

발간등록번호

11-1541000-001211-01

특수기능성 쌀 품종육성 및 이를 이용한 맞춤형
고부가가치 명품 브랜드화
(Commercialization and Breeding of the Functional
Rice)

한국방송통신대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 "특수기능성 쌀 품종육성 및 이를 이용한 맞춤형 고부가가치 명품 브랜드화"과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 2 월 25 일

주관연구기관명 : 한국방송통신대학교
주관연구책임자 : 류 수 노
세부연구책임자 : 류 수 노
세부연구기관명 : 한국방송통신대학교
세부연구책임자 : 한 상 준
협동연구기관명 : (주) 이 름
협동연구책임자 : 홍 성 길

요 약 문

I. 제목

특수기능성 쌀 품종육성 및 이를 이용한 맞춤형 고부가가치 명품 브랜드화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 세계 최고 수준의 안토시아닌 고함유 품종 등록 및 멀티기능 흑미 신품종 육성
- 쌀 미강 함유 신생리활성 물질 탐색 및 정량분석조건 확립
- 고기능성 식물자원을 이용한 신기능성 소재 및 제품 개발
- 기능성 소재 및 제품 개발을 통한 내수 확대 및 해외 시장 개척

III. 연구개발 내용 및 범위

- 안토시아닌 고함유 “Super C3G” 계통의 작물학적 특성 검정 및 품종등록
- 큰눈자미, 대립자미, 슈퍼자미, C3G색소 고함유 찰벼 등 다기능성 유색미 품종육성을 위한 고세대 계통육성
- 안토시아닌 고함유 신품종 및 육성계통 병해충 저항성 검정
- 활성추정분획법과 생리활성 검정을 통한 미강내 고기능성 물질의 탐색, 순수정제 분리 및 구조 동정
- HPLC/MS/MS를 이용한 특수기능성 생리활성 물질의 정량분석방법 개발 및 유전자원 평가
- 기능성 쌀품종의 미강을 이용한 기능성 식품소재의 개발
- 미강 발효물의 안전성/안정성 및 관련 개발 제품의 안정성 규명
- 특수 기능성 쌀을 이용한 기능성 곡류 가공품 개발

IV. 연구개발결과

- 특수기능성 쌀 품종육성 : 3품종(슈퍼자미, 큰눈자미, 대립자미)
- 육성계통의 종실내 미량원소, 성분함량 등 품질특성 검증 및 도열병 저항성 유전자 탐색
- 유색미 유전자원의 도열병 저항성 유전자 탐색
- 유색미 추출분획 제조-실리카겔 컬럼, 활성성분의 분리-리사이클HPLC, prep-HPLC
- 육성품종 추출물의 항산화능 검정-DPPH법, 육성품종 추출물에 대한 여성호르몬 에스트로겐 유사 효과 검정-RT-PCR
- 육성품종 함유 억제성 신경전달물질(GABA) 정량 분석법 개발-GC/MS 이용
- 자미벼 함유 안토시아닌 색소 분리
- 자미벼 추출물의 암세포 사멸효과 검증, 에스트로겐 유사효과 검정 및 항아토피 관련 활성 탐색
- 오리자놀 및 토코페놀 함량 분석법 개발 및 육성 계통 수확 후 함량분석
- 버섯균, 유산균, 효모를 이용한 발효균주별 미강발효물 생산
- 미강발효물의 면역/항암능 측정을 통한 최적 발효물 선발과 면역활성능 규명(in vitro/in vivo) 및 항암능 규명(in vivo)

- 미강 유래 상업용 소재와의 기능성 비교 활성 검증(면역활성)과 활성성분 변화 분석을 통한 개발 소재의 안정성 분석
- 특수미 미강 발효소재의 면역증진 및 항암활성의 in vivo 검증과 항염증 기능 검증
- 미강 발효 소재를 이용한 기능성 제품 개발(정제 및 분말, 과립)
- 신규 품종 개량(슈퍼자미벼)의 생리활성 검색

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 세계 최고 함량의 안토시아닌 함유 쌀 품종의 개발로 우수 유전자원을 보호 받을 수 있고, 추가 멀티 기능 유색미 쌀 품종육성에 선도적 위치를 점할 수 있다.
- 벼 신수요 창출에 의한 농가의 재배면적 확대 및 소득증대에 기여.
- 신기능성 벼 유전자원의 조기확보로 선진국과 기술협력 등 유대강화.
- 농업부산물(쌀겨 등) 이용에 따른 자원재활용 창출.
- 쌀에 함유되어 있는 생리활성 물질을 동정하여 특수 맞춤형 기능성 품종을 육성할 수 있는 근거를 마련하는 계기가 됨.
- 기능성물질의 실용화, 식품소재 등 용도의 다양화로 새로운 수요 창출
- 개발소재와 해외 상업용소재와의 비교분석을 통한 해외 시장 경쟁력 확보

SUMMARY

I. Title

Commercialization and Breeding of the Functional Rice.

II. Objectives and Significance of the research

- Registration of the world's best level of anthocyanin containing rice cultivar and Breeding of new multi-functional black colored rice.
- Identification and analytical method establishment of the phytochemicals in the rice bran.
- Development of nutraceutical product using the highly functional crop resources.
- Expansion of domestic demand and foreign market with nutraceutical products.

III. Contents and Scope

- Agronomic characterization and registration of anthocyanin high containing rice varieties.
- Breeding of advanced lines to select multi-functional colored rice cultivars.
- Resistance test for anthocyanin highly containing rice varieties to disease and pest.
- Isolation and identification of biological active compounds from rice bran.
- Development of analytical method of phytochemical in rice bran and germplasm evaluation using HPLC/MS/MS.
- Development of functional food materials using anthocyanin highly containing rice cultivar.
- Assessment of food safety and insecurity of the fermented rice bran and related functional products.
- Development of nutraceutical grain food products using multi-functional rice.

IV. Results and Suggestions

Rice is the principal cereal in Asia, some countries in Africa, and Latin America. With growing concerns regarding national health and the expanding markets of health food, diverse agricultural crops or residues are attractive sources of bioactive compounds. Colored rice is broadly known as an enriched rice with improved organoleptic properties. Our research group bred several rice cultivars which containing high anthocyanin. Among them, C3GHi was selected for the phytochemical investigation.

In relation to the four varieties of colored rice, analyses were made of the oil content, the fatty acid composition, the protein content, the amino acid component and the pigmentary characteristics of testae. The followings show the results in summary.

In the case of Superjami having a high content of cyanidin-3-glucoside (C3G), it had a low content of oil but had a high content of protein. In particular, it had a higher content of oleic acid (C18:1) and linolenic acid (C18:3) in comparison with other varieties that had the high content of C3G. Four varieties of colored rice were similar in the essential amino acid content (35.48 - 36.15%); especially, Superjami was high in serine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine. The four varieties had the highest content of glutamic acid but the lowest content of methionine. The C3G content in Superjami was at least 10 times higher than that in Heugjinjubyeo. Actually, the content per 100 gram indicated 2,840mg and 2,655mg in 2008 and 2009 respectively. The C3G content in the varieties reached the peak 15 to 20 days after pollination, but later it increased gently. In the case of Superjami having a high content of C3G, the testa on the opposite of the gemmule, i.e., the aleurone layer, was thicker than that in the direction of the gemmule, as compared to other varieties.

'Daeripjami', a new large-grain and blackish purple pigmented rice cultivar, was derived from a cross between Geomjeongbyeo having a high C3G(cyaniding 3-glucoside) content and Daeribbyeo 1 having a very large grain and good popping quality in 2002 and was selected by means of a pedigree breeding. The pedigree of 'Daeripjami', KNOU 4 designated in 2008 was SR28755-44-2-10-1-2-1. It has about 80.5cm in culmlength and 87 spikelets per panicle. The 1,000-brown rice weight is 27.9g, 1.6 times heavier than that of Heugjinjubyeo and C3G content to 'Daeripjami' is 3.6 times higher compared with that of Heugjinjubyeo. The yield potential of 'Daeripjami' is about 4.5MT/ha in brown rice at standard fertilizer application level in middle plain.

'Keunnunjami', a new blackish purple pigmented rice cultivar with giant embryo, is a mid-maturing ecotype developed by rice breeding team at Korean National Open University. This variety was derived from three-way cross between Heugjinjubyeo / Suweon 425 // EM76 in 2002 and selected by pedigree breeding method until F₇ generation. The heading date of this variety is August 13 and 17 days later than that of Heugjinjubyeo in middle plain areas. 'Keunnunjami' has 87.1 cm of culm height and 114 spikelets per panicle. Grain

weight of 1,000-brown rice of this variety is lighter than of Heugjinjubyeo. However embryo weight is 2.82 times heavier than that of heugjinjubyeo on the single grain base. C3G(Cyanidin3-glucoside) content of 'Keunnunjami' is 2 times higher compared with that of Heugjinjubyeo. The brown rice yield of 'Keunnunjami' was about 4.10MT/ha at ordinary fertilizer level.

Three phenolic compounds were isolated from the butanol fraction. Their structure were elucidated as quercetin, protocatechuic acid, and vanillic acid. The analgesic activity of them were revealed. Thus we measured their degranulation-inhibitory effects against RBL-2H3 cells induced by the IgE-antigen complex. Among them, protocatechuic acid potently inhibited the degranulation of RBL-2H3 cells. However C3G showed the weak inhibition compared to those of the others. Mast cell play a key role in immediate-type allergic reactions through the release of numerous mediators and cytokines. TNF- α is a key mediator in many cytokine-dependent inflammatory events. TNF- α is released in allergic responses from both mast cells and macrophages via IgE-dependent mechanism. It has been well known that TNF- α induces chemotaxis of neutrophils and T-cells, enhances cytotoxicity of macrophages, and stimulates the expression of adhesion molecules from endothelial cells. Many reviews indicated that TNF- α released from mast cell is responsible for eosinophil survival through partial inhibition of apoptosis, thereby contributes to chronic inflammation. In this regard, our results suggest that protocatechuic acid and vanillic acid could affect the acute allergic reaction as well as chronic inflammation through the regulation of cytokines gene expression in the mast cell.

Black colored rice varieties contained large amount of phenolic compounds. Based on the backgrounds, anti-inflammatory activities of colored rice cultivars were determined as the major parameter for physiological functionality for health. Anti-inflammatory activities of the pigmented rices were assessed using RBL-2H3 cells. The results showed that the pigmented rices inhibited the secretion of histamine and β -hexosaminidase significantly as compared to those of the non-pigmented rice. In addition, the pigmented rice inhibited the generation of proinflammatory cytokines including IL-1 β and IL-6 in transcriptional level more effectively than the non-pigmented rice did. To understand the antiallergic mechanism of colored rice cultivars, their inhibitory effects in the protein expressions of proinflammatory cytokine TNF- α and IgE switching cytokine IL-4 in RBL-2H3 cells induced by IgE-antigen complex were measured using an ELISA assay. Tested rice extracts at a concentration of 50ppm were found to inhibit the expressions of TNF- α and IL-4 by 50%, respectively. Finally, these findings suggest that colored rice and its main constituents may improve the IgE-induced anaphylaxis and scratching behaviors.

Phytoestrogenic effects of colored rice varieties were investigated. Heugjinjubyeo, Suwon 425, Superjami, Keunnunjami, and chuchungbyeo as a positive control were tested. Aqueous ethanol extracts of tested rice varieties were found to stimulate cell proliferation of MCF-7 cells by 70%. Beside cell proliferation, increased pS2 and c- $\frac{1}{2}$ levels were observed after

exposure of the cells to rice extracts. The progesterone receptor(PR) is an intracellular steroid receptor that specifically binds progesterone. Estrogen is necessary to induce the progesterone receptors. In this study, PR was increased by the tested rice extracts. However the quantity of ER- α was not increased by the tested rice extracts. Although the exact mechanism and key compounds are not clear, colored rice improves the status of sex hormones, especially estrogen. These effects might reduce the risk of breast cancer and cardiovascular diseases in postmenopausal women.

C3GHi, a novel black rice variety developed by conventional breeding has more high contents of cyanidine-3-glucoside(C3G) and a more strong antioxidant than normal black rice. we investigate the antioxidative potential and anti-diabetic activity of C3GHi and extract of it for the purpose of development of functional materials or replacement meal for diabetic patients. Using *in vitro* antioxidative activity assay system such as DPPH radical quenching assay, superoxide anion radical scavenging assay, inhibition of lipid peroxidation and DNA breakage assay, C3GHi extract was observed to have more high antioxidative activity than normal black rice breed. The glycemic index of a freeze dried powder of C3GHi brown rice showed 43.7 ± 18.8 , which belonged to low GI food(GI of 55 or less). Using *in vivo* diabetic model such as *db/db* mice model and streptozotocin-induced diabetic model, C3GHi rice extract decrease blood glucose level and inhibit oxidative stress in blood. From the results, we think that the C3GHi varieties have a potential for the functional materials or ingredient of meal replacement for diabetic patients.

Rice bran is by-products from the dehulling process of rice, an important food resource in Korea. Various studies have been reported immune-enhancing effects of rice bran cultured with *Lentinus edodes*. In particular black rice bran that contains anthocyanin has the beneficial effects on immune system. C3GHi, a recently released black colored rice cultivar, has higher contents of cyanidine-3-glucoside(C3G), a strong antioxidant than those of currently cultivated black rice cultivars. Using *in vivo* and *in vitro* model for inflammation and allergy, anti-inflammatory and anti-allergic effects of C3G-F were determined. C3G-F induced tumor suppressive effect on Sarcoma-180 cell and B16 melanoma cell injected to mice. These results suggest that the capacity of C3G-F seems to act as a potent immunomodulator and with the absence of notable side-effects, C3G-F could be used as a novel functional food ingredient having possible therapeutic effects against immunological disorders. we also investigate the possible immune-enhancing effects of black rice bran substance extracted from a submerged culture of *Lentinus edodes* with black rice bran(crude fermentation-polysaccharide, CFP) and products(crude fermentation-polysaccharide-*S. cerevisiae* CFP-S, crude fermentation-polysaccharide-*L. gasserii*, CFP-L) which are of secondary fermentation of by using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus gasserii* in the Blab/c male mice. We found that supplementation of CFP, CFP-S and CFP-L enhanced macrophage and splenocyte proliferation compared to the control group(NC) in mice. Also, we measured the concentration of cytokines(IFN- γ , TNF-

α , IL-6) secreted by activated macrophage and splenocyte proliferation compared to the control group but supplementation of CFP-L decreased the splenocyte proliferation compared to the control group (without mitogen and treated with LPS). When macrophage and splenocyte were stimulated by CFP and CFP-S supplementation, it was increased IFN- γ , TNF- α and IL-6 concentration compared with the control group. These results suggest that the capacity of CFP and CFP-S seem to act as a potent immune modulator causing augmentation of immune cell activity, and enhance the immune function through regulating cytokine production capacity by activated macrophage and splenocyte in mice.

V. Conclusions and Utilization

- Protection for world's best level of anthocyanin containing rice cultivar and advanced step to breeding of new multi-functional black colored rice.
- Enlarge the culture land and income of farmers derived from new demanding.
- Technical cooperation with developed country by using genetic resources which is new functional varieties.
- Assessment of food safety and insecurity of the fermented rice bran and related functional products.
- Prepare for basis to breed personalized functional varieties by identified biological active substances in rice.
- Make new demand caused by commercialized functional substances

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Chapter 2. Research developmet status	13
Chapter 3. Results and discussions	16
section 1. Breeding new functional rice and test of pathogen resistance	16
section 2. Investigate of new physiological active substances in colored rice	64
section 3. Commercialization of colored rice	114
Chapter 4. Research goal attainment and contribution to related area	162
Chapter 5. Plan for Application of research results	166
Chapter 6. Informations of scientific techniques collected from foreign countries during the research	176
Chapter 7. References	177

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
1. 국내 제품 생산 및 기술현황	13
2. 국외 제품 생산 및 기술현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제1절 특수기능성 맞춤형 쌀품종육성 및 병저항성 검정	16
1. 슈퍼자미벼 품종육성	16
2. 큰눈자미벼 품종육성	36
3. 대립자미벼 품종육성	48
4. 안토시아닌 고함유 계통의 도열병 저항성 검정	59
제2절 신생리활성 물질의 탐색 및 분석	64
1. 쌀함유 신생리활성물질 탐색	64
2. 쌀 품종 별 발아시간에 따른 GABA 함량	72
3. 안토시아닌 고함유 품종의 세포독성 평가	75
4. 안토시아닌 고함유 품종의 여성호르몬 유사효과 검정	81
5. 안토시아닌 고함유 품종의 항알레르기 효과	97
제3절 유색미 품종의 고부가가치 명품 브랜드화	114
1. 면역증진 기능의 특수미 미강 발효물 개발	114
2. 슈퍼자미 미강 발효물의 생리 활성 검증	124
3. 슈퍼자미의 항당뇨 효능 검증	144
4. 슈퍼자미를 적용한 생식 제품의 생리활성	149
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	162
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	166
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	176
제 7 장 참고문헌	177

제 1 장 연구개발과제의 개요

쌀은 주로 아시아 국가의 주요 식량원이며, 영양적으로 에너지 공급원으로서 인식되어 왔다. 그러나 최근 쌀의 생리적 효능이 규명되면서, 기능성 쌀 개발에 대한 연구가 활발해지고 있다. 특히 만성질환자가 많은 서구에서는 쌀에 대한 관심이 높아지고 있으며, 미국 암연구소(NCI)의 Designer Food Program에서는 암 예방 식품 소재 40가지 안에 현미가 선정되기도 하였다(U.S. National Cancer Institute 1991). 그리고 최근에는 기능성 소재에 대한 관심이 급증하면서 기능성이 부여된 특수미에 대한 관심이 높아지고 있다. 특수미 중 유색미는 품종이 개량된 고기능성 쌀로서 독특한 향미와 각종 무기질, 비타민 불포화지방산 및 단백질 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 작용과 면역기능을 강화시켜 노화방지, 특정 질병 예방 등 건강기능성 소재로서의 이용치가 높다(Seo 등 2008). 유색미의 색소는 적갈색에서 흑자색에 이르는 다양한 안토시아닌 색소이다. 특히 쌀에 존재하는 안토시아닌은 Cyanidin-3-Glucoside 및 Peonidin-3-Glucoside 등이 많이 보고되고 있다(Choi 등 1996). 유색미의 색소 분획은 높은 항산화 활성과 항암 활성, 그리고 염증 발생에 대한 억제 활성 등이 보고되고 있다(Stoclet 등 2004; Manach 등 2005; Ling 등 2001; Xia 등 2003; McGhie 등 2003; Williams 등 2002).

유색미의 색소는 대부분 과피인 미강에 존재한다. 그리고 유색미의 미강에는 안토시아닌뿐만 아니라 오리지놀(Oryzanol), 피틴산(Phytic acid), 페루릭산(Ferulic acid), 헤미셀룰로오스(Hemicelluloses), 토크페롤(Tocopherol), 옥타코사놀(Octacosanol) 등이 함유되어 있다. 이 중 식물체의 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로오스는 오탄당과 육탄당, 우론산(Uronic acid) 등을 함유하고 있고, 비 셀룰로오스계 고분자 다당류로서 미강에 약 20~21% 함유되어 있다. 1998년 미국의 UCLA대학의 Mamdoh Ghoneum 박사는 미강에 다량 함유된 식이섬유소인 헤미셀룰로오스를 표고버섯 균사체의 특수효소로 분해하여 만든 아라비녹실란(Arabinoxylan)이라는 생리활성물질을 발견하였다. 아라비녹실란은 면역세포 중 암세포와 최전선에서 싸우는 자연살해세포(Natural Killer cell, NK cell)를 활성화시켜 암세포를 파괴하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ghoneum 등 1999; Willam DG 1998; Ghoneum M 1998). 현재 일본의 대화제약에서는 바이오브랜(BioBran)이라는 제품명으로 기능성 다당체를 주 원료로 하여 일본 국내뿐 아니라 미국과 유럽, 국내 시장에까지 판매하고 있다.

현재 우리나라에서는 연간 미강이 40~60톤 가량 벼 도정 부산물로 발생하고 있다. 그러나 그 중 20% 정도만 이용되고 있을 뿐 대부분이 폐기물로 버려지고 있는 실정이다. 특히 유색미는 연간 약 18,000톤 정도가 사용되고 있으며, 가공시 발생하는 부산물인 미강은 사료용으로만 사용되고 있다. 따라서 저가의 미강을 이용한 기능성 식품 소재의 개발은 부가가치가 높은 생산품으로 농가 소득의 증대를 불러올 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 차후 면역 관련 기능성 소재로 새로운 건강기능식품 개발을 이끌 수도 있다. 여러 연구 결과, 유색미 미강에 색소로 존재하는 안토시아닌은 항산화 활성이 있음이 보고되어 왔고, 미강의 표고버섯 균사체 발효로 생성된 다당체 성분은 면역 증진 작용 및 항암 작용을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 제1세부과제에서 특수기능성 맞춤형 쌀품종 육성 및 병저항성 검정을 수행하였고, 제2세부과제에서 신생리활성물질의 탐색 및 분석을, 제1 협동연구과제에서는 특수기능성 쌀을 이용한 고부가가치 명품브랜드화 연구를 수행하였다. 특수기능성 쌀의 활성평가는 세포독성평가(폐암, 간암, 자궁암, 유방암), 여성호르몬 유사효과검정, 항소양활성평가 그리고

유색미의 미강을 표고버섯 균사체로 발효한 1차 발효물과 1차 발효물을 통해 생성된 다당체 성분을 효모와 유산균으로 2차 발효시킨 2차 발효물을 이용해 *in vivo*상에서 면역활성을 평가하였다. 이로써 유색미 미강의 1차 발효물과 2차 발효물이 보유한 생리활성을 규명하고 활용하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1) 국내 제품생산 및 시장현황

○ 현대사회에 물질적 풍요로 인한 지방과다섭취, 복잡한 현대사회의 스트레스와 과음 등으로 고지혈증, 동맥경화증과 같은 만성질환이 늘면서 지질대사 개선용 기능성식품 및 건강증진식품의 개발이 요구하게 됨. 그에 따라 소비자의 기호에 부응하기 위해 쌀 표면에 영양성분을 가공처리하는 건강기능성 쌀제품이 개발되기 시작함.

○ 가공처리된 건강기능성 쌀제품들은 태생적 한계가 있어 소비자의 기호에 따라 품종자체를 다양화 하려는 노력으로 최근 농촌진흥청 내 국립식량과학원 및 산하 지역농업연구소들에서 다양한 기능성 벼 품종들을 개발하기 시작하였음.

○ 식생활이 다양화되면서 가공용 쌀에 대한 요구가 증대되고 건강기능성 쌀의 소비가 촉진됨에 따라 식이섬유가 일반쌀 보다 3~4배 많은 다이어트 쌀인 '고아미벼2호', 전통주 제조용 쌀인 '설갱벼', 항산화 작용으로 노화를 방지하는 안토시아닌 함량이 높은 '보석찰벼' 등 여러 가지 기능성을 함유하고 있는 다양한 특수미 품종들이 육성되고 있지만 점점 다양화되고 있음.

○ 그간 우리나라에는 수많은 벼 장려품종이 육성 보급되어 주로 벼 품종간 전분의 이화학적 특성 차이가 연구되었는데 메벼 종실의 배유 및 배 돌연변이체 중 dull 계통의 쌀은 아밀로스 함량이 아주 낮아 전분의 점성이 강하고 팽화성이 크므로 제과용이나 스낵 식품의 원료가 될 수 있고, 분상질변이 계통의 쌀은 수분흡수율이 높고 호화특성이 달라 증편제조시 부품성이 크고 알콜 발효 시 당도 저하가 빠르며 알콜 생산량도 많아 그 이용성이 크다는 것도 밝혀졌음. 이 밖에도 sugary 유전자를 가진 고당미 계통 쌀은 sucrose, glucose, fructose 함량이 많고, 거대배(giant embryo) 변이계통 쌀은 지방함량, 비타민 B₁, B₂ 및 α-tocopherol 생산량이 많아 건강식품의 재료로 유망하다는 것이 밝혀짐.

○ 튀김성이 좋고 튀김 정립율이 높은 '대립벼1호'는 유과 및 강정재료로 좋고, '향미벼1호'와 같이 구수한 향이 나는 품종의 쌀은 식혜제조에 유리하며, 현미 과피가 자색 또는 적색으로 착색되는 유색미(black rice)품종은 항산화활성(antioxidative activity)물질, 항변이원성(antimutagenetic activity) 물질을 함유하고 있는 것으로 밝혀지는 등 가공적성 다양화를 위한 많은 기초연구가 부분적으로 발표되고 있음.

○ 건강증진등 기능성 품종 개발 : ('10) 5품종 → ('11) 6품종(2011, 농촌진흥청)

○ 생활 습관병 예방용 기능성 쌀 '메디라이스'임상시험 추진(대학공동)(2011, 농촌진흥청)

- 밀양 263호(GABA 8) → 알콜중독, 익산 526호(레스베라트롤 함유) → 당뇨

○ 다이어트효과가 있는 저항전분 품종 '고아미2호'쌀 피자 상업화(2008년, 농촌진흥청)

- 임실치즈농협 기술이전, 현재 가명점 쌀 피자 판매량의 80%차지

- 피자 판매 : 18,000개/월 ⇒ 년 43억 2천만원 판매 기대

- 고아미2호 품종 특성

* 밀가루 피자도우 대비 난소화성 전분 함량 3배 이상, 효소분해율 76%

* 일품벼 대비 헤미셀룰로스 3배이상 함유 및 혈당상승 억제율 36%

○ 그러나 향후 기능성 쌀 시장은 급속하게 증가할 전망이다. 2005년 쌀이 완전 개방되어 저가의 고품질쌀이 대량으로 수입되면서 유일하게 대응할 수 있는 것이 기능성 쌀이며, 노령인구의 증가와 건강 지향적이고 식품안전에 민감한 소비자의 요구가 그러하기 때문이다.

2) 국외 제품생산 및 시장현황

○ 우리보다 고령화가 먼저 시작된 선진국가들의 경우 노화관련 시장이 오래전부터 형성, 시장조사 전문기관인 Freedonia Group에 의하면 미국시장은 2004년 이미 455억 달러 규모에 이르고 향후 연평균 9.5%씩 성장하여 2009년에는 720억 달러로 확대전망. 대사성질환관련 의약품과 보톡스와 같은 미용시술, 향노화 화장품, 비타민 등 건강기능성식품 등이 현재 노화방지 시장의 큰 축 차지. 최근에는 비만, 수면장애, 금연치료제 등과 같이 생활습관개선을 유도하는 제품도 주목받고 있다.

○ 일본에서 재배, 시판되고 있는 알레르기 방지용 쌀은 유전자 조작에 의한 품종 개량으로 지금까지 쌀밥 알레르기의 원인 물질인 글로블린계 단백질의 함량을 2~3%이하로 조절한 제품으로 아토피성 피부염에 민감한 소비자에게 안심하고 쌀밥을 즐길 수 있도록 개발한 제품임(2008, 농촌진흥청).

○ 일본에서는 표고버섯의 효소를 사용하여 미강을 분해하여 얻은 아라비노자일란은 1992년에 도쿄에 있는 Hiroaki Maeda, Director of Research and Development of Daiwa Pharmaceutical Co.에 의해 처음 개발이 되어 Biobran MGN-3으로 불리고 있으며, 현재 tablets이 제조되어 판매되고 있음. 또한 일본의 Health Food and Nutrition Food Association에 의해 허가되어져 있으며 Japanese Ministry of Health and Welfare의 고시 하에 엄격한 평가기준을 통과하였음.

○ 미국의 건강식품시장은 1994년 영양 보조식품 건강 교육법(DSHEA)제정 이후 94년 164억 달러, 96년 210억 달러, 98년 258억 달러, 2001년도 529억 달러로 매년 두 자릿수의 성장을 보였으며 현재의 성장추세로 보아 2005년도 미국의 기능성식품 시장은 800억 달러를 넘어설 것으로 예측되고 향후 10년간 매년 약 10%의 성장을 지속할 것으로 전망됨. 미국의 기능성 식품 시장은 크게 베이커리·시리얼, 바·캔디·스낵, 유제품·마가린, 기타의 네 부분으로 나뉨. 베이커리·시리얼은 미국 기능성 식품 시장에서 가장 구성비가 높은 부분으로 2001년 판매액이 전년보다 14% 늘어난 7억 2800만 달러였음.

○ 유럽은 기능성식품에 대한 특별한 법적 제도가 마련되지 않으나 '영양학적인 효과 이상으로 다른 신체 기능에 효과를 가진 식품'으로 인식하고 있으며 정제나 캡슐 형태의 Dietary supplements는 기능성 식품에 포함하지 않고 있음. 국가별 관심 요인에 대한 조사에선 영국의 경우는 에너지 충전, 튼튼한 뼈, 치아 건강, 유방암 위험률 감소, 콜레스테롤 저하 순이었다. 미국 NBJ 조사에 따르면 유럽 전체의 건강보조식품 시장 규모는 145억 달러이고 나라별로 보면 독일이 56억 달러, 프랑스 25억달러, 영국이 15억 달러, 이탈리아가 11억 달러, 북유럽 각국이 10억 달러, 스페인이 8억달러, 네덜란드가 5억 달러로 조사 됨.

○ 일본에서는 1980년대 후반에 기능성 식품이 등장해 1991년 특정보건용식품 제도를 제도화한 최초의 국가임. 2001년 4월에는 미국의 통상 압력 영향으로 미국의 Dietary supplement의 비타민, 미네랄, 허브류 등의 영양기능식품군으로 포함시키는 보건기능식품 제도를 시행하여 기능성식품과 Dietary supplement 시장과 제품의 국제 경쟁력을 더욱 높이고 있음. 일본에서 건강식품은 일반적으로 영양성분을 보급하거나 특별 용도에 적합한 것으로 판매되는 식품을 말하고 있으며 범위, 기준규격을 법률적으로 정하고 있지는 않고 일본건강·영양식품협회가 제정한 건강식품 제품의 기준·규격에 따라 자율적으로 50개 품목으로 설정·관리하고 있음.

표 1. 건강기능성 및 가공용 벼 품종 현황

특성		품종수	품종명	특성 및 가공적성
찰벼		12	신선찰, 진부찰, 화선찰, 상주찰, 동진찰, 보석찰, 해평찰, 눈보라, 한강찰1호 , 백설찰, 보석흑찰, 백옥찰	-찰성 -전통식품, 떡 가공
중간찰벼		3	백진주(아밀로스 9%) 백진주1호(11%), 만미(13%)	-중간정도의 찰성 -김밥, 현미밥(당뇨식)
유색	메벼	7	흑진주, 흑남, 적진주, 흑향, 흑광, 홍진주, 흑설	-흑색 및 적색 종피 -건강식 현미 혼반용, 천연색소 활용
	찰벼	4	조생흑찰, 신명흑찰, 신농흑찰, 신토흑미	-흑색 종피, 조생종
향미	메벼	4	향미벼1호 , 향미벼2호 , 향남, 미향	-구수한 향 -혼반용, 식혜, 떡 가공
	찰벼	2	설향찰, 아랑향찰	-구수한 향의 찰벼
기능성	고라이신	1	영안벼	-라이신 고함유(생장발육촉진) -영양식, 유아이유식
	난소화전분	2	고아미2호, 고아미3호	-난소화성, 고식이섬유 -다이어트 식품 가공
	하얀메벼	1	설갱	-참쌀 유사 외관 -홍국균 쌀 제조직성
	거대벼	1	큰눈	-쌀눈 크리 3배, GABA 고함유 -발아현미, 혼반용
기타	고당미	1	단미	-단맛이 나는 쌀 -쌀과자, 음료 등
	고아밀로스	1	고아미벼	-고 아밀로스 함량 -분식용, 볶음밥용
	대립	1	대립벼1호	-쌀 크기 1.5배 -튀김과자, 양조용
	심백미	1	양조벼	-심복백이 많은 쌀 -양조용

진한글저는 통일형 품종

자료출처:<http://blog.naver.com/kimmk6690/120072714541>

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 특수기능성 맞춤형 쌀품종육성 및 병저항성 검정

1. 슈퍼자미벼 품종육성

슈퍼자미벼는 벼 품종의 다양화로 기능성 특수용도의 쌀 품종 육성의 일환으로 벼 종피에 함유된 천연색소 중 안토시아닌의 함량을 높이기 위해 한국방송통신대학교 농학과에서 흑진주벼와 수원 425호 후대 계통에서 선발된 high C3G 계통과 종실이 크고 수량성이 좋은 대립벼 1호를 2003년 하계에 인공교배 하였다. F₁종자를 파종하여 F₂ 종자를 얻고 2004년 포장에 F₂를 전개하여 초형이 양호하고 C3G함량이 높은 개체를 선발하였다.

연도 구분	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
재료수집 및 계통육성									
조합작성									
계통 및 개체선발									
생산력검정 및 농가실증시험									

가. 품종육성과정 설명

● 2001년 ~ 2003년 : 재료수집 및 계통육성

천연색소의 함량이 높고, 수량성확보에 유리한 계통육성을 위해 한국방송통신대학교 농학과 육성계통 중 흑진주 벼와 수원425호의 교배후대에서 high C3G계통을 선발하여 C3G 함량을 평가하여 CG2-3-5-1-6-1 계통을 선발하고, 수량성이 우수한 대립벼 1호를 교배모본으로 선정하였다.

● 2003년 ~ 2007년 : 조합작성 및 계통선발

목적에 부합되는 계통을 선정하여 2003년 하계에 high C3G계통과 대립벼 1호를 양친으로 교배조합을 작성하고, 2004년 포장에서 선발된 F₂개체에서 F₃ 종자를 수확하고 2007년까지 매년 포장에서 계통재배하면서 초형이 양호하고, 현미 100g당 C3G함량이 높은 SR28721-7-9-3-1-2-1 계통을 선발하였다.

● 2008년 ~ 2009년 : 생산력 검정 및 농가실증시험

선발된 계통(SR28721-7-9-3-1-2-1)에 대해 KNOU 5호라고 가칭하고, 2008년~ 2009년에 난피법 3반복으로 생산력검정 및 농가실증시험을 수행한 결과 재배안전성을 확인하고 슈퍼자미벼라고 명명하였다.

- 나. 품종 특성표
- 식물의 종류 : 벼
 - 출원품종의 명칭 : 슈퍼자미
 - 출원인의 성명 : 류수노, 한상준, 권순욱
 - 특성 조사자 성명 : 권순욱
 - 특성 조사 년도 : 2009
 - 특성 조사 장소 : 충청남도 연기군 소정리
 - 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 흑진주 벼

표 2. 슈퍼자미벼 특성조사표

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
1	초엽 : 안토시아닌 색소	없거나 매우약하다	열다	진하다							1		1	
2	제1엽 : 엽초색	녹색	자주색	엷은자색	자색						1		1	
3	잎 : 녹색정도 (잎색농도)			연하다		중간		진하다			6		5	
4	잎 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
5	잎 : 안토시아닌 색소분포	끝	가장자리	일률	균등									
6	잎집 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
7	잎집 : 안토시아닌 색소농도	매우연하다		연하다		중간		강하다						
8	잎몸 : 모용성	없거나 매우약하다		약하다		중간		강하다			5		5	
9	잎 : 잎귀의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
10	잎 : 잎깃의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
11	잎 : 잎혀의 모양	끝이 평범하다	뾰족하다	끝이 갈라지다							3		3	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
12	잎 : 잎혀의 색	무색	녹색	자주색 줄무늬	열은 자주색	자주색								
13	잎몸 : 길이			짧다		중간		길다			5		6	
14	잎몸 : 너비			좁다		중간		넓다			5	1.28cm	4	1.12cm
15	지엽 : 자세(출수기)	직립		반직립		수평		뒤로 휨			1		1	
16	지엽 : 자세(황숙기)	직립		반직립		수평		뒤로 휨			3		3	
17	줄기 : 모양	직립		반직립		보통 개형		완전 개형		포복	3		3	
18	줄기 : 굴성	없다								있다				
19	출수기 (50% 출수)	매우 빠르다		빠르다		중간		늦다			7	8/25	1	7/25
20	응성불임	없다	부분 응성불임	응성불임							1		1	
21	외형 : 하단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다			1		1	
22	외형 : 중간부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다			1		1	
23	외형 : 상단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우 진하다	1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
24	주두색	백색	열은 녹색	황색	열은 자색	자색					1		1	
25	줄기 : 굵기			가늘다		중간		굵다			7	3.1cm	5	2.2cm
26	줄기 : 길이 (이삭제외)	단간		준단간		중간		준장간		장간	3	73.0cm	3	75.0cm
27	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 유무	없다								있다	1		1	
28	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 농도			연하다		중간		진하다			1		1	
29	줄기 : 절간의 안토시아닌 색소 유무	없다								있다	1		1	
30	이삭 : 주경의 이삭 길이			짧다		중간		길다			5	20.4cm	5	21.0cm
31	이삭 : 주당 이삭수			적다		중간		많다			5	10.4개	5	9.0개
32	이삭 : 까락	없다								있다	1		1	
33	이삭 : 까락의 색 (출수기)	황백색	황갈색	갈색	적갈색	담적색	적색	담자색	자색	흑색	1		1	
34	이삭 : 까락의 분포	선단		이삭의 상부		전체					1		1	
35	이삭 : 최장 까락의 길이	매우 짧다		짧다		중간		길다		매우 길다	3		1	
36	외영의 모용성	없거나 매우약하다		약하다		중간		강하다		매우 강하다	3		5	
37	부선색 (외영 끝의 색 호숙기-황숙기)	백색	연노랑 색	갈색	적색	자색	흑색							
38	이삭 : 까락의 색 (황숙기)	황백색	황갈색	갈색	적갈색	담적색	적색	담자색	자색	흑색				
39	이삭 : 주경 만곡성	직립		반직립		굽음		심하게 굽음			5		5	
40	이삭 : 2차지경 유무	없다								있다	1			

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
41	이삭 : 2차지경 모양	1형	2형	3형										
42	이삭 : 지경의 자세	직립		반직립		개형					3		3	
43	이삭 : 추출정도	추출분량		부분추출		중간		추출양호		추출매우양호	5		7	
44	성숙기	매우빠르다		빠르다		중간		늦다		매우늦다	7		3	
45	잎 : 노화			빠르다		중간		늦다			5		5	
46	외영 : 색	황백색	황갈색	갈색	적갈색~담자색	자색	흑색				1		1	
47	외영 : 무늬	없다	황갈색골	갈색골	자색점	자색골					1		1	
48	외영 : 하단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다			1		1	
49	외영 : 중간부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	1		1	
50	외영 : 상단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	1		1	
51	반침 껍질(호영) : 길이			짧다		중간		길다						
52	반침 껍질(호영) : 색	갈색	황갈색	적색	자색						1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
53	정조 : 천립중			가볍다		중간		무겁다			6	31.9g	3	22.54g
54	벼알 : 길이			짧다		중간		길다			7	8.44mm	5	7.63mm
55	벼알 : 폭			좁다		중간		넓다			7	3.90mm	3	3.11mm
56	벼알 : 외영의 페놀반응	없다								있다				
57	외영 페놀반응 정도			연하다		중간		진하다						
58	현미 : 길이			짧다		중간		길다			6	5.90mm	5	5.77mm
59	현미 : 폭			좁다		중간		넓다			7	3.15	3	2.46mm
60	현미 : 모양 (측면 관찰)	원형	다원형	중원형	장원형	세장형					2		3	
61	현미 : 색	백색	담갈색	얼룩진갈색	질은갈색	담적색	적색	얼룩진자색	자색	암자색 / 흑색	9		9	
62	배유 : 찰메성	찰	중간	메							3		3	
63	배유 : 아밀로스함량	< 5%	5 ~ 10%	11 ~ 15%	16 ~ 20%	21 ~ 25%	25 ~ 30%	> 30%						
64	알카리 붕괴도	붕괴안됨		조금붕괴됨		중간		완전히붕괴됨						
65	현미 : 향취성	없거나 매우약하다	약하다	강하다							1		1	

다. 품종 특성기술서

(1) 종(種) 및 학명 : 벼(*Oryza sativa* L.)

(2) 품종명 : 슈퍼자미(Superjami)

(3) 식물체의 주요 형태적 특성

- 슈퍼자미벼는 출수기가 흑진주 보다 30일 정도 늦은 만생종임
- 종피가 흑자색인 유색미 메벼임
- 잎 색깔은 흑진주에 비해 짙은 녹색임
- 잎의 길이가 중간 정도이고, 너비는 흑진주 벼와 비슷하였음
- 줄기는 중단간으로 굵고 반직립이며, 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호함
- 간장과 수장은 중간 크기임
- 이삭추출도가 양호하며, 2차지경은 없음
- 식물체에는 안토시아닌이 착색되지 않고 종피에 안토시아닌이 착색됨
- 현미의 길이는 약간 길고, 폭은 넓은 편임
- 전체적으로 종자의 모양은 단원형이며, 현미천립중이 무거운 편임

(4) 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성

- 슈퍼자미벼는 출수기가 흑진주 보다 30일 늦은 만생종임
- 간장은 73.0cm로 흑진주와 비슷하고, 수장은 20.4cm로 흑진주와 비슷함
- 포기당 이삭수는 10.4개로 흑진주벼 보다 1.4개 많았음
- 이삭당 벼알수는 123개로 흑진주 벼보다 41개 많았음
- 줄기가 굵고 반직립으로 분얼개도가 양호하며 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호함
- 현미길이가 5.9mm로 흑진주 벼에 비해 약간 길고, 폭은 3.15mm로 넓은 편이며, 두께가 2.03mm로 단원형이었고, 현미 천립중은 26.4g으로 무거운 편임
- 슈퍼자미벼는 입실율이 89.6% 정도이고, 정현비율이 82.8%로 흑진주 벼 보다 다소 높았으며, 10a당 현미수량은 630kg 정도로 대단히 높았음
- 특히 슈퍼자미벼는 종피에서 흑자색을 띠는 천연색소 안토시아닌의 주성분인 Cyanidin 3-glucoside(C3G)의 함량의 흑진주 벼보다 10배 정도로 높게 나타났음

(5) 출원품종의 균일성과 안정성

슈퍼자미벼는 2003년 흑진주 벼와 수원425호 교배 후대계통 중 C3G함량이 높은 계통과 대립벼 1호를 인공교배 하여 F₂ 세대에서 초형이 우수하고, C3G함량이 높은 개체를 선발하고, 2004년 세대진전 후 2007년까지 매년 계통재배하면서 포장선발을 실시하여 유전적으로 완전히 고정되어 왔으며 2008년부터 2009년까지 재배시험을 실시한 결과 기본적인 농업형질인 출수기, 간장, 수장, 수수, 현미천립중 등의 변이계수가 대조품종은 흑진주 벼와 차이가 거의 없어 품종의 균일성과 재배 안정성을 확인하였다. 2009년 포장에 1주 3본, 3반복으로 이양하여 균일성을 조사한 결과 전체적으로 균일하고 이형주가 발견되지 않았다.

구분	년도	출수기	간장(cm)	수장(cm)	포기당 이삭수(No.)	이삭수 벼알수(No.)	현미 천립중(g)
흑진주	2008	7.26	73.0	21.8	10.2	88.4	17.2
	2009	7.25	75.0	21.0	9.0	82.0	17.0
	평균		74.0	21.4	9.6	85.2	17.1
	변이계수		1.9	2.6	8.8	5.3	0.8
슈퍼자미	2008	8.29	76.8	19.3	10.8	114.0	25.9
	2009	8.25	73.0	20.4	10.4	123.0	26.4
	평균		74.9	19.9	10.6	118.5	26.2
	변이계수		3.6	3.9	2.7	5.4	1.4

(6) 품종구별에 도움이 되는 추가정보

(가) 병과 충에 대한 저항성

(나) 미질특성

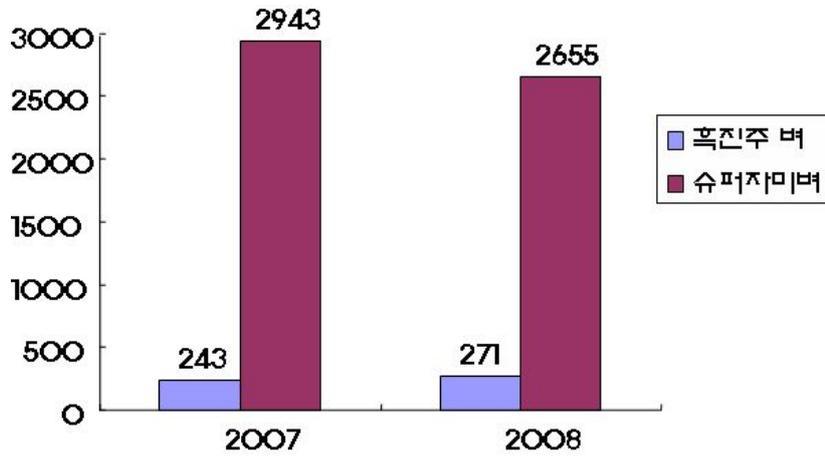
종피가 흑자색이며, 쌀알의 크기가 대립으로 현미천립중이 26.4g으로 흑진주 벼 17.0g보다 1.56배 정도 높다.

구분	정조				현미				정현비율 (%)
	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	
흑진주	7.63	3.11	2.02	2.45	5.77	2.46	1.79	2.35	81.0
슈퍼자미	8.44	3.90	2.16	2.16	5.90	3.15	2.03	1.87	82.8

(다) 생리장애저항성

(라) 기타정보

안토시아닌의 주색소인 C3G함량이 흑진주 벼 보다 10배 정도 높은 수준으로 현미 100g 당 C3G함량이 2007년 2,943mg, 2008년 2,655mg 정도이다.



(1) 포장 사진



촬영일시 : 2009년 9월 30일

(2) 정조 사진



<흑진주 벼>

<슈퍼자미벼>

그림 3. 흑진주와 슈퍼자미벼의 포장 및 정조 사진



그림 4. 흑진주와 슈퍼자미의 현미 사진

Anthocyanin은 식물의 꽃, 자실, 잎, 줄기, 뿌리에 존재하는 적, 자, 청색의 색소이며 넓은 의미의 flavonoid계 색소로 유색미 자색 색소인 anthocyanine계 색소는 Cyanidin-3-glucoside(C3G), Cyanidin-3-rhamnoside, Cyanidin-3,5-diglucoside, maldine-3-galactoside로 구성되어 있으며, 이 중 C3G가 주된 색소인 것으로 알려져 있다.

Choi *et al.*(1994)의 연구에 의하면 anthocyanine계 색소를 가진 유색미가 비 anthocyanine계 색소를 가진 유색미보다 강한 항산화 활성을 가지며, 천연 항산화제인 α -tocopherol과 유사한 활성을 가지고, 적색계보다 자색계 유색미가 항산화능이 더 뛰어나다고 보고하고 있다.

또한, anthocyanine계 색소인 Cyanidin-3-glucoside는 항돌연변이(Yoshimoto *et al.*, 2001), 항암기능(Wang & Mazza, 2002), 콜레스테롤 저하기능(Auger *et al.*, 2001) 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 그 예로 Ling *et al.*(2001)의 연구에서 red rice와 black rice를 섭취한 토끼의 혈장 HDL-cholesterol 농도와 HDL/LDL-cholesterol을 증가시키는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 실험에서는 생리활성이 우수할 것으로 예상되는 품종개량된 cyanidine-3-glucoside 고함유 "슈퍼자미" 유색미를 이용하여 기름함량과 지방산조성, 단백질 함량과 아미노산을 규명하고, 이를 이용한 기능성 소재 및 기능성 식품개발을 위한 기초연구로 수행한 결과는 다음과 같다.

유색 현미의 기름함량은 품종간 변이가 2.15~2.83%로 평균함량이 2.44%였는데, C3G 색소가 높은 슈퍼자미벼는 낮았다(표 5).

현미의 지방산조성을 (표 5)에서 살펴보면 올레산(C18:1)이 34.8%~39.8%, 리놀레산(C18:2)이 36.3%~39.4% 및 팔미틴산(C16:0)이 19.3%~22.0%으로 전체 지방산의 약 95~96%를 차지하

였으며 특히 불포화지방산 중에서 올레산과 리놀렌산 함량은 C3G 색소가 높은 슈퍼자미 품종에서 높았고, 포화지방산은 감소하였다. 다른 많은 연구자들의 보고에서도 현미나 미강 중에 함유된 주 지방산은 올레산, 리놀렌산 및 팔미틴산이고 이들이 전체 지방산 함량의 90% 전후가 됨을 지적하고 있다(Choi, 1991).

표 3. 유색미품종의 Amino acid 조성차이 (MOL %)

Amino acid	Varieties			
	Suwon 425	Heuginjubyeo	C3GHiby eo	Superjamiby eo
Asparatic acid	10.18	10.20	10.82	10.10
Threonine	3.93	3.89	3.95	3.91
Serine	5.41	5.39	5.44	5.49
Glutamic acid	19.41	19.12	19.14	19.45
Proline	4.78	4.75	4.82	4.70
Glycine	5.32	5.35	5.22	5.21
Alanine	6.34	6.41	6.22	6.25
Cystein	0.74	0.73	0.52	0.50
Valine	6.30	6.25	6.37	6.44
Methionine	2.03	2.08	1.98	1.86
Isoleucine	4.00	3.95	4.08	4.11
Leucine	9.31	9.12	9.48	9.67
Tyrosine	1.61	1.69	1.53	1.50
Phenylalanine	5.64	5.56	5.64	5.78
Lysine	4.28	4.42	4.51	4.37
Histidine	2.78	2.84	2.72	2.73
Arginine	7.96	8.25	7.56	7.61
Total	100	100	100	100
Essential amino acid	35.48	35.27	36.02	36.15

표 4. 다양한 유색미에서 단백질과 지질의 함량.

Variety	Content (%)	
	Oil	Protein
Suwon 425	2.83	8.78
Heuginjuby eo	2.45	8.53
C3GHiby eo	2.36	9.21
Superjamiby eo	2.15	9.89
Mean	2.44	9.10

표 5. 다양한 유색미에서 지방산 함량 조성.

Varieties	Saturated fatty acid (SFA)		Unsaturated fatty acid (USFA)			SFA	USFA
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3		
Heugjinju byeo	21.9	2.8	34.8	39.4	0.7	24.7	74.9
Suwon 425	21.5	2.5	36.4	38.5	0.8	24.0	75.7
C3GHiby eo	22.0	1.9	36.9	36.8	1.9	23.9	75.6
Superjamiby eo	19.3	2.7	39.8	36.3	1.6	22.0	77.7
Mean	21.18	2.48	36.98	37.75	1.25	23.65	75.98

유색미 품종 수원425호와 흑진주벼의 단백질 함량은 각각 8.78%, 8.53%로 나타났고 슈퍼자미는 9.1%로 다소 높게 나타났다(표 4). 이들 품종의 아미노산 조성을 보면 필수 아미노산 함량이 35.27- 36.15%로 지금까지 알려진 일반쌀의 필수아미노산 함량 32% 수준보다 다소 높았다(Choi, 1990). 쌀에서 가장 제한적이며 중요한 아미노산인 lysine 함량은 C3GH이벼가 다소 높았다. 아미노산 중에서 serine, glutamic acid, isoleucine, leucine 등은 슈퍼자미벼가 다소 높았다.

쌀 단백질 중에서 가장 풍부한 함량을 나타내는 아미노산은 glutamic acid로 19.12~19.45%였으며, 다음으로는 aspartic acid, leucine등이 각각 10.1~10.8, 9.1~9.7% 정도였다. 필수 아미노산 중에서 함량이 가장 많은 것은 leucine이었고 가장 적었던 것은 methionine이었으며 threonine과 더불어 serine과 lysine도 함량이 적은 아미노산이었다.

이러한 아미노산 함량은 Cagampang 등이 다른 벼 품종의 아미노산 조성에 대해 보고한 바와 거의 비슷하다.

Lysine은 가장 중요한 필수 아미노산으로서 주로 겨층이나 배아에 많이 함유되어 있고 단백질의 질은 주로 이 lysine 함량과 유황함유 아미노산, threonine 및 tryptophan 등에 좌우되며 이는 흰쥐 사육에 의한 생물학적 검정에서 단백질 효율 등으로 증명되었다(Bressani R. et al, 1971, Mitra G.N, et al, 1971).

슈퍼자미쌀은 안토시아닌의 주색소인 C3G 함량이 흑진주벼 보다 10배 이상 높은 수준으로 현미 100g당 C3G색소함량이 2008년에는 2,840mg, 2009년에는 2,655mg을 보여주었다(그림 5).

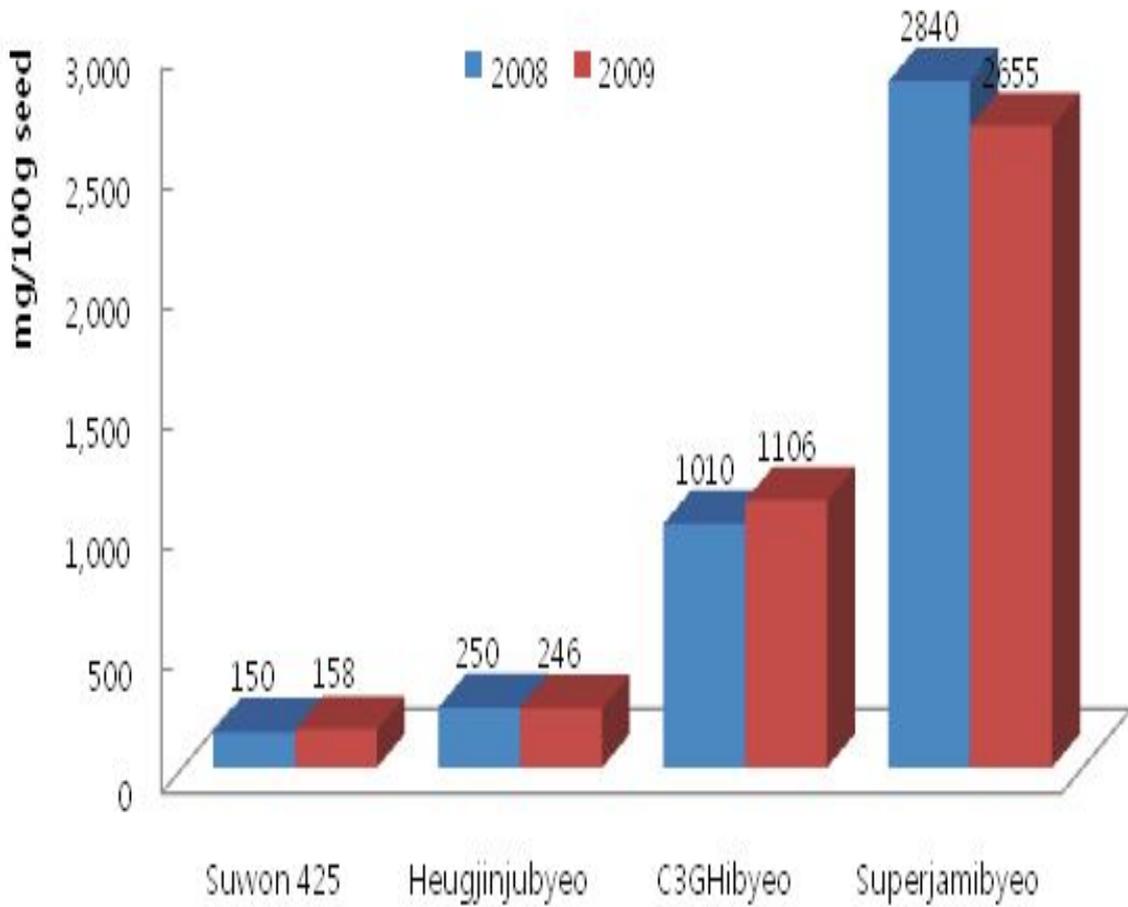
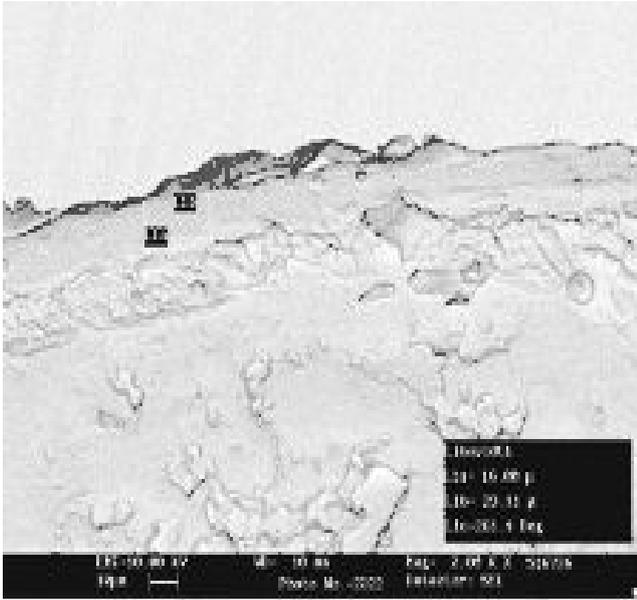
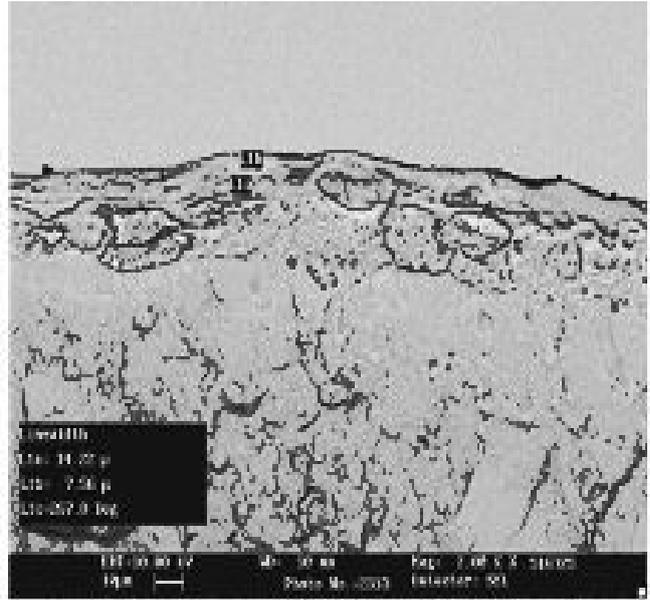


그림 5. 유색미 품종의 C3G의 함량

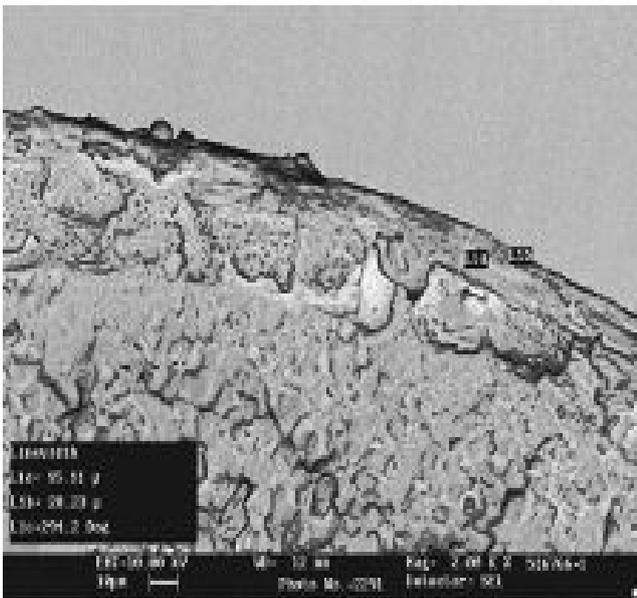
그림 6은 유색미 품종의 배의 위치를 좌측에 위치한 상태에서 상부 횡단면을 전자 현미경으로 촬영한 사진이고, 그림 7는 하복부를, 그림 8는 좌측의 배 있는 부분의 횡단면을, 그림 9은 우측(배의 반대쪽)을 전자현미경으로 촬영한 단면을 제시하고 있다.



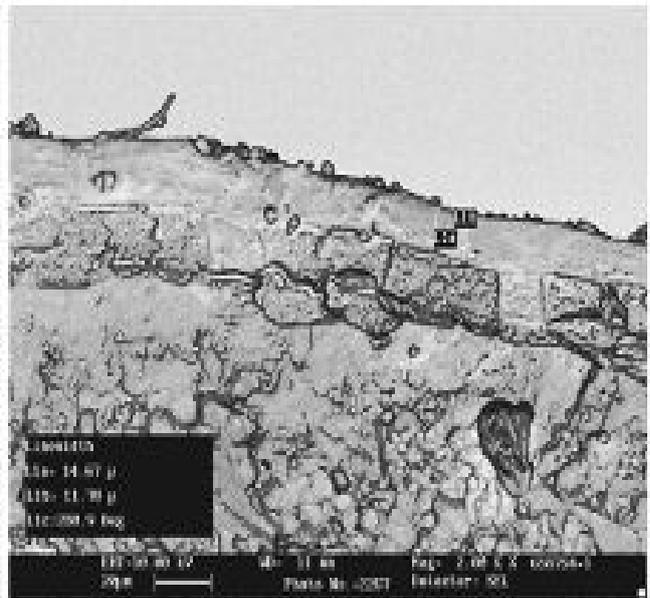
Suwon 425



Heugjinju

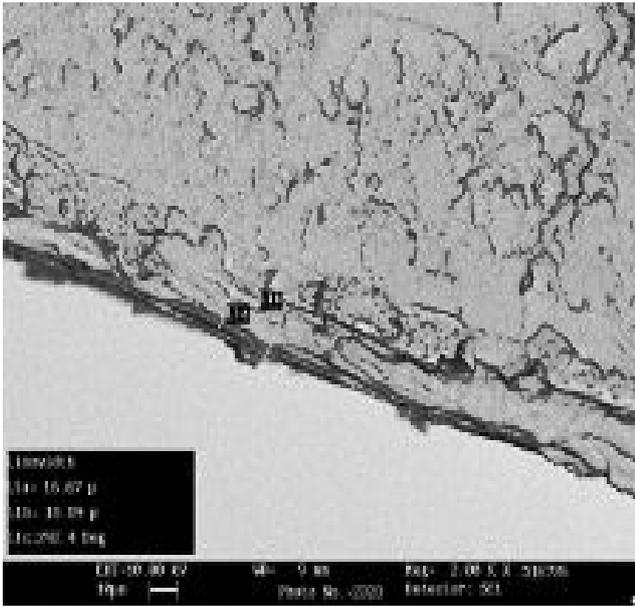


C3GH

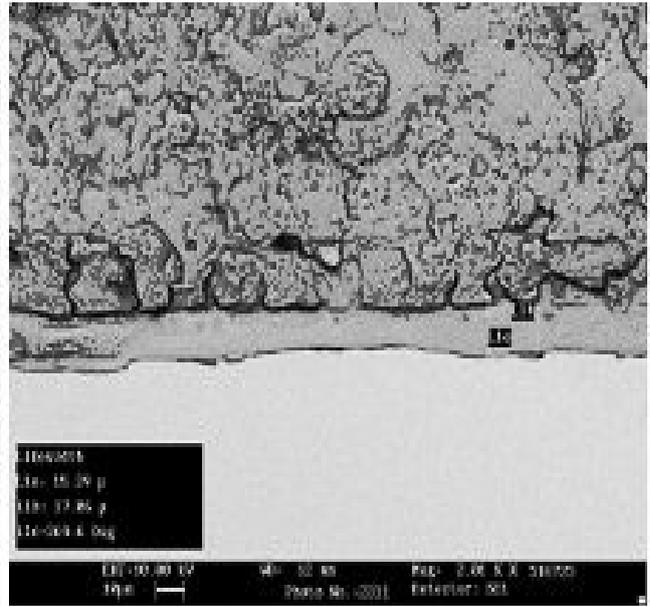


Superjami

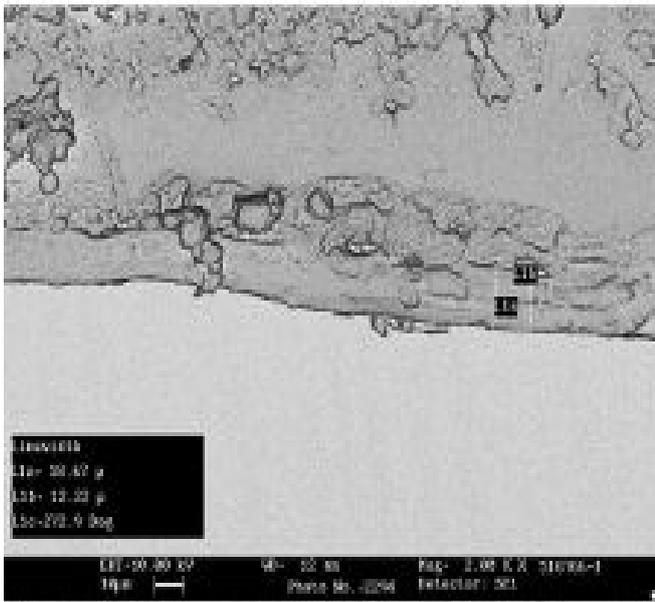
그림 6. 종자 위편의 두께 변화(왼편 : 배)



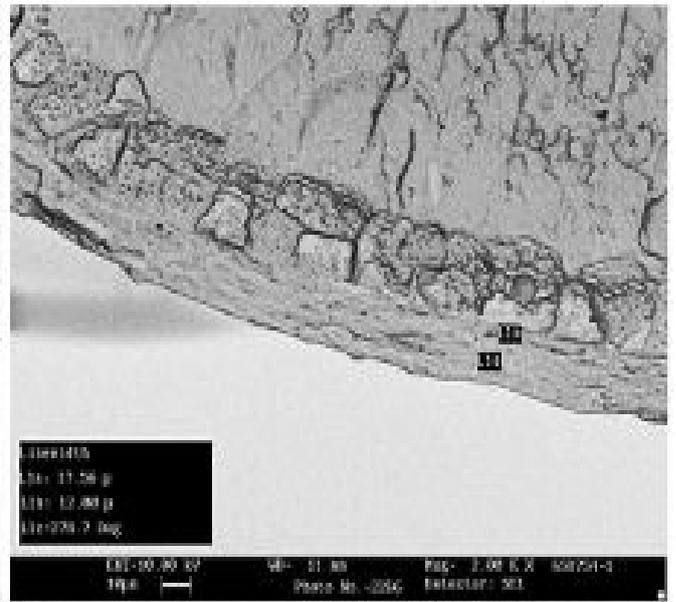
Suwon 425



Heugjinju

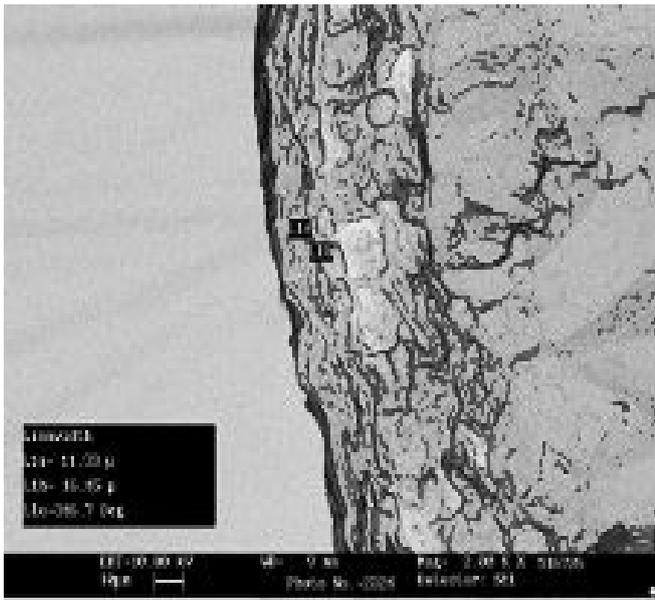


C3GHi

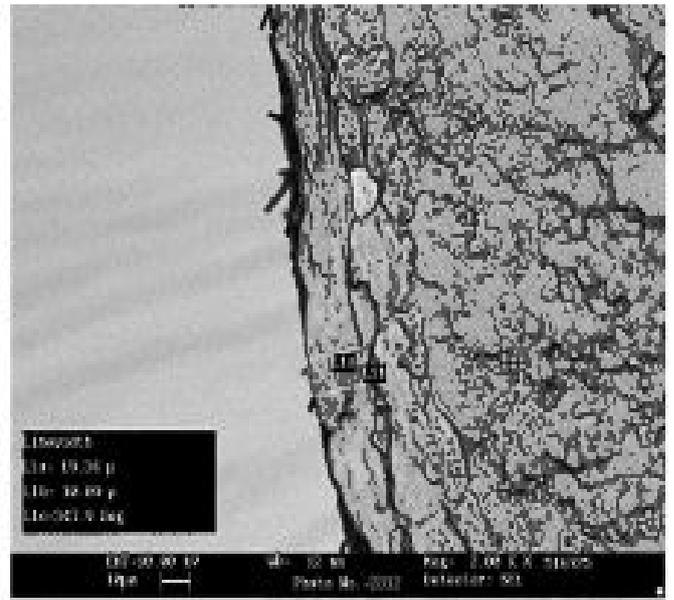


Superjami

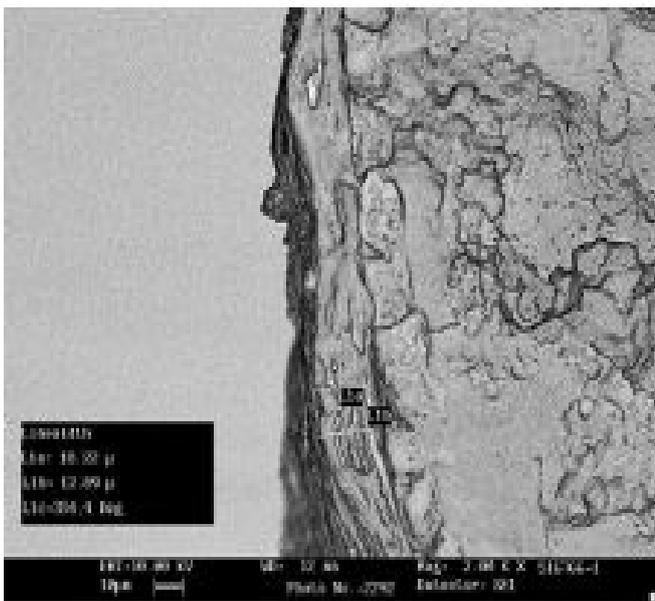
그림 7. 다양한 유색미에서 seed hypogastrium 두께의 변화(왼편 : 배)



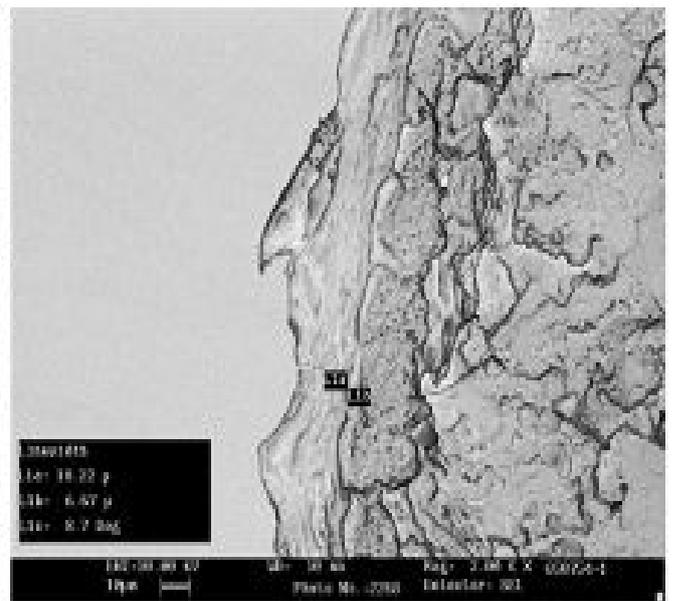
Suwon 425



Heugjinju

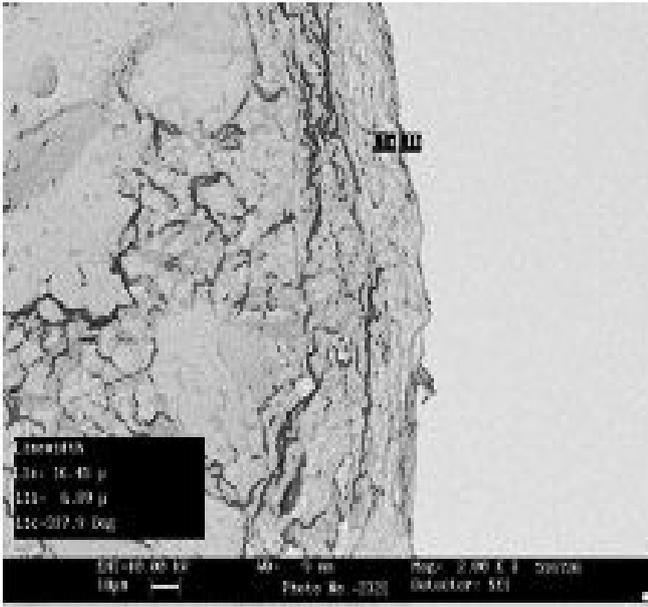


C3GH1

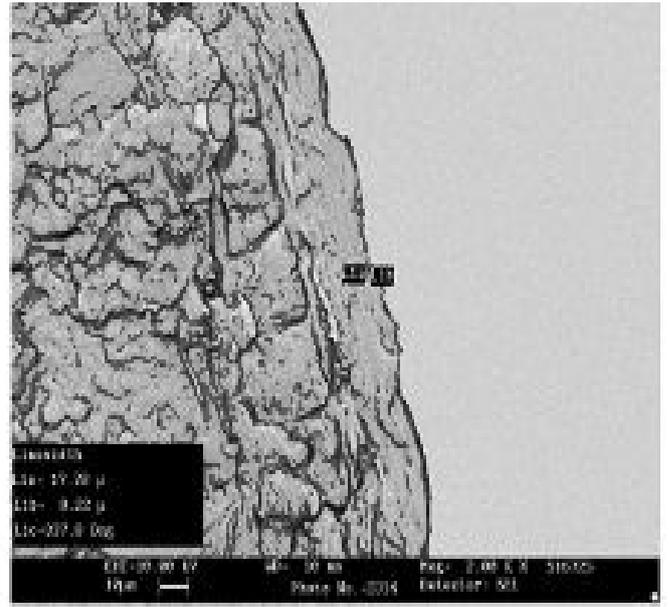


Superjami

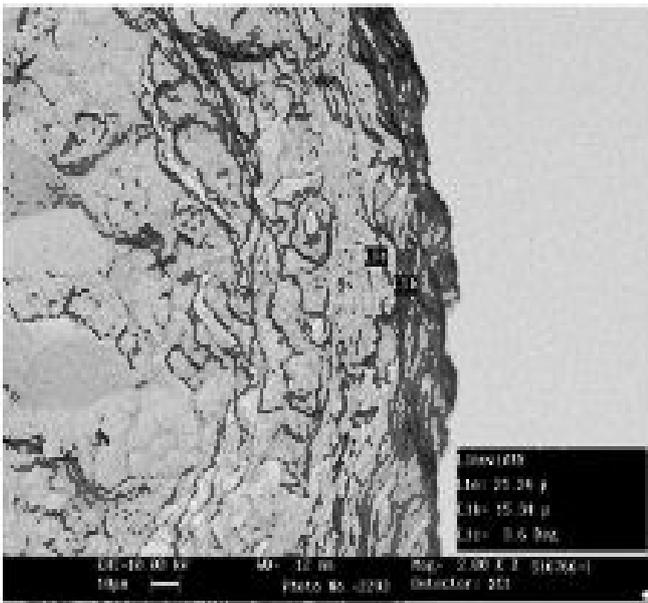
Fig 8. 종피 원편(배 위치)의 두께 변화



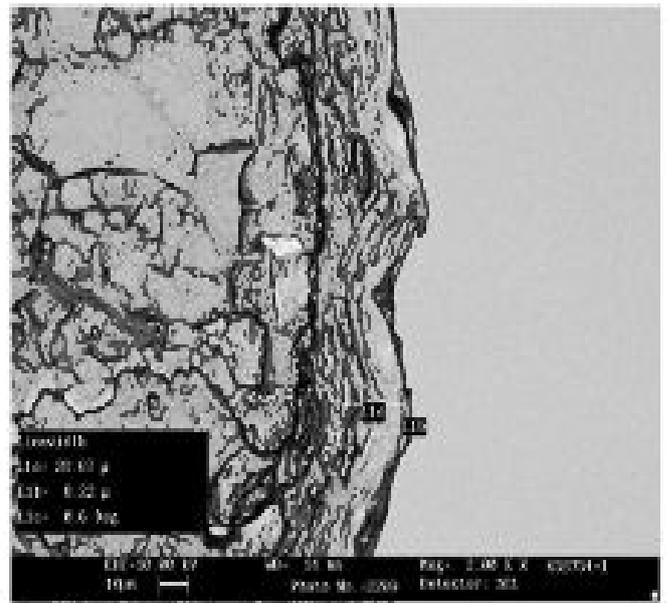
Suwon 425



Heugjinju



C3GHi



Superjami

Fig. 7. 종피 오른쪽의 두께 변화.

표 6는 그림 6, 7, 8, 9을 종합적으로 정리한 도표이다. 수원 425호와 흑진주벼의 배의 반대쪽 두께는 각각 16.45, 17.78 μm 였으며 슈퍼자미벼는 28.67 μm 로 나타났다. 따라서 C3G 함량이 높은 품종일수록 배의 반대쪽 종피와 호분층 두께가 두꺼워지는 것으로 평가 되었다.

표 6. 다양한 유색미에서 종피와 호분층의 두께 차이.

Variety	C3G content (mg/100g seed)	thickness of seed coat and aleurone layer (μm)			
		upper	hypogastrium	left(embryo)	right
Suwon 425	150	16.00	16.67	11.33	16.45
Heuginjubyeo	250	14.22	15.29	19.34	17.78
C3GHiby eo	800	15.11	18.67	18.22	21.34
Superjamiby eo	1,000	14.67	17.56	18.22	28.67



그림 10. DAF에 따른 종피색의 변화

그림 10은 흑자색미 종피의 색소집적과정을 살펴본 것이다. 수정 후 10일부터 급격히 증가하여 수정 후 15일경에는 종피의 대부분이 검게 되었다. 유색미 C3G색소함량을 수정 후 일정간격으로 분석한 결과 15-20일경에 최대함량에 도달하였다(그림 11). 그 이후는 상대적으로 전분의 축적량이 많아지므로 색소함량은 오히려 작게 평가되었다.

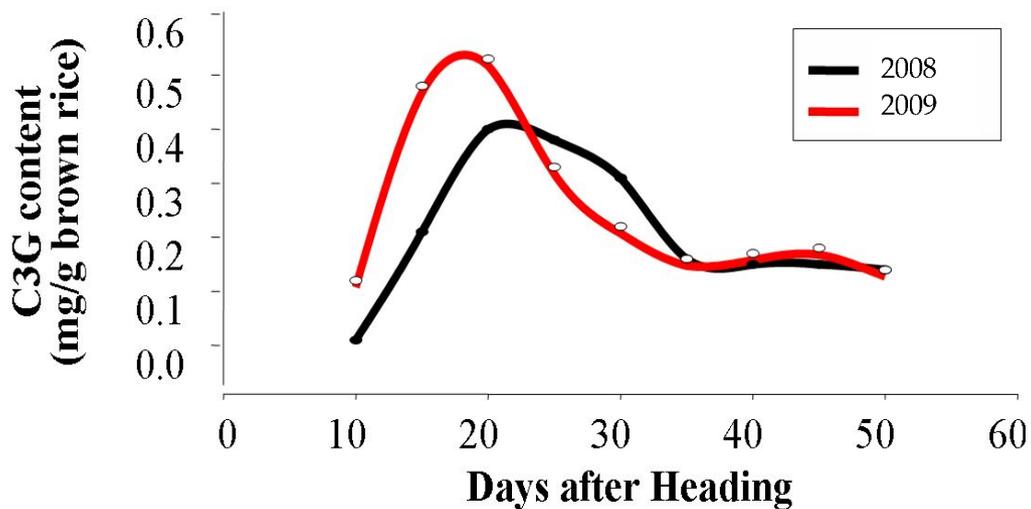


그림 11. DAF 에 따른 C3G 함량의 변화

2. 큰눈자미벼의 품종육성

큰눈자미벼는 벼 품종의 다양화로 기능성 특수용도의 쌀 품종 육성의 일환으로 벼 종피에 함유된 천연색소 중 안토시아닌의 함량을 높이고, 쌀눈(배)의 성분을 활용하기 위해 한국방송통신대학교 농학과에서 흑진주벼와 수원 425호 후대 계통에서 선발된 high C3G계통과 쌀눈의 크기가 큰 EM76을 2003년 하계에 인공교배 하였다. F₁종자를 파종하여 F₂ 종자를 얻고 2004년 포장에 F₂를 전개하여 쌀눈이 크고, 초형이 양호하며, C3G함량이 높은 개체를 선발하였다.

연도 구분	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
재료수집 및 계통육성									
조합작성									
계통 및 개체선발									
생산력검정 및 농가실증시험									

가. 품종육성과정 설명

● 2001년 ~ 2003년 : 재료수집 및 계통육성

천연색소의 함량이 높고, 쌀눈(배)가 큰 계통육성을 위해 한국방송통신대학교 농학과 육성 계통 중 흑진주 벼와 수원425호의 교배후대에서 high C3G계통을 선발하여 C3G 함량을 평가하여 CG2-2-45-4-1-22-3 계통을 선발하고, 배가 큰 EM76 계통을 교배모본으로 선정하였다.

● 2003년 ~ 2007년 : 조합작성 및 계통선발

목적에 부합되는 계통을 선정하여 2003년 하계에 high C3G계통과 EM76을 양친으로 교배조합을 작성하고, 2004년 포장에서 선발된 F₂개체에서 F₃ 종자를 수확하고 2007년까지 매년 포장에서 계통재배하면서 초형이 양호하고, 쌀눈이 크며, 현미 100g당 C3G함량이 높은 SR28706-9-5-3-2-3-4 계통을 선발하였음

● 2008년 ~ 2009년 : 생산력 검정 및 농가실증시험

선발된 계통(SR28706-9-5-3-2-3-4)에 대해 KNOU 8호라고 가칭하고, 2008년~2009년에 난피법 3반복으로 생산력 검정 및 농가실증시험을 수행한 결과 재배안정성을 확인하고 큰눈자미벼라고 명명하였다.

나. 품종 특성표

- 식물의 종류 : 벼
- 출원품종의 명칭 : 큰눈자미
- 출원인의 성명 : 류수노, 한상준, 권순욱, 김홍열
- 특성 조사자 성명 : 권순욱
- 특성 조사 년도 : 2009
- 특성 조사 장소 : 충청남도 연기군 소정리
- 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 흑진주 벼

표 7. 큰눈자미벼 특성 조사표

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
1	초엽 : 안토시아닌 색소	없거나 매우 약하다	열다	진하다							1		1	
2	제1엽 : 엽초색	녹색	자주색	열은자색	자색						1		1	
3	잎 : 녹색정도 (잎색농도)			연하다		중간		진하다			5		5	
4	잎 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
5	잎 : 안토시아닌 색소분포	끝	가장자리	일률	균등									
6	잎집 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
7	잎집 : 안토시아닌 색소농도	매우 연하다		연하다		중간		강하다						
8	잎몸 : 모용성	없거나 매우 약하다		약하다		중간		강하다			5		5	
9	잎 : 잎귀의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
10	잎 : 잎깃의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
11	잎 : 잎혀의 모양	끝이 평범하다	뾰족하다	끝이 갈라지다							3		3	

No	형 질	표 현 형 태								출 원 품 종		대 조 품 종		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
12	앞 : 앞혀의 색	무색	녹색	자주색 줄무늬	얼은 자주색	자주색					1		1	
13	앞몸 : 길이			짧다	중간	길다					5		6	
14	앞몸 : 너비			좁다	중간	넓다					4	1.15cm	4	1.12cm
15	지엽 : 자세(출수기)	직립		반직립	수평	뒤로 휩					1		1	
16	지엽 : 자세(황숙기)	직립		반직립	수평	뒤로 휩					3		3	
17	줄기 : 모양	직립		반직립	보통 개형	완전 개형			포복		3		3	
18	줄기 : 굴성	없다							있다					
19	출수기 (50% 출수)	매우 빠르다		빠르다	중간	느다					5	8/9	3	7/25
20	응성불임	없다	부분 응성불임	응성불임							1		1	
21	외형 : 하단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다					1		1	
22	외형 : 중간부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다					1		1	
23	외형 : 상단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다			매우 진하다		1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
24	주두색	백색	엷은 녹색	황색	엷은 자색	자색					1		1	
25	줄기 : 굵기			가 늘 다		중 간		굵 다			6	2.9cm	5	2.2cm
26	줄기 : 길이 (이삭제외)	단 간		준 단 간		중 간		준 장 간		장 간	5	87.0cm	3	75.0cm
27	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 유무	없 다								있 다	1		1	
28	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 농도			연 하 다		중 간		진 하 다			1		1	
29	줄기 : 절간의 안토시아닌 색소 유무	없 다								있 다	1		1	
30	이삭 : 주경의 이삭 길이			짧 다		중 간		길 다			5	21.0cm	5	21.0cm
31	이삭 : 주당 이삭수			적 다		중 간		많 다			5	10.1개	5	9.0개
32	이삭 : 까락	없 다								있 다	1		1	
33	이삭 : 까락의 색 (출수기)	황 백 색	황 갈 색	갈 색	적 갈 색	담 적 색	적 색	담 자 색	자 색	흑 색	1		1	
34	이삭 : 까락의 분포	선 단		이 삭 의 상 부		진 체					1		1	
35	이삭 : 최장 까락의 길이	매 우 짧 다		짧 다		중 간		길 다		매 우 길 다	1		1	
36	외영의 모용성	없 거 나 매 우 약 하 다		약 하 다		중 간		강 하 다		매 우 강 하 다	5		5	
37	부선색 (외영 끝의 색 호숙기-황숙기)	백 색	연 노 랑 색	갈 색	적 색	자 색	흑 색							
38	이삭 : 까락의 색 (황숙기)	황 백 색	황 갈 색	갈 색	적 갈 색	담 적 색	적 색	담 자 색	자 색	흑 색				
39	이삭 : 주경 만곡성	직 립		반 직 립		굽 음		심 하 게 굽 음			5		5	
40	이삭 : 2차지경 유무	없 다								있 다				

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
41	이삭 : 2차지경 모양	1형	2형	3형										
42	이삭 : 지경의 자세	직립		반직립		개형					3		3	
43	이삭 : 추출정도	추출분량		부분추출		중간		추출양호		추출매우양호	7		7	
44	성숙기	매우빠르다		빠르다		중간		늦다		매우늦다	5		3	
45	잎 : 노화			빠르다		중간		늦다			5		5	
46	외영 : 색	황백색	황갈색	갈색	적갈색~ 담자색	자색	흑색				2		1	
47	외영 : 무늬	없다	황갈색골	갈색골	자색점	자색골					1		1	
48	외영 : 하단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다			1		1	
49	외영 : 중간부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	1		1	
50	외영 : 상단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	1		1	
51	반침 껍질(호영) : 길이			짧다		중간		길다						
52	반침 껍질(호영) : 색	갈색	황갈색	적색	자색						1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
53	정조 : 천립중			가 볍다		중 간		무 겁다			3	24.10g	3	22.54g
54	벼알 : 길이			짧 다		중 간		길 다			6	8.20mm	5	7.63mm
55	벼알 : 폭			좁 다		중 간		넓 다			4	3.34mm	3	3.11mm
56	벼알 : 외영의 페놀반응	없 다								있 다				
57	외영 페놀반응 정도			연 하다		중 간		진 하다						
58	현미 : 길이			짧 다		중 간		길 다			5	5.67mm	5	5.77mm
59	현미 : 폭			좁 다		중 간		넓 다			3	2.65mm	3	2.46mm
60	현미 : 모양 (측면 관찰)	원 형	단 원형	중 원형	장 원형	세 장형					3		3	
61	현미 : 색	백 색	담 갈색	얼 룩진갈색	질 은갈색	담 적색	적 색	얼 룩진자색	자 색	암 자색 / 흑색	9		9	
62	배유 : 찰메성	찰	중 간	메							3		3	
63	배유 : 아밀로스함량	< 5%	5 ~ 10 %	11 ~ 15 %	16 ~ 20 %	21 ~ 25 %	25 ~ 30 %	> 30 %						
64	알카리 붕괴도	붕 괴안됨		조 금붕괴됨		중 간		완 전히붕괴됨						
65	현미 : 향취성	없 거나 매우 약하다	약 하다	강 하다							1		1	

다. 품종 특성기술서

<p>(1) 종(種) 및 학명 : 벼(<i>Oryza sativa</i> L.)</p>
<p>(2) 품종명 : 큰눈자미(Keunnunjami)</p>
<p>(3) 식물체의 주요 형태적 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 큰눈자미벼는 출수기가 흑진주 보다 15일 정도 늦은 중생종임 - 종피가 흑자색인 유색미 메벼임 - 잎 색깔은 흑진주에 비해 약간 짙은 녹색임 - 잎 길이가 다소 길고 너비는 흑진주 벼와 비슷하였음 - 줄기는 굵고 반직립이며 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호함 - 간장은 중간정도이고, 수장은 중간 크기임 - 이삭추출도가 양호하며, 2차지경은 없음 - 식물체에는 안토시아닌이 착색되지 않고 종피에 안토시아닌이 착색됨 - 현미의 길이는 중간 정도이고, 폭은 약간 좁은 편임 - 현미천립중은 가벼운 편이며, 배의 크기가 일반벼 보다 3배 정도임
<p>(4) 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 큰눈자미벼는 출수기는 8월 10일 경으로 흑진주 보다 15일 늦은 중생종임 - 간장이 87.0cm로 흑진주에 비해 10cm 정도 크고, 수장은 21.0cm로 흑진주와 비슷하였음 - 포기당 이삭수는 10.1개로 흑진주벼 보다 1.1개 많았음 - 이삭당 벼알수는 110개로 흑진주 벼보다 28개 많았음 - 잎은 길이와 폭이 흑진주 벼와 비슷하였으나, 줄기가 굵고 반직립으로 분얼개도가 양호하며 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호함 - 현미 길이가 5.67mm로 중간정도이나 폭이 2.65mm로 약간 좁은 편으로 중원형에 가까움 - 현미의 천립중은 19.2g으로 가벼운 편임 - 특히 큰눈자미벼의 쌀눈(배)의 무게는 1.55g/1,000립으로 흑진주 벼 0.55g/1,000립에 비해 3배 가까이 무거웠으며, 현미에서 쌀눈이 차지하는 비율이 8.1%로 흑진주 3.2%에 비해 2.5배 정도 높았음 - 큰눈자미벼는 입실율이 92.0% 수준이고, 정현비율은 79.6%로 흑진주 벼 보다 다소 낮았으며, 10a당 현미수량은 410kg 정도로 흑진주와 비슷하였음 - 특히 큰눈자미벼의 종피는 흑자색의 천연색소 안토시아닌을 함유하고 있으며, 주성분인 Cyanidin 3-glucoside(C3G)의 함량이 흑진주 벼보다 2배 높았음

(5) 출원품종의 균일성과 안정성

큰눈자미벼는 2003년 흑진주 벼와 수원425호 교배 후대계통 중 C3G함량이 우수한 계통과 EM76(ge)을 인공교배 하여 F₂ 세대에서 C3G함량이 높고, 종실의 쌀눈이 큰 큰 개체를 선발하고, 2004년부터 2007년까지 매년 계통재배하면서 포장선발을 실시하여 유전적으로 완전히 고정되어 있으며 2008년부터 2009년까지 재배시험을 실시한 결과 기본적인 농업형질인 출수기, 간장, 수장, 수수, 현미천립중 등의 변이계수가 대조품종은 흑진주 벼와 차이가 거의 없어 품종의 균일성과 재배 안정성을 확인하였다. 2009년 포장에 1주 3본, 3반복으로 이양하여 균일성을 조사한 결과 전체적으로 균일하고 이형주가 발견되지 않았다.

구분	년도	출수기	간장(cm)	수장(cm)	포기당 이삭수(No.)	이삭수 벼알수(No.)	현미 천립중(g)
흑진주	2008	7.26	73.0	21.8	10.2	88.4	17.2
	2009	7.25	75.0	21.0	9.0	82.0	17.0
	평균		74.0	21.4	9.6	85.2	17.1
	변이계수		1.9	2.6	8.8	5.3	0.8
큰눈자미벼	2008	8.13	87.2	22.0	10.7	118.4	18.6
	2009	8.10	87.0	21.0	10.1	110.0	19.2
	평균		87.1	21.5	10.4	114.2	18.9
	변이계수		0.2	3.3	4.1	5.2	2.2

(6) 품종구별에 도움이 되는 추가정보

(가) 병과 충에 대한 저항성

(나) 미질특성

종피가 흑자색이며, 쌀눈의 크기가 흑진주 벼 보다 3배 정도 크다.

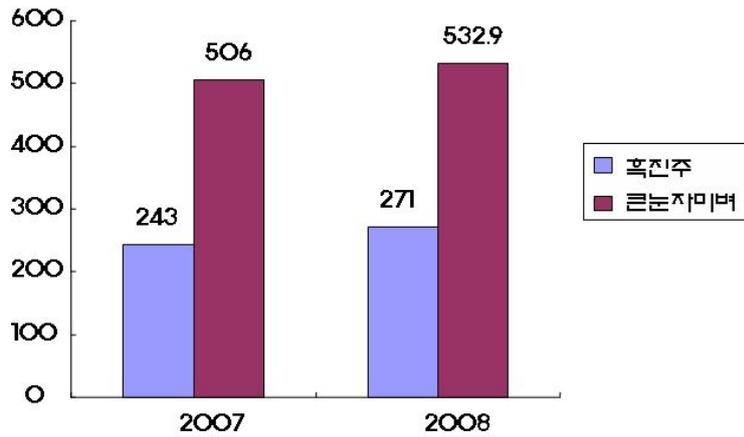
구분	정조				현미				정현비율 (%)
	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	
흑진주	7.63	3.11	2.02	2.45	5.77	2.46	1.79	2.35	81.0
큰눈자미벼	8.20	3.34	2.05	2.46	5.67	2.65	1.91	2.14	79.6

(다) 생리장애저항성

(라) 기타정보

현미에서 쌀눈의 비율이 흑진주의 2.5배 정도이며, 종피의 안토시아닌 주성분인 C3G함량(mg)이 현미 100g 당 2007년 506mg/100g, 2008년 532.9mg/100g으로 나타났다.

구분	(A) 현미천립중(g)	(B) 쌀눈(배) 천립중(g)	(B/A) 쌀눈 비율(%)
흑진주 벼	17.0	0.55	3.2
EN 76	20.4	1.66	8.1
큰눈자미벼	19.2	1.55	8.1



(1) 포장 사진



촬영일시 : 2009년 9월 30일

(2) 정조 사진



<흑진주 벼>

<큰눈자미벼>

그림 12. 흑진주 큰눈자미벼의 포장 및 정조 사진



<흑진주 벼>



<큰눈자미벼>



<흑진주 벼>



<큰눈자미벼>

그림 13. 흑진주 큰눈자미벼의 현미 사진

3. 대립자미벼 품종육성

대립자미벼는 벼 품종의 다양화로 기능성 특수용도의 쌀 품종 육성의 일환으로 현미 종피에 함유된 천연색소 중 안토시아닌의 함량을 높이고, 수량성을 확보하기 위해 한국방송통신대학교 농학과에서 검정벼와 대립벼 1호를 2002년 하계에 인공교배 하였다. F₁종자를 파종하여 F₂ 종자를 얻고 2003년 포장에 F₂를 전개하여 초형이 양호하고, 대립종이며, C3G함량이 높은 개체를 선발하였다.

연도 구분	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
재료수집 및 계통육성									
조합작성									
계통 및 개체선발									
생산력검정 및 농가실증시험									

가. 품종육성과정 설명

● 2001년 ~ 2003년 : 재료수집 및 계통육성

천연색소의 함량이 높고, 가공성이 우수하며, 수량성확보에 유리한 계통육성을 위해 보유자원의 C3G 함량을 평가하여 검정벼를 선발하고, 수량성 및 가공성이 우수한 대립벼 1호를 선정하였다.

● 2002년 ~ 2007년 : 조합작성 및 계통선발

목적에 부합되는 계통을 선정하여 2002년 하계에 검정벼와 대립벼 1호를 양친으로 교배조합을 작성하고, 2003년 포장에서 선발된 F₂개체에서 F₃ 종자를 수확하고 2007년까지 매년 포장에서 계통재배하면서 초형이 양호하고, 현미천립중이 높으며, 현미 100g당 C3G함량이 높은 SR28755-44-2-10-1-2-1 계통을 선발하였다.

● 2008년 ~ 2009년 : 생산력 검정 및 농가실증시험

선발된 계통(SR28755-44-2-10-1-2-1)에 대해 KNOU 4호라고 가치하고, 2008년부터 2009년에 걸쳐 난괴법 3반복으로 생산력 검정 및 농가실증시험을 수행한 결과, 재배안정성을 확인하고 대립자미벼라고 명명하였다.

■ 육성계보 : SR28755-44-2-10-1-2-1-B

나. 품종 특성표

- 식물의 종류 : 벼
- 출원품종의 명칭 : 대립자미
- 출원인의 성명 : 류수노, 한상준, 권순욱, 김홍열
- 특성 조사자 성명 : 권순욱
- 특성 조사 년도 : 2009
- 특성 조사 장소 : 충청남도 연기군 소정리
- 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 흑진주 벼

표 8. 대립자미벼의 품종특성표

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
1	초엽 : 안토시아닌 색소	없거나 매우 약하다	열다	진하다							1		1	
2	제1엽 : 엽초색	녹색	자주색	열은자색	자색						1		1	
3	잎 : 녹색정도 (잎색농도)			연하다		중간		진하다			5		5	
4	잎 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
5	잎 : 안토시아닌 색소분포	끝	가장자리	일률	균등									
6	잎집 : 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
7	잎집 : 안토시아닌 색소농도	매우 연하다		연하다		중간		강하다						
8	잎몸 : 모용성	없거나 매우 약하다		약하다		중간		강하다			5		5	
9	잎 : 잎귀의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
10	잎 : 잎깃의 안토시아닌 색소	없다							있다		1		1	
11	잎 : 잎혀의 모양	끝이 평범하다	뾰족하다	끝이 갈라지다							3		3	

No	형 질	표 현 형 태								출 원 품 종		대 조 품 종		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
12	잎 : 잎혀의 색	무색	녹색	자주색 줄무늬	열은 자주색	자주색					1		1	
13	잎몸 : 길이			짧다	중간	길다					5		6	
14	잎몸 : 너비			좁다	중간	넓다					5	1.20cm	4	1.12cm
15	지엽 : 자세(출수기)	직립		반직립	수평	뒤로 휨					1		1	
16	지엽 : 자세(황숙기)	직립		반직립	수평	뒤로 휨					3		3	
17	줄기 : 모양	직립		반직립	보통 개형	완전 개형			포복		3		3	
18	줄기 : 굴성	없다							있다					
19	출수기 (50% 출수)	매우 빠르다		빠르다	중간	늦다					5	8/15	3	7/25
20	응성불임	없다	부분 응성불임	응성불임							1		1	
21	외영 : 하단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다					1		1	
22	외영 : 중간부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다					1		1	
23	외영 : 상단부 안토시아닌 색소정도 (출수기)	없거나 매우연하다		연하다	중간	진하다			매우 진하다		1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
24	주두색	백색	열은 녹색	황색	열은 자색	자색					1		1	
25	줄기 : 굵기			가늘다		중간		굵다			6	2.7cm	5	2.2cm
26	줄기 : 길이 (이삭제외)	단간		준단간		중간		준장간		장간	3	79.5cm	3	75.0cm
27	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 유무	없다								있다	1		1	
28	줄기 : 마디의 안토시아닌 색소 농도			연하다		중간		진하다			1		1	
29	줄기 : 절간의 안토시아닌 색소 유무	없다								있다	1		1	
30	이삭 : 주경의 이삭 길이			짧다		중간		길다			4	18.2cm	5	21.0cm
31	이삭 : 주당 이삭수			적다		중간		많다			5	11.3개	5	9.0개
32	이삭 : 까락	없다								있다	2		1	
33	이삭 : 까락의 색 (출수기)	황백색	황갈색	갈색	적갈색	담적색	적색	담자색	자색	흑색	1		1	
34	이삭 : 까락의 분포	선단		이삭의상부		전체					1		1	
35	이삭 : 최장 까락의 길이	매우짧다		짧다		중간		길다		매우길다	3		1	
36	외영의 모용성	없거나 매우약하다		약하다		중간		강하다		매우강하다	5		5	
37	부선색 (외영 끝의 색 호숙기-황숙기)	백색	연노랑색	갈색	적색	자색	흑색				3			
38	이삭 : 까락의 색 (황숙기)	황백색	황갈색	갈색	적갈색	담적색	적색	담자색	자색	흑색	1			
39	이삭 : 주경 만곡성	직립		반직립		굽음		심하게굽음			5		5	
40	이삭 : 2차지경 유무	없다								있다				

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
41	이삭 : 2차지경 모양	1형	2형	3형										
42	이삭 : 지경의 자세	직립		반직립		개형					3		3	
43	이삭 : 추출정도	추출분량		부분추출		중간		추출양호		추출매우양호	5		7	
44	성숙기	매우빠르다		빠르다		중간		늦다		매우늦다	5		3	
45	잎 : 노화			빠르다		중간		늦다			5		5	
46	외영 : 색	황백색	황갈색	갈색	적갈색~ 담자색	자색	흑색				2		1	
47	외영 : 무늬	없다	황갈색골	갈색골	자색점	자색골					1		1	
48	외영 : 하단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다			3		1	
49	외영 : 중간부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	3		1	
50	외영 : 상단부 안토시아닌 색소 정도 (황숙기)	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다	3		1	
51	반침 껍질(호영) : 길이			짧다		중간		길다						
52	반침 껍질(호영) : 색	갈색	황갈색	적색	자색						1		1	

No	형 질	표 현 형 태									출 원 품 중		대 조 품 중	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
53	정조 : 천립중			가 볍다		중 간		무 겁다			7	34.2g	3	22.54g
54	벼알 : 길이			짧 다		중 간		길 다			7	8.39mm	5	7.63mm
55	벼알 : 폭			좁 다		중 간		넓 다			7	4.00mm	3	3.11mm
56	벼알 : 외영의 페놀반응	없 다								있 다				
57	외영 페놀반응 정도			연 하다		중 간		진 하다						
58	현미 : 길이			짧 다		중 간		길 다			7	6.08mm	5	5.77mm
59	현미 : 폭			좁 다		중 간		넓 다			7	3.24mm	3	2.46mm
60	현미 : 모양 (측면 관찰)	원 형	단 원형	중 원형	장 원형	세 장형					2		3	
61	현미 : 색	백 색	담 갈색	얼 룩진 갈색	질 은갈 색	담 적색	적 색	얼 룩진 자색	자 색	암 자색 / 흑색	9		9	
62	배유 : 찰메성	찰	중 간	메							3		3	
63	배유 : 아밀로스함량	< 5%	5 ~ 10 %	11 ~ 15 %	16 ~ 20 %	21 ~ 25 %	25 ~ 30 %	> 30 %						
64	알카리 붕괴도	붕 괴안 됨		조 금붕 괴됨		중 간		완 전히 붕괴 됨						
65	현미 : 향취성	없 거나 매우 약하다	약 하다	강 하다							1		1	

다. 품종 특성기술서

<p>(1) 종(種) 및 학명 : 벼(<i>Oryza sativa</i> L.)</p>
<p>(2) 품종명 : 대립자미 (Daeripjami)</p>
<p>(3) 식물체의 주요 형태적 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대립자미벼는 출수기가 흑진주 보다 20일 정도 늦은 중만생종임 - 종피가 흑자색인 유색 메벼임 - 잎 색깔은 흑진주 벼에 비해 약간 짙은 녹색임성 - 잎 길이는 흑진주 벼와 비슷하였으며, 너비는 중간정도임 - 줄기는 약간 굵고 반직립이며 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호 - 간장은 중단간이고, 수장은 약간 짧음 - 이삭추출도가 양호하고 이차지경이 없음 - 식물체에는 안토시아닌이 착색되지 않고 종피에 안토시아닌이 착색됨 - 현미의 길이는 중간 정도이고, 폭은 넓은 단원형 대립종임 - 현미천립중은 무거운 편임
<p>(4) 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 출수기가 흑진주 보다 20일 늦은 8월 15일 경으로 중만생에 속함 - 간장은 79.5cm로 흑진주와 비슷하고, 수장은 18.2cm로 흑진주에 비해 약간 짧음 - 포기당 이삭수는 11.3개로 흑진주벼 보다 2.3개 많음 - 이삭당 벼알수는 84개 내외로 흑진주 벼와 비슷함 - 줄기가 흑진주 벼 보다 굵고 반직립으로 분얼개도가 양호하며 지엽의 자세가 직립으로 수광태세가 양호함 - 대립자미벼의 현미는 길이가 6.08mm로 약간 길고, 폭은 3.24mm로 넓었으며, 두께가 1.96mm로 단원형 대립종임 - 현미천립중이 27.6g으로 흑진주 벼 17.0g 보다 1.6배 정도 무거움 - 종피에서 흑자색을 띠는 천연색소 안토시아닌의 주성분인 Cyanidin 3-glucoside (C3G)의 함량의 흑진주 벼보다 3-4배 높았음
<p>(5) 출원품종의 균일성과 안정성</p> <p>대립자미벼는 2002년 검정벼와 대립벼 1호를 인공교배 하여 2003년 F₂ 세대에서 C3G함량이 높고, 종실의 천립중이 큰 개체를 선발하고, 2004년 동계 온실에서 세대진전 후 2007년까지 매년 계통재배하면서 포장선발을 실시하여 유전적으로 완전히 고정이 되었으며, 2008년부터 2009년까지 재배시험을 실시한 결과 기본적인 농업형질인 출수기, 간장, 수장, 수수, 현미천립중 등의 변이계수가 대조품종은 흑진주 벼와 차이가 거의 없어 품종의 균일성과 재배 안정성을 확인하였다. 2009년 포장에 1주 3본, 3반복으로 이양하여 균일성을 조사한 결과 전체적으로 균일하고 이형주가 발견되지 않았다.</p>

구분	년도	출수기	간장(cm)	수장(cm)	포기당 이삭수(No.)	이삭수 벼알수(No.)	현미 천립중(g)
흑진주	2008	7.26	73.0	21.8	10.2	88.4	17.2
	2009	7.25	75.0	21.0	9.0	82.0	17.0
	평균		74.0	21.4	9.6	85.2	17.1
	변이계수		1.9	2.6	8.8	5.3	0.8
대립자미벼	2008	8.18	81.7	19.0	10.5	90.4	28.2
	2009	8.15	79.5	18.2	11.3	84.0	27.6
	평균		80.6	18.6	10.9	87.2	27.9
	변이계수		1.9	3.0	5.2	5.2	1.5

(6) 품종구별에 도움이 되는 추가정보

(가) 병과 층에 대한 저항성

(나) 미질특성

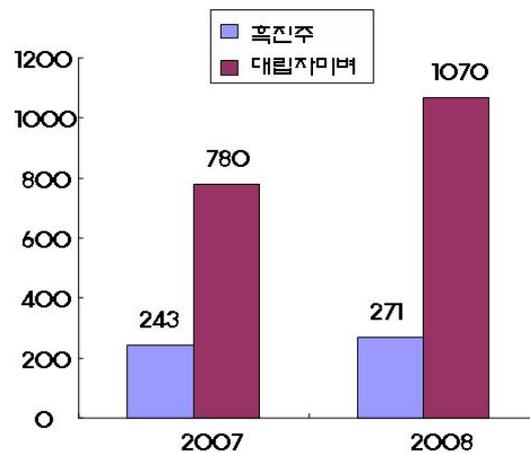
종피가 흑자색이며, 쌀알의 크기가 대립으로 흑진주 벼에 비해 현미의 길이, 폭, 두께가 크고, 장폭비는 1.88 정도이다. 정현비율은 80.4%로 흑진주벼와 비슷하였다.

구분	정조				현미				정현비율 (%)
	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	길이 (mm)	폭 (mm)	두께 (mm)	장폭비	
흑진주	7.63	3.11	2.02	2.45	5.77	2.46	1.79	2.35	81.0
대립자미벼	8.39	4.00	2.24	2.10	6.08	3.24	1.96	1.88	80.4

(다) 생리장해저항성

(라) 기타정보

안토시아닌의 주색소인 C3G함량이 흑진주 벼 보다 3-4배 정도 높은 수준으로 현미 100g당 C3G함량이 2007년 780mg, 2008년에는 1,070mg로 나타났다.



(1) 포장 사진



촬영일시 : 2009년 9월 30일

(2) 정조 사진



<흑진주 벼>

<대립자미벼>

그림 16. 흑진주 대립자미벼의 포장 및 정조 사진



<흑진주 벼>

<대립자미벼>

그림 17. 흑진주와 대립자미벼의 현미 사진

4. 안토시아닌 고함유 계통의 도열병 저항성 검정

최근 다양한 기능성 벼 품종에 대한 수요가 급증함에 따라 향, 색, 가공적성 및 물질이용 등 다양한 요구에 부합하는 품종들이 육성되고 있다. 그러나 대부분 유색미 품종은 도열병 등 병 저항성이 약한 것으로 보고되고 있다. 본 실험은 기 보고된 도열병 관련 DNA 마커를 활용하여, 국내 유색미 품종과 본 연구진에서 육성한 안토시아닌 고함유 계통 및 다기능성 흑자미 계통에 대한 도열병 저항성 유전자를 탐색하여 육성 계통의 재배안정성 확보를 위해 수행하였다.

가. 안토시아닌 고함유 계통 및 유색미 유전자원의 도열병 유전자 탐색

(1) 공시재료 및 마커 정보

도열병 유전자 분석을 위한 흑진주 벼 등 24개 국내품종, 계통 및 교배모본에서 DNA를 추출하였다. 이들 24개 품종 및 계통의 종피색은 흑색 19개, 갈색 2개, 흰색 3품종 이었다(표 9).

도열병 유전자 탐색은 13개 도열병 유전자에 대해 수행하였고, 이를 위해 8개 SNP 마커와 12개 SCARs 또는 STS 마커를 사용하였고(표 10), 이들 실험은 3번 이상의 반복 실험을 수행하였다.

표 9. 도열병 유전자 탐색에 이용한 국내품종 및 계통 목록

연번	품종명	계통번호	약자	연번	품종명	계통번호	약자
1	흑진주벼	수원 415	HJJ	13	신명흑찰	전북 1	SMG
2	수원 425호	수원 425	S425	14	조생흑찰	밀양 194	JSG
3	검정벼	-	GJ	15	흑광벼	수원 477	HG
4	대립벼 1호 ^{a)}	수원 391	DR1	16	흑남벼	Iri427	HN
5	용금 1호	-	YG1	17	흑설	수원 505	HS
6	EM76 ^{a)}	-	EM76	18	흑향	이리 440	HH
7	화선찰벼 ^{a)}	수원 384	HSC	19	상해향혈나	-	SHC
8	C3GHi		CGH	20	조생 자미계통	Knou3	K3
9	적진주벼 ^{b)}	수원 451	JJJ	21	대립자미벼	knou4	K4
10	홍진주벼 ^{b)}	수원 501	RJJ	22	슈퍼자미벼	knou5	K5
11	보석흑찰	수원 512	BSG	23	슈퍼자미벼 2호	knou6	K6
12	신농흑찰	전북 2	SNG	24	큰눈자미벼	knou8	K8

^{a)} : White-colored pericarps, ^{b)} : Red / Brown colored pericarps

표 10. 검정된 도열병 유전자 목록 및 DNA 마커 정보

Rgenes	Chrs.	Markers	Annealing Temp.(℃)	Exp. Size(bp)	Reference
<i>Pi-b</i>	2	Nsb	57	629	Cho <i>et al.</i> 2007
<i>Pi-5</i>	9	JJ817	60	1450	
<i>Pi-a</i>	11	yca72*	60	870/635	
<i>Pi-9</i>	6	pB8	55	700	Liu <i>et al.</i> 2002
		pBA14	55	400	
		NBS-O/U*	60	928	Qu <i>et al.</i> 2006
<i>Pi-i</i>	9	JJ80	56	442	Yi <i>et al.</i> 2004
		JJ81	56	343	
		JJ113	56	484	
<i>Pi-ta, ta2</i>	12	YL155/87	58	1042	Jia <i>et al.</i> 2004
		YL183/87	55	1042	
		YL100/102	55	403	
<i>Pit</i>	1	t256	60	322	
<i>Pi-z</i>	6	z4792	60	340	
		z60510	60	356	
<i>Pi-zt</i>	6	zt4792	60	340	Hayashi <i>et al.</i> 2006
		zt6057	60	360	
<i>Pi-k</i>	11	k6415	60	140	
<i>Pi-km</i>	11	k6441	60	404	
<i>Pi-kp</i>	11	k39575	60	158	

* These PCR products were digested with the *Hinf I* restriction enzyme.

(2) 육성 계통의 도열병 유전자 탐색 결과

13개 도열병 저항성 유전자에 대해 분석한 결과 21개 유색미 품종 중에서 19개 품종에서 적어도 하나 이상의 저항성 유전자가 탐색되었고, 적진주 벼에서는 *pia*, *pii*, *pita2*, *pik* 4개의 저항성 유전자가 발견되었다(표 11).

2번 염색체에 위치한 *Pib* 유전자는 인디카 품종에서 유래된 것으로 국내 통일형 품종에는 IR8, IR24에서, 자포니카 교배모본으로 사용된 BL1, BL7에서 유래된 것으로 보고된 바 있다(Cho 등 2007). Nsb 마커를 이용하여 *Pib* 유전자 탐색한 결과, 21개 유색미 품종 및 계통 중 흑진주, 수원 425호, 용금1호 등 7개 흑자미와 홍진주벼, 조생 자미계통, 대립자미벼, 큰눈자미벼에서 탐색되었다(그림 18).

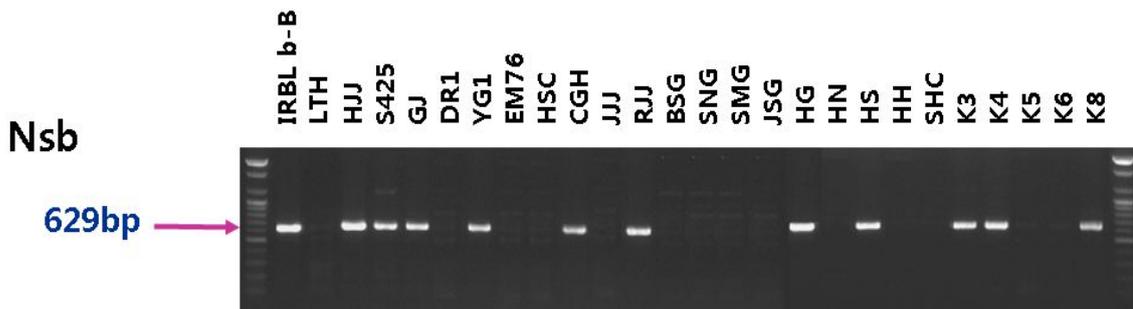


그림 18 안토시아닌 고품유 계통 및 유색미 유전자원의 *Pib* 유전자 탐색 결과

Pita 및 *Pita2* 유전자 탐색을 위해 사용된 DNA 마커 YL155, YL183, YL87은 YL155/YL87 조합에서는 *Pita* 및 *Pita2* 유전자를 증폭하고, YL183/TL87 조합은 *pita*, *pita2*를 증폭하며, *Pita*와 *Pita2*를 구분하지는 못하는 것으로 보고되었다(Jia *et al.* 2004). 공시자료의 DNA 증폭한 결과, 흑진주, 검정벼, 적진주, 대립자미벼가 *Pita* 또는 *Pita2*를 가지고 있는 것으로 확인되었다(그림 19). Cho 등(2007)은 국내 품종의 *Pita2* 유전자는 Fuji280으로 보고한 바 있는데, 특히 적진주벼는 교배모본으로 이용된 Fuji280에서 유래된 *Pita2*를 가지고 있는 것으로 판단된다.

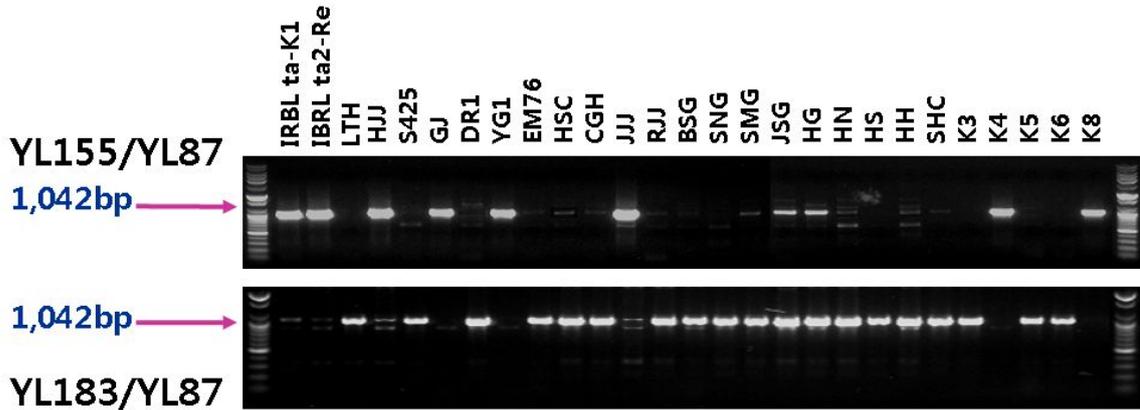


그림 19 안토시아닌 고품유 계통 및 유색미 유전자원의 *Pita*, *Pita2* 유전자 탐색 결과

9번 염색체에서 가깝게 연관되어 위치한 *Pi5*, *Pii* 유전자 탐색을 위해 JJ113(*Pi5*, *Pii* 특이마커)을 이용하여 DNA를 증폭한 결과, 적진주벼, 흑설벼, 흑향벼에서만 *Pii* 유전자가 탐색되었고, JJ817로 증폭한 결과 *Pi5* 저항성 유전자는 탐색되지 않았다(그림 20).

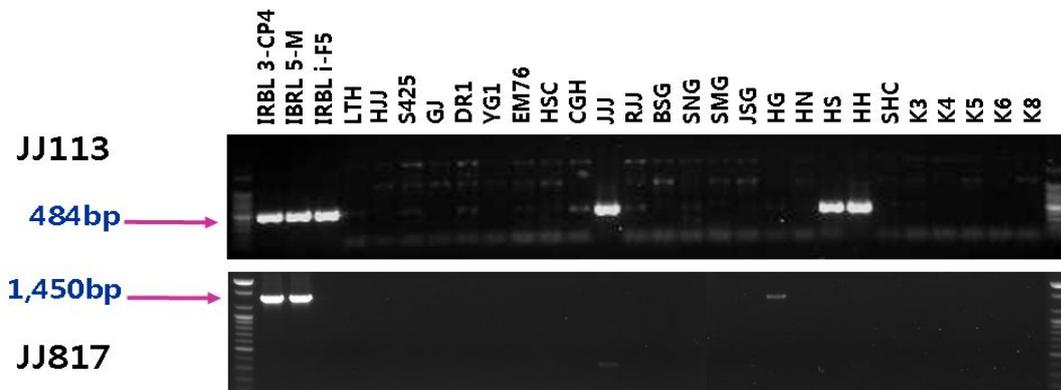


그림 20. 안토시아닌 고품유 계통 및 유색미 유전자원의 *Pii*, *Pi5* 유전자 탐색 결과

*Pia*와 *Pik* 저항성 유전자는 각각 11개 품종, 5개 품종에서 탐색되었고, *Pikm*, *Pit* 유전자는 탐색되지 않았다(표 11). 용금1호를 배배양하여 육성된 흑진주벼는 용금벼와 동일한 *Pia*, *Pib*, *Pita*를 가지고 있었고, 흑남벼를 모본으로 육성된 신명흑찰과 신농흑찰벼에서는 *Pik*가 탐색되었다. 흑광, 흑설, 흑향벼는 *Pia*를 포함하여 2-3개의 도열병 저항성 유전자를 가진 것으로 탐색되었다. 검정벼와 대립벼 1호를 교배하여 육성한 대립자미벼는 *Pia*, *Pib*, *Pita*가 탐색되었고, 흑진주벼와 수원425호의 후대에 EM76을 교배하여 육성한 큰눈자미벼는 *pib*, *pita*, *pi9(t)*를 갖는 것으로 조사되었다.

표 11. 유색미 품종 및 계통의 주요 도열병 유전자 정보

품종 및 계통	육성 계보(저항성 유전자)	저항성 유전자
흑진주벼	용금 1호(a,b,ta)	a,b,ta
수원425호	상해향혈나 / 천마	a,b
검정벼	-	a,b,ta
대립벼 1호	니혼마사리/BG29	-
용금 1호	-	a,b,ta
EM76	-	-
화선찰벼	밀양64/신선찰벼	-
C3GHi	흑진주(a,b,ta)/수원425호(a,b)	a,b
적진주벼	오봉벼(Fuji280(ta2))/긴까락샤레	a,i,ta2,k
홍진주벼	수원 383(삼남벼(b, 9(t)))/자광도	b,k
보석흑찰벼	-	a
신농흑찰벼	흑남벼/밀양 153	k
신명흑찰벼	흑남벼/밀양 153	k
조생흑찰벼	Dohok mochi 149/SX864	a,ta,k
흑광벼	길립흑미(a,ta)/일품벼(b,i)//화진벼(a)	a,b,ta
흑남벼	탐진벼(ta, k)/상해향혈나	-
흑설벼	설갱벼(b,i)/흑진주(a,b,ta)	a,b,i
흑향벼	이리 390/SX864	a,i
상해향혈나	-	-
조생자미계통	흑진주(a,b,ta)/수원 425(a,b)	a,b
대립자미벼	검정벼(a,b,ta)/대립벼 1호	a,b,ta
슈퍼자미벼	흑진주(a,b,ta)/수원 425(a,b)//대립벼 1호	-
슈퍼자미 2호	흑진주(a,b,ta)/수원 425(a,b)//대립벼 1호	-
큰눈자미벼	흑진주(a,b,ta)/수원 425(a,b)//EM76	b,ta

* 저항성 유전자 : a, *Pia* b, *Pib* i, *Pii* k, *Pik* ta, *Pita* ta2, *Pita*2.

BBCC 계통을 가진 야생벼(*O. minuta*)에서 유래된 *Pi9* 저항성 유전자 탐색을 위해 IRBL elite line과 공시재료를 NBS O/U로 증폭된 DNA 단편에 제한효소 *Hinf I*을 처리한 결과, 500bp, 460bp, 240bp와 220bp 크기로 절단되었으며, *Pi9* type등 6개 type으로 분류되었고, 14개 유색미 품종은 감수성 품종인 LTH-type으로 분류되었다. 이들 중 4개 품종은 460bp와 220bp의 단편이 출현한 *Pi9*-type을 보였고, 460bp와 240bp의 단편이 출현한 EM76, 흥진주와 흑설벼는 pB8(*Pi9*-specific primer)로 증폭했을 때 positive한 결과를 보였다. *Pi9*는 *Pi2*, *Piz*, *Pizt* 등과 가깝게 연관되어 있고, 다양한 균주에 대해 광범위한 저항성을 보여 이에 대한 추가적인 분석이 필요한 것으로 보인다. 현재 이들 DNA 단편에 대한 염기서열분석을 수행 중에 있다.

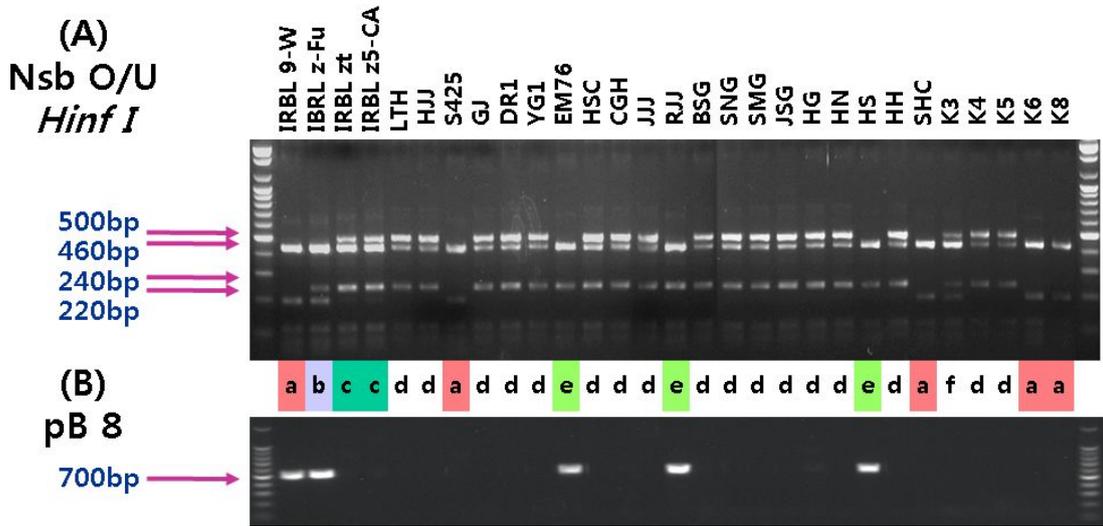


그림 21. DAN 단편 제한효소 처리에 따른 유색미 품종 분류

이들 안토시아닌 고타미 계통 및 유색미 유전자원의 저항성 유전자 탐색 결과는 안토시아닌 고타미 후대 계통 선발 시 초기세대에서 병 저항성 계통 및 개체 선발에 활용 가능할 것으로 판단된다.

제2절 유색미 신생리활성물질의 탐색 및 분석

1. 쌀함유 신생리활성물질 탐색

가. 유색미 추출분획 제조 및 활성성분 분리

유색미 함유 활성성분 분리는 본 연구진이 육성한 C3GHi 품종으로부터 그림 22과 같은 방법으로 수행되었다. 곱게 마쇄된 C3GHi 종자를 MeOH를 가하여 온침 추출하여 얻은 추출액을 여과한 후 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었고, 이 농축액에 증류수 1.5 l를 가한 후 그림 22과 같이 n-hexane, EtOAc, BuOH 분획을 얻었다. 이 중 BuOH 분획에 대하여 그림 23와 같이 실리카겔 컬럼 크로마토그램을 수행하였고, 4개의 sub 분획을 얻었으며, 그 중 2번과 3번 분획을 그림 24에서 제시한 사진의 recycling preparative HPLC system (flow rate: 4ml/min; 60% ACN)을 이용하여 분취한 결과 2번 분획에서 protocatechuic acid와 vanillic acid, 그리고 3번 분획에서 Quercetin을 각각 순수 분리하였다.

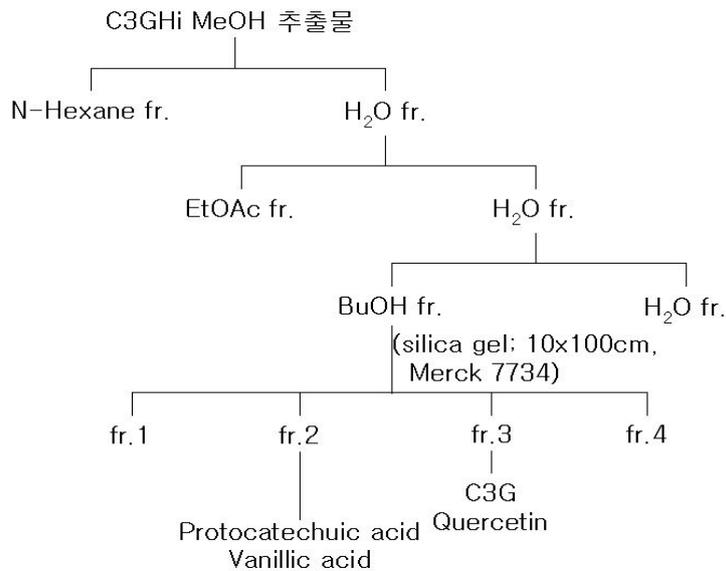


그림 22. C3GHi MeOH 추출물로부터 활성성분 분리과정

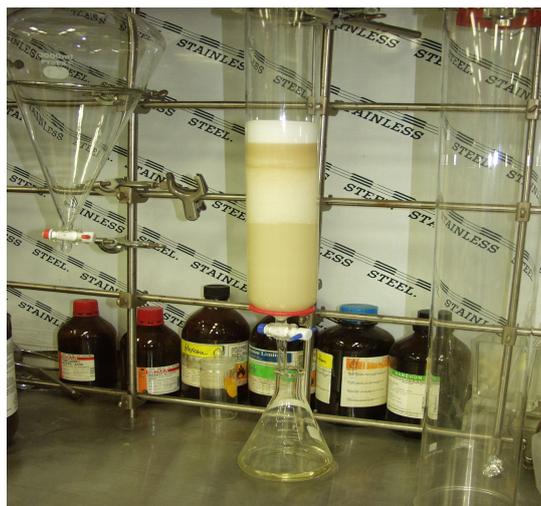


그림 23. C3GHi BuOH 분획으로부터 유효성분 분리 - 실리카겔 컬럼
(CH₂Cl₂:MeOH:H₂O=65:35:10).



그림 24. Recycling preparative HPLC.
컬럼 : JAIGEL-GS310(20x500mm); flow rate: 4 ml/min;
UV-Vis(with RI).

- Protocatechuic acid의 구조

- Protocatechuic acid는 무정형 미색분말로 UV 스펙트럼에서 나타나는 일차흡수 밴드(259 nm)와 이차흡수 밴드(295 nm)에서 단순페놀화합물임을 확인(그림 25).
- $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 7.43에서 meta-coupling ($J=2.0$ Hz)하는 한 개의 proton과, δ 6.78에서 ortho-coupling ($J=7.3$ Hz)하는 한 개의 proton 및 δ 7.42에서 이들과 각각 ortho- 및 meta coupling ($J=2.0, 7.3$ Hz)하는 proton signal 확인(그림 26).
- EI-MS spectrum의 m/z 154 $[\text{M}]^+$ 를 통해 분자량 154 확인(그림 27).

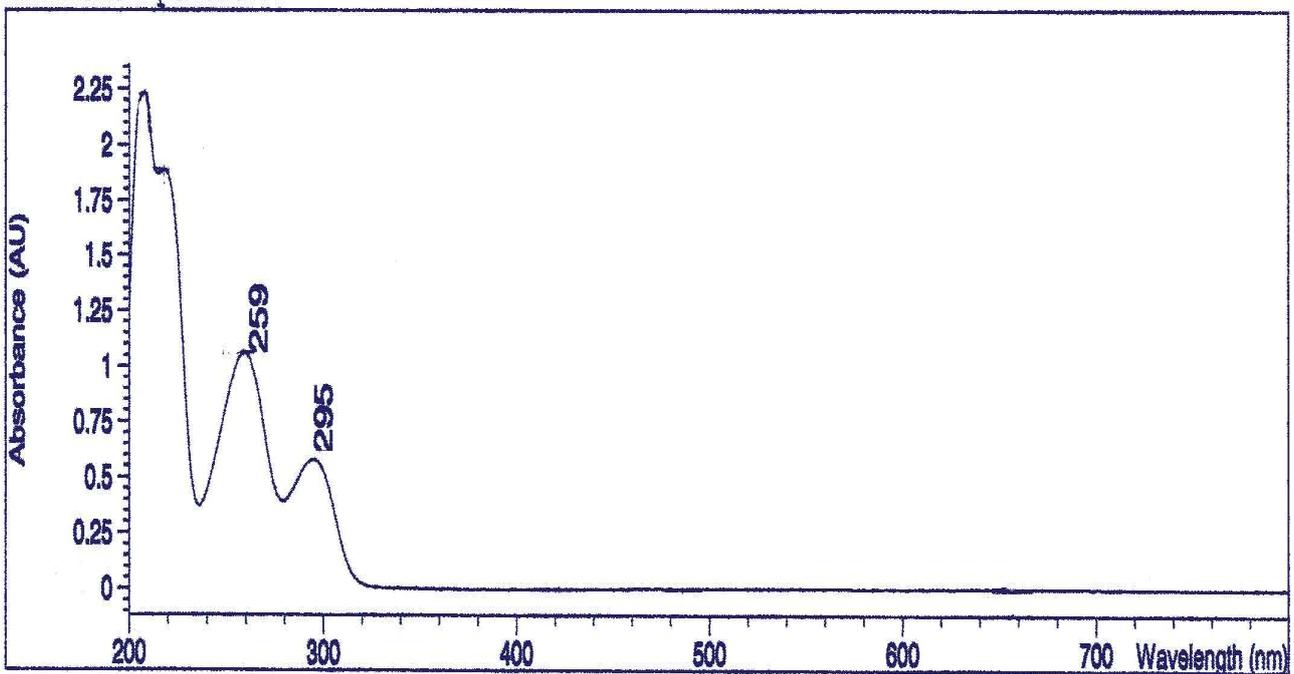


그림 25. Protocatechuic acid의 UV-spectrum.

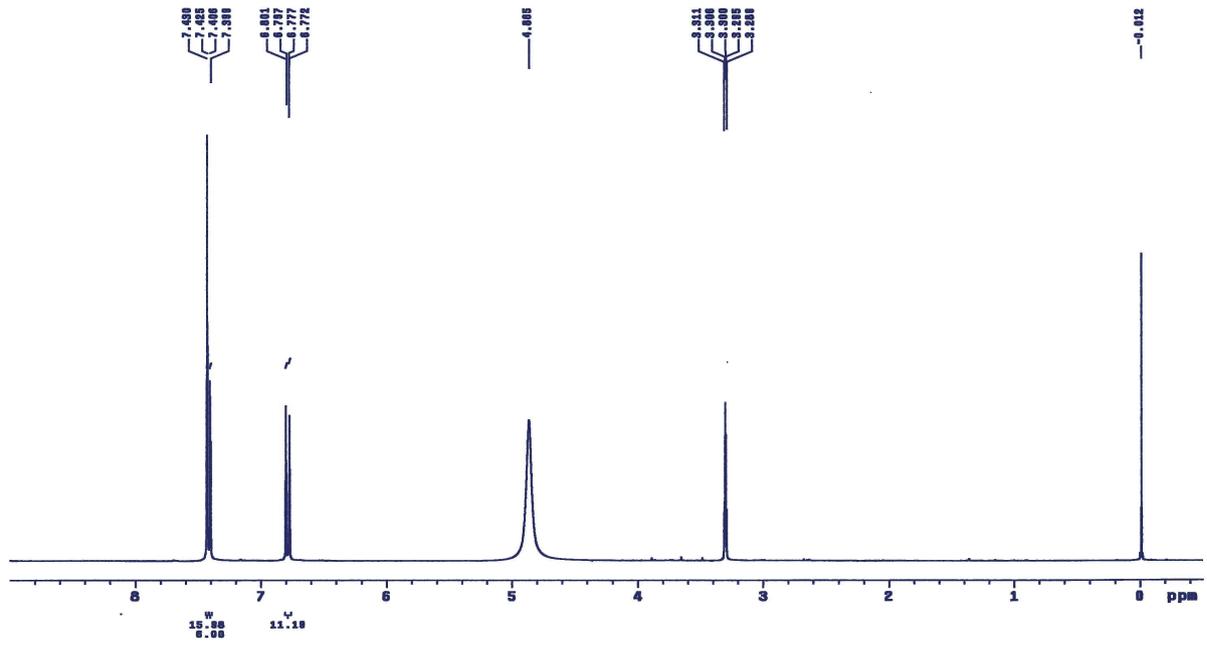


그림 26. Protocatechuic acid의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD).

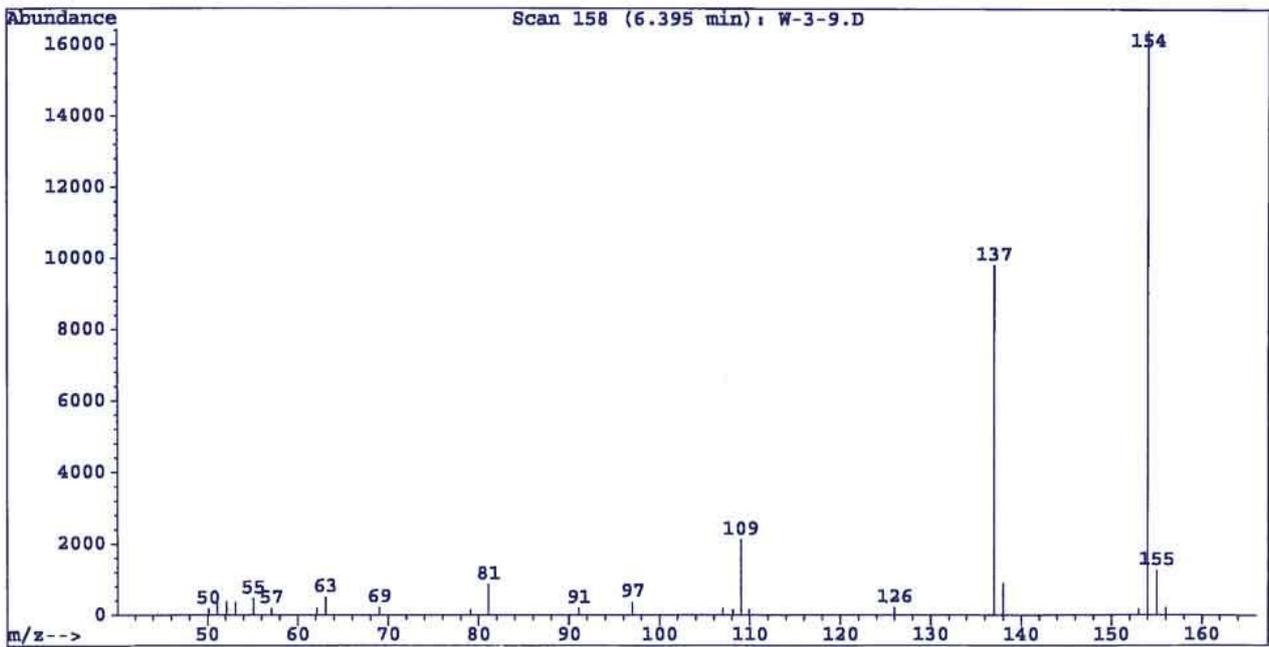


그림 27. Protocatechuic acid의 EI-MS spectrum.

- Vanillic acid의 구조

- Vanillic acid 역시 무정형 미색분말로 EI-MS spectrum의 m/z 168 $[M]^+$ 를 통해 분자량 168 확인(그림 28)
- UV 스펙트럼에서 나타나는 일차흡수 밴드(259 nm)와 이차흡수 밴드(291 nm)에서 단순페놀화합물임을 확인.
- $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 protocatechuic acid와 같은 ABX type의 1,3,4-trisubstituted benzene 형태의 화합물임을 확인(그림 29).
- δ 3.88에서 methoxy의 singlet signal 확인(그림 29).
- $^{13}\text{C-NMR}$ 결과를 토대로 본 화합물이 vanillic acid 임을 최종 확인(그림 30).

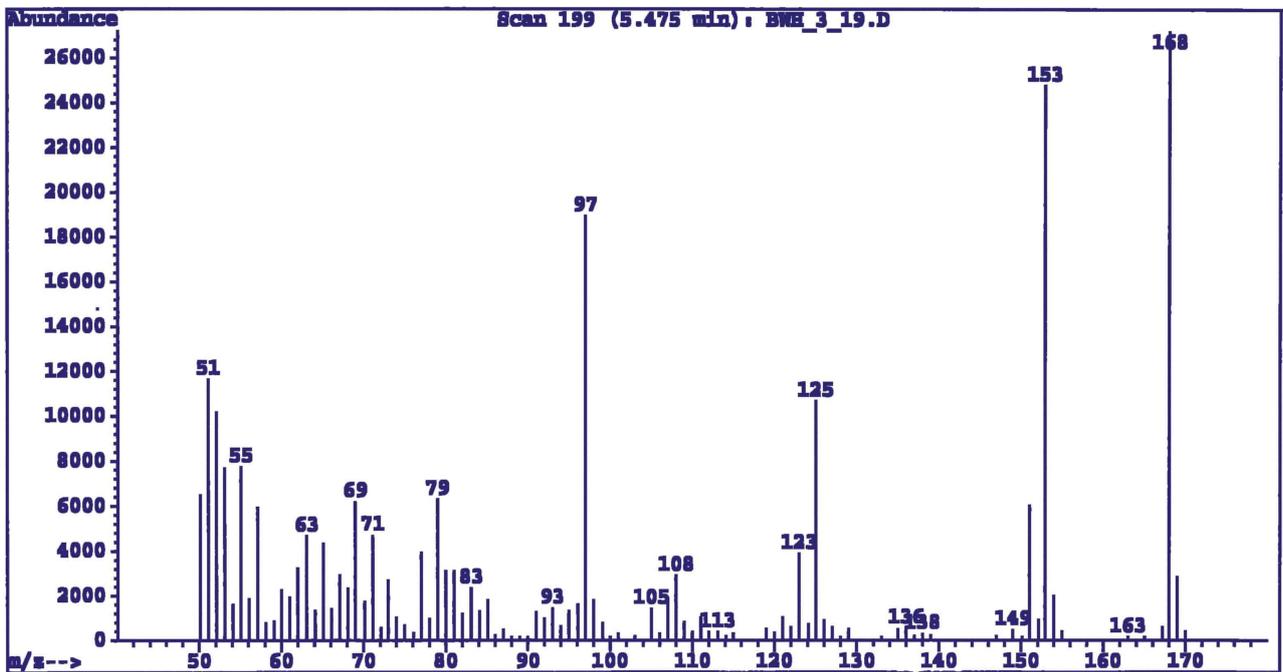


그림 28, Vanillic acid의 EI-MS spectrum.

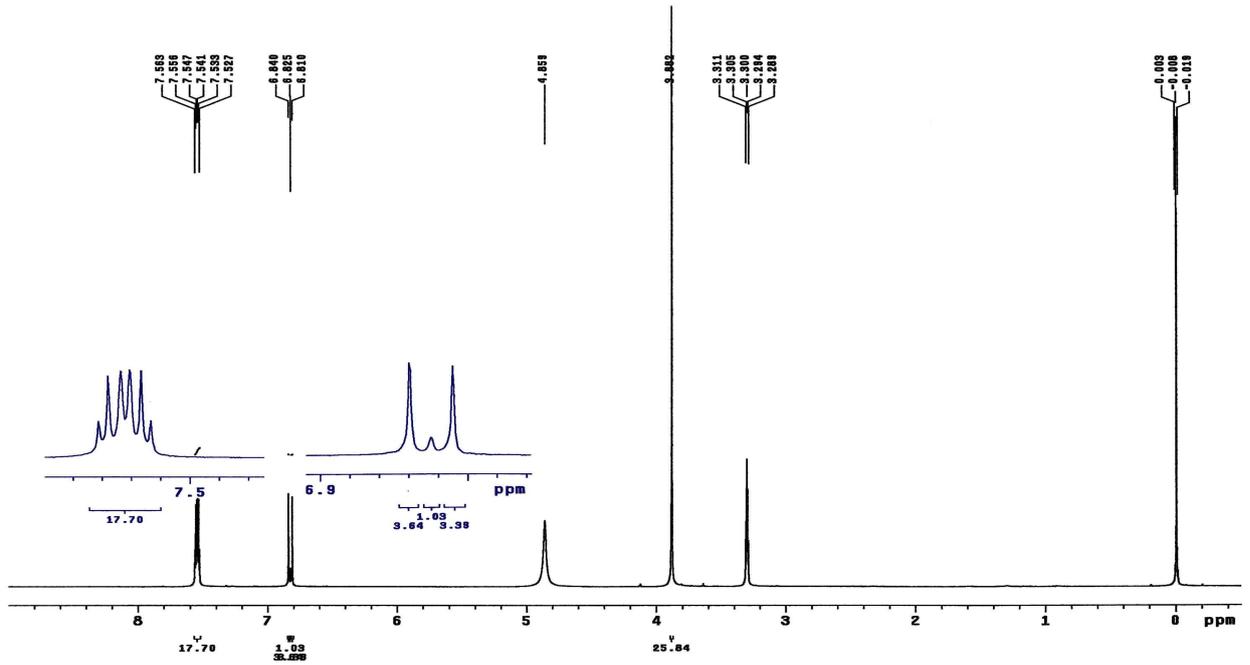


그림 29. Vanillic acid의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD).

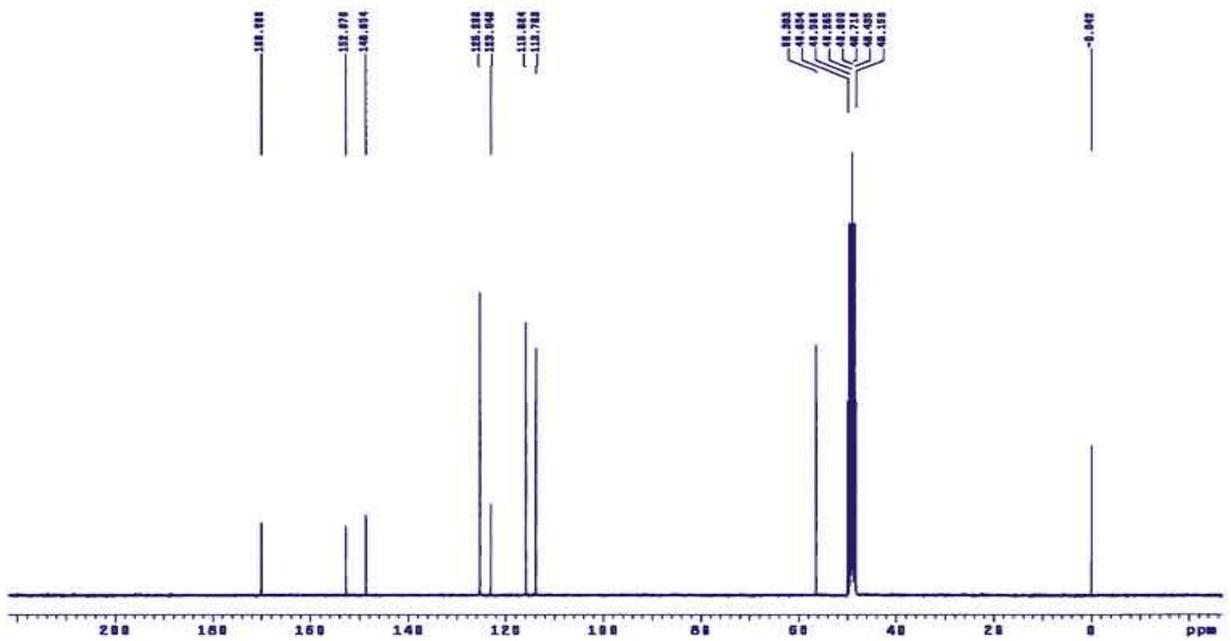


그림 30. Vanillic acid의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CD_3OD).

- Quercetin의 구조

- C3GH_i의 BuOH 분획 중 3번 sub-분획으로부터 recycling preparative HPLC를 통해 얻은 quercetin은 연두색의 부정형 분말로 TLC를 통해 추적이 가능했다.
- ¹H-NMR 스펙트럼에서 ABX type의 1,3,4-trisubstituted benzene 기의 aromatic proton인 δ 7.54, 6.88, 7.67에 의한 signal들과 meta-coupling 하는 δ 6.40, 6.18의 signal 및 저자장에서 나타나는 5개의 phenol성 OH에 기인하는 전형적인 flavanonid의 signal 확인(그림 31).
- ¹³C-NMR(그림 32)과 HMBC 스펙트럼(그림 33)를 통해 본 화합물이 quercetin임을 최종 확인.

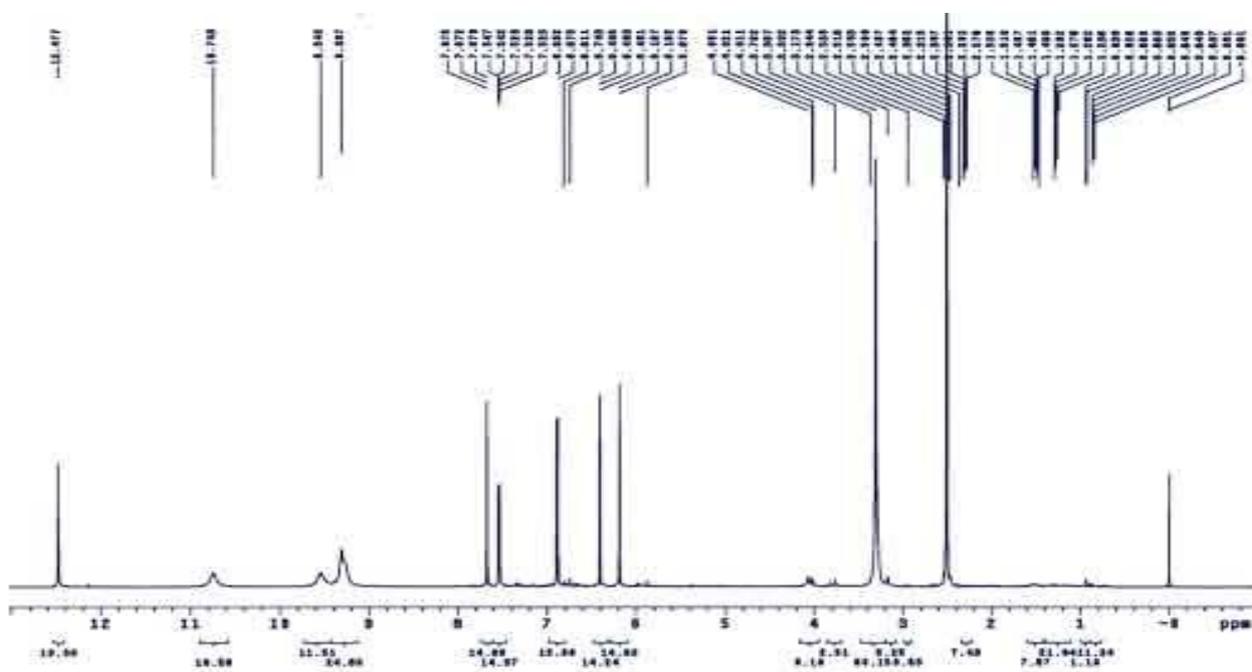
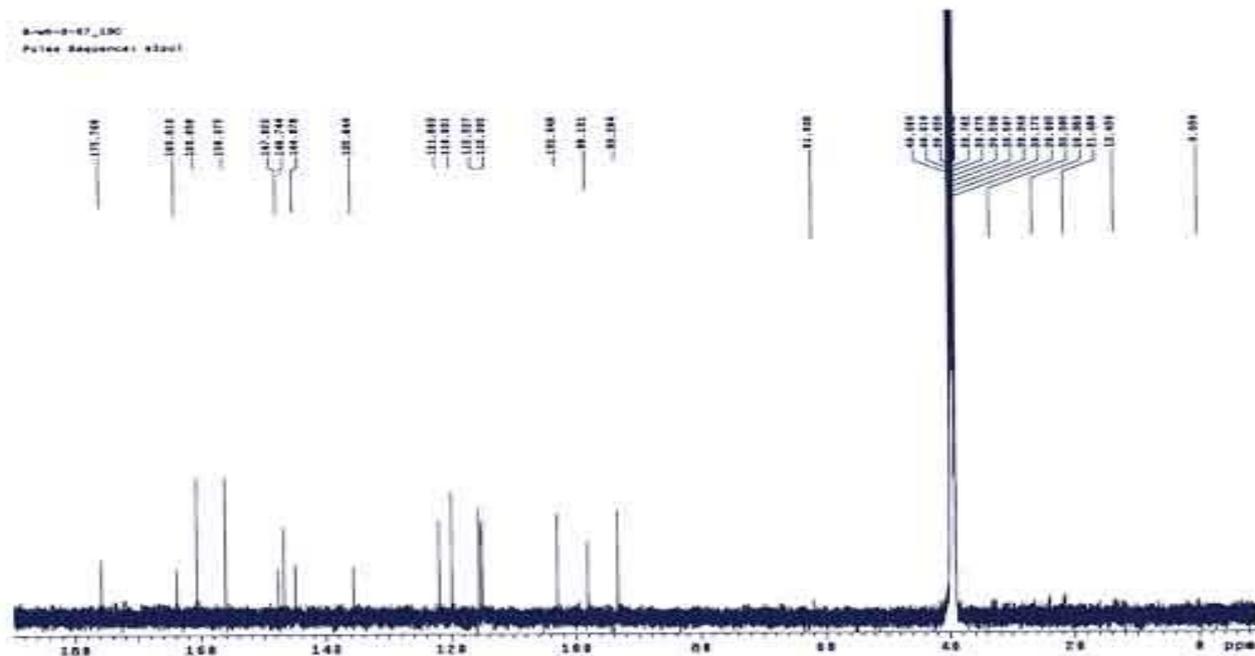


그림 31. Quercetin의 ¹H-NMR spectrum(DMSO-*d*₆).



2. 쌀 품종 별 발아시간에 따른 GABA 함량

가. 공시재료

쌀의 신생리활성 물질의 탐색을 위하여 품종별로 발아시간에 따른 GABA(Gamma-Amino Buytric Acid) 함량 분석을 수행하였고, 대립자미벼, 슈퍼자미벼, 큰눈자미벼, 호품, EM76을 공시하였다.

나. 분석방법

(1) 발아조건

공시된 쌀의 발아는 직경 10cm인 플라스틱 페트리디쉬에 종이 필터를 깔고 약 10ml의 증류수를 공급하여 충분한 수분이 공급되도록 하였으며 충실한 벼 알을 골라 50립씩 치상하였다. 24°C의 항온이 유지되는 생육상에 각 품종당 3반복으로 6, 9, 12, 24, 48시간을 발아시켰다.

(2) GABA 추출

공시된 쌀 품종 0.5g을 TissueLyser(Retsch GmbH & Co.KG, Haan,Germany)를 이용하여 곱게 마쇄한 후 60% 메탄올 5mL를 가해 초음파기(Branson Ultrasonics Co., CT, USA)로 20분간 추출하였다. 추출액은 4°C에서 3000rpm의 속도로 15분간 원심분리하였으며, 이를 nylon syringe filter (25mm, 0.2µm, Whatman)로 여과한 후 분석에 이용하였다.

(3) HPLC-MS/MS를 이용한 GABA 분석 조건

쌀 함유 GABA의 함량분석에 사용된 기기는 HPLC-MS/MS(Agilent 1200 series, USA)이며, 컬럼은 Waters Nova-Pak ® C₈ (3.9 × 150mm)를 사용하였다. 용매는 0.1% formic acid와 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile을 0.8ml/min 유속으로 흘려보냈다.

Mass spectra는 electro spray ionization(ESI) source가 장착된 G6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer를 검출기로 사용하였으며, Mass spectrometer는 positive ESI에서 104.4→87.3(m/z)로 이온화된 분자를 MRM모드로 검출하였다.

다. 실험결과

GABA는 억제성 신경전달 물질로서 신경안정작용과 치매, 비만, 대장암 등 세포의 전기 및 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 GABA는 곡류식품과 녹차 및 김치에 함유되어 있으며, 특히 유산균 발효제품을 이용한 경우 그 함량이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 식량작물의 신생리물질의 탐색을 위한 연구로서 쌀의 발아시간에 따른 품종별 GABA 함량 분석 실험을 HPLC-MS/MS를 이용하여 정량분석을 수행하였다.

Gamma-Amino Buytric Acid(99%) 표준품을 이용하여 stock solution을 만들었고 이를 희석하여 standard로 사용하였다. 만들어진 GABA standard를 positive ESI full scan 크로마토그램을 통하여 molecular ion 104.1(m/z)값을 가지는 것을 확인하였으며, 이 이온을 전구체로 선별하여 재이온화 시키면 자분자 87.1과 45.1(m/z)값을 얻을 수 있다(그림 34). 이를 기준으로 각 샘플의 GABA 양을 정량화 할 수 있게 된다.

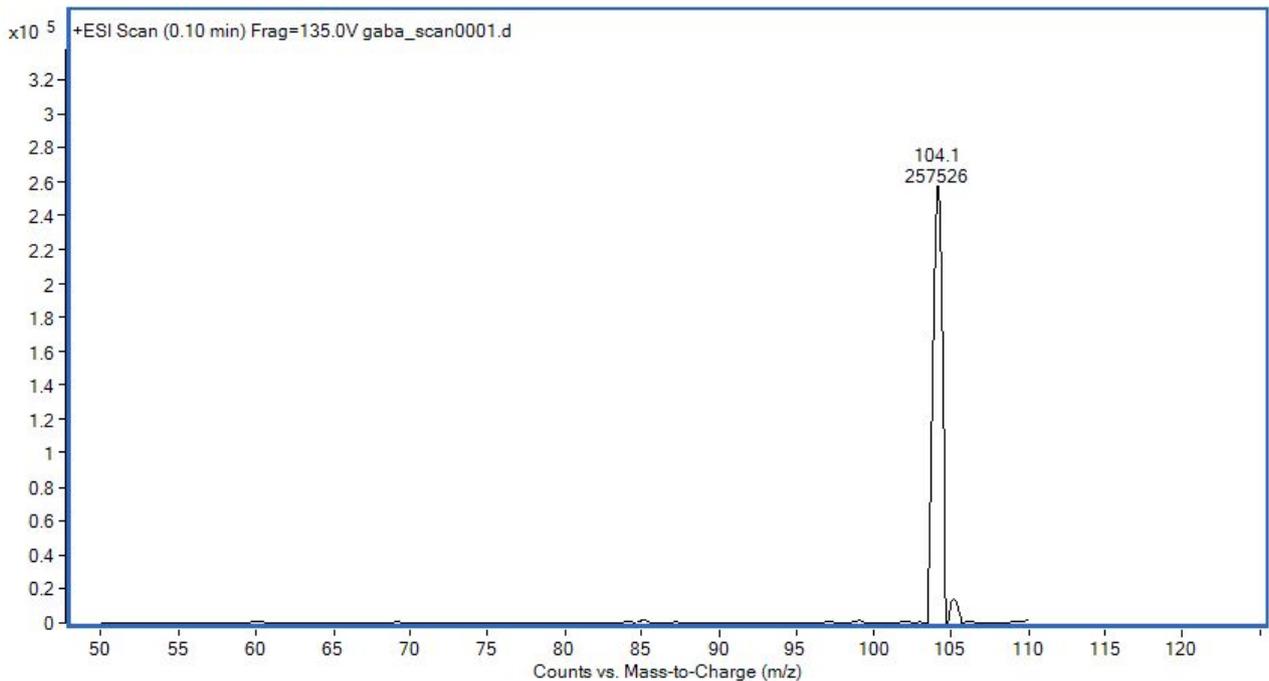


그림 34. GABA(10ppm) standard scan spectrum.

정량된 5개 품종의 발아시간에 따른 GABA 함량은 발아 전 상태에서는 가장 높은 품종이 EM76이었으며, 호품이 다음순으로 함량이 높았고, 대립자미벼와 슈퍼자미벼, 큰눈자미벼의 함량은 비슷하게 나타났다(그림35). 하지만 마지막 발아시간인 48시간 후에는 호품이 가장 높은 GABA 함량을 나타냈으며, 큰눈자미벼, 대립자미벼, EM76, 슈퍼자미벼 순이었다. 48시간 발아 시에는 발아를 시키지 않았을 때 보다 모두 그 함량이 높아지는 것으로 나타났지만 특이하게도 12시간 발아 시에는 대체적으로 GABA의 함량이 발아 전 함량과 비슷하거나 오히려 감소하는 경향도 나타났다. 위와 같은 결과로 보아 GABA의 함량은 발아 12시간 이후부터 그 함량이 증가하는 것으로 보이며, 발아 전 상태에서 GABA의 함량이 많더라도 발아 후의 함량이 더 많을 수 있는 확률은 적을 것으로 판단된다. 공시된 5품종 중 발아에 따른 가장 큰 GABA함량의 변화를 나타낸 품종은 호품과 큰눈자미벼로써 이들 품종의 발아현미에 대한 연구를 지속적으로 수행한다면 건강기능성 식품의 개발에 기여할 것으로 기대된다.

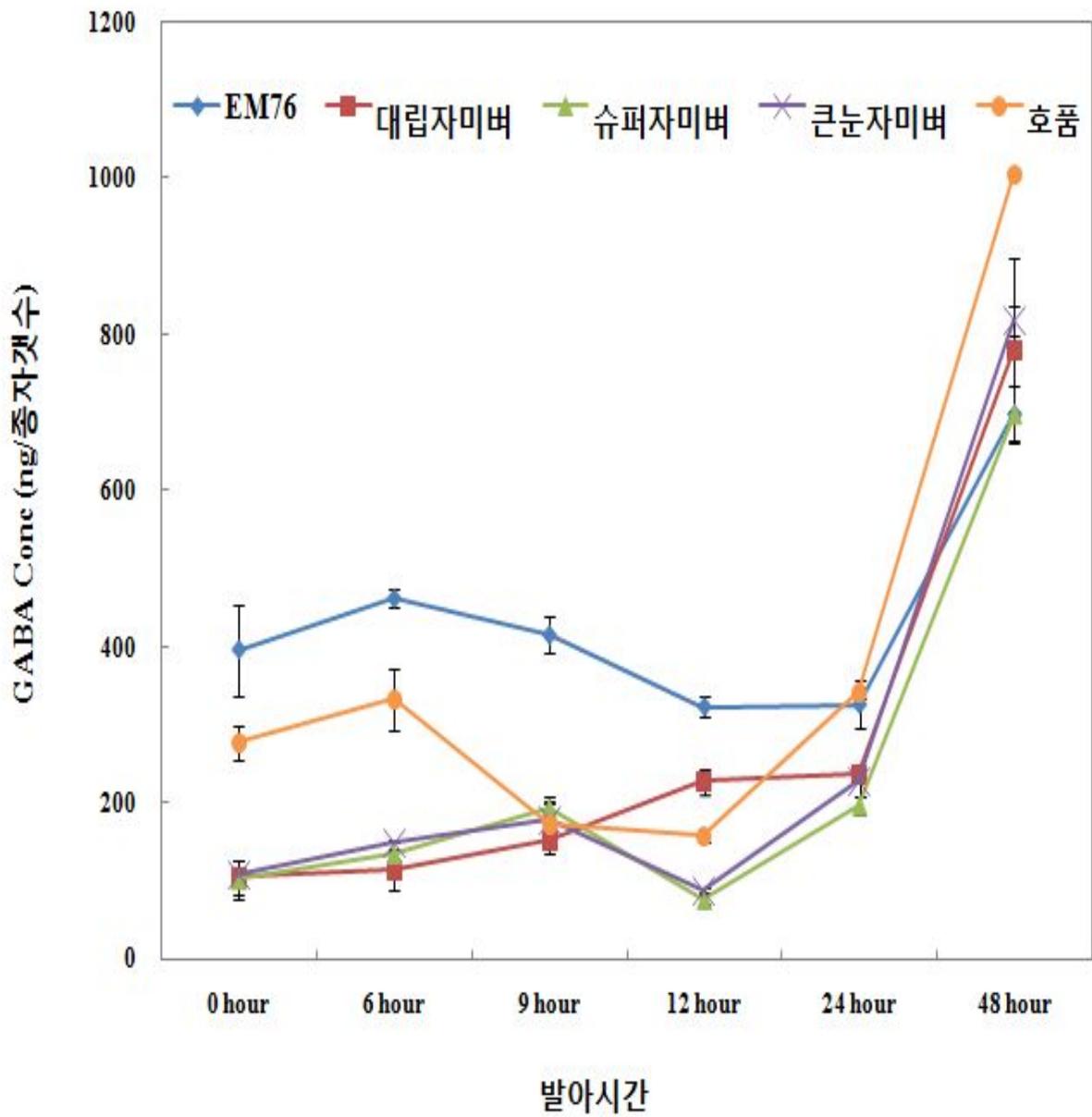


그림 35. 쌀 품종별 발아시간에 따른 GABA 함량.

3. 안토시아닌 고함유 품종의 세포독성 평가

가. 실험재료

(1) 공시재료

안토시아닌 고함유 품종의 세포독성 평가는 2009년도 충청남도 연기군 시험포장에서 재배된 슈퍼자미벼와 동시 재배된 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼 및 추청벼를 통해 수행하였다. 공시된 검체는 곱게 마쇄한 후 상온에서 80% 에탄올을 이용하여 3시간씩 5회에 걸쳐 활성 성분을 추출하여 충분히 감압 농축한 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

쌀의 전분을 호화시키기 위해 품종별로 각각의 쌀 30g을 200ml 비이커에 담고 증류수로 3번 수세한 다음 쌀의 1.5배의 증류수를 넣고 실온(25℃)에서 30분간 침지시키고, 알루미늄 호일로 뚜껑을 한 다음 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 호화된 전분은 증류수와 70% 에탄올을 이용하여 3시간씩 3회 열수추출하여 충분히 감압 농축 한 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

(2) 균주 및 세포

HeLa(Human cervix adenocarcinoma cell line), MCF-7 (Human breast cancer cell line), HepG2(Hepatocellular carcinoma cell line), A-549(Human lung carcinoma cell line) 세포주는 한국 세포주 은행으로 분양받아 사용하였다.

나. 세포증식 억제효과

(1) 균주배양

HeLa, MCF-7 cell은 10% fetal bovine serum(FBS), 1% antibiotic-antimycotic와 3.7g/L sodium bicarbonate를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)를 사용하여 배양하였다. HepG2, A-549 cell은 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic와 2.2g/L sodium bicarbonate를 첨가한 Dulbecco's modified Roswell Park Memorial Institutur(RPMI 1640)를 사용하여 배양하였다. 37℃ 의 5% CO₂ 가스로 포화된 CO₂ incubator에서 배양하였으며, cell이 flask에 약 80%쯤 증식하였을 때 0.25% trypsin으로 처리한 후 cell을 떼어내어 계대 배양하였다.

(2) 세포증식 억제효과측정

세포증식 억제효과측정은 Sulforhodamine B(SRB)법[1]을 이용하여 측정하였다. HeLa, MCF-7, HepG2, A549 cell은 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 세포수를 측정하여 96-well microtiter에 180μl, 4 × 10⁴cells/ml 농도가 되도록 계수하여 깔고 24시간 동안 37℃ 의 5% CO₂ incubator에서 안정화 시켰다.

각 시료(슈퍼자미버, 흑진주버, 큰눈자미버, 수원 425호, 추청버)는 농도를 환산하여 각각 0.1% DMSO에 녹여 1, 10, 50, 100, 500ppM의 최종농도가 되도록 배지에 농도별 20 μ l로 처리하였으며, 대조군은 멸균수를 0.1% DMSO로 하여 배지에 처리하였다. 샘플 처리된 각각의 cell들은 2틀간 37°C 의 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 50 μ l의 50% TCA(4°C)를 각각의 well에 첨가하여 세포들을 well 바닥에 고정시켰다. 1시간 동안 4°C에서 충분히 고정시키고, 고정이 끝난 후 증류수로 5회 이상 세척한다. 여기에 0.4% SRB용액 100 μ l를 가하여 상온에서 30분 동안 염색시킨 후 결합하지 않은 SRB염색액을 제거하기 위해 1% acetic acid로 5회 이상 세척한 하였다. 건조기에서 건조된 plate에 10mM Tris buffer 150 μ l로 SRB dye를 잘 녹여내어 540nm에서 microplate reader(Bio,Tek instrument Inc., U.S.A)로 흡광도 측정하였다.

다. 세포증식 억제 실험결과

(1) 안토시아닌 고함유 품종에 따른 세포증식 억제 실험 결과

(가) 폐암세포주(A-549)에 대한 세포증식 억제효과

폐암세포주인 A-549에 대한 추청버 추출물 및 안토시아닌 고함유 품종의 70%의 에탄올 추출물의 세포 생존율을 조사한 결과 공시된 세 품종 모두에서 농도 의존적으로 세포의 증식억제 효과가 나타났으며, 슈퍼자미버에서 세포 생존율이 50%이하로 세포 생존율이 가장 적게 나타나 세포증식의 억제효과가 가장 크게 나타났고, 그 다음으로는 추청버, 흑진주버 수준으로 조사되었다(표 12).

표 12. A-549 cell에 대한 싼 품종별 세포증식 억제 효과

A-549	Cell viability (%)				
	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm	500ppm
추청버	97.53	89.83	84.86	73.82	58.96
흑진주버	96.00	89.88	78.41	74.90	59.06
슈퍼자미버	89.16	81.67	61.00	57.10	46.57

(나) 간암세포주(HepG2)에 대한 세포증식 억제효과

Hepatocellular carcinoma cell line인 HepG2에 대한 추청버 추출물 및 안토시아닌 고함유 품종의 70%의 에탄올 추출물의 세포 생존율을 조사한 결과 공시된 세 품종 모두에서 농도 의존적으로 세포의 증식억제 효과가 나타났다. 특히, 슈퍼자미버에서 세포 생존율이 35%이하로 세

포증식의 억제효과가 가장 크게 나타났으며, 그 다음으로는 흑진주벼, 추청벼 수준으로 조사되었다(표 13).

표 13. HepG2 cell에 대한 쌀 품종별 세포증식 억제 효과

HepG2	Cell viability (%)				
	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm	500ppm
추청벼	86.87	83.51	86.44	89.14	73.00
흑진주벼	82.31	76.67	70.39	66.13	41.95
슈퍼자미벼	80.67	76.37	65.38	63.62	34.82

(다) 자궁암세포주(HeLa)에 대한 세포증식 억제효과

자궁경부 편평상세포 유래의 암세포주인 HeLa에 대한 추청벼 추출물 및 안토시아닌 고함유 품종의 70%의 에탄올 추출물의 세포 생존율을 조사한 결과 공시된 세 품종 모두에서 농도 의존적으로 세포의 증식억제 효과가 나타났으며, 특히 500ppm 농도에서 세 품종 모두 세포 생존율이 20%이하의 세포 생존율로 세포증식 억제효과가 큰것으로 조사되었다(표 14).

표 14. Hela cell에 대한 쌀 품종별 세포증식 억제 효과

Hela	Cell viability (%)				
	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm	500ppm
추청벼	94.16	88.13	86.70	86.63	13.99
흑진주벼	88.57	87.53	85.70	69.26	16.29
슈퍼자미벼	89.03	86.55	77.23	43.22	14.83

(라) 유방암세포주(MCF-7)에 대한 세포증식 억제효과

유방암에서 유래한 암세포주인 MCF-7에 대한 추청벼 추출물 및 안토시아닌 고함유 품종의 70%의 에탄올 추출물의 세포 생존율을 조사한 결과 공시된 세 품종 모두에서 세포의 증식억제 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다(표 15).

표 15. MCF-7 cell에 대한 쌀 품종별 세포증식 억제 효과

MCF-7	Cell viability (%)				
	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm	500ppm
추청벼	100	100	100	100	100
흑진주벼	100	100	100	100	100
슈퍼자미벼	100	100	100	100	94

(2) 추청벼 및 안토시아닌 고함유 품종에 따른 열수추출 및 70% 에틸알코올 추출 분획의 세포증식 억제 실험결과

(가) 폐암세포주(A-549)에 대한 세포증식 억제효과

추청벼 및 안토시아닌 고함유 품종인 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼를 모두 열수추출한 추출물, 70%의 에탄올 추출물한 추출물 그리고 각각의 모든 품종에 열을 가해 전분을 호화시킨 후 열수추출한 추출물, 70%의 에탄올로 추출한 추출물에서 폐암세포주인 A-549에 대한 세포 생존율을 조사한 결과 모든 추출물에서 세포증식 억제효과가 보이지 않았으나, 열수추출한 추출물에서만 추청벼, 흑진주벼, 큰눈자미벼에서 세포 생존율 90% 이상으로 미미한 세포증식 억제효과를 보였고, 슈퍼자미벼는 86.7%, 수원 425호가 78.9%로 가장 세포증식 억제효과가 나타났다(표 16).

표 16. A-549 cell에 대한 쌀 품종별 추출물에 따른 세포증식 억제 효과

농도 500ppm	Cell viability (%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
열수추출	96.6±5.5	96.6±3.2	78.9±4.3	91.2±8.0	86.7±7.7
호화전분 열수추출	100	100	100	100	100
에틸알코올추출	100	100	100	100	100
호화전분 에틸알코올추출	100	100	100	100	100

(나) 간암세포주(HepG2)에 대한 세포증식 억제효과

Hepatocellular carcinoma cell line인 HepG2에 대한 세포 생존율을 조사한 결과 열수추출물에서는 모든 품종에서 세포 생존율에 대한 효과가 나타나지 않았으며, 70%의 에탄올로 추출한 흑진주벼 추출물에서 세포 생존율이 80%로 다른 품종보다 가장 큰 세포증식 억제효과를 보였다. 호화시킨 전분의 에틸알코올 추출물에서는 모든 품종에서 세포의 증식억제 효과가 나타났으며, 특히 큰눈자미벼를 호화시킨 전분의 에틸알코올 추출물에서 45.3%의 세포 생존율로 다른 품종보다 가장 큰 세포증식 억제효과가 나타나는 것으로 조사되었다(표 17).

표 17. HepG2 cell에 대한 쌀 품종별 추출물에 따른 세포증식 억제 효과

농도 500ppm	Cell viability (%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
열수추출	100	100	99.3±4.6	99.7±4.8	100
호화전분 열수추출	100	100	100	100	100
에틸알코올추출	99.4±6.1	80.8±2.6	90.1±2.1	89.8±3.8	87.8±1.75
호화전분 에틸알코올추출	70.8±11.09	78.5±8.1	83.5±3.5	45.3±5.2	85.5±8.1

(다) 자궁암세포주(HeLa)에 대한 세포증식 억제효과

추청벼 및 안토시아닌 고함유 품종인 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼를 모두 열수추출물, 70%의 에탄올 추출물 그리고 각각의 모든 품종에 전분을 호화시킨 열수추출물, 70%의 에탄올로 추출한 추출물에서 자궁경부 편평상세포 유래의 암세포주인 HeLa에 대한 세포 생존율을 조사한 결과 열수추출한 추출물에서는 모든 품종에서 세포 생존율에 대한 효과가 나타나지 않는 것으로 조사되었다(표 18).

표 18. HeLa cell에 대한 쌀 품종별 추출물에 따른 세포증식 억제 효과

농도 500ppm	Cell viability (%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
열수추출	100	100	100	100	100
호화전분 열수추출	100	100	100	100	100

에틸알코올추출	100	100	100	100	100
호화전분 에틸알코올추출	100	100	100	100	100

(라) 유방암세포주(MCF-7)에 대한 세포증식 억제효과

추청벼 및 안토시아닌 고함유 품종인 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼를 모두 열수추출한 추출물, 70%의 에탄올 추출물한 추출물 그리고 각각의 모든 품종에 열을 가해 전분을 호화시킨 후 열수추출한 추출물, 70%의 에탄올로 추출한 추출물에서 유방암에서 유래한 암세포주인 MCF-7에 대한 세포 생존율을 조사한 결과 열수추출물에서만 미미한 세포증식 억제효과를 보였으며, 모든 품종에서 세포 생존율에 대한 효과가 나타나지 않는 것으로 조사되었다(표 19).

표 19. MCF-7 cell에 대한 쌀 품종별 추출물에 따른 세포증식 억제 효과

농도 500ppm	Cell viability (%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
열수추출	98.9±3.2	98.9±2.2	95.1±2.4	90.4±3.6	97.3±2.2
호화전분 열수추출	100	100	100	100	100
에틸알코올추출	100	99.6±2.9	99.1±0.9	100	100
호화전분 에틸알코올추출	100	100	100	100	100

4. 안토시아닌 고함유 품종의 여성호르몬 유사효과 검정(E-screen assay)

가. 실험재료

(1) 재료

안토시아닌 고함유 품종의 세포독성 평가는 2009년도 충청남도 연기군 시험포장에서 재배된 슈퍼자미벼와 동시 재배된 흑진주벼 및 추청벼를 통해 수행하였다. 공시된 검체는 곱게 마쇄한 후 상온에서 70% 에탄올을 이용하여 3시간씩 5회에 걸쳐 활성성분을 추출하여 충분히 감압 농축한 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

쌀의 전분을 호화시키기 위해 품종별로 각각의 쌀 30g을 200ml 비이커에 담고 증류수로 3번 수세한 다음 쌀의 1.5배의 증류수를 넣고 실온(25°C)에서 30분간 침지시키고, 알루미늄 호일로 뚜껑을 한 다음 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 호화된 전분은 증류수와 70% 에탄올을 이용하여 3시간씩 3회 열수추출하여 충분히 감압 농축한 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

(2) 균주 및 세포

MCF-7 (Human breast cancer cell line) 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로 분양받아 사용하였다.

나. 여성호르몬 유사효과 검정(E-screen assay)

(1) 균주배양

MCF-7세포는 10% FBS가 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 배지를 사용하여, 37°C, CO₂(5%) incubator배양하였다. 균주 배양을 위해 쓰이는 FBS를 charcoal-dextran(10%)으로 처리하여 FBS내에 함유되어있는 steroid를 제거한 후 제조된 charcoal-dextran stripped FBS(CD-FBS)를 가지고 배지제조에 사용하였다. 시료처리 전 모든 estrogenic source를 제거하기 위해서 2일 동안 10% charcoal-dextran stripped FBS(CD-FBS)가 함유된 phenol red free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에서 배양하여 사용하였다.

(2) 식물 여성 호르몬상 효과

MCF-7 cell을 이용한 E-screen assay는 Perez 등의 실험방법에 의해 실험하였다(2,3). 계대중인 세포를 0.25% trypsin-EDTA 를 처리하여 탈리시킨 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 각 well 당 세포수를 측정하여 96-well microtiter에 180 μ l, 5 \times 10³cells/well이 되도록 계수하여 분주한 후 37°C 의 5% CO₂ 가스로 포화된 CO₂ incubator에서 안정화 시켰다. 24시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 phenol red가 없는 DMEM으로 2번 씻고, 10% CD-FBS가 함유되

어 있는 phenol red가 없는 DMEM으로 시험용액을 처치하였다. 시료는 각 시료(슈퍼자미버, 흑진주버, 큰눈자미버, 수원 425호)는 농도를 환산하여 각각 0.1% DMSO에 녹여 0.1, 1, 10, 50, 100ppM의 최종농도가 되도록 배지에 농도별 20 μ l로 처리하였으며, 대조군은 멸균수를 0.1% DMSO로 하여 배지에 처리하였다. 에스트로겐 효과를 평가하기 위해 양성대조군인 17 β -estradiol과 상대비교를 하였으며, 17 β -estradiol에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도는 10pM을 기준으로 하였다. 농도별로 6일간 배양된 세포는 SRB방법(1)에 의해 세포성장을 측정하였다.

(3) Western blot

MCF-7 cell을 이용하여 계대중인 세포를 0.25% trypsin-EDTA 를 처리하여 탈리시킨 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 각 well 당 세포수를 측정하여 western blot을 위한 10ml dish에 2 \times 10⁵cells/well이 되도록 계수하여 분주한 후 37°C 의 5% CO₂ 가스로 포화된 CO₂ incubator에서 24시간 안정화 시켰다. 시료는 각 시료(슈퍼자미버, 흑진주버, 큰눈자미버, 수원 425호)는 농도를 환산하여 각각 0.1% DMSO에 녹여 0.1, 1, 10, 50, 100ppM의 최종농도가 되도록 배지에 농도별 200 μ l로 처리하였으며, 대조군은 멸균수를 0.1% DMSO로 하여 배지에 처리하였다. 에스트로겐 효과를 평가하기 위해 양성대조군인 17 β -estradiol과 상대비교를 하였으며, 17 β -estradiol에 의해 최대 세포증식을 나타내는 최소 농도는 10pM을 기준으로 하였다. 농도별로 2일간 배양된 세포는 PBS로 두 번 씻어준 후 lysis buffer (20mM HEES, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet p40, 10% glycerol, 60mM octyl- β -glucoside, 2.5mM nitrophenyllphosphate, 0.7 μ g/ml pepstatin, and a protease-inhibitor tablet)를 첨가하여 세포를 용해시켜서 e-tube로 옮겨 담았다. 1,300 rpm으로 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 3X sample buffer와 섞어 100°C에서 5분간 단백질변성과정을 진행하였다. 이렇게 얻은 단백질을 시료를 10%의 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide:bisacrylamid = 29:1)을 사용하여 120V에서 1시간 30분 동안 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 진행한 후 300mA로 1시간 30분 동안 PVDF 멤브레인(Schleicher & Schuell, BA85)로 transfer 시켰다. TBS-T(10mM Tris-HCL, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 5% BSA을 만들어 한 시간 동안 blocking 시킨 다음, 각각의 특이적인 항체와 한 시간 동안 반응시켰다(1차 항체 반응). 그리고 HRP(horseadish peroxidase)가 붙은 단일클론 항체 또는 다클론 항체로 한 시간 동안 반응시킨 다음(2차 항체 반응) 비특이적으로 남아있는 항체를 TBS-T로 씻어 제거해주고 membrane에 ECL detection kit(Amersham Pharmacia Biotech)의 detection reagent A(Enhanced Luminol reagent)와 B(Oxidizing reagent)를 1:1의 비율로 섞은 혼합액을 뿌려주었다. Membrane을 자동 필름 현상기(ChemiDOC XRS+, Bio Rad..)를 이용하여 밴드 농도를 관찰하였다.

(4) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

RBL-2H3 세포 (2.5 \times 10⁵cells)에 100ng/ml anti-DNP-IgE를 넣고 12시간 자극된 cell을 1,200rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거한 후 PBS로 2회 wash하고 500rpm에서 5분간

원심분리하여 PBS를 완전히 제거한다. e.p tube에 담겨진 cell을 TRIzol reagent(Invitrogen Co., cat. 15596-026)를 1ml 첨가하고 상온에서 5분간 두어 cell이 완전히 해리되게 한 후 chloroform을 200 μ l 넣고 15초간 세차게 섞은 후 상온에서 2~3분간 방치하였다. e.p tube를 4°C, 12,000 \times g, 15분간 원심분리하여 분리된 윗부분의 투명 층을 세로운 e.p tube에 담고 isopropyl alcohol 500 μ l를 넣고 섞어 상온에서 10분간 정치하였다. 4°C, 12,000 \times g, 10분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 남은 용액까지 완전히 제거 한 후 남아있는 RNA pellet에 75% ethanol 1ml을 넣고 잘 섞은 다음 4°C, 7,500 \times g, 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거 후 남아있던 75% ethanol을 상온에서 잘 건조시킨다. RNase free water를 RNA pellet의 양에 맞게 30~40 μ l 정도 넣어 RNA를 용해시킨 후 55~60°C에서 10분간 incubation하였다. 이렇게 추출된 RNA를 1.5% agarose gel에서 RNA band를 확인하고 spectrophotometer를 사용하여 RNA 양을 측정하여, RT-PCR에 사용하였다.

(5) RT-PCR

RT과정은 Maxime RT premix kit에 준하여 수행하였다. 준비된 total RNA와 Forward primer 와 reverse primer를 RT-PCR kit에 넣고 최종 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC D.W를 가 하였다. Reverse transcription reaction은 45°C에서 30min간 반응시킨 다음 94°C에서 5분간 RNA를 denaturation하여 cDNA를 만든 후 94°C에서 1분간 denaturation 시키고, 50~53°C에서 45초간 annealing 시킨 다음, 72°C에서 1분간 extension 시키는 cycle을 25회 반복 한 뒤에, 마지막 extension은 72°C에서 7분간 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l 씩 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (표 20).

표 20. Primer sequence

Cytokine		Sequence(rat)	Length(bp)
C-fos	Forward	5'-AGAAAAGGAGAATCCGAAGGGAAA-3'	420
	Reverse	5'-ATGATGCTGGGACAGGAAGTC-3'	
pS2	Forward	5'-TTCTATCCTAATACCATCGACG-3'	212
	Reverse	5'-TTTGAGTAGTCAAAGTCAGAGC-3'	
β -actin	Forward	5'-CCTCACCCCTGAAGTACCCCA-3'	542
	Reverse	5'-CGTCAGGCAGCTCGTAGCTC-3'	

다. 실험결과

(1) 유색미 품종의 estrogen 유사효과 검정

(가) 에탄올 추출물의 estrogen 유사효과

추청벼, 흑진주벼, 슈퍼자미벼의 에탄올 추출물층을 MCF-7 cell에 대한 1ppm부터 500ppm까지 투여하여 증식효과를 측정하였다. 아래 데이터는 대조군을 100%로 하였을 때 상대증식비율이다. 추청벼는 100ppm 까지 농도별로 점차 증가하다가 500ppm에서 대조군대비 세포의 증식이 억제되었음을 확인할 수 있었고, 흑진주벼와 슈퍼자미벼는 농도가 증가됨에 따라 점차 대조군 대비 세포증식의 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(표 21).

표 21. 안토시아닌 고함유 품종별 에스트로젠 활성

MCF-7	상대증식비율(%)				
	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm	500ppm
추청벼	83.9±3.8	89.6±3.8	88.3±6.8	105.7±10.2	64.7±7.3
흑진주벼	81.4±5.3	81.6±3.7	82.4±4.0	78.1±4.2	43.1±3.1
슈퍼자미벼	77.5±3.8	80.6±4.7	76.8±3.5	43.4±4.2	36.0±4.3

(나) 호화가공 후 추출물의 estrogen 유사효과

추청벼 및 안토시아닌 고함유 품종인 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼를 모두 열수추출한 추출물과 각각의 모든 품종에 열을 가해 전분을 호화시킨 후 열수추출한 추출물을 MCF-7 cell에 투여하여 증식효과를 측정하였다. 추청벼와 흑진주벼, 슈퍼자미벼는 열수추출한 추출물에서 세포증식이 우세함을 보였고, 수원 425호는 호화시킨 호화전분을 열수추출한 추출물에서 세포증식이 증가하는 경향을 나타내었다. 큰눈자미벼는 열수추출물과 호화시킨 추출물은 차이가 나타나지 않는 것으로 조사되었고(표 22), 품종별 70%의 에탄올 추출물과 호화시킨 후 70%의 에탄올로 추출한 추출물 간에 차이는 또한 거의 없었으며, 모든 품종에서 약 70% 상대증식비율을 나타내는 것으로 조사되었다(표 23).

표 22. 열수추출물의 안토시아닌 고함유 품종별 에스트로겐 활성

농도 500ppm	상대증식비율(%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
열수추출	72.1±4.4	74.6±3.1	42.4±2.8	70.7±4.4	71.8±1.9
호화전분 열수추출	67.5±2.5	65.6±2.4	66.7±1.4	70.5±0.1	68.2±2.8

표 23. 70% 에틸알코올 추출물의 안토시아닌 고함유 품종별 에스트로겐 활성

농도 500ppm	상대증식비율(%)				
	추청벼	흑진주벼	수원425호	큰눈자미벼	슈퍼자미벼
에틸알코올추출	62.7±1.7	67.4±1.2	64.1±1.8	64.2±0.6	71.3±1.6
호화전분 에틸알코올추출	68.4±6.0	70.6±8.8	65.5±8.8	70.5±5.7	81.3±7.4

(3) 안토시아닌 고함유 품종별 MCF-7에 대한 증식효과

(가) 추청벼, 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼의 에탄올 추출물층을 MCF-7 cell에 대한 1ppm부터 500ppm까지 투여하여 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간, 160시간에 따른 MCF-7 cell의 증식효과를 측정하였다. 추청벼, 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼의 추출물의 농도에 따른 estrogenicity를 다음 Table 10~13에 나타내었다. 아래 데이터는 대조군을 100%로 하였을 때 MCF-7 cell의 상대증식비율이다.

① 추청벼의 MCF-7에 대한 증식효과

추청벼를 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 모든 농도에서 48시간 까지는 셀의 증식효과가 크게 나타나지 않았으나, 72시간 이후부터 14% 이상 증가

하기 시작하여, 최대 증식 효과 시간인 144시간에는 60% 이상 증식시키는 효과를 나타내었다. 또한 모두 농도 의존적으로 증식효과가 나타나는 것으로 조사되었으며, 100ppm에서는 78.4%의 증식효과가 관찰되었다(표 24).

표 24. 추청벼의 시간대별 에스트로겐 활성

추청벼	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	3.2±3.7	5.0±5.0	6.8±4.9	4.3±2.4	4.6±1.5
48시간(2일)	4.4±1.3	5.2±1.7	2.8±0.7	3.2±1.7	2.4±1.9
72시간(3일)	20.7±2.7	17.5±2.3	17.8±1.5	16.2±3.0	14.3±1.9
96시간(4일)	41.8±6.1	40.5±1.9	38.2±1.8	42.7±6.6	37.4±4.2
120시간(5일)	42.2±3.5	50.4±1.3	45.1±6.2	54.6±3.6	48.1±4.2
144시간(6일)	65.5±4.2	66.9±1.7	68.3±0.6	73.4±3.5	78.4±3.5

② 흑진주벼의 MCF-7에 대한 증식효과

흑진주벼를 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 모든 농도에서 48시간까지는 셀의 증식효과가 크게 나타나지 않았으나, 50ppm, 100ppm에서는 48시간부터 14%이상의 셀 증식효과가 나타나기 시작하였다. 72시간 이후부터 14% 이상 증가하기 시작하여, 최대 증식 효과 시간인 144시간에는 60% 이상 증식시키는 효과를 나타내었다. 50ppm까지는 농도 의존적으로 증식효과가 나타나 것으로 조사되었으나, 100ppm에서는 65.8%로 50ppm보다 낮은 증식효과를 보여주었다(표 25).

표 25. 흑진주벼의 시간대별 에스트로겐 활성

흑진주벼	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	1.4±1.1	3.1±1.8	5.8±2.4	13.1±0.9	9.4±2.7
48시간(2일)	6.2±1.1	7.9±1.3	10.5±2.3	17.8±0.9	14.2±5.7
72시간(3일)	15.9±5.0	13.0±1.6	20.5±4.3	22.4±1.2	18.0±4.2
96시간(4일)	41.5±3.8	38.6±1.2	46.1±2.3	47.9±2.2	43.6±5.6
120시간(5일)	54.4±5.0	51.4±1.6	58.9±4.3	60.8±3.	56.4±3.6
144시간(6일)	63.7±4.9	60.8±2.3	68.3±4.2	70.2±2.4	65.8±5.7

(3) 수원 425호의 MCF-7에 대한 증식효과

수원 425호를 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 모든 농도에서 48시간까지는 셀의 증식효과가 전혀 나타나지 않았으나, 10ppm, 50ppm에서는 미미한 셀 증식 효과를 보여주었다. 72시간 이후부터 셀증식효과가 나타나기 시작하여, 최대 증식 효과 시간인 144시간에는 60% 이상 증식시키는 효과를 나타내었다. 50ppm까지는 농도 의존적으로 증식효과가 나타나 것으로 조사되었으나, 100ppm에서는 66.7%로 셀 증식효과가 50ppm의 72.%보다 증가되지 않는 것으로 조사되었다(표 26).

표 26. 수원 425호의 시간대별 에스트로겐 활성

수원 425호	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	0	0	0.8±1.7	0.9±2.9	0
48시간(2일)	0	0	2.6±0.8	2.4±2.1	0

72시간(3일)	10.4±0.8	6.3±2.8	17.9±1.7	17.9±2.9	12.9±1.4
96시간(4일)	42.9±0.5	38.7±2.8	50.4±1.2	51.2±2.3	45.4±1.8
120시간(5일)	53.1±0.8	48.9±3.1	60.7±3.8	61.4±4.7	55.6±2.4
144시간(6일)	64.3±2.4	60.1±2.3	71.7±1.9	72.8±4.9	66.7±1.3

(4) 큰눈자미벼의 MCF-7에 대한 증식효과

큰눈자미벼를 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 앞의 다른 품종보다 48시간에서 셀 증식효과가 30% 이상 높게 나타났으며, 0.1ppm, 1ppm, 10ppm의 농도에서 144시간 이후에 셀 증식효과가 90%이상 나타나는 것으로 조사되었다. 그러나 144시간 이후 50ppm 77.9%, 100ppm 53.3%으로 셀 증식효과가 둔화되는 것으로 나타났다(표 27).

표 27. 큰눈자미의 시간대별 에스트로젠 활성화

큰눈자미	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	8.1±4.0	7.5±1.6	10.7±2.3	11.5±2.4	5.3±3.4
48시간(2일)	32.4±9.0	30.6±4.4	31.5±3.9	33.6±2.1	14.2±7.2
72시간(3일)	41.8±0.2	46.7±2.3	50.1±1.8	43.2±2.8	19.5±1.7
96시간(4일)	40.0±2.1	49.0±1.9	46.7±1.0	32.8±4.4	10.7±4.8
120시간(5일)	63.8±2.8	72.4±1.7	73.5±2.2	58.3±1.6	25.3±0.1
144시간(6일)	94.1±2.5	97.5±4.2	99.8±7.3	77.9±1.3	53.3±2.1

(5) 슈퍼자미벼의 MCF-7에 대한 증식효과

슈퍼자미벼를 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 앞의 다른 품종보다 48시간에서 셀 증식효과가 6% 미만으로 낮게 나타났으며, 0.1ppm, 1ppm, 10ppm의 농도에서 144시간 이후에 셀 증식효과가 66%이상 나타나는 것으로 조사되었다. 그러나 144시간 이후 50ppm의 농도에서는 52.4%로 나타났고, 100ppm의 농도에서는 96시간까지는 아무런 효과를 나타내지 않았으며, 120시간에 9%의 효과를 144시간에는 5%로 셀 증식효과가 거의 나타나지 않는 것으로 조사되었다(표 28).

표 28. 슈퍼자미벼의 시간대별 에스트로젠 활성

슈퍼자미벼	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	3.2±0.5	0.6±4.5	0	0.73±2.2	0
48시간(2일)	4.5±0.7	4.2±2.1	6.0±2.4	1.8±3.3	0
72시간(3일)	13.5±3.4	17.5±2.5	15.8±1.8	9.8±0.7	0
96시간(4일)	39.7±2.7	45.0±0.9	43.5±1.59	33.5±0.7	0
120시간(5일)	50.4±3.7	44.6±4.1	45.4±0.7	35.0±0.6	8.7±2.1
144시간(6일)	66.1±3.1	68.1±4.3	66.7±0.4	52.4±1.6	5.0±0.7

나) 에스트로젠 효과를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 17-β estradiol과 과 상대비교를 하였으며, 이 실험방법은 17-β estradiol에 의해 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질에 의한 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비를 구하여 비교하는 방법이다. 본 실험에서는 최대증식 효과를 나타내는 에스트라디올(E2) 10pM농도로 처리한 대조군 대비 세포증식을 100%로 하였을 때, 각 쌀 품종별 세포증식에 대한 정도를 상대에스트로젠 활성(REA relative estrogenic activity) %로 평가 비교하였다. 추청벼, 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼의 추출물의 농도에 따른 estrogenicity를 다음 표 29 ~ 33에 나타내었다.

(1) 추청벼의 에스트로겐 활성

추청벼의 에스트로겐 활성은 0.1ppm에서 86.3%, 100ppm에서 93.1%로 모든 농도에서 농도 의 존적으로 에스트로겐의 활성이 85% 이상 높게 나타나는 것으로 효과가 관찰되었다(표 29).

표 29. 추청벼의 에스트로겐 활성

추청벼	REA(%)					
	에스트라디올 (10pM)	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA (%)평균	100	86.3	87.1	87.8	90.5	93.1
S.D	4.31	2.18	0.90	0.34	1.85	1.83

(2) 흑진주벼의 에스트로겐 활성

흑진주벼의 에스트로겐 활성은 0.1ppm에서 85.5%, 100ppm에서 86.5%로 모든 농도에서에스트로겐의 활성이 83% 이상 높게 나타나는 것으로 효과가 관찰되었고, 50ppm의 농도에서 88.8%로 효과가 가장 높은 것으로 조사되었다(표 30).

표 30. 흑진주벼의 에스트로겐 활성

흑진주벼	REA(%)					
	에스트라디올 (10pM)	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA(%) 평균	100	85.5	83.9	87.8	88.8	86.5
S.D	4.31	2.62	0.84	2.23	1.17	2.97

(3) 수원 425호의 에스트로겐 활성

수원 425호의 에스트로겐 활성은 0.1ppm에서 85.7%, 100ppm에서 87.5%로 모든 농도에서 에스트로겐의 활성이 83% 이상 높게 나타나는 것으로 효과가 관찰되었고, 10ppm의 농도에서 89.6%가 가장 효과가 높게 조사되었다(표 31).

표 31. 수원 425호의 에스트로겐 활성

수원425호	REA(%)					
	에스트라디올 (10pM)	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA(%) 평균	100	85.7	83.5	89.6	87.9	87.5
S.D	4.31	0.44	1.46	0.89	1.54	0.73

(4) 큰눈자미벼의 에스트로겐 활성

큰눈자미벼의 에스트로겐 활성은 0.1ppm 102.8%, 1ppm 106.1%, 10ppm 104.3%로 100%이상의 높은 활성을 나타냈으며, 100ppm의 농도에서는 79.9%로 에스트로겐의 활성이 가장 낮게 조사되었다(표 32).

표 32. 큰눈자미벼의 에스트로겐 활성

큰눈 자미벼	REA(%)					
	에스트라디올 (10pM)	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA(%) 평균	100	102.8	106.1	104.3	92.8	79.9
S.D	4.31	1.34	1.30	3.85	0.68	1.09

(5) 슈퍼자미벼의 에스트로겐 활성

슈퍼자미벼의 에스트로겐 활성은 0.1ppm 86.7%, 1ppm 87.7%, 10ppm 87%의 활성을 나타냈으며, 100ppm의 농도에서는 54.8%로 에스트로겐의 활성이 가장 낮게 조사되었다(표 33).

표 33. 슈퍼자미벼의 에스트로겐 활성

슈퍼 자미벼	REA(%)					
	에스트라디올 (10pM)	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA(%) 평균	100	86.7	87.7	87.0	79.5	54.8
S.D	4.31	1.76	2.23	0.25	0.83	0.38

다) Western blot 결과

안토시아닌 고 함유 품종의 에스트로겐에 미치는 영향을 단백질 수준에서 조사하기 위하여 MCF-7 세포주에 쌀 품종별로 시료를 조사하고 24시간 배양한 후 세포 내에 에스트로겐 활성화와 관련된 단백질을 확인하였다. 에스트로겐에 의해서 PR은 합성이 유도되었고, 반대로 ER- α 는 억제되었으며, 공시재료의 70% 에탄올 추출물을 처리한 결과 모든 품종에서 에스트로겐과 유사한 결과를 확인하였다(그림 36~40).

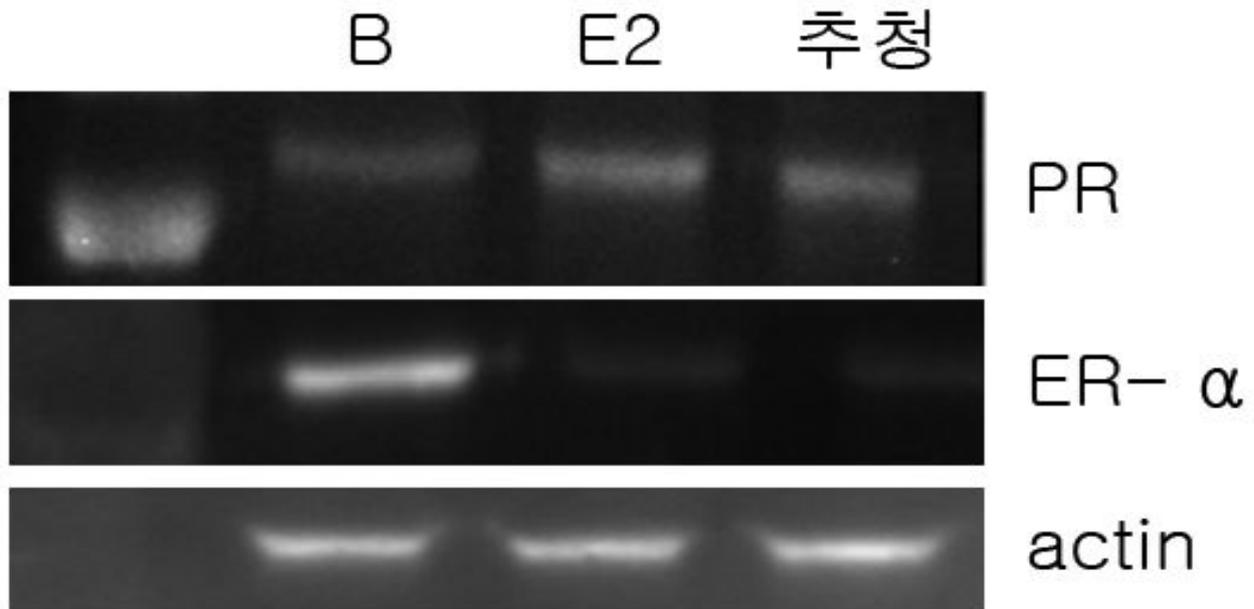


그림 36. 추청벼의 MCF-7 cells에서 PR과 ER- α 단백질 발현에 대한 영향.

* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ , 추청:추청벼 50ppm

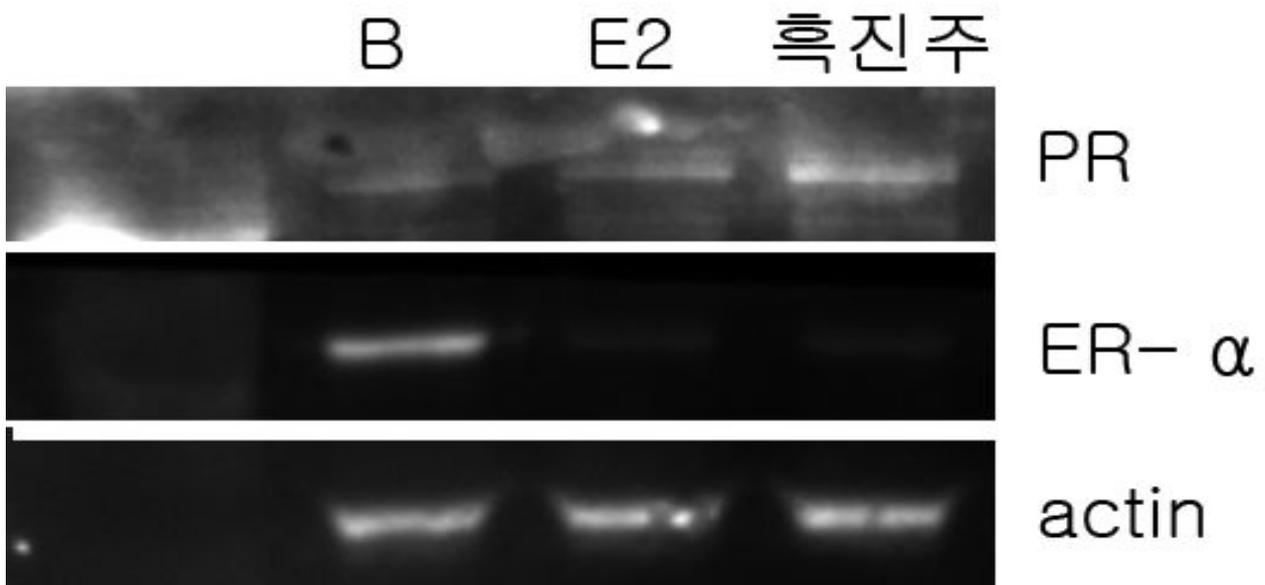


그림 37. 흑진주의 MCF-7 cells에서 PR과 ER- α 단백질 발현에 대한 영향.

* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ , 흑진주:흑진주벼 50ppm

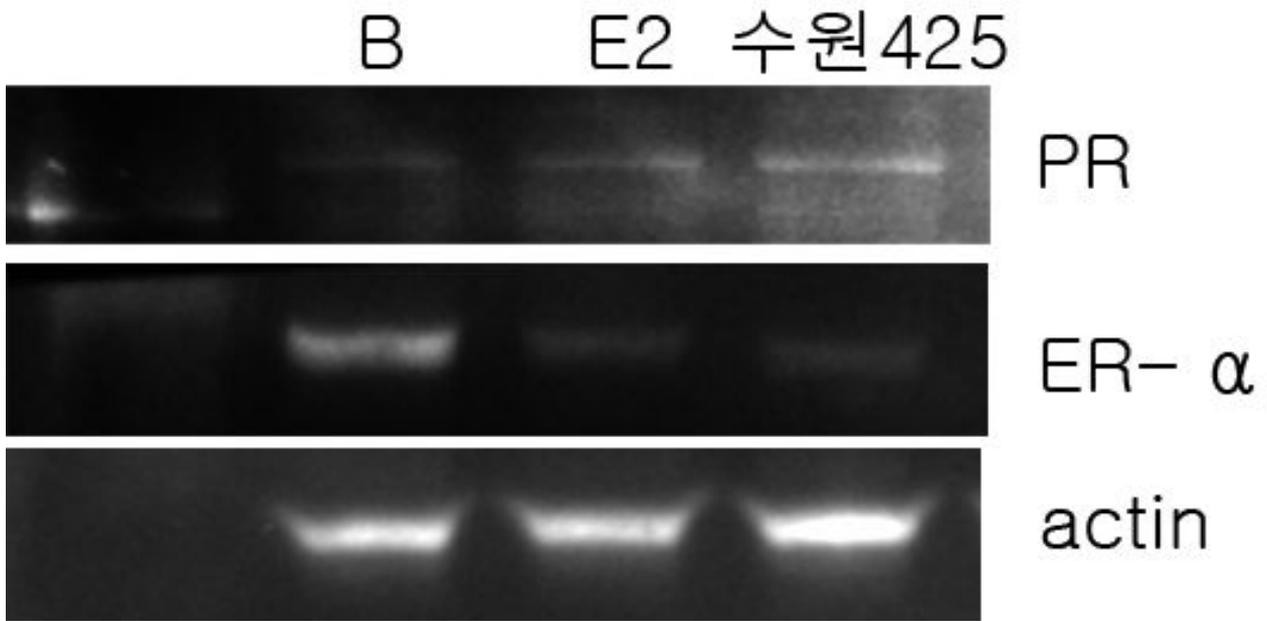


그림 38. 수원 425호의 MCF-7 cells에서 PR과 ER-α 단백질 발현에 대한 영향.
 * B:control, E2:17β-estradiol 10pμ, 수원425:수원425호 50ppm

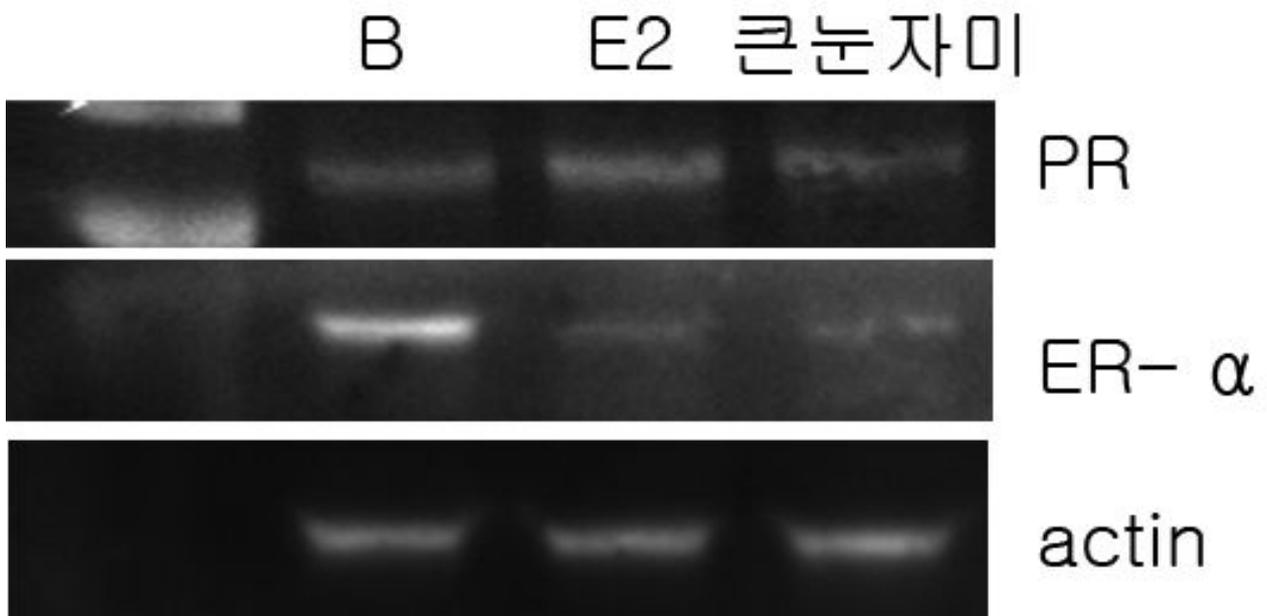


그림 39. 큰눈자미벼의 MCF-7 cells에서 PR과 ER-α 단백질 발현에 대한 영향.
 * B:control, E2:17β-estradiol 10pμ, 큰눈자미:큰눈자미벼 50ppm

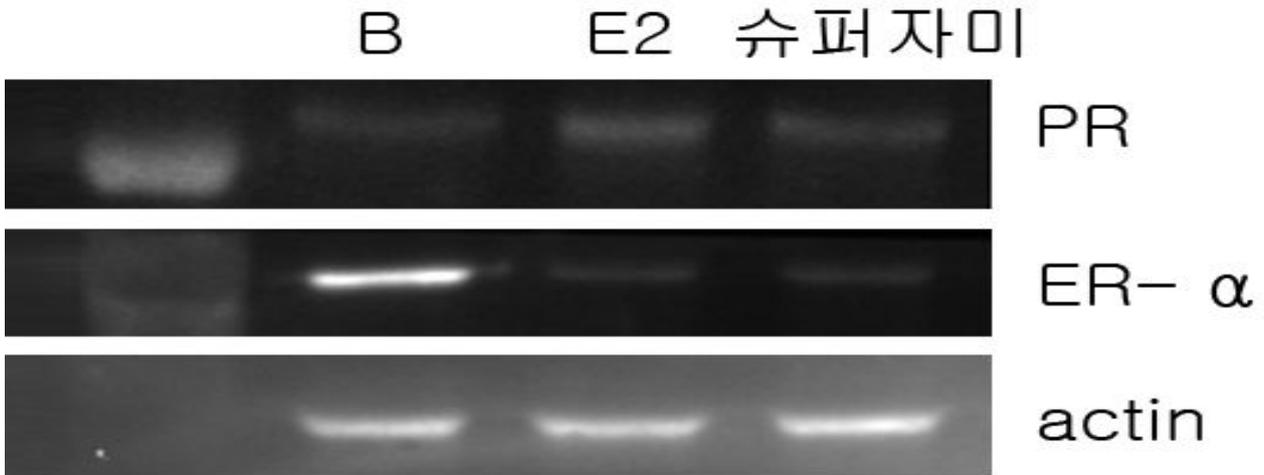


그림 40. 슈퍼자미벼의 MCF-7 cells에서 PR과 ER- α 단백질 발현에 대한 영향.

* B:control, E2:17 β -estradiol 10p μ , 슈퍼자미:슈퍼자미벼 50ppm

라) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)결과

안토시아닌 고함유 품종이 에스트로겐에 미치는 영향을 RNA 전사단계에서 조사해 보고자, C-fos, pS-2와 같은 MCF-7 cells의 에스트로겐 효과를 Semi-quantitative RT-PCR 방법으로 비교 검정하였다. cytokine 중 C-fos, pS-2는 에스트로겐의 activation에 관여 한다고 알려져 있으며, 실험에 사용된 모든 시료는 농도별(1, 5, 10, 50ppm)로 처리하였으며, 에스트로겐의 효과를 증대시켜주는 대조군으로는 17 β -estradiol을 10pM로 사용하였다.

(1) 추청벼의 RT-PCR 결과

추청벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조군 lane B와 비교해 보았을 때, C-fos, pS-2 증가시키는 것으로 나타났으며, 대조군인 17 β -estradiol(lane E2)보다는 증가되지 않았으나 비슷한 증가율을 보이는 것으로 나타났다(그림 41).

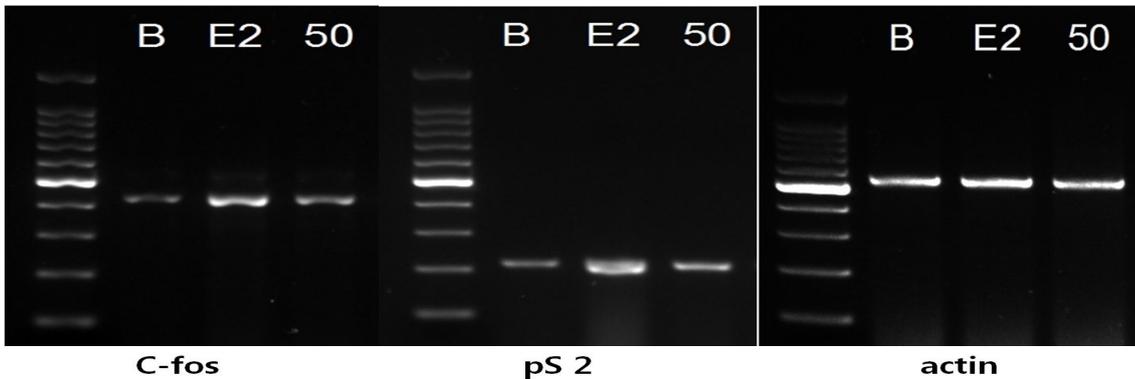


그림 41. 추청벼의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향

* B:control, E2:17 β -estradiol 10p μ , 추청:추청벼 50ppm

(2) 흑진주벼의 RT-PCR 결과

흑진주벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane B와 비교해 보았을 때, 에스트로젠을 증가시키는 cytokine C-fos, pS-2 조금 증가시키는 것으로 나타났으나, 대조군인 17 β -estradiol(lane E2)과 비교해 보면 그리 크게 증가시키지는 않는 것으로 나타났다(그림 42).

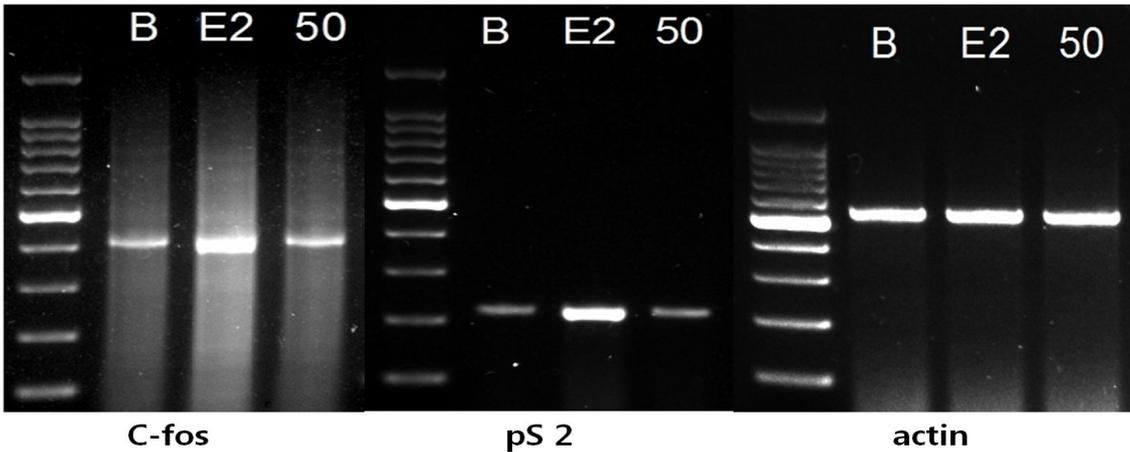


그림 42. 흑진주벼의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향
* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ M, 50:흑진주벼 50ppm

(3) 수원 245호의 RT-PCR 결과

수원 245호의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane B와 비교해 보았을 때, 에스트로젠을 증가시키는 cytokine C-fos, pS-2 조금 증가시키는 것으로 나타났으나, 대조군인 17 β -estradiol(lane E2)과 비교해 보면 그리 크게 증가시키지는 않는 것으로 나타났다(그림 43).

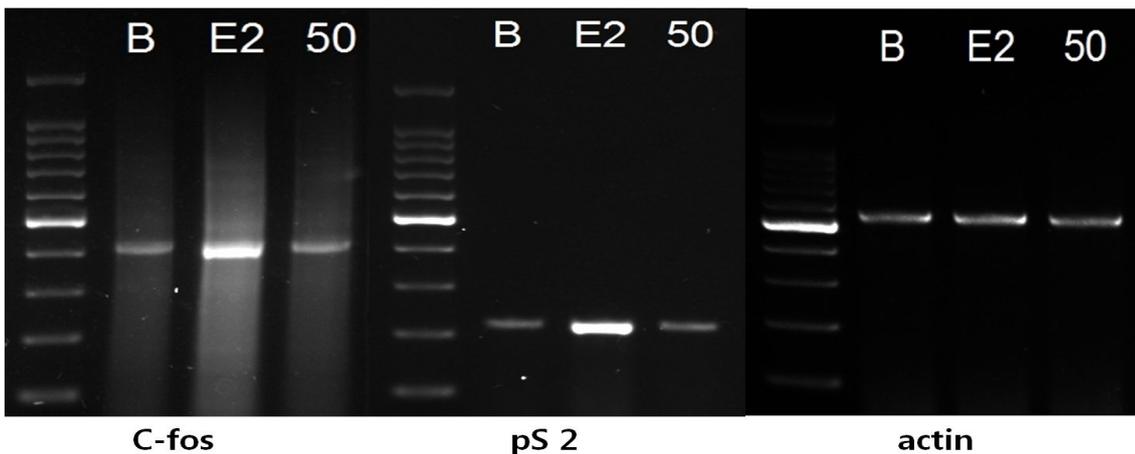


그림 43. 수원245호의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향
* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ M, 50:수원245호 50ppm

(4) 큰눈자미벼의 RT-PCR 결과

큰눈자미벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane B와 비교해 보았을 때, 에스트로젠을 증가시키는 cytokine C-fos, pS-2 조금 증가시키는 것으로 나타났으며, 대조군인 17 β -estradiol(lane E2)과 비교해 보면 비슷하게 증가하는 것으로 나타났다(그림 44).

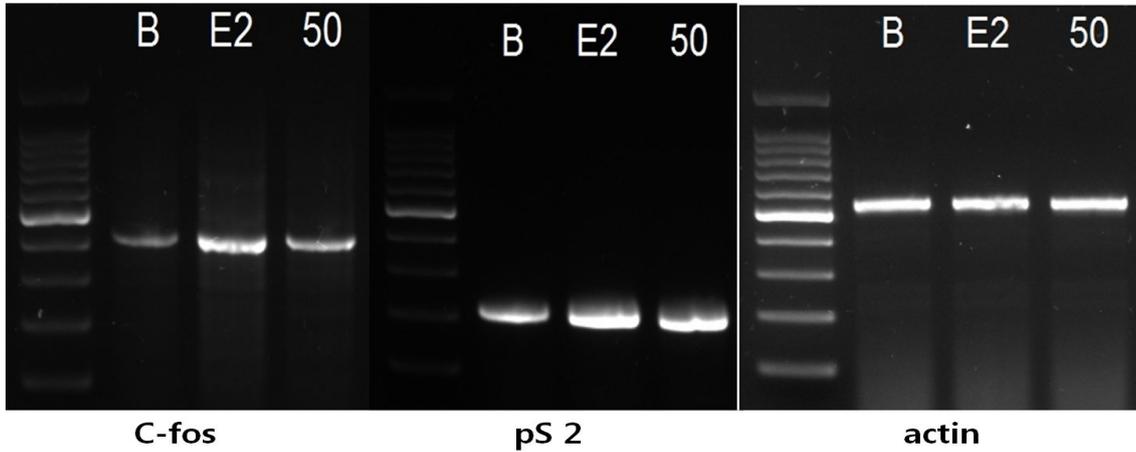


그림 44. 큰눈자미벼의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향
* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ , 50:큰눈자미벼 50ppm

(5) 슈퍼자미벼의 RT-PCR 결과

슈퍼자미벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane B 와 비교해 보았을 때, 에스트로젠을 증가시키는 cytokine C-fos, pS-2 조금 증가시키는 것으로 나타났으나, 대조군인 17 β -estradiol(lane E2)과 비교해 보면 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다(그림 45).

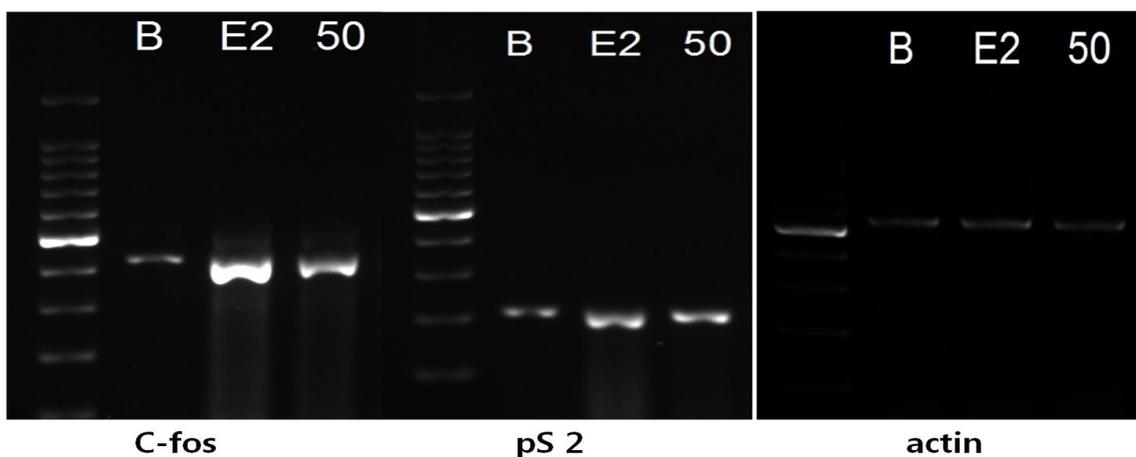


그림 45. 슈퍼자미벼의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향
* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ , 50:슈퍼자미벼 50ppm

5. 안토시아닌 고함유 품종의 항알레르기 효과

가. 실험재료

(1) 재료

안토시아닌 고함유 품종의 세포독성 평가는 2009년도 충청남도 연기군 시험포장에서 재배된 슈퍼자미벼와 동시 재배된 흑진주벼 및 추청벼를 통해 수행하였다. 공시된 검체는 곱게 마쇄한 후 상온에서 80% 에탄올을 이용하여 3시간씩 5회에 걸쳐 활성성분을 추출하여 충분히 감압 농축한 후 동결건조하여 실험에 이용하였다.

(2) 균주 및 세포

RBL-2H3 (basophilic cell line) 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로 분양받아 사용하였다.

나. 항알레르기 효과 측정

(1) 세포배양

지시세포로 사용된 basophilic cell line인 RBL-2H3 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% fetal bovine serum(FBS), 1% antibiotic-antimycotic와 3.7g/L sodium bicarbonate를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C 의 5% CO₂ 가스로 포화된 CO₂ incubator에서 배양하고 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 cell이 flask에 약 80%쯤 증식하였을 때 0.25% trypsin으로 처리한 후 cell을 떼어내어 계대 배양하였다.

(2) β -hexosaminidase활성 측정방법

β -hexosaminidase는 basophil과 mast cell specific granule의 구성 물질로 알려져 있으며, 탈과립에 의한 histamine의 분비는 β -hexosaminidase의 분비량과 비례한다. 따라서 β -hexosaminidase의 분비활성을 측정함으로써 RBL-2H3의 탈과립과 histamine의 분비정도를 살펴보았다. β -hexosaminidase활성 측정은 Choi O.H 방법에 준하여 실시하였다(4).

RBL-2H3 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 Dubecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에 현탁 시킨 후 24 well plate에 각 well당 2×10^5 cells/mL이 되도록 조절한 후에 각 well당 0.5 μ g/mL DNP-IgE로 감작 시킨 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 배양한다. 이후 각 well의 세포들을 Siraganian Buffer(119mM NaCl, 5mM KCl, 5.6mM Glucose, 0.4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH7.2)로 2번 세척한 다음 37°C에서 10분간 각 well당 Siraganina Buffer로 전 반응시키고, 대조군과 시료를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 ppm/ml)로 각각 첨가한 후 10분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 37°C에서

30분간 antigen(DNP-HSA, 10 μ g/ml)을 처리하여 탈 과립상태로 만든 후 반응을 ice bath에서 10분간 incubation 시켜 반응을 종결시키고 상층액을 취해 12,000rpm에서 90초간 원심분리한 뒤 다시 상등액 25 μ L를 회수하고, 0.1M citrate buffer(pH5)에 용해된 1mM p-nitrophenyl- β -acetyl -glucosamide를 동량을 넣고 37 $^{\circ}$ C, CO₂(5%)배양기에서 1시간 동안 반응하였다. 반응을 종결시키기 위하여 200 μ L의 sodium bicarbonate buffer(pH 2.0)를 넣은 뒤, ELISA reader를 이용하여 405nm파장에서 측정하였다. 시료와 대조군의 흡광도 값으로 다음 시기에 의해 억제율을 산출하였다.

$$Inhibition(\%) = \frac{1 - (T - B - N)}{C - N} \times 100$$

N: DNP-HAS(-), test sample (-); C: DNP-HSA(+), test sample(-);

T: DNP-HAS(+), test sample (+); C: DNP-HSA(-), test sample(+);

(3) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT- PCR)

RBL-2H3 세포 (2.5 \times 10⁵cells)에 100ng/ml anti-DNP-IgE를 넣고 12시간 자극된 cell을 1,200rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거한 후 PBS로 2회 wash하고 500rpm에서 5분간 원심분리하여 PBS를 완전히 제거한다. e.p tube에 담겨진 cell을 TRIZol reagent(Invitrogen Co., cat. 15596-026)를 1ml 첨가하고 상온에서 5분간 두어 cell이 완전히 해리되게 한 후 chloroform을 200 μ l 넣고 15초간 세차게 섞은 후 상온에서 2~3분간 방치하였다. e.p tube를 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g, 15분간 원심분리하여 분리된 윗부분의 투명 층을 세로운 e.p tube에 담고 isopropyl alcohol 500 μ l를 넣고 섞어 상온에서 10분간 정치하였다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g, 10분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 남은 용액까지 완전히 제거 한 후 남아있는 RNA pellet에 75% ethanol 1ml을 넣고 잘 섞은 다음 4 $^{\circ}$ C, 7,500 \times g, 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거 후 남아있던 75% ethanol을 상온에서 잘 건조시킨다. RNase free water를 RNA pellet의 양에 맞게 30~40 μ l 정도 넣어 RNA를 용해시킨 후 55~60 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation하였다. 이렇게 추출된 RNA를 1.5% agarose gel에서 RNA band를 확인하고 spectrophotometer를 사용하여 RNA 양을 측정하여, RT-PCR에 사용하였다.

(4) RT-PCR

RT과정은 Maxime RT premix kit에 준하여 수행하였다. 준비된 total RNA와 Forward primer 와 reverse primer를 RT-PCR kit에 넣고 최종 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC D.W를 가하였다. Reverse transcription reaction은 45 $^{\circ}$ C에서 30min간 반응시킨 다음 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 RNA를 denaturation하여 cDNA를 만든 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation 시키고, 50 $^{\circ}$ C~53 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing 시킨 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 시키는 cycle을 30회 반복 한 뒤에, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l 씩 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (표 20).

표 20. Primer sequence

Cytokine		Sequence(rat)	Length (bp)
IL-1 β	Forward	5'-GTAGCCCACGTCGTAGCAAA-3'	350
	Reverse	5'-CCCTTCTCCAGCTGGGAGC-3'	
IL-6	Forward	5'-GAAATGATGGATGCTTCCAAACTG G-3'	414
	Reverse	5'-GGATATATTTTCTGACCACAGTGA GG-3'	
β -actin	Forward	5'-GTGGGGCGCCAGGCACCA-3'	529
	Reverse	5'-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC- 3'	

(5) Cytokine의 정량

24-well plate에 2.5×10^5 cells/mL의 세포와 DNP-IgE(0.5 μ g/mL)를 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C, CO₂(5%) 배양기에서 12시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 시료를 농도별(0.1,1,10,50,100ppm/mL)로 희석시켜 세포에 처리하였다. 30분 동안 배양한 후 5% DNP-HAS (10 μ g/mL)를 가하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂(5%)배양기에서 2시간 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation 하여 반응을 종결시켰다. 배양이 끝난 상층액을 96-well ELISA plate에 옮기고, IL-4와 TNF- α 농도를 측정하였다.

다. 실험결과

(1) 항소양 활성 평가

생활환경에 폭넓게 존재하는 알러지 원인물질에 의해 유발되는 각종 자극은 비만세포에 작용하여 탈과립을 일으켜 히스타민과 같은 약리활성 물질을 분리하게 하는데 이를 이용하여 항알러지 특히 가려움증과 관련된 면역반응에 관여하는 signal들에 대한 유색미 성분의 억제기능에 대해 조사하였다.

C3GHi로부터 순수 분리한 페놀성 화합물들의 탈과립 억제효과를 측정한 결과 대조약물인 azelastine보다는 많이 낮았으나 protocatechuic acid와 vanillic acid에서 유의한 억제효과를 확인함(그림 46).

사이토카인 억제효과: 그림 14에서와 같이 ELISA 법을 이용하여 면역반응중 생성되는 TNF- α 의 함량을 측정한 결과 protocatechuic acid와 vanillic acid에서 유의한 결과 확인(그림 47).

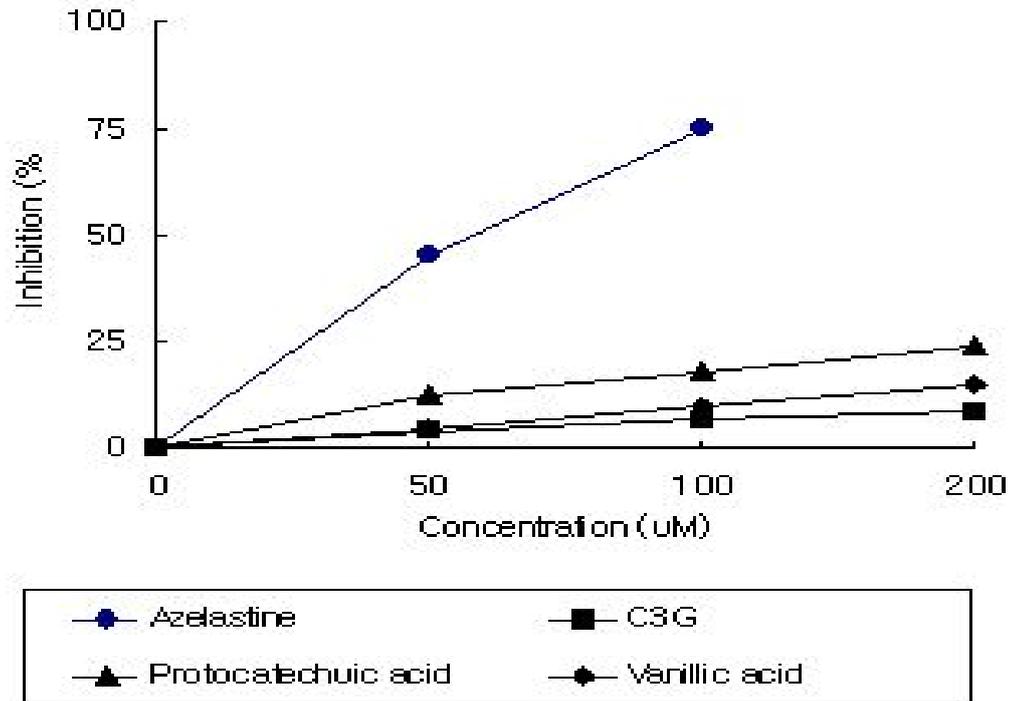


그림 46. C3GHi 함유 성분(C3G, protocatechuic acid, vanillic acid)의 탈과립 억제효과.

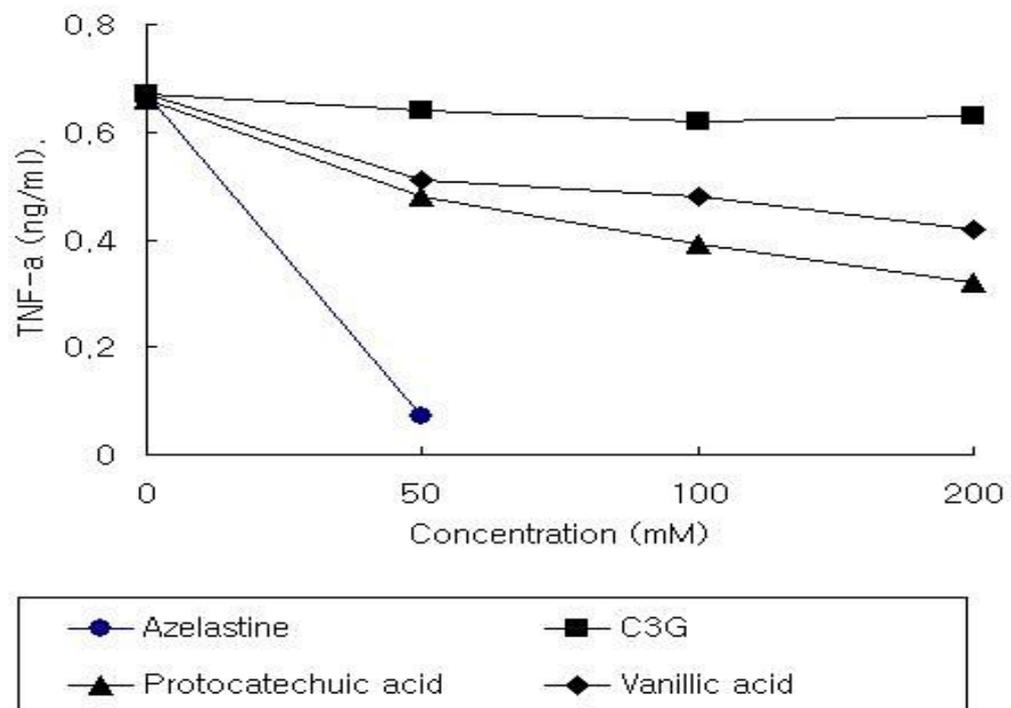


그림 47. 유색미 함유 성분(C3G, protocatechuic acid, vanillic acid)의 TNF- α 억제효과.

(2) β -hexosaminidase활성 측정

(가) RBL-2H3 cell 세포독성 측정

지시세포로 사용된 Rat basophilic leukemia cells(비만세포주)인 RBL-2H3 cells은 비만세포의 유형으로 DNP-IgE로 세포를 감작시킨 후, 항원인 DNP-BSA로 자극하여 탈과립을 유도하는 방법이다. 이때 측정된 β -hexosaminidase 분비 억제효과가 세포독성으로 인한 결과인지 여부를 알아보기 위하여 세포독성을 측정하였다. RBL-2H3 세포주에 추청벼, 흑진주벼, 수원 425호, 큰눈자미벼, 슈퍼자미벼를 농도별로(1, 5, 10, 50ppm) 투여하여 실험한 결과 모든 품종의 시료에서 85% 이상의 세포 생존율을 보여 시료에 의한 독성이 탈과립 억제효과에 미치는 영향이 없는 것으로 조사되었다(그림 47~51).

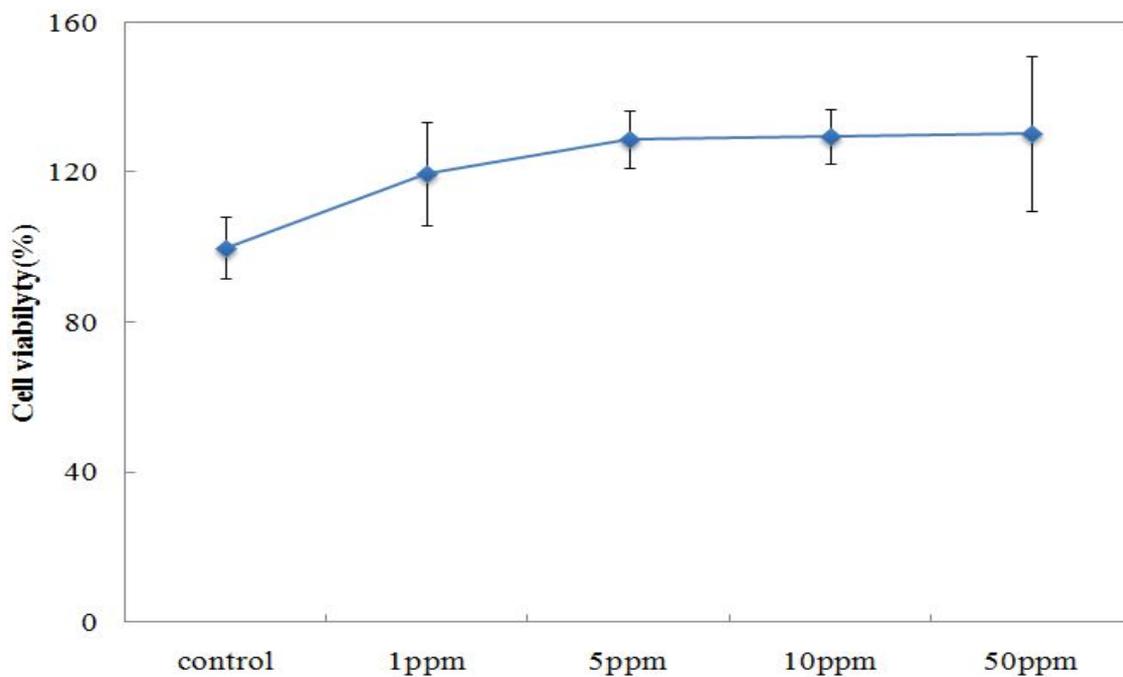


그림 47. 추청벼의 RBL-2H3 cell 세포독성

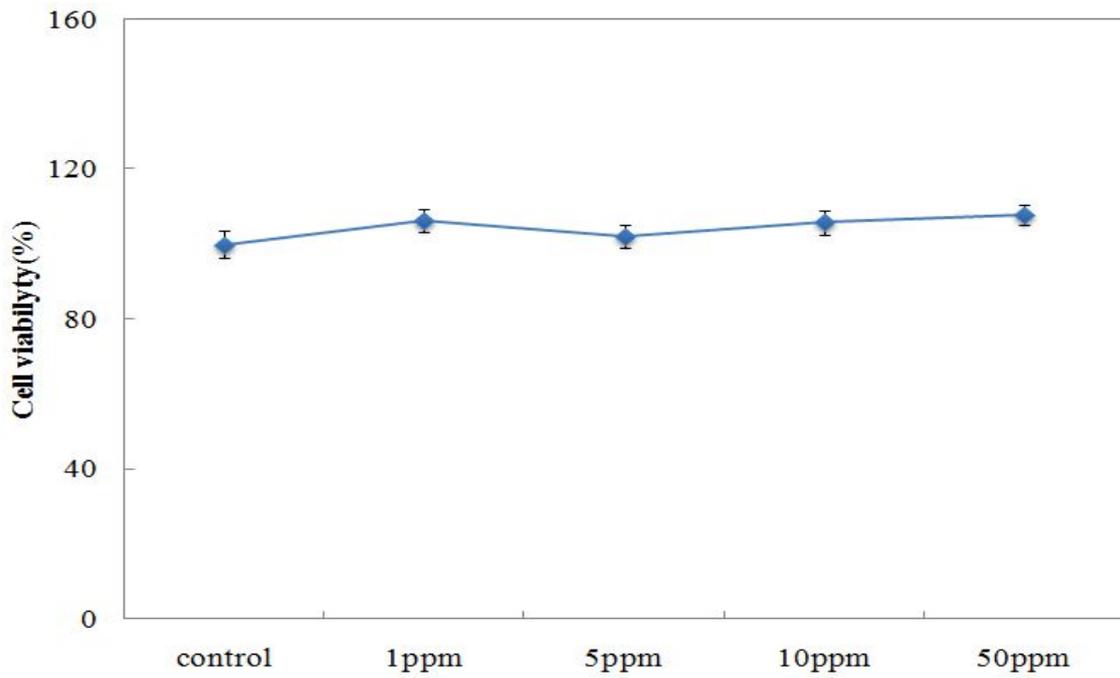


그림 48. 흑진주벼의 RBL-2H3 cell 세포독성

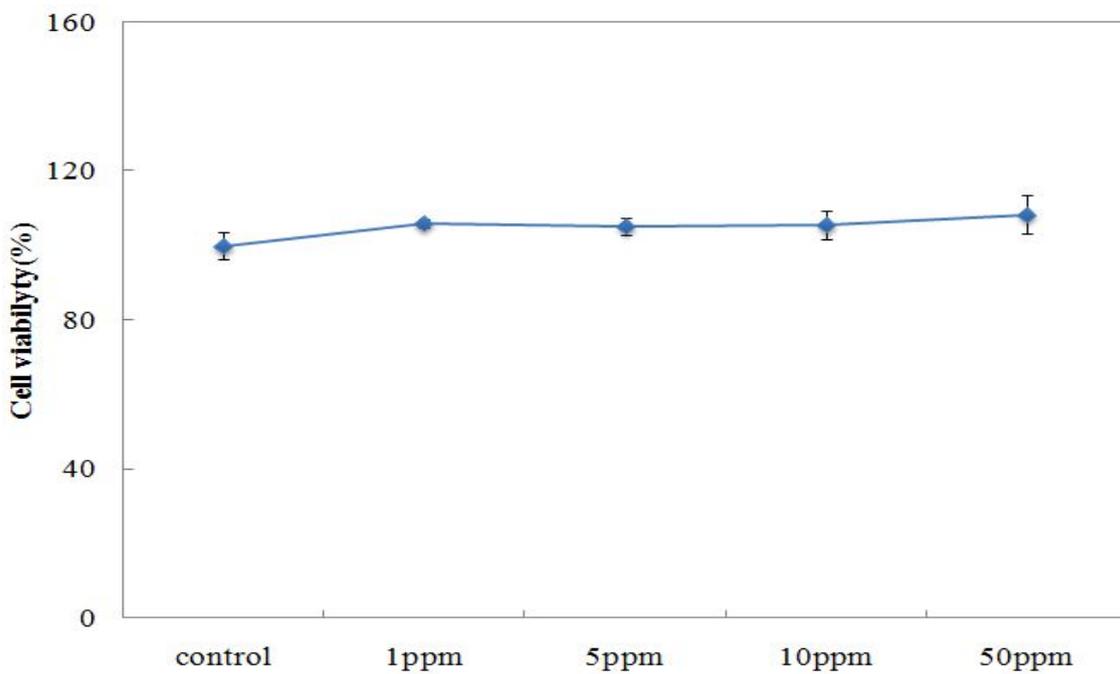


그림 49. 수원 425호의 RBL-2H3 cell 세포독성

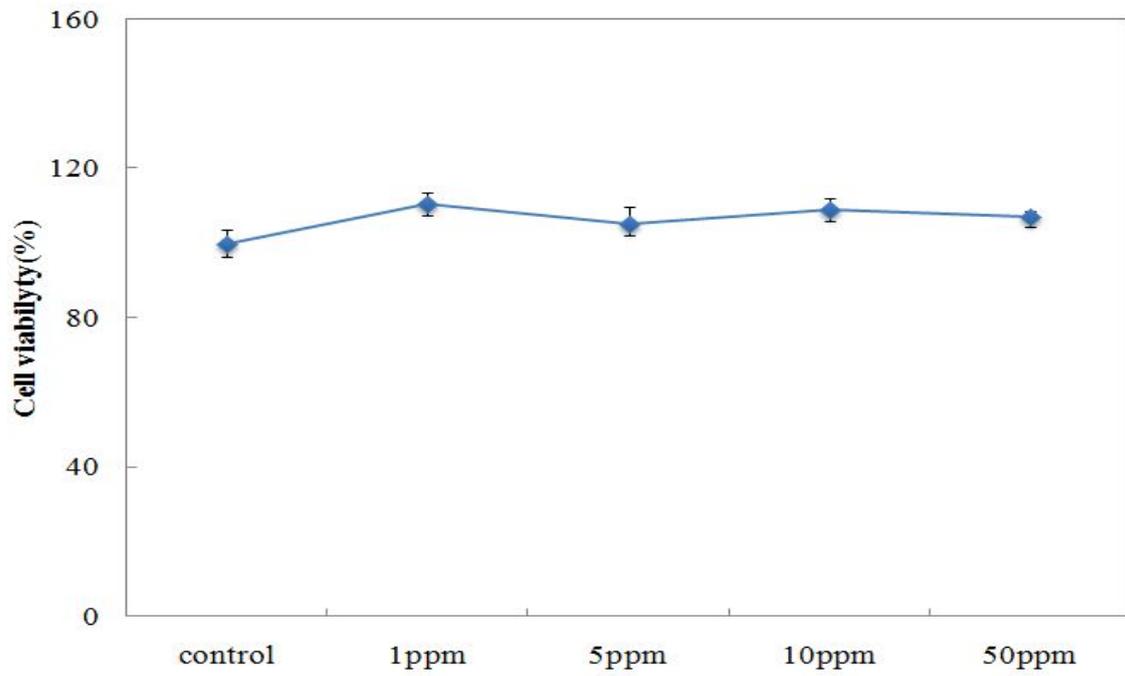


그림 50. 큰눈자미벼의 RBL-2H3 cell 세포독성

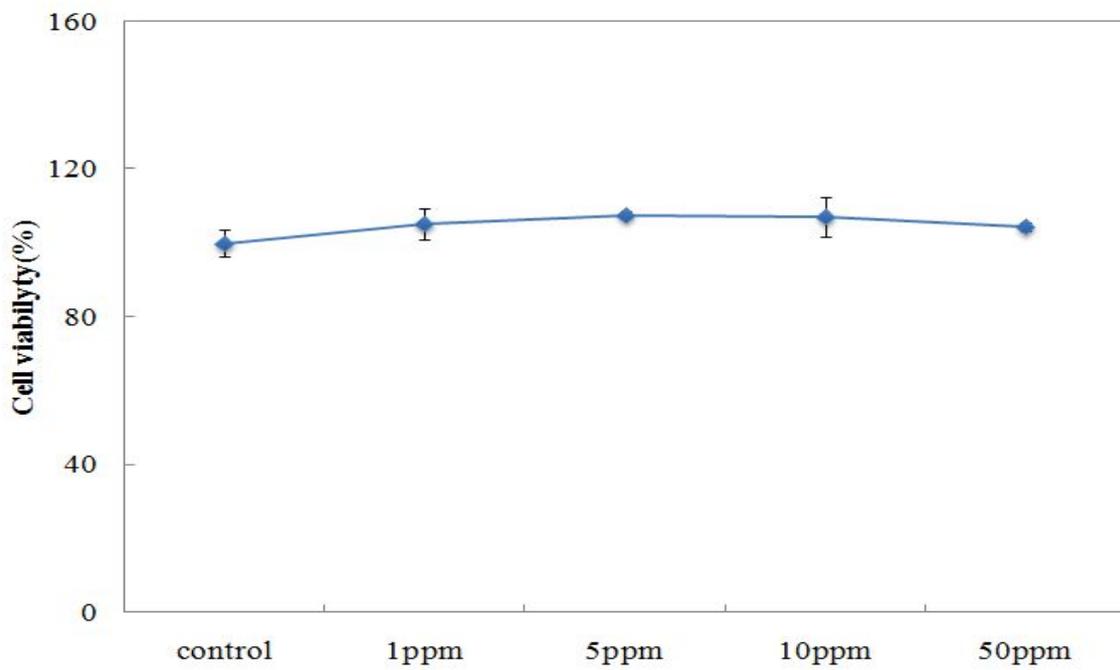


그림 51. 슈퍼자미벼의 RBL-2H3 cell 세포독성

(나) β -hexosaminidase 활성 측정

항알러지 효과를 알아보기 위한 실험 중 탈과립 정도를 측정하는 방법의 하나인 β -hexosaminidase release assay 실험을 실시하였다. β -hexosaminidase release assay는 비만세포에 IgE로 감작 후 항원을 처리하여 탈과립을 유도할 경우 분비된과립 내의 지표성분인 β -hexosaminidase를 검출하는 방법으로, RBL-2H3 세포주에서 Azelastin에 의해 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 시료의 억제활성을 보여 주는 것이다. RBL-2H3 세포주에 품종별 쌀 시료를 1, 5, 10, 50ppm의 농도로 처리한 후 β -hexosaminidase를 측정하였다.

① 추청벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 세포주에서 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 추청벼 시료의 억제활성은 1ppm과 50ppm에서는 5%미만으로 나타났고, 5ppm 24%, 10ppm 16%으로 나타났다(그림 52).

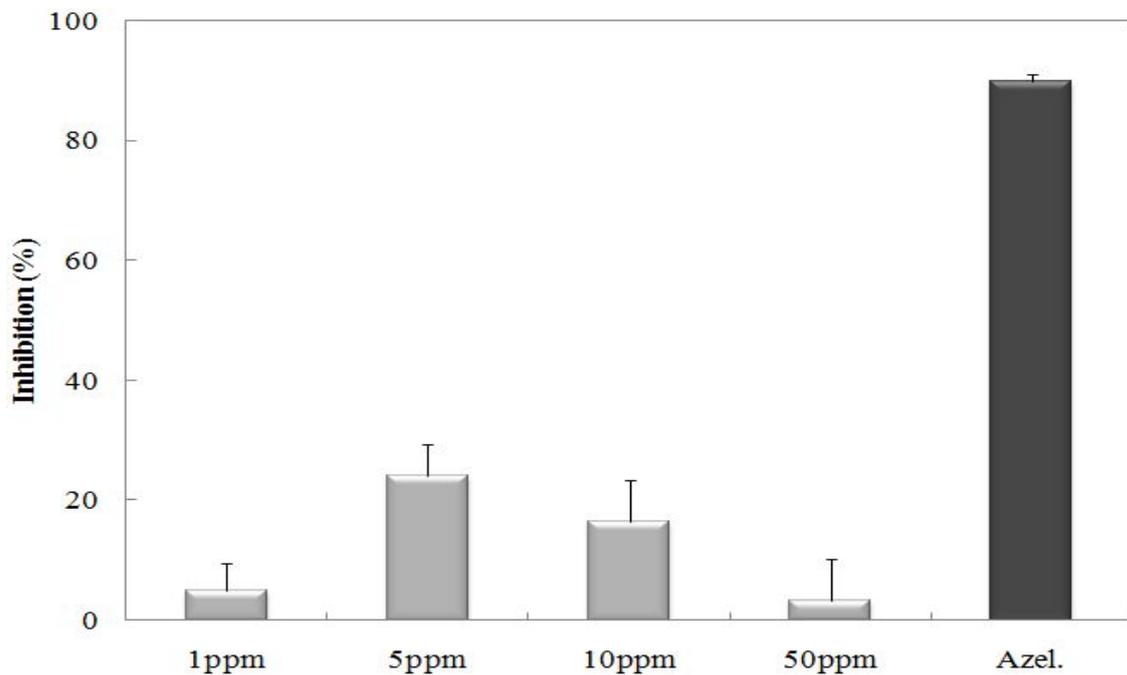


그림 52. 추청벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

*Azel.: Azelastin 50 μ M

② 흑진주벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 세포주에서 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 흑진주벼 시료의 억제활성은 1ppm 3%, 50ppm 7%, 10ppm 16%, 50ppm 35%으로 나타났고 농도 의존적으로 β -hexosaminidase분비에 대한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(그림 53).

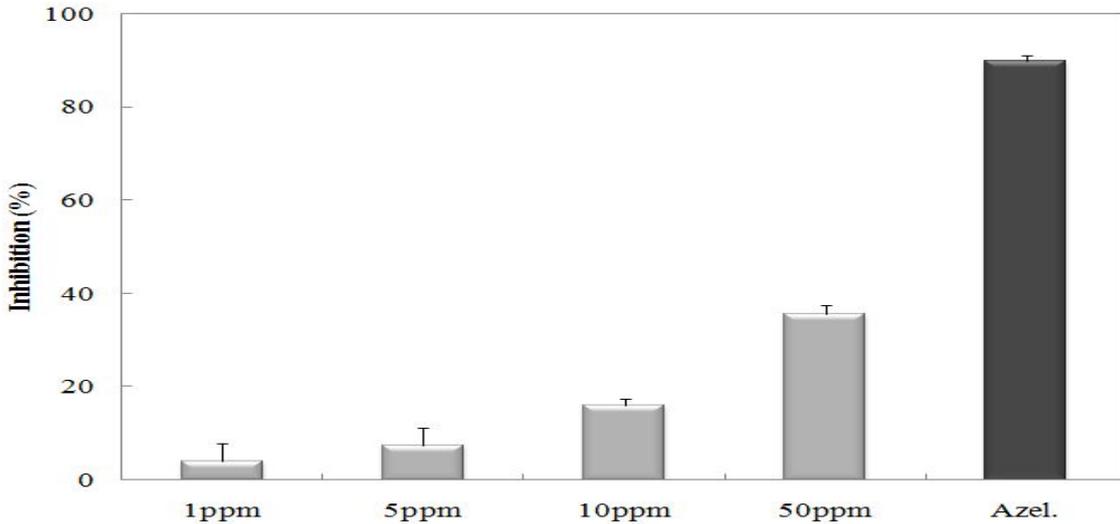


그림 53. 흑진주벼 β -hexosaminidase 활성 측정 *Azel.: Azelastin 50 μ M

③ 수원 425호의 β -hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 세포주에서 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 수원 425호 시료의 억제활성은 1ppm 8%, 50ppm 9%, 10ppm 14%, 50ppm 26%으로 나타났고 농도 의존적으로 β -hexosaminidase분비에 대한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(그림 54).

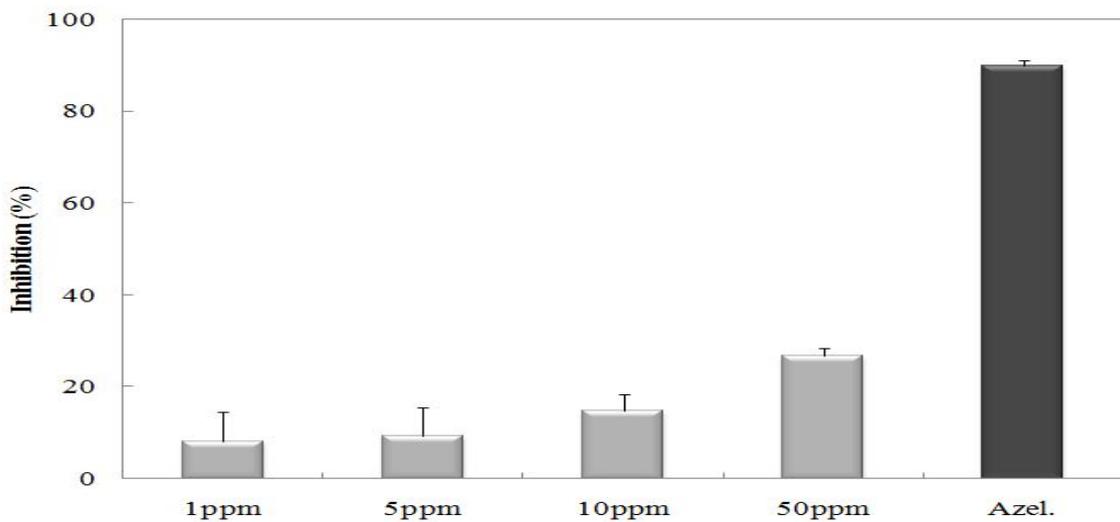


그림 54. 수원 425호 β -hexosaminidase 활성 측정

*Azel.: Azelastin 50 μ M

④ 큰눈자미벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 세포주에서 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 큰눈자미벼 시료의 억제활성은 1ppm 1%, 5ppm 10%, 10ppm 12%, 50ppm 31%으로 나타났고 농도 의존적으로 β -hexosaminidase분비에 대한 억제 효과가 있는것으로 나타났다(그림 55).

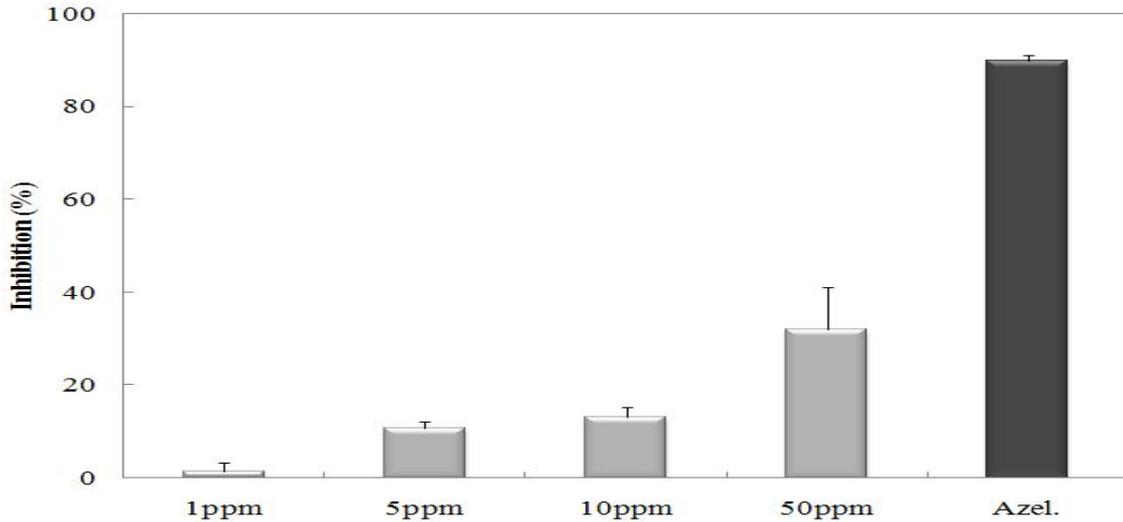


그림 55. 큰눈자미벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

*Azel.: Azelastin 50 μ M

⑤ 슈퍼자미벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

RBL-2H3 세포주에서 유발된 β -hexosaminidase분비에 대한 슈퍼자미벼 시료의 억제활성은 1ppm 8%, 5ppm 16%, 10ppm 28%, 50ppm 57%으로 나타났고 농도 의존적으로 β -hexosaminidase분비에 대한 억제 효과가 있는것으로 나타났다(그림 56).

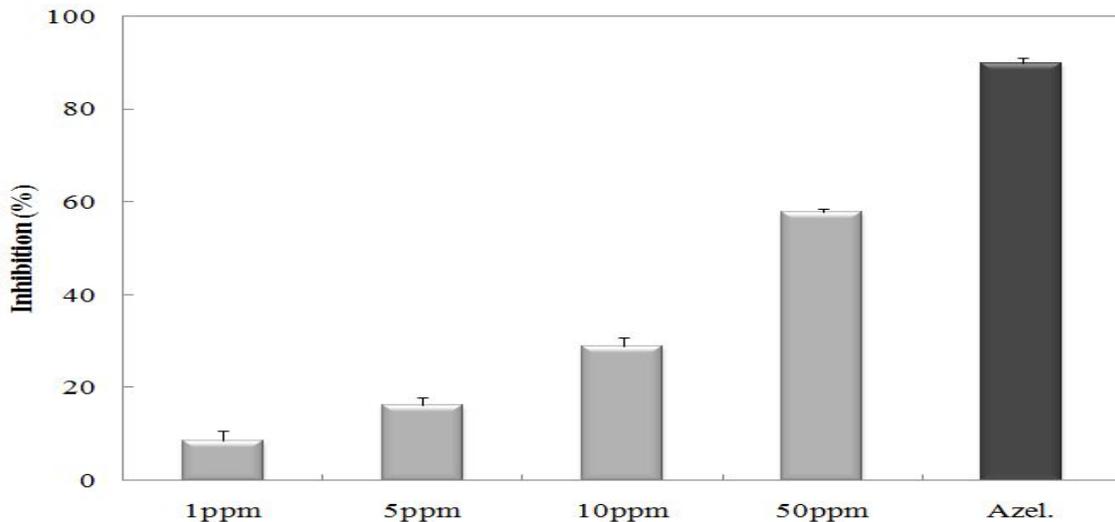


그림 56. 슈퍼자미벼의 β -hexosaminidase 활성 측정

*Azel.: Azelastin 50 μ M

(3) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT- PCR) 결과

안토시아닌 고함유 품종이 염증반응에 미치는 영향을 RNA 전사단계에서 조사해 보고자, IL-1 β , IL-6와 같은 비만세포의 염증성 cytokine을 Semi-quantitative RT-PCR 방법으로 비교 검정하였다. 실험에 사용된 모든 시료는 농도별(1, 5, 10, 50ppm)로 처리하였으며, 자극원으로는 Azraisten을 50 μ M로 사용하였다. 또한 앞에서 실험한 β -hexosaminidase 활성 측정에서 가장 효과가 없는 것으로 나타난 추청벼를 Normal(N)으로 잡고 다른 품종을 비교실험 하였다. N으로 표시된 Lane은 추청벼를 50ppm으로 하여 비교하였다.

(가) 흑진주벼 RT- PCR 결과

흑진주벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane C 와 비교해 보았을 때, 염증성 cytokine IL-1 β , IL-6를 억제시키는 것으로 나타났으며 추청벼인 N lane보다 염증을 억제시키는 것으로 보인다(그림 57).

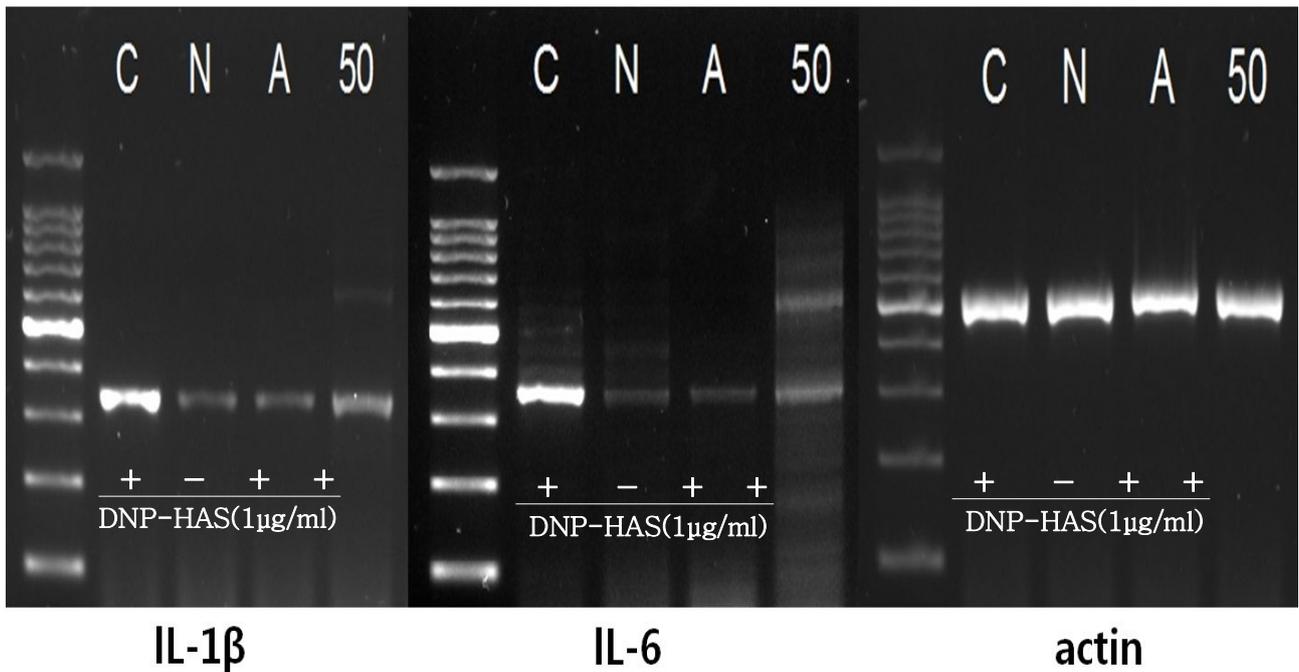


그림 57. 흑진주벼의 RBL-2H cell RT- PCR 결과
 * C:control, N:추청벼 50ppm, A:Azelaistin 50 μ M, 50:흑진주벼 50ppm

(나) 수원 425호의 RT- PCR 결과

수원 425호의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane C 와 비교해 보았을 때, 염증성 cytokine IL-1 β , IL-6를 억제시키는 것으로 나타났으며 추청벼인 N lane보다 염증을 억

제시키는 것으로 보인다(그림 58).

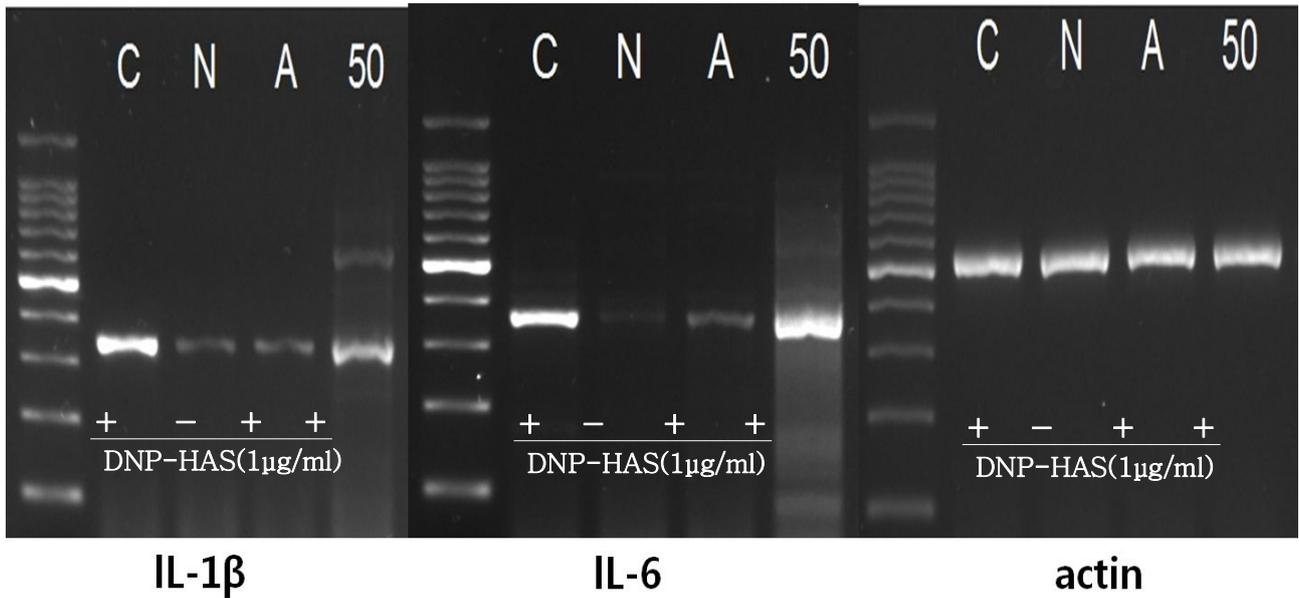


그림 58. 수원 425호의 RBL-2H cell RT- PCR 결과

* C:control, N:추청벼 50ppm, A:Azelastrin 50μM, 50:수원425호 50ppm

(다) 큰눈자미벼의 RT- PCR 결과

큰눈자미벼의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane C 와 비교해 보았을 때, 염증성 cytokine IL-1β, IL-6를 억제시키는 것으로 나타났으며 추청벼인 N lane보다 염증을 억제시키는 것으로 보인다(그림 59).

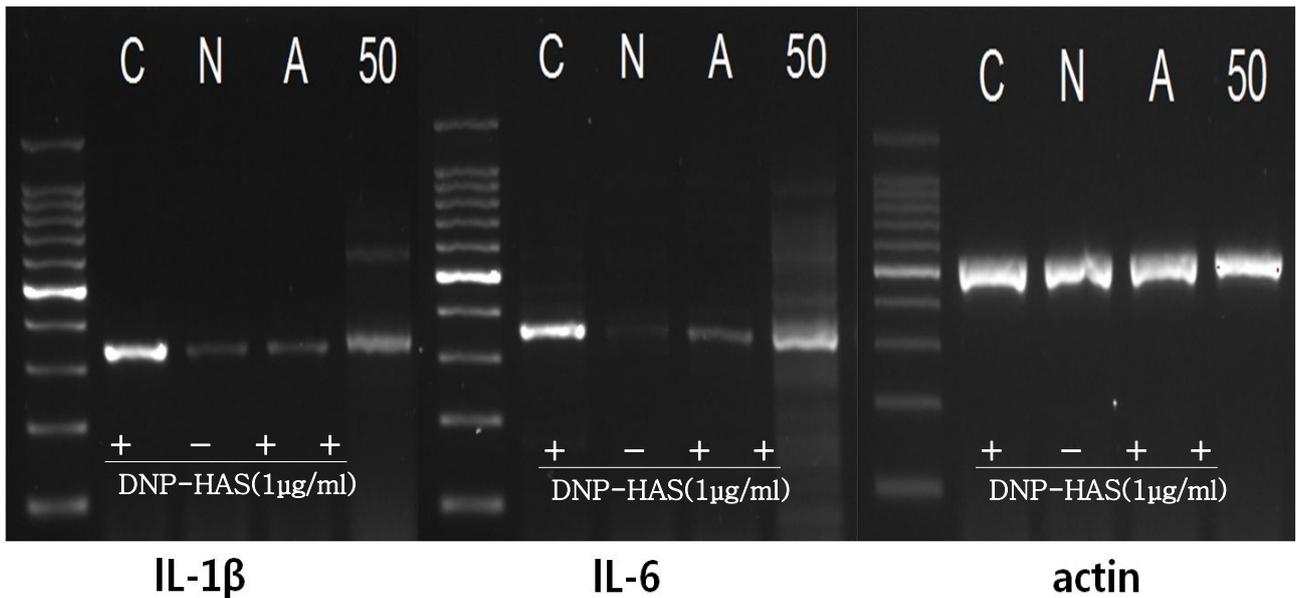


그림 59. 큰눈자미벼의 RBL-2H cell RT- PCR 결과

* C:control, N:추청벼 50ppm, A:Azelastrin 50μM, 50:큰눈자미벼 50ppm

(라) 슈퍼자미버의 RT- PCR 결과

슈퍼자미버의 시료를 처리한 결과 시료를 처리하지 않은 대조구 lane C 와 비교해 보았을 때, 염증성 cytokine IL-1 β , IL-6를 억제시키는 것으로 나타났으며 추청벼인 N lane보다 염증을 억제시키는 것으로 보인다(그림 60).

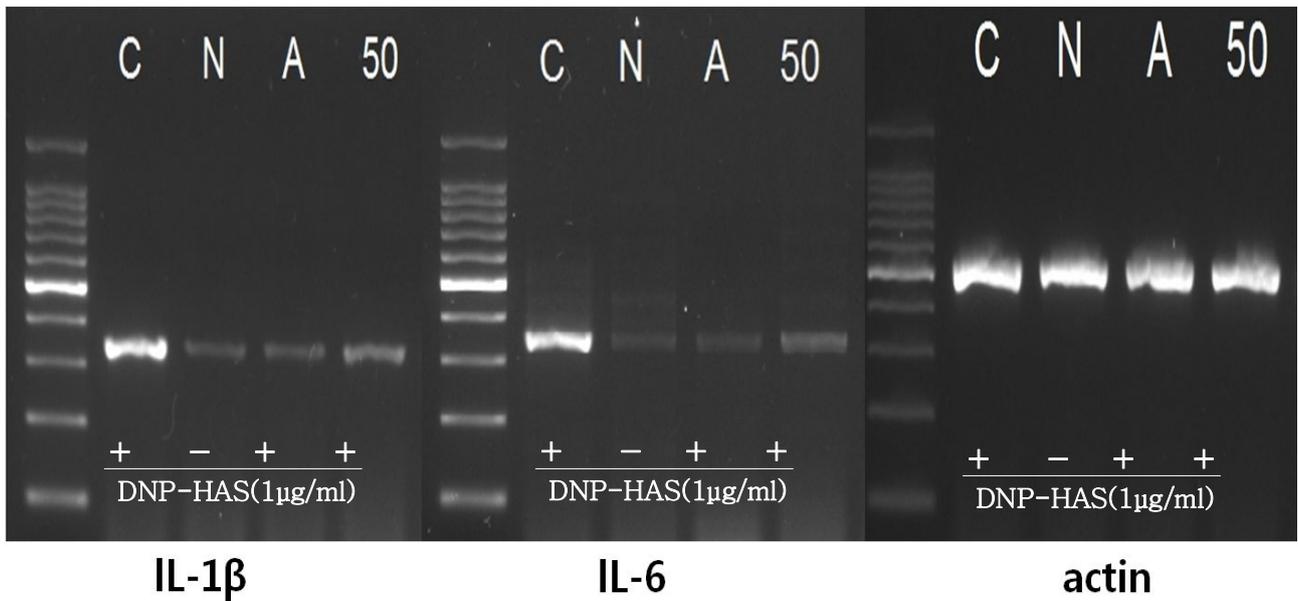


그림 60. 슈퍼자미버의 RBL-2H cell RT- PCR 결과

* C:control, N:추청벼 50ppm, A:Azelastin 50 μ M, 50:슈퍼자미버 50ppm

(4) Cytokine의 정량 결과

안토시아닌 고함유 품종의 염증성 cytokine의 억제활성을 단백질 수준에서 검정하기 위하여, ELISA를 통해 정량하였다. 지시세포는 RBL-2H3 세포를 사용하였으며, TNF- α 와 IL-4는 많이 알려져 있는 염증관련 cytokine이다. 실험 결과 모든 안토시아닌 고함유 품종에서 농도 의존적으로 각 cytokine의 단백질 발현 분비 작용이 억제됨을 확인할 수 있었다(그림 61~68).

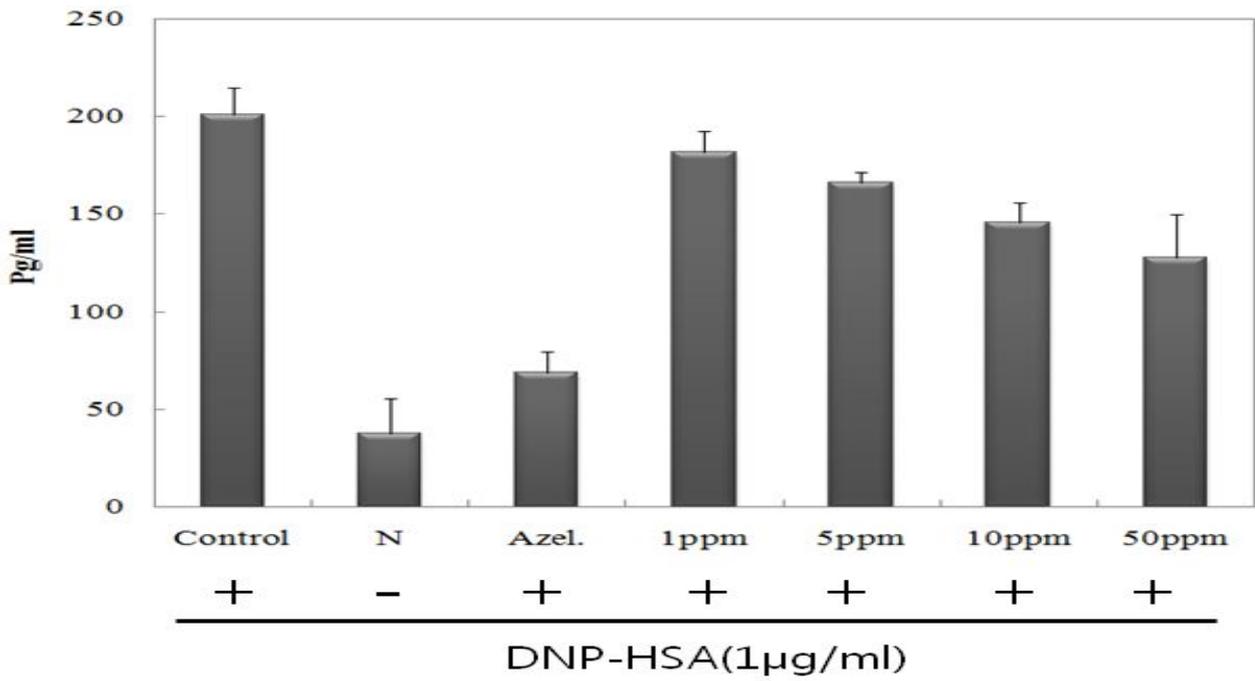


그림 61. 흑진주벼의 TNF- α 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

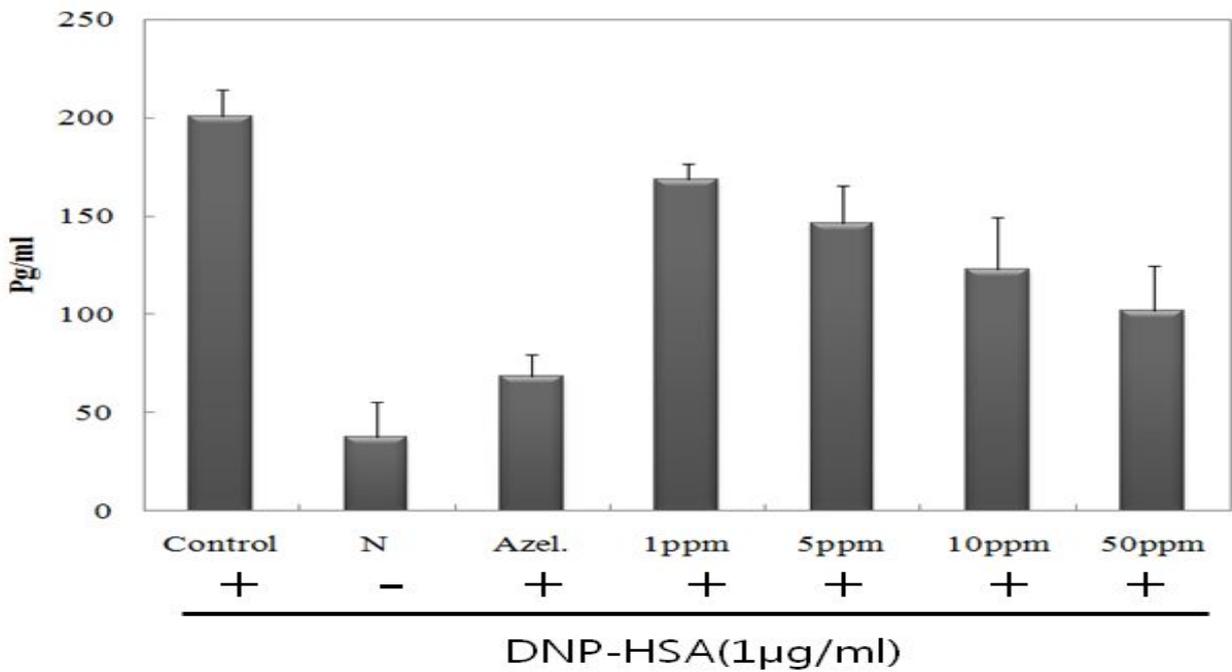


그림 62. 흑진주벼의 IL-4 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

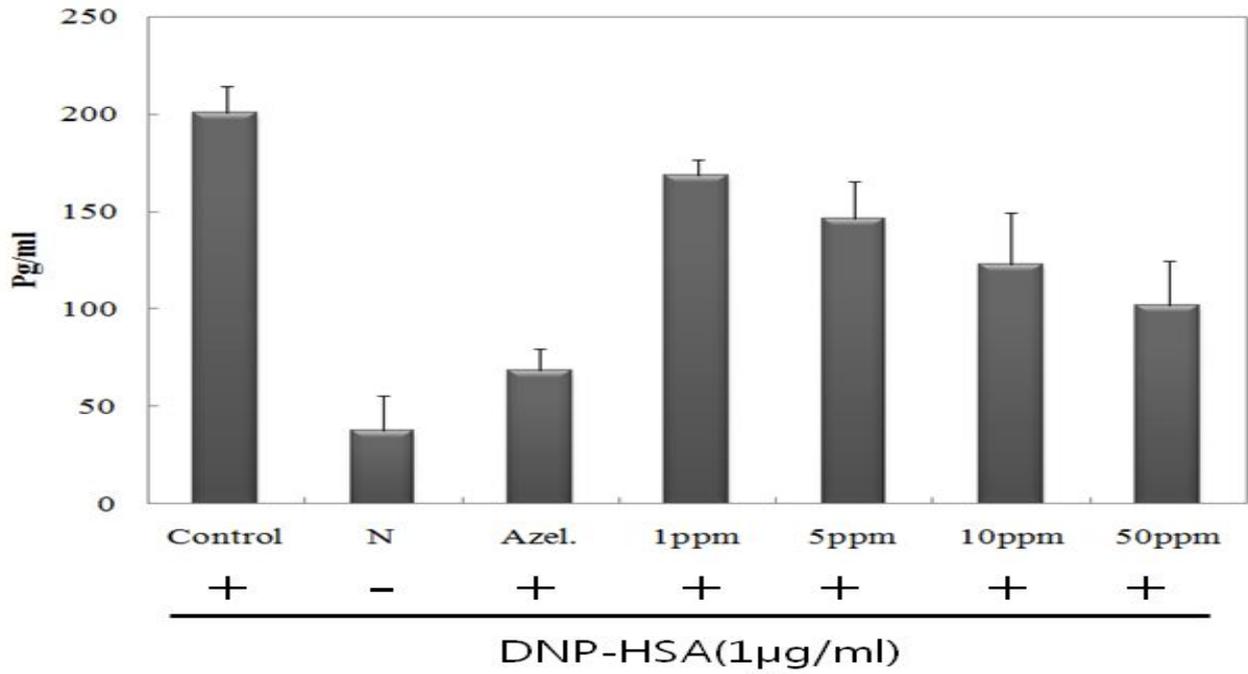


그림 63. 수원 425호의 TNF- α 측정결과

* N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

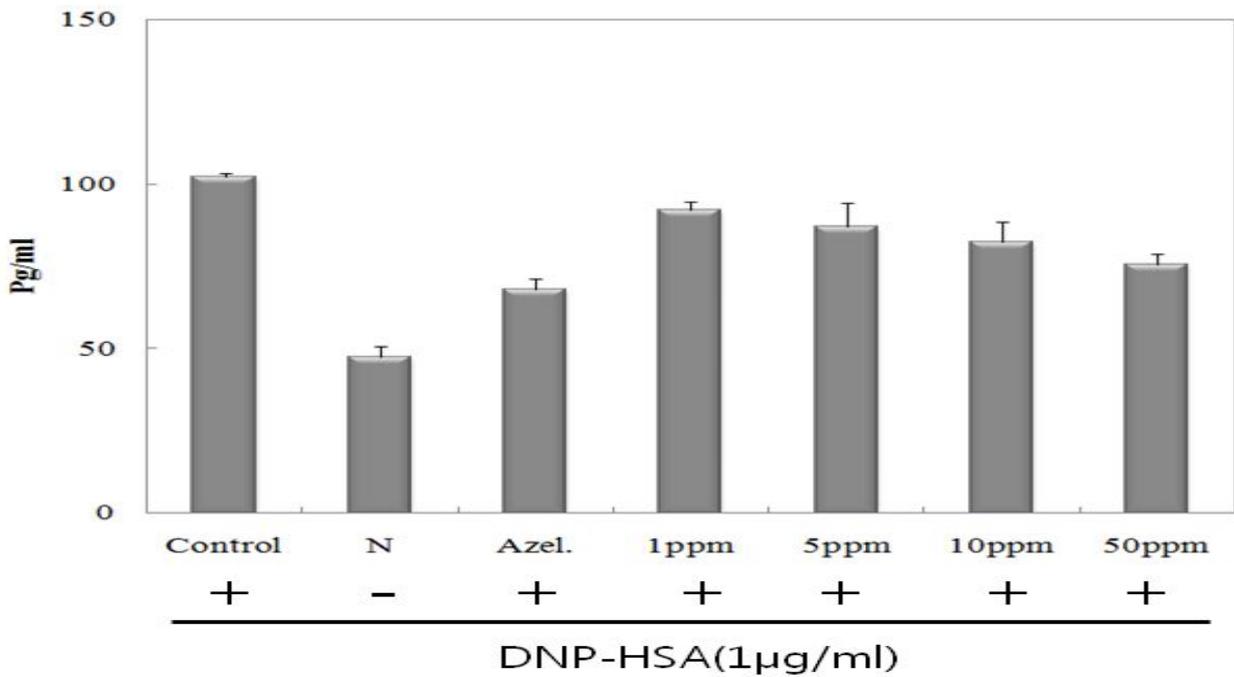


그림 64. 수원 425호의 IL-4 측정결과

* N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

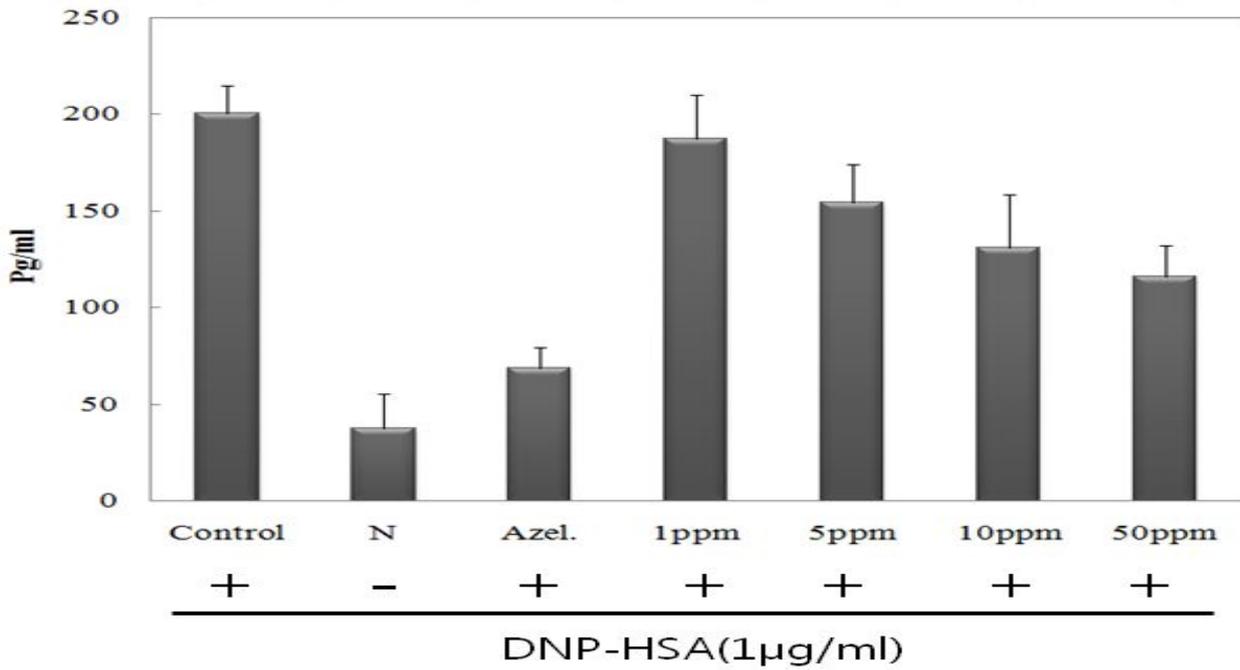


그림 65. 큰눈자미벼의 TNF- α 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

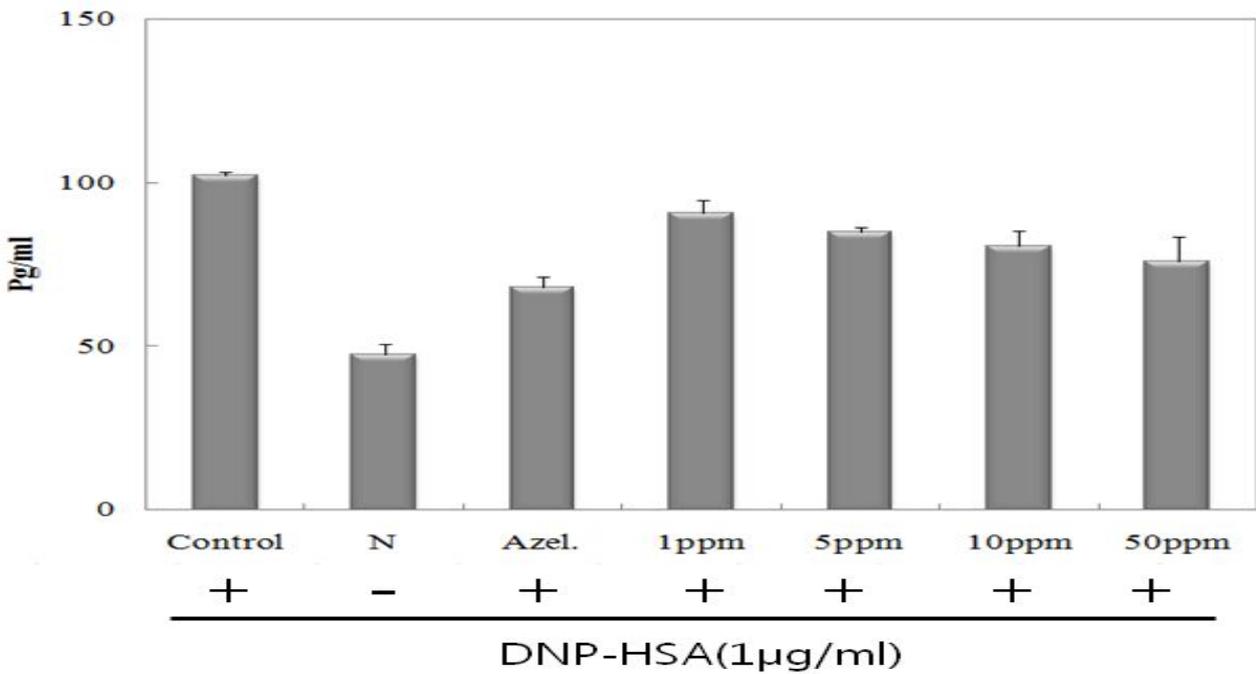


그림 66. 큰눈자미벼의 IL-4 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

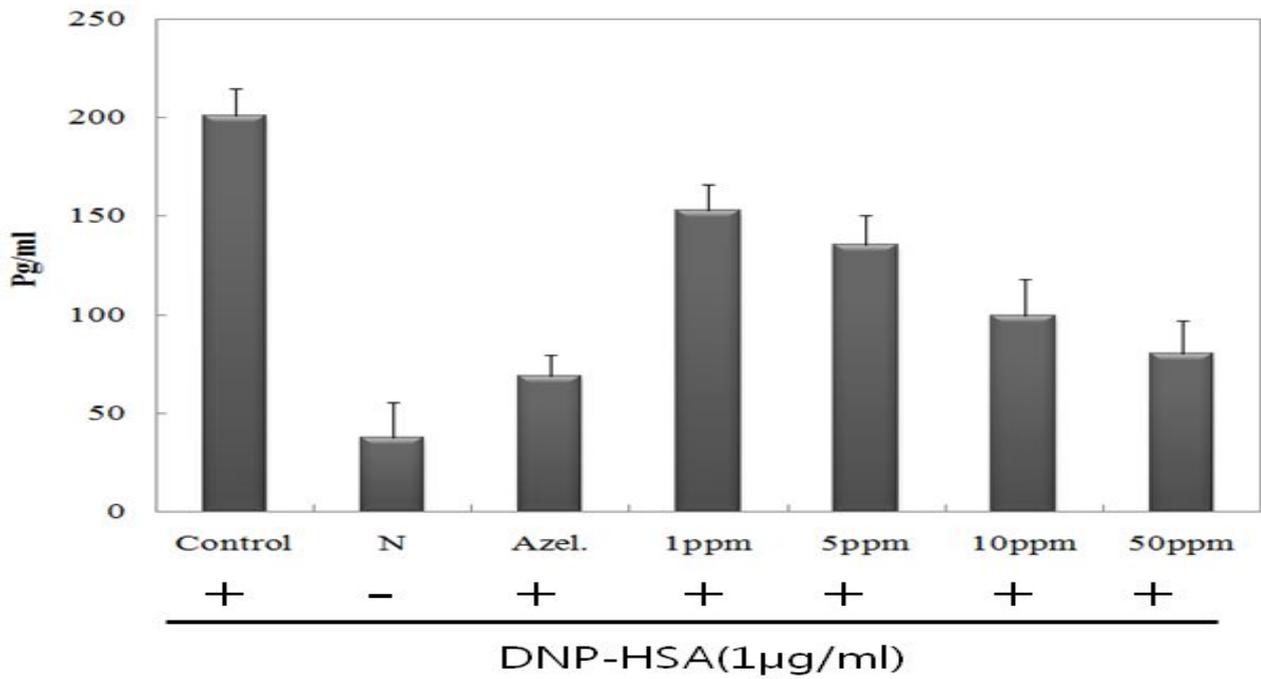


그림 67. 슈퍼자미벼의 TNF- α 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

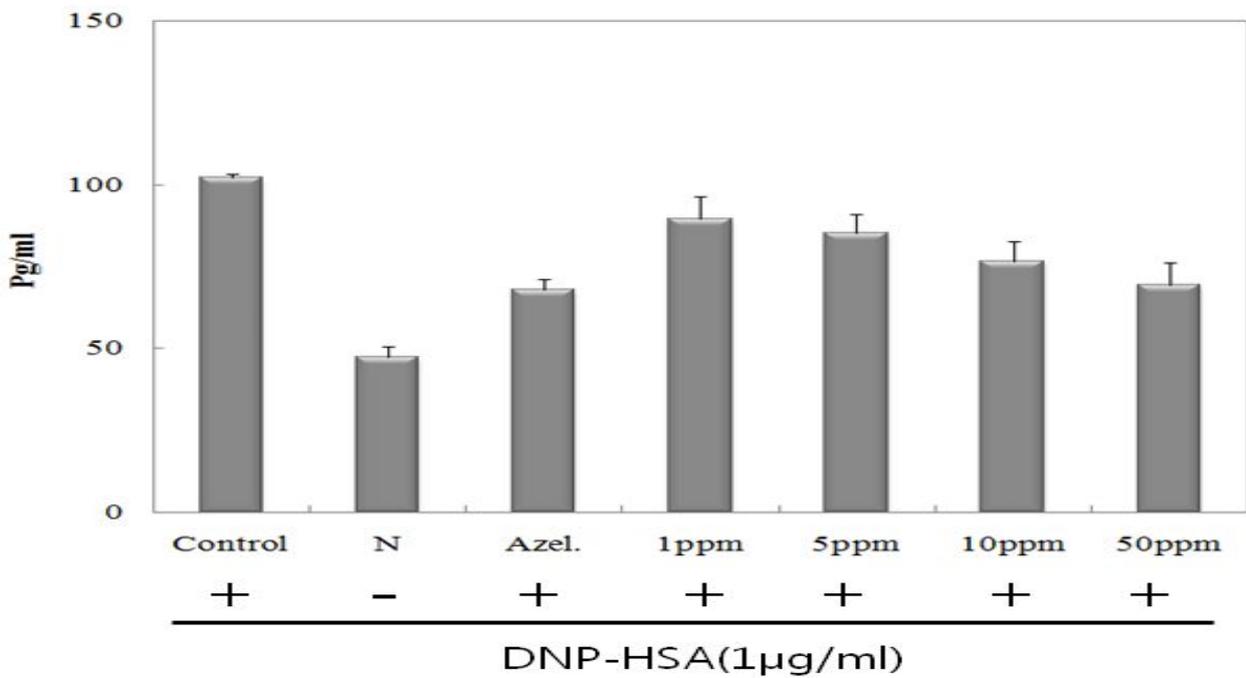


그림 68. 슈퍼자미벼의 IL-4 측정결과
 * N:Nomal, Azel:Azelastin 50 μ M

제3절 유색미 품종의 고부가가치 명품 브랜드화

1. 면역증진 기능의 특수미 미강 발효물 개발

가. C3GHi 미강 발효물 개발

만성적인 면역계 질환 또는 면역계 약화에 의해서 발생하는 여러가지 질환을 개선하기 위하여 다양한 방법의 접근이 최근 들어 활발하게 진행되고 있음. 생체내 면역계의 이상으로 발생하는 질환을 개선하기 위한 연구들은 인체에 부작용이 없으면서도 면역계를 조절할 수 있는 면역 활성물질의 개발에 대해 관심이 집중되어 있음. 부작용이 없으면서도 인체의 생물학적 반응을 조절하여 면역계를 활성화시키거나 또는 면역 과민반응 등으로 인하여 과잉된 면역반응(알러지 질환)을 정상인 상태로 조절하는 기능성식품 소재의 발굴은 미생물 또는 식물자원으로부터 주로 개발중임.

미강(현미)은 탄수화물 외에도 질 좋은 식물성 단백질과 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 철분, 아연 등의 풍부한 미네랄, 비타민 등이 함유되어 있으며 또한 건강증진 효용을 평가받아 기능성소재로 이용되고 있는 성분도 많이 함유하고 있음. 현미에 포함되어 있는 기능성 성분에는 아라비노스 실란, 펠룰릭산, 감마-아미노부티릭산, 감마-오리자놀, 토코트리에놀, 옥타코사놀, 피틴, 세라미드, 스쿠알란 및 스쿠알렌, 식이섬유 등이 있으며, 이중 hemicellulose에 결합되어 있는 다수의 다당체들은 면역 증진 기능이 우수한 것으로 알려져 있음. 미강다당체의 유용한 성분을 활용하기 위하여 hemicellulose에 결합된 다당체를 발효 또는 효소 작용을 통해 분리하고자 하는 시도가 수행되었으며, 국내에서 발효 공법을 이용하여 협동연구기관인 (주)이룸에서 상품화가 진행되었으며, 일본 대화제약에서는 효소 분해 공정을 통해 상품화를 하여 판매가 진행 중임.

본 연구에서 사용되는 품종 개량 특수 유색미인 C3GHi는 일반 흑미 또는 벼의 미강에서보다 다수의 기능성 성분이 함유되어 있을 것으로 예측되어져 일반 미강으로부터 유래된 다당체 성분에 비하여 생리활성이 우수할 것으로 예상되어졌으며, 발효 또는 효소분해된 다당체 성분을 유산균 또는 효모 등을 통한 2차 발효를 통해 기능성 다당체의 수율의 상승 또는 기능성을 강화시킬 수 있는 연구도 수행되고 있음.

따라서 본 연구과제에서는 특수 유색미 품종인 C3GHi의 미강으로부터 기능성 다당체 분리를 위하여 1차로 표고버섯 발효를 수행하고, 여기서 얻어진 발효물을 유산균 및 효모를 통해 2차 발효를 수행하였고, 각 발효물간의 활성 비교를 통해서 최적의 발효물을 선발하였음.

(1) 미강 발효 제조 공정

- 미강 발효물의 제조공정은 그림 69과 같이 수행되었으며, C3GHi의 미강을 이용하여 5가지 종류의 발효물을 제조하였음(표 21).

표 21. 미강발효물 시료에 대한 내용

Sample No.	Group	Sample Name	1차 발효균주	2차 발효균주
1	CW	C3G 쌀 분말	-	-
2	ERP	호소처리미강	<i>Lentinus edodes</i>	-
3	RFP	일반미강발효분말	<i>Lentinus edodes</i>	-
4	CP	C3G 미강 분말	-	-
5	BFP	일반 흑미 발효 분말	<i>Lentinus edodes</i>	-
6	CFP	C3G 미강 발효 분말	<i>Lentinus edodes</i>	-
7	CFP-S	C3G 미강 이차 발효분말 #4	<i>Lentinus edodes</i>	<i>S. cerevisiae</i>
8	CFP-L1	C3G 미강 이차 발효 분말 #1	<i>Lentinus edodes</i>	<i>L. acidophilus</i>
9	CFP-L2	C3G 미강 이차 발효분말 #2	<i>Lentinus edodes</i>	<i>L. plantarum</i>
10	CFP-L3	C3G 미강 이차 발효분말 #3	<i>Lentinus edodes</i>	<i>L. gasseri</i>

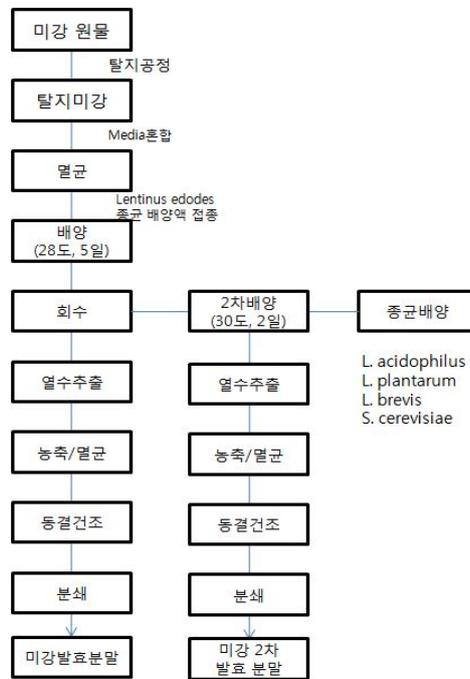


그림 69. 미강 발효물의 제조과정

- *Lentinus edodes*를 이용한 미강 발효 공정은 현재 협동연구기업에서 상업화 시킨 미강 발효 분말의 제조 공정을 적용하였으며, 간략하게 요약하면 탈지 공정으로 탈지한 미강을 발효 배지에 2%가 되도록 첨가하고 PDA 배지에서 배양한 종균을 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 후 회수하여 열수추출, 농축 및 멸균 공정을 거치고 동결건조하는 방법을 사용함.
- 2차 발효 공정은 *Lentinus edodes* 발효를 통해 얻어진 발효물을 회수하여 별도로 종균 배양된 *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. gasseri*의 유산균종 및 *S. cerevisiae* 효모 균주를 각기 접종하여 30°C에서 2일간 추가 배양한 후 회수/멸균/동결건조 공정을 통해서 제조하였음.

(2) 기능성 미강 발효물의 선정

(가) 면역 세포 활성화 비교를 통한 1차 선별

- 대식세포(macrophage)의 활성화를 통해 미강의 발효물별 활성을 비교 평가한 결과는 그림 70와 같이 나타났음.
- C3GHi의 동결건조 분말로부터 추출된 다당체는 대식세포의 활성화 기능이 거의 나타나지 않았으며, *Lentinus edodes*를 통한 1차 발효를 통해서 대식세포의 활성화가 나타났음.
- 2차 발효를 통해서 최고 농도에서의 활성은 발효물간에 큰 차이는 나타나지 않았으나 1ug/mL의 저농도에서 활성은 2차 발효를 통해서 전반적으로 향상되는 모습을 나타내었으며, 각 균종별 2차 발효를 통해 *L. gasseri* 발효시 저농도에서의 효능이 가장 많이 상승하는 것을 확인할 수 있었음. 효모균주로의 2차 발효시에도 거의 유사한 정도의 효능 향상이 나타났음.
- 비장세포(splenocyte)의 활성화를 통해 미강의 발효물별 활성을 비교 평가한 결과는 그림 71과 같이 나타났음. 2차 발효를 통하여 효모 및 *L. acidophilus*의 발효물이 비장세포의 증식 효과에도 향상 되는 결과로 나타났음.
- 대식세포 및 비장세포의 활성화 비교 시험 결과를 통하여 C3GHi의 발효를 통하여 면역 증진 기능이 향상되는 것을 확인할 수 있었음. 특히, 2차 발효를 통하여 *Lentinus edodes*를 이용한 1차 발효물에 비해 저농도에서의 효능 향상이 나타나고 있음을 확인하여 C3GHi 미강을 이용한 기능성 소재의 개발을 위해서 2차 발효 공정을 사용하는 것이 바람직하다고 판단됨.
- 2차 발효물간의 비교에서는 2차 발효 균주로 효모 균주의 발효물과 *L. gasseri*의 발효물이 타 발효물에 비하여 상대적으로 우수한 활성이 나타난 것으로 판단되어 추가적인 면역 증진 기능성 검증을 위하여 상기 2개의 발효물 시료를 사용하였음.

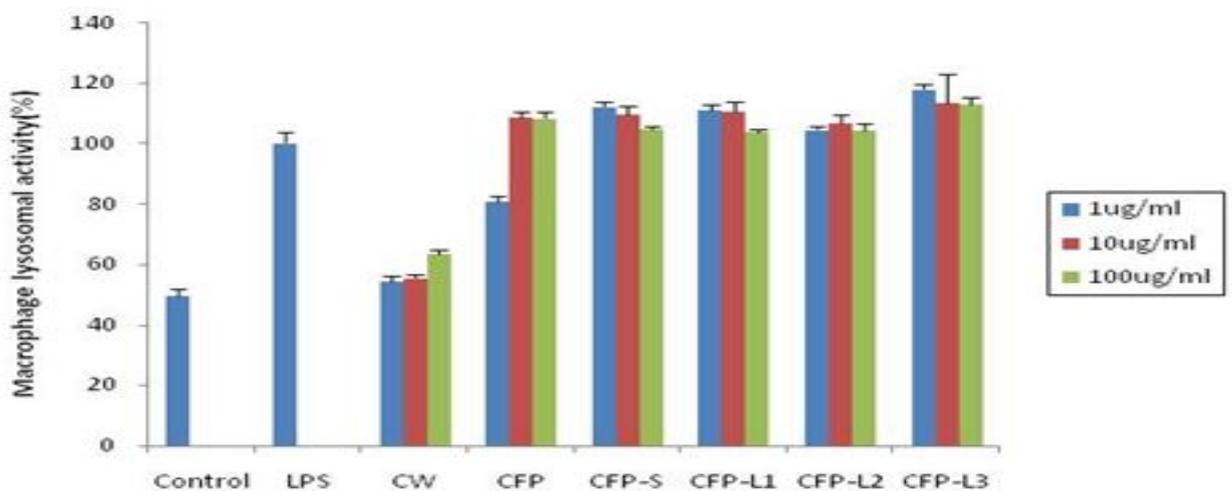


그림 70. C3GHi 미강 발효물의 대식세포 활성화능 비교

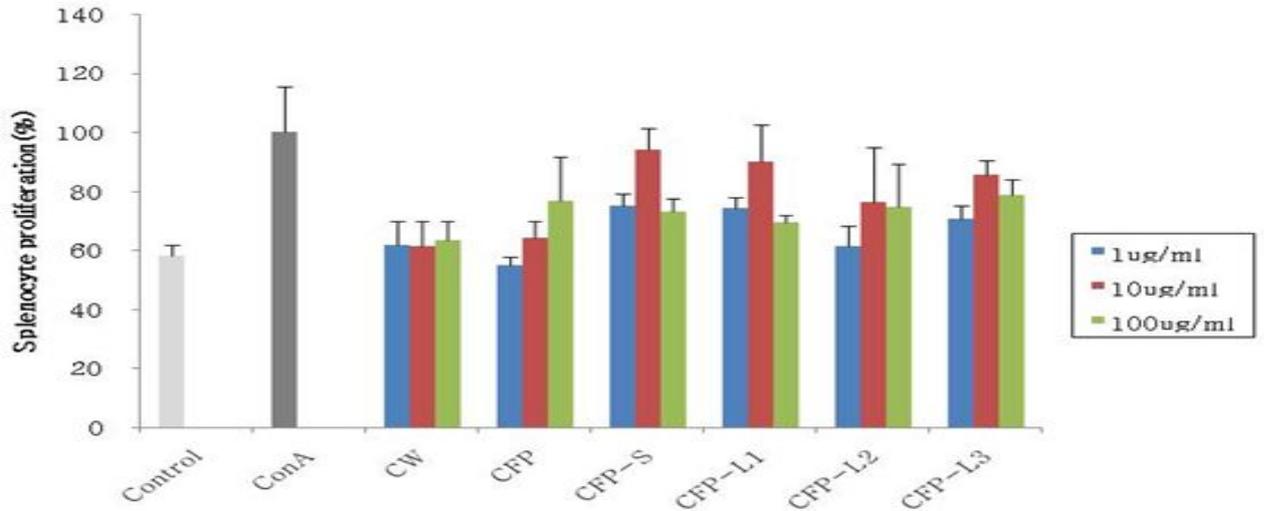


그림 71. C3GHi 미강 발효물의 비장세포 활성화능 비교

(나) 암세포 성장 억제능 비교를 통한 1차 선별

- 미강 유래 다당체는 암세포주에 대한 세포독성(cytotoxicity)를 보유하고 있는 것으로 나타나 있으며, 이를 바탕으로 본 연구에서 제조된 미강 발효 분말들의 인간유래 대장 암세포주(HT-29), 폐암세포주(A549), 자궁경부암세포주(Hela229)에 대한 암세포 성장 억제능을 측정하였음(그림 72).
- C3GHi의 발효를 하지 않은 추출물에서도 우수한 암세포에 대한 cytotoxicity를 나타내었으며, *Lentinus edodes* 발효물의 경우 HT-29, Hela-229세포주에 대해서는 발효 하지 않은 미강 추출물에 비하여 항암 활성은 저하되는 것으로 나타났으나 A549 세포에 대해서는 발효 되지 않은 C3GHi 추출물과 유사한 활성을 나타내어 발효로 인하여 항암 활성을 나타내는 성분의 활성이 감소한 것으로 추측됨.
- 또한, 2차 발효물의 경우에는 *L. gasseri*로 2차 발효한 시료(CFP-L3)와 *S. cerevisiae*로 2차 발효한 시료(CFP-S)가 C3GHi 미발효 추출물보다 우수한 항암 활성을 나타내는 것으로 조사되어, 2차 발효과정상에서 새로운 항암 성분이 생성되는 것으로 추측되었음.

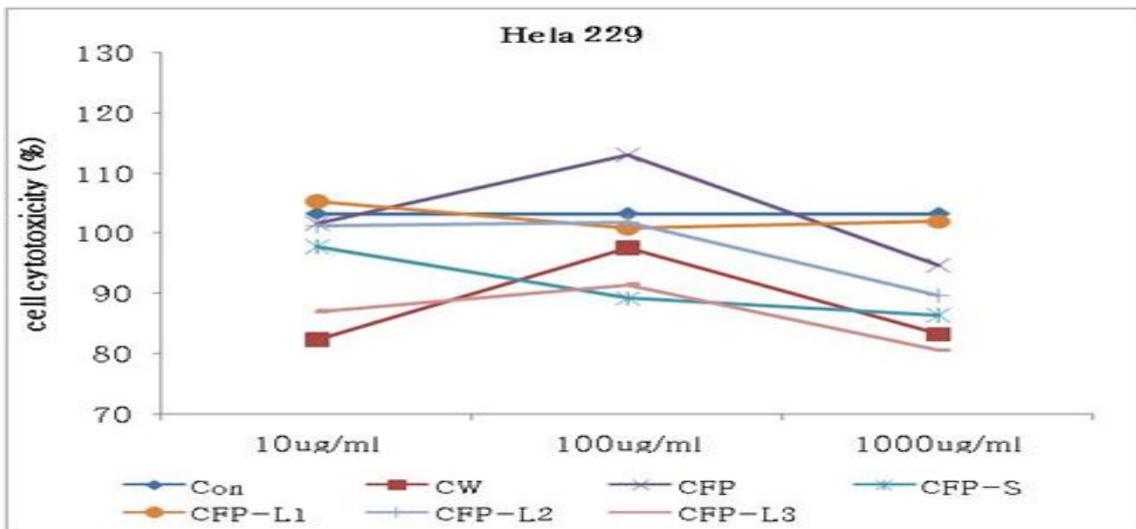
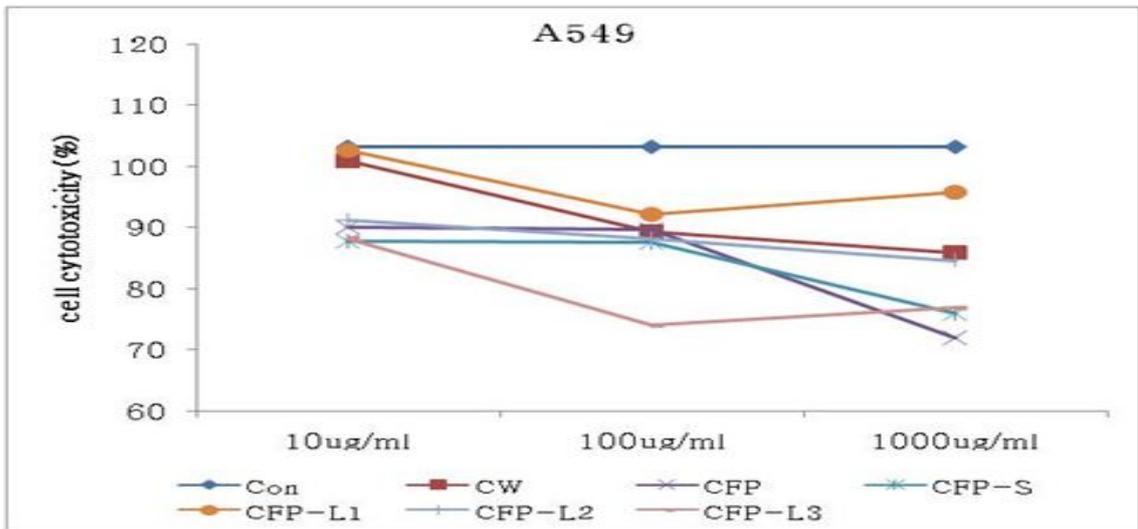
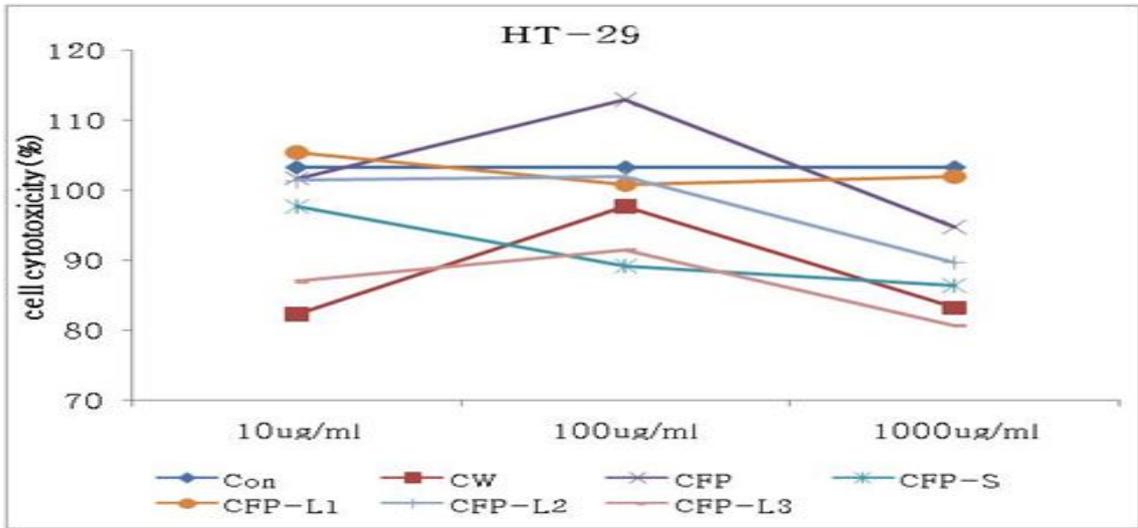


그림 72. C3GHi 미강 발효물의 암세포 성장 억제능

(3) 미강 발효물의 cytokine 활성 비교

- 비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 가지 종류의 사이토카인을 분비하는데, 사이토카인은 분비세포나 타 면역세포를 활성화 시키고, 성장 및 분화를 촉진하는 매개물질임. C3GHi의 미강 발효물은 면역세포의 활성을 자극하는 것으로 나타났으며, 면역반응의 신호전달 기전에 관여할 것으로 예상됨.
- 본 연구에서는 마우스의 비장으로부터 유래된 세포를 이용하여 C3GHi의 미강발효물이 cytokine 분비능(IFN- γ , IL-4, 6, 10, TNF- α)에 미치는 영향을 알아보려고 하였으며, 그 결과는 그림 73와 같음.
- C3GHi의 미강발효물은 IL-6, IL-10, TNF- α 의 분비를 자극하는 것으로 나타났으며, 농도 의존적인 증가량을 나타내었음. 특히, IL-6, TNF- α 의 분비능은 2차 발효시 더 증가하는 것으로 관찰되어 C3GHi의 2차 발효시 면역자극물질의 생성이 증대되어 일부 사이토카인의 분비를 자극시키는 것으로 판단된다.
- 따라서, C3GHi의 미강발효물은 면역세포를 자극하여 다양한 사이토카인의 생산을 촉진시켜 체내 면역시스템을 활성화 시키는데 기여할 것으로 판단됨.

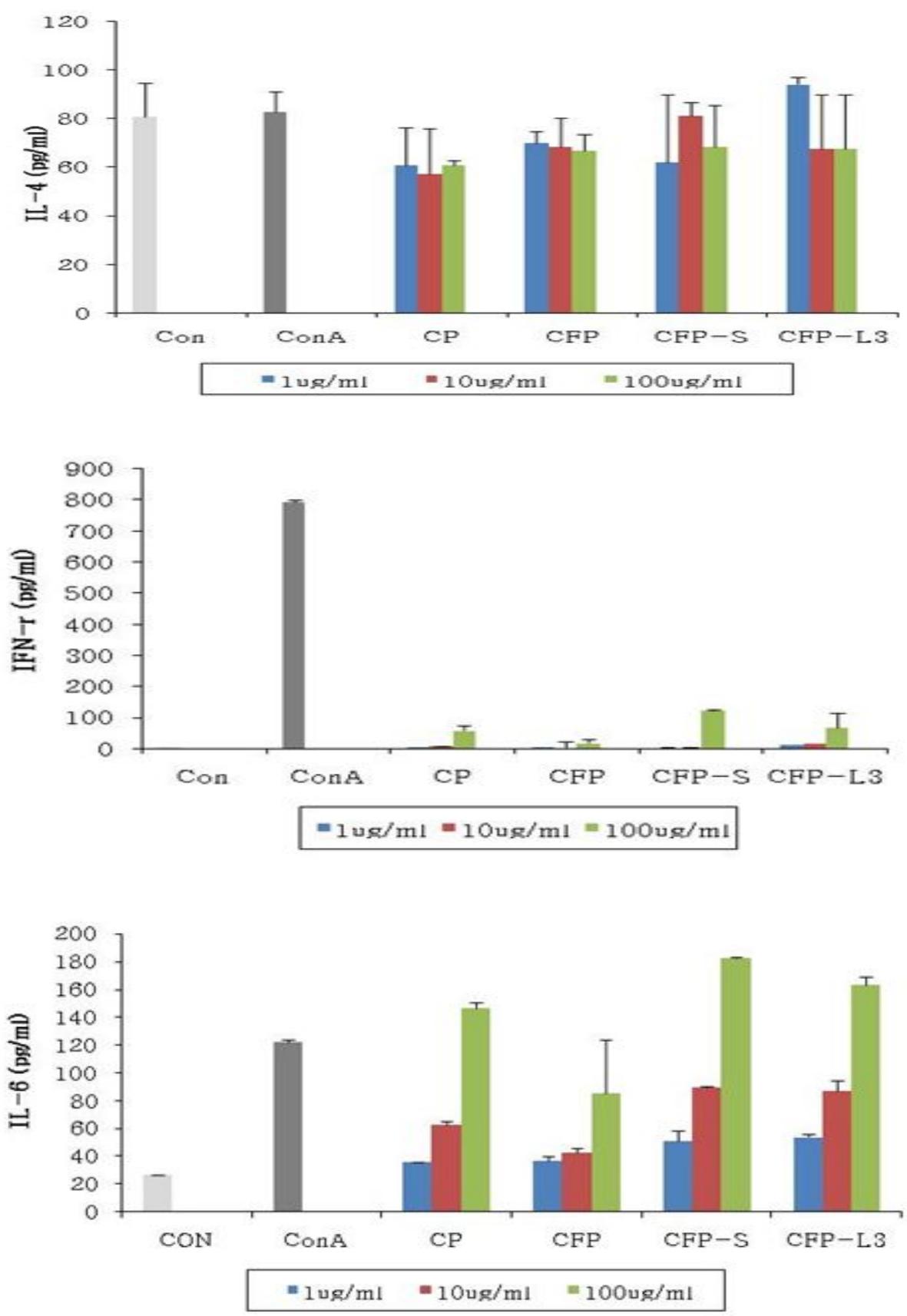
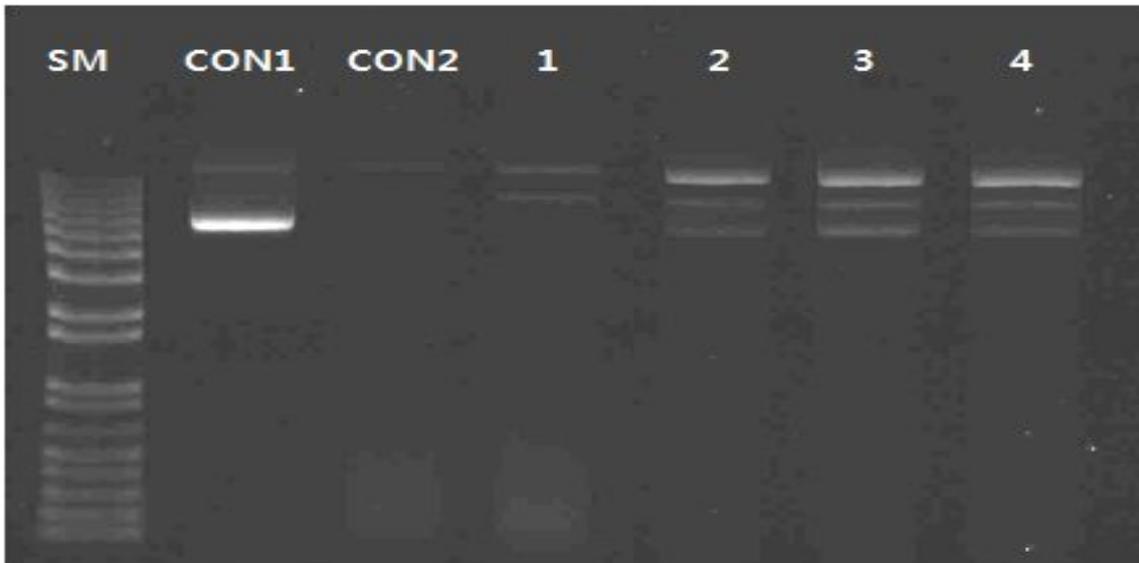


그림 73. C3GHi 미강 발효물의 Cytokine 분비능

(4) 미강 발효물의 항산화 활성비교

- C3GHi 품종은 타 흑미 품종에 비하여 높은 cyanidine-3-glucoside(C3G)를 함유하고 있으며, C3G는 오디, 포도 등에도 포함된 색소의 일종으로 강력한 항산화제로 보고되고 있음. 또한, 쌀의 미강의 경우에도 다양한 성분의 항산화 성분이 풍부하게 포함된 것으로 보고되고 있음.
- 본 연구에서 C3GHi의 미강 발효물에서의 발효과정상에서의 항산화 활성을 비교분석하였으며 그 결과는 그림 74과 같이 나타났음.
- DNA를 활성 산소종에 노출시키면 활성산소에 의해서 DNA breaking이 발생하며, 항산화제의 첨가에 의해서 이러한 산화적 손상을 억제하게 되며, 이를 통해 항산화 활성을 비교 분석할 수 있음.
- C3GHi 추출물의 단독 사용에서도 항산화 활성이 나타났으며, 발효 과정을 통해서 항산화 활성이 더 증대되는 것을 확인할 수 있었으며, 2차 발효를 통해서 항산화 활성이 더 증대되고 있는 것이 관찰되었음.
- 따라서, C3GHi의 발효 과정상에서 항산화 활성이 증대되고 있으며, 2차 발효과정을 통해 항산화 활성을 나타내는 물질들의 상대적 함량이 더 증대되고 있는 것으로 판단됨.



SM : size marker, CON1 : Control, CON2 : Negative control

1: CP : C3GHi only, 2: CFP : C3GHi fermented by *Lentius edodes*

3: CFP-S : C3GHi fermented by *Lentinus edodes* and *S. cerevisiae*

4: CFP-L3 :C3GHi fermented by *Lentinus edodes* and *L. brevis*

그림 74. C3GHi 미강 발효물의 DNA 산화손상 억제능

나. 슈퍼자미(C3GHi) 미강 발효물과 상업용 소재의 비교 평가

미강 유래의 다당체가 체내의 면역 기능 활성화, 항암 및 다양한 기능을 함유하고 있는 연구가 확보되면서 미강으로부터 유래되는 면역 소재의 상품화가 진행되고 있음.

미강 유래 면역 증진 소재의 상업화는 협동연구기관인 (주)이룸과 일본의 대화제약이 현재 상품으로서 출시하고 있으며, 이 두 소재와 본 연구개발에서 개발되는 C3GHi를 이용한 미강 유래 다당체와 활성을 상호 비교하였다. 현재 시판되고 있는 두 소재(ERP, RFP)와 C3GHi 미강 발효물의 활성을 대식세포 활성을 통해서 수행했을 때, ERP, RFP와의 비교에서 C3GHi (CFP) 발효물에 비하여 C3GHi를 사용한 발효물이 더 우수한 것으로 나타나 면역 기능을 활성화하는데 있어서 C3GHi의 미강 성분이 일반 미강 성분보다 더 우수한 것으로 추측됨. 또한, 2차 발효물을 이용하였을 때는 현재 시판되고 있는 소재들에 비해서 모든 농도에서 더 우수한 결과를 나타내어 C3GHi 품종을 이용하여 기능성 소재로의 활용 시 상대적 우위를 가져 상업성을 확보할 수 있을 것으로 판단됨(그림 75). 비장세포의 결과에서도 표고버섯균주만의 1차 발효물에서 시판소재와 C3GHi 소재간의 결과가 유사하였으나, 2차 발효물에서 현재 시판되고 있는 상업용 소재에 비해서 상대적으로 우수한 결과를 나타내었음(그림 76).

따라서, 현재 상업화 된 소재와의 비교분석 결과에서 C3GHi 미강의 2차 발효물이 우수한 결과를 바탕으로 상업화시에 충분한 경쟁력을 가진 소재가 될 수 있을 것으로 판단됨.

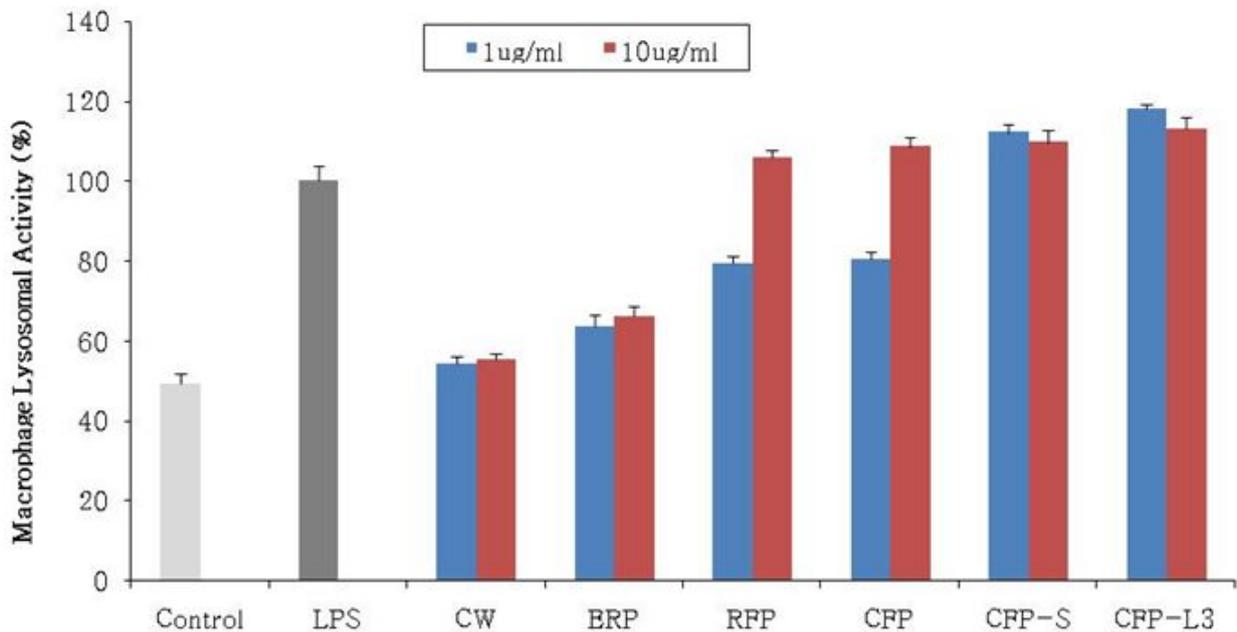


그림 75. 시판소재와 C3GHi 품종의 대식세포 활성화 기능 비교

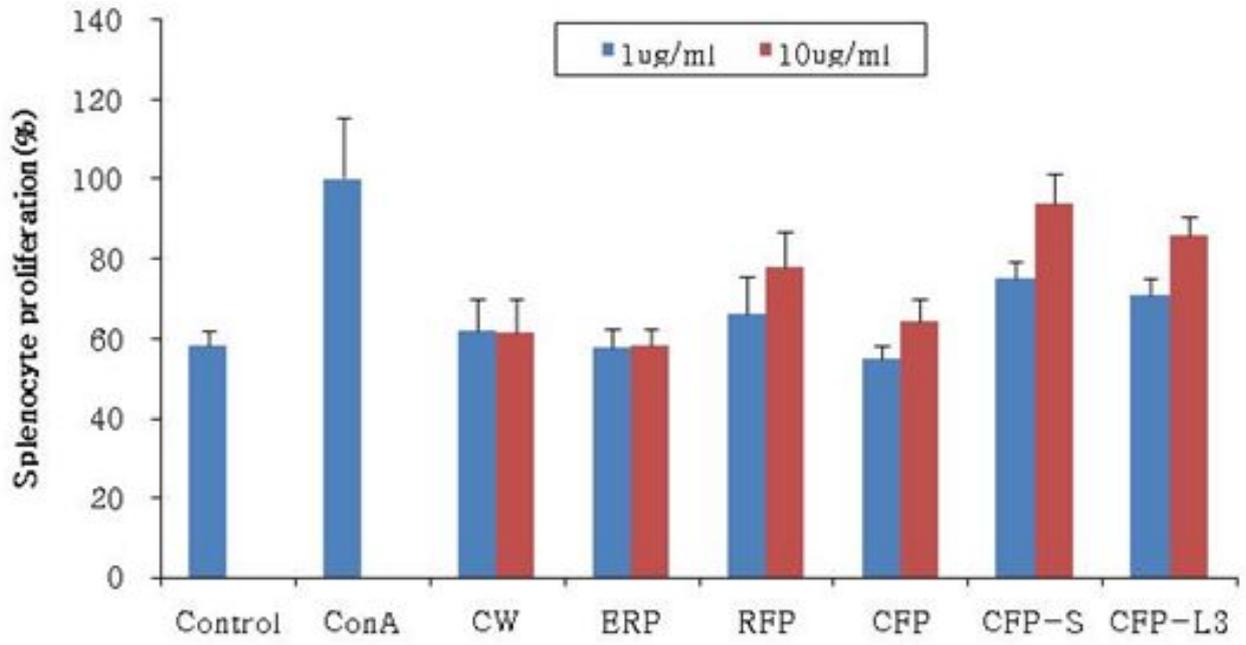


그림 76. 시판소재와 C3GHi 품종의 비장세포 활성화 기능 비교

2. 슈퍼자미 미강 발효물의 생리활성 검증

슈퍼자미의 미강을 1차 발효 또는 2차 발효를 통하여 얻어진 미강 발효물에 대한 면역 기능 관련 1차 검증을 거쳐서 아래 표 22와 같이 1종의 발효 분말 및 2종의 복합 발효분말을 선별 하였으며, 이에 대해서 보다 정밀한 생리활성에 대한 검증을 수행하였다.

표 22. 슈퍼자미벼 발효물 및 복합발효분말

시료 번호	Group	Sample Name	1차 발효균주	2차 발효균주
1	CFP	슈퍼자미벼 발효분말	-	-
2	CFP-S	슈퍼자미벼 복합발효물 1	<i>Lentinus edodes</i>	<i>S. cerevisiae</i>
3	CFP-L	슈퍼자미벼 복합발효물 2	<i>Lentinus edodes</i>	<i>L. gasseri</i>

가. 항산화 활성의 검증

1차년도에서 일반 미강을 사용한 미강발효분말과 슈퍼자미벼 품종을 사용한 미강 분말과의 항산화 활성을 DNA degradation 방법을 사용하여 평가하였을 때 슈퍼자미벼 품종을 사용한 미강발효분말의 항산화 활성이 우수하였음을 확인하였으나 이를 정량적 지표로서 재 검증 하였다. 항산화 활성의 비교는 현재 많이 사용되고 있는 방법인 ORAC법과 혈장 항산화력 측정 방법으로 활용되고 있는 TAS (Total Antioxidant Status) 법을 사용하여 비교 정량하였다.

ORAC 비교에서 슈퍼자미벼 미강 발효물(슈퍼자미벼)의 ORAC를 측정한 결과 수용성 535 μ mole TE/g, 지용성 648 μ mole TE/g으로 total ORAC value는 1,183 μ mole TE/g으로 나타났으며, 일반 미강 사용 미강 발효분말(EROM-4)의 ORAC는 수용성 326 μ mole TE/g, 지용성 446 μ mole TE/g으로 total ORAC value 772 μ mole TE/g으로 나타났다(그림 77). 그 결과 슈퍼자미벼와 일반벼 미강발효분말의 ORAC 비교 시 슈퍼자미벼의 ORAC가 1.5배 정도 높게 나타나 미강 발효 시에도 슈퍼자미벼 품종을 사용하였을 때가 더 높은 항산화 활성을 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었다.

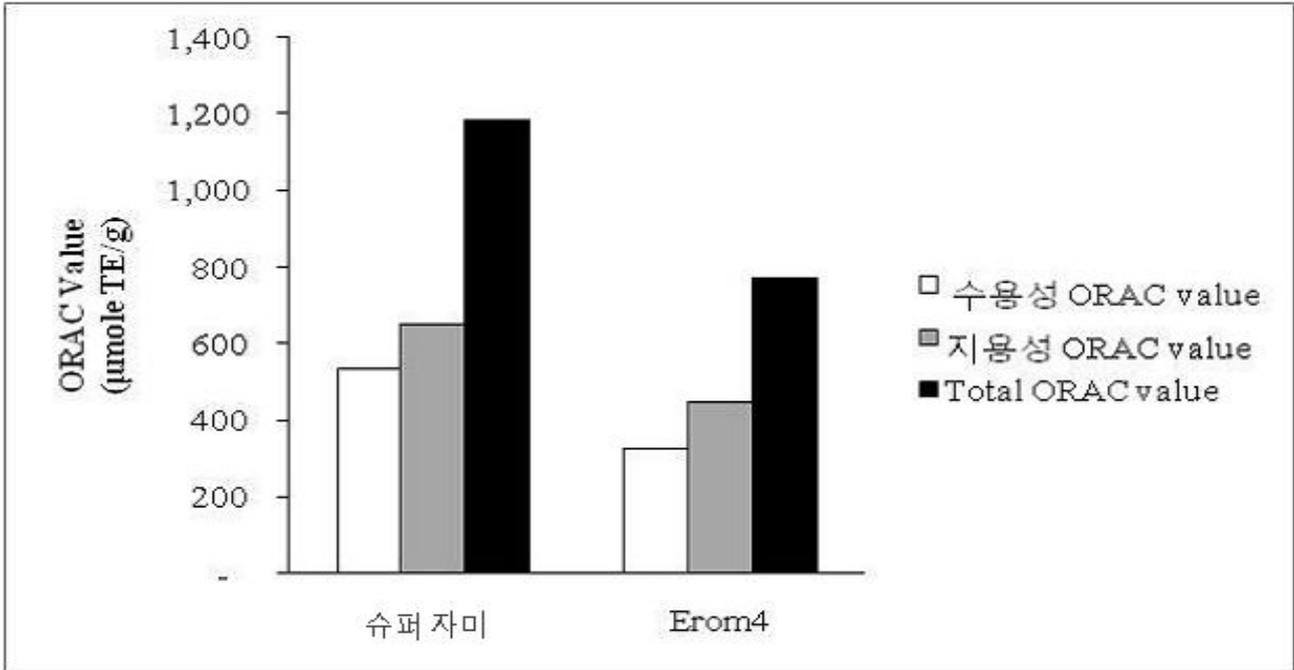


그림 77. 슈퍼자미벼, 슈퍼자미벼 미강 발효물과 일반미강발효추출물의 ORAC 비교

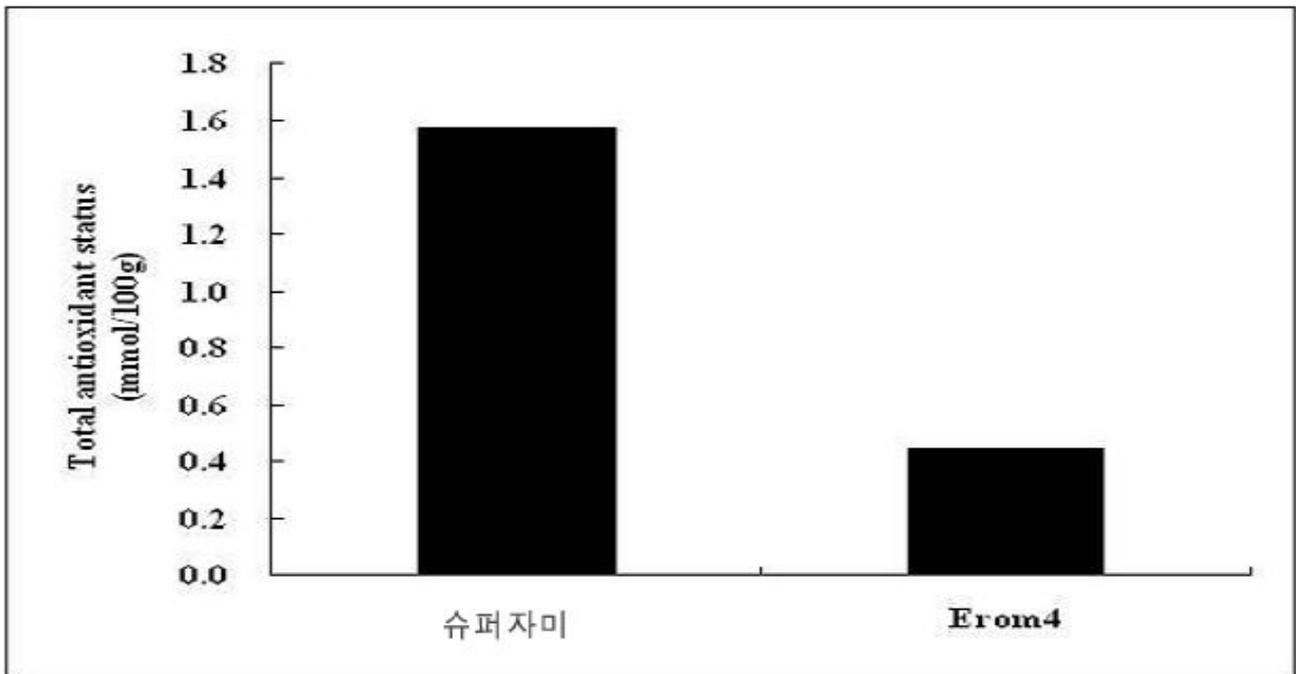


그림 78. 슈퍼자미 미강발효물과 일반미강발효물의 TAS 활성 비교

TAS 측정법에서 슈퍼자미벼의 TAS 값은 1.6mmol/100g, 일반벼 미강발효물은 0.4mmol/100g으로 나타나 슈퍼자미벼는 일반벼 미강발효물에 비해 3.5배 높은 TAS 값을 나타내어 ORAC와 동일하게 슈퍼자미벼 사용 발효물에서 항산화력이 더 좋은 것으로 나타났으며, 이는 1차년도에서와 동일한 결과이다(그림78).

나. 항산화 활성의 검증

슈퍼자미벼 품종을 이용한 미강 발효물 및 복합 미강 발효물의 안전성을 1차로 규명하기 위

하여 L929 세포열을 이용한 세포독성을 7.8ug/mL~1,000ug/mL의 농도에서 관찰하였다.

그 결과, 1000ug/mL 농도를 최대로 하였을 때 슈퍼자미버 미강 발효 분말(CFP), 유산균 및 효모균을 활용한 2차 발효분말(CFP-S, CFP-L) 모두에서 최고 농도에서 대조군 대비 95% 이상의 세포 생존율을 나타내어 모든 시료에서 세포 독성이 나타나지 않아 본 시료는 식품으로서의 사용에 대한 1차적인 안전성을 확보하고 있는 것으로 판단된다(그림 79).

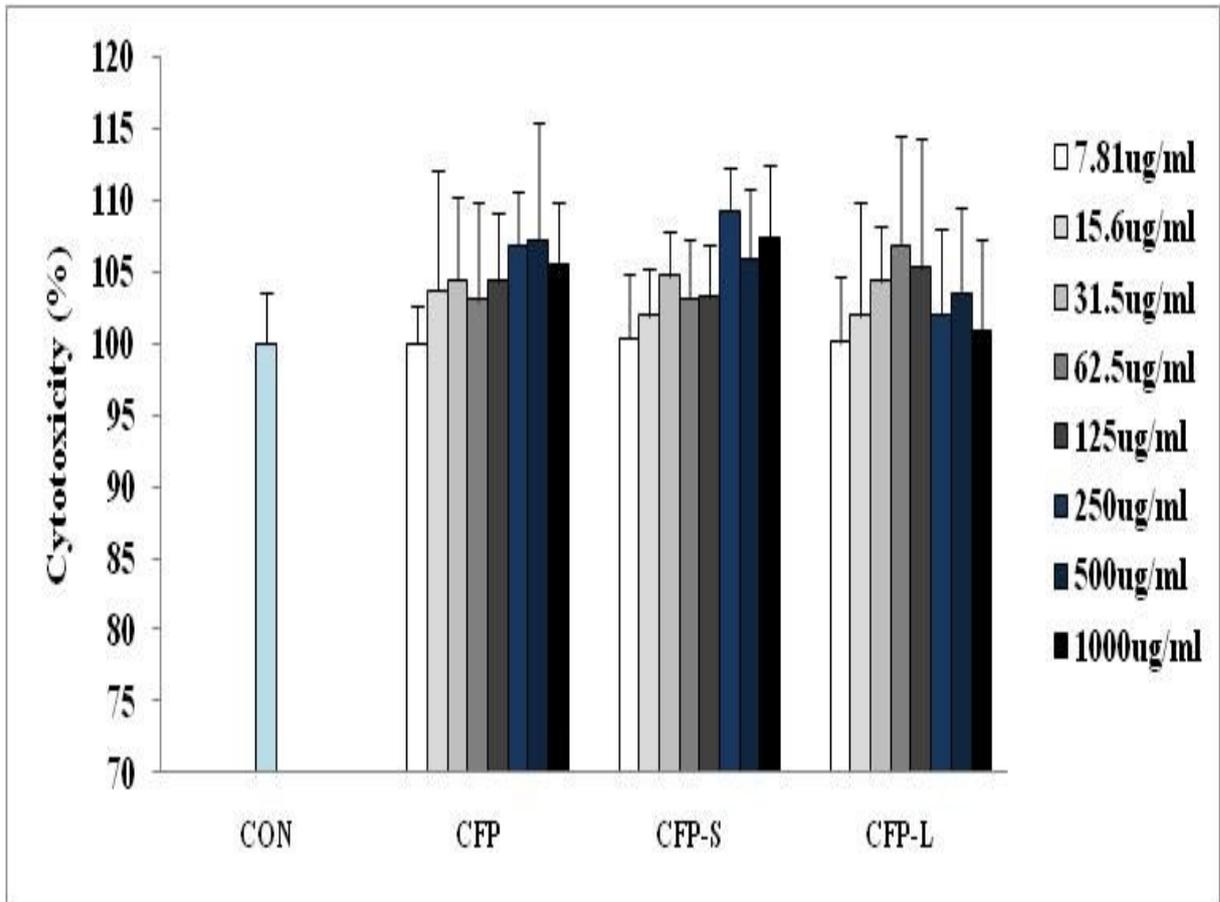


그림 79. L929 세포주를 이용한 세포독성 평가

CFP: 슈퍼자미버 미강 발효물, CFP-S: 슈퍼자미버 미강 효모 복합 발효물, CFP-L: 슈퍼자미버 미강 유산균 복합 발효물

다. In vivo에서 면역 증강 활성의 평가

1차년도에서 animal cell-based assay에서 면역 증강 기능을 확인하였으나, 실제 in vitro상의 실험은 직접적인 면역세포와 시료의 접촉이 가능한 반면 식품으로서 경구 섭취하였을 때는 소화관의 소화작용 및 흡수성, 흡수 후 조직간의 이동 등의 영향으로 in vitro 시험과는 차이가 나타날 수 있다. 따라서 당해연도 연구개발에서는 1차년도에 면역 증진 활성이 상대적으로 우수한 것으로 판정된 CFP-L과 CFP-S 시료에 대해서 경구 섭취에 의한 면역 증강 기능을 대식 세포, 비장 세포 및 cytokine 분비량에 의해서 관찰하였다.

이를 위해 실험동물에서 CFP, CFP-L, CFP-S를 각기 250mg/kg의 비율로 4주간 경구 투여 후

실험동물로부터 대식세포(macrophage)와 비장세포(splenocyte)를 분리하여 각각의 세포 활성화 및 대식세포로부터 분비되는 cytokine의 함량을 측정하였다.

시료를 섭취한 실험동물의 최종 체중무게를 비교한 결과 모든 실험물질군에서는 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 장기무게 역시 비장과 간, 심장의 무게를 측정하였을 때 각 군별 유의적인 차이는 나타나지 않아 본 연구에 사용된 시료가 독성 등의 부작용을 나타내고 있지 않은 것으로 판단된다(표 23).

표 23. 4주간 시료를 섭취한 실험동물의 체중 및 장기무게 비교

Group	Final body weight(g)	Spleen(g)	Liver(g)	Heart(g)
NC	27.14±1.38	0.111±0.010	1.164±0.065	0.136±0.014
CFP	26.25±1.32	0.108±0.015	1.037±0.027	0.136±0.010
CFP-S	27.60±1.30	0.111±0.014	1.118±0.091	0.143±0.025
CFP-L	27.11±1.12	0.107±0.011	1.096±0.042	0.141±0.013

또한, 대식세포활성은 T 세포의 활성을 유도하는 물질로 알려진 mitogen LPS를 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 측정하였으며, 실험결과 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 대조군에 비해 CFP-S군의 세포활성이 유의적으로 높게 나타났다. CFP군은 유의성은 없으나 대조군에 비해 활성이 증가하는 경향을 나타내었으며, LPS를 처리한 세포에서는, CFP, CFP-S군 모두 대조군에 비해 유의적으로 대식세포 활성이 증가하였다(그림 80).

1차년도에서 실시한 in vitro 시험에서는 CFP-L, CFP-S 양 시료 모두에서 대식세포 활성 증가능이 관찰되었으나 in vivo 시험에서는 CFP-S가 우수한 기능을 나타낸 반면 CFP-L에서는 대식세포 활성화능이 미약한 것으로 나타났으며, CFP-S의 경우 2차 발효를 한 시료가 1차 발효물에 비해서 우수한 기능을 나타내어 2차 발효를 통해 기능성을 강화할 수 있는 것으로 판단된다.

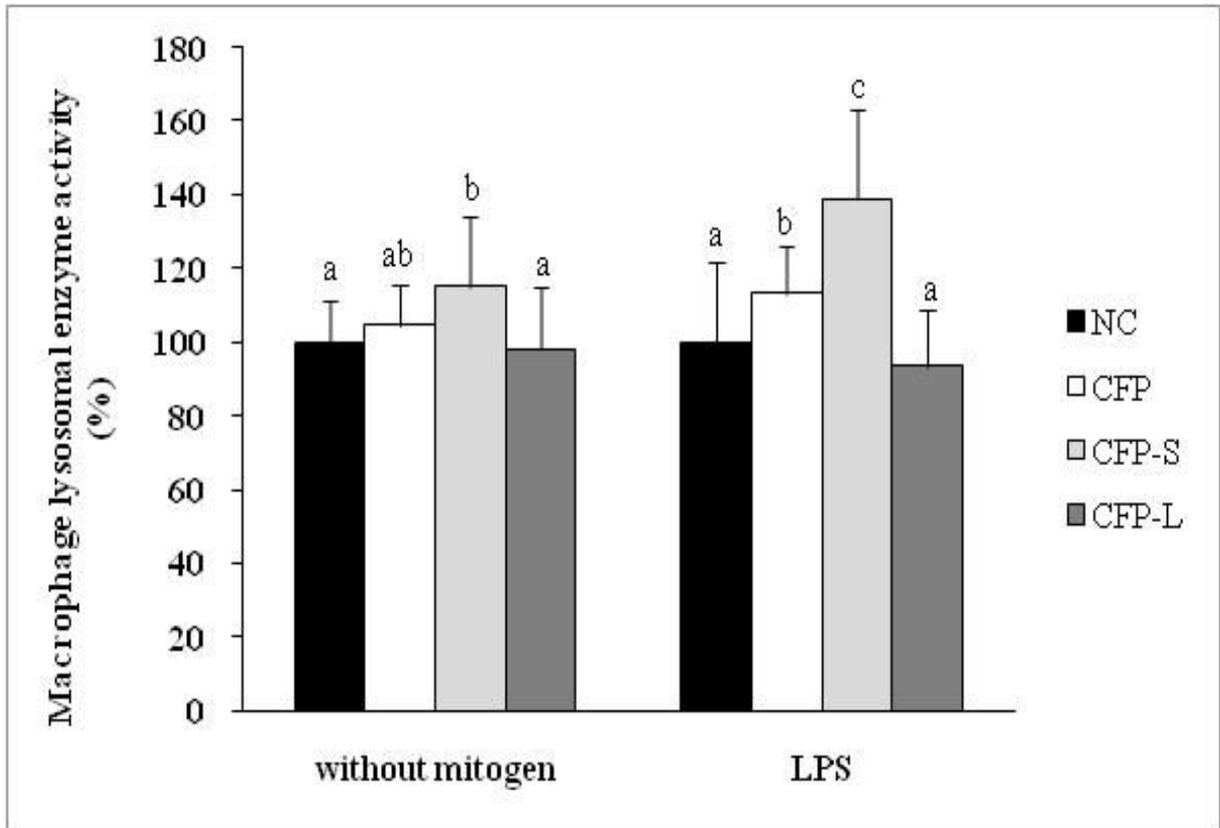


그림 80. 슈퍼자미버 미강 발효물의 섭취가 대식세포 활성화에 미치는 영향
 NC(음성대조군): 멸균중류수, CFP: 슈퍼자미버 미강 발효물,
 CFP-S 슈퍼자미버 미강 복합 발효물 1, CFP-L: 슈퍼자미버 미강 복합 발효물 2

비장세포의 증식능 측정은 B세포를 활성화시키는 mitogen인 ConA, T 세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS를 처리한 것과 mitogen을 처리하지 않은 것으로 나누어 실시하였으며, mitogen을 처리하지 않은 비장세포에서는 모든 실험물질군에서 대조군에 비해 비장세포 증식능이 높게 나타났고 CFP-S>CFP>CFP-L순으로 세포증식능이 나타났다.

ConA를 처리한 비장세포에서는 CFP군에서만 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, LPS를 처리한 비장세포에서도 CFP 세포증식이 가장 높게 나타났고 대조군과 유의적인 차이를 나타내었으며, 그 외의 군은 유의적 차이는 나타나지 않았지만 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다(그림 81).

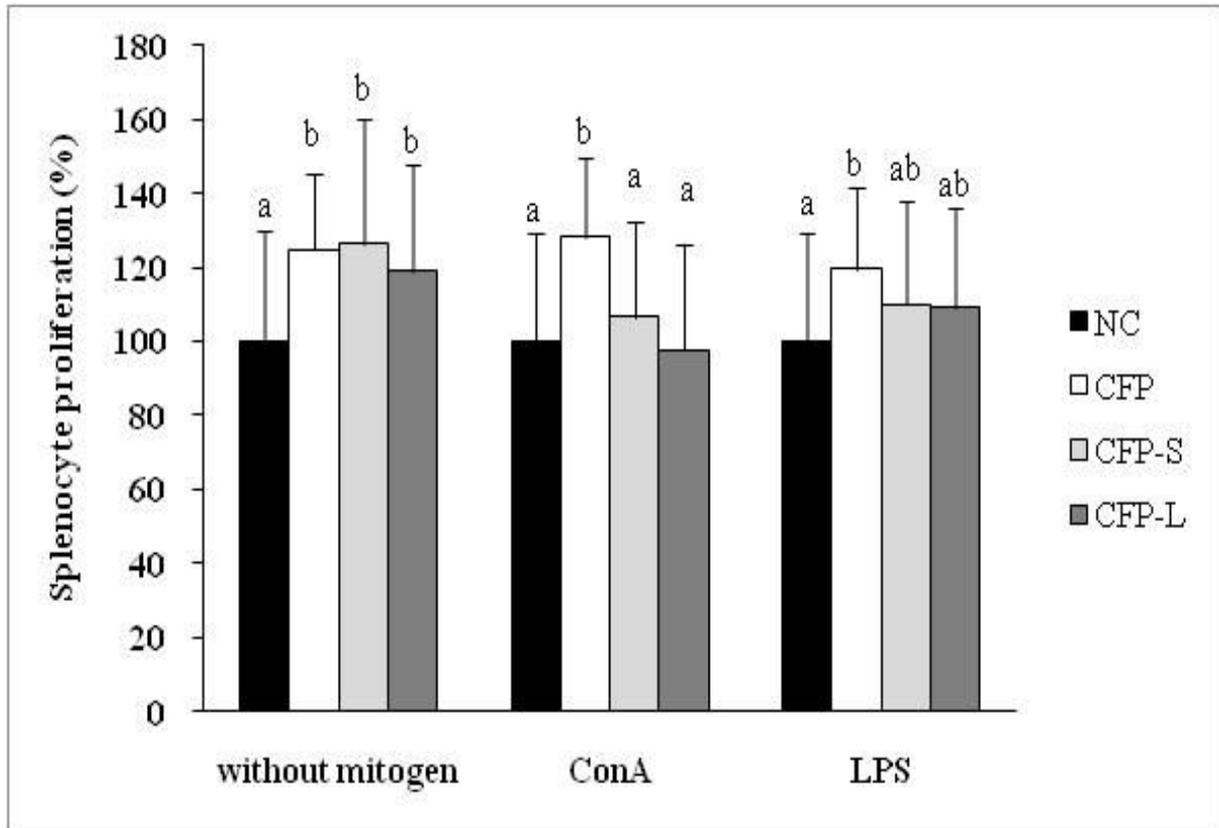


그림 13. 슈퍼자미벼 미강의 발효 시료가 마우스의 비장세포 증식에 미치는 영향.

NC(음성대조군): 멸균증류수, CFP: 슈퍼자미벼 미강 발효물,

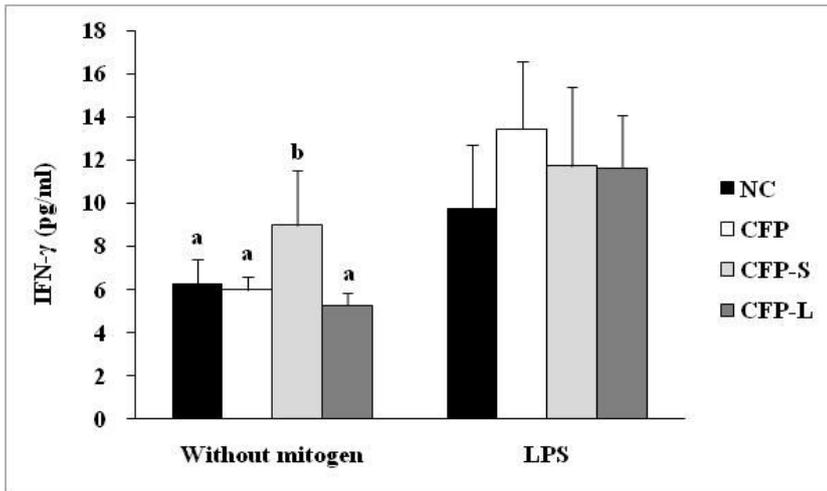
CFP-S 슈퍼자미벼 미강 복합 발효물1, CFP-L: 슈퍼자미벼 미강 복합 발효물

대식세포 cytokine 분비량 측정은 대식세포에 LPS처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 각 상층액을 회수 하여 IFN- γ , TNF- α , IL-6의 cytokine 함량을 측정한 결과, IFN- γ 농도 측정 결과, LPS를 처리하지 않은 배양액에서는 CFP-S군이 대조군보다 유의적으로 높게 나타났으며, LPS를 처리한 상층액에서는 모든 실험물질들은 대조군과 유의적 차이를 나타내지는 않았으나 대조군 보다 증가하는 경향을 나타내었다.

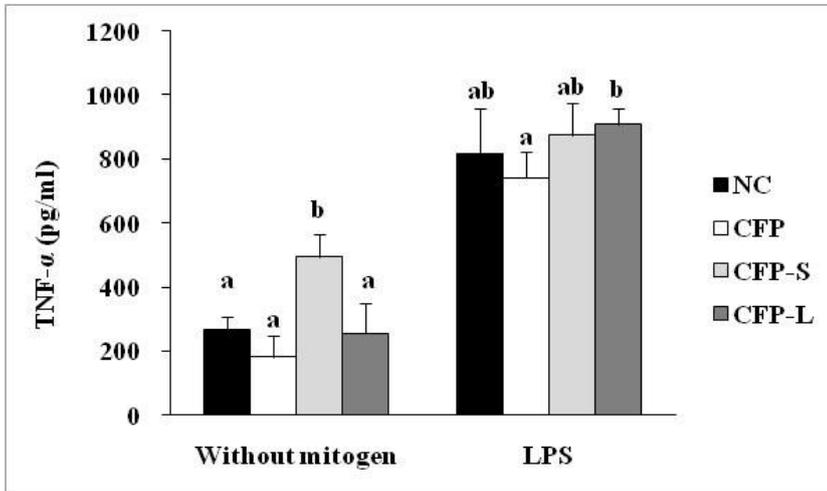
TNF- α 농도 측정결과, LPS를 처리하지 않은 배양액에서는 CFP-S군이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났고, LPS를 처리한 배양액에서는 모두 대조군에 비하여 유의적인 변화가 관찰되지 아니하였으며, CFP에 비하여 2차 발효물인 CFP-L이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.

IL-6의 농도 측정결과, LPS를 처리하지 않은 배양액에서는 모든 실험물질이 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, LPS를 처리한 배양액에서는 CFP-S군이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났고 CFP군은 유의성은 없었으나 대조군에 비해 IL-6의 함량이 높은 것으로 나타났다(그림 82).

(a)IFN- γ



(b)TNF- α



(c)IL-6

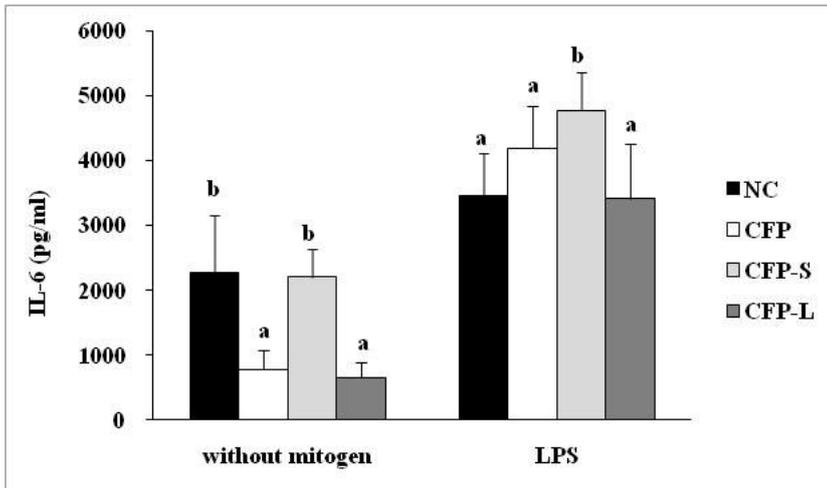


그림 82. 슈퍼자미버 미강 발효 시료가 대식세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향
NC(음성대조군): 멸균증류수, CFP: 슈퍼자미버 미강 발효물,
CFP-S 슈퍼자미버 미강 복합 발효물1, CFP-L: 슈퍼자미버 미강 복합 발효물

라. 항염 활성의 측정

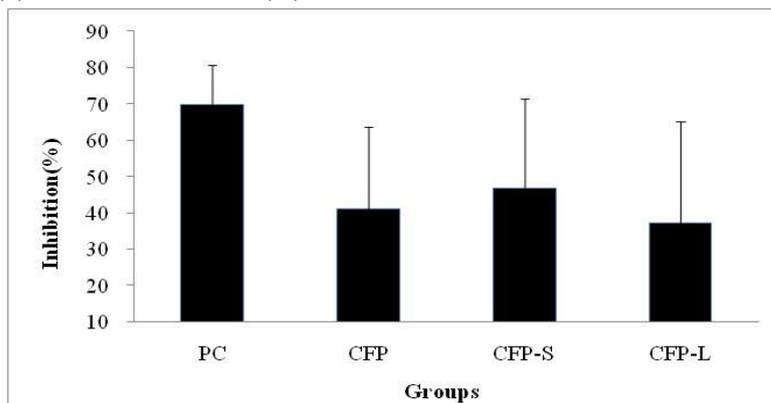
항염 활성의 측정은 실험동물의 내이(內耳)에 염증 유발 물질을 도포한 후 염증에 의해서 증가하는 귀의 두께를 측정하는 ear-edema model을 사용하여 측정하였다.

실험동물의 내이에 3% arachidonic acid를 마우스 왼쪽과 오른쪽 귀에 전체적으로 도포하고 2분 정도 경과 후 왼 쪽 귀에는 acetone(30ul/ear)을 처리하고 오른쪽 귀에는 각 시료를 (30ul/ear)를 처리 한 후 샘플 처리 전과 후의 귀 두께 값을 이용하여 inhibition(%)과 Ear edema (%)를 구하였다.

실험결과 대조군에 대한 부종억제 효과는 PC(인도메타신)군이 가장 좋았으며, 실험물질군에서는 CFP-L>CFP-S>CFP 순으로 나타났으며, Ear edema(%)는 PC 군이 7.1%, NC 군이 21.1%, CFP-S군 12.8%, CFP 12.1%, CFP-L 16.5%로 나타났다.

따라서 3종의 시료 모두에서 40%이상의 염증 억제 활성이 관찰되었으며, 유의적 차이는 나타나지 않았으나 CFP-S에서 가장 우수한 염증 활성이 존재하는 것으로 확인되었다(그림 83).

(a) Edema Inhibition (%)



(b) Ear edema (%)

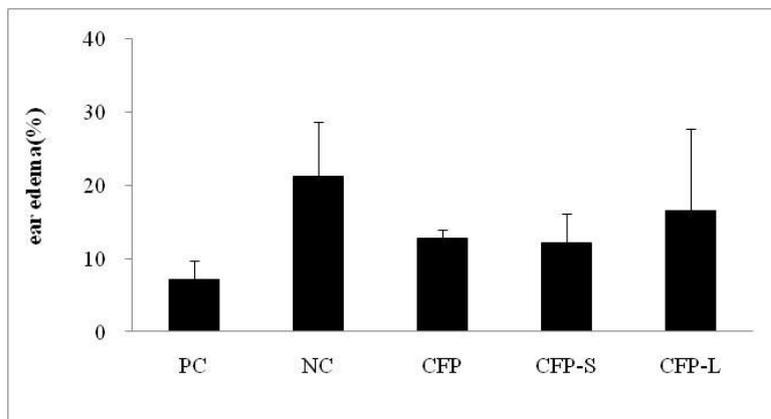


그림 83. Arachidonic acid를 처리한 마우스에서 실험물질들의 부종억제효과.

NC: 음성대조군, PC: 양성대조군, CFP: 슈퍼자미버 미강 발효물,

CFP-S: 슈퍼자미버 미강 복합 발효물 1, CFP-L: 슈퍼자미버 미강 복합 발효물 2.

마. 항알러지 활성의 측정

슈퍼자미버 미강 발효물의 항알러지 기능을 관찰하기 위하여 비만 세포주인 RBL-2H3 세포주에 compound 48/80으로 알러지 반응을 유발시킨 후 나타나는 n-hexoaminidase의 분비량을 관찰하였다. 슈퍼자미버 미강을 표고버섯과 효모로 2차 발효한 CFP-S 는 음성 대조군과 비교할 때 hexoaminidase의 유리가 유의적으로 감소시켰으며, 표고버섯 단독 발효물과 비교할 때도 역시 유의적으로 낮은 활성을 보였다(그림 84).

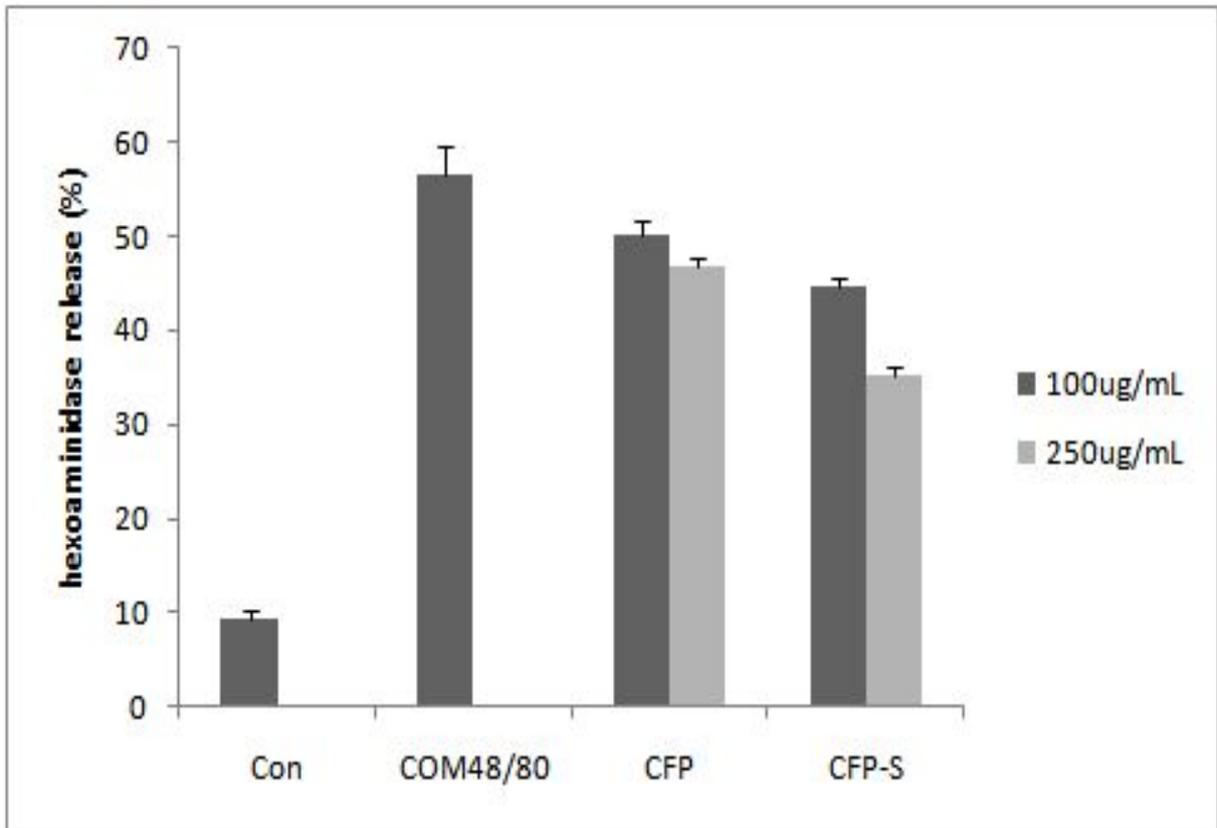


그림 84. Compound 48/80으로 유도 된 비만세포 RBL-2H3의 hexoaminidase 유리에서 미강 발효물의 항알러지 효과

Con: 음성대조군, Com48/80 : Compound48/80 단독처리군

CFP: 슈퍼자미버 미강 발효물, CFP-S: 슈퍼자미버 미강 복합 발효물 1,

알러지 반응에서 비만세포에 의해서 증가되는 histamin의 양을 정량한 결과 hexoaminidase와 유사한 결과를 얻어 CFP-S가 가장 우수한 활성을 보였으나 저농도에서는 상대적으로 CFP와 CFP-S간에 유의적 차이는 나타나지 않았으나 고농도에서는 CFP-S가 항알러지 활성이 증대하는 것을 확인하였다(그림 85).

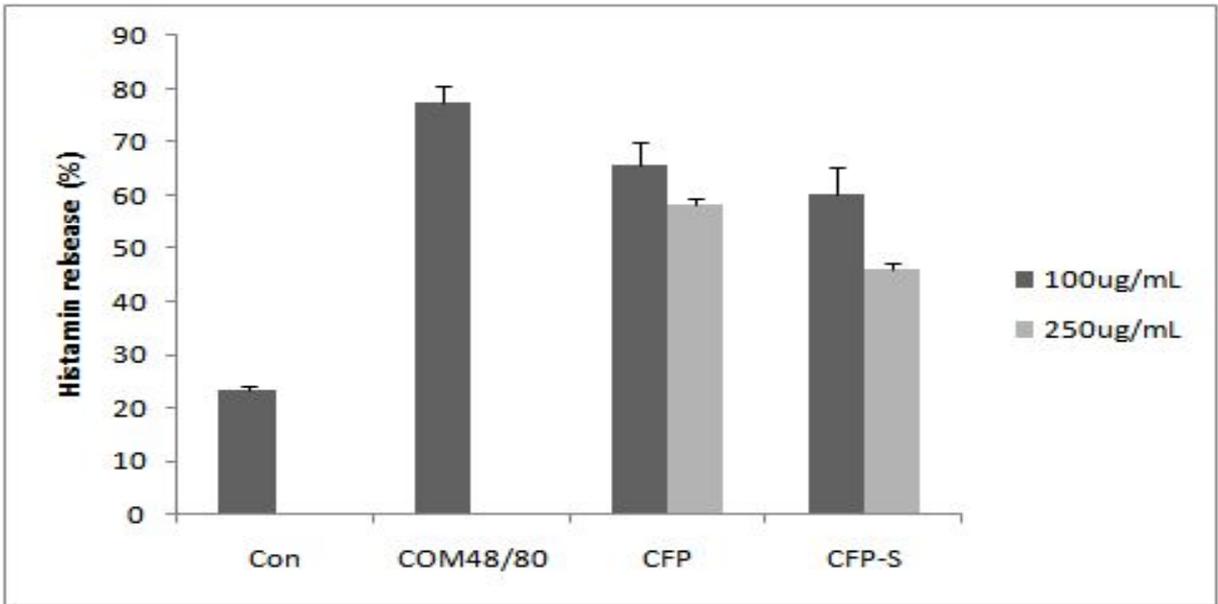


그림 17. Compound 48/80으로 유도 된 비만세포 RBL-2H3의 hexoaminidase 유리에서 미강 발효물의 항알러지 효과

Con: 음성대조군, Com48/80 : Compound48/80 단독처리군

CFP: 슈퍼자미벼 미강 발효물, CFP-S: 슈퍼자미벼 미강 복합 발효물 1

이뮤노글로부린(Immunoglobulin)중 IgE는 알러지 반응시에 증대되는 것으로 알려져 있으며 마우스의 복강에서 분리된 B세포를 이용하여 IgE 분비량을 관찰한 결과에서도 CFP에 비해서 CFP-S가 항알러지 활성이 더 증가한 것으로 나타났다(그림 86).

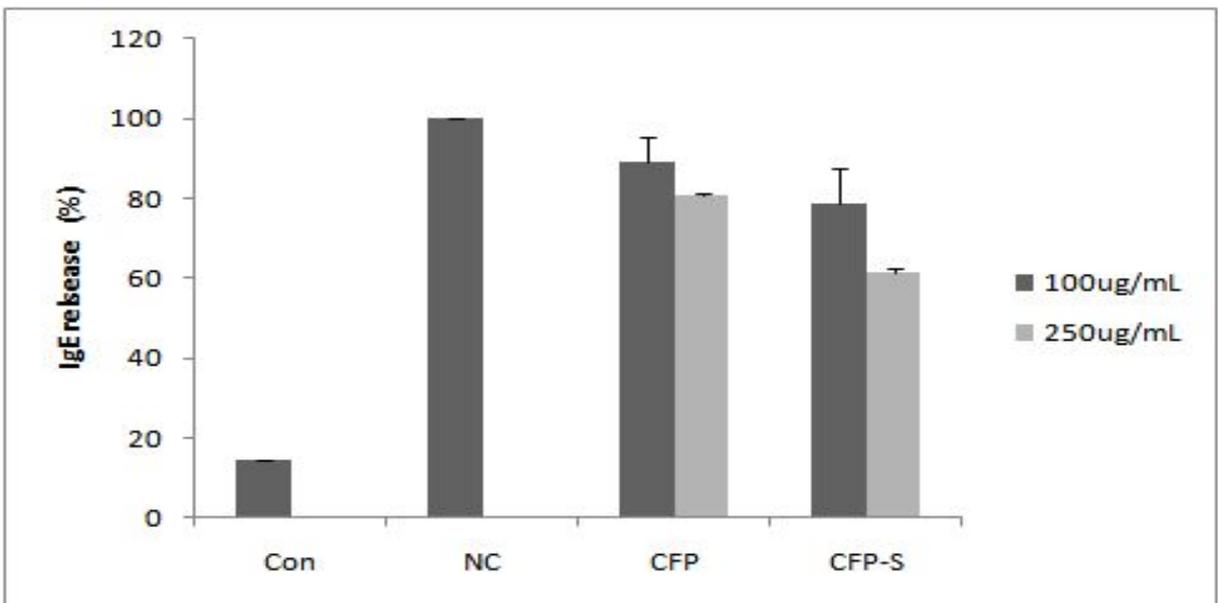


그림 86. B세포의 IgE 생산에서 미강발효물의 항알러지 효과

Con: 음성대조군, Com48/80 :

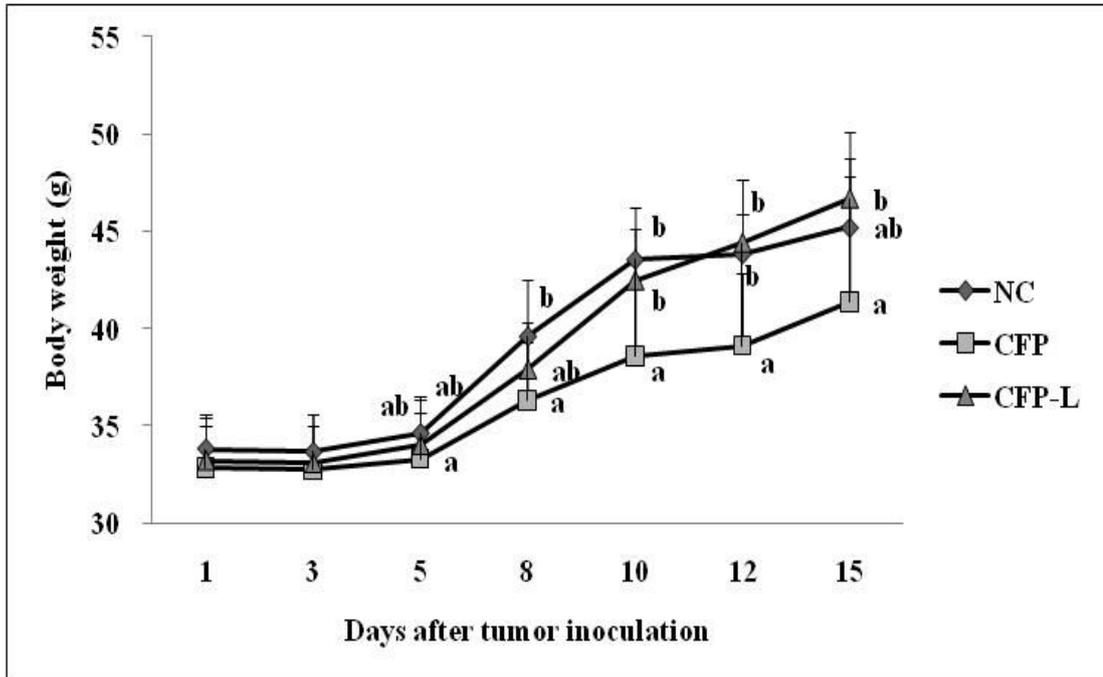
CFP: 슈퍼자미벼 미강 발효물, CFP-S: 슈퍼자미벼 미강 복합 발효물 1

바. 항암 활성의 측정

항암 활성은 복수암 모델과 고형암 모델 두가지로 나누어 실시 하였으며, 복수 모델의 경우 체중을 통해 항암 활성을 측정하였고, 고형암 모델의 경우 일정 기간 경과 후 종양의 무게를 측정하여 항암 활성을 관찰하였으며, 1차년도에서 항암 활성이 가장 우수한 것으로 판단된 유산균(*L. gassei*)을 활용한 2차 발효물과 1차 발효물과의 비교를 수행하였다. 또한, 고형암 모델에서는 시험 후 각 장기의 무게를 측정하여 시료가 발암 모델에서 미치는 영향을 관찰하였으며 또한, 혈액학적 분석을 통해 혈구에 미치는 영향도 관찰하였다.

각 군별 체중변화의 측정은 복수암으로 인해 실험동물의 희생이 나타나기 전까지인 15일까지로 한정하여 측정하였으며, 암세포 이식 후, 5일부터 모든 실험동물의 체중은 급격하게 증가하는 것으로 관찰되었다. 암세포 이식 후 8일째부터는 CFP군이 대조군에 비해 유의적으로 체중이 적게 나갔으며 CFP-L군은 유의성은 없었지만 체중이 적게 나가는 경향을 나타내었으나, 10일부터는 CFP-L군의 체중이 급격하게 증가하면서 대조군과 비슷한 체중을 나타냈으며 12일째부터는 대조군 보다 체중이 더 증가하는 것으로 나타나 2차 발효물이 항암 효과가 크지 않은 것으로 나타났으며, 반면에 1차 발효물인 CFP군은 복수암에 대한 항암 효과가 나타나는 것으로 판단된다(그림 87).

(a) 체중변화



(b) 체중증가율

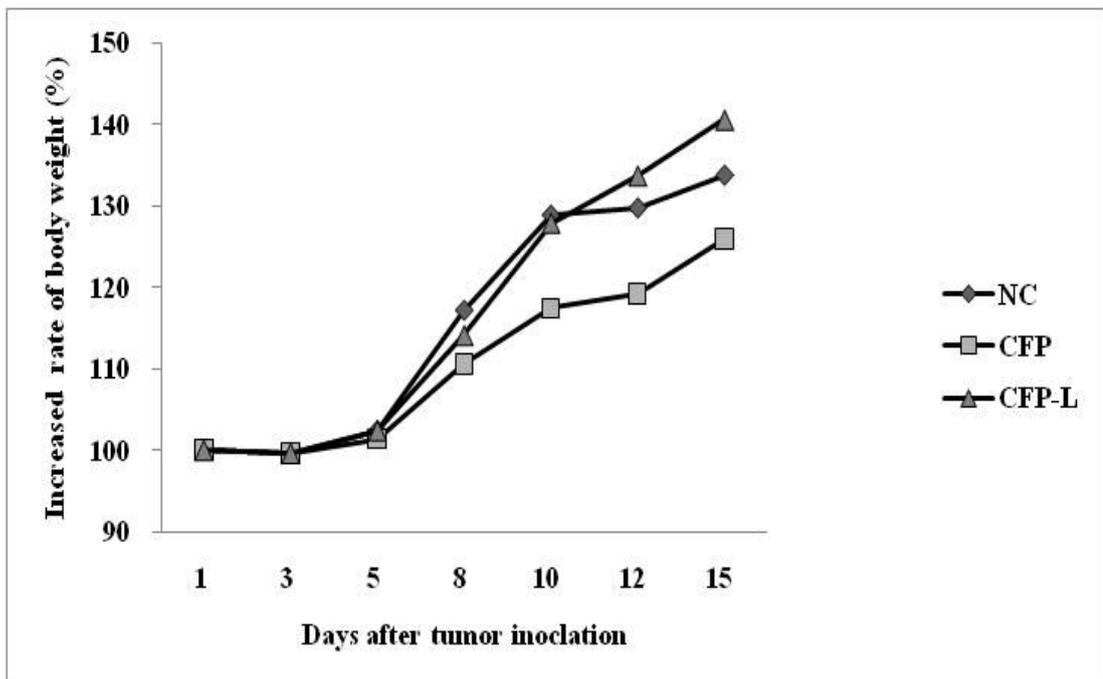


그림 87. Sarcoma 180 세포주를 이식한 ICR마우스의 체중 변화 및 증가량(%).

NC(음성대조군): Sarcoma 180이식 + 시료무처리,
CFP: Sarcoma 180 이식 + 슈퍼자미버 미강 발효물,
CFP-L: Sarcoma 180 이식 + 슈퍼자미버 미강 복합 발효물

고형암 모델에서 희생시킨 실험동물의 암조직 무게를 측정된 결과, CFP-L군의 암조직이 가장 컸으며 CFP군이 가장 작은 것으로 나타나 복수암 결과와 유사하게 2차 발효물에서는 항암 효과가 크지 않음을 보였으며, 1차 발효물에서는 약 20%정도의 조직 무게 억제율이 나타나 항암 효과는 2차 발효물에 비해서 1차 발효물이 더 높은 것으로 판단되었다(표 24).

표 24. B16BL/6 세포주를 이식한 C57BL6 마우스의 종양무게와 종양억제효과

Group	Tumor weight (g)	Inhibition (%)
NC	0.635±0.241	0.0
CFP	0.512±0.129	19.4
CFP-L	0.645±0.156	-1.6

표 25. B16BL/6 세포주를 이식한 C57BL6 마우스의 장기무게

Group	Spleen weight (g)	Liver weight (g)
NC	0.077±0.013	0.978±0.096 ^b
CFP	0.079±0.023	0.99±0.985 ^{ab}
CFP-L	0.083±0.016	1.125±0.071 ^c

희생시킨 실험동물들의 비장과 간의 무게를 측정된 결과, 비장은 군별 유의성을 나타내지 않았으나 간 무게는 CFP-L군이 다른 군에 비해 유의적으로 크게 나타났고(표 25), 고형암 모델에서 혈액학적 분석결과 RBC를 비롯한 대부분의 biomarker들이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 WBC, MID, LYME(%) 수치가 대조군에 비해 실험군에서 유의적으로 높게 나타났으며 RBC, PLT, LYME, GRAN의 수치가 대조군에 비해 수치가 증가하는 경향을 나타내었다(표 26).

표 26. B16BL/6 세포주를 이식한 C57BL6 마우스의 혈액학적 지표 측정

측정 biomarker	단위	NC	CFP	CFP-L
RBC	10 ⁶ /mm ³	8.59±5.54	9.31±0.61	8.99±1.03
PLT	10 ³ /mm ³	783.90±289.15	893.10±0.68	812.25±216.66
WBC	10 ³ /mm ³	2.63±1.26 ^a	4.24±0.71 ^b	4.66±1.71 ^b
HGB	g/dl	12.54±3.63	12.99±2.23	13.45±1.17
LYME	10 ³ /mm ³	2.15±1.03	3.39±0.96	3.48±1.50
GRAN	10 ³ /mm ³	0.27±0.23	0.48±0.33	0.64±0.13
MID	10 ³ /mm ³	0.30±0.19 ^a	0.49±0.11 ^{ab}	0.55±0.16 ^b
LYME	%	81.60±13.63 ^a	79.41±12.79 ^b	70.64±14.65 ^b
GRAN	%	10.95±8.50	12.56±8.03	17.05±8.75

사. 미강 2차 발효 분말을 이용한 시제품의 개발 및 생리활성 비교 평가

건강기능식품은 다양한 형태의 제제가 존재하나 실질적으로 가장 많은 부분을 차지하는 제형은 과립과 정제형태이기 때문에 당 연구개발에서 개발된 미강 발효 분말을 이용하여 과립과 정제 형태의 시제품을 제조하였다. 특히, 과립 또는 타정 형태의 제형을 이용한 제품 생산을 위해서는 실질적으로 제제 생산성이 우수하여야 하여 본 연구개발에서 이들 소재에 대한 생산성을 확인하였다.

유색미 슈퍼자미벼 미강 발효물과 슈퍼자미벼 미강 2차 발효물을 이용하여 각각 20%정도의 비율을 함유시켜 아래와 같은 원료로 분말 및 과립 제품, 정제 제품을 제조하였다(그림 88, 89).

슈퍼자미벼 미강 발효물을 분말 및 과립 및 정제 제품 스펙

슈퍼자미벼 미강 발효물 또는 2차 발효물 (20%), 치커리식이섬유(15%), 팔리티노스 분말(30%), 말토덱스트린(5%), 유청칼슘(5%), 결정과당(23%), 비타민C(2%)

상기의 배합비를 이용하여 분말, 과립 및 정제 제품에 대한 시제품 생산을 테스트 결과 혼합상에 문제가 없었으며, 과립 및 정제 제품을 제조하였을 때도 문제점이 발생하지 않아 본 연구개발에서 개발된 슈퍼자미벼 미강 발효 분말 소재는 차후 양산시에 생산성에 문제가 없을 것으로 판단된다(그림 88).



그림 88. 슈퍼자미벼 미강 발효물을 이용한 분말, 과립, 정제 제품

또한, 슈퍼자미버 미강의 1차 발효물을 유산균으로 2차 발효한 2차발효물 역시 상기와 유사한 스펙으로 동일하게 분말, 과립 및 정제 제품을 제조하였다.

슈퍼자미버 미강 발효물을 분말 및 과립 및 정제 제품 스펙
 슈퍼자미버 미강 발효물 또는 2차 발효물 (20%), 치커리식이섬유(15%), 팔리티노스 분말 (30%), 말토덱스트린(5%), 유청칼슘(5%), 결정과당(23%), 비타민C(2%)



그림 89. 슈퍼자미버 미강 2차 발효물을 이용한 분말, 과립, 정제 제품

상기와 같은 스펙으로 혼합 분말을 제조한 뒤 이를 이용하여 정제 제품으로 제조하였다. 정제 제품의 경우 타정 공정을 거친 후 제조된 정제 제품에서 생산 공정 및 생산 후 제조된 타정에서 특이한 문제점이 발견되지 않았으며, 차후 상품화시 본 연구개발에서 개발된 소재가 20%정도의 배합비를 가지는데 문제가 없는 것으로 나타났다.

또한, 현재 시제품으로 제조된 슈퍼자미버 미강 발효 분말, 슈퍼자미버 미강 2차 발효 분말은 거의 무미, 무취하여 실질적으로 제품에 관능에 대한 영향이 극히 미미한 상태로 다른 원료를 통해 상품에 적합한 관능을 조절하는데 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 본 연구개발에서 과립과 정제 형태의 시제품을 제작하였을 때 과립 형성 또는 타정 공정상에서 생산 공정에서 생산성을 저해시키는 문제점을 발견하지 못했으며, 이는 차후에 이들 소재가 실질적으로 대량 생산 공정상에서도 충분한 생산성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

개발된 슈퍼자미 미강 2차 발효물 2종 (유산균 및 효모 발효물)의 면역 증강 활성을 기존의 소재들과 비교하기 위하여 1차로 일반 미강을 대상으로 한 1차 발효물과의 활성을 비교 분석하였다. 시험동물에게 2주간 각기 발효물을 10g/kg체중의 비율로 섭취 시킨 후 면역 증강활성을 관찰하였으며, 각 시험동물의 체중 및 비장, 간 조직의 무게를 측정된 결과는 표 7과 같이 나타났다. 체중 및 조직의 중량은 각 군별로 차이가 없이 나타나 섭취한 시험 물질이 심각한 부작용을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

표. 27 미강발효물, 슈퍼자미 미강 2차발효물 섭취 동물의 체중 및 장기 무게

Group	Final body weight(g)	Spleen(g)	Liver(g)
NC	21.88±2.79	0.097±0.010	1.080±0.050
미강 발효물	23.31±0.77	0.096±0.009	1.095±0.040
C3GHi A type	23.39±1.05	0.098±0.011	1.114±0.012
C3GHi B type	23.84±1.42	0.098±0.008	1.099±0.040

미강발효물 : 일반 쌀의 미강 발효물

C3GHi A type : 슈퍼자미 미강 2차 발효물(효모)

C3GHi B type : 슈퍼자미 미강 2차 발효물(유산균)

슈퍼자미 미강 2차 발효물을 섭취한 시험동물로부터 채취한 대식세포(macrophage)의 활성도를 측정된 결과는 그림 90와 같이 나타났으며 이전의 시험결과와 같이 효모로 2차 발효를 수행한 군에서 가장 우수한 대식세포 활성 증대 효과를 나타내었다.

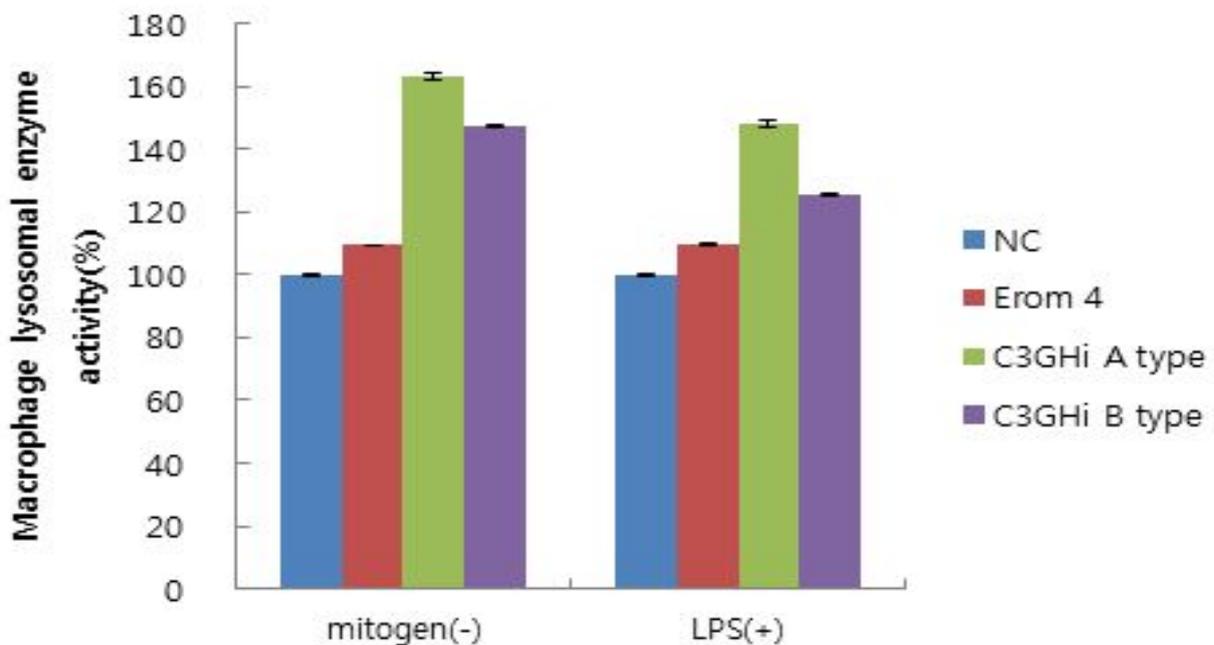


그림 90. 슈퍼자미벼(C3GHi)의 미강 2차 발효물의 대식세포 활성 증대 효과

대식세포 이외에 비장세포의 증강 활성을 측정된 결과(그림 91)에서도 슈퍼자미 미강 발효물을 효모로 2차 발효한 2차 발효물에서 비장 세포의 활성 증대 폭이 가장 높았으나 실질적으로 각 군간 유의적 차이는 나타나지 않았다. 대식세포와 비장세포의 활성 증대 효과에 대한 결과로서 판단할 때 슈퍼자미 미강 2차 발효물은 일반 미강 발효물보다 우수한 활성을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

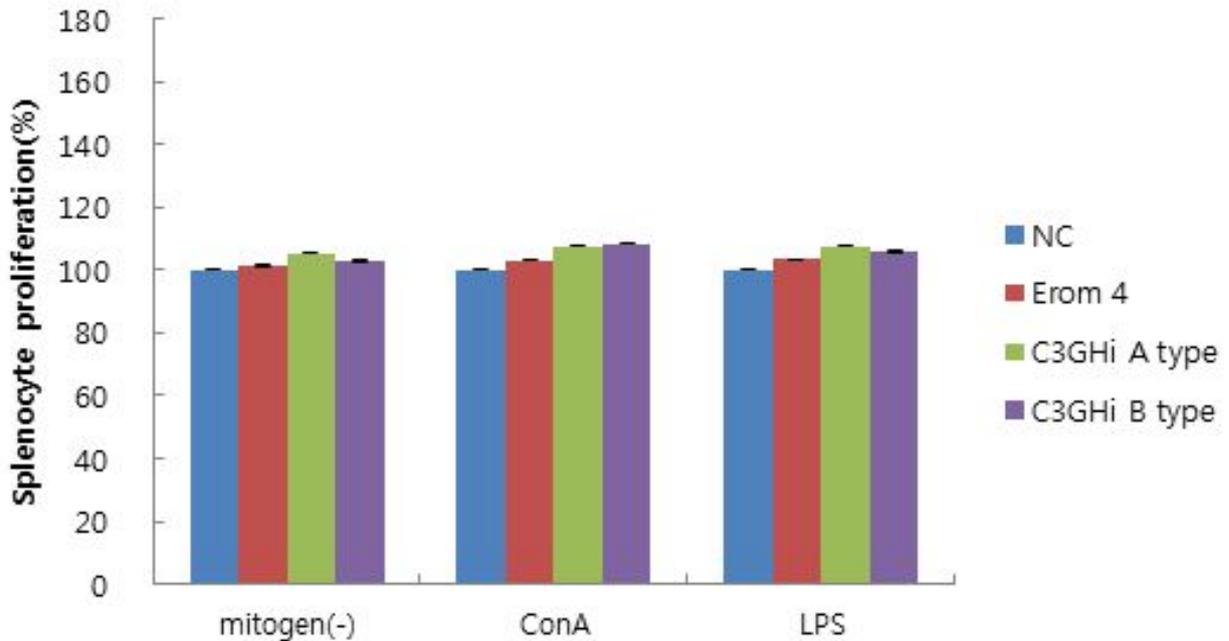


그림 91. 슈퍼자미벼(C3GHi)의 미강 2차 발효물의 비장세포 활성 증대 효과

슈퍼자미 미강 2차 발효물의 면역 기능 강화 활성에 대해서 현재 시판중인 면역 증강 기능성 원료와의 비교 평가를 위하여 건강기능식품 원료인 홍삼 제품과의 직접적인 비교를 수행하였다. 면역 증강 기능성의 비교에는 2차 발효물중 상대적으로 우수한 활성을 나타낸 효모 복합 발효물을 선택하여 수행하였다. 시험동물에게 2주간 홍삼 및 슈퍼자미 미강 2차 발효물을 10g/kg의 비율로 2주간 경구투여 한 후 시험동물을 희생하여 시험을 실시하였다. 2주간 시험물질 섭취한 시험동물의 체중 및 장기 무게는 각 군간 유의적 차이가 나타나지 않아 시험 물질이 독성을 나타내지 않은 것으로 나타났다(표 28).

표. 28 슈퍼자미 미강 2차발효물 및 홍삼 농축액 섭취 동물의 체중 및 장기 무게

Group	Final body weight(g)	Spleen(g)	Liver(g)
NC	26.57±1.22	0.097±0.007	1.072±0.039
Red ginseng extract	25.59±1.07	0.093±0.011	1.071±0.054
C3GHi A type	25.68±1.24	0.094±0.011	1.099±0.013

슈퍼자미 2차 발효물 및 홍삼 농축액을 섭취한 시험동물의 대식 세포 활성 증대 효과를 측정 한 결과는 그림 92와 같이 나타났다. 홍삼농축액 및 슈퍼자미 2차 발효물 모두에서 대식세포의 활성 증대 효과가 관찰되었으며, 원료간 상대 비교에서는 홍삼 농축액이 슈퍼자미 2차 발효물 에 비해 더 높은 대식 세포 증대 활성이 있는 것으로 나타났다.

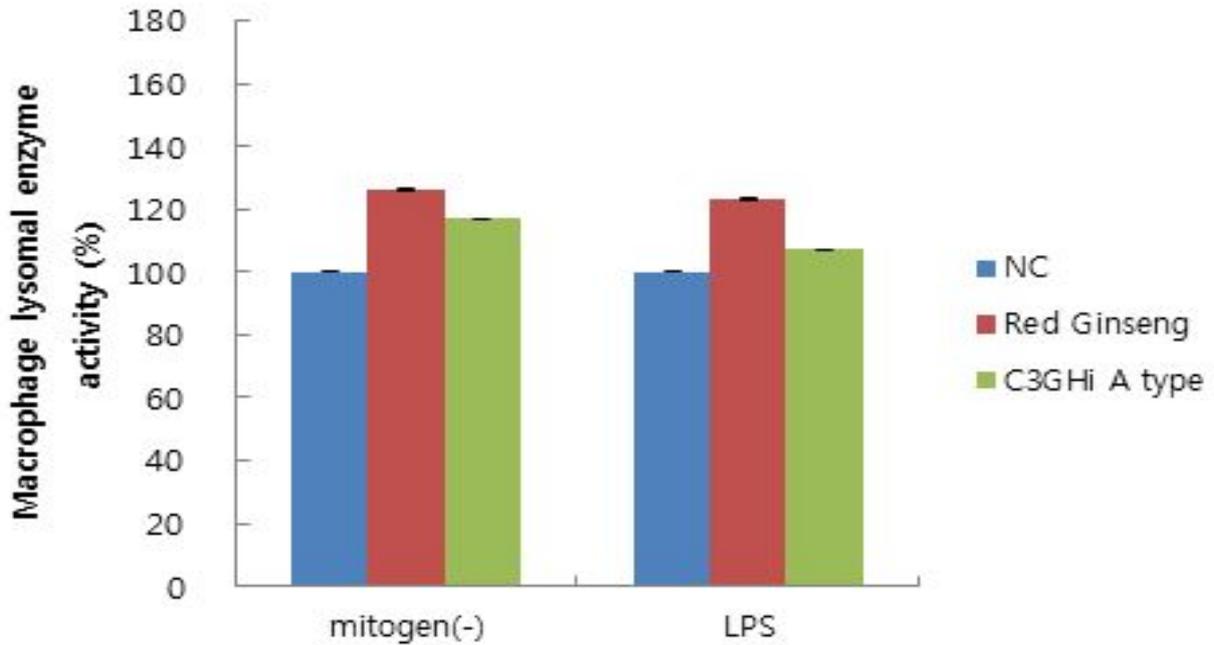


그림 92. 슈퍼자미 미강 복합발효물 및 홍삼농축액의 대식 세포 활성 증대 효과

비장세포에 B-lymphocyte mitogen인 LPS, T-lymphocyte mitogen인 ConA를 처리한 것과 mitogen을 처리하지 않은 것으로 나누어 실시하였으며, mitogen을 처리하지 않은 비장세포에서 는 모든 실험물질군에서 대조군에 비해 비장세포 증식능이 높게 나타났고, ConA, LPS를 처리 하였을 때 슈퍼자미 미강 복합 발효물이 홍삼농축액보다 더 높은 비장세포 활성 증대 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

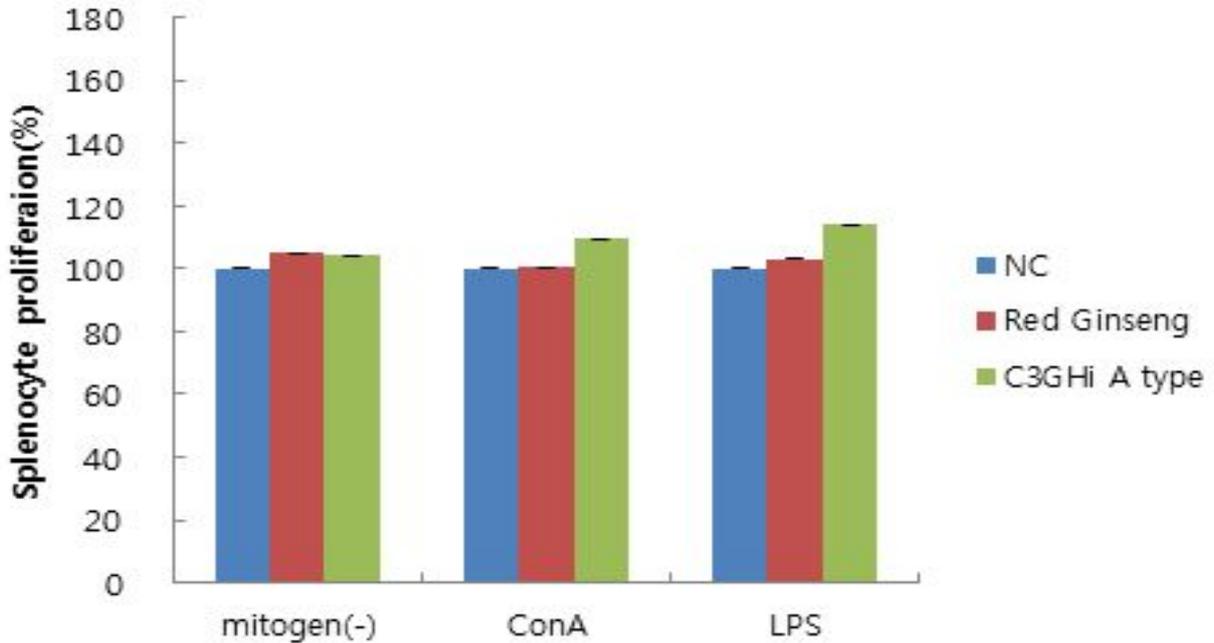


그림 93. 슈퍼자미 미강 복합발효물 및 홍삼농축액의 비장 세포 활성화 증대 효과

현재 시장에서 면역 증강 기능성 원료로서 가장 각광 받고 있는 원료인 홍삼 농축액(6년근)과의 직접적인 활성 비교 시험을 통해서 슈퍼자미 미강 복합 발효물은 대식세포 활성 강화에서는 비록 홍삼농축액에 비하여 낮은 활성을 보였으나 비장세포 활성능에서는 홍삼 농축액보다 더 높은 활성을 보이고 있어 상업화를 수행할 시 시장에서 경쟁력 있는 원료로서 진출 할 수 있는 가능성이 높다고 판단된다.

아. C3GHi 미강 발효물의 안정성 검증

C3GHi 품종의 미강을 이용한 발효물 제조시 활성성분인 cyanidine-3-glycoside(C3G)의 변화를 알아보려고 HPLC-UV detector(520nm)를 이용하여, 발효물의 C3G 함량을 측정하여 발효물에서의 C3G의 안정성을 검토하였음.

측정결과, C3GHi의 미강의 C3G 함량을 100%로 기준하여 산출하였을 때, 표고버섯으로 1차 발효하였을 때의 C3G의 잔존율은 약 6.3%로 많은 양의 C3G가 소실된 것으로 나타났음. C3G가 온도안정성이 높지 않은 화합물임을 감안할 때 발효 공정상에서의 소실이 나타난 것으로 추측됨. 발효물(CFP)보다 2차 발효 공정을 통해 제조된 CFP-S, CFP-L3 발효물의 C3G 함량은 1차 발효물에 비하여 더 높아진 것으로 나타났으며, 이에 대해서는 추가적인 연구 및 각 제조 공정 단계에서의 C3G 함량의 추적 조사가 필요할 것으로 생각됨(표 29).

C3GHi 품종에서 C3G가 중요한 항산화 물질임이고, 발효공정상으로 차이가 있으나 잔존율이 25% 정도임을 감안할 때 발효에 따라 항산화 활성의 감소가 예상되어지나 항산화 활성 측정 결과에서는 오히려 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났음. 따라서, C3GHi 품종 고유의 항

산화 성분의 감소가 발생하더라도 발효물의 향산화 활성의 증가를 통해 C3GHi 품종의 장점인 향산화 활성을 발효물이 유지 또는 강화된 것으로 유추할 수 있으며, 이를 통하여 상업적인 활용에는 문제가 없을 것으로 예상됨.

표 29. 발효 조건 별 C3G 상대적 함량 변화

Sample	C3G 함량(%)
CP	100%
CFP	6.3%
CFP-S	25.9%
CFP-L3	28.7%

3. 슈퍼자미의 항당뇨 효능 검증

Streptozotocin(STZ)는 췌장의 beta-cell을 선택적으로 파괴하여 인슐린 분비를 억제함으로써 당뇨와 동일한 증상을 유도하면서 동시에 다른 장기에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 보고된 약물로서 동물 모델에서 당뇨 유발제로서 많이 활용이 되고 있음. STZ로 당뇨가 유도된 동물에게서 슈퍼자미(C3GHi)가 함유된 식이를 섭취 시키면서 나타나는 혈당의 변화는 표 30과 같음.

STZ의 투여는 활성산소종에 대한 감수성이 높여 산화적 스트레스로 인해 조직 손상을 주는 물질인 hydrogen peroxide 등의 증가되고, 증가된 활성산소종이 활성화 된 대식세포로부터 beta-cell의 자동면역 기능을 파괴하여 당뇨병 증상을 보이는 것으로 보고됨. 따라서 항산화 활성이 우수한 시료의 투여는 STZ로 인해 유도되는 당뇨를 경감시킬 수 있을 것으로 생각되며, STZ로 당뇨가 유도된 실험동물의 혈당은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 양상을 보였으며, C3GHi를 함유한 식이를 섭취한 실험동물은 대조군에 대비하여 혈당의 증가가 완만한 상승세를 보였으며, 2주 후부터 대조군 대비 유의적인 혈당량 감소 결과를 나타내었다(그림 94, $p<0.05$).

일반 쌀의 현미를 섭취 한 실험군에서는 평균적으로 백미 투여군에 비하여 낮은 혈당 증가세를 보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았고, C3GHi는 타연구결과에서 낮은 혈당지수를 나타내어 이를 바탕으로 섭취 시 즉각적인 혈당의 상승을 억제할 뿐만 아니라 장기적인 섭취 시에도 혈당 증가를 억제하여 당뇨 증상을 완화시키는 결과를 나타낼 수 있을 것으로 추측되어 기능성 소재 또는 기능성 식사 대용식으로서의 개발 가능성이 높다고 예상됨.

당뇨가 유발되었을 경우 신체의 조직에서 산화적 손상이 증가한다는 연구가 보고된 바 있으며, 이는 생체막 지질에서 phospholipase A2, mixed functional oxidase 등의 활성 산소 생성계의 활성화나 항산화계의 약화가 발생하는 것에 기인한 것으로 알려져 있음. 또한 산화적 손상이 당뇨 합병증의 중요한 원인임이 규명되어 있어, 당뇨 질환자에게서 산화적 손상을 억제하는 것은 매우 중요한 사항이라 할 수 있음. STZ로 당뇨를 유발시키고 3주간 C3GHi를 섭취한 실험동물에게서 간 조직상에서의 산화적 손상의 지표인 malondialdehyde를 정량한 결과는 (그림 94)와 같이 나타났음.

STZ로 당뇨가 유발된 실험동물에서 혈장 MDA의 수치는 백미만을 섭취한 군에 비하여 C3GHi를 섭취한 실험동물의 MDA가 통계적으로 유의하게 낮은 수치를 나타내었으며, 반면에 일반벼의 현미만을 섭취한 실험군은 백미를 섭취한 군에 비하여 낮은 평균값을 보였으나 통계적 유의성이 나타나지는 않았음.

C3GHi는 높은 항산화력을 가지는 cyanidine-3-glucoside(C3G)의 함량이 매우 높도록 개량되어진 품종으로 항산화력의 검증 결과에서도 일반벼의 추출물에 비하여 매우 높은 항산화력이 나타나는 것으로 확인되었음. 따라서, STZ로 당뇨가 유도된 실험동물에게서 나타나는 산화적 스트레스에 대해서 C3GHi 품종이 가지는 높은 항산화력을 기반으로 하여 체내의 산화적 스트레스를 경감시킴으로서 당뇨로 인해 유도되는 생체내 산화적 손상을 경감시켜 당뇨 합병증을 예방하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

표 30. STZ로 유도된 실험 동물에서 혈당 수치에 대한 C3GHi의 효능

Group	weeks			
	0	1	2	3
D-W	428.3±41.4 ^a	508.4±63.2 ^a	589.2±78.79 ^a	631.7±97.0 ^a
D-B	417.2±38.2 ^a	492.3±54.8 ^a	541±73.1 ^a	529.3±62.3 ^a
D-C3	430.1±45.2 ^a	466.3±28.9 ^a	482.4±60.2 ^b	486.3±48.2 ^b

Means with same alphabets within a column are significantly not different at p<0.05

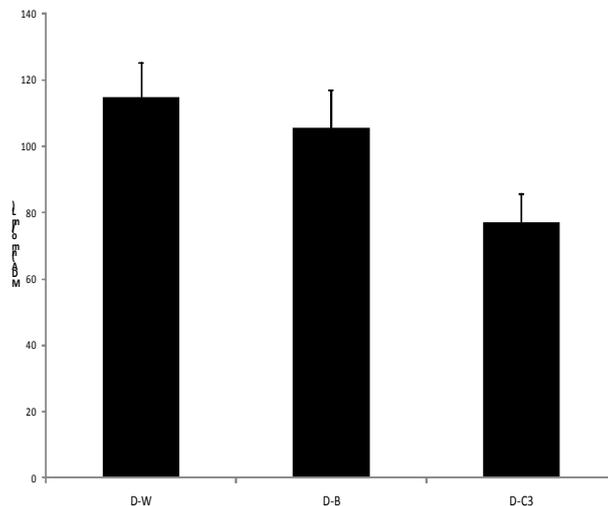


그림 94. STZ로 유도된 실험 동물에서 혈장 지질과산화에 대한 C3GHi의 효능

당뇨 모델에서 슈퍼자미의 섭취가 혈당 및 인슐린의 감소를 통해서 항당뇨 기능이 있음을 확인 할 수 있었다. 일반적으로 당뇨 환자를 위한 기능성 식품의 구성 요건은 장기 섭취시 혈당 및 인슐린 농도 감소와 같은 당뇨 증상의 개선과 더불어서 식사로서 섭취 시 식사 후 혈당 상승의 억제 또는 장내 소화 효소에 대한 저해 작용을 통해 당의 흡수를 억제할 수 있는 기능의 필요성도 높다고 할 수 있다. 슈퍼자미는 전년도 연구과제를 통하여 혈당지수(glycemic index, GI)가 41정도로 일반 현미에 비해서 낮은 값을 나타내어 당뇨 환자용 식사 원료로서의 가능성이 높은 것이 확인되었는데, 본 연구에서는 슈퍼자미가 장내 소화 효소에 대한 억제 활성을 조사하여 당뇨 환자용 식품으로서의 가능성을 다시 한번 확인하고자 하였다.

시험에 사용된 시료는 슈퍼자미를 70% 에탄올로 추출하여 제조하였으며, 비교 물질로는 현재 건강기능성식품중 장내 소화 효소 억제 활성을 통해 [혈당조절] 기능성을 인정 받은 개별인정형 원료인 [구아바잎 추출물]을 사용하여 비교 관찰하였다. 슈퍼자미 에탄올추출물(C3GHi Ex)과 구아바잎 추출물(GvEx)의 α-amylase활성 저해 효과를 조사한 결과는 그림 95과 같으며, 가용성 전분의 분해는 시료의 첨가로 효소활성이 억제되어 maltose의 생성량이 줄어든 것을

확인 할 수 있었다. 특히, 슈퍼자미의 에탄올 추출물은 α -amylase에 대한 저해 활성이 개별인 정형 기능성 식품 원료인 구아바잎 추출물과 유사한 수준으로 나타나 장내에서 전분질의 분해를 억제하여 혈당 상승을 억제할 수 있는 기능성이 매우 우수한 수준인 것으로 판단되었다.

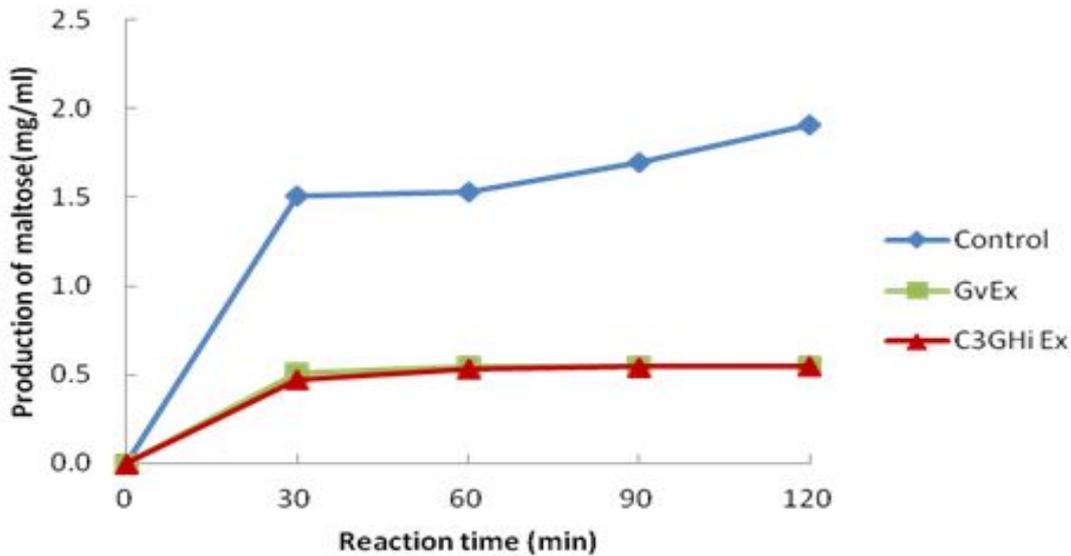
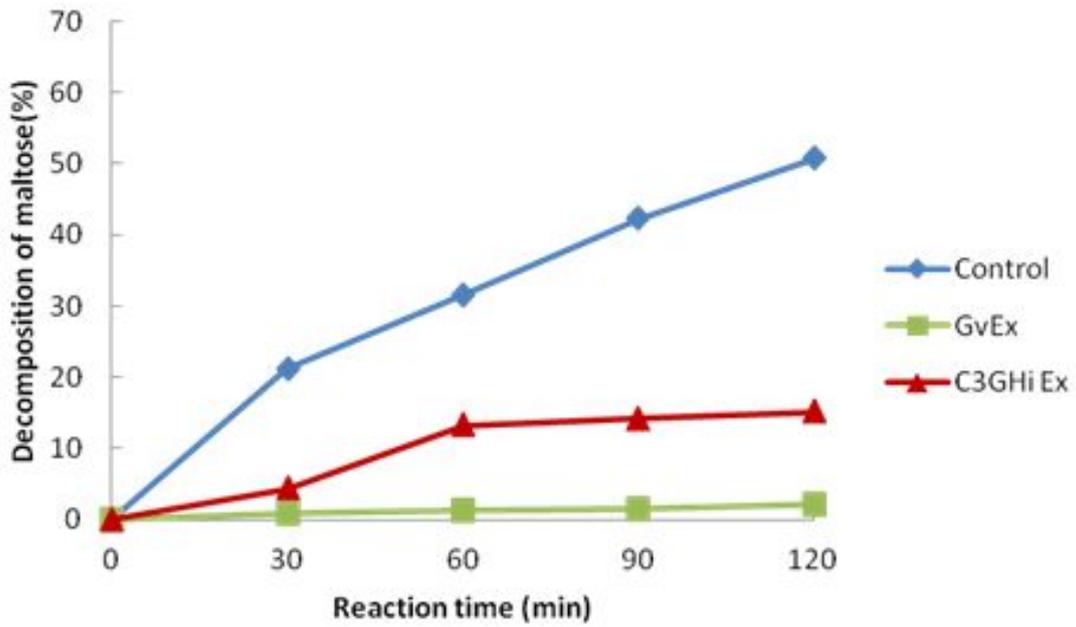


그림 95. 슈퍼자미 에탄올 추출물의 α -amylase 저해 효과

α -amylase와 함께 이당류를 분해하여 실질적으로 장내에서 당의 흡수를 유도하는 이당류 분해효소중 maltase와 sucrase에 대한 저해효과를 조사한 결과는 그림 96과 같으며, 구아바잎추출물(GvEx), 슈퍼자미 에탄올추출물(C3GHi Ex)의 첨가로 maltase 및 sucrase의 활성이 억제되어 glucose의 생성량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 구아바잎추출물(GvEx)의 maltase, sucrase에 대한 50% 저해 농도는 maltase에 대해서는 2.0mg/ml, sucrase에 대해서는 3.5mg/ml이며, 슈퍼자미 에탄올추출물(C3GHi Ex)은 maltase에 대해서는 2.5mg/ml, sucrase에 대해서는 3.02mg/ml으로 나타나 슈퍼자미 에탄올 추출물이 구아바잎 추출물에 비해서 상대적으로 낮은 활성을 보이고 있는 것으로 나타났다.

(A)



(B)

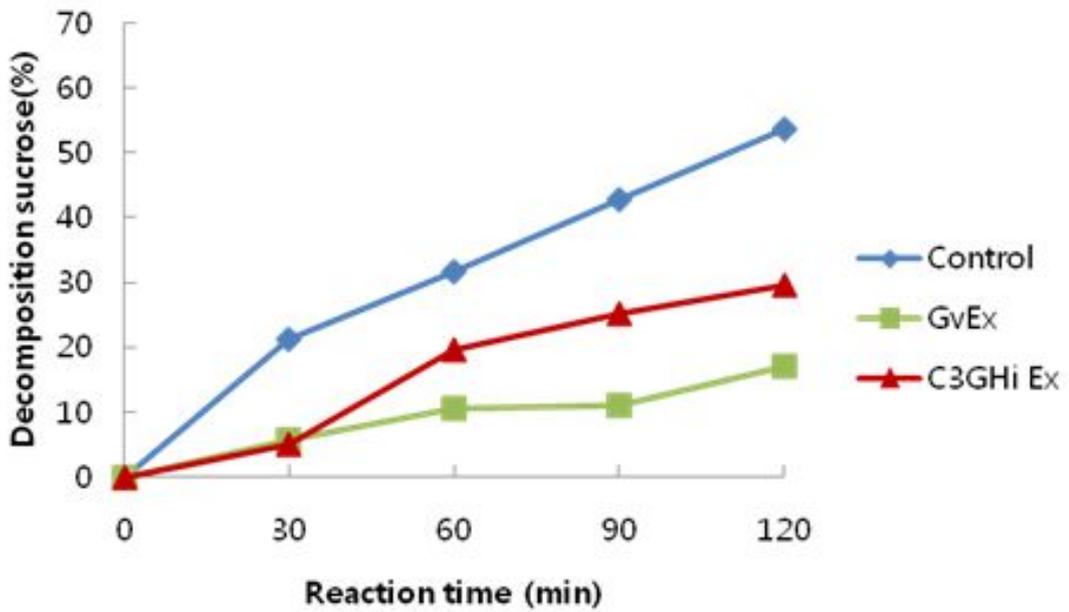


그림 96. 슈퍼자미 에탄올 추출물(C3GHi Ex)에 의한 Maltase(A), Sucrase(B)의 활성 저해 효과

슈퍼자미 에탄올 추출물의 장내 소화 효소인 전분분해효소(α -amylase) 및 이당류 분해효소인 maltase, sucrase에 대한 효소 저해 활성을 측정한 결과에서 개별인정형 기능성 식품원료인 구

아바잎 추출물과 비교할 때 α -amylase에 대한 효소 활성의 저해는 거의 동등한 수준으로 나타났으며, 이당류 분해 효소에 대한 저해 활성에서는 구아바잎 추출물보다는 낮지만 우수한 활성이 있는 것으로 판단되었다. 따라서, 슈퍼자미는 낮은 혈당지수 및 장내 소화 효소 활성 억제를 통해 식사 후에 나타나는 혈당의 급격한 상승을 억제하여 당뇨 환자용 식사 대용식 등의 원료로서 높은 가능성을 가지고 있을뿐만 아니라 당뇨 모델에서 장기 섭취시 혈당 및 인슐린 농도의 감소를 확인할 수 있어 우수한 항당뇨 기능을 가진 농산물로서의 가능성이 매우 높아, 상업적인 이용성이 매우 높은 것을 확인 할 수 있었다.

4. 슈퍼자미를 적용한 생식 제품의 생리활성

가. 슈퍼자미를 이용한 생식 제품 개발

슈퍼자미를 이용하여 생식 제품을 개발하였다. 개발된 생식 제품은 참여기업인 (주)이룸에서 판매되고 있는 제품중 최고급 프리미엄급 제품인 산삼배양근생식을 기반으로하여 슈퍼자미의 특색을 살릴 수 있도록 개발되었으며, 개발 생식 제품의 슈퍼자미 함유율은 15%로 최종 결정하였다. 슈퍼자미 함유량이 증대될수록 제품의 색상이 더 짙은 검은색을 나타내어 슈퍼자미의 이미지화가 우수하다고 판단되었으나, 실제 섭취 상태에서 짙은 검은색이 식감을 저하시키고 또 섭취 후 치아의 변색등이 나타나는 등의 문제가 발생하여 최적 배합비로서 15%를 결정하여 제품을 개발하였다. 개발제품의 이미지는 다음과 같다.



그림 97. 슈퍼자미를 활용한 프리미엄 생식 제품의 제품 이미지

나. 슈퍼자미 함유 생식의 항산화활성

슈퍼자미를 직접 제품에 적용하였을 때의 생리활성의 증강 효과를 알아보기 위하여 시판중인 생식 제품에 적용하여 제품을 개발하였으며, 슈퍼자미를 통해 향상된 기능성을 확인하고자 개

발 제품을 대상으로 하여 체내 항산화력 증강 효능에 대한 분석을 실시하였다.

항산화력의 분석은 슈퍼자미를 15% 함유한 생식 제품과 동일 배합비에서 슈퍼자미가 아닌 일반 흑미를 사용한 생식 제품을 시험동물에게 2주간 사료로서 분말 형태로 섭취시키도록 한 후 사염화탄소를 복강으로 주입하여 산화적 손상을 일으킨 후 혈액 및 조직에서 산화적 손상 지표를 측정함으로써 활성을 비교 분석 하였다.

2 주간 시험 사료를 섭취한 시험 동물간의 체중 및 비장, 간장의 무게를 측정한 결과는 표 31 과 같이 나타났다. 음성대조군에서 조직의 무게가 일부 감소하는 경향을 보였으나 각 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

표 31. 실험동물의 성장성적 및 장기무게의 변화

Groups	개시체중(g)	최종체중(g)	비장무게(g)	간장무게(g)
정상대조군	33.3±1.3	36.4±1.6 ^b	0.084±0.011	1.7±0.1
음성대조군	33.4±1.2	34.1±1.2 ^a	0.078±0.005	1.6±0.3
산삼배양근생식섭취군	33.5±1.4	35.9±1.5 ^b	0.084±0.005	1.8±0.4
슈퍼자미생식섭취군	33.7±1.6	35.8±1.2 ^b	0.083±0.015	1.7±0.2

2 주간의 시료급여 종료 후 실험동물의 심장으로부터 채혈하여 혈중 간손상 지표인 GOT, GPT 및 ALP(alkaline phosphatase)의 변화를 측정하였으며, 그 결과는 표 32와 같다. 혈중 GOT, GPT 및 ALP의 농도는 정상대조군에 대하여 사염화탄소를 처리한 모든 군에서 간손상에 따라 유의적으로 증가한 것으로 관찰 되었으며, 특히 음성대조군이 유의적으로 급격히 증가한 것으로 나타났으며, 2주간의 시료급여에 따른 GOT의 변화는 음성대조군에 대하여 일반생식과 슈퍼자미생식을 섭취한 실험동물이 유의하게 낮아진 것으로 나타났으며, 각 실험 군간에는 차이를 보이지 않았다. 혈중 GPT의 변화에서도 음성대조군에 일반생식과 슈퍼자미생식을 섭취한 군이 유의하게 감소한 것으로 나타났으며, 슈퍼자미생식을 섭취한 군이 산삼배양근보다 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성 없었다. 혈중 ALP의 변화는 음성대조군에 대하여 슈퍼자미생식을 섭취한 군이 유의하게 감소한 것으로 평가되었으며, 일반생식을 섭취한 군은 음성대조군과 통계적 유의차를 보이지 않았으나 한편으로 대조군과 슈퍼자미생식 섭취군에 대하여도 통계적 유의차를 보이지 않아 음성대조군에 대해 상대적으로 감소한 것으로 평가되고, 따라서 슈퍼자미생식의 섭취가 보다 유효한 것으로 평가되었다.

표 32 . 실험동물의 혈중 간손상 지표의 변화

Groups	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (K-A Unit)
정상대조군	6.2±3.7 ^a	13.6±10.2 ^a	13.4±1.5 ^a
음성대조군	199.0±17.6 ^c	334.7±19.3 ^c	18.6±3.8 ^b
일반생식섭취군	176.1±8.9 ^b	301.2±18.2 ^b	15.1±2.8 ^{ab}
슈퍼자미생식섭취군	175.6±7.1 ^b	286.3±8.5 ^b	13.9±4.0 ^a

산화적 손상에 의한 적혈구의 안정도 손상에 따른 헤모글로빈의 유출 정도를 평가하기 위하여 심장으로부터 채혈한 전혈로부터 증류수와 PBS에 대한 용혈비를 구하여 적혈구의 안정도를 평가하였으며, 그 결과는 그림 98과 같이 나타났다. 적혈구의 용혈도(hemolysis %)는 정상대조군(CON)에 대하여 사염화탄소를 처리한 음성대조군(NC)에서 산화적 손상에 따라 유의하게 증가한 것으로 나타났으며, 일반생식과 슈퍼자미생식을 급여한 군은 정상대조군과 같은 수준으로, 산화적 손상에 따른 적혈구 용혈도가 유의하게 억제된 것으로 평가 되었으며, 특히 슈퍼자미생식을 섭취한 군의 용혈도가 더 낮은 것으로 보이나 일반생식 섭취군과의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

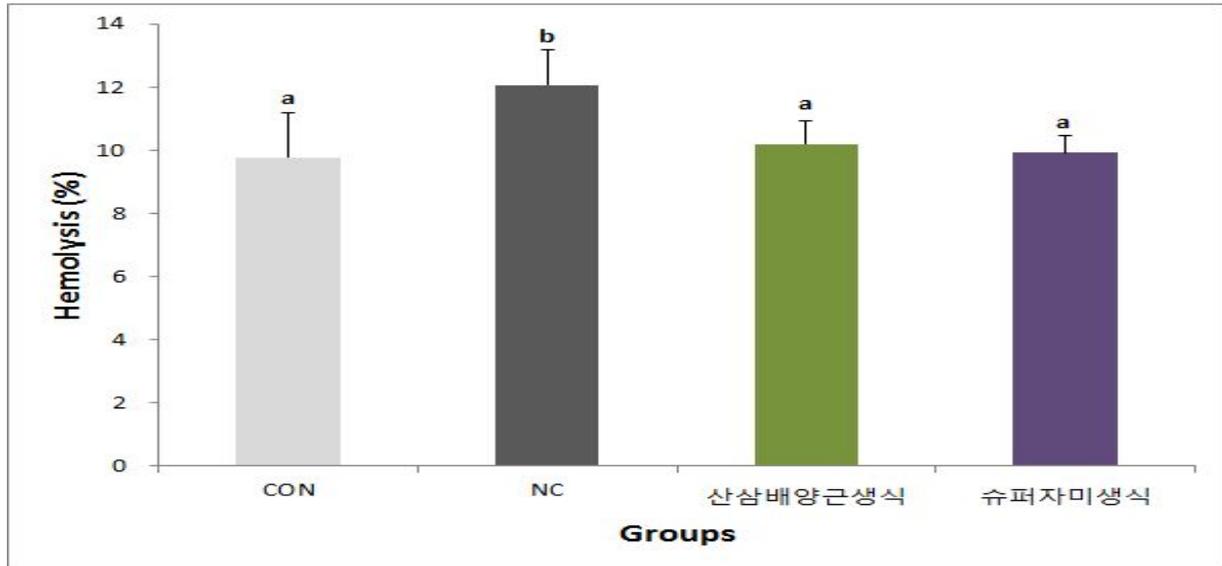


그림 98. 슈퍼자미 생식 섭취에 의한 적혈구 용혈도의 변화

2 주간의 시료 섭취에 따른 혈청 및 간 조직 중의 총 항산화물질량(TAS)의 변화를 측정하여 비교 평가하였으며, 그 결과는 표 33과 같다. 정상대조군에 대하여 사염화탄소를 처리한 시험군의 혈청의 총 항산화량은 크게 증가한 것으로 나타났는데, 이는 산화적 손상에 따라 항산화물질의 생성이 증가한 것으로 생각되었으며, 혈중 총 항산화물질량의 변화는 음성대조군에 대하여 일반생식과 슈퍼자미생식이 유의하게 증가한 것으로 나타나 실험사료의 섭취가 혈액중의 총 항산화물질량의 생성을 증가시켜준 것으로 평가되며, 한편 슈퍼자미생식 섭취군이 일반생식 섭취군에 대하여 보다 높은 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 보이지 않았다. 간 조직 중의 총 항산화물질량은 사염화탄소를 처리한 시험군이 산화적 손상에 의해 유의하게 감소한 것으로 나타났으며, 간 조직 중의 총 항산화물질량의 변화는 음성대조군에 대하여 산삼배양근생식 및 슈퍼자미생식을 섭취한 군이 유의하게 증가된 것으로 나타났으며, 특히 슈퍼자미생식을 섭취한 시험군은 정상대조군의 수준으로 유의하게 증가된 것으로 평가되었다.

표 33 .실험동물의 혈청 및 간 조직 중 총 항산화물질량(TAS)의 변화

<i>Groups</i>	<i>TAS in Serum (mmol TE/L)</i>	<i>TAS in Liver Tissue (mmol/kg)</i>
정상대조군	0.71±0.11 ^a	17.7±1.1 ^a
음성대조군	2.13±0.23 ^b	11.5±0.7 ^c
일반생식섭취군	2.59±0.29 ^c	14.0±5.3 ^b
슈퍼자미생식섭취군	2.76±0.05 ^c	15.8±2.7 ^{ab}

2 주간의 시료 섭취에 따른 혈청 및 간 조직 중의 지질과산화물의 일종인 (MDA)의 변화를 측정하여 비교 평가하였으며, 그 결과는 표 34와 같다. 혈청 중의 MDA의 변화는 사염화탄소를 처리한 음성대조군이 정상대조군에 대하여 유의하게 증가한 것으로 관찰되었으며, 혈중 MDA의 변화는 음성대조군에 대하여 일반생식과 슈퍼자미생식이 정상대조군의 수준으로 유의하게 감소한 것으로 관찰되었다. 또한, 간 조직 중의 MDA의 양은 사염화탄소를 처리한 시험군이 산화적 손상에 의해 유의하게 증가한 것으로 나타났으며, 음성대조군에 대하여 일반생식 및 슈퍼자미생식을 섭취한 군이 유의하게 감소한 것으로 평가되었고, 특히, 슈퍼자미생식섭취군은 정상대조군의 수준으로 유의하게 감소한 것으로 평가되어 슈퍼자미를 함유한 생식이 일반생식에 비해서 생체내의 산화적 손상을 경감시키는데 크게 기여하고 있어 높은 생리활성이 부가됨을 확인할 수 있었다.

표 34 .실험동물의 혈청 및 간 조직 중 총 항산화물질량(TAS)의 변화

<i>Groups</i>	<i>MDA in Serum (μmol/L)</i>	<i>MDA in Liver Tissue (μmol/g)</i>
정상대조군	1.8±0.1 ^a	30.8±11.4 ^a
음성대조군	2.3±0.5 ^b	59.6±19.2 ^c
일반생식섭취군	1.4±0.1 ^a	49.8±4.2 ^b
슈퍼자미생식섭취군	1.4±0.1 ^a	45.6±8.6 ^{ab}

2 주간의 시료 섭취에 따른 혈청 및 간 조직 중의 항산화계 방어 효소로서 GPx(glutathione peroxidase)의 활성의 변화를 비교 평가하였으며, 그 결과는 표 35와 같다. 혈청 및 간 조직 중의 GPx 활성은 정상대조군에 대하여 사염화탄소를 처리한 시험군에서 산화적 손상으로 인하여 유의하게 감소한 것으로 나타났으며, 혈중 총 GPx 활성의 변화는 음성대조군에 대하여 일반생식과 슈퍼자미생식이 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 또한, 간 조직 중의 GPx 활성의 변화는 음성대조군에 대하여 슈퍼자미생식 섭취군이 유의하게 증가한 것으로 나타났으며, 일반생식섭취군은 음성대조군과 유의차를 보이지 않았다. 즉, 슈퍼자미를 함유한 생식 제품의 섭취는 신체내의 GPx의 활성을 증대시킴으로서 산화적 손상으로부터의 보호 기능이 활성화되는 기능이 향상됨을 확인할 수 있었다.

표 15. 실험동물의 혈청 및 간 조직 중 총 항산화물질량(TAS)의 변화

<i>Groups</i>	<i>GPx in Serum ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>GPx in Liver Tissue ($\mu\text{mol/g}$)</i>
정상대조군	3.07±0.36 ^c	21.7±2.7 ^b
음성대조군	0.83±0.26 ^a	12.0±4.9 ^a
산삼배양근생식섭취군	2.03±0.20 ^b	17.4±4.1 ^{ab}
슈퍼자미생식섭취군	2.35±0.38 ^b	21.8±5.4 ^b

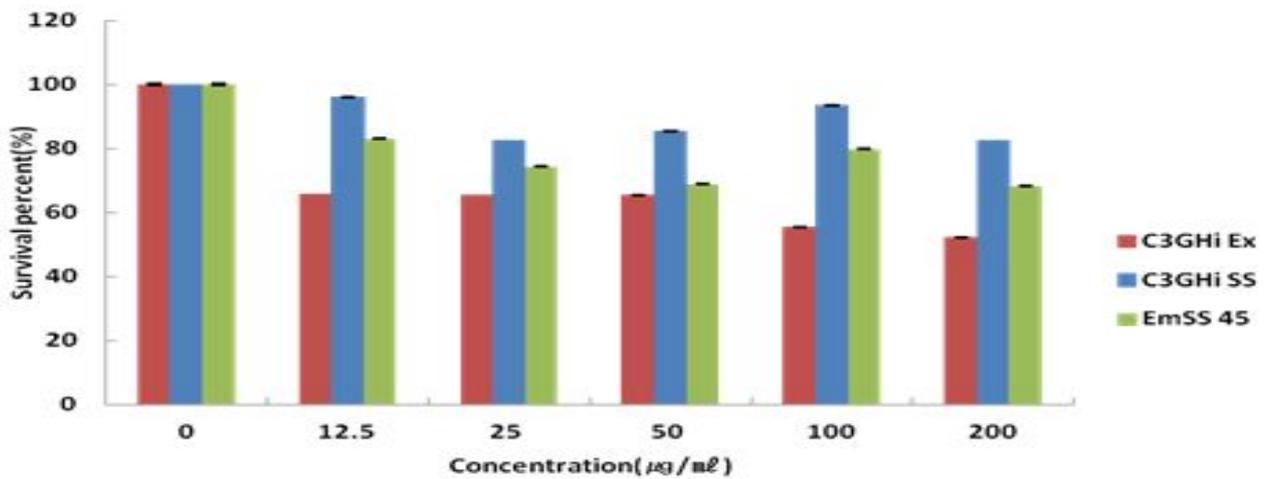
이상의 연구의 결과 사염화탄소에 의한 급성 간독성 유발 마우스에 대하여 시판되고 있는 일반 생식 및 일반 생식 제품에 슈퍼자미를 20% 함유하도록 제조된 슈퍼자미생식의 2주 이상의 섭취는 혈액과 조직의 산화적 손상과 간독성을 경감시켜 주는 것으로 평가되었으며, 각 시료에 대한 활성도는 슈퍼자미를 첨가한 생식의 항산화 활성이 가장 높아 슈퍼자미를 포함한 생식 제품이 생리활성이 강화되고 있음을 확인할 수 있었다. (활성도: 슈퍼자미생식>일반생식) 따라서 본 연구의 결과 슈퍼자미생식의 항산화 개선 효능이 기존 일반생식에 대하여 유의하게 높은 결과를 보여 슈퍼자미의 프리미엄급 생식의 제품 적용이 가능한 고품종 기능성 원물로서 적절하다고 판단된다.

다. 슈퍼자미 함유 생식의 항암 효과

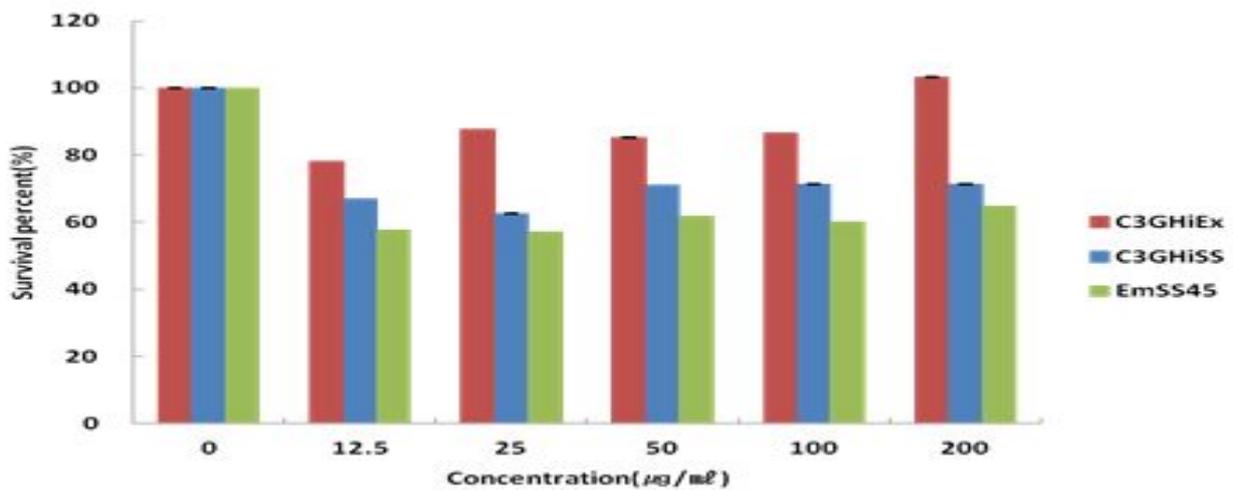
슈퍼자미를 함유한 생식 제품의 항암 효과를 확인하기 위하여 슈퍼자미 에탄올 추출물, 슈퍼자미 함유생식과 시중에서 판매되고 있는 생식 제품과의 항암 효과에 대한 활성을 비교 분석하였다. 일반생식(EmSS45)는 현재 시판되고 있는 생식중 시장점유율 1위를 하고 있는 이롭생식45를 비교대상으로 하였다.

항암효과 비교를 위하여 자궁경부암 세포주(Hela299 cell line), 대장암세포주(HT29 cell line), 폐암 세포주(A549 Cell line)에 대해서 각 시료의 추출물의 세포 성장 억제율을 관찰하였으며, 그 결과는 그림 99과 같다. 슈퍼자미 추출물은 자궁경부암세포주 및 폐암세포주에 대해서는 생육 저해 효과가 나타났으나, 대장암 세포주에서는 그 활성이 높지 않았으며, 슈퍼자미를 함유한 생식 제품의 경우 슈퍼자미 추출물에 비해서는 낮은 활성이었으나 3개 암 세포주 모두에서 일정한 생육 저해효과를 보여 슈퍼자미 함유 생식의 장기 섭취시 암 예방에 대한 효과가 있을 것으로 기대된다.

(A) Hela 299 cell line



(B) HT 29 cell line



(C) A549 cell line

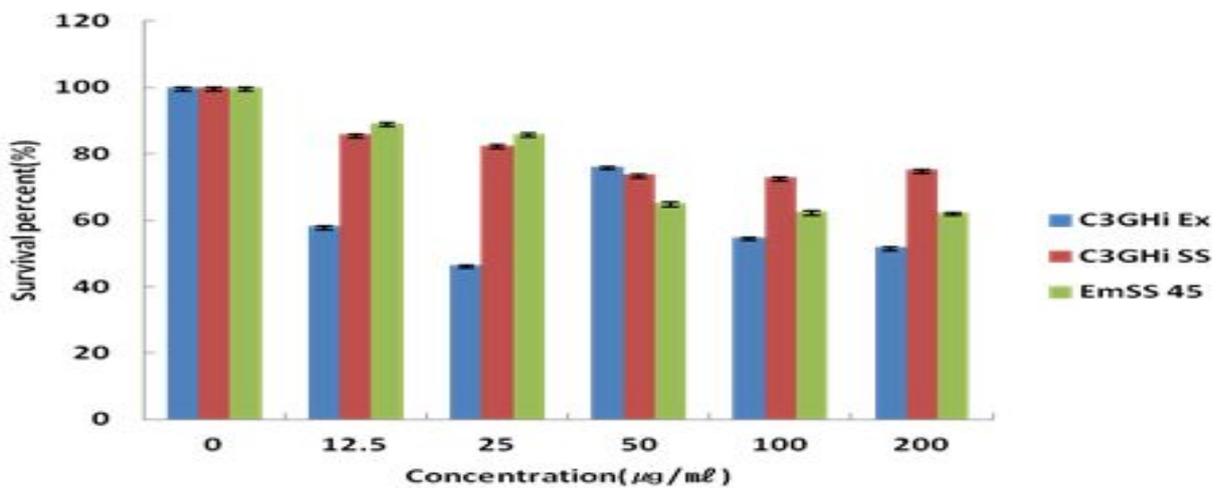
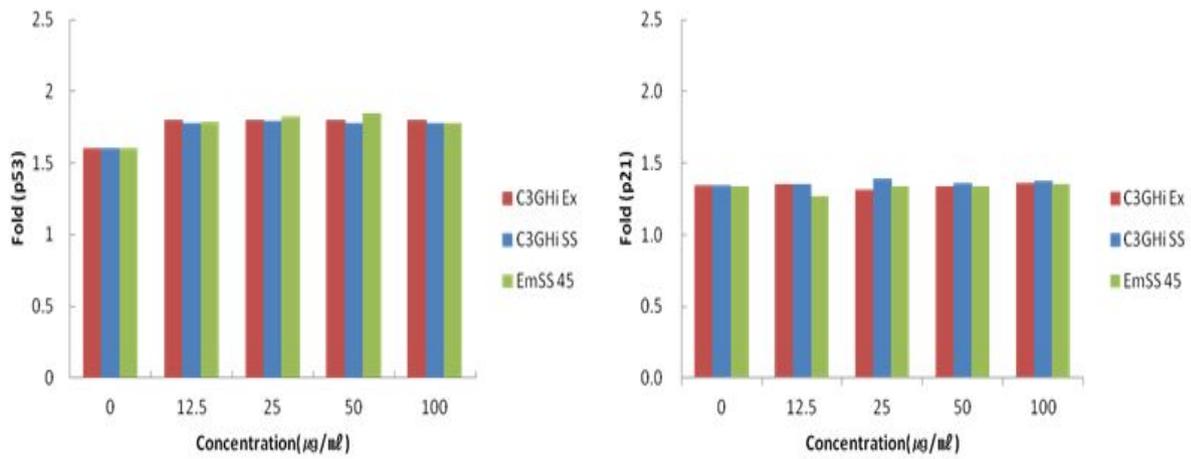


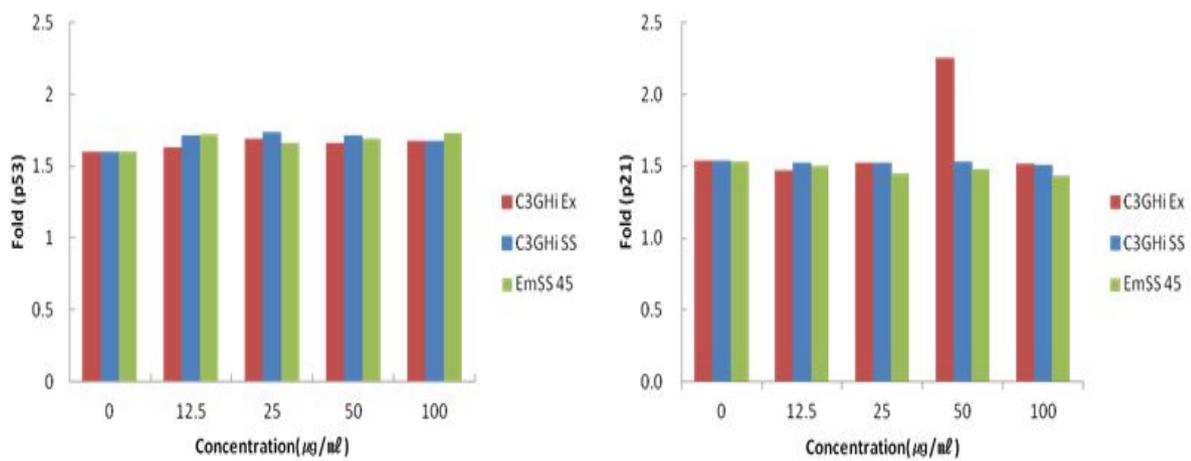
그림 99. 슈퍼자미 추출물, 슈퍼자미 함유생식(C3GHiSS), 시판생식(EmSS45)의 항암효과

각 추출물 및 생식 제품의 항암 효과에 대한 기작을 관찰하기 위하여 종양 억제 유전자인 p21 유전자와 p53 유전자에 대한 발현양을 조사하였다. p21 유전자는 세포의 생육 주기 중 G/M 주기에서 세포 주기 전반에 걸친 조절자로 알려져 있으며, p53 유전자는 G1에서 세포 생육을 억제하는 조절인자로 알려져 왔다. 각 암 세포주에 슈퍼자미 추출물, 슈퍼자미 함유 생식, 일반 생식 제품을 처리한 후 p21, p53 유전자의 발현양을 조사한 결과는 그림 32와 같이 나타났다. 슈퍼자미 및 슈퍼자미 함유 생식 제품의 암 유전자 발현양 조사에서 p53, p21 유전자 모두에서 일정량의 증가폭이 관찰되었으며, 암세포의 세포 증식을 억제함으로써 항암 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

(A) Hela 299 cell line



(B) HT29 cell line



(C) A549 cell line

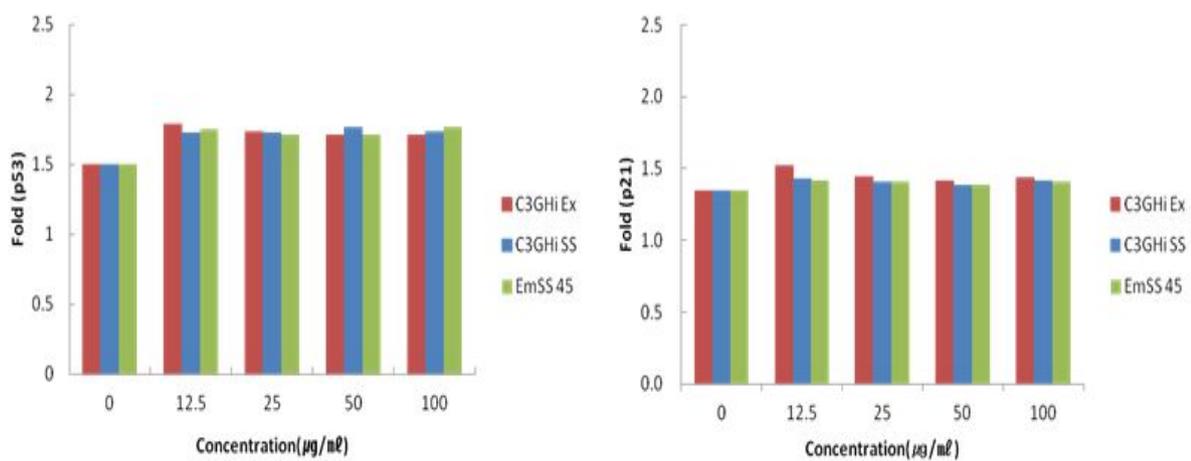


그림 100. 슈퍼자미 추출물, 슈퍼자미 함유생식(C3GHISS), 시판생식(EmSS45)의 압 조절 유전자 발현양에 미치는 영향

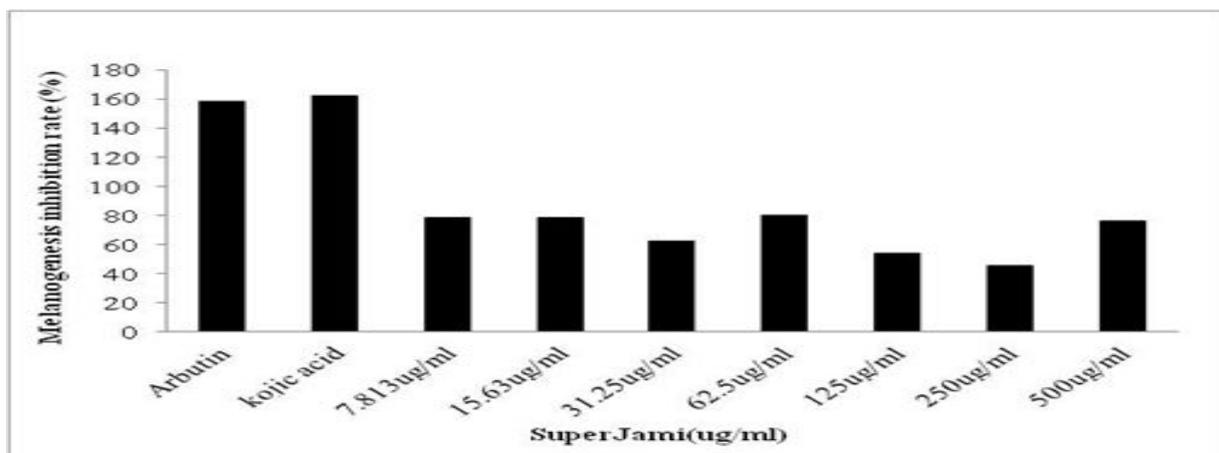
라. 슈퍼자미의 향장 원료화

(1) 피부 미백 효과 검증

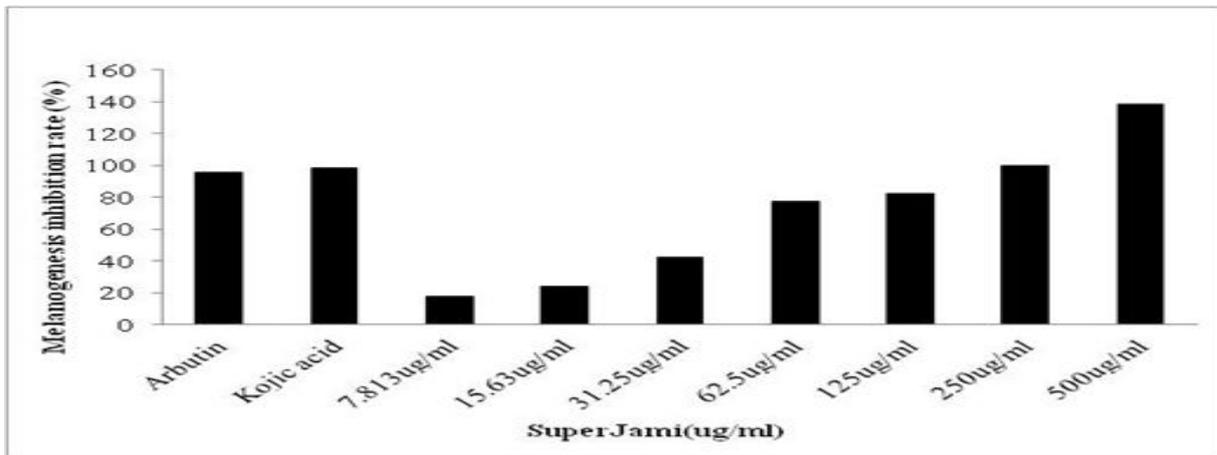
슈퍼자미의 활용성 증대를 위하여 식품 원료가 아닌 화장품(향장품)의 원료로서의 가능성을 타진하기 위하여 슈퍼자미 추출물의 피부 세포에 대한 생리활성 검증을 수행하였다.

슈퍼자미의 피부 보호 효과중 미백 효과에 대한 관찰 결과는 그림 101과 같이 나타났다. 피부 세포는 UV 또는 화학적 자극에 의하여 흑화 색소인 melanin을 생합성하여 누적시킴으로서 피부에 점, 검버섯과 같은 흑색 색소가 침착 되는 현상이 발생하고 있으며, 이를 억제하기 위하여 melanin 생합성을 억제할 수 있는 기능성분을 중심으로 피부 미백(whitening)에 대한 효능을 가진 기능성 화장품을 제조하고 있다. 슈퍼자미 추출물의 피부 미백 활성을 검증하기 위하여 멜라닌 생합성 세포인 B16-B16 cell line을 이용하였으며, melanin 생합성 촉진을 위하여 UV 조사, 산화제(hydrogen peroxide) 처리 및 confluent stress를 가하는 3가지 유도 방법을 사용하였다. 양성 대조물질로는 arbutin과 kojic acid를 사용하였다. UVB 조사에 의한 melanogenesis는 유의적인 결과를 나타내지 않았으나, hydrogen peroxide에 의한 melanogenesis는 시료농도가 증가함에 따라 억제되었으며, 특히, 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 86%의 저해율을 나타내어 우수한 피부 미백 효과가 관찰되었다. Confluent stress에 의한 melanogenesis는 역시 시료 농도가 증가함에 따라 증가하였고, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 78%로 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 슈퍼자미가 melanin 생성을 50% 저해 시키는 농도는 hydrogen peroxide의 처리로 melanogenesis를 유도한 경우 35.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났고, confluent stress에 의해 유도된 경우 120.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, 본 실험에서 슈퍼자미 에탄올 추출물은 hydrogen peroxide와 같은 산화적 손상에 의한 melanogenesis와 또한 자연적으로 발생하는 melanogenesis를 억제하는데 매우 우수한 효과를 가진 것으로 판단된다.

(A) UVB



(B) Hydrogen peroxide



(C) Confluent Stress

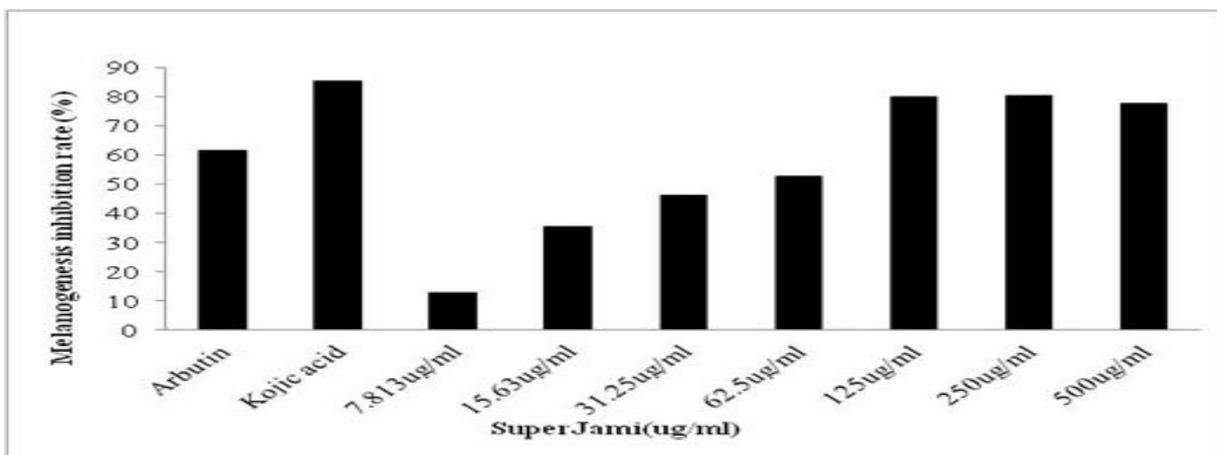


그림 101. 슈퍼자미의 피부 미백 효과

Melanin 생합성에 관여하는 key enzyme인 tyrosinase에 대한 억제 활성을 관찰한 결과는 그림 102와 같이 나타났다. Arbutin과 kojic acid는 모두 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해 활성이 증가되는 것으로 이 관찰되었고, 슈퍼자미 추출물 역시 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해활성이 증가되었다. 특히, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 양성대조군으로 사용한 kojic acid 100mM을 보다 활성이 더 우수하였으며, tyrosinase 활성을 50% 저해하는 슈퍼자미 처리 농도는 84.94 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, 피부 미백 기능과 관련하여 기능성 소재로서의 개발 가능성이 있을 것으로 판단되었다.

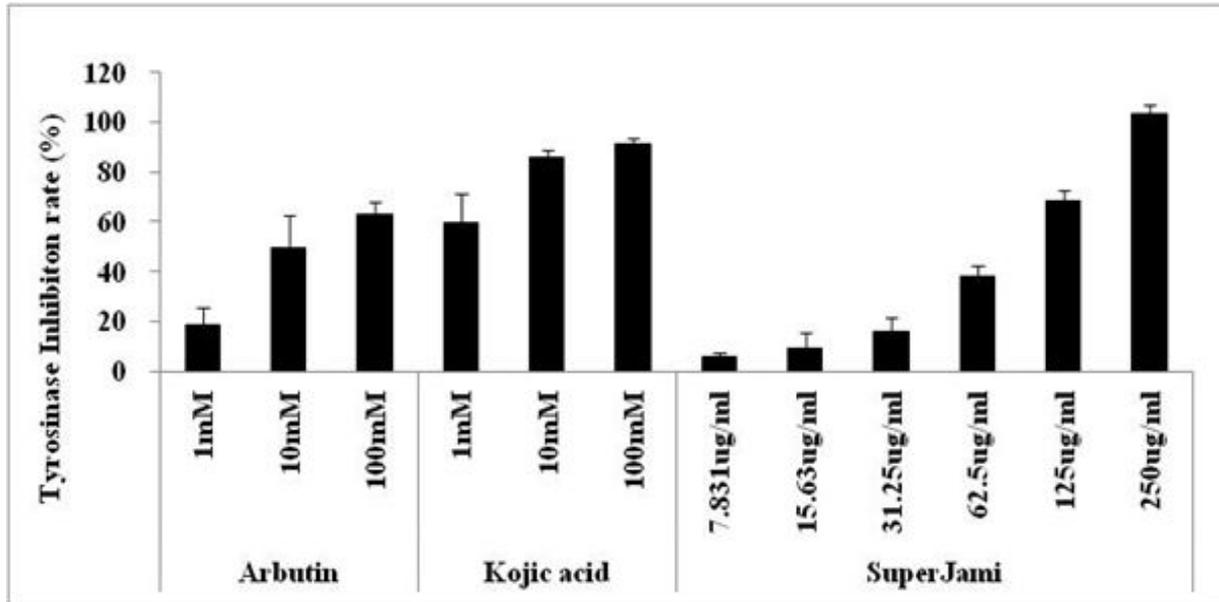


그림 102. 슈퍼자미의 tyrosinase 활성 억제 효과

Melanin 생합성 과정상에서 melanin의 전구물질인 DOPA의 자동 산화를 억제하면 피부 미백 효과가 있는 것으로 알려져 있기에 슈퍼자미의 피부미백 효과를 검증하기 위하여 DOPA의 자동산화 억제 기능을 검증하였으며, 그 결과는 그림 102와 같이 나타났다. 양성대조군은 농도가 증가와 함께 따라 DOPA-oxidase 억제율이 증가하였으며, 특히 arbutin보다 kojic acid의 효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다. 슈퍼자미의 DOPA-oxidase를 50% 저해하는 농도인 IC50의 농도는 $12.62\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, $250\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 양성대조군인 kojic acid 100mM과 유사한 DOPA-oxidase 억제율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합할 때 슈퍼자미 추출물은 DOPA의 자동산화 억제, tyrosinase에 대한 효소 활성의 억제 및 피부 세포에서 흑화 색소인 melanin의 생합성을 억제함으로써 피부 미백 효과를 가지고 있는 것으로 확인되었으며 차후 슈퍼자미를 이용한 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성이 매우 높다고 판단되었다.

(2) 피부 주름 개선 효과 검증

피부는 노화되면서 collagen이나 elastin과 같은 섬유질의 감소가 나타나고 이로 인하여 주름이 발생하는 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문에 피부 노화를 억제하고 피부 주름 상태를 개선할 수 있는 기능성 소재들은 collagen과 같은 피부 섬유질의 합성을 증대시키거나 또는 collagen, elastin과 같은 피부 섬유질을 분해하는 효소인 collagenase, elastinase와 같은 효소를 저해하는 것을 가장 중요한 목표로 삼아 개발되고 있다. 본 연구개발에서는 슈퍼자미의 피부 주름 개선 효과를 확인하기 위하여 피부세포인 human fibroblast Hs46Fs cell line을 이용하여 collagen 및 elastin에 대한 합성 촉진능에 대한 검증을 수행하였다.

Collagen 생합성 증가 시험은 SircolTMkit를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 그림 103과 같이 나타났다. collagen 생합성량을 감소시키기 위한 외부 자극으로서 세포의 산화적 손상은 UVB조사와 hydrogen peroxide를 처리하여 각각 유도하였다. UVB조사로 산화적 손상을 유발한 세포에서 슈퍼자미의 처리 농도에 따라 collagen 생성이 증가하였고, 특히, $250\mu\text{g/ml}$ 농도

부터 음성 대조군((+)UVB)과 비교하여 상대적으로 높은 collagen 생성량을 나타내었음. 수퍼자미 농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100. 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 콜라겐 생성량을 나타내어, 음성 대조군과 비교하여 33% 정도 collagen 생합성양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Hydrogen peroxide로 산화적 손상을 유발한 세포에서는 수퍼자미의 처리 농도에 따라 collagen 생합성이 증가하였으나, 대조군과 비교할 때 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 collagen 생합성이 증가하는 것으로 나타났으며, 가장 많은 collagen 생합성을 나타낸 수퍼자미 농도는 위 실험과 동일하게 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이며, 이 농도에서 collagen 생성량은 97.83 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났음. 음성 대조군((+)H₂O₂)에 비해 37% 높은 collagen 생합성을 나타낸 것으로 나타났다.

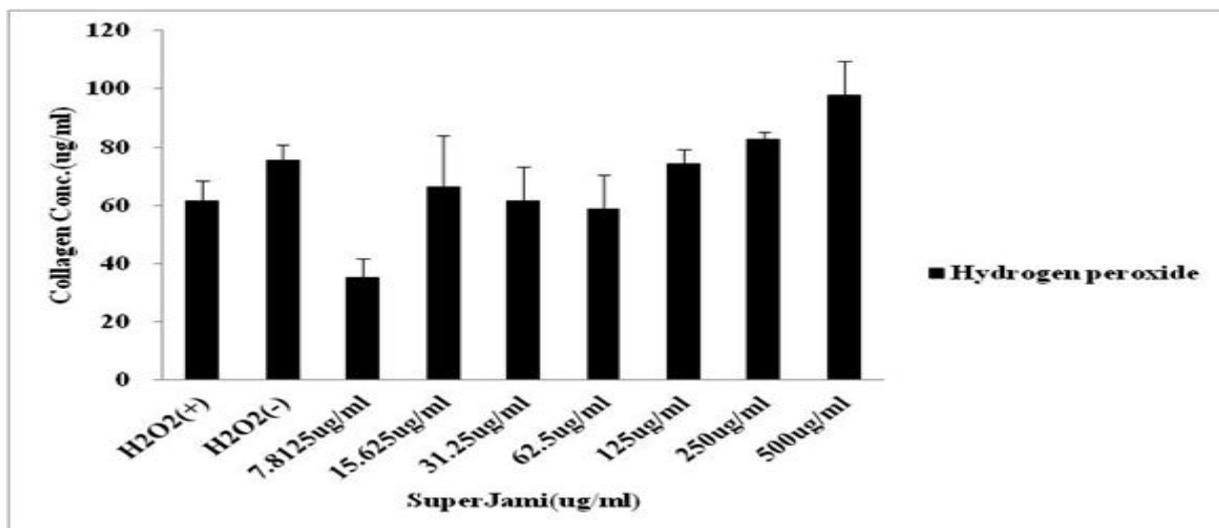
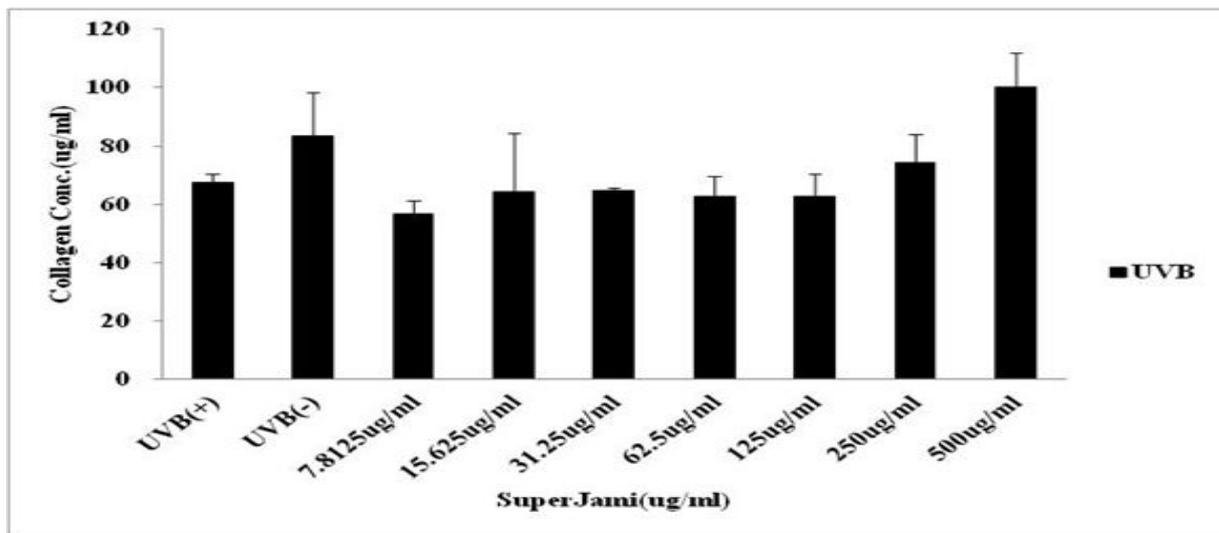


그림 103. UVB 및 Hydrogen peroxide 자극에 대한 슈퍼자미의 collagen 합성 증가 효과

Elastin 생합성 증가 시험은 FastinTMkit를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 그림 104과 같이 나타났다. 세포의 산화적 손상은 UVB조사와 hydrogen peroxide를 처리하여 유도하였으며, UVB조사로 산화적 손상을 유발한 세포에서 수퍼자미 처리 농도에 따라 elastin 생성량은 유의적으로 증가하지 않았고, 수퍼자미 처리농도 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 elastin 함량이 가장 높았고, 음

성 대조군(+)UVB)과 비교하여 5.39% 증가하는 것으로 관찰되었다. Hydrogen peroxide로 산화적 손상을 유발한 세포에서도 슈퍼자미의 처리 농도에 따라 elastin 생성량이 증가하는 경향을 나타내지 않았으며, 또한 음성대조군(+)H2O2)와 비교하여 생성량이 증가하지 않는 것으로 나타나 슈퍼자미의 처리는 elastin 생성량에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 즉, 슈퍼자미 추출물은 collagen의 생합성은 촉진시키지만 elastin에 대한 생합성 촉진 능은 상대적으로 낮아 피부 주름 개선 효과가 미백 효과와 같이 크게 나타나지는 않는 것으로 판단된다.

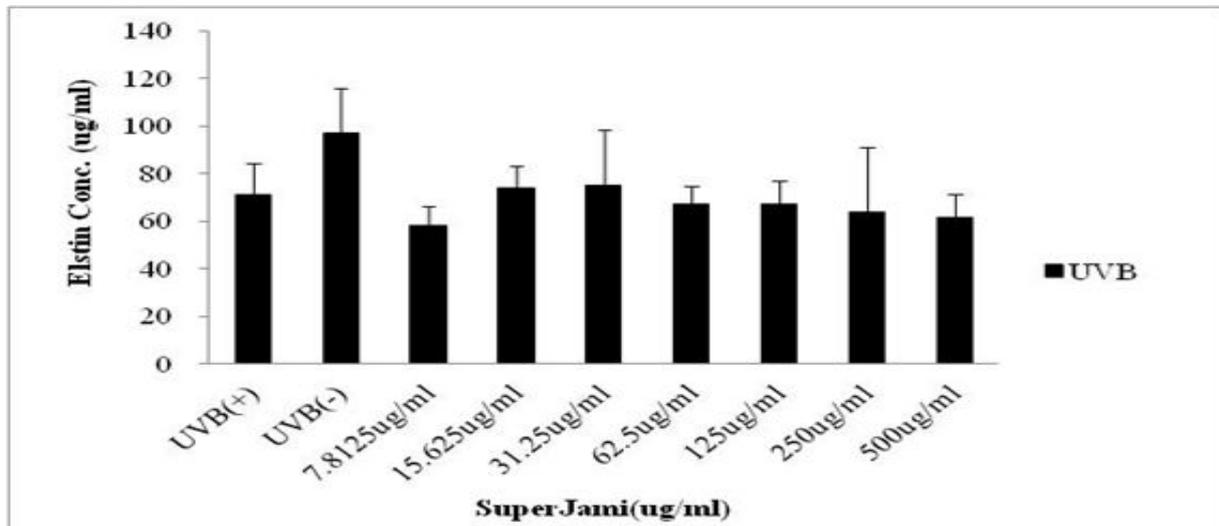
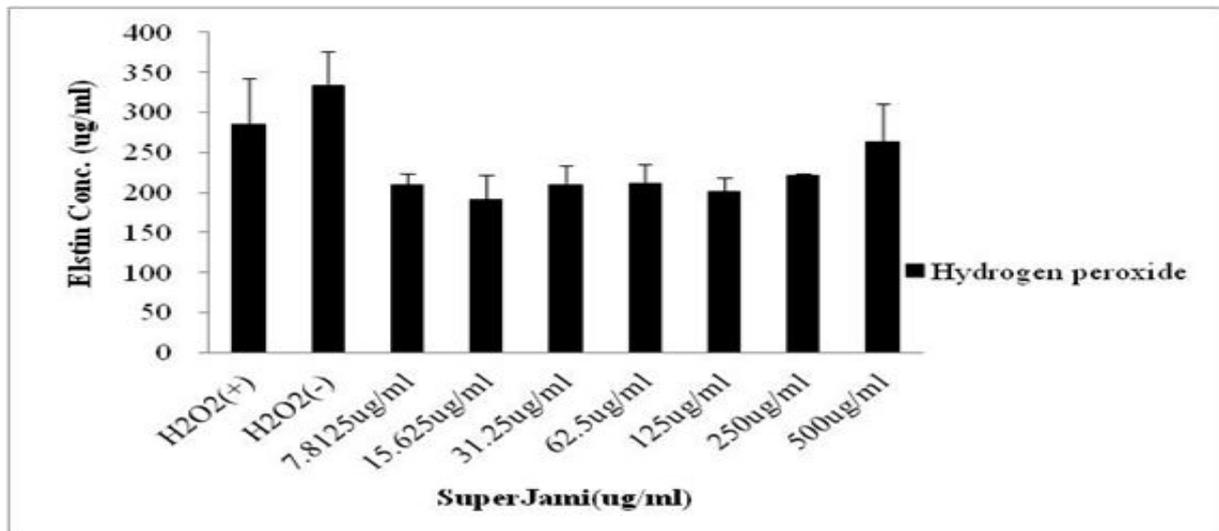


그림 104. UVB 및 Hydrogen peroxide 자극에 대한 슈퍼자미의 elastin 합성 증가 효과

(3) 슈퍼자미를 이용한 향장 제품 개발

슈퍼자미 추출물을 이용하여 2종의 향장 제품을 개발하였다. 향장제품은 슈퍼자미의 본연의 색상을 살린 보라색 계열의 크림 제품과 흑미의 이미지를 강화한 검정색 계열의 크림 제품 2종으로 개발되었다. 본 제품은 천연 색소를 사용한 제품으로 제품 안전성에서 좀더 연구개발이 필요하나 슈퍼자미의 이미지를 잘 살린 천연 기능성 화장품으로서 개발되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입판 매신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						6	1	
	달성	1				3	5	3(7)		
2차년도	목표	1				1		3	5	1
	달성							1(4)		
3차년도	목표									
	달성							2(8)		
계	목표	2				1		3	11	2
	달성	1				3	5	6(19)		

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표					
	달성		2		20	

(3) 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	슈퍼자미벼의 품질특성	류수노	류수노		한국국제 농업개발 학회지	23(2) 174-178	국내	학진 등재지
2011	슈퍼자미(Super C3GHi)미강 발효물의 생리활성	김동주	홍성길	최수민, 김화영, 김중학, 류수노, 한상준	한국작물 학회지	56(6)420-4 26	국내	학진 등재지
2011	유색미 미강 발효물의 면역 증강 효과	김동주	홍성길	류수노, 한상준, 김화영, 김중학	한국식품 영양학회 지	24(3)273-2 81	국내	학진 등재지
2010	Cyanidine-3-glucosid e (C3G) 색소의 함유 량이 증대된 쌀 신품 종(C3GHi)의 항산화 및 항당뇨 활성	김화영	홍성길	김중학, 이성애, 류수노, 4한상준	한국작물 학회지	55(1) 38-46	국내	학진 등재지

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	이면교배에 의한 흑자색 미 안토시아닌 함량의 유 전분석	권순욱	류수노	한상준 김홍열	한국작물학 회지	53(S) 58~64	국내	학진 등재지
2011	검정쌀 대립자미벼 추출 물의 histamine분비억제 효과	김그리나	한상준	김효선, 추상호, 류수노	한국작물학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	검정쌀 슈퍼자미벼 추출 물의 염증 억제효과	정현수	한상준	김효선, 추상호, 류수노	한국작물학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	Contents of Amino Acid and GABA in Different Pre-germinate Treatment of Some Functional Varieties	함태호	류수노	추상호, 한상준	한국작물학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	슈퍼자미 2호 벼의 작물학 적 특성 및 품질 특성	류수노	류수노	추상호, 권순욱, 한상준	한국육종학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	Quality Characteristics of Superjami Colored Rice	추상호	류수노	권순욱, 한상준	한국작물학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	The Antiallergic Effects of the Extracts of the Korean Lacquer Tree	정현수	한상준	김그리나, 추상호, 류수노	한국작물학 회지	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	흑자색미 대립자미벼의 작물학적 특성 및 품질 특성	추상호	류수노	권순욱 한상준	한국작물학 회	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	Comparison of Food Security Policy in Republic of Korea and Japan	류수노	류수노		한국작물학 회	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	C3GHi 미강발효무제품의 면역 증강 및 소화효소 억제 효과	최수민	홍성길	김화영 류수노 한상준	한국식품영 양과학회	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2011	슈퍼자미의 피부미백과 주름개선 효과 검증	김동주	홍성길	김중학 류수노 한상준	한국식품영 양과학회	2011정기 학술대회	국내	학진 등재지
2010.	유색미 미강발효물의 경 구 투여가 마우스 면역세 포 활성화에 미치는 영향	김동주	홍성길	김화영	한국식품영 양과학회	2010년 추계 학술대회	국내	학진 등재지

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	유색미 미강 1차 발효물과 유색미 미강 2차 발효물의 경구투여가 마우스의 항암 활성에 미치는 효과	김동주	홍성길	김화영 김중학	한국식품영양과학회	2010년 추계 학술대회	국내	학진 등재지
2010	국내 육성 유색벼 품종의 도열병 저항성 유전자 탐색	권순옥	류수노	추상호 정현수	한국육종학회	2010 정기 학술대회	국내	학진 등재지
2010	큰눈자미벼의 작물학적 특성 및 품질 특성	권순옥	류수노	추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2010	슈퍼자미벼의 작물학적 특성 및 품질 특성	권순옥	류수노	추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2010	대립자미벼의 작물학적 특성 및 품질 특성	추상호	류수노	추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	안토시아닌 고함유 유색미(C3GHi) 미강발효물의 면역활성 증진 효과	김화영	홍성길	김중학, 이성애, 류수노, 한상준	한국식품영양과학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	안토시아닌 고함유 유색미(C3GHi) 미강발효물의 염증반응 억제 효과	김화영	홍성길	김중학, 이성애, 류수노, 한상준	한국식품영양과학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	조생 및 중만생 안토시아닌 고함유 계통 육성	류수노	류수노	권순옥 추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	큰눈자미벼 계통 육성	류수노	류수노	권순옥 추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	대립자미벼 계통 육성	류수노	류수노	권순옥 추상호 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	고기능성 유색미의 생합성 관여 유전자 발현분석	안중훈	류수노	권순옥 한상준	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지
2009	흑자색 유색미 함유 Cyanidin3-glucoside 의 대사와 항소양기능	한상준	한상준	정현수 권순옥 류수노	한국작물학회	정기 학술대회	국내	학진 등재지

(4) 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009. 9	免疫力增強 super C3G Hi 稻	류수노 외 2	일본	2009- 208314	2009.11	유전자 원기탁 (KNO U3)	류수노 외 2	한국	k156115
2009.12	폼중출원 (대립자미벼)	류수노 외 2	한국	2009-477	2009.11	유전자 원기탁 (KNO U4)	류수노 외 2	한국	k156116
2009.12	폼중출원 (슈퍼자미벼)	류수노 외 2	한국	2009-478	2009.11	유전자 원기탁 (KNO U5)	류수노 외 2	한국	k156117
2009.12	폼중출원 (큰눈자미벼)	류수노 외 2	한국	2009-479	2009.11	유전자 원기탁 (KNO U6)	류수노 외 2	한국	k156118
					2009.11	유전자 원기탁 (KNO U8)	류수노 외 2	한국	k156119

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 성과활용 계획

(1) 신기능성 슈퍼자미벼 품종의 확대 보급은 최근 서구화된 식단과 편의 생활에 따른 활동량의 감소 및 체중증가 등의 이유로 매년 증가하고 있는 아토피·당뇨병의 발병률을 낮추어 국민건강의 증진에 크게 기여할 것이며, 쌀은 안정성이 확보된 소재로서 쌀의 미래 신가치 창출이 가능할 것이다.

(2) 쌀의 소비감소와 값싼 외국농산물로 인하여 농가소득이 계속 감소하는 상황에서 신기능성 슈퍼자미쌀 개발은 수량이 아닌 기능성으로 외국농산물과 경쟁할 것이고, 최근 급속히 성장하고 있는 기능성 식품시장에 새로운 소재로 활용함으로써 우리나라 농가소득의 증대 및 쌀산업의 경쟁력 확보에 크게 기여하리라 예상된다.

(3) 후속연구를 통한 비만억제·항당뇨·항아토피 등의 멀티기능성 쌀 품종육성에 기초 자료가 될 것이며, 다양한 관련 제품군 개발로 기능성식품 시장을 확대에 기여할 것이다.

나. 앞으로 이렇게 달라집니다.

(1) 개인 맞춤형 기능성품종 개발시대의 도래

- 인간 유전체 해독 결과 인간의 DNA 염기 서열은 각 개인 간 약 0.1%만 다르고, 이 차이점이 질병에 대한 감수성 등 여러 가지 차이를 가져온다. 이러한 유전적 다형성에 대한 정보를 활용하여 개별 유전자에 맞는 개별 맞춤형 의약품 개발 시대가 눈앞에 다가오고 있다. 특히 우리가 매일 먹는 식품은 인간의 유전자와 상호작용하여 다양한 질환(당뇨병, 비만, 심혈관계 질환 등)을 예방할 수도 있다. 이러한 다양한 영양분은 주로 식물의 대사작용을 통하여 생산하게 된다. 식물은 기초적인 1차대사산물과 인간의 건강 증진을 도모할 수 있는 다양한 기능의 이차대사산물을 생산한다. 최근 유전체 연구는 기능 유전체학(functional genomics)과 연계하여 대사체학(metabolomics), 생리체학(physiomics) 등의 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 앞으로 식물체 자체가 가지고 있는 성분의 유무 및 상호작용에 대한 이해와 각 개인의 다양한 질환의 예방 또는 치료와 관계된 개인별 유전적 다양성에 의한 특성을 상호 연계한 복합적이고 종합적인 품종개발이 필요하게 될 것이다.

(2) 안전한 농산물 생산과 건강기능성 소재로 활용

- 최근 천연물을 이용한 약물 개발 또는 기능성식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히 농산물은 인간이 오랫동안 섭취하여 온 것으로 크고 작은 부작용을 동반하는 기존의 의약소재와는 달리 안전하고 지속적인 효과를 기대할 수 있는 대단히 우수한 기능성 소재라고 할 수 있다. 앞으로는 쌀을 포함한 다양한 작물에서 기능성 신물질들을 분리하고, 그 작용기작을 연구함으로써 더 많은 분야에 활용될 것이다.

다. 회로애락(연구후일담)

(1) GMO품종의 안전성에 대한 사회적 논란이 계속되고 있다. GMO가 아닌 전통적인 교배육종에 의해서도 새로운 신품종개발의 가능성을 제시하려 본 연구를 수행하였다. 연구 시설의 열악함을 극복해가며, 신기능성품종에 대한 정보획득과 자료 축적을 위해 포장과 실험실을 씀 없이 오간 연구원들의 땀과 노력은 기술개발의 밑거름이 되어 주었다.

(2) WTO, FTA 등 세계농업 선진국과 무한경쟁의 체계에서 우리나라 농업이 살아남고 한걸음

더 나아가 고품질농산물을 수출 하는 농업국가로 거듭나기 위해서는 품종육성 - 재배 - 가공 - 유통 - 판매에 이르는 시스템화 된 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것이다. 특히 우리나라의 농산물은 세계적으로 품질이 가장 좋은 것으로 알려지고 있는데, 이를 증명하기 위해서는 식약 동원(食藥同源) 즉 먹어서 약이 되는 농산물을 발굴해 내고, 그 물질의 양을 많이 함유하고 있는 새로운 품종을 개발하고, 더 나아가서는 이 물질을 활용하여 천연물신약으로서 개발이 가능 할 것으로 생각된다.

라. 언론 홍보

NO.	홍보유형	매체명	제목	일시
1	월간잡지	헬스조선	이롭생식으로 만나는 블랙푸드 '슈퍼자미'	20111201
2	중앙전문지	아시아경제	교과부, 2010국가연구개발 우수성과 100선 선정	20101201
3	중앙전문지	파이낸셜뉴스	2010국가연구개발 우수성과100선 선정	20101201
4	중앙TV방송	KBS	한식탐험대	20101022
5	지방일간지	서울신문	Vision2009 경영혁신 대상 사회공헌부문	20091218
6	중앙전문지	농민신문	아토피당뇨 잡는 쌀 개발	20091214
7	중앙일간지	The korea herald	Korea develops diabetes, atopy-easing rice	20091211
8	중앙일간지	중앙일보	아토피 당뇨에 효과 '슈퍼쌀' 개발	20091209
9	중앙일간지	경향일보	당뇨아토피 쌀밥 먹고 치료하세요	20091209
10	중앙일간지	세계일보	당뇨아토피 치료에 좋은 쌀 개발	20091209
11	중앙일간지	국민일보	당뇨아토피 잡는쌀 나왔다	20091209
12	중앙TV방송	MBC	당뇨아토피에 좋은 슈퍼 쌀 개발	20091208
13	중앙TV방송	KBS	당뇨아토피에 효과있는 신품종 쌀 등장	20091208
14	중앙TV방송	SBS	밥만 먹어도 아토피 당뇨 낫는다? 슈퍼쌀 개발	20091208
15	중앙TV방송	매일경제TV	아토피 치료하는 쌀	20091208
16	중앙TV방송	연합뉴스	방통대, 당뇨아토피 치료쌀 개발	20091208
17	중앙일간지	아시아투데이	당뇨아토피 치료 슈퍼 쌀 개발	20091208
18	중앙일간지	문화일보	당뇨아토피 잡는 '슈퍼기능성 쌀' 개발	20091208
19	중앙TV방송	YTN	아토피 당뇨 완화 슈퍼쌀 개발	20091208
20	Internet/PC통신	메디컬투데이	당뇨아토피 개선효과 기능성 쌀 개발돼	20091208

마. 수상 및 기타 홍보성과

No	일자	수상명칭	공적내용
1	20100219	Vision2010 대한민국 교육혁신 대상	C3G고함유 벼의 특성과 기능효과
2	20101206	2010 국가연구개발 우수성과 100선	아토피/당뇨 예방에 탁월한 효과가 있는 신 기능성 쌀 품종 육성
3	21001013	농림수산물식품과학기술대상	세계최초 생활습관병(당뇨·아토피) 치료효과 있는 특수 쌀 개발

* 별첨 : 2010년도 국가연구개발사업 우수성과 100선 선정 성과 사례

2010년도 우수성과 100선 사례집

1. 성명



류수노

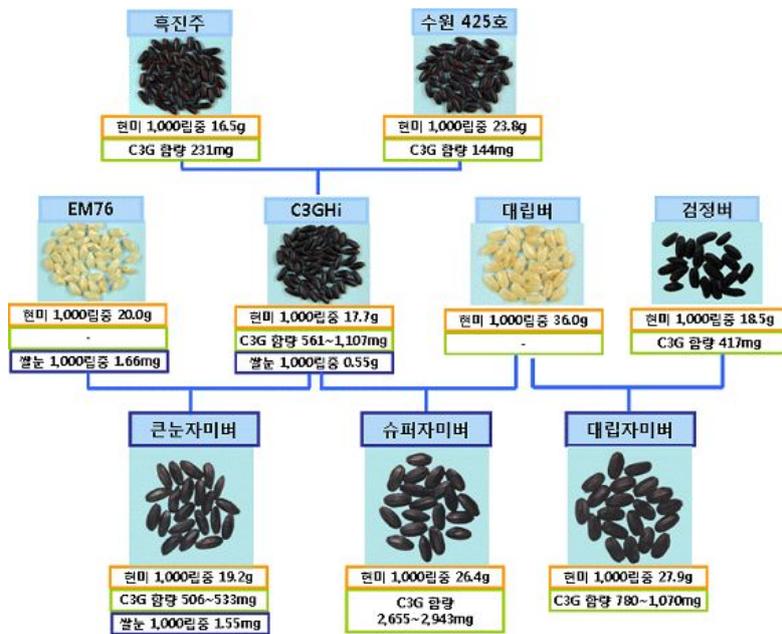
한국방송통신대학교 농학과 / 교수

ryusn@knou.ac.kr

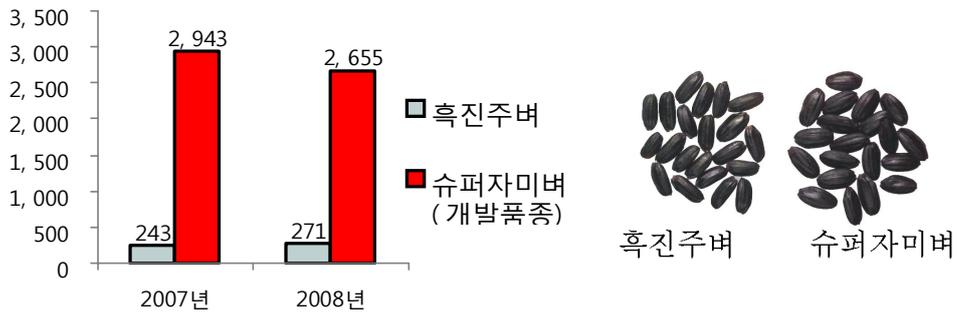
02-3668-4631

2. 연구개발의 핵심은 바로 이것!

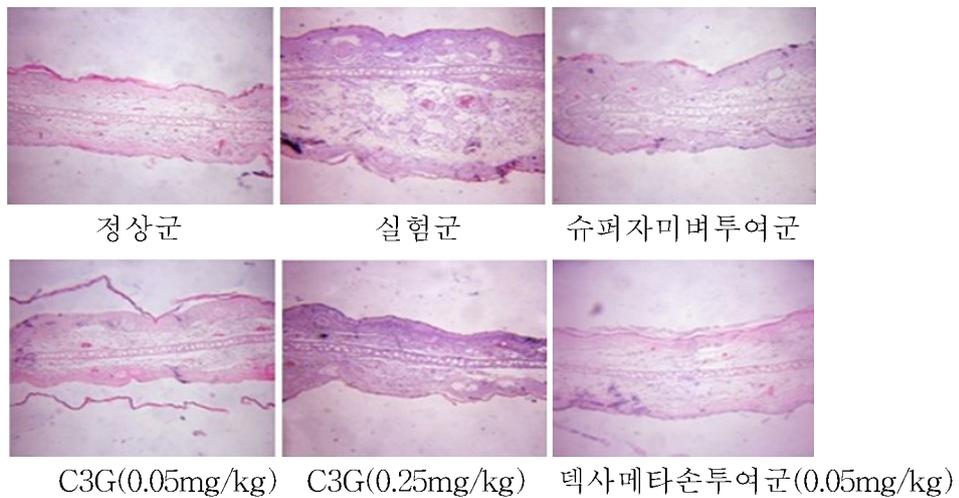
- 세계 최고 수준의 C3G(Cyanidin 3 glucoside) 고함유 신기능성 쌀 품종 및 복합기능성 쌀 품종 육종
 - ▶ 안토시아닌 색소 중 C3G는 시력보호·노화억제·항암기능·당뇨·아토피에 효과가 있는 기능성 흑자색 천연색소입니다.
- 슈퍼자미(紫米)벼는 국내 유색미 품종 인 흑진주벼에 비해 10배 정도의 C3G를 함유하고, 이는 세계 10대 슈퍼푸드인 블루베리보다 안토시아닌 함량이 1.2배 높은 수준이다.
- 대립(大粒)자미벼는 흑진주벼에 비해 쌀알의 무게가 1.6배 정도 무거운 품종으로 C3G의 함량 역시 3배 높은 품종이다.
 - ※ 현미 1,000알의 무게 : 흑진주벼 17.0g < 대립자미벼 27.6g
- 큰눈자미벼는 쌀눈의 크기가 일반 쌀보다 3배 정도 큰 품종으로, 쌀눈에는 가바(GABA) 등의 기능성 물질이 더 많이 함유되어 있고, 영양성분도 높은 C3G 고함유 품종이다.
 - ※ 쌀눈 1,000알 무게 : 흑진주벼 0.55g < 큰눈자미벼 1.55g
- 쌀의 미래 신가치 창출 : 생리활성·항아토피·항당뇨효과 검증 및 작용기전 규명
 - 쌀로부터 C3G의 분리·정제 및 C3G의 구조결정 및 이화학적 특성 규명
 - C3G의 가려움증 억제효과가 높아 아토피 치료 기대.
 - 항당뇨효과 검증



<그림 1> 신품종의 육성 계보



<그림 2> 슈퍼자미버의 C3G함량 (mg/100g 종자)



<그림 3> 슈퍼자미버의 가려움 억제효과

3. 캐치프레이즈

멘델의 유전법칙으로부터 그 후 200년!

세계 최고수준의 향당뇨·항아토피 신기능 쌀 품종육성

4. 주요연구개발성과

□ 연구성과 활용실적

- 품종보호출원 : 대립자미벼(102009000477호)
슈퍼자미벼(102009000478호)
큰눈자미벼(102009000479호)

○ 특허등록 및 출원

- 특허등록 : 多量の 天然色素 C3G 含有 水稻種子(일본, 제 3886499호, 2007) 외 3건
- 특허출원 : 免役力增強 Super-C3GHi 稻(일본, 2009-208314, 2009) 외 1건

○ 주요논문

- Han S.J., S.N. Ryu, H.T. Tring, E.H. Joh, S.Y. Jang, M.J. Han, and D.H. Kim. 2009. Metabolism of Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside Isolated from Black Colored Rice and It's Anti-scratching Behavioral Effect in Mice. Journal of Food Science 74(4): 253~258 외 8건 (SCI 5건, 등재지 3건)

○ 제품화사례

- 흑자미 천연색소 소재



타블렛



환



크로칸트 환

□ 연구특징

○ 기술적 측면

- 세계 최고 수준의 안토시아닌 함유 쌀 품종의 개발로 우수 유전자원을 보호 받을 수 있고, 멀티 기능 유색미 쌀 품종육성에 선도적 위치를 점할 수 있음.
- 벼 영양, 약리성분의 산업화 및 고부가가치 제품 개발에 활용.
- 면역력 개선효과 성분에 대한 가공 안정성 연구.
- 기능성 신 물질의 탐색 및 유사 제품 개발의 기술 기반.
- 신기능성 벼 유전자원의 조기 확보로 선진국과 기술협력 등 유대강화.

○ 학술적 측면

- 기능성 신 물질의 분리 및 정량분석법 개발
- 식물 성분의 유전 육종 연구 및 복합 기능성 맞춤형 품종 육성 기술기반 연구
- 식물 유래 신물질 탐색 및 동정



교육과학기술부

국가연구개발
우수성과
100선

국가연구개발
우수성과패

한국방송통신대학교
류수노

성과명 : 당뇨·아토피 억제효과가 큰 기능성 쌀 신품종 육성
귀하의 위 연구성과가 2010 국가연구개발 우수성과
100선으로 선정되었기에 이 패를 드립니다.

2010년 12월 6일

교육과학기술부
장관 이주호



제 9410 호

표창장

한국방송통신대학교
교수 류수노

귀하는 평소 맡은 바 직무에 정려하여
왔으며 특히, 농림수산·식품 과학기술
분야의 창의적 기술개발로 농어업인의
소득증대 및 농식품 산업발전에 기여한
공이 크므로 이에 표창함

2011년 10월 13일

교육과학기술부장관 이 주



민원인을 가족같이, 민원을 내일같이

통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

담당자: 김현옥 전화 : (031) 467-0111 FAX : (031) 467-0116

인터넷 홈페이지 : www.seed.go.kr

4 3 0 - 0 1 6 경기도 안양시 만안구 안양6동 433

품종보호출원번호 통지서

출원일자 : 2009. 12. 02	품종보호 출원번호 : 출원 2009 - 478
	품종명칭 출원번호 : 명칭 2009 - 1196

작 물 명 : 벼

품종 명칭 : 슈퍼자미

출 원 인 : 한국방송통신대학교산학협력단

주 소 : 서울 종로구 동숭동 169

2009년 12월 02일

국 립 종 자 원



민원인을 가족같이, 민원을 내일같이

통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

담당자: 김현옥 전화: (031) 467-0111 FAX: (031) 467-0116

인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr

430 - 016 경기도 안양시 만안구 안양6동 433

품종보호출원번호 통지서

출원일자: 2009. 12. 02

품종보호 출원번호: 출원 2009 - 479

품종명칭 출원번호: 명칭 2009 - 1197

작 물 명: 벼

품종 명칭: 큰눈자미

출 원 인: 한국방송통신대학교산학협력단

주 소: 서울 종로구 동숭동 169

2009년 12월 02일

국 립 종 자 원



민원인을 가족같이, 민원을 내일같이

통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

담당자: 김현옥 전화 : (031) 467-0111 FAX : (031) 467-0116

인터넷 홈페이지 : www.seed.go.kr

430 - 016 경기도 안양시 만안구 안양6동 433

품종보호출원번호 통지서

출원일자 : 2009. 12. 02	품종보호 출원번호 : 출원 2009 - 477
	품종명칭 출원번호 : 명칭 2009 - 1195

작 물 명 : 벼

품종 명칭 : 대립자미

출 원 인 : 한국방송통신대학교산학협력단

주 소 : 서울 종로구 동숭동 169

2009년 12월 02일

국립종자원



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 서구 선진국 및 개발국 등에서 아토피 등 피부면역계 이상에 의한 질환이 매년 지속적으로 증가하고 있는 추세이고, 따라서 전 세계 연구진들로부터 이를 개선하기 위한 각종 의약품 개발이 경쟁적으로 진행되고 있음.
- 현재까지 아토피와 같은 면역계 이상에 의한 질환의 치료는 스테로이드계열의 크림이나 연고 등이 개발되어 있으나, 일시적으로 증상을 완화하는 경우에 국한되며, 크고 작은 부작용을 동반함.
- 천연물을 중심으로 아토피 질환을 치료 또는 개선하기 위한 약물개발 또는 기능성식품의 개발이 주로 이루어지고 있으나, 주석을 이용한 아토피질환의 개선하거나 치료하기 위한 연구는 없음

제 7 장 참고문헌

Auger C., Caporiccio B., Landrault N., Teissedre P.L., Lautent C., Gros G., Besancon P., Rouanet J.M. 2001. Red wine phenolic compounds reduce plasmalipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamster. *Nutr Metab* 131 : 2837-2842.

Bressani, R., L.G. Elias, and B.O. Juliano. 1971. Evaluation of the protein quality of milled rices differing in protein content. *Jour. Agric. Food Chem.* 19(5) : 1028-1034.

Cagampang, G.B., A.A. Perdon, and B.O. Juliano. 1976. Changes in salt-soluble proteins of rice during grain development. *Phytochemistry.* 15 : 1425-1429.

Chae S.Y., Shin S.H., Bae M.J., Park M.H., Song M.K., Hwang S.J., Yee S.T.. 2004. Effect of arabinoxylane and PSP on activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 278-286

Cho MH, Yoon HH, Hahn TR. 1996. Thermal stability of the major color compound, cyanidin-3- β -glucoside, from a Korean pigment rice variety in aqueous solution. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39 : 245-248

Cho S.H., Yang K, Bae B.S., Im S.A., Yu R.N. 1998. Effect of sea tangel intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J Korean Food Sci Nutr* 27 : 952-959

Cho Y.C., Kwon S.W., Choi I.S., Lee S.K., Jeon J.S., Oh M.K., Roh J.H., Hwang H.G., Yang S.J., Kim Y.G. 2007. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza Sativa* L.) using molecular markers, *J of Crop Sci Biotech* 10(4) : 265-276.

Choi H.C., S.Y. Cho, and K.H. Kim. 1999. Varietal difference and environmental variation in protein content and amino acid composition of rice seed. *Korean J. Crop.* 35(5) : 379-386.

Choi S.W., Kang W.W., Osawa T. 1994. Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Foods Biotechnol.* 3 : 131-135.

Choi O, H., Kim J.H., Kinet J.P., 1996. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc ϵ RI antigen receptor, *Nature(London)*, 380, 634-635

Cleary J.A., Kelly G.E., Husband A.J.. 1999. The effect of molecular weight and β

-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by β -1,3-D-glucan. *Immunol Cell Biol* 77:395-403

Cyster J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102

Desai A., Vyas T., Amiji M. 2008. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci* 1999 : 2745-2756

DiLuzio N.R. 1983. Immunopharmacology of glucan: A broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 4 : 344-347

Eom S.H, Lee B.J, Kim Y.M. 2010. Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Kor J Fish Aquat Sci* 434 : 117-124

Ghoneum M, Gollapudi S. 2005. Modified arabinoxylan rice bran(MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 25 : 859-870

Ghoneum M. 1998. Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylane from rice bran(MGN-3). *International Journal of Immunotherapy* XIV : 89-99

Ghoneum M. 1999. NK immunorestitution of cancer patient by MGN-3, A modified arabinoxylan rice bran(study of 32 patients followed for up to 4 years). *American Academy of Anti-Aging Medicine* 1 : 1-10

Green S, Water P, greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, and Chambon P., 1986. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 24: 77-83

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Borner JM, Argos P, and Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139

Hong S.G. 2005. Development of immunostimulation materials from rice bran. *Food Industry and Nutrition* 10 : 42-47

James G.L. 1995. *Methods in Immunotoxicology*. John Wiley Liss, Inc, San Diego. 2:15

Jeong S.C, Yang B.K, Kim G.N, Jeong H, Michael A, Wilson, Cho Y, Sundar Rao K, Song C.H. 2006. Macrophage stimulating activity of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Coriolus versicolor*(Turkey tail mushroom). *J Med Food* 9 : 175-181

Kim H.Y., Han J.T., Hong S.G., Yang S.B., Hwang S.J., Shin K.S. 2005. Enhancement of immunological activity in exo-biopolymer from submerged culture of *Lentinus edodes* with rice bran. *Natural Product Sciences* 11 : 183-187

Kim M.J., Ryu H.W., Cho G.H., Ki H.W. 2008. Expression of inflammatory cytokines by beta-glucan in macrophage cell line. *Yakhak Hoeji* 52 : 73-78

Klis F.M. 1973. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10: 851-869

Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C. 1994. The structure of a β -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. *J Biochem* 135 : 19-30

Kwon S.H., Woo H.J., Han D.S., Kim M.K.. 2001. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Korean J Nutr* 34 : 271- 284

Larsson B.M., Larsson K., Malmberg P., Palmberg L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23 : 217-230

Ling W.H., Cheng Q.X., Ma J., Wang T. 2001. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. *J Nutr* 131 : 1421-1426

Manach C., Mazur A., Scalbert A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 16 : 77-84

McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. 2003. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 51 : 4539-4548

Mitra, G.N. and N.B. Das. 1971. Protein quality of the high yielding varieties of rice. *Jour. Agric. Food Chem.* 19(5) : 927-929.

Morel F., Doussiere J., Vignais P.V. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201 : 523-546

Nathan C.F. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3059

Oh, S.M., S.K. Lee, and K.H. Chung, 2000. Quantitative assessment of xenoestrogenic environmental pollutants using E-screen assay. *Yakkak Haeji*, 44(5): p. 416~422.

Page R.C, Davies P, Allison A.C. 1978. The macrophage as a secretory cell. *Int Rev Cytol* 52 : 119-123

Park H.A., Kweon M.H., Han H.M., Sung H.C., Yang H.C. 1998. Biological activity/nutrition : Effects of the glycoprotein isolated from *Pteridium aquilinum* on the immune function of mice. *Koran J Food Sci Technol* 30 : 976-982

Park, S.Z., H.Y. Kim, S.J. Han, and S.N. Ryu. 2000. Cyanidin-3-glucoside content in F1, F2 and F3 grains of pigmented rice Heugjinjubyeo crosses. *Korean J. Breed.* 32(3) : 285-290.

Peter, H., et al., 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *METHODS*. 42: 377~387.

Perez, P., et al., 1998. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.* 106(3): 167.

Ramesh H.P., Yamaki K., Tsushida T. 2002. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydrate polymers* 50 : 79-83

Reddy, V.S., S. Dash, and A.R Reddy. 1995. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L.) : Identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. *TAG* 91 : 301-312.

Reynolds J.A., Kastello M.D., Harrington D.G., Grabbs C.L., Peters C.J., Jemski J.V., Scott G.H., Diluzio N.R. 1980. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious disease. *Infection Immunity* 30 : 51-57

Roitt I, Brostoff J, Male D. 1996. *Immunology* 4th ed. Mosby
Ryu HS. 2008. Effect of job's tear (Yul-Moo). Extracts on mouse oral administration IL-1 β -IL-6, TNF- α , IL-10 cytokine production by peritoneal macrophage for two weeks. *Korean J Food & Nutr* 21 : 204-209

Ryu H.S. 2010. Effects of water extract acorn on mouse immune cell activation ex vivo. Korean J Food & Nutr 23 : 135-140

Ryu S.N., S.Z. Park, and C.T. Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. Journal of Food and Drug analysis 6(4) : 729-736.

Ryu, S.N., S.J. Han, S.Z. Park, and H.R. Kim. 2006. Antioxidant activity of blackish purple rice. Korean J. Crop 51(2) : 173-178.

Sarzotti M., Coppenhaver D.H., Singh I.P., Past J, Baron S. 1989. The in vivo antiviral effect of CL246, 738 is mediated by the independent induction of interferon-alpha and interferonbeta. J Interferon Res 9 : 265-272

Seo S.J., Choi Y.C., Lee S.M., Kong S, Lee J. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. J Korean Soc Food Sci Nutr 37 : 129-135

Singh I.P., Sarzotti M, Coppenhaver D.H., Past J, Baron S. 1989. Postinfection therapy of arbovirus infections in mice. Antimicrob Agents Chemother 33 : 2126-2131

Song M.K., Woo S.G., Jang J.S., Kim J.H., Kim H.W., Hong S.G., Lee B.W., Park M.H., Chung K.S. 2003. Immunostimulating and anti-cancer effects of *Pediococcus pentosaceus* ERIM101 isolated from Korea. Kor J Microbiol Biotechnol 31 : 355-361

Stoclet J.C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.H., Bedoui J.E., Chataigneau M., Valerie B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. Eur J Pharmacol 500 : 299-313

Sunderkotter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. J Leukoc Biol March 55 : 410-422

U.S. National Cancer Institute. 1991. Designer Food Program Scheduled

Wajant H., Grell M., Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. Cytokine Growth Factor Rev 10 : 15-26

Wang J., Mazza J., 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. J Agric Food Chem 50 : 4183-4189.

William D.G. 1998. MGN-3: Quite possibly the most powerful immune booster known to man. *Alternatives Health Conscious Individual* 7 : 113-120

Williams H., Johnson J.L., Carson K.G., Jackson C.L. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 : 788-792

Xia M., Ling W.H., Ma J., Kitts D.D., Zawistowski J. 2003. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic. *J Nutr* 133 : 744-751

Yang F, Foekens JA, Yu J, Sieuwerts AM, Timmermas M, Klinjn JG, Atkins D, Wang Y, Jiang Y., 2006. Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways. *Oncogene* 25:1413-1419

Yoshimoto M., Okuno S., Yamaguchi M., Yamakawa O. 2001. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosic Biotechnol Biochem* 65 : 1652-1655.

Zalys R., Zagon I.S., Bonneau R.H., Lang C.M., McLaughlin P.J. 2000. In vivo effect of chronic treatment with(MET5) enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci* 66 : 829-834

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.