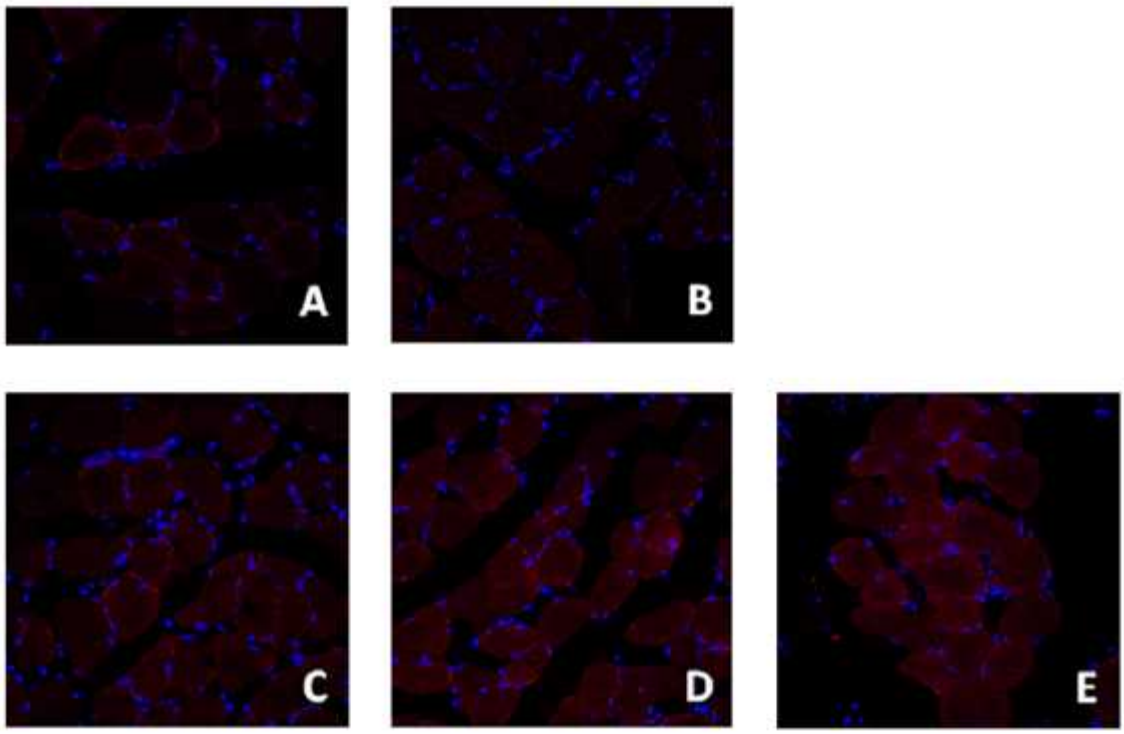


Fig. 4-10. Representative observations of skeletal muscles stained with rhodamine for phospho-Akt ser473 (pAkt) in C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. A: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m*+ mice), B: Positive control group (C57BLKS/J-*db/db* mice), C: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 50 mg/kg group, D: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 100 mg/kg group, E: C57BLKS/J-*db/db* mice + Pioglitazone 5mg/kg group. Green (FITC): Akt, Blue (DAPI): nucleus.

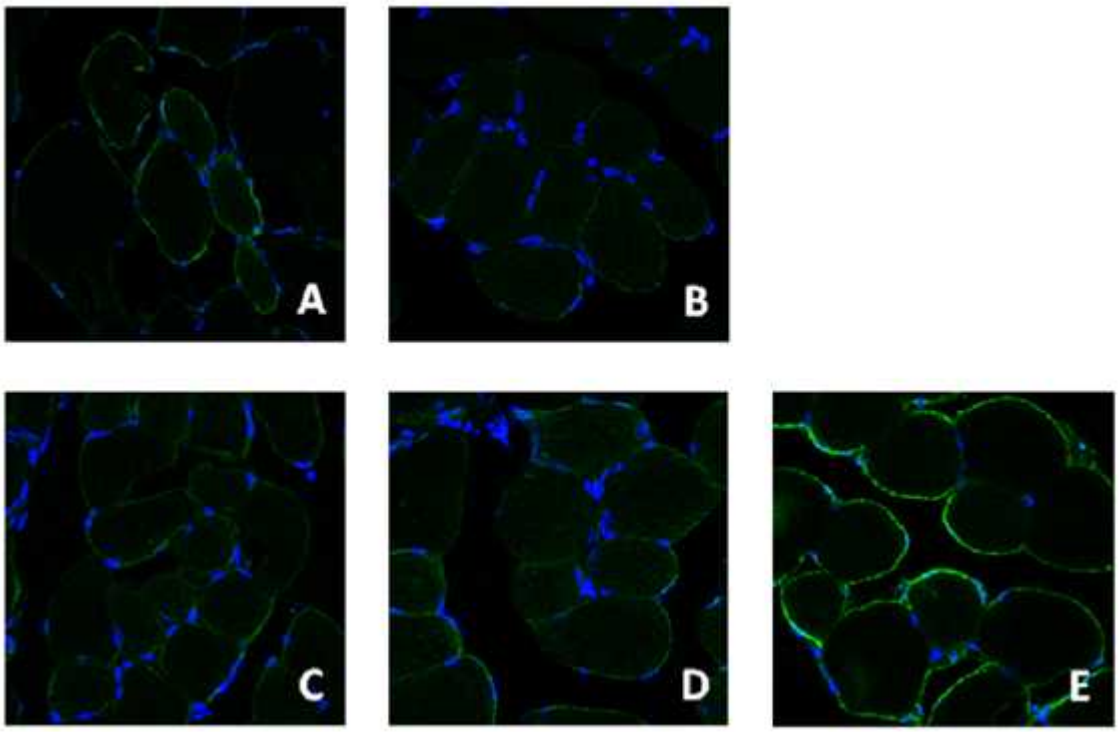


Fig. 4-11. Representative observations of skeletal muscles stained with Fluorescein isothiocyanate (FITC) for glucose transporter type 4 (GLUT4) in C57BLKS/J-*db/db* mice or C57BLKS/J-*db/db* mice. A: Normal control group (C57BLKS/J-*db/m*+ mice), B: Positive control group (C57BLKS/J-*db/db* mice), C: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 50 mg/kg group, D: C57BLKS/J-*db/db* mice + GRE-C5 100 mg/kg group, E: C57BLKS/J-*db/db* mice + Pioglitazone 5mg/kg group. Green (FITC): Akt, Blue (DAPI): nucleus.

제5절 항당뇨 물질 고함유 벼의 발아 및 추출조건 확립

1. 연구방법

가. 실험재료 및 발아조건 설정

본 실험에 사용된 벼는 2011년도에 전북 군산에서 생산된 신동진과 충북 증평에서 생산된 한국산의 일반 벼 품종인 일품을 각각 구매하여 실험에 사용하였다. 신동진은 충남 이남 내륙평야지대의 1, 2모작지에서 잘 자라는 중만생종의 벼 품종으로, 아밀로스 함량 및 호화온도가 낮으며, 단백질 함량은 7.6%, 아밀로스 함량은 18.6%이다. 벼의 수량성은 596 kg/10 a이고 현미 천립중량은 27.7 g이다. 고 질소비료 과용 시 도복 우려가 있으며, 쌀의 경도가 낮아 도정률이 떨어질 수 있고 수발아성이 약하므로 적기 수확 및 건조에 유의하여야 한다. 일품은 중부 평야지 및 남부 내륙중간지에서 자라는 중만생종의 벼로, 쌀알은 짧고 둥글면서 아밀로스함량과 호화온도가 낮아 밥이 찰기가 있고 맛이 좋다. 단백질 함량은 6.4%이고, 아밀로스 함량은 18.9%이다. 수량성은 534 kg/10 a이며, 현미 천립중량은 21.3 g으로 신동진보다 낮은 편이다.

발아는 일품과 신동진 각각 500 g을 20℃의 물로 수세하고 3일간 침지시킨 다음 발아실에서 발아시켰다. 발아 온도는 32, 35 및 37℃, 습도는 85%를 유지시키면서 발아시켰으며, 물은 1일 1회씩 교환해주었고, 1일 3회씩 10분간 물주기를 하면서 발아시켰다. 발아기간은 1~4일로 하였고, 발아시키지 않은 벼를 대조구로 하였다. 발아된 벼는 50℃의 열풍건조기 에서 2일간 건조시켜 실험재료로 사용하였다.

나. 부위별 분리 및 추출조건 설정

건조된 무발아 및 발아 벼는 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨와 싹을 혼합한 분획(hull & sprout; HS)과 현미(Brown rice; BR)로 나누어 분리한 뒤, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄한 후 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 최적 발아조건으로 선정된 발아온도와 일수에서 제조된 발아 벼로부터 항당뇨 활성물질의 추출수율을 높이기 위하여 최적 추출조건을 선정하고자 하였다. 추출수율에 영향을 줄 수 있는 변수인 추출용매, 온도 및 시간은 산업적으로 이용이 가능한 범위에서 설정하였다. 즉, 추출용매는 물과 80% 에탄올을 사용하였으며, 추출온도는 60, 70 및 80℃로 설정하였으며, 추출시간은 3시간으로 고정하였다. 각 조건에 의해 제조된 추출물의 추출수율과 항당뇨 활성물질의 함량을 측정하였다. 건조된 무발아 및 발아 벼의 HS 분획과 BR 분획 분말 20 g에 400 mL의 n-hexane을 가하고 shaking water bath를 이용하여 30℃에서 12시간 교반(400 rpm) 추출하였다. 이 추출액을 감압여과한 후 여과잔사에 다시 추출용매 400 mL을 가하고 2시간씩 2회 반복 추출하여 얻은 추출액을 여과하고 용매를 완전히 제거하여 총지질(total lipid)을 추출하였다.

다. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu phenol reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(Dewanto, Xianzhong & Liu, 2002). 즉 각 추출물 100 μL에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분 동안 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μL 를 가하고 30분 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. 표준물질인 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 g 중의 mg gallic acid로 나타내었다.

라. 페놀산 추출 및 분석

분말시료 4 g에 80% methanol 40 mL을 가한 후 초음파 추출장치에서 1시간씩 3회 추출하였다. 추출액을 여과지로 여과하고 여과액을 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 농축건조된 시료를 10% methanol 5 mL에 재용해시킨 후 10 mL의 diethyl ether : ethyl acetate (1:1) 혼합액으로 3회 분획한 후 감압농추기로 용매를 완전히 제거하였다. 농축건조된 시료를 methanol에 재용해한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 함량 분석에 사용하였다. 활성물질의 정량분석은 HPLC system(Acme 9100 series)를 사용하였다. 즉, 분석에 사용된 칼럼은 ODS column (5 μm, 46×250 mm, Agilent Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, USA)을 사용하였으며, 0.1% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 용출용매 (A)로, 0.1% acetic acid가 함유된 water를 용출용매 (B)로 설정한 후 A와 B의 비율을 초기에 8 : 92, 2분까지 10 : 90, 27분까지 30 : 70, 50분까지 90 : 10, 51분까지 100 : 0, 60분까지 100 : 0, 70분까지 8 : 92로 설정하였다. 메탄올에 재용해시킨 활성분획을 10 μL 주입한 후 전개용매를 1.0 mL/min의 유속으로 용출시켰으며, 280 nm에서 검출하였다.

마. 지방산 조성 분석

지방산 분석은 시료 0.5 g에 반응시약(methanol:heptane:bezene:2,2-dimethoxypropane: H_2SO_4 = 37:36:20:5:2 (v/v)) 2 mL을 넣고 80℃에서 20분간 반응시킨 후 상등액을 질소 농축하여 hexane에 용해시켜 지방산 분석용 시료로 사용하였다. 지방산 분석은 Gas chromatography (Agilent 6850 GC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, 칼럼은 Varian VF-WaxMS (30m × 300 μm, 0.25 μm, Varian, Palo Alto, CA, USA), 검출기는 flame ionization detector를 사용하였다. 분석조건은 주입구 온도 250℃, 검출기 온도 300℃로 하였으며, 오븐 온도 120℃에서 5분간 유지한 후 분당 10℃씩 230℃까지 올려 20분간 유지하였다. Carrier gas는 N_2 (99.999%)를 사용하였으며, 유속은 1.3 mL/min, 주입량은 1 μL이었고, split ratio는 10:1 비율로 하였다. 표준물질로는 myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, conjugated linoleic acid (9c,11t 및 10t,12c)를 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였으며 지방산 조성은 peak area의 상대적인 비로 나타내었다.

바. 비검화물 분획 제조

시료 2 g을 검화 용기에 정확히 칭량하여 담은 후 30 mL의 methanol과 10 mL의 10 M KOH를 넣고 90℃에서 60분간 검화시켰다. 검화가 완료된 후 완전히 냉각시켜 분액깔때기에 옮기고 50 mL의 증류수로 검화 용기를 완전히 세척하였다. 검화액에 50 mL의 diethyl ether를 이용하여 3회 분액을 실시한 후 ether 분획을 50 mL의 증류수로 세척하였다. Ether 분획에 무수 황산나트륨을 가하여 수분을 제거하고 감압 및 질소 농축하여 포도당 유입활성 및 분석시료로 사용하였다.

사. 감마오리자놀(γ-Oryzanol) 함량 분석

감마오리자놀 함량 분석은 시료 2 g을 50 mL tube에 담고 dichloromethane과 methanol 혼합용매(2:1, v/v)를 40 mL 첨가하여 30분간 초음파로 추출하였다. 그 다음 10분간 원심분리(3,000 rpm)한 후 상층액 만을 취해 여과지(Whatman No. 2)로 여과시켰다. 침전물에 추출용매 30 mL과 20 mL를 순차적으로 처리하여 상기 추출방법을 2회 반복한 다음 수집된 최종 여과액을 질소 농축하였다. 농축물을 isoprpanol 1 mL로 용해시킨 후 syringe filter (PVDF, 0.45 ㎛)로 여과하여 HPLC (Acme 9000 system, Younglin, Anyang, Korea) 분석에 사용하였다. 칼럼은 Mightysil RP-18 GP column (4.6×250 mm, 5 μm, Denwato, Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 이동상은 methanol : acetonitrile : dichloromethane:acetic acid를 50 : 44 : 3 : 3의 비로 혼합한 단일 용매를 이동상으로 사용하여 50분간 분석 하였으며, 유속은 1.4 mL/min, 주입량은 20 μL, 검출기는 UV detector로 325 nm 파장에서 분석하였다.

아. 식물스테롤(phytosterol) 함량 분석

시료의 total phytosterol과 free phytosterol은 각각 비검화물과 총지질을 이용하여 분석하였다. 즉, 적정농도로 chloroform에 재용해된 비검화물과 총지질 용액 0.1 mL에 0.6 mL의 acetic acid와 0.4 mL의 2.5% ferric chloride를 가한 후 균질화시키고 암소에서 10분간 반응시켰다. 반응이 종료된 후 반응액 0.2 mL을 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 β-sitosterol을 사용하였으며, 각 분획물에 함유된 total 및 free phytosterol을 β-sitosterol 당량으로 나타내었다.

자. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA (Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$). 또한 요인들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis로 분석하였다.

2. 연구결과

가. 발아에 따른 성상 및 에탄올 추출수율 변화

(1) 발아조건에 벼의 따른 싹 길이와 발아율 변화

신동진과 일품 벼를 20℃의 상수에서 3일간 침지 후, 발아온도 32, 35 및 37℃에서 4일 동안 발아시키면서, 각각의 싹 길이와 발아율을 측정한 결과는 Table 5-1~5-3과 같다. 32℃처리시 신동진은 싹 길이 1.8~2.2 cm, 발아율 90%로 나타났고, 일품은 싹 길이 1.6~2.1 cm, 발아율 85%로 신동진의 싹 길이와 발아율이 더 높은 것으로 나타났다. 35℃처리시 신동진은 싹 길이 1.7~2.5 cm, 발아율 93%로 나타났고, 일품은 싹 길이 1.6~2.3 cm, 발아율 90%로 신동진의 싹 길이와 발아율이 더 높은 것으로 나타났다. 37℃처리시 신동진은 싹 길이 1.7~2.8 cm, 발아율 95%로 나타났고, 일품은 싹 길이 1.7~2.5 cm, 발아율 92%로 나타나, 이 경우에도 신동진의 싹 길이와 발아율이 더 높은 것으로 나타났다. 신동진과 일품을 20℃의 상수에서 3일간 침지 후, 발아온도 32℃, 35℃ 및 37℃에서 4일 동안 각각 발아를 시키면서, 싹 길이와 발아율을 측정한 결과, 신동진은 4일간 발아시 싹길이는 1.7~2.8cm, 발아율은 90~95%로 나타났고, 일품의 싹 길이는 1.6~2.5cm, 발아율은 85~92%로, 전체적으로 볼 때 신동진의 싹 길이와 발아율이 더 높은 것으로 나타났다.

Table 5-1. Changes in the sprout length and germination raito of *Shindongjin* and *Ilpum* rough rice with different germination time at 32℃.

Varieties \ Time		0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
Sindongjin	Shape					
	Sprout length		0.5~0.8cm	0.8~1.2cm	1.3~1.7cm	1.8~2.2cm
	Germination ratio		25%	60%	85%	90%
Ilpum	Shape					
	Sprout length		0.4~0.7cm	0.8~1.1cm	1.1~1.5cm	1.6~2.1cm
	Germination ratio		15%	35%	70%	85%

Table 5-2. Changes in the sprout length and germination raito of *Shindongjin* and *Ilpum* rough rice with different germination time at 35℃.

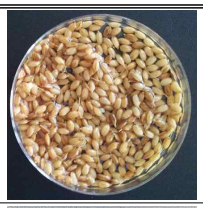
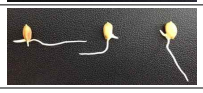
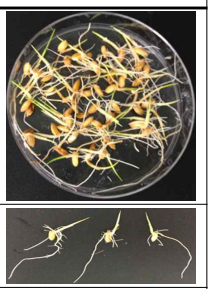
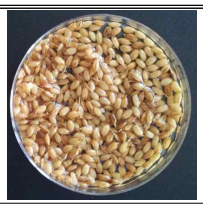
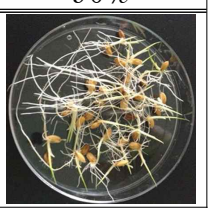
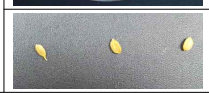
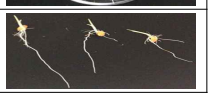
Varieties \ Time		0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
Sindongjin	Shape					
	Sprout length		0.4~0.9cm	0.8~1.2cm	1.1~1.8cm	1.7~2.5cm
	Germination ratio		30%	65%	85%	93%
Ilpum	Shape					
						
	Sprout length		0.4~0.8cm	0.7~1.2cm	1.1~1.7cm	1.6~2.3cm
	Germination ratio		25%	45%	75%	90%

Table 5-3. Changes in the sprout length and germination raito of *Shindongjin* and *Ilpum* rough rice with different germination time at 37℃.

Varieties \ Time		0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
Sindongjin	Shape					
	Sprout length		0.5~0.8cm	0.8~1.2cm	1.3~1.7cm	1.8~2.2cm
	Germination ratio		25%	60%	85%	90%
Ilpum	Shape					
						
	Sprout length		0.4~0.7cm	0.8~1.1cm	1.1~1.5cm	1.6~2.1cm
	Germination ratio		15%	35%	70%	85%

(2) 왕겨와 싹을 포함하는 분획의 추출수율 변화

항당뇨 활성물질을 다량 함유할 수 있는 발아조건을 선정하기 위하여 발아온도(32, 35 및 37℃)와 발아기간(0~4일)에 따른 신동진과 일품 발아 벼를 제조한 후 항당뇨 활성이 높았던 왕겨와 싹을 포함하는 분획(hull & sprout; HS 분획)을 정미기로 분획하여 에탄올 추출하였을 때 추출수율은 Table 5-4와 같이 나타났다. 신동진의 경우 전곡(control)과 3일간 침지시킨 벼(soaked)의 추출수율이 각각 5.12%와 5.17%로 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 일품 역시 전곡과 침지벼의 추출수율이 각각 5.24%와 5.34%로 유사하게 나타났다($p>0.05$). 그러나 발아기간이 길어질수록 추출수율은 증가하는 경향을 보였으며, 발아온도가 높을수록 추출수율은 증가하는 것으로 나타났다. 또한 전반적인 추출수율은 신동진보다 일품벼이 높게 나타났으며, 각 품종별 가장 높은 추출수율을 보였던 37℃/4일 발아시킨 벼의 추출수율이 각각 15.62%와 16.69%로 일품에서 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$).

Table 5-4. Changes in the ethanol extraction yields of hull & sprout with different germination temperatures and times.

Treatment		Extraction yield (%)	
Temp. (℃)	Time (day)	*Shindongjin*	*Ilpum*
Control		5.12 ± 0.20^{j}	5.24 ± 0.10^{j}
Soaked (0 day)		5.17 ± 0.10^{j}	5.34 ± 0.05^{j}
32	1	6.12 ± 0.12^{i}	6.67 ± 0.12^{i}
	2	6.71 ± 0.18^{h}	7.22 ± 0.11^{h}
	3	7.57 ± 0.36^{g}	8.20 ± 0.14^{g}
	4	9.09 ± 0.17^{e}	11.13 ± 0.16^{e}
35	1	7.74 ± 0.23^{fg}	8.17 ± 0.16^{g}
	2	8.24 ± 0.08^{f}	9.65 ± 0.10^{f}
	3	11.83 ± 0.32^{c}	12.21 ± 0.28^{d}
	4	13.49 ± 0.25^{b}	14.52 ± 0.28^{b}
37	1	10.72 ± 0.53^{d}	11.31 ± 0.34^{e}
	2	10.93 ± 0.71^{d}	12.84 ± 0.35^{c}
	3	13.20 ± 0.22^{b}	14.60 ± 0.25^{b}
	4	15.62 ± 0.29^{a}	16.69 ± 0.32^{a*}

$^{*}p<0.05$ indicates significant differences between groups by Student's t-test.

$^{a-c}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

나. 발아조건에 따른 페놀산 함량 변화

(1) 왕겨와 싹을 포함하는 분획의 총 폴리페놀 함량

세부과제의 연구결과 3T3-L1 지방세포 지방세포를 이용하여 포도당 유입활성을 평가함으로써 항당뇨 물질을 탐색한 결과 페놀산으로 추정되었기 때문에 페놀산을 다량 함유할 수 있는 발아조건을 선정하고자 하였다. 발아온도(32, 35 및 37℃)와 발아기간(0~4일)에 따른 신동진과 일품 발아 벼를 제조한 후 항당뇨 활성이 높았던 왕겨와 싹을 포함하는 분획(hull & sprout; HS 분획)을 정미기로 분획의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 5-5와 같다. 신동진의 경우 전곡(control)과 3일간 침지시킨 벼(soaked)의 총 폴리페놀 함량이 각각 1.25 mg/g와 1.40 mg/g로 나타났으며, 일품 역시 전곡과 침지 벼의 총 폴리페놀 함량이 각각 1.73 mg/g와 1.87 mg/g로 침지시킨 벼가 높게 나타났다($p<0.05$). 또한 발아기간이 길어질수록 총 폴리페놀 함량은 증가하는 경향을 보였으며, 발아온도가 높을수록 함량은 증가하는 것으로 나타났다. 또한 전반적인 총 폴리페놀 함량은 신동진보다 일품이 높게 나타났으며, 각 품종별 가장 높은 함량을 보였던 37℃/4일 발아시킨 벼의 함량이 각각 4.45%와 4.63%로 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 함량이 비교적 높게 나타났던 35℃/4일차, 37℃/3-4일차에서는 일품 발아 벼에서 유의적으로 높은 총 폴리페놀 함량을 보였다($p<0.05$).

Table 5-5. Changes in the total polyphenol content of hull & sprout with different germination temperatures and times.

Treatment		Total polyphenol content (mg/g)	
Temp. (℃)	Time (day)	*Shindongjin*	*Ilpum*
Control		1.25 ± 0.01^{i}	1.73 ± 0.06^{k}
Soaked (0 day)		1.40 ± 0.10^{hi}	1.87 ± 0.06^{j}
32	1	1.49 ± 0.06^{h}	2.37 ± 0.03^{i}
	2	1.68 ± 0.07^{g}	2.59 ± 0.04^{h}
	3	2.36 ± 0.08^{e}	2.92 ± 0.05^{g}
	4	2.61 ± 0.12^{d}	3.18 ± 0.07^{f}
35	1	1.89 ± 0.10^{f}	2.70 ± 0.02^{h}
	2	2.29 ± 0.05^{e}	3.47 ± 0.10^{e}
	3	2.77 ± 0.11^{d}	3.71 ± 0.07^{d}
	4	3.39 ± 0.14^{c}	4.19 ± 0.08^{c**}
37	1	2.43 ± 0.04^{e}	3.16 ± 0.07^{f}
	2	3.22 ± 0.17^{c}	3.61 ± 0.17^{d*}
	3	3.87 ± 0.06^{b}	4.34 ± 0.12^{b**}
	4	4.45 ± 0.23^{a}	4.63 ± 0.06^{aNS}

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test. $^{a-k}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(2) 발아조건에 따른 페놀산의 함량 변화

발아온도(32, 35 및 37℃)와 발아기간(0~4일)에 따른 신동진과 일품 발아 벼를 제조한 후 항당뇨 활성이 높았던 왕겨와 싹을 포함하는 분획(hull & sprout, HS 분획)을 정미기로 분획하여 메탄올 추출 및 에테르와 에틸아세테이트 혼합용매로 분획하여 얻어진 페놀산 농축물에 대하여 HPLC를 이용하여 구성 페놀산을 분석하였다. 분석결과 14종의 페놀산이 검출되었으며(gallic acid, chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, coumaric acid, rutin, ferulic acid, salicylic acid, naringin, hesperidin, myricetin, cinnamic acid, naringenin 및 kaemperol), 이 중 *in vitro* 및 *in vivo* 항당뇨 효능 평가에서 활성을 나타냈다고 다수 보고된 caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid 및 cinnamic acid를 정량분석하여 그 함량으로 발아조건을 선정하고자 하였다.

신동진의 발아조건에 따른 주요 페놀산 함량 변화는 Table 5-6과 같다. Caffeic acid의 경우 전곡(control)과 3일간 침지시킨 벼(soaked)에서 0.73 및 0.77 μg/g의 유사한 함량을 보였으며, 발아기간 및 발아온도에 따라 증가하여 37℃/4일 발아 시 3.48 μg/g으로 증가하였다. *p*-Coumaric acid의 경우에도 전곡과 침지벼에서 각각 3.44 및 4.15 μg/g으로 유사한 함량을 보였으나, 발아온도에 따라 증가하였지만, 37℃에서 발아 시 4일차에 감소하는 경향을 보였으며, 2일차와 3일차에 각각 10.97 및 20.73 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. Ferulic acid의 경우에도 전곡과 침지 벼에서 각각 3.08 및 3.75 μg/g으로 유사하게 나타났으며, 발아온도에 따라서는 증가하였으나 모든 온도처리구에서 발아 4일차에 감소하는 경향을 보였으며, 37℃/2일차에서 26.77 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 세부과제의 항당뇨 활성물질 분리과정에서 최종 활성분획에 함유되어 있는 것으로 나타난 cinnamic acid의 경우 전곡과 침지 벼에서 각각 11.74 및 13.92 μg/g으로 유사하게 나타났으나, 발아온도와 발아기간이 증가함에 따라 그 함량이 증가하는 경향을 보였지만 37℃에서 발아 시 4일차에 다소 감소하였으며, 3일차에서 90.86 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다.

일품의 발아조건에 따른 주요 페놀산 함량 변화는 Table 5-7과 같다. Caffeic acid의 경우 발아온도와 발아기간에 따라 대체적으로 증가하는 경향을 보였지만 35℃/3일차에 5.96 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였으며, 37℃에서 발아 시 감소하는 경향을 보였다. *p*-Coumaric acid의 경우에도 높은 발아온도 처리구에서 높은 함량을 보였으나, 32℃와 37℃에서 발아 시 4일차에 함량이 감소하는 경향을 나타냈고, 37℃/3일차에 22.16 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. Ferulic acid의 경우에도 발아온도와 기간에 따라 coumaric acid와 유사하게 함량 변화가 나타났으며, 37℃/2일차에서 49.55 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. Cinnamic acid의 경우 대체적으로 발아온도와 기간에 따라 증가하는 경향을 보였으나, 35℃와 37℃ 발아 4일차에 다소 감소하는 경향을 보여 37℃/3일차에서 110.75 μg/g으로 가장 높은 함량을 보였다.

신동진과 일품을 비교하였을 때, 4종 주요 페놀산 모두 일품 발아 벼에서 함량이 보다 높게 나타났으며, 각 페놀산의 최대 함량을 보인 발아조건은 동일하게 나타났다. 따라서 **주요 페놀산의 함량이 높게 나타난 발아온도 37℃, 발아기간 3일을 최적 발아조건으로 선정하였다.**

Table 5-6. Changes in major phenolic compounds content of hull & sprout from *Shindongjin* with different germination temperatures and times.

Treatment		Caffeic acid	*p*-Coumaric acid	Ferulic acid	*trans*-Cinnamic acid
Temp. (℃)	Time (day)				
Control		0.73^{k}	3.44^{j}	3.08^{ai}	11.74^{j}
Soaked (0 day)		0.77^{k}	4.15^{j}	3.75^{ai}	13.92^{j}
32	1	0.92^{j}	5.60^{i}	5.46^{h}	19.18^{i}
	2	1.10^{i}	6.80^{h}	7.05^{g}	26.40^{h}
	3	1.68^{g}	9.57^{g}	15.44^{d}	42.62^{f}
	4	2.03^{e}	12.16^{e}	12.51^{f}	45.10^{ef}
35	1	1.37^{h}	6.82^{h}	7.57^{g}	31.35^{g}
	2	2.04^{e}	10.94^{f}	13.08^{ef}	45.08^{ef}
	3	2.96^{c}	15.69^{c}	22.42^{b}	65.31^{d}
	4	3.28^{b}	20.73^{b}	16.20^{d}	70.37^{c}
37	1	1.87^{f}	14.91^{c}	13.94^{e}	46.96^{e}
	2	2.80^{d}	21.97^{a}	26.77^{a}	70.72^{c}
	3	3.31^{b}	21.84^{a}	23.06^{b}	90.86^{a}
	4	3.48^{a}	13.78^{d}	19.74^{c}	77.84^{b}

Unit : μg/g hull & sprout, $^{a-k}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

Table 5-7. Changes in major phenolic compounds content of hull & sprout from *Ilpum* with different germination temperatures and times.

Treatment		Caffeic acid	*p*-Coumaric acid	Ferulic acid	*trans*-Cinnamic acid
Temp. (℃)	Time (day)				
Control		1.11^{m}	3.78^{k}	6.66^{l}	25.45^{k}
Soaked (0 day)		1.20^{l}	4.40^{j}	7.37^{l}	31.25^{j}
32	1	1.56^{k}	7.25^{i}	10.26^{k}	44.49^{i}
	2	1.98^{j}	8.14^{h}	19.49^{h}	50.69^{h}
	3	2.25^{h}	9.64^{f}	23.46^{e}	66.26^{f}
	4	2.60^{g}	9.19^{g}	16.20^{j}	67.58^{f}
35	1	2.12^{i}	8.98^{g}	17.72^{i}	54.87^{g}
	2	3.09^{f}	13.28^{e}	20.58^{g}	78.75^{e}
	3	5.96^{a}	16.35^{c}	32.02^{b}	99.23^{bc}
	4	4.27^{b}	17.50^{b}	22.29^{f}	98.09^{c}
37	1	2.53^{g}	14.83^{d}	27.38^{d}	66.65^{f}
	2	3.38^{e}	17.51^{b}	49.55^{a}	101.64^{b}
	3	3.84^{d}	22.16^{a}	29.91^{c}	110.75^{a}
	4	3.93^{c}	17.85^{b}	31.51^{b}	89.02^{d}

Unit : μg/g hull & sprout, $^{a-k}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

다. 추출조건에 따른 총 폴리페놀 및 페놀산 함량 변화

발아 벼로부터 항당뇨 물질의 추출수율을 높이기 위하여 최적 발아조건으로 선정된 37℃에서 3일간 발아시킨 일품을 이용하여 추출용매 및 추출온도별 추출수율과 총 폴리페놀 함량을 평가하였다. 추출수율의 경우 물 추출이 높게 나타났으며, 추출온도가 증가함에 따라서 추출수율도 증가하였다(Table 5-8). 또한 총 폴리페놀 함량 또한 추출온도가 증가함에 따라서 증가하였지만, 물 추출보다는 80% 에탄올 추출에서 높은 추출수율을 보였다.

또한 세부과제의 연구결과를 바탕으로 추출용매 및 추출온도에 따른 주요 페놀산의 구성을 조사한 결과는 Table 5-9와 같다. 주요 페놀산의 함량은 물 추출보다 80% 에탄올 추출에서 보다 높은 함량을 보였으며, 추출온도에 따라서는 80℃의 고온으로 추출시 그 함량이 감소하는 경향을 보였으나, cinnamic acid는 유사한 함량을 보였다. 따라서 추출수율과 총 페놀산의 수율을 증가시키기 위해서는 80% 에탄올로 80℃에서 추출하는 것이 바람직하나 대부분의 주요 페놀산이 80℃의 고온에서 그 함량이 감소하는 경향을 보였기 때문에 **최적 추출조건은 80% 에탄올을 이용하여 70℃에서 3시간 추출하는 것이 바람직하다고 판단된다.**

Table 5-8. Changes in the extraction yields and total polyphenol content of hull & sprout from *Ilpum* rough rice with extraction solvents and temperatures.

Treatment		Extraction yields (%)	Total polyphenol content (mg/g)
Solvent	Temp. (℃)		
Water	60	12.41 ± 0.28^{c}	1.48 ± 0.04^{e}
	70	14.25 ± 0.09^{b}	2.45 ± 0.10^{d}
	80	16.75 ± 0.07^{a}	3.25 ± 0.08^{c}
80% Ethanol	60	11.50 ± 0.34^{d}	2.33 ± 0.12^{d}
	70	12.60 ± 0.14^{c}	3.53 ± 0.07^{ab}
	80	14.60 ± 0.25^{b}	4.34 ± 0.12^{a}

$^{a-k}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

Table 5-9. Changes in major phenolic compounds content of hull & sprout from *Ilpum* rough rice with different extraction solvents and temperatures.

Treatment		Caffeic acid	*p*-Coumaric acid	Ferulic acid	*trans*-Cinnamic acid
Solvent	Temp. (℃)				
Water	60	0.893^{f}	5.795^{e}	8.978^{e}	34.355^{d}
	70	1.788^{d}	10.823^{c}	21.200^{c}	65.709^{b}
	80	1.640^{e}	9.537^{d}	17.673^{d}	63.314^{b}
80% Ethanol	60	1.896^{c}	11.130^{c}	20.548^{c}	50.026^{c}
	70	3.320^{a}	17.184^{a}	48.628^{a}	99.763^{a}
	80	2.914^{b}	15.937^{b}	30.887^{b}	99.285^{a}

Unit : μg/g hull & sprout, $^{a-k}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

라. 발아조건에 따른 총지질 함량 변화

발아온도와 기간을 달리하여 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼로부터 지표성분 함량을 측정하기 위하여 총지질을 추출하였으며, 그 결과는 Table 5-10과 같다. 무처리 신동진과 일품의 총지질 함량은 1.25%와 1.34%로 일품이 높게 나타났으며, 3일간 침지시킨 벼는 각각 1.27%와 1.36%로 무처리와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 총지질 함량은 발아온도와 기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 신동진 발아 벼의 경우 발아온도 32, 35 및 37℃에서 각각 1.44~2.47%, 1.45~2.50% 및 1.67~2.56%로 증가하였으며, 일품 발아 벼의 경우에도 각각 1.55~2.65%, 1.56~2.68% 및 1.79~2.75%로 증가하였다.

Table 5-10. Changes in the total lipid contents of rough rice with different germination temperatures and times.

Treatment		Total lipid content (%, d.b.)	
Temp. (°C)	Time (day)	*Shindongjin*	*Ilpum*
Control		1.25 ± 0.02^{Bg}	1.34 ± 0.01^{Ag}
Soaked (0 day)		1.27 ± 0.03^{Bg}	1.36 ± 0.02^{Ag}
32	1	1.44 ± 0.01^{Bf}	1.55 ± 0.02^{Af}
	2	1.96 ± 0.04^{Bd}	2.10 ± 0.04^{Ad}
	3	2.26 ± 0.03^{Bc}	2.43 ± 0.03^{Ac}
	4	2.47 ± 0.07^{Bab}	2.65 ± 0.05^{Ab}
35	1	1.45 ± 0.02^{Bf}	1.56 ± 0.02^{Af}
	2	1.99 ± 0.02^{Bd}	2.13 ± 0.05^{Ad}
	3	2.44 ± 0.04^{Bb}	2.62 ± 0.04^{Ab}
	4	2.50 ± 0.07^{Ba}	2.68 ± 0.06^{Ab}
37	1	1.67 ± 0.06^{Be}	1.79 ± 0.05^{Ae}
	2	1.99 ± 0.04^{Bd}	2.14 ± 0.08^{Ad}
	3	2.50 ± 0.05^{Ba}	2.68 ± 0.02^{Ab}
	4	2.56 ± 0.09^{Ba}	2.75 ± 0.04^{Aa}

Results are expressed as the mean ± SD of triplicate samples (n=3). Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among cultivar and germination conditions by Duncan's multiple range test, respectively.

라. 발아조건에 따른 total 및 free phytosterol 함량 변화

발아온도와 기간을 달리하여 발아시킨 신동진 발아 벼로부터 지표성분인 phytosterol 함량을 측정한 결과는 Table 5-11과 같다. 무처리와 침지 벼의 경우 각각 38.43%와 38.45%로 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 발아 온도 및 기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 발아기간동안 발아온도가 32, 35 및 37℃로 증가함에 따라 total phytosterol은 각각 40.75~50.55%, 42.55~52.70% 및 46.45~52.70%로 증가하였으며, free phytosterol 역시 6.23~8.16%, 6.70~8.54% 및 7.55~8.59%로 유의적인 증가를 보였다. 또한, 발아 온도와 기간이 증가함에 따라 free phytosterol의 비율이 증가하여 발아과정 중 결합형의 phytosterol이 유리형으로 일부 전환되는 것으로 판단된다. 특히, 37℃에서 3일간 발아시킨 벼에서 53.34%와 8.90%로 가장 높은 phytosterol 함량을 보였다.

Table 5-11. Changes in the total and free phytosterol contents and ratio of free phytosterol of *Shindongjin* with different germination temperatures and times.

Treatment		Phytosterol content (mg/100 g rough rice)		Free phytosterol (% of total)
Temp. (℃)	Time (day)	Total	Free	
Control		38.43 ± 0.12^{i}	5.87 ± 0.02^{i}	15.27^{h}
Soaked (0 day)		38.45 ± 0.14^{i}	5.86 ± 0.04^{i}	15.24^{h}
32	1	40.75 ± 0.15^{h}	6.23 ± 0.02^{h}	15.29^{h}
	2	46.31 ± 0.11^{g}	7.14 ± 0.02^{g}	15.42^{g}
	3	49.18 ± 0.21^{e}	7.91 ± 0.03^{e}	16.07^{e}
	4	50.55 ± 0.09^{de}	8.16 ± 0.02^{de}	16.13^{de}
35	1	42.55 ± 0.12^{fg}	6.70 ± 0.01^{fg}	15.74^{fg}
	2	49.10 ± 0.15^{f}	7.83 ± 0.04^{f}	15.95^{f}
	3	51.70 ± 0.17^{ef}	8.30 ± 0.02^{ef}	16.05^{ef}
	4	52.70 ± 0.12^{c}	8.54 ± 0.03^{c}	16.20^{c}
37	1	46.45 ± 0.11^{bc}	7.55 ± 0.04^{bc}	16.26^{bc}
	2	51.83 ± 0.15^{cd}	8.39 ± 0.02^{cd}	16.19^{cd}
	3	53.34 ± 0.14^{a}	8.90 ± 0.03^{a}	16.69^{a}
	4	52.70 ± 0.15^{b}	8.59 ± 0.05^{b}	16.31^{b}

Results are expressed as the mean ± SD of triplicate samples (n=3). Different small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among germination conditions by Duncan's multiple range test.

발아온도와 기간을 달리하여 발아시킨 일품 발아 벼로부터 지표성분인 phytosterol 함량을 측정한 결과는 Table 5-12와 같다. 무처리와 침지 벼의 경우 각각 41.23%와 41.25%로 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 발아 온도 및 기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고, 신동진 벼보다 높게 나타났다. 발아기간동안 발아온도가 32, 35 및 37℃로 증가함에 따라 total phytosterol은 각각 43.72~54.24%, 45.65~56.55% 및 49.84~56.54%로 증가하였으며, free phytosterol 역시 6.70~8.77%, 7.20~9.18% 및 8.12~9.24%로 유의적인 증가를 보였다. 또한, 발아 온도와 기간이 증가함에 따라 free phytosterol의 비율이 증가하여 신동진 발아 벼와 동일한 결과를 얻었으며, 특히 37℃에서 3일간 발아시킨 벼에서 57.23%와 9.57%로 가장 높은 phytosterol 함량을 보였다.

Table 5-12. Changes in the total and free phytosterol contents and ratio of free phytosterol of *Ilpum* with different germination temperatures and times.

Treatment		Phytosterol content (mg/100 g rough rice)		Free phytosterol (% of total)
Temp. (℃)	Time (day)	Total	Free	
Control		41.23 ± 0.12^{k}	6.31 ± 0.02^{k}	15.30^{i}
Soaked (0 day)		41.25 ± 0.09^{k}	6.30 ± 0.02^{k}	15.27^{i}
32	1	43.72 ± 0.08^{j}	6.70 ± 0.04^{j}	15.32^{i}
	2	49.69 ± 0.12^{h}	7.68 ± 0.03^{h}	15.46^{h}
	3	52.77 ± 0.03^{f}	8.50 ± 0.06^{f}	16.11^{de}
	4	54.24 ± 0.14^{e}	8.77 ± 0.07^{e}	16.17^{d}
35	1	45.65 ± 0.08^{i}	7.20 ± 0.05^{i}	15.77^{g}
	2	52.68 ± 0.12^{f}	8.42 ± 0.06^{f}	15.98^{f}
	3	55.47 ± 0.17^{d}	8.92 ± 0.04^{d}	16.08^{e}
	4	56.55 ± 0.09^{c}	9.18 ± 0.05^{c}	16.23^{cd}
37	1	49.84 ± 0.11^{g}	8.12 ± 0.07^{g}	16.29^{c}
	2	55.61 ± 0.14^{cd}	9.02 ± 0.05^{cd}	16.22^{cd}
	3	57.23 ± 0.11^{a}	9.57 ± 0.04^{a}	16.72^{a}
	4	56.54 ± 0.12^{b}	9.24 ± 0.06^{b}	16.34^{b}

Results are expressed as the mean ± SD of triplicate samples (n=3). Different small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among germination conditions by Duncan's multiple range test.

발아온도와 시간이 total phytosterol의 함량에 미치는 영향을 분산분석한 결과는 Table 5-13과 같다. 신동진의 경우 발아시간에 대한 F값이 14810.00($p<0.001$)로 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 발아온도는 5958.96($p<0.001$), 발아온도와 시간의 상호작용효과는 291.53($p<0.001$)로 나타나 total phytosterol의 함량에 적게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한, 일품의 경우에도 발아시간에 대한 F값이 14884.30($p<0.001$)로 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 발아온도는 5985.58($p<0.001$), 발아온도와 시간의 상호작용효과는 293.71($p<0.001$)로 나타나 total phytosterol의 함량에 적게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 **37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼를 이용하여 추출조건 선정실험을 진행하였다.**

Table 5-13. Analysis of variance for total phytosterol yield of germinated rough rice.

Factor		df	S.S[1)]	M.S[2)]	F-value
Shindongjin	X_1	2	115.27	57.64	5958.96***
	X_2	3	429.74	143.25	14810.00***
	X_3	6	16.92	2.82	291.53***
Ilpum	X_1	2	132.68	66.34	5985.58***
	X_2	3	494.90	164.97	14884.30***
	X_3	6	19.53	3.26	293.71***

[1)]Sum of square, [2)]Mean square, *** : $p<0.001$

X_1 : Germination temperature (°C), X_2 : Germination time (day), X_3 : $X_1 \times X_2$

마. 추출조건에 따른 total phytosterol의 함량 및 수율 변화

발아조건 최적화 연구에서 phytosterol의 함량이 가장 높게 나타났던 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품을 이용하여 추출온도 및 시간을 달리하여 얻은 추출물을 검화시킨 후 total phytosterol 함량과 수율을 측정한 결과는 Table 5-14와 같다. Hexane을 추출용매로 30℃에서 12시간 3회 반복 추출한 Control의 경우 신동진과 일품이 각각 53.34%와 57.23%로 일품 벼가 높게 나타났다. 추출시간이 길어질수록 추출수율은 증가하는 경향을 보였고, 12시간과 18시간의 추출은 큰 차이를 보이지 않았다. 추출온도가 증가함에 따라 추출수율은 감소하였으며, 상대적으로 높은 온도에서 장시간 추출 시 total phytosterol의 추출수율이 감소하는 경향을 보였다.

추출온도와 시간이 total phytosterol의 수율에 미치는 영향을 분산분석한 결과는 Table 5-15와 같다. 추출시간에 대한 F값이 18160.50($p<0.001$)로 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 시간은 16669.30($p<0.001$), 온도와 시간의 상호작용효과는 11376.90($p<0.001$)로 나타나 추출온도와 시간이 모두 total phytosterol의 수율이 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 **경제성을 고려하였을 때 30℃에서 12시간 추출하는 것이 바람직하다고 판단된다.**

Table 5-14. Changes in the total phytosterol content and yield of germinated rough rice with different cultivar and extraction conditions.

Treatment		Total phytosterol content (mg/100 g rough rice)		Total phytosterol yield (%)	
Temp. (℃)	Time (h)	*Shindongjin*	*Ilpum*	*Shindongjin*	*Ilpum*
Control		53.34^{B}	57.23^{A}		
30	6	19.08^{Bi}	20.44^{Ai}	35.77^{i}	35.71^{NSi}
	12	25.22^{Bc}	27.08^{Ac}	47.28^{c}	47.32^{NSc}
	18	26.55^{Ba}	28.51^{Aa}	49.78^{a}	49.81^{NSa}
40	6	19.87^{Bg}	21.31^{Ag}	37.25^{g}	37.24^{NSg}
	12	24.99^{Bd}	26.80^{Ad}	46.85^{d}	46.83^{NSd}
	18	25.65^{Bb}	27.53^{Ab}	48.08^{b}	48.11^{NSb}
50	6	21.41^{Be}	22.99^{Ae}	40.14^{e}	40.17^{NSe}
	12	20.33^{Bf}	21.83^{Af}	38.11^{f}	38.15^{NSf}
	18	18.91^{Bh}	20.30^{Ah}	35.45^{h}	35.47^{NSh}

Results are expressed as the average of triplicate samples (n=3). Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among cultivar and extraction conditions by Duncan's multiple range test, respectively. NS : not significant.

Table 5-15. Analysis of variance for total phytosterol yield of germinated rough rice.

Factor	df	S.S[1)]	M.S[2)]	F-value
X_1	2	235.96	117.98	16669.30^{***}
X_2	2	257.07	128.54	18160.50^{***}
X_3	4	322.09	80.52	11376.90^{***}

[1)]Sum of square, [2)]Mean square, *** : $p<0.001$

X_1 : Extraction temperature (°C), X_2 : Extraction time (h), X_3 : $X_1 \times X_2$

제6절 발아 벼를 이용한 시제품 제형개발

1. 연구방법

가. 분말 시제품 개발

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품을 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시킨 후, 분쇄기 (Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 분쇄한 후, 분말을 가로 10.5 cm x 세로 2.7 cm인 알루미늄 포장지에 5 g씩 충진한 후 밀봉하여 분말 시제품을 개발하였다.

나. 분말 시제품의 품질특성 평가

분말 시제품의 입도는 분말시료 100 g을 60, 100, 120 및 140 mesh의 표준체로 체별하여 250>, 150, 125, <106 μm 크기별로 입도분포를 측정하였다. 색도는 색차계(Colorimeter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명도(L), 적색도(a) 및 황색도(b)를 측정하였다. 효소적 소화율은 분말시료 5 g에 30 mL의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.9)를 가하고, 320 unit의 α-amylase를 첨가하여 교반배양기에서 25℃에서 14시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 침전물에 대하여 80℃에서 건조하여 감소된 무게로부터 효소적 소화율을 측정하였다. 물결합력은 분말 2 g에 증류수 20 mL을 가하고 교반기를 이용하여 1시간 동안 200 rpm으로 교반한 후 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 침전물의 무게를 측정하여 처음 시료량과의 중량비로 물 결합력을 계산하였다. 용해도 및 팽윤력은 항량을 측정한 원심분리관에 건조된 분말 2 g을 취하고 증류수 30 mL을 혼합하여 균질화한 후 80℃의 shaking water bath에서 200 rpm으로 30분간 가열 후 호화액을 원심분리(4,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 제거하고 침전물을 80℃에서 건조하여 건조 중량을 측정하여 용해도 및 팽윤력을 측정하였다.

다. 선식 시제품 개발

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품을 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시킨 후, 분쇄기 (Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 분쇄하였다. 이 분말을 선식분말과 혼합한 후, 외부사이즈 10×12 cm, 내부사이즈 8.5×10.5 cm인 Retort Pouch에 35 g씩 충진한 후 밀봉하였다. 선식 부원료는 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡식 14종을 사용하여, 발아벼 분말과 선식분말의 함량비를 각각 5 : 30, 10 : 25, 15 : 20 (w/w)으로 하여 혼합 후 충진하여 시제품을 개발하였다.

라. 선식 시제품의 품질특성 평가

선식 시제품의 입도는 분말시료 100 g을 60, 100, 120 및 140 mesh의 표준체로 체별하여 250>, 150, 125, <106 μm 크기별로 입도분포를 측정하였다. 색도는 색차계(Colorimeter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명도(L), 적색도(a) 및 황색도(b)를 측정하였다. 효소적 소화율은 분말시료 5 g에 30 mL의 0.2 M phosphate buffer (pH 6.9)를 가하고, 320 unit의 α-amylase를 첨가하여 교반배양기에서 25℃에서 14시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 침전물에 대하여 80℃에서 건조하여 감소된 무게로부터 효소적 소화율을 측정하였다. 물결합력은 분말 2 g에 증류수 20 mL을 가하고 교반기를 이용하여 1시간 동안 200 rpm으로 교반한 후 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 침전물의 무게를 측정하여 처음 시료량과의 중량비로 물 결합력을 계산하였다. 용해도 및 팽윤력은 항량을 측정한 원심분리관에 건조된 분말 2 g을 취하고 증류수 30 mL을 혼합하여 균질화한 후 80℃의 shaking water bath에서 200 rpm으로 30분간 가열 후 호화액을 원심분리(4,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 제거하고 침전물을 80℃에서 건조하여 건조 중량을 측정하여 용해도 및 팽윤력을 측정하였다. 관능평가는 발아벼 분말의 첨가량이 다른 선식 시제품 35 g을 식용수 200 g에 혼합한 후 본 실험에 흥미가 있고 차이식별능력이 있는 관능검사요원(20~50대, 남녀 혼성) 10명을 대상으로 실시하였다.

마. 음료 시제품 개발

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품을 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시켰다. 건조된 발아 벼 200 g을 면주머니에 넣고 증류수 2 L 가해 1시간 열수추출을 하였다. 열로 인해 수증기로 수분이 증발 되는 것을 감안 하여 가열 중간 30분에 증류수를 1 L를 첨가하였으며, 1시간 동안 추출 과정을 끝내고 추출물을 여과지를 이용하여 감압여과를 발아 벼 열수추출물을 얻었다. 발아 벼 열수추출물을 100%, 80% 및 60%가 되도록 식용수로 희석한 후 미생물에 의한 변질을 방지하기 위하여 자몽종자추출물 0.2%를 첨가하여 음료 시제품을 개발하였다.

바. 음료 시제품의 품질특성 평가

음료 시제품의 pH는 pH meter(Orion 4 STAR, Thermo Scientific, USA)로 측정하였으며, 색도는 색차계(Colorimeter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명도(L), 적색도(a) 및 황색도(b)를 측정하였다. 점도는 점도계(Viscometer, RVT DV-II, Brookfield, USA)를 이용하여 측정하였으며, spindle No 1번을 100 rpm으로 회전시키며 점도를 측정하였다. 관능평가는 발아 벼 열수추출물의 첨가량이 다른 음료 시제품을 식음수와 함께 제공하였고, 본 실험에 흥미가 있고 차이식별능력이 있는 관능검사요원(20~50대, 남녀 혼성) 10명을 대상으로 실시하였다.

사. 캡슐 시제품 개발

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품을 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시켰다. 건조된 발아벼는 분쇄기 (Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄하였다. 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡류 14종을 선식 부원료로 하여 발아벼 분말과 각각 5 : 30, 10 : 25, 15 : 20 (w/w)으로 하여 혼합 후 이 선식 분말을 부형제 SiO2(1%), 스테아린산 마그네슘(1.5%)과 혼합한 후, 500 mg 용량의 백색 불투명 경질캡슐(52A/52A)에 각각 충진하여 캡슐 시제품을 개발하였다.

아. 캡슐 시제품의 품질특성 평가

캡슐 시제품의 품질특성으로 밀도와 붕해도를 측정하였다. 이완밀도는 분말 20 g을 정확히 칭량한 후 100 mL 메스실린더에 담은 후 부피를 측정하여 계산하였으며 다짐밀도는 메스실린더를 20 cm 높이에서 20회 자유낙하 하였을 때의 밀도로 계산하였다. 안식각은 깔대기를 통해 일시에 배출시킨 발아벼 분말은 원뿔모양으로 퇴적되는데 이를 카메라를 이용하여 촬영하고, 촬영된 영상을 Adobe photoshop CS2 프로그램을 이용하여 H와 D를 측정하여 계산하였다. 붕해도는 대한약전에 기술되어 있는 시험법을 변형하여 측정하였다. 캡슐에 인공위액과 인공장액을 각각 20 mL을 가한 다음, 교반배양기(37℃)에서 교반시킨 후 용해 시간을 측정하였다. 이때 사용한 인공위액(pH 1.2)은 NaCl 5 g에 HCl 24 mL 및 증류수를 넣어 1 L로 하여 제조하였고, 인공장액(pH 6.8)은 0.2 M KH_2PO_4 250 mL에 0.2 N NaOH 118 mL 및 증류수를 넣어 1 L로 하여 제조하였다.

자. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA (Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$). 또한 요인들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis로 분석하였다.

2. 연구결과

가. 분말 시제품 개발 및 품질특성 평가

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼를 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시킨 후, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 분쇄한 후, 분말을 가로 10.5 cm x 세로 2.7 cm인 알루미늄 포장지에 5 g씩 충진한 후 밀봉하여 분말 시제품을 개발하였다(Fig. 6-1, 6-2).

Fig. 6-1. The powders of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum*.

Shindongjin *Ilpum*

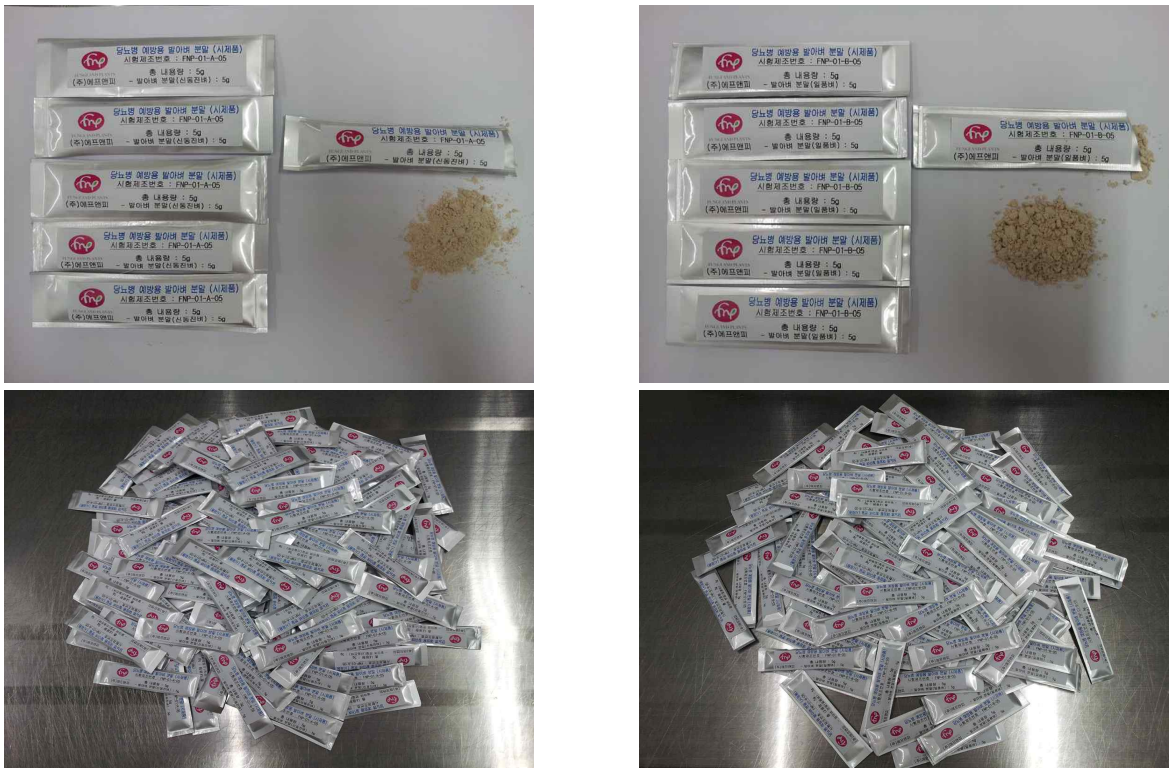


Fig. 6-2. The prototype of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* powders.

(1) 분말 시제품의 입도

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말 시제품들의 입도분포를 분석한 결과는 Fig. 6-3과 같다. 발아 신동진 분말의 경우 250 μm 표준체를 통과하지 못한 시료가 7.31%로 나타났으며, 150 μm 표준체를 통과하지 못한 시료는 39.90%, 125 μm 표준체를 통과하지 못한 시료는 41.64%, 106 μm 표준체를 통과하지 못한 시료와 통과한 시료는 각각 8.25%와 2.91%로 나타나 대부분 125~150 μm의 입도를 갖는 것으로 나타났다. 발아 일품 분말의 경우 250 μm 표준체를 통과하지 못한 시료가 9.77%로 나타났으며, 150 μm 표준체를 통과하지 못한 시료는 49.69%, 125 μm 표준체를 통과하지 못한 시료는 33.41%, 106 μm 표준체를 통과하지 못한 시료와 통과한 시료는 각각 5.68%와 1.46%로 나타나 발아 신동진과 마찬가지로 대부분 125~150 μm의 입도를 갖는 것으로 나타났다. 발아 신동진과 일품을 비교하였을 때, 일품보다는 신동진의 입도가 더 작게 분포되어 있는 것으로 나타나 신동진의 미분쇄 효율이 높은 것으로 판단된다.

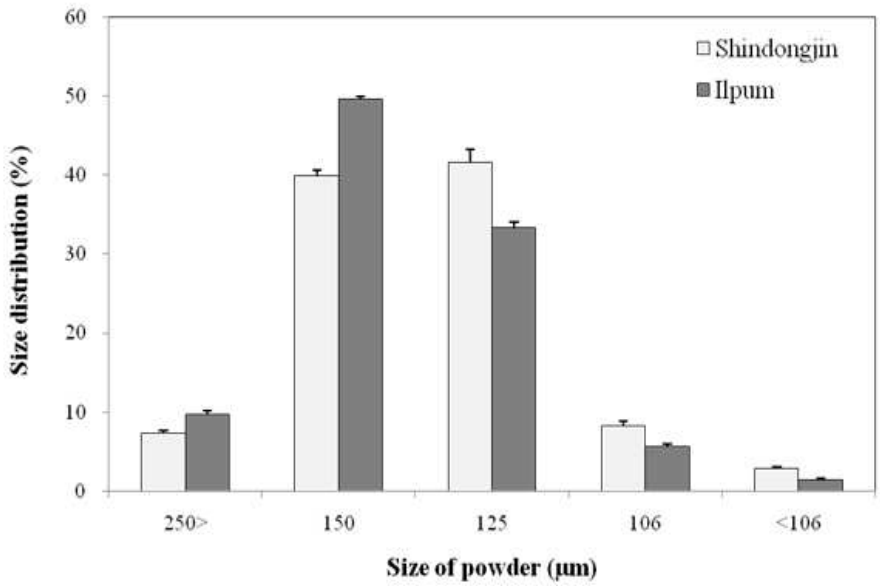


Fig. 6-3. The size distributions of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* powders.

(2) 분말 시제품의 색도

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말 시제품들의 색도를 분석한 결과는 Table 6-1과 같다. 발아 신동진 분말의 경우 명도를 나타내는 L값은 96.99, 적색도를 나타내는 a값은 -4.81, 황색도를 나타내는 b값은 7.15로 나타났으며, 발아 일품 분말의 경우 L값은 98.10, b값은 -4.57, a값은 6.46으로 나타났다. 발아 신동진과 일품을 비교하였을 때, 일품의 명도와 적색도가 더 높아 밝은 적색을 띠었으며, 황색도는 낮아 푸른색을 띠었다.

Table 6-1. The color of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* powders.

	Shindongjin	*Ilpum*
Lightness (L)	96.99 ± 0.15	98.10 ± 0.07***
Redness (a)	-4.81 ± 0.02	-4.57 ± 0.02***
Yellowness (b)	7.15 ± 0.09***	6.46 ± 0.01

***$p<0.001$ indicates significant differences between groups by Student's t-test.

(3) 분말 시제품의 소화율, 물결합력, 용해도 및 팽윤력

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말 시제품들의 효소적 소화율, 물결합력, 용해도 및 팽윤력을 분석한 결과는 Table 6-2와 같다. 효소적 소화율(enzymatic digestibility)의 경우 발아 신동진 분말 23.83%, 발아 일품 분말 24.17%로 유사하게 나타났다. 물결합력(water binding capacity)의 경우 발아 신동진 분말 116.32%, 발아 일품 분말 117.57%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 용해도(solubility)의 경우 발아 신동진 분말 6.73%, 발아 일품 분말 5.96%로 차이를 보이지 않았으며, 팽윤력(swelling power)의 경우에서도 발아 신동진 분말 3.12%, 발아 일품 분말 3.00%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 발아 신동진벼 및 일품벼 분말의 효소적 소화율, 물결합력, 용해도 및 팽윤력은 차이가 없었다.

Table 6-2. The enzymatic digestibility, water binding capacity, solubility and swelling power of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* powders.

	Shindongjin	*Ilpum*
Enzymatic digestibility (%)	23.83 ± 1.37ns	24.17 ± 0.45
Water binding capacity (%)	116.32 ± 3.38ns	117.57 ± 1.83
Solubility (%)	6.73 ± 0.49ns	5.96 ± 0.79
Swelling power (%)	3.12 ± 0.46ns	3.00 ± 0.44

ns indicates no significant differences between groups by Student's t-test.

(4) 분말 시제품의 페놀산 함량

분말 시제품의 주요 페놀산 함량을 분석한 결과는 Table 6-3과 같다. 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품의 caffeic acid는 각각 7.45 및 8.76 μg/g, *p*-coumaric acid는 각각 14.21 및 15.02 μg/g, ferulic acid는 각각 10.44 및 12.71 μg/g, *trans*-cinnamic acid는 각각 53.76 및 64.91 μg/g으로 발아 신동진보다 발아 일품에서 그 함량이 높게 나타났다.

Table 6-3. The contents of major phenolic compounds of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* powders.

	Shindongjin	*Ilpum*
Caffeic acid	7.45	8.76*
p-Coumaric acid	14.21	15.02*
Ferulic acid	10.44	12.71*
trans-Cinnamic acid	53.76	64.91**

Unit : μg/g powder *p<0.05, **p<0.01 indicates significant differences between groups by Student's t-test. NS indicates no significant differences between groups by Student's t-test.

나. 선식 시제품 개발 및 품질특성 평가

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼를 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시킨 후, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 분쇄하였다. 이 분말을 선식분말과 혼합한 후, 외부사이즈 10×12 cm, 내부사이즈 8.5×10.5 cm인 Retort Pouch에 35 g씩 충진한 후 밀봉하였다. 선식 부원료는 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡식 14종을 사용하여, 발아벼 분말과 선식분말의 함량비를 각각 5 : 30 (w/w), 10 : 25, 15 : 20으로 하여 혼합 후 충진하여 시제품을 개발하였다(Fig. 6-4, 6-5).

Fig. 6-4. The *Sunsik* powders of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum*.with different sub-material ratios.

Ratio (germinated rough rice : sub-material)	*Shindongjin*	*Ilpum*
5 : 30		
10 : 25		
15 : 20		

Fig. 6-5. The prototype of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with sub-material different ratios.

(1) 선식 시제품의 입도

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말 시제품들의 입도분포를 분석한 결과는 Fig. 6-6과 같다. 발아 신동진 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)의 경우 150 μm와 125 μm의 표준체를 통과한 시료의 비율이 각각 28.63%와 44.72%로 나타났으며, 발아 신동진 분말을 10 g 첨가한 처리구(10:25)의 경우에는 각각 53.18%와 33.98%로 나타났으며, 발아 신동진 분말을 15 g 첨가한 처리구(15:20)의 경우에는 각각 43.52%와 40.22%로 나타나 대부분 125~150 μm의 입도를 갖는 것으로 나타났다. 발아 일품 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)의 경우 150 μm와 125 μm의 표준체를 통과한 시료의 비율이 각각 33.56%와 32.46%로 나타났으며, 발아 일품 분말을 10 g 첨가한 처리구(10:25)의 경우에는 각각 51.20%와 33.61%로 나타났으며, 발아 일품 분말을 15 g 첨가한 처리구(15 : 20)의 경우에는 각각 34.95%와 16.02%로 나타나 대부분 125~150 μm의 입도를 갖는 것으로 나타났으나, 106 μm를 통과한 시료의 비율도 16.02%로 신동진 분말에 비하여 높게 나타났다.

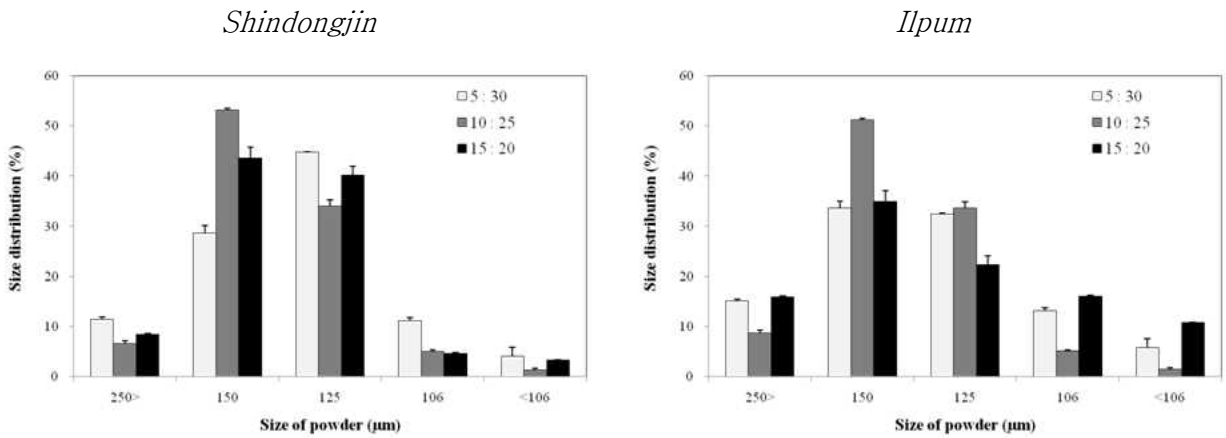


Fig. 6-6. The size distributions of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with different sub-material ratios.

(2) 선식 시제품의 색도

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말 시제품들의 색도를 분석한 결과는 Table 6-4와 같다. 발아 신동진 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)의 경우 명도 98.18, 적색도 -3.51, 황색도 13.96으로 나타났으며, 10 g 첨가한 처리구(10:25)에서는 명도 95.89, 적색도 -3.63, 황색도 12.62로 나타났으며, 15 g 첨가한 처리구(15:20)에서는 명도 100.33, 적색도 -4.10, 황색도 12.16으로 나타나 첨가량 증가로 명도는 증가하지만 적색도와 황색도는 감소하는 경향을 보였다. 발아 일품 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)의 경우 명도 96.09 적색도 -3.35, 황색도 15.53으로 나타났으며, 10 g 첨가한 처리구(10:25)에서는 명도 99.88, 적색도 -3.81, 황색도 11.98로 나타났으며, 15 g 첨가한 처리구(15:20)에서는 명도 98.86, 적색도 -3.68, 황색도 13.22으로 나타나 첨가량 증가로 명도는 증가하고, 적색도와 황색도는 감소하는 경향을 보였다.

Table 6-4. The color of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with different sub-material ratios.

	Ratio (germinated rough rice : sub-material)	*Shindongjin*	*Ilpum*
Lightness (L)	5 : 30	98.18 ± 2.30^{b}	96.09 ± 0.13^{c***}
	10 : 25	95.89 ± 0.15^{c}	99.88 ± 0.05^{a***}
	15 : 20	100.33 ± 0.25^{a}	98.86 ± 0.03^{b***}
Redness (a)	5 : 30	−3.51 ± 0.06^{a}	−3.35 ± 0.02^{a***}
	10 : 25	−3.63 ± 0.02^{b}	−3.81 ± 0.01^{c***}
	15 : 20	−4.10 ± 0.04^{c}	−3.68 ± 0.02^{b***}
Yellowness (b)	5 : 30	13.96 ± 0.11^{a}	15.53 ± 2.84^{a***}
	10 : 25	12.62 ± 0.02^{b}	11.98 ± 0.01^{c***}
	15 : 20	12.16 ± 0.05^{c}	13.22 ± 0.02^{b***}

$^{***}p<0.001$ indicates significant differences between groups by Student's t-test.
$^{a-c}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(3) 선식 시제품의 소화율, 물결합력, 용해도 및 팽윤력

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말에 선식 부원료를 혼합하여 제조한 선식 시제품들의 효소적 소화율, 물결합력, 용해도 및 팽윤력을 분석한 결과는 Table 6-5와 같다. 효소적 소화율(enzymatic digestibility)의 경우 발아 신동진을 첨가한 선식은 그 첨가량이 증가함에 따라 29.11%에서 25.51%로 감소하였으며, 발아 일품을 첨가한 선식은 26.16~26.88%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 물결합력(water binding capacity)의 경우 발아 신동진을 첨가한 선식은 첨가량이 증가함에 따라 146.12%에서 134.80%로 감소하였으며, 발아 일품을 첨가한 선식 역시 첨가량이 증가함에 따라 161.01%에서 145.51%까지 감소하였다. 용해도(solubility)의 경우 발아 신동진을 첨가한 선식은 첨가량이 증가함에 따라 5.27~3.13%로 감소하였으며, 발아 일품을 첨가한 선식은 첨가량이 증가함에 따라 4.24%에서 2.30%로 감소하였다. 팽윤력(swelling power)의 경우 발아 신동진을 첨가한 선식은 첨가량이 증가함에 따라 2.77%에서 1.98%로 감소하였으며, 발아 일품을 첨가한 선식도 역시 2.73%에서 1.70%로 감소하였다. 발아 신동진과 일품을 비교해보면 효소적 소화율과 팽윤력의 경우 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며($p>0.05$), 물결합력의 경우 첨가량이 높은 처리구(10 : 25와 15 : 20)에서도 차이를 보이지 않았다. 그러나 용해도의 경우에는 모든 처리구에서 발아 신동진을 첨가한 처리구가 높게 나타났다. 이는 물에 용해 또는 분산시켜 섭취하는 선식 제품의 특성상 중요한 특성의 하나가 될 수 있다.

Table 6-5. The enzymatic digestibility, water binding capacity, solubility and swelling power of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with different sub-material ratios.

Items / Ratios		*Shindongjin*	*Ilpum*
Enzymatic digestibility (%)	5 : 30	29.11 ± 1.92^{a}	26.37 ± 2.93^{abNS}
	10 : 25	27.73 ± 1.67^{ab}	26.16 ± 6.88^{bNS}
	15 : 20	25.51 ± 3.26^{b}	26.88 ± 1.32^{aNS}
Water binding capacity (%)	5 : 30	146.12 ± 3.75^{a}	161.01 ± 1.60^{a**}
	10 : 25	140.73 ± 1.94^{b}	148.33 ± 4.98^{bNS}
	15 : 20	134.80 ± 3.92^{c}	145.51 ± 9.89^{bNS}
Solubility (%)	5 : 30	5.27 ± 0.06^{a}	4.24 ± 3.27^{a***}
	10 : 25	4.14 ± 0.17^{b}	3.27 ± 0.16^{b**}
	15 : 20	3.13 ± 0.14^{c}	2.30 ± 0.16^{c**}
Swelling power (%)	5 : 30	2.77 ± 0.06^{a}	2.73 ± 0.05^{aNS}
	10 : 25	2.24 ± 0.07^{b}	2.29 ± 0.15^{bNS}
	15 : 20	1.98 ± 0.14^{c}	1.70 ± 0.24^{cNS}

$^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test.
$^{a-c}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(4) 선식 시제품의 관능평가

신동진 및 일품 발아 벼를 분쇄하여 제조한 분말에 선식 부원료를 혼합하여 제조한 선식 시제품 35 g을 식용수 200 g에 용해 및 분산시킨 선식음료 제품의 관능평가를 실시한 결과는 Table 6-6과 같다. 외관(appearance)의 경우 발아 신동진과 일품 발아 벼 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)에서 각각 4.2와 4.3으로 가장 높게 나타났으나($p<0.05$), 품종간의 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). 고소한 맛(nutty)의 경우 발아 신동진과 일품 발아 벼 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)에서 각각 4.0와 3.1으로 가장 높게 나타났으며($p<0.01$), 단맛(sweetness)의 경우에도 역시 발아 신동진과 일품 발아 벼 분말을 5 g 첨가한 처리구(5:30)에서 각각 3.1와 2.1로 높았으나 감미료를 첨가하지 않았기 때문에 상대적으로 낮은 수치를 보였다. 향(flavor)의 경우 발아 벼 분말을 단독으로 사용한 처리구(35:0)보다 선식 부원료 분말이 첨가된 처리구에서 높게 나타났으며, 목 넘김(feeling of throat)은 전반적으로 5 g 첨가한 처리구(5:30)에서 높게 나타났다. 색, 고소한맛, 단맛, 향 및 목 넘김에 대한 관능평가와 함께 전반적인 기호도를 고려하여 발아 신동진 및 일품 발아 벼 분말 5 g과 14종 선식분말 30 g을 혼합한 선식의 관능특성이 가장 우수하였다.

Table 6-6. The sensory evaluations of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with different sub-material ratios.

Items / Ratios		*Shindongjin*	*Ilpum*
Appearance	35 : 0	1.7^{c}	1.6^{cNS}
	5 : 30	4.2^{a}	4.3^{aNS}
	10 : 25	3.9^{ab}	3.2^{b*}
	15 : 20	3.6^{b}	3.4^{bNS}
Nutty	35 : 0	1.3^{c}	1.1^{cNS}
	5 : 30	4.0^{a}	3.1^{a**}
	10 : 25	3.3^{b}	2.4^{b**}
	15 : 20	3.1^{b}	2.1^{b*}
Sweetness	35 : 0	1.1^{c}	1.0^{bNS}
	5 : 30	3.1^{a}	2.1^{a*}
	10 : 25	2.1^{b}	1.7^{aNS}
	15 : 20	1.9^{b}	1.8^{aNS}
Flavor	35 : 0	1.7^{b}	1.4^{cNS}
	5 : 30	4.1^{a}	3.9^{aNS}
	10 : 25	4.2^{a}	2.8^{b**}
	15 : 20	4.0^{a}	2.8^{b**}
Feeling of throat	35 : 0	1.3^{d}	1.1^{bNS}
	5 : 30	3.3^{b}	2.9^{aNS}
	10 : 25	2.6^{c}	2.9^{aNS}
	15 : 20	4.1^{a}	2.5^{a**}
Overall acceptance	35 : 0	1.2^{c}	1.2^{cNS}
	5 : 30	4.2^{a}	3.5^{a*}
	10 : 25	3.8^{a}	3.3^{aNS}
	15 : 20	3.1^{b}	2.4^{bNS}

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test.
$^{a-d}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(5) 선식 시제품의 페놀산 함량

선식 시제품의 주요 페놀산 함량을 분석한 결과는 Table 6-7과 같다. 37℃에서 3일간 발아시킨 분말의 caffeic acid는 각각 7.45 및 8.76 μg/g, *p*-coumaric acid는 각각 14.21 및 15.02 μg/g, ferulic acid는 각각 10.44 및 12.71 μg/g, *trans*-cinnamic acid는 각각 53.76 및 64.91 μg/g으로 발아 신동진보다 발아 일품에서 그 함량이 높게 나타났다. 또한 첨가비에 따라서는 발아 벼 분말 이외에 사용된 선식 부원료에도 존재하는 페놀산들로 인하여 첨가된 발아 벼의 페놀산 함량보다 다소 높게 나타났다.

Table 6-7. The contents of major phenolic compounds of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum Sunsik* powders with different sub-material ratios.

Phenolic compounds	Ratio	*Shindongjin*	*Ilpum*
Caffeic acid	35 : 0	7.45[a]	8.76[a]
	5 : 30	1.06[c]	1.25[d]
	10 : 25	2.13[c]	2.50[c]
	15 : 20	3.19[b]	3.75[b]
Coumaric acid	35 : 0	14.21[a]	15.02[a]
	5 : 30	2.03[d]	2.15[d]
	10 : 25	4.06[c]	4.29[c]
	15 : 20	6.09[b]	6.44[b]
Ferulic acid	35 : 0	10.44[a]	12.71[a]
	5 : 30	1.49[d]	1.82[d]
	10 : 25	2.98[c]	3.63[c]
	15 : 20	4.47[b]	5.45[b]
Cinnamic acid	35 : 0	53.76[a]	64.91[a]
	5 : 30	7.68[d]	9.27[d]
	10 : 25	15.36[c]	18.55[c]
	15 : 20	23.04[b]	27.82[b]

[a-d]Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

다. 음료 시제품 개발 및 품질특성 평가

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼를 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시켰다. 건조된 발아 벼 200 g을 면주머니에 넣고 증류수 2 L 가해 1시간 열수추출을 하였다. 열로 인해 수증기로 수분이 증발 되는 것을 감안 하여 가열 중간 30분에 증류수를 1 L를 첨가하였으며, 1시간 동안 추출 과정을 끝내고 추출물을 여과지를 이용하여 감압여과를 발아 벼 열수추출물을 얻었다. 발아 벼 열수추출물을 100%, 80% 및 60%가 되도록 식용수로 희석한 후 미생물에 의한 변질을 방지하기 위하여 자몽종자추출물 0.2%를 첨가하여 음료 시제품을 개발하였다(Fig. 6-7, 6-8).

Fig. 6-7. The beverages containing water extracts of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* with different concentrations.

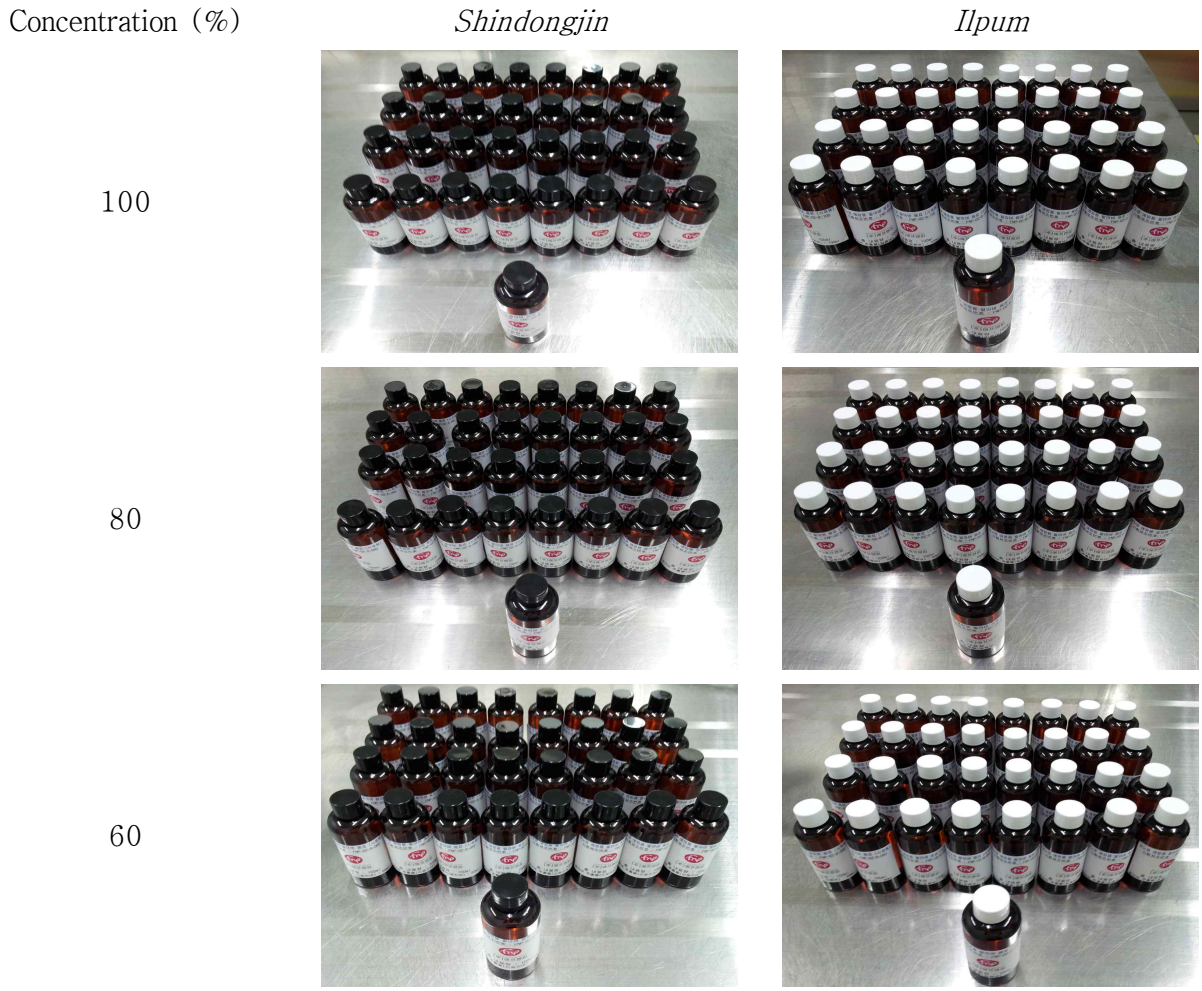


Fig. 6-8. The prototype of the beverages containing water extracts of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* with different concentrations.

(1) 음료 시제품의 pH, 색도 및 점도

신동진 및 일품 발아 벼를 열수 추출하여 제조한 추출물을 100%, 80% 및 60%로 희석하여 제조한 음료 시제품들의 pH, 색도 및 점도를 분석한 결과는 Table 6-8과 같다. 음료의 pH의 경우 신동진과 일품 발아 벼 열수추출물이 각각 6.07과 5.80으로 나타났으며($p<0.001$), 식용수의 첨가량이 증가할수록 pH는 증가하여 60% 첨가구에서는 각각 6.44와 6.38로 나타났다($p<0.05$). 음료의 색도에 있어서 명도(L)의 경우 신동진과 일품 발아 벼 열수추출물이 각각 96.95와 97.30으로 나타났으며($p<0.05$), 식용수의 첨가량이 증가할수록 명도는 증가하여 60% 첨가구에서는 각각 98.47과 98.38로 증가하였다. 적색도(a)의 경우 신동진벼과 일품 발아 벼 열수추출물이 각각 −5.29와 −4.84로 나타났으며($p<0.001$), 식용수의 첨가량이 증가할수록 적색도는 −4.97과 −4.63으로 증가하였다($p<0.001$). 황색도(b)의 경우 신동진과 일품 발아 벼 열수추출물이 각각 11.15와 7.14로 나타났으며($p<0.001$), 식용수의 첨가량이 증가할수록 7.67과 4.94로 감소하였다($p<0.001$). 음료의 점도의 경우 신동진과 일품 발아 벼 열수추출물이 각각 10.30 cP와 10.50 cP로 나타났으며($p>0.05$), 식용수의 첨가량이 증가할수록 점도는 각각 9.20 cP로 감소하였다($p<0.05$).

Table 6-8. The pH, color and viscosity of the beverages containing water extracts of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* with different concentrations.

Items / Ratios			*Shindongjin*	*Ilpum*
pH		100	6.07 ± 0.02^{c}	5.80 ± 0.02^{c***}
		80	6.24 ± 0.03^{b}	6.03 ± 0.02^{b***}
		60	6.44 ± 0.02^{a}	6.38 ± 0.02^{a*}
Color	Lightness (L)	100	96.95 ± 0.07^{c}	97.30 ± 0.20^{c*}
		80	97.92 ± 0.01^{b}	97.75 ± 0.03^{b***}
		60	98.47 ± 0.23^{a}	98.38 ± 0.02^{aNS}
	Redness (a)	100	−5.29 ± 0.04^{b}	−4.84 ± 0.03^{c***}
		80	−5.28 ± 0.02^{b}	−4.76 ± 0.02^{b***}
		60	−4.97 ± 0.01^{a}	−4.63 ± 0.01^{a***}
	Yellowness (b)	100	11.15 ± 0.02^{a}	7.14 ± 0.08^{a***}
		80	10.30 ± 0.01^{b}	6.20 ± 0.01^{b***}
		60	7.67 ± 0.02^{c}	4.94 ± 0.01^{c***}
Viscosity (cP)		100	10.30 ± 0.10^{a}	10.50 ± 0.10^{aNS}
		80	9.40 ± 0.10^{b}	10.40 ± 0.10^{a***}
		60	9.20 ± 0.10^{c}	9.20 ± 0.10^{bNS}

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test.
$^{a-c}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

(2) 음료 시제품의 관능평가

신동진 및 일품 발아 벼를 열수 추출하여 제조한 추출물을 100%, 80% 및 60%로 희석하여 제조한 음료 시제품들의 관능평가 결과는 Table 6-9와 같다. 외관(apprearance)의 경우 발아 신동진 추출물의 첨가량에 의한 차이는 없었지만($p>0.05$), 발아 일품 추출물은 첨가량이 많을수록 높게 평가되었다($p<0.05$). 고소한 맛(nutty)의 경우도 마찬가지로 발아 신동진 추출물의 첨가량에 의한 차이는 없었지만($p>0.05$), 발아 일품 추출물은 첨가량이 많을수록 높게 평가되었다($p<0.05$). 단맛(sweetness)의 경우 발아 일품 추출물의 첨가량에 따라 차이가 없었던 반면($p>0.05$), 발아 신동진 추출물은 함량이 높았을 때 높게 평가되었다($p<0.05$). 향(flavor)의 경우 발아 신동와 일품 추출물 모두 첨가량에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 외관, 고소한 맛, 단맛 및 향과 전반적인 기호도를 바탕으로 신동진 및 일품 발아 벼 열수추출물을 이용한 음료 제조 시 추출물의 함량이 높을수록 높은 기호도를 기대할 수 있을 것이라 판단된다.

Table 6-9. The sensory evaluations of the beverages containing water extracts of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum* with different concentrations.

Items / Ratios		*Shindongjin*	*Ilpum*
Appearance	100	4.4^{a}	3.0^{aNS}
	80	4.0^{a}	2.6^{a*}
	60	4.2^{a}	1.9^{b**}
Nutty	100	3.5^{a}	3.0^{aNS}
	80	3.7^{a}	2.3^{b*}
	60	3.3^{a}	2.0^{b*}
Sweetness	100	2.9^{a}	2.4^{aNS}
	80	3.0^{a}	2.2^{a*}
	60	2.2^{b}	1.9^{aNS}
Flavor	100	3.4^{a}	2.6^{aNs}
	80	3.6^{a}	2.6^{aNS}
	60	3.2^{a}	2.3^{aNS}
Overall acceptance	100	4.0^{a}	3.1^{aNS}
	80	4.1^{a}	2.6^{a*}
	60	3.9^{a}	1.7^{b*}

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test.

$^{a-d}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

라. 캡슐 시제품 개발 및 품질특성 평가

활성물질을 가장 많이 함유된 발아최적조건 시험 결과에 따라 37℃에서 3일간 발아시킨 신동진과 일품 발아 벼를 세척한 후, 50℃의 건조기에서 15시간 동안 건조시켰다. 건조된 발아 벼는 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swtzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄하였다. 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡류 14종을 선식 부원료로 하여 발아벼 분말과 각각 5 : 30 (w/w), 10 : 25, 15 : 20으로 하여 혼합 후 이 선식 분말을 부형제 SiO_2(1%), 스테아린산 마그네슘(1.5%)과 혼합한 후, 500 mg 용량의 백색 불투명 경질캡슐(52A/52A)에 각각 충진하여 캡슐 시제품을 개발하였다(Fig. 6-9).

Fig. 6-9. The prototype capsules containing powders of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum*.

신동진 및 일품 발아 벼 분말을 이용하여 제조한 캡슐의 품질특성으로 이완밀도, 다짐밀도, 안식각 및 붕해도를 측정한 결과는 Table 6-10과 같다. 이완밀도(loose bulk density)의 경우 신동진과 일품 발아 벼 분말이 각각 0.427 g/cm^{3}와 0.439 g/cm^{3}로 나타나 품종간의 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 또한 다짐밀도(tapped bulk density)의 경우 이완밀도보다 증가하였으며, 발아 신동진과 일품 분말이 각각 0.625 g/cm^{3}과 0.641 g/cm^{3}로 나타나 역시 품종간의 차이는 보이지 않았다($p>0.05$). 안식각(angle of repose)의 경우 발아 신동진과 일품 분말이 각각 37.24 °와 38.79 °로 나타나 품종간의 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 발아 신동진과 일품 분말의 물리적 특성 평가 결과를 바탕으로 안식각이 크고 다짐밀도가 높은 것으로 보아 캡슐에 분말제품의 충진 시 충진불량, 밀봉불량 및 중량불량 등의 품질관리의 문제가 발생할 수 있을 것으로 예상되며, 이를 개선하기 위하여 적절한 부형제를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 붕해도(disintegration)의 경우 발아 신동진과 일품 캡슐 제품 모두 동일한 기재의 캡슐을 사용하였기 때문에 같이 나타내었다. 위액(pH 1.2) 조건하에서 캡슐은 약 2분경부터 캡슐기재가 용해되기 시작하여 5.52분 만에 완전히 용해되었으며, 장액(pH 6.8)의 조건하에서 캡슐은 동일하게 2분경부터 용해되기 시작하였지만, 위액의 조건보다 조금 늦은 6.75분에 완전히 용해되었다($p<0.05$). 붕해도는 캡슐의 기재에 따라 다를 수 있겠지만 일반적으로 사용하는 경질캡슐(52A/52A)의 경우 4~5분경에 완전히 용해되는 것으로 알려져 있다.

Table 6-10. The density, angle of repose and disintegration test of the capsule containing powders of germinated rough rice *Shindongjin* and *Ilpum*.

Test items		*Shindongjin*	*Ilpum*
Loose bulk density (g/cm^3)		0.427 ± 0.012	0.439 ± 0.023^{NS}
Tapped bulk density (g/cm^3)		0.625 ± 0.021	0.641 ± 0.019^{NS}
Angle of repose (°)		37.24 ± 2.42	38.79 ± 2.11^{NS}
Disintegration	Gastric juice (pH 1.2)	5.52 ± 0.24^{b}	
	Intestinal juice (pH 6.8)	6.75 ± 0.36^{a}	

$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ indicates significant differences between groups by Student's t-test. ^{NS} indicates no significant differences between groups by Student's t-test.

$^{a-d}$Any means in the same column followed by the different superscripts are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple test.

마. 왕겨 사용 식품에 대한 추가연구 필요성

왕겨는 다량의 식이섬유와 무기질을 함유하고 있어 식이섬유 공급원을 위한 식품소재로서 높은 가치가 있으나 국내에서 왕겨 섭취에 대한 근거가 부족하여 식품의약품안전처의 식품원료 데이터 베이스에 식품원료로서 사용이 금지되어 있다. 그러나 왕겨에 대한 기본 특성자료, 기존의 섭취에 대한 근거 제시 및 안전성 연구로 독성이나 부작용(소화장애 등)에 대한 연구가 이루어질 경우 식품원료 사용에 대한 재검토가 가능하며, 식품원료로 사용이 가능하게 된다면 주요성분인 회분(약 14%)과 식이섬유(약 50%) 공급원으로서 고부가가치의 식품소재로 활용이 가능하고, 본 연구의 결과를 활용하는 것에 있어 일반식품 원료로 사용하기 어려운 부분에 대한 문제점의 해결이 가능할 것으로 판단된다. 또한, 본 연구의 결과를 활용하기 위하여 발아벼 왕겨 추출물을 건강기능식품 원료로 사용하기 위한 연구로 안전성 평가가 요구되며, 왕겨 추출물은 식경험이 없는 원료에 해당되어 단회투여독성실험, 3개월 반복투여독성시험 및 유전독성시험을 통하여 안전성을 검증하고, 기능성 인증을 위한 전임상 및 임상시험을 통하여 기능성을 검증한다면 개별인정형 건강기능식품원료로 활용하는 것이 가능할 것으로 판단된다.

제7절 발아 벼를 이용한 시제품의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가

1. 연구방법

가. 실험재료 및 추출물 제조

발아 벼 함유 시제품(분말, 선식, 음료 및 캡슐)의 *in vitro* 항당뇨 효능을 평가하기 위하여 에탄올 추출물을 제조하였다. 분말, 선식 및 캡슐 시제품의 경우 시료 20 g에 80% 에탄올 400 mL을 가한 후 1시간동안 상온에서 초음파 추출하였다. 이 추출물을 감압여과한 후 여과잔사에 다시 추출용매 400 mL을 가한 후 상기 추출 및 여과 과정을 2회 반복하여 실시하였다. 여과액은 40℃에서 감압농축하여 용매를 완전히 제거하고 동결건조하였으며, 음료의 경우에는 전처리 없이 동결건조한 후 −20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. α−Glucosidase 저해활성 평가

α−Glucosidase 저해활성은 Tibbot와 Skadsen (1996)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, α−Glucosidase과 ρ−nitrophenyl−α−D−glucopyranoside (ρNPG)는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 각각의 추출물 50 μL를 0.35 unit/mL α−glucosidase 효소액 100 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 1.5 mM ρNPG 50 μL를 가하여 37℃에서 20분간 반응시켰다. 1 M Na_2CO_3 1 mL을 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)을 계산하였으며, positive control로 acarbose (Sigma−Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

다. α−Amylase 저해활성 평가

α−Amylase 저해활성은 Lim 등(2005)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 각각의 추출물 125 μL에 12 unit/mL pancreatin 기원의 α−amylase 효소액 62.5 μL, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 62.5 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 1% starch를 125 μL 가하여 37℃에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 48 mM DNS (3,5−dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartrate in 0.5 M NaOH) 발색시약 125 μL를 넣고 100℃에서 15분간 끓여 발색을 시킨 후 충분히 냉각시키고, 이 반응액에 3배량의 증류수를 가한 후 ELISA를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)을 계산하였다.

라. Dipeptidyl peptidase−4 저해활성 평가

Dipeptidyl peptidase−4 (DPP−4) 저해활성은 DPP−4 Inhibitor Screening Kit (Cat. K780−100, Biovision Co., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 시험법에 따라 측정하였다. 즉, DPP−4 enzyme 1 μL와 enzyme buffer 49 μL를 혼합하여 enzyme buffer를 준비하고 DPP−4 Substrate 2 μL와 enzyme buffer 23 μL를 혼합하여 substrate 용액을 준비하였다. 96−Well

plate에 각각의 추출물 25 μL를 DPP-4 Enzyme buffer 50 μL와 혼합하여 37℃에서 10분간 전배양한 후 Substrate 용액 25 μL을 가하여 0~30분동안 37℃에서 kinetic 반응하여 360 nm와 460 nm의 흡광도를 측정하였고 저해율(%)을 계산하였다.

마. 3T3-L1 지방세포의 포도당 유입활성 평가

(1) 3T3-L1 지방세포 배양 및 분화 유도

3T3-L1 전지방세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포의 배양과 유지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 조건에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포가 80~90% confluence 되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기에서 세포를 모은 후 suspension 용액을 만들어 세포 배양용 6-well plate에서 confluent 상태까지 배양한 후 포화상태에 이른 것을 확인한 다음 48시간 더 배양하였다. 세포가 post-confluent하게 되면 IBMX (0.5 mM)와 dexamethasone (0.25 μM), insulin (5 μg/mL), 10% FBS를 첨가된 differentiation medium을 처리하여 분화를 유도하였다. 분화유도 2일 후에는 5 μg/mL의 insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였다. 그 후 4, 6일째 10% FBS DMEM으로 배양액을 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다.

(2) 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 유입활성 평가

배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 고농도 포도당 DMEM 용액으로 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 7~10일 사이에 포도당 흡수 실험을 포도당 유입 실험을 하였다. 분화가 유도된 지방세포를 PBS로 세척한 후 Serum-free DMEM으로 37℃에서 6시간 동안 배양한 후 Krebs Ringer Phospate Hepes buffer (KRPH buffer; 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.3 mM $CaCl_2$, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7.5)로 세척한 후에 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 대조구 및 시료를 희석하여 3T3-L1 지방세포내로의 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit (COSMO BIO CO., LTD, Tokyo, Japan)롤 사용하여 측정하였다. 즉, 2% BSA를 함유한 KRPH buffer에 시료와 1 uM insulin, 1 mM 2-Deoxyglucose를 같이 분화가 유도된 지방세포에 처리한 후 37℃에서 20분동안 배양한 다음 배지를 제거한 후 200 uM phloretin이 포함된 cooled PBS로 세척한다. 그 후, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 각 well에 3 mL 넣은 뒤 세포를 파쇄한다. Cell lyssate를 tube로 모아준 후 80℃에서 15분동안 열처리를 실시한 다음 4℃ 15,000×*g*로 20분동안 원심분리를 실시한 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨준 후 상등액을 1×sample diluent buffer (1:4)로 희석한 다음 kit 안의 solution을 사용해 2-Deoxyglucose Uptake Measurement kit 방법에 준하여 실험을 순차적으로 진행한 다음 420 nm, 25~30℃의

조건에서 30분동안 5분 간격의 kinetic 반응으로 흡광도를 측정하였다(Zou, Wang & Shen, 2005).

바. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA (Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다(p=0.05).

2. 연구결과

가. α-Glucosidase 저해활성

발아 벼 함유 시제품의 α-glucosidase 저해 활성을 20 mg/mL의 농도에서 측정한 결과는 Table 7-1과 같다. 신동진 및 일품 발아 벼 함유 분말 제품이 각각 42.04%와 37.47%로 가장 높은 저해활성을 보였으며, 선식의 경우 발아 벼의 함유량이 높아질수록 저해활성은 신동진과 일품 발아 벼 함유 제품이 각각 18.91~23.07%와 15.37~18.10%로 증가하였다. 음료의 경우에는 신동진과 일품 발아 벼 함유 제품이 각각 19.91%와 15.14%로 신동진 함유 제품이 높게 나타났다. 또한, 대조구로 사용된 acarbose는 10 mg/mL의 농도에서 64.89%의 저해활성을 보였다(data not shown).

Table 7-1. The α-glucosidase inhibition activities of prototypes containing the germinated rough rice with different cultivar.

Prototypes		*Shindongjin*	*Ilpum*
Powder		42.04 ± 0.11^{Aa}	37.47 ± 0.09^{Ba}
	5	18.91 ± 0.08^{Af}	15.37 ± 0.07^{Bde}
Sunsik	10	20.63 ± 0.04^{Ad}	15.75 ± 0.03^{Bd}
	15	23.07 ± 0.07^{Ac}	18.10 ± 0.04^{Bc}
Capsule		24.17 ± 0.05^{Ab}	22.07 ± 0.04^{Bb}
Beverage		19.91 ± 0.04^{Ae}	15.14 ± 0.03^{Be}

Results are expressed as the mean ± SD of triplicate samples (n=3). The concentration of sample was 20 mg/mL. Different capital and small letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) among cultivar and prototypes by Duncan's multiple range test, respectively.

나. α-Amylase 저해활성

발아 벼 함유 시제품의 α-amylase 저해 활성을 0.5 mg/mL의 농도에서 측정한 결과는 Table 7-2와 같다. 신동진 및 일품 발아 벼 함유 분말 제품이 각각 45.25%와 62.74%로 가장 높은 저해활성을 보였으며, 선식의 경우 발아 벼의 함유량이 높아질수록 저해활성은 신동진과 일품 벼 함유 제품이 각각 19.24~38.24%와 28.66~45.78%로 증가하였다. 캡슐과 음료의 경우에는 신동진과 일품 발아 벼 함유 제품이 각각 39.78%와 46.54% 및 14.92%와 25.76%로 일품 벼 함유 제품이 높게 나타났다.

Table 7-2. The α-amylase inhibition activities of prototypes containing the germinated rough rice with different cultivar.

Prototypes		*Shindongjin*	*Ilpum*
Powder		45.25 ± 0.12^{Ba}	62.74 ± 0.11^{Aa}
	5	19.24 ± 0.09^{Be}	28.66 ± 0.05^{Ae}
Sunsik	10	27.52 ± 0.07^{Bd}	33.21 ± 0.08^{Ad}
	15	38.24 ± 0.10^{Bc}	45.78 ± 0.12^{Ac}
Capsule		39.78 ± 0.09^{Bb}	46.54 ± 0.11^{Ab}
Beverage		14.92 ± 0.06^{Bf}	25.76 ± 0.07^{Af}

See the legend in Table 7-1. The concentration of sample was 0.5 mg/mL.

다. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 억제활성

발아 벼 함유 시제품의 DPP-4 저해 활성을 2 mg/mL의 농도에서 측정한 결과는 Table 7-3과 같다. 신동진 및 일품 발아 벼 함유 분말 제품이 각각 52.78%와 56.24%로 가장 높은 저해활성을 보였으며, 선식의 경우 발아 벼의 함유량이 높아질수록 저해활성은 신동진과 일품 벼 함유 제품이 각각 15.72~26.97%와 17.56~31.52%로 증가하였다. 캡슐과 음료의 경우에는 신동진과 일품 발아 벼 함유 제품이 각각 28.22%와 33.14% 및 9.25%와 11.26%로 일품 벼 함유 제품이 높게 나타났다.

Table 7-3. The dipeptidyl peptidase-4 inhibition activities of prototypes containing the germinated rough rice with different cultivar.

Prototypes		*Shindongjin*	*Ilpum*
Powder		52.78 ± 0.09^{Ba}	56.24 ± 0.10^{Aa}
	5	15.72 ± 0.05^{Be}	17.56 ± 0.05^{Ae}
Sunsik	10	20.11 ± 0.03^{Bd}	24.56 ± 0.02^{Ad}
	15	26.97 ± 0.05^{Bc}	31.52 ± 0.05^{Ac}
Capsule		28.22 ± 0.04^{Bb}	33.14 ± 0.07^{Ab}
Beverage		9.25 ± 0.01^{Bf}	11.26 ± 0.02^{Af}

See the legend in Table 7-1. The concentration of sample was 2 mg/mL.

라. 포도당 유입활성

발아 벼 함유 시제품의 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입 활성을 100 μg/mL의 농도에서 측정한 결과는 Fig. 7-1과 같다. 신동진 및 일품 발아 벼 함유 분말 제품이 각각 137.5%와 157.4%로 가장 높은 포도당 유입활성을 보였으며, 선식의 경우 발아 벼의 함유량이 높아질수록 유입활성은 신동진과 일품 벼 함유 제품이 각각 101.4~124.2%와 111.1~138.4%로 증가하였다. 캡슐과 음료의 경우에는 신동진과 일품 발아 벼 함유 제품이 각각 124.2%와 84.2% 및 135.5%와 101.%로 일품 벼 함유 제품이 높게 나타났다.

[*Shindongjin*] [*Ilpum*]

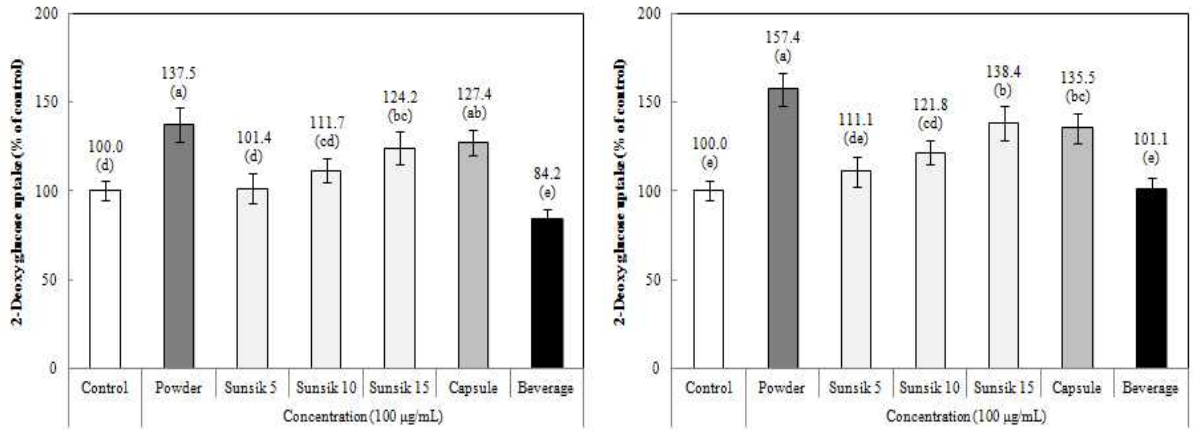


Fig. 7-1. Effects of prototypes containing the germinated rough rice powder of Shindongjin and Ilpum on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The small letters on the error bars means significant difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

제8절 시제품의 최적 제형 및 제조조건 선정

1. 연구방법

가. 선식 제품 개발

동물실험 결과 항당뇨 효능을 갖기 위한 발아 벼 왕겨와 싹을 포함한 분획(GIP-HS)의 인체적용량은 체중 60 kg의 성인이 1일 약 100 g으로 나타났으며, 경제성과 적용가능성을 바탕으로 선식 제품을 리뉴얼하고자 하였다. 따라서 37℃에서 3일간 발아시킨 일품 벼를 건조한 후 현미기를 사용하여 왕겨와 싹을 포함한 분획(HS 분획)과 현미(BR 분획)로 나누어 분리한 뒤, 분쇄기(Pin mill, Gyeyangsa, Incheon, Korea)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄하여 사용하였다. 발아 벼 HS 분획 분말 25 g에 부형제 10 g을 혼합한 후 외부사이즈 10 × 12 cm, 내부사이즈 8.5 × 10.5 cm인 Retort Pouch (Laminated aluminum foil film)에 35 g씩 충진한 후 밀봉하였다. 선식 부원료는 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡식 14종을 사용하여 시제품을 개발하였으며, 1일 섭취권장량은 4회 섭취(35 g × 1포 × 4회)로 결정하였다.

나. 선식 시제품의 품질특성 평가

선식 시제품의 입도는 분말시료 100 g을 60, 100, 120 및 140 mesh의 표준체로 체별하여 250>, 150, 125, <106 μm 크기별로 입도분포를 측정하였다. 색도는 색차계(Colorimeter CR-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명도(L), 적색도(a) 및 황색도(b)를 측정하였다. 물결합력은 시제품 분말 2 g에 증류수 20 mL을 가하고 교반기를 이용하여 1시간 동안 200 rpm으로 교반한 후 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 침전물의 무게를 측정하여 처음 시료량과의 중량비로 물 결합력을 계산하였다. 용해도 및 팽윤력은 항량을 측정한 원심분리관에 건조된 시제품 분말 2 g을 취하고 증류수 30 mL을 혼합하여 균질화한 후 80℃의 shaking water bath에서 200 rpm으로 30분간 가열 후 호화액을 원심분리(4,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 제거하고 침전물을 80℃에서 건조하여 건조 중량을 측정하여 용해도 및 팽윤력을 측정하였다. 관능평가는 기존 및 신규 선식 시제품 35 g을 식용수 200 g에 혼합한 후 본 실험에 흥미가 있고 차이식별능력이 있는 관능검사요원(20~50대, 남녀 혼성) 20명을 대상으로 실시하였다.

다. 집단특성

발아 벼 분말 및 선식 시제품의 집단특성으로 안식각, 이완 겉보기 밀도, 충격 겉보기 밀도 및 하우스너 비를 평가하였다. 안식각(Dynamic angle, °)은 깔때기를 통해 일시에 배출시킨 분말 시료는 원뿔모양으로 퇴적되는데, 이를 카메라로 촬영하고 그 영상을 Adobe photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) 프로그램을 이용하여 H와 D를 측정하

였으며, 다음의 식(1)을 이용하여 안식각을 구하였다(Park, Kim & Shin, 2005). 여기서 Θ_d는 안식각, H는 시료퇴적물의 높이, D는 시료퇴적물 밑변의 직경이다.

$$\Theta_d = \tan^{-1}(\frac{2H}{D}) \quad \text{식(1)}$$

분말 시료 30 g을 100 mL 메스실린더에 깔때기로 부어 넣은 다음의 밀도를 이완 겉보기 밀도(loosed bulk density, g/cm^3)로 하였고, 메스실린더를 5 cm 높이에서 60회 자연낙하 시킨 후의 밀도를 충격 겉보기 밀도(tapped bulk density, g/cm^3)로 하였으며, 하우스너 비(Hausner's ratio)는 다음 식들을 이용하여 계산하였다(Kang et al., 2012; Oh et al., 2013).

$$r_n = \frac{V_0 - V_n}{V_0} = \frac{abn}{1+bn} \quad \text{식(2)}$$

식(2)를 직선화시키면

$$\frac{n}{r_n} = \frac{1+bn}{abn} = \frac{1}{ab} + \frac{n}{a} \quad \text{식(3)}$$

이다. 하우스너 비는 다음과 같이 계산하였다.

$$H_R = \frac{\rho_T}{\rho_0} = \frac{1}{1-a} \quad \text{식(4)}$$

여기서 r_n은 n번 두드림 후의 부피변화율, n은 두드림 횟수, V_0는 초기부피(mL), V_n은 n번 두드림 후의 부피(mL), H_R은 하우스너 비, ρ_0는 초기 겉보기 밀도(g/cm^3), ρ_T는 충격 겉보기 밀도(g/cm^3)이고 a, b는 상수이다.

라. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램 (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA (Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다(p=0.05).

2. 연구결과

가. 선식 제품 개발

발아 벼 HS 분획 분말 25 g에 부형제 10 g을 혼합한 후 외부사이즈 10 × 12 cm, 내부사이즈 8.5 × 10.5 cm인 Retort Pouch (Laminated aluminum foil film)에 35 g씩 충진한 후 밀봉하였다. 선식 부원료는 당뇨병 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려진 현미, 보리, 찹쌀, 흑미, 콩, 율무, 기장, 수수 등의 곡식 14종을 사용하여 시제품을 개발하였으며, 1일 섭취권장량은 4회 섭취(35 g × 1포 × 4회)로

결정하였다.

나. 선식 제품의 입도

일품 발아 벼(original)와 그 HS 분획(renewal)을 함유한 선식 제품의 입도분포를 분석한 결과는 Fig. 8-1과 같다. 기존 제품과 신규 제품 모두 150~125 μm의 입도가 각각 51.20%과 48.23%로 가장 높은 비율을 보였으며, 150~125 μm의 입도는 각각 33.61%와 27.21%로 나타났다. 작은 입자 크기의 경우 기존 제품과 신규 제품에 유의적인 차이가 없었으나, 입도가 커질수록 차이를 보이고 있으며, 특히 250 μm 이상의 입자 크기를 갖는 비율이 신규 제품이 더 많이 나타났다. 이는 기존 제품보다 전분질의 함량이 적고 섬유질의 함량이 높아 분쇄성이 낮게 나타났기 때문이며, 제품의 섭취 시 용해도가 작아지고 이물감이 나타날 수 있으므로 입자 크기를 더 작게 분쇄하는 공정이 필요하다고 판단된다.

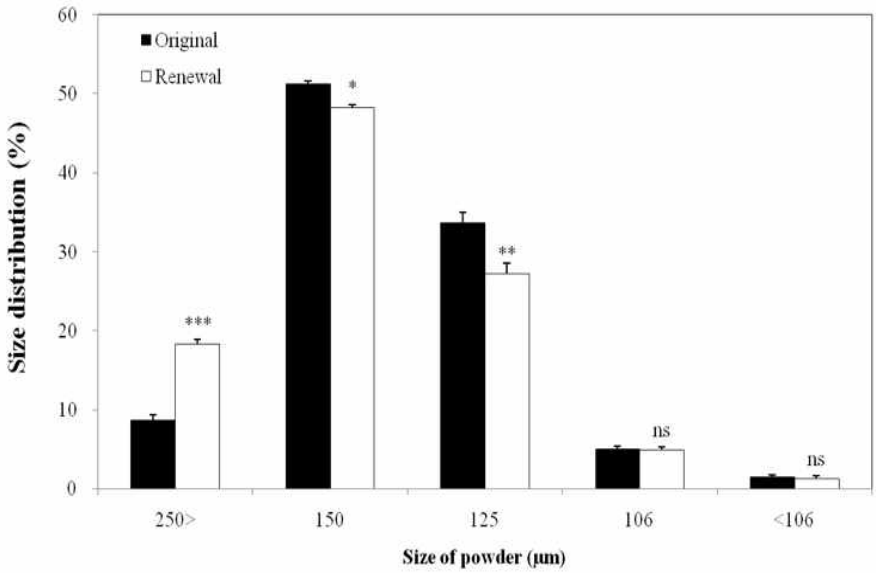


Fig. 8-1. The size distributions of germinated *Ilpum Sunsik* powders. Original : germinated rough rice powder + sub-material, Renewal : germinated rough rice hull and sprout powder + sub-material. *, **, *** and ^{ns} are indicates significant differences among factors by *t*-test and there are means $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ and *not significant*, respectively.

다. 선식 제품의 색도

일품 발아 벼(original)와 그 HS 분획(renewal)을 함유한 선식 제품의 색도를 분석한 결과는 Table 8-1과 같다. 기존 제품과 신규 제품의 명도를 나타내는 L값은 각각 99.88과 52.32로 큰 차이를 보였다 ($p<0.001$). 이는 명도가 낮은 발아 벼 HS 분획의 비율이 높기 때문으로 판단된다. 적색도를 나타내는 a값과 황색도를 나타내는 b값은 각각 -3.81과 -1.02 및 11.98과 11.78로 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 8-1. The color of germinated *Ilpum Sunsik* powders.

	Original	Renewal
Lightness (*L*)	99.88 ± 0.05	52.32 ± 1.25***
Redness (*a*)	-3.81 ± 0.01	-1.02 ± 0.16*
Yellowness (*b*)	11.98 ± 0.01	11.78 ± 0.18ns

Original : germinated rough rice powder + sub-material, Renewal : germinated rough rice hull and sprout powder + sub-material. *, **, *** and ns are indicates significant differences among factors by *t*-test and there are means $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ and *not significant*, respectively.

라. 선식 제품의 물결합력, 용해도 및 팽윤력

일품 발아 벼(original)와 그 HS 분획(renewal)을 함유한 선식 제품의 물결합력, 용해도 및 팽윤력을 분석한 결과는 Table 8-2와 같다. 물결합력의 경우 신규 제품이 295.23%로 기존 제품의 148.33% 보다 높게 나타났다($p<0.001$). 또한 팽윤력의 경우에도 신규 제품이 4.26%로 기존 제품의 2.29%보다 높았지만, 용해도는 기존 제품이 3.27%로 신규 제품의 1.48% 보다 높게 나타났다. 이는 신규 제품에 함유된 발아 벼 HS 분획이 다량의 식이섬유를 함유하고 있기 때문에 나타난 현상으로 판단되며, 복부 팽만감 및 장의 연동운동 증가로 인하여 다이어트에 도움을 줄 수 있으나 용해도가 감소하여 물에 용해 또는 분산시켜 섭취하는 선식 제품의 특성상 단점이 될 수 있으므로 분쇄도를 높여 입자의 크기를 줄일 수 있는 공정이 필요하다.

Table 8-2. The water binding capacity, solubility and swelling power of germinated *Ilpum Sunsik* powders.

	Original	Renewal
Water binding capacity (%)	148.33 ± 4.98	295.23 ± 5.26***
Solubility (%)	3.27 ± 0.16	1.48 ± 0.06**
Swelling power (%)	2.29 ± 0.15	4.26 ± 0.07**

Original : germinated rough rice powder + sub-material, Renewal : germinated rough rice hull and sprout powder + sub-material. *, **, *** and ns are indicates significant differences among factors by *t*-test and there are means $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ and *not significant*, respectively.

마. 선식 제품의 관능평가

일품 발아 벼(original)와 그 HS 분획(renewal)을 함유한 선식 제품의 관능평가를 실시한 결과는 Table 8-3과 같다. 기존 제품과 신규 제품은 고소한 맛과 단맛에 있어서 관능검사 요원들간의 유의적인 차이가 없었으나, 외관, 향, 목넘김과 전반적 기호도에서는 기존 제품이 더 좋게 평가되었다. 특히 목넘김에 있어서 신규 제품의 평가가 낮았으며, 이는 입자가 크고 용해도가 적어서 나타난 현상으로 판단된다.

Table 8-3. The sensory evaluation of germinated *Ilpum Sunsik* powders.

	Original	Renewal
Appearance	3.2	2.4^{*}
Nutty flavor	2.4	2.6^{ns}
Sweetness	1.7	2.0^{ns}
Smell	2.8	2.0^{*}
Feeling of throat	2.9	1.6*
Overall feeling	3.3	2.2*

Original : germinated rough rice powder + sub-material, Renewal : germinated rough rice hull and sprout powder + sub-material. *, **, *** and ^{ns} are indicates significant differences among factors by *t*-test and there are means $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ and *not significant*, respectively.

바. 발아 벼 분말 및 선식 제품의 집단 특성

식품분말의 밀도는 0.25~0.64 g/cm^{3}의 분포를 보이며 수분함량과 식품의 종류에 따라 다양하게 나타난다. 충격밀도와 이완밀도의 비로 나타낸 하우스너 비는 클수록 다져지는 특성이 강해 선식의 충진 시 호퍼의 진동운동에 의해 밀도가 증가할 수 있음을 의미하며 보다 적은 하우스너 비를 가지는 제품의 경우 불량률을 줄일 수 있을 것이다. 또한 두드림 횟수에 따른 부피변화식에서 상수인 a, b를 얻을 수 있으며, a는 응집성을 의미하기 때문에 a값이 작은 제품이 불량률을 줄일 수 있을 것이다. 발아 벼의 경우 발아온도와 기간이 증가하에 따라 안식각, 하우스너 비 및 a값이 커져 응집성이 강해진 다는 것을 알 수 있다(Table 8-4). 발아 벼 분말의 응집성을 낮추기 위하여 결정 cellulose를 부형제로 사용하여 제조한 발아 벼 선식의 경우 HS 분획에 비해 안식각, 하우스너 비 및 a값이 작아져 응집성이 개선되는 것으로 보였으나 물성에는 큰 차이를 보이지 않았다(Table 8-5). 따라서 발아 벼 분말을 이용한 선식 제품의 개발에 가공공정의 편의성과 효율성을 제고하고 불량을 줄이기 위해서는 보다 다양한 부형제 또는 이형제의 종류, 첨가량 등의 결정이 필요하다.

Table 8-4. Physical characteristics of hull &sprout fractions from germinated rough rice with different germination condition and sub-materials.

Germination		Dynamic angle (°)	Loosed bulk density (g/cm^3)	Tapped bulk density (g/cm^3)	Hausner ratio	Constant of equation	
Temp.	Period					a	b
Cereal powder		39.07 ± 3.10	0.321 ± 0.012	0.601 ± 0.000	1.873 ± 0.070	0.564 ± 0.035	0.085 ± 0.016
Cellulose		27.95 ± 1.94	0.683 ± 0.016	0.827 ± 0.013	1.211 ± 0.015	0.192 ± 0.022	0.164 ± 0.076
Hull &sprout		37.32 ± 1.74	0.411 ± 0.027	0.578 ± 0.000	1.410 ± 0.091	0.318 ± 0.055	0.203 ± 0.044
32	1	36.56 ± 3.05	0.389 ± 0.003	0.605 ± 0.007	1.557 ± 0.016	0.417 ± 0.023	0.117 ± 0.032
	2	39.44 ± 2.98	0.371 ± 0.026	0.613 ± 0.000	1.660 ± 0.112	0.547 ± 0.034	0.058 ± 0.032
	3	39.49 ± 2.57	0.309 ± 0.007	0.557 ± 0.010	1.803 ± 0.027	0.608 ± 0.009	0.047 ± 0.004
	4	40.79 ± 1.89	0.304 ± 0.003	0.550 ± 0.006	1.811 ± 0.036	0.622 ± 0.023	0.043 ± 0.004
35	1	37.07 ± 3.25	0.389 ± 0.008	0.609 ± 0.007	1.567 ± 0.015	0.415 ± 0.011	0.129 ± 0.019
	2	41.09 ± 2.13	0.347 ± 0.006	0.613 ± 0.000	1.769 ± 0.031	0.527 ± 0.026	0.083 ± 0.015
	3	34.23 ± 2.68	0.309 ± 0.004	0.557 ± 0.000	1.802 ± 0.021	0.609 ± 0.025	0.048 ± 0.006
	4	38.22 ± 2.87	0.301 ± 0.000	0.530 ± 0.005	1.765 ± 0.018	0.633 ± 0.023	0.036 ± 0.004
37	1	35.29 ± 2.85	0.365 ± 0.009	0.622 ± 0.007	1.704 ± 0.063	0.505 ± 0.046	0.079 ± 0.018
	2	33.06 ± 2.12	0.334 ± 0.010	0.593 ± 0.007	1.776 ± 0.049	0.571 ± 0.026	0.058 ± 0.006
	3	36.19 ± 3.24	0.322 ± 0.002	0.582 ± 0.007	1.807 ± 0.018	0.611 ± 0.035	0.049 ± 0.009
	4	42.99 ± 0.57	0.301 ± 0.000	0.537 ± 0.010	1.786 ± 0.032	0.629 ± 0.019	0.039 ± 0.003

Table 8-5. Physical characteristics of hull &sprout prototypes from germinated rough rice with different germination condition and sub-materials.

Germination		Dynamic angle (°)	Loosed bulk density (g/cm3)	Tapped bulk density(g/cm3)	Hausner ratio	Constant of equation	
Temp.	Period					a	b
Hull &sprout		39.94 ± 0.38	0.438 ± 0.011	0.647 ± 0.008	1.479 ± 0.049	0.365 ± 0.024	0.137 ± 0.046
32	1	36.69 ± 0.39	0.429 ± 0.009	0.647 ± 0.008	1.507 ± 0.034	0.405 ± 0.017	0.092 ± 0.015
	2	39.90 ± 0.71	0.394 ± 0.012	0.661 ± 0.008	1.679 ± 0.064	0.549 ± 0.023	0.049 ± 0.004
	3	37.72 ± 3.12	0.345 ± 0.008	0.608 ± 0.007	1.765 ± 0.041	0.597 ± 0.037	0.047 ± 0.007
	4	43.02 ± 2.71	0.334 ± 0.009	0.588 ± 0.007	1.760 ± 0.032	0.634 ± 0.030	0.039 ± 0.007
35	1	39.53 ± 0.57	0.423 ± 0.007	0.638 ± 0.008	1.507 ± 0.022	0.427 ± 0.017	0.071 ± 0.013
	2	42.15 ± 3.97	0.376 ± 0.010	0.638 ± 0.008	1.698 ± 0.064	0.571 ± 0.039	0.048 ± 0.006
	3	42.47 ± 3.17	0.337 ± 0.008	0.596 ± 0.007	1.770 ± 0.040	0.613 ± 0.043	0.044 ± 0.012
	4	40.18 ± 1.57	0.326 ± 0.007	0.577 ± 0.006	1.771 ± 0.021	0.613 ± 0.010	0.042 ± 0.005
37	1	39.74 ± 3.26	0.392 ± 0.005	0.642 ± 0.000	1.638 ± 0.021	0.488 ± 0.012	0.071 ± 0.005
	2	39.14 ± 3.28	0.368 ± 0.009	0.629 ± 0.000	1.708 ± 0.042	0.541 ± 0.014	0.062 ± 0.016
	3	39.46 ± 0.56	0.351 ± 0.004	0.625 ± 0.007	1.779 ± 0.030	0.578 ± 0.010	0.054 ± 0.004
	4	39.05 ± 1.05	0.327 ± 0.002	0.593 ± 0.013	1.823 ± 0.048	0.679 ± 0.022	0.034 ± 0.004

사. 발아 벼 선식 시제품의 품질 특성

발아조건에 따른 일품 발아 벼 HS 분획과 부형제로서 결정 셀룰로오스, 혼합곡물 분말을 이용하여 제조한 발아 벼 선식 시제품의 품질특성으로 물결합력, 용해도 및 팽윤력을 분석한 결과 Table 8-6과 같다. 물결합력의 경우 무발아 벼 HS 분획은 202.21%로 낮게 나타났으며, 발아가 진행됨에 따라 물결합력은 증가하는 경향을 보여 251~300%의 범위를 보였다. 용해도의 경우 무발아 벼 HS 분획은 17.16%로 낮게 나타났으며, 발아가 진행됨에 따라 용해도 역시 증가하여 20~31%의 범위를 보였다. 팽윤력의 경우 무발아 벼 HS 분획은 0.905%이었으나 발아가 진행됨에 따라 증가하여 0.918~0.956% 범위로 증가하였다.

Table 8-6. The water binding capacity, solubility and swelling power of hull &sprout prototypes from germinated rough rice with different germination condition and sub-materials.

Germination		Water binding capacity (%)	Water solubility (%)	Swelling power (%)
Temp.	Period			
Hull & sprout		202.21 ± 17.29	17.16 ± 0.50	0.905 ± 0.003
32	1	253.81 ± 7.73	19.98 ± 0.79	0.919 ± 0.007
	2	255.79 ± 6.35	23.68 ± 0.96	0.919 ± 0.015
	3	296.12 ± 5.04	26.69 ± 1.36	0.949 ± 0.000
	4	299.91 ± 3.23	26.27 ± 1.82	0.941 ± 0.017
35	1	258.78 ± 6.22	21.66 ± 0.41	0.918 ± 0.033
	2	251.26 ± 4.73	24.98 ± 1.24	0.946 ± 0.009
	3	284.67 ± 3.08	25.41 ± 0.39	0.942 ± 0.004
	4	273.39 ± 7.20	30.19 ± 1.01	0.954 ± 0.014
37	1	289.69 ± 11.85	22.18 ± 1.28	0.942 ± 0.007
	2	279.95 ± 11.80	22.94 ± 0.26	0.939 ± 0.018
	3	294.77 ± 4.18	24.33 ± 0.47	0.934 ± 0.020
	4	272.41 ± 10.39	30.69 ± 2.13	0.956 ± 0.008

제9절 대량생산공정 확립 및 저장 안정성 평가

1. 연구방법

가. 실험재료 및 발아

실험에 사용된 벼는 2013년도에 충북 증평에서 생산된 한국산의 일반 벼 품종인 일품(*Oryza sativa* L.; *Ilpum*)을 구매하여 실험에 사용하였다. 발아는 Lee 등(2008)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 벼를 물로 수차례 수세하며 이물질을 제거하고 물을 1일 2회씩 교환하며 암소에서 3일간 침지시켰다. 온도(37℃)와 상대습도(85%)가 유지되는 발아기(WGC-450, Dahan Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 6일간 발아시켰으며, 1일 2회씩 세척하였다. 발아시키지 않은 벼를 대조구(무발아)로 하였으며, 무발아 및 발아 벼는 50℃의 열풍건조기(WFO-459PD, EYELA, Tokyo, Japan)에서 2일간 건조시켜 시료로 사용하였다.

나. 발아 벼의 부위별 분리 및 추출물 제조

건조된 무발아 및 발아 벼는 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨와 싹을 혼합한 분획(hull & sprout; HS)과 현미(Brown rice; BR)로 나누어 분리한 뒤, 분쇄기(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Switzerland)를 사용하여 80 mesh의 크기로 분쇄한 후 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 시료 중에 함유된 유용성분을 추출하기 위해 물 및 에탄올 추출물을 제조하였다. 물 및 에탄올 추출은 각각 시료 중량 대비 10배의 증류수와 80% 에탄올(v/v)를 첨가하여 80℃에서 3시간동안 환류추출하고, 이 추출물을 감압여과, 진공농축 및 동결건조한 후 -20℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

다. 유리형 및 결합형 폴리페놀 함량 측정

유리형 폴리페놀 함량은 Sun 등(2002)의 방법으로 분석하였다. 즉, 발아 벼 분말 시료 약 0.5 g을 50 mL의 차가운 acidic methanol (95% methanol : 1 M HCl = 85 : 15)을 가한 후 균질하였다(10,000 rpm, 5 min). 추출액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 여과한 후 45℃에서 용매를 완전히 제거하였다. 농축액을 acidic methanol 10 mL로 재용해한 후 분석시료로 사용하였다.

결합형 폴리페놀 함량은 Sun 등(2002)의 방법으로 분석하였다. 즉, 유리형 폴리페놀을 측정하기 위하여 제조한 추출물의 침전물에 40 mL의 2 M NaOH를 가한 후 상온에서 1시간동안 알칼리 가수분해하였다. 가수분해물을 동량의 hexane으로 분획하여 지질을 제거한 후 HCl을 이용하여 pH 7.0으로 중화시켰다. 이 추출물을 50 mL의 ethyla acetate로 5회 분획한 후 ethyl acetate 분획을 모아 농축하여 용매를 완전히 제거하고 증류수 10 mL에 재용해하여 분석시료로 사용하였다.

라. 유리형 및 결합형 페놀산 함량 측정

유리형과 결합형 폴리페놀 분석을 위해 사용된 시료를 0.45 μm membrane filter로 여과하여 함량 분석에 사용하였다. 페놀산의 정량분석은 HPLC system(Acme 9100 series)를 사용하였다. 즉, 분석에 사용된 칼럼은 ODS column (5 μm, 46×250 mm, Agilent Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, USA)을 사용하였으며, 0.1% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 용출용매 (A)로, 0.1% acetic acid가 함유된 water를 용출용매 (B)로 설정한 후 A와 B의 비율을 초기에 8 : 92, 2분까지 10 : 90, 27분까지 30 : 70, 50분까지 90 : 10, 51분까지 100 : 0, 60분까지 100 : 0, 70분까지 8 : 92로 설정하였다. 메탄올에 재용해시킨 활성분획을 10 μL 주입한 후 전개용매를 1.0 mL/min의 유속으로 용출시켰으며, 280 nm에서 검출하였다(Ti et al., 2014).

마. 발아 벼 추출물의 저장성 평가

일품 발아 벼로부터 정제한 활성분획(C5)의 온도, 빛 및 pH에 대한 안정성을 지표물질인 ferulic acid의 함량 변화로 평가하였다. 우선 온도의 영향을 알아보기 위하여 일정농도로 제조한 활성분획을 갈색 바이알에 담은 후 −70, −18, 4 및 37℃에서 30일간 저장하며 지표물질 함량을 분석하였다. 빛에 의한 영향은 일정농도의 활성분획을 투명 및 갈색 바이알에 담은 후 상온(25℃)에서 30일간 저장하며 지표물질 함량을 분석하였다. pH에 의한 영향은 pH 2, 4, 6, 8 및 10의 조건으로 제조한 용매로 활성분획을 희석한 후 갈색 바이알에 담아 상온(25℃)에서 30일간 저장하며 지표물질의 함량을 분석하였다.

바. 발아 벼 선식 시제품의 저장성 평가

일품 발아 벼를 이용하여 제조한 선식 시제품의 포장재질과 저장온도에 따른 저장성을 지표물질인 ferulic acid의 함량 변화로 평가하였다. 포장재질은 polyethylene (PE), aluminum laminated polyethylene (PEL), aluminum (Al) 및 polyehylene tetraphthalate (PET)를 사용하여 25℃와 37℃에서 60일간 저장하며 지표물질의 함량을 분석하였다.

사. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램 (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA (Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다($p=0.05$).

2. 연구결과

발아 벼를 이용한 선식 제품의 대량생산 시 품질관리 요소인 지표물질의 변화양상을 규명하기 위하여 발아 전후, 부위별, 추출물을 비롯한 정제단계에서의 지표물질 함량을 관찰하였으며, 발아 벼 추출물 및 시제품의 저장 안정성을 평가하였다.

가. 발아에 따른 유리형 및 결합형 폴리페놀 함량

발아 유무와 부위별 폴리페놀 함량을 평가한 결과는 Table 9-1과 같다. 총 폴리페놀 함량의 경우 발아 전 현미에 4.44 mg/g, 왕겨에 20.86 mg/g으로 왕겨에 다량 분포하는 것을 알 수 있으며, 유리형보다 결합형으로 존재하는 것으로 나타났다. 발아에 의해 총 폴레페놀 함량은 25.30 mg/g에서 29.41 mg/g으로 증가하였으며, 유리형의 폴리페놀 함량 비율이 증가하였다. 이는 발아에 의해 활성화된 다양한 효소들에 의하여 결합형의 폴리페놀이 유리형으로 분해되었기 때문으로 판단된다.

Table 9-1. Free, bound and total polyphenol content of rough rice before and after germination.

Germination	Part	Polyphenol content (mg/g)		
		Free	Bound	Total
Before	Brown rice	0.37 ± 0.01	4.07 ± 0.13	4.44 ± 0.08
	Hull	1.49 ± 0.08	19.37 ± 0.24	20.86 ± 0.11
	Whole grain	1.86 ± 0.07	23.44 ± 0.18	25.30 ± 0.21
After	Brown rice	0.73 ± 0.05	3.15 ± 0.04	3.88 ± 0.09
	Hull &sprout	4.31 ± 0.12	21.22 ± 0.15	25.53 ± 0.14
	Whole grain	5.04 ± 0.09	24.37 ± 0.13	29.41 ± 0.11

나. 발아에 따른 유리형 및 결합형 페놀산 조성

발아 유무와 부위별 페놀산 조성을 평가한 결과는 Table 9-2와 같이 총 폴리페놀 함량의 변화와 마찬가지로 발에 후 전체 페놀산 조성의 총량이 증가하였다. 주요한 페놀산은 coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid로 발아 전 왕겨 분획에 47.06 μg/g, 117.71 μg/g 및 144.90 μg/g의 함량을 보였으며, 발아에 의해 65.65 μg/g, 157.19 μg/g 및 205.62μg/g으로 증가하였다. 이는 발아에 의해 활성화된 다양한 효소들에 의하여 결합형의 폴리페놀이 유리형으로 분해되었기 때문으로 판단된다. 또한 발아 과정 중 phenylalanine으로부터 cinnamic acid가 생성되고 이로부터 benzoic acid와 *p*-coumaric acid가 유도되며 다양한 페놀산들이 생성되는 shikimic acid pathway가 활성화되어 다양한 페놀산들이 생성되는 것으로 판단된다.

Table 9-2. Free, bound and total phenolic acid content of rough rice before and after germination.

Germination	Part	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
			Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	*p*-Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
Before	Brown rice	Free	0.15	0.75	0.09	0.57	0.21	1.76	1.32	4.84
		Bound	1.47	7.37	0.84	5.60	29.72	17.23	12.96	75.19
		Total	1.62	8.12	0.93	6.17	29.93	18.99	14.28	80.03
	Hull	Free	0.74	2.31	0.48	3.23	2.47	9.95	7.48	26.66
		Bound	10.04	31.35	6.57	43.83	115.24	134.95	101.50	443.49
		Total	0.66	33.66	7.06	47.06	117.71	144.90	108.98	460.03
	Whole grain	Free	0.89	3.06	0.57	3.80	2.68	11.70	8.80	31.50
		Bound	11.51	38.71	7.41	49.43	144.96	152.19	114.47	518.68
		Total	2.28	41.77	7.98	53.23	147.64	163.89	123.27	540.06
After	Brown rice	Free	0.58	1.47	0.38	2.00	2.10	6.87	1.59	14.99
		Bound	1.44	7.22	0.82	5.49	29.13	16.89	12.70	73.69
		Total	2.02	8.68	1.20	7.48	31.23	23.76	14.29	88.67
	Hull &sprout	Free	2.81	7.16	1.86	9.76	10.26	33.56	7.76	73.17
		Bound	12.80	39.97	8.38	55.88	146.93	172.07	129.42	565.45
		Total	15.62	47.13	10.24	65.65	157.19	205.62	137.18	638.62
	Whole grain	Free	3.39	8.63	2.24	11.76	12.36	40.43	9.35	88.16
		Bound	14.25	47.18	9.21	61.37	176.06	188.96	142.12	639.14
		Total	17.64	55.81	11.45	73.13	188.42	229.39	151.47	727.30

다. 추출 및 정제과정에 따른 유리형 및 결합형 페놀산 조성 변화

일품 발아 벼의 에탄올 추출물 및 그 용매분획물의 유리형 및 결합형 페놀산 조성 변화는 Table 9-3과 같다. 에탄올 추출물에는 ferulic acid, trans-cinnamic acid 및 kaempferol이 각각 157.19 μg/g, 205.62 μg/g 및 137.18 μg/g으로 나타났다. 극성이 높은 gallic acid는 부탄올과 물 분획으로 이행되는 양이 많았으며, 그 밖의 대부분의 페놀산들은 클로로포름과 에틸아세테이트 분획으로의 이행량이 많게 나타났다. 헥산 분획물을 C18 레진으로 정제한 분획물들의 경우 C5 분획으로 160.42 μg (66.7%)의 총 페놀산을 함유되어 있는 것으로 나타났다(Table 9-4). C5 분획을 Diaion HP-20 ion exchange resin으로 정제하여 얻은 분획물들에서는 메탄올로 용출시킨 D3 분획에서 약 50%의 총 페놀산이 검출되었다(Table 9-5). D3 분획을 C18 column을 장착한 preparative HPLC로 정제하여 얻은 분획물들 중 P3 분획물에서 약 52%의 총 페놀산이 이행되었다(Table 9-6). P3 분획을 gel filtration column이 장착된 recycling HPLC를 이용하여 정제한 분획물 중 R1 분획물에서 76.6%의 총 페놀산이 검출되었다(Table 9-7). 여러 단계의 정제과정을 거치면서 중극성을 갖는 ferulic acid, cinnamic acid 및 kaempferol 등의 주요 페놀산들이 농축되는 효과를 얻었다.

Table 9-3. Free, bound and total phenolic acid content of solvent fractions from germinated rough rice extract.

Fractions	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
		Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
GIP-HS_E	Free	2.81	7.16	1.86	9.76	10.26	33.56	7.76	73.17
	Bound	12.80	39.97	8.38	55.88	146.93	172.07	129.42	565.45
	Total	15.62	47.13	10.24	65.65	157.19	205.62	137.18	638.62
GIP-HS_E_H	Free	0.90	2.29	0.59	3.12	3.28	10.74	2.48	23.42
	Bound	4.10	12.79	2.68	17.88	47.02	55.06	41.41	180.94
	Total	5.00	15.08	3.28	21.01	50.30	65.80	43.90	204.36
GIP-HS_E_C	Free	0.59	1.50	0.39	2.05	2.15	7.05	1.63	15.37
	Bound	2.69	8.39	1.76	11.74	30.86	36.13	27.18	118.74
	Total	3.28	9.90	2.15	13.79	33.01	43.18	28.81	134.11
GIP-HS_E_E	Free	0.79	2.01	0.52	2.73	2.87	9.40	2.17	20.49
	Bound	3.58	11.19	2.35	15.65	41.14	48.18	36.24	158.33
	Total	4.37	13.20	2.87	18.38	44.01	57.57	38.41	178.81
GIP-HS_E_B	Free	0.31	0.79	0.20	1.07	1.13	3.69	0.85	8.05
	Bound	1.41	4.40	0.92	6.15	16.16	18.93	14.24	62.20
	Total	1.72	5.18	1.13	7.22	17.29	22.62	15.09	70.25
GIP-HS_E_W	Free	0.23	0.57	0.15	0.78	0.82	2.68	0.62	5.85
	Bound	1.02	3.20	0.67	4.47	11.75	13.77	10.35	45.24
	Total	1.25	3.77	0.82	5.25	12.58	16.45	10.97	51.09

Table 9-4. Free, bound and total phenolic acid content of C18 column chromatography fractions from germinated rough rice extract.

Fractions	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
		Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
GIP-HS_E_H	Free	0.90	2.29	0.59	3.12	3.28	10.74	2.48	23.42
	Bound	4.10	12.79	2.68	17.88	47.02	55.06	41.41	180.94
	Total	5.00	15.08	3.28	21.01	50.30	65.80	43.90	204.36
GIP-HS_E_H_C1~4	Free	0.19	0.49	0.13	0.67	0.71	2.31	0.53	5.03
	Bound	0.88	2.75	0.58	3.84	10.11	11.84	8.90	38.90
	Total	1.07	3.24	0.70	4.52	10.81	14.15	9.44	43.94
GIP-HS_E_H_C5	Free	0.71	1.80	0.47	2.45	2.58	8.43	1.95	18.38
	Bound	3.22	10.04	2.11	14.04	36.91	43.22	32.51	142.04
	Total	3.92	11.84	2.57	16.49	39.49	51.65	34.46	160.42

Table 9-5. Free, bound and total phenolic acid content of Diaion HP-20 ion exchange chromatography fractions from germinated rough rice extract.

Fractions	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
		Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
GIP-HS_E_H_C5	Free	0.71	1.80	0.47	2.45	2.58	8.43	1.95	18.38
	Bound	3.22	10.04	2.11	14.04	36.91	43.22	32.51	142.04
	Total	3.92	11.84	2.57	16.49	39.49	51.65	34.46	160.42
GIP-HS_E_H_C5_D1	Free	0.16	0.40	0.10	0.54	0.57	1.87	0.43	4.07
	Bound	0.71	2.22	0.47	3.11	8.17	9.57	7.19	31.43
	Total	0.87	2.62	0.57	3.65	8.74	11.43	7.63	35.50
GIP-HS_E_H_C5_D2	Free	0.06	0.16	0.04	0.22	0.24	0.77	0.18	1.68
	Bound	0.29	0.92	0.19	1.28	3.38	3.95	2.97	13.00
	Total	0.36	1.08	0.24	1.51	3.61	4.73	3.15	14.68
GIP-HS_E_H_C5_D3	Free	0.36	0.91	0.24	1.24	1.30	4.26	0.99	9.30
	Bound	1.63	5.08	1.06	7.10	18.66	21.86	16.44	71.83
	Total	1.98	5.99	1.30	8.34	19.97	26.12	17.43	81.13
GIP-HS_E_H_C5_D4	Free	0.06	0.16	0.04	0.22	0.24	0.77	0.18	1.68
	Bound	0.29	0.92	0.19	1.28	3.38	3.95	2.97	13.00
	Total	0.36	1.08	0.24	1.51	3.61	4.73	3.15	14.68

Table 9-6. Free, bound and total phenolic acid content of Prep. HPLC fractions from germinated rough rice extract.

Fractions	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
		Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
GIP-HS_E_H_C5_D3	Free	0.36	0.91	0.24	1.24	1.30	4.26	0.99	9.30
	Bound	1.63	5.08	1.06	7.10	18.66	21.86	16.44	71.83
	Total	1.98	5.99	1.30	8.34	19.97	26.12	17.43	81.13
GIP-HS_E_H_C5_D3_P1	Free	0.02	0.07	0.01	0.09	0.22	0.29	0.19	0.89
	Bound	0.07	0.21	0.05	0.29	0.69	0.91	0.61	2.82
	Total	0.09	0.27	0.06	0.38	0.91	1.19	0.80	3.71
GIP-HS_E_H_C5_D3_P2	Free	0.13	0.40	0.09	0.56	1.33	1.74	1.16	5.40
	Bound	0.17	0.51	0.11	0.71	1.69	2.21	1.48	6.88
	Total	0.30	0.91	0.20	1.26	3.02	3.95	2.64	12.28
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3	Free	0.78	2.36	0.51	3.29	7.88	10.31	6.88	32.03
	Bound	0.29	0.87	0.19	1.22	2.92	3.81	2.54	11.85
	Total	1.07	3.24	0.70	4.51	10.80	14.13	9.42	43.87
GIP-HS_E_H_C5_D3_P4	Free	0.08	0.24	0.05	0.33	0.79	1.03	0.69	3.19
	Bound	0.44	1.33	0.29	1.86	4.45	5.82	3.88	18.07
	Total	0.52	1.57	0.34	2.19	5.23	6.85	4.57	21.26

Table 9-7. Free, bound and total phenolic acid content of Re. HPLC fractions from germinated rough rice extract.

Fractions	Form	Phenolic acid content (μg/g)							
		Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3	Free	0.78	2.36	0.51	3.29	7.88	10.31	6.88	32.03
	Bound	0.29	0.87	0.19	1.22	2.92	3.81	2.54	11.85
	Total	1.07	3.24	0.70	4.51	10.80	14.13	9.42	43.87
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R1	Free	0.60	1.81	0.39	2.52	6.04	7.90	5.27	24.53
	Bound	0.22	0.67	0.15	0.93	2.23	2.92	1.95	9.07
	Total	0.82	2.48	0.54	3.45	8.27	10.82	7.22	33.60
GIP-HS_E_H_C5_D3_P3_R2	Free	0.18	0.55	0.12	0.77	1.85	2.42	1.61	7.50
	Bound	0.07	0.20	0.04	0.29	0.68	0.89	0.60	2.77
	Total	0.25	0.76	0.16	1.06	2.53	3.31	2.21	10.27

라. 유리형 및 결합형 페놀산 함량과 포도당 유입활성의 상관관계

일품 발아 벼의 에탄올 추출물을 여러 단계의 정제과정을 거치면서 얻은 분획물들에 대하여 3T3-L1 지방세포에 대한 포도당 유입활성을 평가하였고, 분획물들에 존재하는 유리형 및 결합형 페놀산의 조성을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 각 분획물에서의 포도당 유입활성과 페놀산 함량과의 상관관계를 분석한 결과는 Table 9-8과 같다. 결합형의 페놀산은 종류에 상관없이 포도당 유입활성과 유의적인 상관관계를 보이지 않았으나, gallic acid와 ferulic acid의 유리형과 총 함량은 포도당 유입활성과 양의 상관관계를 보였다. 특히 ferulic acid의 경우 유리형이 0.956 ($p<0.01$), 총 함량이 0.942 ($p<0.01$)로 높은 양의 상관관계를 보여 포도당 유입활성과 상관성이 높은 것으로 나타났다. 이에 따라 발아 벼로부터 추출 및 정제하여 얻어진 ferulic acid는 3T3-L1 지방세포로의 포도당을 유입시켜 항당뇨 효능을 갖는 지표물질로 적합하다고 판단된다.

Table 9-8. Correlation analysis among glucose uptake activity, free, bound and total phenolic acid content of germinated rough rice extract.

Form	Phenolic acid content (μg/g)							
	Gallic acid	Catechin	Caffeic acid	Coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Kaempferol	Total
Free	0.928**	0.412	0.385	0.451	0.956**	0.515	0.498	0.854**
Bound	0.518	0.305	0.312	0.322	0.624	0.367	0.361	0.441
Total	0.912*	0.408	0.362	0.415	0.942**	0.492	0.412	0675*

* : $P<0.05$, **: $P<0.01$

마. 발아 벼 추출물의 저장성 평가

발아 벼 추출물 중 활성분획인 C5 분획의 온도, 빛, pH에 대한 저장특성을 평가하였다. 우선 온도에 대한 영향을 알아보기 위하여 일정농도로 제조한 C5 분획을 갈색 바이알에 담고 -70, −18, 4 및 37℃에서 30일간 저장한 결과 -70℃와 -18℃ 저장조건에서는 저장기간 30일까지 94.58%와 92.14%의 지료물질(ferulic acid)이 보전되는 것으로 나타났으며, 37℃ 저장조건에서는 20일의 90.73% ($p<0.05$), 25일의 82.93% ($p<0.001$), 30일의 75.22% ($p<0.001$)로 급격하게 감소하였다(Fig. 9−1 [A]). 빛에 대한 노출효과를 알아보기 위하여 C5를 각각 갈색과 투명 바이알에 담고 빛에 노출된 조건에서 30일간 저장한 결과 빛에 노출된 조건에서는 5일의 92.75%부터 급격하게 감소하여 20일에는 51.75%까지 감소하였으며, 30일에는 47.42%로 감소하여 광분해효과가 큰 것으로 나타났다(Fig. 9−1 [B]). pH 2~10으로 제조한 용매에 적정농도로 희석한 C5 분획을 상온에서 30일간 저장하며 pH에 의한 효과를 알아본 결과 pH 6 처리구에서는 25일까지도 90% 이상의 잔존율을 보였으나 pH 8 처리구는 15일의 85.45%로 급격히 감소하였다. pH 4 처리구에서는 저장 10일까지 74.45%로 급감하였으나 이후 30일까지 68.54%로 유지되었으며, pH 2 처리구는 저장 0일차에 84.25%로 급감하여 산성조건에서의 안정성이 매우 낮은 것으로 나타났다(Fig. 9−1 [C]). 저장온도에 따른 활성분획의 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 유입활성은 저장온도에 대해 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 9−1 [D]).

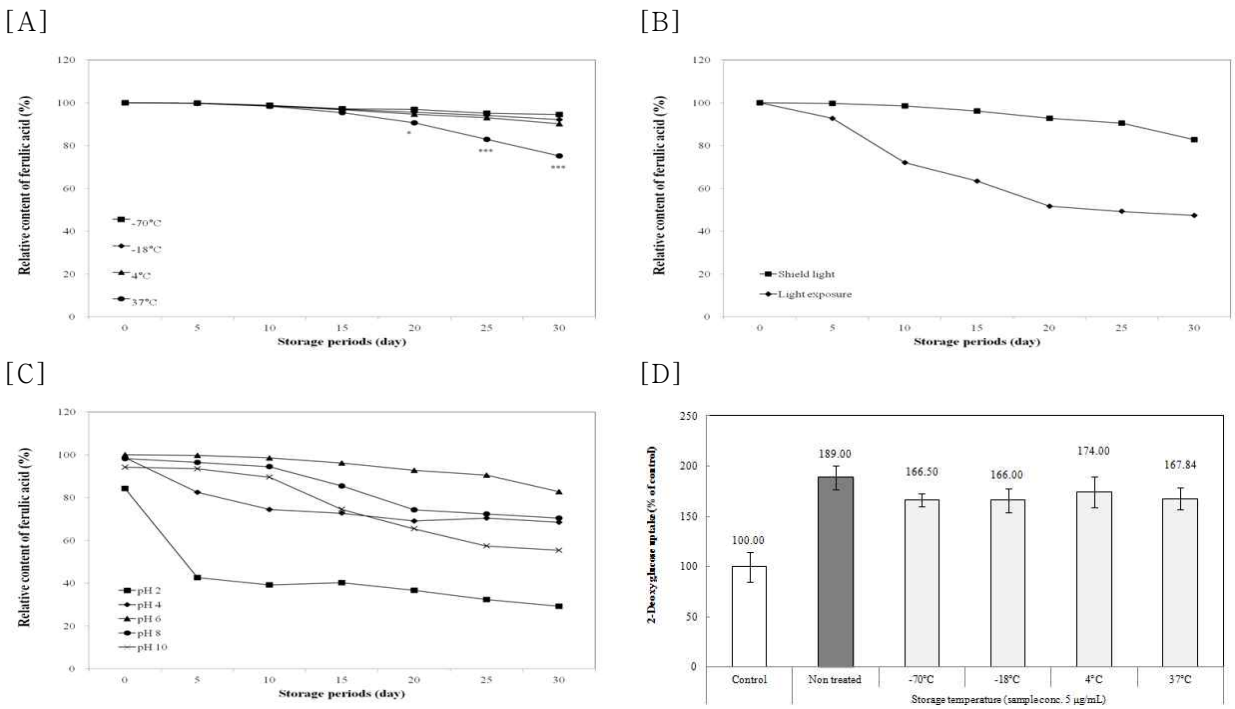


Fig. 9−1. Changes in ferulic acid content and glucose uptake activity of active fraction (GIP−HS_E_H_C5) from germinated rough rice with different storage conditions. [A] with different storage temperatures and periods, [B] with exposed a light or kept in dark, [C] with different pH values, [D] glucose uptake assay

바. 발아 벼 선식 시제품의 저장성 평가

발아 벼 분말을 첨가한 선식 시제품의 포장재질 및 저장온도에 따른 저장성을 평가하기 위하여 일반적인 선식의 포장 및 섭취형태를 고려하여 polyethylene (PE), aluminum laminated polyethylene (PEL) 및 aluminum foil (Al)에는 선식 35 g을 1단위로 포장하였으며, polyethylene tetraphthalate (PET)에는 500 g을 1단위로 포장하여 저장하여 60일동안 지표물질인 ferulic acid 함량을 평가하였다(Fig. 9-2). 초기 발아 벼 선식 제품의 지표물질인 ferulic acid 함량은 11.35 μg/g이었다. Al 포장의 경우 25℃ 저장 시 저장기간 60일까지 11.12 μg/g으로 변화가 없었으며, 37℃ 저장 시 60일에 10.57 μg/g으로 소폭 감소하여 저장성이 가장 우수한 것으로 나타났다. PE와 PEL의 경우에는 25℃ 저장 시 저장 60일까지 10.11 μg/g과 9.46 μg/g으로 감소하였으며, 37℃ 저장 시 8.41 μg/g과 8.98 μg/g으로 감소하였다. PET 저장의 경우 샘플링을 위하여 제품을 열고 닫는 과정에서 유입된 산소와의 반응으로 저장성이 감소하였다. 25℃ 저장 시 15일의 9.78 μg/g으로 감소하였고 60일에는 7.45 μg/g으로 감소하였다. 37℃ 저장 시 저장 초기부터 감소하기 시작하였으며 저장 60일에 6.54 μg/g으로 크게 감소하였다. 따라서 발아 벼 선식의 지표물질인 ferulic acid의 안정성을 고려할 때 Al 개별포장이 가장 우수하며 PET 다량 포장의 경우 이중포장이나 방습제 첨가 등을 통한 안정성을 높이기 위한 방안 모색이 필요하다.

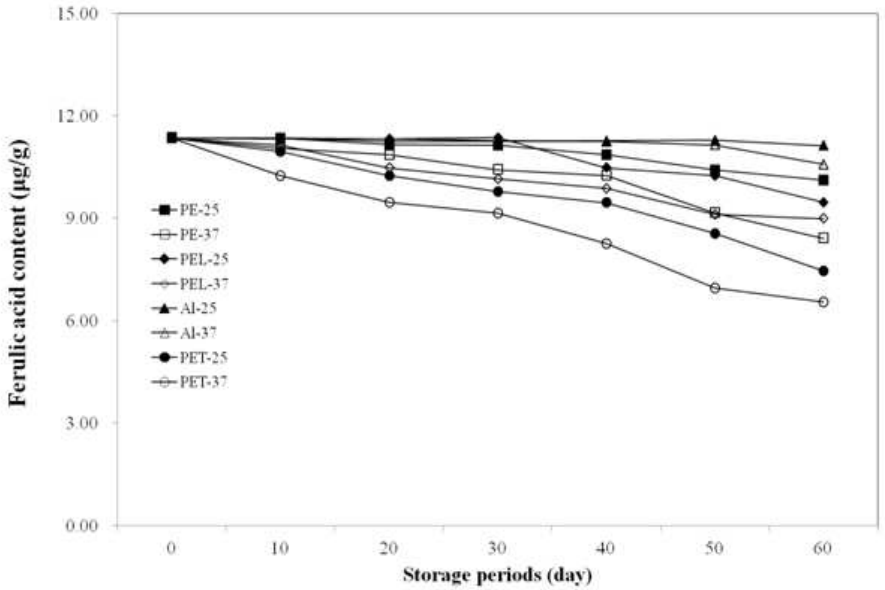


Fig. 9-2. Changes in ferulic acid content of *Sunsik* prototypes from germinated rough rice with different storage temperatures and periods. PE : polyethylene; PEL : aluminum laminated polyethylene, Al : aluminum foil, PET : polyethylene tetraphthalate, storage temperatures are 25℃ and 37℃.

발아 벼 분말을 첨가한 선식 시제품의 포장재질 및 저장온도에 따른 저장성을 평가하기 위하여 저장조건별 시료를 샘플링하여 C5 분획과 동일한 정제과정(에탄올추출/용매분획/C18컬럼정제)을 거쳐 시료를 준비한 후 포도당 유입활성을 평가하였다(Fig. 9-3). C5 분획은 control 대비 136.4%의 포도당 유입활성을 보였으나 시제품은 243.3%의 높은 활성을 보였다. 이는 선식에 포함된 부형제(sub materials)들이 항당뇨 효과를 갖는 곡/두류 혼합물이며 이들의 활성 역시 212.1%로 높게 나타나 선식의 포도당 유입활성이 크게 증가된 것으로 판단된다. 일반적으로 포장용지로 사용되고 있는 PE의 경우 25℃에서 15일, 30일 저장함에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 37℃ 저장 시 30일에 157.1%로 크게 감소하였다. PEL, Al 및 PET 포장 조건에서도 37℃에서 30일간 저장 시 153.3%, 181.9% 및 160.0%로 크게 감소하였다. 따라서 지표물질의 안정성과 항당뇨 효과를 감안하여 Al 개별 포장이 효과적이라고 판단된다.

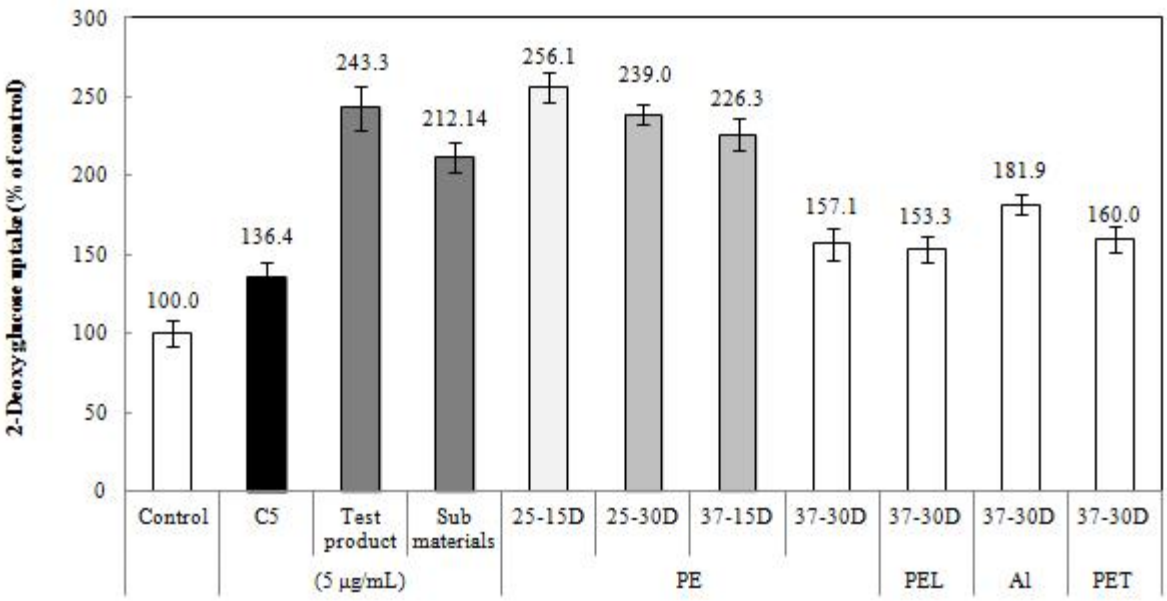


Fig. 9-3. Effects of Sunsik prototypes from germinated rough rice on the glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes with different storage conditions and package materials. PE : polyethylene; PEL : aluminum laminated polyethylene, Al : aluminum foil, PET : polyethylene tetraphthalate, storage temperatures are 25℃ and 37℃.

제10절 가공부산물을 활용한 기능성 식품 개발

1. 연구방법

가. 실험재료 및 발아현미 제조

본 실험에 사용한 벼는 2014년도 충북 증평에서 생산된 한국산 일반 벼 품종인 일품(*Oryza sativa* L.)를 농가로부터 구매하여 사용하였다. 발아는 일품을 20℃의 물로 수세하여 이물질을 제거하고 1일 2회 물갈이를 실시하며 3일간 암소에서 침지시켰다. 침지된 벼는 습도 85%로 조정된 발아기(WGC 450, Daihan Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 온도 32, 35 및 37℃, 기간 1, 2, 3 및 4일의 조건으로 발아시켰다. 발아된 벼는 50℃의 열풍건조기(WFO-459PD, Eyela, Tokyo, Japan)에서 2일간 건조시킨 후 현미기(FC2K, Kett Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 왕겨와 현미 분획으로 제조하였다. 이 중에서 왕겨 분획은 항당뇨 물질을 추출하기 위한 원료로 사용하였으며, 가공부산물인 왕겨는 그 활용도를 증진시키기 위하여 홍국으로 발효시켰다.

나. 홍국 발효

발아온도와 기간을 달리하여 제조한 발아 현미를 20℃에서 12시간 수침시킨 후 건져내어 물기를 제거하고 air filter가 부착된 멸균 polyethylene bag에 1 kg씩 입봉하고 121℃에서 120분간 멸균하였다. 미리 준비해둔 *Monascus pilosus* 305-9 (KFCC 11410P) 배양액 100 mL을 접종한 후 온도 29±1℃, 습도 75±5%의 배양기에서 20일간 배양하였다. 발효물을 100℃에서 30분간 2차 살균한 후 55℃에서 수분함량이 10% 이하가 되도록 건조하고 60 mesh 이하로 분쇄하여 홍국배양 발아현미 시료를 제조하였다.

다. 에탄올 추출물 제조

홍국색소 및 항산화 활성 측정을 위한 에탄올 추출물은 홍국현미 분말 5 g에 75% 에탄올(v/v) 50 mL을 가하여 1시간 씩 3회 초음파 추출한 후 여과(Whatman No. 42, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)하였다. 여과액을 회전식 진공농축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 40℃에서 용매를 완전히 제거한 후 동결건조(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)하고 -18℃ 냉동고에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

라. 색도 및 홍국색소 측정

에탄올 추출물의 색변화는 색차계(CR-200, Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 명암도를 나타내는 L값(lightness), 적색도를 나타내는 a값(redness), 황색도를 나타내는 b값(yellowness)을 측정하였다. 홍국색소(*Monascus* pigment)는 에탄올 추출물 중 일부를 취하여 여과(Whatman No. 42)한 후 spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 각각 500 nm

(red color group), 470 nm (orange color group) 및 400 nm (yellow color group)에서 흡광도를 측정하여 그 값으로 나타내었다(Johns & Stuart, 1991).

마. Monacolin K 및 citrinin 함량 측정

Monacolin K 함량 측정을 위한 추출물 제조는 건강기능식품 시험법의 총 모나콜린 K 시험법(III.3.6.6 총 모나콜린 K)에 따라 준비하였다(KFDA, 2014). 즉 발아온도 및 기간별 홍국배양 발아 현미 분말 4 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 75% 에탄올 40 mL을 넣은 후 1시간 초음파 추출하였다. 추출물을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 50 mL로 정용하고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하였으며, 적정농도로 희석하여 분석에 사용하였다. 표준용액으로 비활성형 monacolin K (Mevinolin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 10 mg을 정확히 칭량하여 75% 에탄올 50 mL에 녹여 제조하였으며, 활성형 monacolin K는 이 중 2 mL을 취하여 0.05 N 에탄올성 수산화나트륨용액 0.5 mL을 넣고 실온에서 30분 방치하여 제조하였다. Monacolin K의 분석은 Avula 등(2014)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 HPLC (Acme 9000 system, Younglin Inst., Anyang, Korea) 분석에는 Mightysil RP-18 GP column (250×4.6 mm, 5 μm pore size, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile를 A로 0.2% phosphoric acid를 B로 하여 기울기용리로 하였으며 시료 20 μL를 주입하여 1 mL/min의 유속으로 용출시키며 237 nm에서 측정하였다.

Citrinin 함량 측정을 위한 추출물 제조는 건강기능식품 시험법의 시트리닌 제1시험법(III.2.5.4.1 시트리닌(제1법))에 따라 준비하였다(KFDA, 2014). 즉 발아온도 및 기간별 홍국배양 발아 현미 분말 2.5 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 에탄올 20 mL을 넣은 후 30분간 초음파 추출하였다. 추출물을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 농축한 후 메탄올 1 mL에 재용해시키고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 분석에 사용하였다. 표준용액은 citrinin (Sigma-Aldrich) 10 mg을 정확히 칭량하여 100% 메탄올 100 mL에 녹여 제조한 후 희석하여 사용하였다. Citrinin의 분석은 Avula 등(2014)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 분석에는 Mightysil RP-18 GP column을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile : 0.1% trifluoroacetic acid = 40 : 60로 1 mL/min의 유속으로 용출시키며 여기파장 335 nm, 측정파장 502 nm에서 측정하였다.

바. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu phenol reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(Dewanto, Xianzhong & Liu, 2002). 즉 각 추출물 100 μL에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분 동안 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μL 를 가하고 30분 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였다. 표준물질인 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을

작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 g 중의 mg gallic acid로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Dewanto 등(2002)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 추출물 250 μL에 증류수 1 mL와 5% NaNO2 75 μL를 가한 다음, 5분 후 10% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 150 μL를 가하여 6분 방치하고 1 N NaOH 500 μL를 가하였다. 반응 11분 후 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질인 catechin (Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량은 시료 g 중의 mg catechin으로 나타내었다.

사. 전자공여능 및 총 항산화력 측정

전자공여능은 DPPH 라디칼 소거활성으로 측정하였다(Blois, 1958). 즉 에탄올 추출물 0.2 mL에 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich) 용액 0.8 mL를 가하여 실온에서 60분 동안 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity, mg trolox eq/g)로 표현하였다.

총 항산화력은 ABTS cation decolorization assay 방법(Blois, 1958)에 의하여 측정하였다. ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline- 6-sulfonic acid) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 에탄올 추출물 50 μL를 가하여 흡광도의 변화를 60분 후에 측정하였으며, 표준물질로서 L-ascorbic acid를 동량 첨가하였고 AEAC (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)로 표현하였다.

아. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리간의 차이 유무를 one-way ANOVA(Analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다(P=0.05). 또한 요인들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 통하여 분석하였다(P=0.05).

2. 연구결과

가. 홍국 발아 현미 제조

발아온도와 기간을 달리하여 제조한 일품 발아 벼로부터 현미기를 이용하여 왕겨와 현미 분획을 분리한 후 현미 분획에 홍국을 접종시켜 제조한 홍국 발아 현미의 그림은 Fig. 10-1과 같다. 발아온도와 기간이 증가함에 따라 왕겨와 싹 분획의 비율이 커지고 알곡은 상대적으로 작아지고 연화되어 현미기를 이용한 분리 시 깨끗하게 분리되지 않는 문제점이 발생하였다. 이에 따라 홍국 발효 시 높은 발아온도와 기간에서 발아시킨 벼를 이용할 때 왕겨 분획이 많이 혼입되어 전반적으로 균일하게 배양되지 않았다. 또한 홍국 접종을 위하여 예비살균(증자)하는 과정에서 전분질이 호화되어 응집현상이 발생하였으며 이 역시 홍국이 균일하게 접종되지 못한 이유로 판단된다.

Germination temperature (℃)	Germination periods (day)			
	1	2	3	4
32				
35				
37				

Fig. 10-1. Photographs of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

나. 홍국 발아 현미 추출물의 색도 및 홍국색소 변화

발아현미 홍국배양물의 색도 변화는 Table 10-1과 같이 발아기간이 길어짐에 따라 명도를 나타내는 L값은 증가하였으나 적색도와 황색도를 나타내는 a값과 b값은 감소하였다. 적색도와 황색도는 백미보다 현미가 높았으며, 발아 현미를 기질로 이용할 경우 이러한 색소 생성량을 크게 증가시켰다. *Monascus*속 균주들은 자색에서 적색의 색을 띄며, 홍국 색소는 황색의 monascin과 ankaflavin, 오렌지색의 rubropunctatin과 monascorubrin, 적색의 rubropunctamine과 monascorubramine 등 10여 종 이상의 색소가 복합적으로 구성되어 있다. 이들 색소성분들은 특이적인 UV-absorbance를 가져 집단화할 수 있으며 그 결과는 Table 10-2와 같다. 적색계(A_{500}), 오렌지계(A_{470}) 및 황색계(A_{400}) 모두 백미보다는 현미에서 높았으며, 발아현미에서 그 생성량이 크게 증가하였으나 발아기간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 색차계를 이용하여 측정한 적색도와 황색도 결과와 일치하였다(Table 10-1). 홍국색소의 색상, 색의 강도 및 생성량은 균의 종류는 물론 생육조건에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과 발아기간에 따라 색소생성량이 감소하는 것은 미생물의 생육이 저하되고 있음을 의미한다. 또한 발아에 따라 활성화된 α-amylase와 glucoamylase로 인하여 glucose 함량이 증가되고 홍국균의 생육이 증가되어 발아초기에 홍국색소 생성량이 높았으나, 발아가 진행되는 과정에서 연화된 전분립이 살균과정에서 응집하여 홍국균이 생육할 수 있는 비표면적이 작아지고 통기성이 저하되어 색소생성량이 감소하는 것으로 판단된다.

Table 10-1. Changes in the color of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

Germination Temp. (℃)	Germination Period (day)	Whiteness (L-value)	Redness (a-value)	Yellowness (b-value)
White rice		45.11±0.03^{b}	1.68±0.04^{m}	0.15±0.01^{n}
Brown rice		44.26±0.03^{c}	2.88±0.03^{l}	0.91±0.01^{m}
32	1	37.67±0.03^{n}	9.25±0.12^{a}	5.99±0.02^{g}
	2	38.88±0.04^{m}	8.33±0.04^{b}	7.25±0.02^{c}
	3	42.88±0.03^{e}	4.17±0.01^{j}	4.30±0.03^{k}
	4	43.54±0.01^{d}	3.47±0.02^{k}	4.44±0.01^{j}
35	1	41.05±0.02^{h}	5.61±0.04^{g}	7.07±0.02^{d}
	2	39.73±0.02^{j}	7.06±0.06^{e}	7.35±0.03^{b}
	3	41.71±0.02^{g}	5.11±0.03^{h}	5.57±0.01^{h}
	4	45.27±0.01^{a}	1.16±0.01^{n}	1.03±0.02^{l}
37	1	39.27±0.01^{l}	7.43±0.03^{d}	7.43±0.01^{a}
	2	39.83±0.01^{i}	6.87±0.01^{f}	6.76±0.02^{f}
	3	39.39±0.04^{k}	7.59±0.05^{c}	6.94±0.03^{e}
	4	42.04±0.01^{f}	4.82±0.04^{i}	5.43±0.03^{i}

Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 10-2. Changes in the *Monascus* pigment of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

Germination		Red color group (500 nm)	Orange color group (470 nm)	Yellow color group (400 nm)
Temp. (℃)	Period (day)			
White rice		0.122±0.001[l]	0.099±0.001[l]	0.181±0.001[j]
Brown rice		0.235±0.007[k]	0.178±0.004[j]	0.353±0.010[i]
32	1	2.320±0.024[a]	1.909±0.017[a]	4.663±0.026[a]
	2	1.669±0.038[b]	1.398±0.033[b]	3.760±0.075[b]
	3	0.494±0.017[i]	0.420±0.014[h]	1.169±0.041[h]
	4	0.432±0.003[j]	0.383±0.002[i]	1.225±0.010[h]
35	1	0.936±0.004[f]	0.815±0.004[f]	2.178±0.010[f]
	2	1.289±0.017[d]	1.113±0.014[d]	3.074±0.048[d]
	3	0.701±0.007[g]	0.597±0.005[g]	1.738±0.016[g]
	4	0.129±0.002[l]	0.131±0.001[k]	0.415±0.004[i]
37	1	1.425±0.008[c]	1.230±0.007[c]	3.580±0.017[c]
	2	1.189±0.014[e]	1.015±0.013[e]	2.705±0.034[e]
	3	1.323±0.061[d]	1.111±0.051[d]	3.117±0.140[d]
	4	0.664±0.009[h]	0.577±0.007[g]	1.744±0.022[g]

Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

다. Monacolin K와 citrinin 함량 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 monacolin K 함량 변화는 Table 10-3과 같다. 총 monacolin K 함량은 현미의 경우 215.85 mg/kg으로 백미의 40.41 mg/kg 보다 5.3배 높은 함량을 보였다. 32℃에서 1일간 발아시킨 발아 현미는 1263.04 mg/kg으로 무발아 현미에 비해 5.9배 높은 함량 증가를 보였다. 그러나 발아 기간이 길어질수록 총 monacolin K 함량은 감소하는 경향을 보였으며, 35℃에서 4일간 발아시킨 발아 현미는 165 mg/kg으로 가장 낮은 함량을 보였다. 또한 활성형 monacolin K의 비율은 백미와 현미가 각각 75%와 53%이었으며, 발아조건에 따라서는 일정한 경향을 보이지 않았지만 평균 50%로 나타났다. 홍국균 배양 시 monacolin K는 활성형인 acid form과 비활성형인 lactone form으로 공존하며 이들은 일반적으로 6:5의 함량비율을 가져 monacolin K의 인위적인 첨가 여부를 판단하는 지표가 된다. 식품의약품안전처(KFDA)에서 홍국미 제조에 사용할 수 있도록 허용하고 있는 홍국균은 *Monascus anka*, *M. purpureus*, *M. pilosus* 및 *M. ruber*의 총 35종이며, 이들 균주는 기질의 종류와 양, 배양방법, 배양온도 및 배양시간에 따라 monacolin K 생성량과 활성형/비활성형 monacolin K 비율이 다양하다. Monacolin K 생성량은 홍국균의 생장과 관련이 높으며, 기질의 탄소원으로 glucose의 이용도가 높지만 sucrose와 lactose는 전혀 이용할 수 없으며, 배양 중 공기가 통할 수 있는 호기조건에서 생육이 원활하다고 보고되었다.

Table 10-3. Changes in the content of activated and non-activated monacolin K of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

Germination		Monacolin K content (mg/kg)			Citrinin content (mg/kg)
Temp. (°C)	Period (day)	Activated type (Acid form)	Non-activated type (Lactone form)	Total monacolin K	
White rice		30.22±1.24^{j}	10.19±0.12^{j}	40.41±1.19^{k}	ND
Brown rice		113.82±2.13^{h}	102.03±1.38^{h}	215.85±2.91^{h}	ND
32	1	573.53±10.46^{a}	689.51±5.28^{a}	1263.04±15.75^{a}	ND
	2	424.89±8.81^{b}	331.55±5.27^{c}	756.44±14.07^{b}	ND
	3	72.95±1.14^{i}	62.35±1.21^{i}	135.30±2.35^{j}	ND
	4	73.56±1.21^{i}	108.79±5.82^{h}	182.35±7.03^{i}	ND
35	1	137.14±1.43^{g}	204.51±2.19^{f}	341.66±3.62^{f}	ND
	2	266.07±0.07^{e}	269.45±0.52^{d}	535.52±0.59^{d}	ND
	3	135.18±0.26^{g}	123.21±1.57^{g}	258.38±1.83^{g}	ND
	4	9.96±0.13^{k}	14.60±0.26^{j}	24.57±0.39^{l}	ND
37	1	309.32±8.29^{d}	447.02±12.25^{b}	756.33±20.54^{b}	ND
	2	204.63±2.48^{f}	198.67±2.28^{f}	403.30±4.76^{e}	ND
	3	333.67±3.10^{c}	248.84±3.13^{e}	582.51±6.23^{c}	ND
	4	116.95±0.87^{h}	128.04±0.51^{g}	244.99±1.37^{g}	ND

ND : not detected.

Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

본 연구에서 백미와 현미보다 발아현미를 기질로 이용할 때 monacolin K 생성량이 증가한 이유는 발아에 의해 활성화된 효소들이 홍국균이 탄소원으로 이용할 수 있는 glucose의 생성량이 증가했기 때문이며, 발아가 진행됨에 따라 탄소원뿐 아니라 질소원 및 무기성분의 소비에 의해 monacolin K 생성량이 감소한 것으로 판단된다.

Citrinin은 홍국배양 시 색소와 함께 생성되는 mycotoxin의 일종으로 항균효과가 있으나 여러 동물에서 신장독성을 유발한다고 알려져 있어(6) 식약처에서는 홍국제품의 citrinin 함량을 0.05 mg/kg 이하로 제한하고 있다(5). 이에 따라 발효과정 중 citrinin 생성량을 감소시킬 수 있는 균주와 배양방법을 개발하는 연구가 진행되었다(7,8). 본 연구결과 모든 처리구에서 citrinin이 검출되지 않아(Table 3) 변이주인 *M. pilosus* 305-9 (KFCC 11410P)는 citrinin을 생성하지 않고 고농도의 monacolin K를 생성하는 유용한 균주로서 건강기능식품 개발에 보다 적극적으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

라. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 변화는 Table 10-4와 같다. 홍국배양 현미의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 3.71 및 0.35 mg/g으로 홍국배양 백미의 0.31 및 0.08 mg/g보다 높았다. 또한 홍국을 배양하지 않은 현미의 1.40 및 0.19 mg/g보다 높아 홍국배양에 따라 페놀 화합물의 함량이 증가되었다(data not shown). 이는 다양한 구조와 분자량을 가지며 거대분자와의 결합을 통해 다양한 생리활성을 나타내는 페놀 화합물은 주로 왕겨와 미강층에 존재하기 때문이라 판단된다. 발아온도와 기간이 증가함에 따라 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 4.62~13.80 및 0.43~1.30 mg/g 범위로 유의적인 증가를 보였다. 벼가 발아함에 따라 활성화된 다양한 효소들에 의하여 결합형 페놀 화합물이 유리형으로 전환되고, 세포벽의 완화로 인하여 페놀 화합물의 추출수율이 증가한다고 알려져 있으며, 벼의 왕겨층과 현미분획에서 발아에 따른 페놀 화합물 증가가 크게 나타났으며, 발아 기간이 증가함에 따라 페놀 화합물의 함량이 증가하였다.

Table 10-4. Changes in the total polyphenol and flavonoid contents of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

Germination		Total polyphenol content (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)
Temp. (°C)	Period (day)		
White rice		0.31±0.01^{m}	0.08±0.00^{m}
Brown rice		3.71±0.14^{l}	0.35±0.00^{l}
32	1	4.62±0.08^{k}	0.43±0.01^{k}
	2	5.21±0.11^{j}	0.49±0.01^{j}
	3	7.32±0.09^{h}	0.69±0.01^{h}
	4	8.84±1.24^{f}	0.83±0.02^{f}
35	1	5.86±0.08^{i}	0.55±0.01^{i}
	2	7.33±0.11^{h}	0.69±0.00^{h}
	3	9.14±0.12^{e}	0.86±0.01^{e}
	4	11.53±0.08^{b}	1.08±0.01^{b}
37	1	8.26±0.14^{g}	0.78±0.00^{g}
	2	10.30±0.09^{d}	0.97±0.01^{d}
	3	10.84±0.08^{c}	1.02±0.02^{c}
	4	13.80±0.09^{a}	1.30±0.02^{a}

Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

마. 전자공여능과 총 항산화력 변화

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 전자공여능과 총 항산화력 변화는 Table 10-5와 같다. 홍국을 배양하지 않은 현미의 전자공여능과 총 항산화력은 각각 1.14 mg TE/g과 2.85 mg AAE/g이었으나(data not shown), 홍국배양 현미는 각각 3.73 mg TE/g과 10.47 mg AAE/g으로 크게 증가하였다. 또한 홍국배양 발아현미 의 경우 홍국현미에 비해 항산화활성이 증가하였으며, 특히 32℃/1일 발아시킨 현미의 경우 전자공여능과 총 항산화력이 각각 22.16 mg TE/g과 62.27 mg AAE/g으로 가장 높은 항산화활성을 보였으나 발아기간이 증가함에 따라 항산화활성은 감소하는 경향을 보였다. 현미와 백미 에탄올 추출물의 항산화활성을 비교한 결과 DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소거활성과 환원력이 백미보다 현미 추출물에서 현저하게 높게 나타났으며, 이는 현미 추출물의 높은 페놀 화합물 함량과 관련이 있다고 보고되었다. 벼의 발아에 따라 증가된 페놀 화합물로 인하여 발아 후 벼 추출물의 항산화활성이 크게 증가된다고 보고한 연구결과와 일치하였다. 항산화활성이 발아 3~4일차까지 증가되다 6일차까지 감소하는 경향을 보여 발아기간에 따라 항산화활성이 감소한 본 연구결과와는 다소 차이가 있었다. 이는 대부분의 홍국색소가 지용성이며 이들의 항산화활성이 높게 나타나, 발아기간에 따라 감소된 홍국색소성분에 의하여 홍국배양 발아현미의 항산화 활성이 감소된 것으로 판단된다.

Table 10-5. Changes in the free radical scavenging activities of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

Germination		DPPH radical scavenging activity (mg TE/g)	ABTS radical scavenging activity (mg AAE/g)
Temp. (℃)	Period (day)		
White rice		0.56±0.01^{m}	1.56±0.03^{m}
Brown rice		3.73±0.09^{i}	10.47±0.13^{i}
32	1	22.16±0.12^{a}	62.27±0.21^{a}
	2	13.23±0.08^{b}	37.16±0.14^{b}
	3	2.31±0.08^{k}	6.49±0.11^{k}
	4	3.14±0.11^{j}	8.83±0.10^{j}
35	1	5.94±0.09^{f}	16.69±0.15^{f}
	2	9.35±0.07^{d}	26.27±0.21^{d}
	3	4.48±0.12^{g}	12.58±0.14^{g}
	4	1.37±0.14^{l}	3.03±0.09^{l}
37	1	13.24±0.17^{b}	37.21±0.12^{b}
	2	7.03±0.08^{e}	19.75±0.08^{e}
	3	10.18±0.15^{c}	28.59±0.11^{c}
	4	4.25±0.09^{h}	11.94±0.10^{h}

Different small letters in the same column indicate a significant difference at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

바. 상관관계 분석

발아 온도와 기간에 따른 발아현미 홍국배양물의 홍국색소생성, 색도, monacolin K 생성과 항산화 활성간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 10-6과 같다. 기질로 사용된 발아 현미의 발아온도와 홍국색소생성량, 적색도 및 황색도는 양의 상관관계를 보였으나 발아기관과는 음의 상관관계를 보여 발아기간이 길어짐에 따라 홍국균의 생육을 저해하는 것으로 나타났다. 홍국색소와 적색도, 황색도는 0.769~0.968의 높은 양의 상관관계를 보였으나, 명도와는 -0.967~-0.983의 높은 음의 상관관계를 보였다. Monacolin K 생성량은 발아기간과 음의 관계였으며, 홍국색소, 적색도 및 황색도와 높은 상관관계(0.633~0.969)를 보였다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 발아가 진행됨에 따라 발아온도 및 기간과 높은 양의 상관관계를 보였으나(0.742~0.830), 홍국색소, 적색도, 황색도, monacolin K 생성과는 상관성을 보이지 않아 발아기간에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 증가는 발아에 의한 영향이 큰 것으로 판단된다. 항산화 활성은 홍국색소, 색도 및 monacolin K 생성량과 높은 상관관계를 보였으나 발아기간, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과는 음의 상관관계를 보였다. 일반적으로 페놀 화합물과 자유라디칼 소거활성은 높은 양의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으나, 본 연구결과에서 음의 상관관계를 보인 것은 발아에 의해 생성된 페놀 화합물보다 홍국균 발효에 의해 생성된 홍국색소의 항산화 활성이 더 높기 때문으로 판단된다.

Table 10-6. Correlation coefficients among *Monascus* pigment, color, monacolin K content and antioxidant activity of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rice from germinated rough rice with different germination temperatures and periods.

	A_{500}	A_{470}	A_{400}	L	a	b	MK	TPC	TFC	DPPH	ABTS
Temp	0.470**	0.493**	0.559***	-0.558***	0.525***	0.759***	0.325*	0.742***	0.747***	0.336*	0.333*
Period	-0.193	-0.180	-0.116	0.134	-0.140	0.126	-0.289	0.830***	0.827***	-0.275	-0.279
A_{500}	1.000	0.999***	0.988***	-0.967***	0.965***	0.769***	0.969***	-0.026	-0.017	0.966***	0.967***
A_{470}		1.000	0.992***	-0.972***	0.968***	0.788***	0.963***	-0.007	0.002	0.960***	0.961***
A_{400}			1.000	-0.983***	0.978***	0.841***	0.940***	0.070	0.078	0.937***	0.938***
L				1.000	-0.996***	-0.887***	-0.897***	-0.092	-0.101	-0.889***	-0.892***
a					1.000	0.877***	0.899***	0.064	0.074	0.890***	0.893***
b						1.000	0.633***	0.329*	0.337*	0.622***	0.625***
MK							1.000	-0.128	-0.119	0.997***	0.998***
TPC								1.000	0.979***	-0.115	-0.119
TFC									1.000	-0.106	-0.109
DPPH										1.000	0.991***

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$, A_{500} : red color groups, A_{470} : orange color groups, A_{400} : yellow color groups, L : lightness, a : redness, b : yellowness, MK : total monacolin K content (mg/kg), TPC: total polyphenol content (mg/g), TFC : total flavonoid content (mg/g), DPPH : DPPH radical scavenging activity (mg TE/g), ABTS : ABTS radical scavenging activity (mg AAE/g).

사. 홍국 발아 현미 분말의 집단특성

식품분말의 밀도는 0.25~0.64 g/cm^{3}의 분포를 보이며 수분함량과 식품의 종류에 따라 다양하게 나타난다. 충격밀도와 이완밀도의 비로 나타낸 하우스너 비는 클수록 다져지는 특성이 강해 선식의 충진 시 호퍼의 진동운동에 의해 밀도가 증가할 수 있음을 의미하며 보다 적은 하우스너 비를 가지는 제품의 경우 불량률을 줄일 수 있을 것이다. 또한 두드림 횟수에 따른 부피변화식에서 상수인 a, b를 얻을 수 있으며, a는 응집성을 의미하기 때문에 a값이 작은 제품이 불량률을 줄일 수 있을 것이다.

부형제로 사용한 결정 cellulose는 상대적으로 낮은 안식각(27.95°), 하우스너 비(1.211) 및 a값(0.192)로 응집성이 낮게 나타났다. 곡물혼합분의 경우 높은 안식각 39.07°, 하우스너 비(1.873) 및 a값(0.564)으로 응집성이 크게 나타나 선식의 물성 개선의 목적으로는 부적합한 것으로 나타났다. 그러나 홍국 발아 현미 분말이 갖는 관능특성을 개선하고 곡류 유래의 기능성을 보완하기 위하여 첨가하는 것이 바람직할 것이다. 홍국 발아 현미의 경우 발아온도 및 기간에 대하여 유의적인 차이를 보이지 않았지만 발아기간이 증가함에 따라 응집성이 감소하는 것으로 나타났다(Table 10-7).

홍국 발아 현미 분말 25 g에 부형제 10 g (곡물혼합분 : 결정 cellulose = 1 : 1)를 혼합하여 제조한 홍국 발아 현미 선식 제품의 집단 특성을 평가한 결과는 Table 10-8과 같다. 홍국 현미의 경우 안식각, 하우스너 비 및 a값이 각각 37.14°, 1.558 및 0.384로 나타났으며, 32℃에서 발아시킨 현미의 경우 발아기간이 증가함에 따라 안식각은 37.45°에서 35.84°로 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 전반적으로 발아온도와 기간에 따라 집단 특성의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 홍국 발아 현미 선식 제품의 응집성은 크게 나타났으며, 응집성을 낮추기 위하여 결정 cellulose를 부형제로 사용하여 제조한 발아 벼 선식의 경우 HS 분획에 비해 안식각, 하우스너 비 및 a값이 작아져 응집성이 개선되는 것으로 보였으나 물성에는 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 홍국 발아 현미 분말을 이용한 선식 제품의 개발에 가공공정의 편의성과 효율성을 제고하고 불량을 줄이기 위해서는 보다 다양한 부형제 또는 이형제의 종류, 첨가량 등의 결정이 필요하다.

Table 10-7. Physical characteristics of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rough rice from germinated rough rice with different germination condition and sub-materials.

Germination Temp.	Germination Period	Dynamic angle (°)	Loosed bulk density (g/cm^3)	Tapped bulk density (g/cm^3)	Hausner ratio	Constant of equation a	Constant of equation b
Cereal powder		39.07 ± 3.10	0.321 ± 0.012	0.601 ± 0.000	1.873 ± 0.070	0.564 ± 0.035	0.085 ± 0.016
Cellulose		27.95 ± 1.94	0.683 ± 0.016	0.827 ± 0.013	1.211 ± 0.015	0.192 ± 0.022	0.164 ± 0.076
White rice		30.05 ± 1.58	0.716 ± 0.017	0.959 ± 0.017	1.341 ± 0.040	0.067 ± 0.027	0.277 ± 0.044
Brown rice		32.46 ± 1.99	0.586 ± 0.007	0.893 ± 0.015	1.525 ± 0.023	0.357 ± 0.009	0.422 ± 0.086
32	1	37.82 ± 3.65	0.462 ± 0.007	0.777 ± 0.012	1.681 ± 0.013	0.444 ± 0.005	0.169 ± 0.010
	2	38.65 ± 2.08	0.477 ± 0.008	0.784 ± 0.012	1.644 ± 0.036	0.430 ± 0.015	0.195 ± 0.016
	3	38.46 ± 1.09	0.454 ± 0.017	0.777 ± 0.012	1.716 ± 0.090	0.452 ± 0.035	0.233 ± 0.042
	4	36.75 ± 1.24	0.467 ± 0.004	0.777 ± 0.012	1.664 ± 0.022	0.415 ± 0.004	0.378 ± 0.048
35	1	39.62 ± 1.81	0.421 ± 0.003	0.745 ± 0.011	1.769 ± 0.011	0.484 ± 0.003	0.147 ± 0.018
	2	38.65 ± 2.28	0.475 ± 0.011	0.771 ± 0.000	1.624 ± 0.039	0.437 ± 0.013	0.129 ± 0.013
	3	37.72 ± 1.22	0.449 ± 0.018	0.784 ± 0.012	1.748 ± 0.066	0.496 ± 0.020	0.187 ± 0.053
	4	35.67 ± 1.81	0.449 ± 0.000	0.777 ± 0.012	1.733 ± 0.026	0.442 ± 0.012	0.425 ± 0.210
37	1	41.10 ± 1.78	0.444 ± 0.010	0.854 ± 0.128	1.924 ± 0.297	0.530 ± 0.086	0.118 ± 0.053
	2	39.08 ± 1.14	0.410 ± 0.003	0.721 ± 0.010	1.760 ± 0.021	0.530 ± 0.002	0.080 ± 0.004
	3	38.62 ± 2.17	0.444 ± 0.004	0.758 ± 0.011	1.706 ± 0.035	0.463 ± 0.012	0.157 ± 0.018
	4	40.12 ± 1.82	0.444 ± 0.004	0.751 ± 0.000	1.692 ± 0.014	0.452 ± 0.005	0.173 ± 0.042

Table 10-8. Physical characteristics of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rough rice prototypes from germinated rough rice with different germination condition and sub-materials.

Germination Temp.	Germination Period	Dynamic angle (°)	Loosed bulk density (g/cm^3)	Tapped bulk density (g/cm^3)	Hausner ratio	Constant of equation a	Constant of equation b
White rice		37.82 ± 1.56	0.643 ± 0.014	0.915 ± 0.000	1.424 ± 0.030	0.313 ± 0.020	0.256 ± 0.094
Brown rice		37.13 ± 3.18	0.559 ± 0.010	0.871 ± 0.015	1.558 ± 0.039	0.384 ± 0.010	0.262 ± 0.086
32	1	37.45 ± 2.09	0.480 ± 0.027	0.781 ± 0.012	1.630 ± 0.104	0.425 ± 0.042	0.165 ± 0.023
	2	34.39 ± 2.20	0.496 ± 0.022	0.795 ± 0.000	1.605 ± 0.070	0.411 ± 0.029	0.187 ± 0.023
	3	38.08 ± 3.02	0.487 ± 0.013	0.768 ± 0.023	1.577 ± 0.045	0.410 ± 0.023	0.148 ± 0.020
	4	35.84 ± 2.77	0.507 ± 0.010	0.788 ± 0.012	1.548 ± 0.028	0.387 ± 0.017	0.195 ± 0.080
35	1	36.50 ± 1.67	0.484 ± 0.004	0.736 ± 0.000	1.520 ± 0.014	0.404 ± 0.013	0.103 ± 0.028
	2	37.77 ± 2.40	0.506 ± 0.005	0.768 ± 0.011	1.517 ± 0.020	0.400 ± 0.005	0.096 ± 0.007
	3	35.46 ± 3.44	0.506 ± 0.005	0.774 ± 0.020	1.530 ± 0.027	0.399 ± 0.005	0.120 ± 0.009
	4	35.36 ± 3.48	0.518 ± 0.022	0.788 ± 0.012	1.521 ± 0.045	0.373 ± 0.009	0.216 ± 0.075
37	1	38.17 ± 1.69	0.509 ± 0.013	0.774 ± 0.020	1.521 ± 0.007	0.394 ± 0.006	0.119 ± 0.008
	2	35.94 ± 1.52	0.467 ± 0.008	0.731 ± 0.021	1.564 ± 0.038	0.465 ± 0.010	0.063 ± 0.009
	3	34.93 ± 3.43	0.477 ± 0.024	0.755 ± 0.019	1.583 ± 0.055	0.421 ± 0.012	0.120 ± 0.026
	4	38.07 ± 1.31	0.472 ± 0.007	0.749 ± 0.011	1.587 ± 0.013	0.412 ± 0.005	0.160 ± 0.016

아. 홍국 발아 현미 시제품의 품질특성

홍국 발아 현미 분말을 부형제와 혼합하여 제조한 선식 제품의 품질특성으로 물결합력, 용해도 및 팽윤력을 평가한 결과는 Table 10-9와 같다. 물결합력의 경우 홍국미 선식은 337.62%로 홍국 현미의 344.85%보다 낮게 나타났으며, 홍국 발아 현미의 경우 홍국미와 홍국 현미에 비해 높은 물결합력을 보였다. 32℃ 발아 현미의 경우 392.65~435.22%로 발아 기간에 따라 증가하였으며, 35℃ 발아 현미는 410.79~410.11%로 큰 차이를 보이지 않았다. 홍국미와 홍국현미의 용해도는 12.43%와 13.37%로 발아 현미에 비해 낮게 나타났다. 발아 온도와 기간에 따라 용해도와 팽윤력은 시료들 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 10-9. The water binding capacity, solubility and swelling power of *Monascus pilosus* (305-9) cultivated brown rough rice prototypes from germinated rough rice with different germination condition and sub-materilas.

Germination Temp.	Period	Water binding capacity (%)	Water solubility (%)	Swelling power (%)
White rice		337.62 ± 9.34	12.43 ± 1.10	0.907 ± 0.029
Brown rice		344.85 ± 6.00	13.37 ± 0.97	0.922 ± 0.007
32	1	392.65 ± 13.89	19.82 ± 1.19	0.936 ± 0.013
	2	406.21 ± 11.55	20.09 ± 1.30	0.944 ± 0.003
	3	421.96 ± 10.20	18.83 ± 0.56	0.920 ± 0.018
	4	435.22 ± 23.16	18.98 ± 1.27	0.933 ± 0.017
35	1	410.79 ± 21.57	20.91 ± 0.39	0.940 ± 0.004
	2	411.31 ± 14.26	21.40 ± 1.19	0.931 ± 0.016
	3	367.19 ± 17.80	17.38 ± 2.82	0.908 ± 0.035
	4	410.11 ± 10.90	16.83 ± 3.55	0.890 ± 0.081
37	1	399.63 ± 13.70	18.93 ± 0.37	0.944 ± 0.012
	2	422.90 ± 23.51	20.71 ± 0.50	0.928 ± 0.027
	3	387.93 ± 8.41	20.53 ± 0.13	0.939 ± 0.023
	4	407.13 ± 13.55	21.39 ± 0.36	0.936 ± 0.017

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

년차	세부연구개발 목표	목표달성도
1년차 (2012)	발아 벼 추출물의 *in vitro* 항당뇨 효능 평가	- 발아 벼 추출물의 항당뇨 관련 효소 억제활성과 지방세포로의 포도당 유입활성 평가를 통해 *in vitro* 항당뇨 효능을 평가하였음 - 발아기간 및 부위별 추출물의 추가적인 생리활성을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 이상 달성하였음
	발아 벼로부터 항당뇨 물질 분리·동정	- Activity-guided purification법에 의해 활성물질을 분리하고자 하였으나, C5 분획 이후에 정제단계를 거칠수록 항당뇨 효능이 감소되는 문제점 발생됨 - C5 분획의 지표물질을 설정하기 위해 다양한 정제과정을 거쳐 지표물질을 결정하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	항당뇨 물질 고함유 발아 및 추출조건 최적화	- 발아온도 및 기간에 따른 지표물질 함량을 평가하였으며, 추출용매, 온도 및 시간에 따른 영향을 평가하여 최적 조건을 제시함 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	발아 벼를 이용한 시제품 제형개발	- 발아 벼를 이용하여 분말, 선식, 음료, 캡슐의 시제품 4종을 개발하였고, 각 제형별 품질특성을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
2년차 (2013)	활성물질의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘 규명	- 면역형광법과 Western blot assay를 이용하여 활성분획(C5)의 *in vitro* 항당뇨 메커니즘을 규명하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	활성물질에 대한 *in vivo* 항당뇨 효능 평가	- 당뇨 마우스 모델을 이용하여 제2형 당뇨에 대한 발아 벼 추출물(C5)의 항당뇨 효능을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	시제품에 대한 *in vitro* 항당뇨 효능 평가	- 시제품 4종 추출물의 항당뇨 관련 효소 억제활성과 지방세포로의 포도당 유입활성 평가를 통해 *in vitro* 항당뇨 효능을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	시제품 최적 제형 및 제조조건 선정	- 동물실험 결과를 바탕으로 결정된 인체적용량을 충족시킬 수 있는 선식 제품의 리뉴얼을 실시하였으며, 신규 제품의 품질특성을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음

3년차 (2014)	활성물질의 *in vivo* 항당뇨 메커니즘 규명	- 면역형광법과 Western blot assay를 통해 활성분획(C5)을 투여한 동물로부터 적출한 장기를 이용하여 *in vivo* 항당뇨 메커니즘을 규명하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	발아 벼 항당뇨 물질의 안정성 평가	- 발아 벼 추출물 및 선식 제품의 온도, 광, pH 및 포장재질에 의한 저장성을 지표물질의 함량 변화로 평가 및 제시하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	대량생산공정 확립	- 대량생산 시 품질관리 요소인 지표물질의 변화 양상을 규명하기 위하여 원료, 추출물, 용매분획물, 칼럼정제분획물 등 가공공정에서의 지표물질 함량을 평가하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	당뇨예방 식품 제조조건 최적화	- 선식 제품의 가공공정을 개선하기 위하여 집단특성을 평가하고 부형제를 첨가하여 물성을 개선하고자 하였음 - 따라서 계획된 목표를 100% 달성하였음
	(추가연구)	- 발아 벼의 도정부산물인 현미의 활용도를 높이기 위해 홍국으로 발효시킨 후 지표물질의 함량을 평가하였으며, 선식제품으로 개발하여 품목제조보고를 득하여 제품화하였음

제2절 관련분야에의 기여도

○ 다양한 항당뇨 기전에 대한 발아 벼 추출물의 효과 규명뿐만 아니라 항산화, 항고혈압 활성 등의 생리활성에 대한 자료 제시

○ 발아 벼 추출물의 항당뇨 효능의 지표물질 선정을 통한 품질관리 정보 제공과 벼 품종선발 및 물질다량생산조건 확립

○ 당뇨예방 및 치료용 소재로 기능성 쌀의 이용성증대를 위한 기본 자료제공

○ 신수요 창출에 따른 벼 소비 증가로 안정적 농가소득 보장

○ 당뇨예방 식품 및 소재 개발을 통한 국민건강증진에 기여

○ 발아 벼의 당뇨 예방 효과 규명 및 활용가능성 제시로 이용가치와 소비확대 유도

○ 의약품과 식품의 중간형태로서 소비창출을 유도할 수 있는 새로운 산업분야의 활성화

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 성과

1. 지식재산권 (3/3)

출원번호(출원일)	출원인	발명의 명칭
10-2014-0068297 (2014.06.05.)	충북대학교 산학협력단	벼의 유용물질 증대를 위한 고압처리방법
10-2015-0110171 (2015.08.04.)	충북대학교 산학협력단	모나콜린 K 함량과 항산화활성이 증가된 홍국발아현미의 제조방법
10-2015-0109877 (2015.08.04.)	충북대학교 산학협력단	발아 벼 왕겨 추출물을 유용성분으로 포함하는 항당뇨용 조성물

2. 기술이전 (1/2)

기술명	이전대상	이전일
“모나콜린 K 함량과 항산화활성이 증가된 홍국발아현미의 제조방법“ 관련 특허	(주)에프앤피	2015.09

3. 제품화 (1/1)

제품명	품목제조보고인	관리부서	보고일
홍국발아현미 선식	(주)에프앤피 김신제	충북 증평군청 환경과	2015.06.02

4. 언론홍보 (2/2)

홍보주제	제목		홍보일
발아벼 항당뇨 소재 개발	충북대학교 정헌상 교수 연구팀 항당뇨 소재개발(국제뉴스 등 10개)	발아벼로부터 항당뇨 활성이 우수한 추출물 개발	2015.08.13
충북대 기술이전 협약	충북대 기술이전 협약 (아시아 뉴스통신 등 3개)	발아벼 현미 이용 기능성분 증가 기술 이전	2015.10.15

5. SCI (2/3) 및 비SCI (5/4) 논문 게재

구분	논문명	학술지명	년도
SCI	Effects of high hydrostatic pressure treatment on the enhancement of functional components of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.)	Food Chemistry 166	2015
SCI	Influence of Applied Pressure on Bioactive Compounds of Germinated Rough Rice (*Oryza sativa* L.)	Food and Bioprocess Technology 8	2015
비SCI	발아기간에 따른 벼(*Oryza sativa* L.)의 부위별 효소저해활성	한국식품영양과학회지 42(6)	2013
비SCI	고압처리가 발아벼의 항산화 성분과 활성에 미치는 영향	한국식품영양과학회지 42(11)	2013
비SCI	발아와 고압처리에 따른 벼(*Oryza sativa* L.) 추출물의 효소저해활성	한국식품과학회지 46(1)	2014
비SCI	고압처리가 발아벼의 화학성분 변화에 미치는 영향	한국식품과학회지 47(2)	2015
비SCI	홍국균 발효가 발아현미의 Monacolin K 함량과 항산화 활성에 미치는 영향	한국식품영양과학회지 44(8)	2015

6. 학술발표 (8/6)

구분	제목	학술대회명	년도
국내	Changes of Enzyme Inhibitory Activities on the Different Part of Rough Rice (*Oryza setiva* L.) with Germination Periods.	한국식품과학회 학술대회	2013
국내	Effect of High Pressure (HP) Treatment on the Increase of Antioxidant Compounds and Activity of Germinated Rough Rice (*Oryza setiva* L.).	한국식품과학회 학술대회	2013
국내	Effect of High Pressure Treatment on the Change of Functional Components of Germinated Rough rice (*Oryza sativa* L.).	한국식품영양과학회 학술대회	2013
국내	Enzyme Inhibitory Activities of Rough Rice (*Oryza sativa* L.) Extracts with Germination and High Pressure Treatment.	한국식품영양과학회 학술대회	2013
국외	Influence of Applied Pressure on Enhancement of Functional Component of Germinated Rough Rice.	The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF)	2014
국외	Anti-diabetic Activity of Germinated Rough Rice (Oryza sativa L.) Extracts in 3T3-L1 Adipocytes.	ISNFF	2014
국내	Changes of Phenolic-Acids and Vitamin E Profiles on Germinated Rough Rice (*Oryza sativa* L.) Treated by High Hydrostatic Pressure.	한국식품과학회 학술대회	2015
국내	Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Chemical Composition of Germinated Rough Rice (*Oryza sativa* L.).	한국식품과학회 학술대회	2015

제2절 성과활용 계획

○ 발아 벼에 함유된 유용성분 분리 기술 확보
○ 우수 벼품종 선발을 위한 자료활용
○ 발아 벼에 함유된 항당뇨활성 물질분리 및 동정기술의 특허 출원을 통한 지적재산권 확보
○ 동물 실험을 통한 항당뇨 예방효과기술의 논문 발표
○ 국민보건 증진을 위한 기능성식품 소재화

(1) 기술적 측면

○ 발아 벼에 함유된 유용성분의 최대 생산조건 및 분리 기술 확립
○ 항당뇨 효능이 높은 벼 품종선발 및 물질다량생산조건 확립
○ 당뇨예방 및 치료용 소재로 기능성 쌀의 이용성증대를 위한 기본 자료제공

(2) 경제적 · 산업적 측면

○ 신수요 창출에 따른 벼 소비 증가로 안정적 농가소득 보장
○ 당뇨예방 식품 및 소재 개발을 통한 국민건강증진에 기여
○ 발아 벼의 당뇨 예방 효과 규명 및 활용가능성 제시로 이용가치와 소비확대 유도
○ 의약품과 식품의 중간형태로서 소비창출을 유도할 수 있는 새로운 산업분야의 활성화

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 발아

1. 발아(Germination)

발아란 배가 종피를 뚫고 나와 어린식물로 출현하여 활발한 성장을 재개하는 것을 말한다. 벼를 비롯한 식물종자는 씨눈과 배젖에 있는 비활성 상태의 DNA 유전정보와 각종 효소 및 영양소 등이 외적환경 여건이 좋아지면 활성화되어 발아되는데, 일반적으로 발아가 진행됨에 따라 생리적 활성이 증대되고 많은 성분의 변화가 일어나 발아에 의한 영양소의 유효도를 극대화시키려는 연구가 많이 이루어지고 있다.

2. 발아에 의한 영양성분의 변화

발아과정은 먼저 수분이 흡수되면서 종피가 부풀어 수분과 가스의 투과가 용이해지고 이에 따라 종자내의 효소들이 활성화되어 자엽에 있는 영양성분들이 분해되고 생장점으로 이동하여 발아에 필요한 새로운 물질을 합성하기 시작한다. 씨앗에 저장된 단백질은 가용성 아미노산으로, 전분은 amylase에 의해서 분해되어 포도당으로 전환되고, 지방은 lipase에 의해서 지방산과 glycerol로 분해되며, 지방산은 산화되어 발아에 필요한 에너지를 공급하고 glycerol은 당으로 전환된다.

이러한 화학성분의 변화는 주로 자엽에서는 분해적인 대사가 일어나는데 반해, 배축에서는 합성적인 대사가 주로 일어난다. 발아과정 중에는 화학성분의 변화뿐만 아니라 유용성분들 증가되거나 생성되며, 그에 따라 다양한 생리활성이 증가되는 경향이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 조, 기장, 수수, 메밀, 대두 등의 다양한 종자에 대한 발아에 따른 유용성분 및 생리활성의 변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 현미의 경우 발아에 따른 항산화, 항비만, 항암활성 등에 대한 연구가 진행되었다. 또한 벼 전곡을 발아시킨 연구는 발아기간에 따른 벼의 화학성분 변화, 발아기간과 부위에 따른 벼 추출물의 항산화 및 항암활성 변화, 그리고 발아 벼 추출물의 여러 가지 암세포주의 증식억제에 대한 연구들이 진행되었다.

3. 발아 벼의 기능성 성분

가. Fatty acids

지방산은 지방을 구성하는 물질로 지방산에는 포화, 단일불포화, 다가불포화 3종류가 있다. 다가 불포화지방산은 이중결합의 위치에 따라 n-3 지방산과 n-6 지방산으로 나뉜다. Linoleic acid (18:2 n-6, LA)는 docasahesanoic acid (DHA)와 eicosapentanoic acid (ELA)의 전구체로 탄소수가 18개이며 3개의 이중결합을 형성하는 n-3계열의 모지방으로 식물유에 풍부하게 함유되어있다. 음식물로 섭취된 LA는 두 가지로 변환되는데 불포화 상태에서 연장되어 백혈구와 간에서 elongate와 desaturase에 의해 EPA로 전환되며, EPA는 PH3계열의 전구물질이고, EPA는 뇌의 주요 지방산인 DHA로 전환될 수 있다. 또한 공액리놀레산(conjugated linoleic acid, CLA)는 linoleic acid의 위치적 기하학적 이성질체이다. Linoleic acid와 linoleic acid 이성체의 존재는 오래전부터 알려져 왔으나, CLA가 관심을 모으기 시작한 것은 grilled ground beef에 존재하는 CLA 가 항암효과와 같은 다양한 생리활성을 가지고 있다는 것이 밝혀지면서 부터이다.

나. Phenolic acids

식물체의 phenolic acids는 모든 식물체에 존재하고, 특히 커피와 녹차에 다량 함유되어 있으며,식품 가공 부산물로 버려지는 과실의 껍질 및 곡류의 겨층에도 많이 함유되어 있다. 왕겨 및 미강 페놀산의 주요성분이 되는 phenylpropamoid은 방향족 환에 탄소 3개의 사슬이 달린 구조로서 hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids가 있으며, 일부는 유리형으로 존재하지만 대부분은 세포벽 다당체, 아미노산 등에 ester결합상태로 존재하고 있다. 발아 과정 중에 증가하는 유리형의 phenolic acid는 ferulic acid,ρ-coumaric acid, caffeic acid, *trans*-cinamic acid, benzoic acid, isovitexin 등이 있다.

발아 벼의 주요 페놀산은 강력한 항산화 작용뿐 만 아니라 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고 되어있다. 특히 ferulic acid는 벼의 세포벽 아라비노자일란과 결합되어 존재하거나, 감마오리자놀의 구성성분으로 분포하고 있는 대표적인 페놀산으로써 항산화 효과와 함께 혈전억제 효과, 피부보호 효과 및 항균효과 등이 있다. 또한 최근 보고된 연구에서 제1형 당뇨모델 쥐에서 간의 과산화물 생성 감소 및 혈당강하 효과를 나타냈고, 미강에서 얻은 페놀산 추출액을 제2형 당뇨 모델에 적용한 결과, 인슐린 분비력 향상과 함께 혈당강하 효과를 나타낸 것으로 보고되어 당뇨억제제로써의 가능성이 주목받고 있다.

다. γ-Aminobutyric acid (GABA)

GABA는 동 식물계에서 널리 분포되어 있는 비단백태 아미노산으로 동물의 경우 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로서 잘 알려져 있다. 이러한 GABA는 현미를 발아시킬 때 많이 생성되는데, 전구체인 glutamate가 glutamatedecarboxylase (GAD)의 촉매작용에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. GABA는 중추신경계의 신경전달물질로서 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 촉진시키기도 하고, 혈압강하와 알코올 대사를 증진시키는 것으로 알려져 있다. 한편 GABA의 농도가 급격히 감소하거나 함량이 줄어들 때에는 발작이나 경련 등이 발생하며 이러한 현상이 지속될 시 간질이나 치매 등 신경에 관계된 신경성 질환을 일으킬 수 있는 것으로 보고되었다.

라. Arabinoxylan

아라비노자일란(Arabinoxylan)은 오탄당인 arabinose와 xylose로 구성된 복합 다당체로 옥수수, 소맥, 벼 등의 식물의 씨앗이나 종피, 배아, 줄기 등의 조직에 lignin과 hemicellulose 형태로 들어있다. 아라비노자일란의 기본 구조는 β-(1→4)-xylan 골격을 가진 고도로 분지된 구조를 보이며 곁가지의 비환원 위치에 glucuronic acid와 4-methyl ether도 존재한다. 아라비노자일란의 생리적 기능은 식이섬유로서 기능뿐만 아니라, 면역 증강 활성, 항암, 항바이러스 및 항균활성, 당뇨예방 등이 보고되고 있고 이 가운데 주된 활성은 면역증강 활성으로 인식되고 있다. 또한 최근 미강에서 추출된 아라비노자일란의 항산화, NK cell의 암세포 독성효과, 면역세포 활성화 작용 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다.

마. γ-Oryzanol

감마오리자놀(γ-Oryzanol)은 10개 이상의 phytosteryl ferulate의 혼합물로 약 80% 정도는 cycloartenyl ferulate, 2,4-methylenecycloartanyl ferulate 및 campesteryl ferulate 등이 차지하는 것으로 알려져 있다. 식물성 sterol의 ferulic acid의 ester 형태를 가지고 있는 감마오리자놀은 기능적으로는 plasma lipid 패턴의 개선, plasma-cholesterol 감소, HDL-cholesterol의 증가 및 혈소판 응집억제 등과 같은 인체에 유익한 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 항산화활성의 경우 단독으로는 그다지 강하지는 않지만 토코페롤, 인지질, 아미노산 및 아스코르빈산 등과 같이 사용하면 뛰어난 항산화성을 보인다.

제2절 당뇨병

1. 당뇨병의 개요

당뇨병은 혈액 내에 존재하는 포도당이 소변을 통해 배출되는 질환으로서, 근본적인 치유가 되지 않는 만성퇴행성질환중의 하나이다. 국내에서의 당뇨병 유병율은 약 5~10%에 달하는 것으로 알려져 있으며, 2014년 현재당뇨병 환자는 400만명을 넘어서 인구 100명 중 8.3명이 당뇨 질환을 앓고 있는 셈이다. 2025년에는 당뇨병 환자가 약 680만명으로 늘어날 것으로 추산된다.

당뇨병은 인슐린작용, 인슐린 분비, 또는 이러한 두 가지 모두의 결함으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애 증후군이다. 당뇨병을 일으키는 원인으로는 자가면역기전에 의해서 췌장의 베타세포(β-cell)가 파괴되어 인슐린이 절대적으로 부족하게 되는 경우에서부터 인슐린의 작용에 대한 저항성에 이르기까지 다양하나 대부분의 환자에서는 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성이 동시에 존재하는 경우가 많다.

이러한 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당질대사 뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사장애도 함께 일으켜 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등의 합병증을 유발시킴으로써 환자에게 고통과 함께 수명단축의 치명적인 문제를 초래하게 된다. 고혈당의 전형적인 증상은 多飮, 多食, 多尿를 들 수 있으나, 무증상인 환자도 전체 당뇨병환자의 10~15%를 차지하고 있으며, 특히 진단이 안 된 채 지내는 환자도 전체 예상 당뇨병 환자의 50%에 이르는 것으로 알려져 있다.

2. 당뇨병의 예방 및 치료

당뇨병 치료는 식이요법, 운동요법 및 약물요법으로 대별되며 환자의 병태에 따라 결정되고 있다. 당뇨병 발병 이후의 치료는 완치가 거의 불가능하기 때문에 증상을 개선시키고 급만성 합병증을 막는 이차적 예방에 두고 있다. 합병증의 예방에 있어 가장 중요한 것은 혈중 혈당치를 항상 적절한 수준으로 유지할 수 있도록 하는 것이다. 대표적으로 인슐린 약재와 각종 혈당 강하제가 이용되고 있다. 그러나 이러한 혈당치의 관리가 장기간에 걸쳐 철저히 이루어지기는 힘들며 합병증이 나타나기까지 자각증상이 별로 없기 때문에 혈당치의 유지와 더불어 합병의 예방제의 복용은 매우 중요하다고 할 수 있다.

당뇨병 치료의 목적은 첫째, 고혈당에 의한 다음, 다식, 다뇨 및 피로감 등의 증상을 없애고, 둘째, 치료에 수반하기 쉬운 저혈당이나 반대로 심한 인슐린 결핍으로 인한 당뇨병성 케톤산증, 고삼투압성 비케톤성 혼수와 같은 급성 합병증을 예방 치료하는 것과, 셋째, 망막병증, 신증, 신경병증, 죽상경화증, 뇌혈관질환 및 관상동맥질환 같은 만성 합병증을 예방하는데 있다. 당뇨병 치료제는 크게 세 가지, 즉 당이 몸 안에 흡수되지 못하도록 방해하는 당질 분해억제제, 인슐린의 작용을 도와주는 인슐린 저항개선제, 그리고 인슐린 분비 촉진제로 나눌 수 있다.

2010년 전세계적으로 당뇨병 예방 및 치료를 위하여 사용된 비용은 3,760억 달러이며 국제당뇨연맹(IDF)은 2030년에 상기 비용이 4,900억 달러를 넘어설 것으로 예상하고 있다. 당뇨병 치료제 시장은 제약산업에서 가장 빠르게 성장하고 있는 시장 중 하나이다. 전세계 당뇨병 치료제 시장은 2009년 263억 달러에서 2016년에는 443억 달러로 성장이 예상되며, 국내 당뇨병 치료제 시장 규모도 2010년 4,401억원에서 2016년 9,300억원의 시장으로 성장할 것으로 예상된다.

당뇨병 치료제로는 경구용 약물과 인슐린 제제가 있다. 경구용 약물 중 2형 당뇨병에서 1차로 선택하는 메트포르민은 간에서 당분생산을 억제하여 혈당을 효과적으로 낮추며, 체중증가가 없고 가격이 저렴하다. 이외 설폰요소제, TZD, α-glucosidase 억제제, 글리나이드 등이 2차 선택 제제이다. 인슐린과는 다르지만 인슐린 분비를 자극하거나, 당분의 흡수를 억제하거나, 인슐린 감수성을 개선하는 효과를 가진다. 또한 새로운 형태의 치료약으로 GLP-1 작용제, DPP-4 저해제, SGLT2 저해제 등이 강한 경쟁제품으로 예상된다.

제 7 장 참고문헌

Avular B, Cohen PA, Wang YH, Sagi S, Feng W, Wang M, Zweigenhaum J, Shuangcheng M, Khan IA. Chemical profiling and quantification of monacolins and citrinin in red yeast rice commercial raw materials and dietary supplements using liquid chromatography–accurate QToF mass spectrometry: Chemometrics application. J Pharma and Biomed Anal 100: 243–253 (2014)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1200 (1958)

Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. J Agric Food Chem 50: 4959–4964 (2002)

Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a Monascus species. J Antibiotics 32: 852–854 (1979)

Franco CM, Fente CA, Vazquez B, Cepeda A. Simple and sensitive high–performance liquid chromatography fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. J Chromato A 723: 69–75 (1996)

Johns M, Stuart D. Production of pigments by Monascus purpureus in solid culture. J Ind Microbiol 8: 23–28 (1991)

Kang DZ, Um JB, Lee SK, Lee JH. Content of rutin and monacolin K in the red buckwheat fermented with Monascus ruber. Korean J Food Sci Technol 35: 242–245 (2003)

Kang HR. Reduction of citrinin formation in Angkak produced by Monascus purpureus. MS Thesis. Korea University, Seoul, Korea (2011)

Kang YR, Lee SH, Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Hwang Y, Yoo SM, Kim HR, Kim HY, Lee J, Jeong HS. Bulk properties of red pepper powder by drying method and variety. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 1320–1325 (2012)

KFDA. Health functional food code, Korea food and drug adminstration, Seoul, Korea (2014)

Kim DJ, Oh SK, Yoon MR, Chun AR, Hong HC, Lee JS, Kim YK. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown rice and milled rice by cultivar. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 467–473 (2010)

Kim HY, Hwang IG, Joung EM, Kim TM, Kim DJ, Park DS, Lee JS, Jeong HS. Antiproliferation effects of germinated–Korean rough rice extract on human cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 325–330 (2010)

Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee JS, Jeong HS. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activity on different parts of germinated rough rice. J Korean Soc Food Sci Nutr 40: 775-780 (2011)

Kim SD, Kim ID, Park HD, Park MJ. Pigment content in Meju fermented by a Monascus species with different materials. J Korean Soc Food Sci Nutr 30: 1047-1052 (2001)

Kim JH, Kim HJ, Kim C, Jung H, Kim YO, Ju JY, Shin CS. Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by Monascus fermentation. Food Chem 101: 357-364 (2007)

Kim MJ. Analysis of the factors enhancing Monascus pigment production in mixed culture. PhD Dissertation. Yonsei University, Seoul, Korea (1995)

Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim SJ, Lee YR, Lee J, Jeong HS. Effects of high pressure treatment on antioxidant compounds and activity of germinated rough rice (Oryza sativa L.). J Korean Soc Food Sci Nutr 42: 1783-1791 (2013)

Koshi S. A study on pigment produced by microorganisms (Monascus pigments). Technical J on Food Chemistry & Chemicals, 1: 36-39 (1985)

Kwak EJ, Cha SK, Lim SI. The optimal condition for the production and extraction of monacolin K from red-Koji. Korean J Food Sci Technol 35: 830-834 (2003)

Kwon EK, Kim YE, Lee CH, Kim HY. Screening of nine herbs with biological activities on ACE inhibition, HMG-CoA reductase inhibition, and fibrinolysis. Korean J Food Sci Technol 38: 691-698 (2006)

Lee JY. Minimization of the citrinin produced during Monascus fermentation. MS Thesis. Yonsei University, Seoul, Korea (2002)

Lee SM, Kim HS, Yu TS. The optimal condition for production of red pigment by Monascus anka on solid culture. J Korean Soc Food Sci Nutr 32: 155-160 (2003)

Lee YR, Hwang IG, Woo KS, Kim KJ, Jeong HS. Some physiological activities observed from ethanol extracts of germinated specialty rough rice. J Food Sci Nutr 13: 176-181 (2008)

Lee YR, Woo KS, Kim KJ, Son JR, Jeong HS. Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. Food Sci Biotechnol 16: 765-770 (2007)

Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI. The inhibitory effect of Cornus walteri extract against α-amylase. J Korean Soc Appl Biol Chem 48 : 103-108 (2005)

Martinková L, Jůzlová P, Veselý D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus Monascus. J Appl Bacteriol 79: 609-616 (1995)

Oh SH, Kang YR, Lee SH, Hwang IG, Yoo SM, Kim HY, Lee J, Jeong HS. Physical properties of red

pepper powder at different particle sizes. J Korean Soc Food Sci Nutr 42: 421-426 (2013)

Park CD, Jung HJ, Lee HW, Kim HS, Yu TS. Antioxidant activity of Monascus pigment of Monascus purpureus P-57 mutant. Korean J Microbiol 41: 135-139 (2005)

Park JY, Han SI, Seo WD, Ra JE, Sim EY, Nam MH. Study on Monascus strains and characteristic for manufacturing red yeast rice with high production of monacolin K. Korean J Crop Sci 59: 167-173 (2014)

Park SJ, Kim MH, Shin HM. Physical properties of rice husk. J Biosystems Eng 30: 229-234 (2005)

Rhyu MR, Kim EY. The relation between antihypertensive effect and γ-aminobutyric acid, mycelial weight and pigment of Monascus. Korean J Food Sci Technol 34: 737-740 (2002)

Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. J Biol Chem 244: 3855-3863 (1969)

Sun J, CHu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agricultural Food Chem 50: 7449-7454 (2002)

Ti H, Li Q, Zhang R, Deng Y, Wei Z, Chi J, Zhang Y. Free and bound phenolic profiles and antioxidant activity of milled fractions of different indica rice varieties cultivated in southern China. Food Chem 159: 166-174 (2014)

Tibbot BK, Skadsen RW. Molecular cloning and characterization of gibberellin-inducible, putative α-glucosidase gene from barley. Plant Mol Biol 30: 229-241 (1996)

Tseng YY, Chen MT, Lin CF. Growth, pigment production and protease activity of Monascus purpureus as affected by salt, sodium nitrate, polyphosphate and various sugars. J Appl Microbiol 88: 31-37 (2000)

Wild D, Tóth G, Humpf HU. New Monascus metabolite isolated from red yeast rice (ankak, red koji). J Agric Food Chem 50: 3999-4002 (2002)

Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. J Biochem Biophys Methods 64: 207-215 (2005)

[별첨]

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	발아 벼를 이용한 당뇨병 예방 식품개발 및 산업화		
주관연구책임자	정 헌 상	주관기관	충북대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
곡류 발아 기술	대한민국	100%	100%	110%	
활성물질의 분리 기술	일본	70%	80%	100%	
대량생산공정 확립 기술	일본	80%	90%	100%	
제형화 기술	일본	80%	70%	90%	

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*벼의 당뇨 및 기능성 활용분야*	*벼의 당뇨 및 기능성 활용분야*
Keyword		벼, 당뇨	벼, 당뇨
검색건수		272	272
유효특허건수		9	9
핵심특허 및 관련성	특허명	기능성 현미 가공장치 (omitted)	당뇨병 예방 치료 및 내장 기능 치료제 조성물과 그 제조방법 (A diabetes pharmaceutical composition and manufacturing process thereof)
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2008	2008
	관련성(%)	60	50
	유사점	당뇨 예방효능 평가	당뇨 예방효능 평가
	차이점	발아 공정을 이용	발아 벼 단일추출물을 이용

개발기술명		*발아벼의 항당뇨 기능성*	*발아벼의 항당뇨 기능성 활용분야*
Keyword		발아, 당뇨	발아, 당뇨
검색건수		578	578
유효특허건수		6	6
핵심특허 및 관련성	특허명	발아현미 추출물을 포함하는 항당뇨 조성물	당뇨환자의 혈당조절 생식식품 및 그 제조방법 (THE UNCOOKED FOOD FOR GLUCOSE CONTROL OF A DIABETICAND METHOD OF MANUFACTURE)
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2011	2002
	관련성(%)	80	60
	유사점	발아공정도입, 당뇨 예방효능 평가	당뇨 예방효능 평가, 제형개발
	차이점	발아 벼를 이용	발아 벼를 이용하여 다양한 제형개발

개발기술명		*벼의 당뇨 및 기능성 활용*	*벼의 당뇨 및 기능성 활용*
Keyword		발아, 당뇨	발아, 당뇨
검색건수		578	578
유효특허건수		6	6
핵심특허 및 관련성	특허명	현미배아, 참쌀가루, 발아현미 녹차잎분말등각종영양재료를 주로한 균형식품	항당뇨 기능의 생식 타입 차(茶) 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2006	2001
	관련성(%)	60	60
	유사점	발아공정도입, 당뇨 예방효능 평가	발아공정도입, 당뇨 예방효능 평가, 제형개발
	차이점	발아 벼를 이용	발아 벼를 이용하여 다양한 제형개발

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	Pubmed DB, Sciencedirect DB, 한국학술정보, 국회도서관
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록, 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*항당뇨활성 규명(벼)*	*항당뇨활성 규명(벼)*
Keyword		벼(Rough rice), 당뇨	벼(Rough rice), 당뇨
검색건수		114	114
유효논문건수		9	9
핵심논문 및 관련성	논문명	왕겨추출물의 쥐소장점막 α-glucosidase에 대한 *in vitro*에서의 저해효과	γ-oryzanol의 급여가 KK 당뇨 마우스의 혈당에 미치는 영향
	학술지명	한국식품과학회	한국식품영양학회지
	저 자	김혜영	이성현, 전혜경, 장순옥, 이연숙
	게재년도	1997	2004
	관련성(%)	40	40
	유사점	벼 추출물의 항당뇨 효능 평가	벼에 존재하는 유용성분의 항당뇨 효능 평가
	차이점	발아 벼 전곡을 이용	발아 벼 전곡을 이용

개발기술명		*항당뇨활성 규명(벼)*	*항당뇨활성 규명(벼)*
Keyword		현미(brown rice), 당뇨	벼(Rough rice), 당뇨
검색건수		17,800	114
유효논문건수		37	9
핵심논문 및 관련성	논문명	함염증 및 항당뇨 활성에 미치는 현미 추출물의 영향	쌀눈기름의 급여가 당뇨병 환자의 혈당, 혈청 지질 및 혈압 수준에 미치는 영향
	학술지명	생명과학회지	한국지질동맥경화학회
	저 자	조은경, 정경임, 최영주	이성현, 전혜경, 이연숙
	게재년도	2012	2001
	관련성(%)	60	40
	유사점	항당뇨 효능 평가	항당뇨 효능 평가
	차이점	발아 벼 전곡을 이용	발아 벼 전곡을 이용

개발기술명		항당뇨활성 규명(벼)	항당뇨활성 규명(벼)
Keyword		발아벼(Germinated rough rice), 당뇨	발아(Germination), 당뇨
검색건수		1,410	12,000
유효논문건수		26	31
핵심논문 및 관련성	논문명	건답 및 담수상태에서 동진벼와 Red rice 의 발아 중 전분분해효소 활성의 변화	밀순 물추출물의 항산화 효과 및 streptozotocin 으로 유발한 당뇨 흰쥐에서 혈당강하에 미치는 영향
	학술지명	한국잡초학회	한국생약학회
	저 자	이관휘, 홍경식, 한성수, 조광연	이선희, 이영미, 이희선, 김대기
	게재년도	1999	2009
	관련성(%)	80	60
	유사점	발아과정에서 생성되는 효소작용에 의한 a-glucosidase 저해효과에 따른 항당뇨활성	발아과정에서 생성 또는 증가되는 물질에 의한 혈당강화효과
	차이점	3T3-L1 지방세포, 동물실험 및 임상실험을 통한 항당뇨 효능 평가	발아 벼 전곡을 이용

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 쌀 수급 및 발아 곡류 시장 규모

O 우리나라의 쌀 소비 자급률은 이미 100%를 초과하였고, 재고량이 매년 늘어나고 있으며, 수입쌀 시판이 가속화되고 있어 쌀 가격의 하락이 초래되고 있다. 특히 수입쌀의 시판물량이 중저가로 몰리면서 고품질의 쌀 생산에 힘을 기울이고 있는 추세이다.

O 이와 같이 우리나라의 쌀 산업은 WTO/DDA 협상, FTA 등 국제화에 따른 수입개방에 대응하여 국내 쌀 산업의 경쟁력 확보와 고부가가치 상품개발을 통한 국제경쟁력을 갖추어야 할 필요가 있다.

O 특히 기능성 보조식품으로 알려져 있는 발아현미는 쌀에 기능성을 부여할 수 있는 발아공정을 도입함으로써 틈새시장을 공략하고 있으며, 판매량까지 증가하여 발아현미 시장의 규모화를 통해 식품산업의 발전을 기대할 수 있다.

O 우리나라의 연간 쌀 시장규모는 농협중앙회 추산자료에 의하면 2010년 현재 약 10~11조원으로 추정하고 있으며, 전체 쌀 시장에서 현미가 차지하는 비중은 약 1,000억원 이상, 이 중에서 발아현미 시장은 약 500억원 규모로 추정되고 있다.

O 한편 발아현미 생산업체에서 자체적으로 추정한 시장규모는 전체 쌀 소비액의 약 0.45%인 500억원으로 나타났다. 그러나 발아현미 생산업체에 대한 탐문 조사 결과 농협중앙회 및 일부 생산업체에서 추정한 생산규모에는 훨씬 미치지 못하는 250~300억원 이하로 추정되고 있으며, 특히 발아현미 생산업체의 생산 규모가 매우 영세하여 정확한 시장규모의 추정은 매우 어려운 것으로 나타났다.

표. 발아현미 시장 규모 추정

단위: 억원

구 분	매출액	비 고
농협중앙회	500	자체 추정
발아현미 생산업체 추정	500	쌀 소비액의 0.45%
발아현미 생산업체 조사 추정	250~350	50~100(1), 10~20억(5), 5~10(5), 1~5(10), 1억 미만(50)

자료 : 농협중앙회 및 현지 업체자료 참고.

O 발아현미 생산업체의 주요 제품은 발아현미 원료곡 위주로 생산하는 업체가 전체의 59.6%를 차지하고 있어 아직까지 생산라인이 발아현미 원료곡에 한정되어 있음을 알 수 있다. 그러나 사업의 다각화를 위해 발아현미와 잡곡 등 혼합곡을 동시에 취급하는 업체가 21.3%나 되고 있으며, 이외에도 발아현미와 양곡가공식품을 생산하는 업체도 19.1%나 되는 것으로 나타났다.

표. 발아현미 업체의 제품 현황

구 분	업체 수	비 중
발아현미 위주	28	59.6
발아현미 + 혼합곡	10	21.3
발아현미 + 양곡 가공	9	19.1
계	47	100.0

자료 : 농협중앙회 및 현지 업체자료 참고.

O 한편 규모화 된 일부 생산업체에서는 발아현미를 가공한 선·생식류, 죽류, 떡 및 국수류 등 소비자의 수요와 기호를 고려한 다양한 제품개발에 힘을 기울이고 있다. 특히 최근에는 대기업을 중심으로 다양한 인스턴트 밥류, 기능성 음료류, 웰빙 면류, 화장품, 의약품 등 발아현미 제품을 출시하고 있어 발아곡류 시장의 지속적인 확대를 예고하고 있다.

O 종자의 발아에 관한 연구는 수년 전부터 이루어져 왔으나, 그 연구는 대부분 발아현미에 의한 관심 증대로 다른 종자 및 발아전곡에 관한 연구 및 제품화는 매우 미비한 실정이다.

2) 건강기능식품 제품 생산 및 시장 현황

O 2015년 건강기능식품 산업 총생산액은 약 1.6조원으로 국내 총생산의 0.11%를 차지하고 있으며 제조업 총 생산액 대비 0.40 %이다.

O 건강기능식품의 세계 시장규모는 약 3천억달러로, 국내시장은 세계시장 규모의 0.5% 수준으로 나타났다.

그림. 건강기능식품 생산액

O 건강기능식품의 2010년 총생산액 10,671억원에서 2015년 1,631억원으로 크게 증가하였다.

O 매출액 상위 5개 품목 : 홍삼 제품(39.99%), 개별인정제품(20.03%), 비타민 및 무기질(8.91%), 프로바이오틱스(8.72%), 밀크씨슬 추출물(4.23%)로 나타났다.

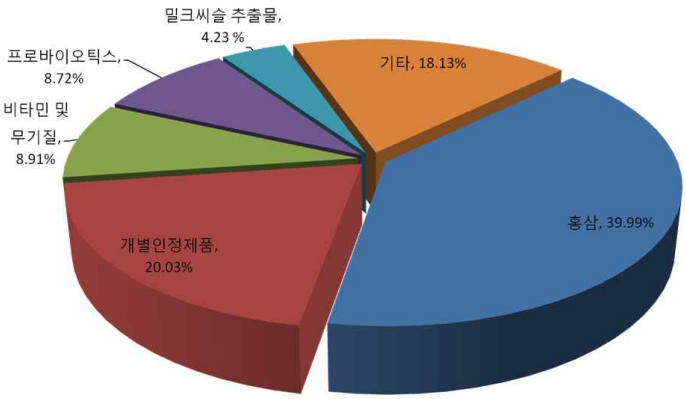


그림. 건강기능식품 품목별 현황(2014년)

O 건강기능식품 업체는 매년 증가하고 있는 추세로 2007년-2014년까지 연평균 12.5% 증가하였다.

O 2010년을 기준으로 일반판매업이 70,753개소로 전체의 93.8%를 차지하고 있으며, 수입업(2,818개소, 3.7%), 유통전문판매업(1,481개소, 2.0%), 전문제조업(361개소, 0.5%), 벤

처제조업(36개소,0.1%)의 순이다.

O 2010년 일반판매업의 급격한 성장이 눈에 띄는 부분이다('09년 대비 약 18.6% 증가).

구분	2007	2008	2009	2010
건강기능식품제조업	345	356	385	397
건강기능식품수입업	2,201	2,395	2,528	2,818
건강기능식품판매업	47,709	55,819	60,688	72,234
계	50,255	58,570	63,601	75,449

그림. 건강기능식품 업체 현황

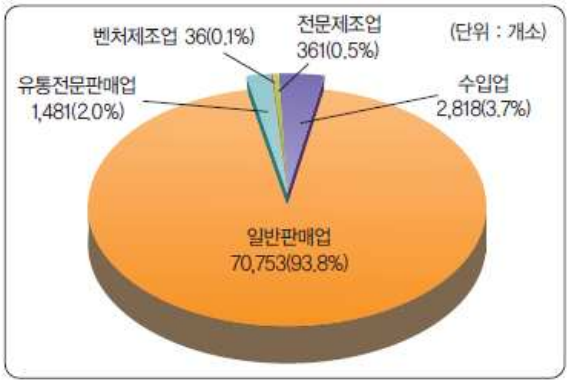


그림. 건강기능식품 업체 현황(2010년)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향

O 시장성 분석 결과 발아 곡류 시장 규모가 증가하고 있으며, 발아 곡류 시장은 쌀 소비 확대와 한식 세계화를 추진하고 있는 정부 정책과도 일치되고 있다. 따라서 현재 발아 현미에 치중되어 있는 발아 곡류에 대한 부가가치 증대를 위한 연구가 필요하며, 발아 벼를 이용한 건강기능성 식품의 개발이 필요하다.

O 이에 본 연구에서는 기능성 물질을 함유하고 있는 미강을 포함한 전곡을 활용한다는 측면에서 발아 현미와는 차별화를 둔 발아 벼를 이용하여 건강기능식품 소재 및 제품화 연구를 진행하고자 한다.

O 이를 위하여 발아 벼로부터 항당뇨 활성을 갖는 물질을 분리·동정하고, 이의 메카니즘을 규명함으로써 과학적 연구 근거를 바탕으로 신뢰성 있는 생산업체에서 기능식품이 생산되어 국가기관으로부터 공인하에 시판된다면, 부가가치를 창출할 수 있으며, 매년 누적되는 국내 쌀 재고량 감소는 물론 이에 따른 농민의 소득증대와 국민건강증진에도 크게 기여할 것으로 전망된다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	1,500	2,500	4,000	8,000
경제적 파급효과	600	1,000	1,600	3,200
부가가치 창출액	1,000	1,500	2,500	5,000
합 계	3,100	5,000	8,100	16,200

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.