

**미강의 효율적 활용을 통한 건강 기능성 식품 개발**  
**(Development of Functional Food Products**  
**by the Efficient Application of Korea Rice Bran)**

경북대학교

농림수산식품자료실



0009353

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미강의 효율적 활용을 통한 건강 기능성 식품 개발에 관한 연구” (제1세부과제 “미강의 건강 기능성식품 소재화 기술개발에 관한연구”, 제2세부과제 “산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발”에 관한연구, 제1협동과제 “미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증”에 관한 연구, 제2협동과제 “만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화”에 관한 연구)과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 일

주 관 연구 기관 명 : 경 북 대 학 교  
주 관 연구 책임자 : 최 용 희  
제1세부연구책임자 : 최 용 희  
연 구 원 : 전 주 영  
연 구 원 : 조 인 희  
제2세부연구책임자 : 이 원 희  
연 구 원 : 황 성 욱  
협 동 연구 기관 명 : 아 주 대 학 교  
제1협동연구책임자 : 남 석 현  
연 구 원 : 윤 상 식  
협 동 연구 기관 명 : (주)건양 RPC  
제2협동연구책임자 : 이 건 우  
연 구 원 : 강 미 영  
연 구 원 : 이 상 미  
연 구 원 : 조 민 경  
연 구 원 : 서 충 원



# 요 약 문

## I. 제 목

미강의 효율적 활용을 통한 건강 기능성 식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

미곡종합처리장(Rice Precessing Complex, RPC)에서 자동화 도정 공정의 부산물로 방출되는 미강들을 위생적으로 안전하게 처리하여 식품 소재화 할 수 있는 기술을 개발 및 위생적이고 안전한 미강을 식품에 적극적으로 첨가하여 당질 및 지질대사에 바람직한 효능이 있는 기능성 제품화하여 미강을 고부가 가치화할 수 있도록 하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 미강의 건강기능성 식품 소재화 기술개발

- 미강함유 식이섬유의 분석 및 추출
- 미강함유 지용성 분획의 분리 및 추출
- 추출물을 이용한 다양한 형태의 제품 개발

### 2. 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발

- 목재인자별 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색
- 소재물질의 물리적, 화학적 성분분석
- 원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립

### 3. 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증

- 비만세포주 및 대식세포주를 사용하여 염증관련물질( $\beta$ -hexosaminidase, 염증 cytokines, eicosanoids) 및 활성라디칼 생성(ROS 및 NO)에 대한 억제활성을 조사
- 암세포이식으로 종양을 형성한 생쥐에 기능성성분을 식이했을 때 식이에 의한 종양형성의 억제도와 종양보유 동물의 대식세포 및 자연살해세포의 종양 살해 기능이 향진 여부를 대식세포의 활성라디칼 생성도, 포식활성도, 그리고 자연살해세포의 종양살해능을 측정하여 평가
- 실험생쥐에서 Salmonellosis 실험계를 사용하여 활성물질이 세균감염증에 대한 예방 및 억제효과를 평가

#### 4. 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화

- 흑미미강 색소추출물 활용에 의한 미강의 산패억제 효과
- 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 미강의 활용
- 쌀 배아젤리 급여 동물의 만성대사성질환 억제효능 검정
- 한약재 열수추출물 혼합 사용에 의한 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품제조 및 가공적성 검정

### IV. 연구개발결과

#### 1. 미강의 건강기능성 식품 소재화 기술개발

미강의 식이섬유인 헤미셀룰로오스의 추출시 NaOH 농도는 종속변수 모두에 영향을 주는 것으로 나타났으며, 특히, 추출 수율과 Xyl/Ara ratio는 NaOH 농도에 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 추출 시간은 베타 글루칸 함량, 총당에 유의하게 영향을 주었다( $p < 0.05$ ). 그리고 헤미셀룰로오스의 최적 추출 조건을 예측하기 위하여 각 종속변수에 대한 각각의 contour map을 superimposing한 결과 NaOH 농도 2.4~2.5 M, 추출 시간 24~24.4 시간으로 나타났다. 그리고 미강의 지용성 기능성분(ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, tocopherol, tocotrienol, octacosanol)을 추출시 시료에 대한 용매비, 추출온도, 추출시간의 독립변수 중 시료에 대한 용매비와 온도가 모든 종속변수에 영향을 주었다. 최적 추출 조건을 예측한 결과 시료에 대한 용매비 7.85 mL/g, 추출 온도 81.5°C, 추출 시간 579min으로 나타났다. 미강의 기능성 성분을 효과적으로 섭취하기 위하여 과립, 타블렛 제품을 제조하였다. 수분결합지수는 타블렛보다 과립이 더 높았으며, 또한 흡습성도 과립이 더 높아서 저장성면에서 타블렛이 더 우수한 것으로 사료된다.

#### 2. 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발

목질계 원료에서 기능성 성분을 효율적으로 추출하기 위하여 수증기 전처리를 수행하였는데 25기압에서 6분 또는 9분간 수증기 처리했을 때 실험에 제공된 크기의 원료칩 상태에서는 최적의 전처리 조건임을 알 수 있었다. 냉수추출물을 비롯한 대부분의 추출물의 함량은 수증기처리하지 않은 일반 목분에 비하여 아주 높게 나타났다. 수증기처리재를 일반목분과 비교해 보면, 냉수추출물은 약 2~3배, 열수추출물은 약 3~4배, 알칼리 용액 추출물은 약 2배, 유기용제 추출물은 약 10배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 식품으로 사용가능한 생약소재로서 참나무를 선정하여 수증기 전처리를 하여 추출한 추출액은 항종양활성, 노화방지(항산화제) 및 면역증강활성을 가지며, 이에 따라 항종양제 및 면역활성화제용 치료제로 사용될 수 있을 것으로 판단되며, 독성이 전혀 없으므로 건강보조식품으로도 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증

쌀도정 부산물인 미강의 주요 조성분인 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol과 phytic acid 중,  $\gamma$ -oryzanol은 생체발생 종양을 억제하는데 효과가 있는 반면, phytic acid 피부부종의 억제에 효과적이었다. 또한 왕겨 탄화물도 피부부종을 억제하는 강한 활성을 보유하고 있었다. 조사한 한약재 중 광향은 세균 내독소인 LPS 수준으로 대식세포의 NO발생을 유도하였다. 광향의 열수추출물은 생쥐의 Salmonellosis 실험계에서 세균감염으로 인한 치사율을 획기적으로 저하시켰다.

### 4. 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화

흑미찹쌀 미강 색소추출물은 4℃의 온도에서 산성 상태를 유지 할 경우 9일간의 저장 후에도 비교적 안정한 것으로 나타났는데 흑미 미강 색소추출물의 첨가량이 증가함에 따라 배아의 산패가 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 콩가루와 배아가루를 50% 씩 혼합하여 시루떡 고물을 제조하였을 경우 배아고물만으로 만들었을 때의 단점인 부스러짐이 완화되었으며, 배아젤리는 젤라틴 젤리에 배아가루를 5%로 첨가하였을 때 gel 조직 특성상 가장 바람직한 것으로 나타났다. 흑미 미강색소 추출물과 배아를 첨가하여 가공품을 제조 후 고콜레스테롤 식이를 급여하여 고지혈증을 유발시킨 흰쥐에게 급여한 결과 배아군과 흑미 미강색소 배아젤리군은 고콜레스테롤혈증 상태에서 간 기능 보호에 긍정적인 효과가 있었으며, 고콜레스테롤 급여로 인해 증가된 혈장과 간 내의 지질과산화물 억제시키는 효과가 있었다. 반면, 항산화 효소인 간 조직의 SOD와 CAT 활성은 배아와 배아젤리 첨가에 따라 증가하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 미강의 식이섬유 헤미셀룰로오스와 지용성 생리활성 물질의 효율적인 추출 및 분리를 위한 최적 추출공정을 확립하였고, 본 추출공정에 따라 추출된 성분으로 가공제품을 제형하였다. 본 연구로 다른 식품첨가물 및 의약품소재를 개발하기 위한 선행 자료로 활용 및 응용 제품도 개발 할 수 있을 것으로 기대되고 폐자원이었던 미강의 고부가가치화할 수 있을 것으로 사료된다.
2. 참나무의 페놀성 화합물의 분해 및 고분자 물질의 저분자화 추출기술에 의한 목재추출물의 대량생산 방법 및 기능식품의 첨가물로서의 제제를 개발하고 항동맥경화 등 심혈관질환 예방물질 및 항당뇨와 관련한 면역활성에 기여하는 항산화 식품첨가물 원료 및 의약품소재를 개발하였다. 본 연구에 의한 새로운 심혈관질환 예방물질은, 의약품 수입원료의 20%를 대체한다고 가정할 경우, 100

억원 이상의 수입 대체효과가 기대된다. 특히 생약제재 물질의 작용기작에 대한 과학적 입증이 뒷받침되면, 동양 의학에 대한 관심이 고조되고 있는 미국을 비롯한 해외시장으로의 수출도 가능하리라 보며, 이들 시장이 증가할수록 이들 산업체의 소득증대도 기대된다. 이 기술을 토대로 다른 의약품 및 건강기능성 식품 개발에도 응용하여 고부가가치를 가지는 상품을 개발할 수 있는 기틀을 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 쌀도정 부산물인 미강의 주요 조성분인 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol과 phytic acid 중,  $\gamma$ -oryzanol은 생체발생 종양을 억제하는데 효과가 있는 반면, phytic acid 피부부종의 억제에 효과적이었다. 또한 왕겨 탄화물도 피부부종을 억제하는 강한 활성을 보유하고 있었다. 조사한 한약재 중 광향은 세균 내독소인 LPS 수준으로 대식세포의 NO발생을 유도하였다. 광향의 열수추출물은 생쥐의 Salmonellosis 실험계에서 세균감염으로 인한 치사율을 획기적으로 저하시켰다. 이 결과는  $\gamma$ -oryzanol과 같은 미강 생리활성성분이나 광향 열수추출물이 항암 또는 항세균감염증과 같은 건강기능성을 식품에 부여하는 첨가물로 활용될 수 있음을 나타낸다.
4. 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자등 한약재 열수추출물들의 혼합사용에 의한 떡 및 한과 제조 시 기본반죽에의 활용 및 부산물(고물소 등)로서의 활용화 방법 개발하였다. 산업화에 성공할 경우 손상장기 회복효과가 우수한 건강기능성 쌀가공 식품으로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

# SUMMARY

## **I. Title**

Development of Functional Food Products by the Efficient Application of Korean Rice Bran

## **II. Research objectives and necessity**

Rice bran, the main by-product of rice, was always unsued as food materials in spite of having abundant functional materials. So, the objectives of this research were to develop a processing technology for using the rice bran as a functional additive materials to foods and to develop functional rice bran products which could give better effects on the sugar and lipid metabolism.

## **III. Research contents and areas**

### **1. The technical development for health functional rice bran products**

- To extract and analyze dietary fiber contained in rice bran.
- To extract and separate the lipid soluble substances contained in rice bran.
- To develop diverse products using rice bran extracts.

### **2. The technical development for functional food supplement using natural forest**

- To investigate highly efficient extraction conditions of functional components in woods.
- To analyze physical characteristics and chemical components in different woods.
- To find out efficient pretreatment technique and establish extraction technique for woods.

### **3. Inspection of inhibitive effect of functional rice bran product on chronic digestive disease and Proliferative inflammation**



- Using mast cell and histiocyte to investigate the inhibitive activity on inflammation relative disease (–hexosaminidase, inflammatory cytokines, eicosanoids) and generation of active radicals (ROS and NO).
- Using mice as experimental objections, transplant cancer cell to mice to induce tumor, while dosage mice with functional components extracted from rice bran, so as to find out whether those functional components have inhibitive effect on tumor forming or accelerate the lethal ability of nature cell killer to tumor cell by evaluating and determining the generation of active radicals, predation activity, and the lethal ability of nature cell to tumor.
- To evaluate the preventive and inhibitive effect of active components from rice bran on bacterial infective disease in mice using Salmonellosis meter.

#### **4. Commercialization of matched processed rice products for chronic digestive disease and proliferative inflammatory disease**

- To investigate the inhibitive effect on rancidity of rice bran using black rice extracts.
- To use rice bran for another material of processed rice products.
- To investigate the inhibitive effect of rice embryojelly on chronic digestive disease by feeding rice embryo jelly to animals.
- To process rice embryo jelly products by mixing jelly with hot water extracted Chinese herb extracts which was verified to have recovery effect on liver and heart damage.

### **IV. Research results**

#### **1. The technical development of health functional rice bran products**

The results showed that NaOH concentration had much effects on all dependent responses in dietary fiber (hemicelluloses) extraction, especially NaOH concentration had significant effects on extraction yield and Xyl/Ara ratio. Extraction time had significant effect on hexosaminidase content and total sugar. The optimal conditions for hemicelluloses extraction presented as follows were obtained according to superimposed contour map: NaOH concentration of 2.4-2.5 M, extraction time of 24-24.4 hours. Solvent to sample ratio, extraction temperature, extraction time were used as independent variables during functional lipid soluble compounds (ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, tocopherol,

tocotrienol, Octacosanol) extraction from rice bran, and the results turned out that solvent to sample ratio and extraction temperature had significant effect on all dependent responses. The predicted optimal conditions were solvent to sample ratio of 7.85 ml/g, extraction temperature of 81.5, and extraction time of 579 min. In order to ingest the functional components from rice bran more efficiently, granulate and tablet rice bran products were manufactured. Index of coupling of the granulate products were higher than tablet products, and granulate products had a higher absorbing ability as well which implied granulate products are more suitable for preservation.

## **2. The technical development for functional food supplement using natural resources**

In order to have efficient extraction of functional components from wood chip, steam was used as pretreatment in this research, and the results showed that optimal conditions to get right size material were 25 atmospheres for 6 min to 9 min. After steam pretreatment and compared with common wood powder, it was observed that the functional components greatly increased, cool water extract was 2-3 times higher, hot water extract was 3-4 times higher, ethanol extract was 2 times higher, organic solvent extract was 10 times higher. Oak tree, an herb medicine, was selected as experimental material and processed by steam pretreatment. The results showed that the oak extracts have anti-tumor and anti-oxidant ability, and it can increase the activity of immunity which indicated that steam pretreated oak extracts could be widely used as a resource for anti-tumor and immune active medicines, or other various health aid products without toxic effects.

## **3. Inspection of inhibitive effect of functional rice bran product on chronic digestive disease and Proliferative inflammation**

The research discovered that among the primary components of ferulic acid, -oryzanol, ricetrienol and phytic acid contained in rice bran, -oryzanol has inhibitive effect on tumor, and phytic acid has inhibitive effect on skin edema. Besides, carbides of rice bran have treatment effect on skin edema. The betony, one of the materials investigated in this experiment, showing level of LPS to bacterial endotoxin, and induced NO on macrophage. According to Salmonellosis meter, hot water extracted betony extracts could greatly reduce the fatality which caused by bacterial inflammation.

## **4. Commercialization of matched processed rice products for chronic digestive disease and proliferative inflammatory disease**

The results showed that black rice extracts maintained stable after 9 days preservation under 4°C, and embryo rancidity reduced with the increase of supplement amount of black rice extracts. Using 5% embryo powder mixed with gelatin can prevent the steamed rice cake from broken. What is more, animal research confirmed this product has protective functions against cholesterol disease and inhibition of lipid peroxidation in plasma and liver caused by quick cholesterol. The antioxidant ability as SOD and CAT activities in liver tissues increased with the increase of the supplement amount of embryo and embryo gel.

## V. Research achievement and plan of application

1. Optimal extraction technology was established for maximal extraction and separation of dietary fiber (Hemicelluloses) and lipid dissolved active components from rice bran, and functional compounds obtained under this extraction technology were manufactured into process products. In order to develop other food additives and medical materials, rice bran relative products were developed, which could turn useless rice bran into products with high additional value.
2. Based on the decomposition means of phenolic compounds from oak tree and the extraction technology which can turn high molecular components into low molecule, a massive production methods for wood extracts and medicine with functional food additive were developed for angiocardopathy(antiatherogenic) prevent and antidiabetic. This new angiocardopathy prevent component, if it could replace 20% of import medicine materials, which can expect more than 10 billion won of imports earning. Especially, if we can get the scientific proof for mechanism of crude herb metabolism, we would have opportunity to export to overseas market like USA which have amount of interests in east medical science, and bring good benefits for domestic industry. Beside, other products with high additional value like medical products and health functional foods could be developed using this technology.
3. Among the primary components such as ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol and phytic acid which contained in rice bran,  $\gamma$ -oryzanol has inhibitive effect on tumor, and phytic acid has inhibitive effect on skin edema. And carbides of rice bran have treatment effect on skin edema. The betony, one of the materials investigated in this research, showing level of LPS to bacterial endotoxin, and induced NO on macrophage. According to Salmonellosis meter, hot water extracted betony extracts could greatly reduce the fatality which caused by bacterial inflammation. The results indicated there is a great

possibility to have application of additives which containing active components like  $\gamma$ -oryzanol and hot water extracted betony extracts for healthy functions of anticancer and anti-bacterial inflammation.

4. A method using mixture of hot water extracted Chinese herbs such as hovenia dulcis, alisma, leaves of persimmon, Sang zhi, thunberg and cluster mallow fruit for dough and other by-products when making Korean cakes and traditional cookies was developed. If this process technology successfully applied into industry, we believed that excellent health functional rice products with the recovery effect on damaged organs would be developed.

# CONTENTS

<b>Summary</b> .....	7
<b>Chapter 1. Introduction to research material</b> .....	24
Section 1. Introduction .....	24
Section 2. Research contents and area .....	25
<b>Chapter 2. Research status in domestic and abroad</b> .....	27
<b>Chapter 3. Methods and results</b> .....	29
Section 1. The technical development of health functional rice bran products ..	31
1. The extraction and analysis of fiber from rice bran .....	31
A. Materials and methods .....	31
(1) Materials .....	31
(2) Chemical analysis .....	31
(3) Hemicelluloses extraction .....	31
(4) Experimental design for optimal extraction of hemicelluloses .....	34
(5) Chemical analysis of hemicelluloses extract .....	35
(6) Prediction and verification for optimal extraction conditions .....	37
(7) The structure characteristics of hemicelluloses in optimal rice bran extract .....	37
B. Results .....	38
(1) Characteristics of chemical components .....	38
(2) Characteristics of hemicelluloses at different extraction conditions .....	39
(3) Optimization of extraction conditions for hemicelluloses .....	54
(a) Response surface methodology .....	54
(b) Prediction and verification for optimal extraction conditions .....	61
(4) The structure characteristics of hemicelluloses in optimal rice bran extract .....	62
2. The extraction and separation of lipid soluble components from rice bran .....	65
A. Materials and methods .....	65
(1) Materials .....	65
(2) Extraction conditions and preliminary experiment .....	65
(3) The extraction of lipid soluble components with biological activity from rice bran .....	65
(4) Chemical analysis for rice bran extracts .....	68
(5) Prediction and verification for optimal extraction conditions .....	70

B. Results .....	70
(1) Presetting for extraction conditions .....	70
(2) Characteristics of lipid soluble components with biological activity from rice bran .....	72
(3) Prediction and verification for optimal extraction conditions .....	84
3. Development of products with various shapes using rice bran extract .....	85
A. Materials and methods .....	85
(1) Materials .....	85
(2) Products modeling .....	85
(3) Physical and chemical characteristics of product quality .....	86
B. Results .....	87
(1) Products modeling .....	87
(2) Quality characteristics of shaped products .....	87
(3) Color changing of products .....	90
(4) Characteristics of moisture absorption .....	90
Section 2. The technical development for functional food supplement using wood sources .....	92
1. Investigation of highly efficient extraction conditions of functional components from wood .....	92
A. Materials and methods .....	92
(1) The technical development for functional food supplement using wood sources. 92	
B. Results .....	94
(1) Selection of wood species and exploration of pretreatment for different woods 94	
(2) The development of extraction technique for separation of functional components from woods .....	95
(3) Investigation on physical characteristics of pretreated woods .....	96
2. Physical and chemical analysis for materials .....	102
A. Materials and methods .....	103
(1) Analysis of components in pretreated materials .....	103
(2) Analysis of primary components and separation using stem pretreatment with high temperature and high pressure .....	104
B. Results .....	105

(1) General analysis of material .....	105
(2) Temperature and pressure in stem pretreatment process .....	106
(3) Primary components analysis for wood materials treated by high temperature steam .....	109
3. Establishment of high efficient extraction and pretreatment techniques for woods.	112
A. Materials and methods .....	112
(1) Selection of crude Chinese herbs using for food. ....	112
(a) Research on pretreatment for production of low molecular materials .....	117
(b) The characteristics of pretreated wood .....	117
(c) Deduction of steam processed for efficient extraction .....	117
(d) Verification of antioxidant ability and increased immune activity of oak tree extract .....	117
B. Results .....	119
(1) Analysis of stem treated extracts .....	119
(a) Research on pretreatment for producing low molecular materials .....	119
(b) The characteristics of pretreated wood .....	120
(c) Deduction of steam processed for efficient extraction .....	121
(d) Oak tree extract with antioxidant ability and increased immune activity .....	122
4. Anti-diabetic effect of oak tree extract .....	136
A. Materials and methods .....	137
(1) Material .....	137
(2) Methods .....	137
(a) Test sample preparation .....	137
(b) Inducement of diabetes and dosage of the sample .....	137
(c) Sample collection and pretreatment .....	138
(d) Quantification of blood glucose and insulin content in serum .....	138
(e) Detection of glucokinase and hexokinase activities .....	138
(f) Quantification of protein content .....	138
B. Results and discussion .....	139
(1) Changes in weight .....	139
(2) Changes in blood glucose and insulin .....	140
Section 3. inspection of inhibitive effect of functional rice bran product on chronic digestive disease and proliferative inflammation .....	141
A. Materials and methods .....	141

(1) Materials .....	141
(2) Determination of electron donating ability .....	141
(3) Determination of antioxidant ability using culture cell .....	141
(4) SOS chromotest .....	142
(5) Determination of inhibitive activity on tumor forming .....	142
(6) Predation activity of histiocyte .....	142
(7) Determination of cell toxin .....	142
(8) Separation of histiocyte cell in abdominal cavity .....	143
(9) Determination of NO generation in histiocyte cell .....	143
(10) Separation of mast cell in abdominal cavity .....	143
(11) Determination of inhibitive effect on mast cell .....	143
(12) Induction of skin edema .....	143
(13) Tumor transplantation .....	144
(14) RNA extraction and RT-PCR .....	144
(15) Analysis of western plot .....	144
(16) Determination of ELISA .....	145
 B. Results .....	 145
 (1) Biological activity of rice bran extract .....	 145
(2) Biological activity of wood extract .....	156
(3) Biological activity of chaff extract .....	158
(4) Controlling effect of functional component from rice bran on activity of histiocyte cell .....	163
(5) Controlling effect of Chinese herbs extract on anti-inflammation reaction and bacterial infection .....	184
 Section 4. Commercialization of matched processed rice products for chronic digestive disease and proliferative inflammatory disease .....	 195
1. The inhibitive effect of color extracts of black rice on rice bran rancidification .....	195
 A. Materials and methods .....	 195
(1) Materials .....	195
(2) Colored black rice extraction .....	195
(3) General components analysis for rice embryo .....	195
(4) Structure analysis for rice embryo .....	195
(5) Determination of stability in blank rice extract .....	196
(6) Determination of acid value .....	196
(7) Statistical analysis .....	196
 B. Results .....	 196



(1) Color comparison of black nonglutinous rice and black glutinous rice .....	196
(2) Characteristics of rice embryo components .....	196
(3) Stability of black rice color .....	199
2. Utilization of rice bran as by-material for rice products manufacture .....	204
A. Materials and methods .....	204
(1) Materials .....	204
(2) Color extracts of black rice .....	204
(3) Produce methods for cake paste, filling, and rice embryo jelly .....	204
(4) Sensory evaluation .....	204
(5) Determination of properties of rice embryo jelly .....	204
(6) Statistical analysis .....	205
B. Results .....	204
(1) Formability of rice embryo past, filling, and embryo jelly .....	204
(2) Sensory evaluation for rice embryo paste and filling .....	208
(3) Property comparison for rice embryo jelly .....	209
(4) Sensory evaluation for rice embryo jelly .....	211
3. Verification of the inhibitive effect of rice embryo jelly on chronic digestive disease by feeding rice embryo jelly to animals .....	212
A. Materials and methods .....	212
(1) Materials .....	212
(2) Animal breeding and feeding .....	213
(3) Determination of weight, food intake and diet efficiency. ....	215
(4) Taking blood and organs .....	215
(5) Analysis of the lipid content in plasma and liver tissues .....	215
(6) Determination of GOT, GPT concentrations in plasma .....	215
(7) Determination of thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) in plasma and liver tissues .....	215
(8) Determination of lipid and oxide content in plasma and liver tissue .....	216
(9) Determination of activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHpx) in liver tissues .....	216
(10) Statistical analysis .....	217
B. Results .....	217
(1) Food intake, weight increase, dietary efficiencyand organ weight .....	217
(2) Lipid level in plasma and liver .....	218
(3) GOT and GPT activity in plasma .....	220
(4) Lipid and oxide contentsin plasma and liver .....	222

(5) Antioxidant enzyme activity in liver tissue .....	223
4. Processing of rice embryo jelly mixed with hot water extracted Chinese herbs extract which verified to have recovery effect on liver and heart damage .....	224
A. Material and methods .....	224
(1) Verification of recovery effect on organ damage by dosing hot water extracted Chinese herbs(hovenia dulcis, alisma, leaves of persimmon, sang zhi, Thunberg and cluster mallow fruit) to damaged organ tissues induced by CCl4 treatment .....	224
(a) Biological effects and characteristics of Chinese herbs used in the research ..	224
(b) Materials .....	226
(c) Methods .....	226
① Dosage, blood taking, and tissue removing .....	226
② Biochemical analysis for blood .....	227
③ Analysis the tissues in histology and histomorphology ways .....	227
④ Statistical analysis .....	227
(2) Verification of process ability for rice embryo jelly using Chinese herbs extracts by hot water .....	227
(a) Materials .....	227
(b) Production methods for rice embryo jelly .....	228
(c) Determination of rice embryo jelly property .....	229
(d) Sensory evaluation .....	229
(e) Statistical analysis .....	230
B. Results .....	231
(1) Verification of recovery effect on organ damage by dosing hot water extracted Chinese herbs (hovenia dulcis, alisma, leaves of persimmon, sang zhi, Thunberg and cluster mallow fruit) to damaged organ tissues induced by CCl4 treatment .....	231
(a) Complete blood cell (CBC) count .....	233
(b) Biochemical analysis .....	236
(2) Verification of process ability for rice embryo jelly using Chinese herbs extracts by hot water .....	241
(a) Property characteristics .....	241
(b) Sensory characteristics .....	244
<b>Chapter 4. Contributions to Related Technologies .....</b>	<b>247</b>
Section 1. Contributions .....	247
Section 2. Related Technologies .....	251
<b>Chapter 5. Application of Results .....</b>	<b>253</b>
<b>Chapter 6. Scientific Information of Current Technology .....</b>	<b>255</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>259</b>

# 목 차

요 약 문 .....	3
제1장 연구개발과제의 개요 .....	24
제1절 서 론 .....	24
제2절 연구내용 및 범위 .....	25
제2장 국내외 기술개발 현황 .....	27
제3장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	29
제1절 미강의 건강 기능성식품 소재화 기술개발 .....	31
1. 미강함유 식이섬유의 분석 및 추출 .....	31
가. 재료 및 방법 .....	31
(1) 실험재료 .....	31
(2) 이화학적 성분 분석 .....	31
(3) 헤미셀룰로오스 추출 .....	31
(4) 헤미셀룰로오스 추출 최적화 실험계획 .....	34
(5) 헤미셀룰로오스 추출물의 이화학적 성분 분석 .....	35
(6) 최적 추출 조건의 예측 및 실증시험 .....	37
(7) 미강유래 헤미셀룰로오스 최적 추출물의 구조적 특성 .....	37
나. 실험결과 .....	38
(1) 이화학적 성분 특성 .....	38
(2) 추출조건에 따른 헤미셀룰로오스 성분 특성 .....	39
(3) 헤미셀룰로오스 추출 조건 최적화 .....	54
(가) 반응표면분석 .....	54
(나) 최적 추출 조건 예측 및 실증 .....	61
(4) 미강 식이섬유 헤미셀룰로오스 최적 추출물의 구조적 특성 .....	62
2. 미강함유 지용성 분획의 분리 및 추출 .....	65
가. 재료 및 방법 .....	65
(1) 실험재료 .....	65
(2) 추출조건 설정을 위한 예비실험 .....	65
(3) 미강의 지용성 생리활성 물질 추출 .....	65

(4) 미강 추출물의 이화학적 성분 분석 .....	68
(5) 최적 추출 조건의 예측 및 실증시험 .....	69
나. 실험결과 .....	70
(1) 추출조건의 예비 설정 .....	70
(2) 추출조건에 따른 미강의 지용성 생리활성 물질 특성 .....	72
(3) 최적 추출조건의 예측 및 실증 .....	84
3. 추출물을 이용한 다양한 형태의 제품개발 .....	85
가. 재료 및 방법 .....	85
(1) 재료 .....	85
(2) 제형 .....	85
(3) 이화학적 품질특성 .....	86
나. 실험 결과 .....	87
(1) 제형화 .....	87
(2) 제형제품의 품질 특성 .....	87
(3) 색도변화 .....	90
(4) 흡습특성 .....	90
제2절 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발 .....	92
1. 목재인자별 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색 .....	92
가. 재료 및 방법 .....	92
(1) 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발 .....	92
나. 연구수행결과 .....	94
(1) 수증선정 및 목재인자별 전처리 조건 탐색 .....	94
(2) 목재로부터 기능성물질 분리를 위한 추출기술 개발 .....	95
(3) 전처리 목재의 물리적 특성 조사 .....	96
2. 소재물질의 물리적, 화학적 성분분석 .....	102
가. 재료 및 방법 .....	103
(1) 전처리 소재물질의 성분분석 .....	103
(2) 고온고압 수증기 전처리재의 성분분리 및 조성분 분석 .....	104
나. 연구수행 결과 .....	105
(1) 시료의 일반분석 .....	105
(2) 수증기처리조의 온도와 압력 .....	106
(3) 고온 수증기처리재의 조성분 분석 .....	109
3. 원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립 .....	112
가. 재료 및 방법 .....	112
(1) 식품사용 가능한 생약소재의 선발 .....	112
(가) 저분자 리그닌계 원료생산을 위한 전처리 연구 .....	117

(나) 원료물질 추출을 위한 전처리재의 성상 .....	117
(다) 효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출 .....	117
(라) 참나무 수액의 항산화 및 면역증강 활성 검증 .....	117
나. 연구수행 결과 .....	119
(1) 수증기처리에 의한 추출물의 성분분석 .....	119
(가) 저분자 리그닌계 원료생산을 위한 전처리 연구 .....	119
(나) 원료물질 추출을 위한 전처리재의 성상 .....	120
(다) 효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출 .....	121
(라) 항산화제 및 면역증강 활성을 갖는 참나무 수액 .....	122
4. 참나무 추출물의 항당뇨 효능 .....	136
가. 재료 및 방법 .....	137
(1) 재료 .....	137
(2) 실험방법 .....	137
(가) 검액의 조제 .....	137
(나) 당뇨병의 유도 및 검액의 투여 .....	137
(다) 시료 수집 및 前 처리 .....	138
(라) 혈당 및 혈청 인슐린 정량 .....	138
(마) Glucokinase와 hexokinase 활성 측정 .....	138
(바) 단백질의 정량 .....	138
나. 결과 및 고찰 .....	139
(1) 체중의 변화 .....	139
(2) 혈당과 인슐린의 변화 .....	140
제3절 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환	
억제효능 검증 .....	141
가. 재료 및 방법 .....	141
(1) 실험재료 .....	141
(2) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정 .....	141
(3) 배양세포를 이용한 항산화활성의 측정 .....	141
(4) SOS chromotest .....	142
(5) 종양촉진 억제활성의 측정 .....	142
(6) 대식세포의 포식활성 .....	142
(7) 세포독성의 측정 .....	142
(8) 복강대식세포의 분리 .....	143
(9) 대식세포의 NO 생산 측정 .....	143
(10) 복강비만세포의 분리 .....	143
(11) 비만세포 탈과립 억제활성의 측정 .....	143

(12) 피부부종의 유발 .....	144
(13) 종양이식 .....	144
(14) RNA 추출 및 RT-PCR .....	144
(15) Western blot 분석 .....	144
(16) ELISA 측정 .....	145
나. 실험 결과 .....	145
(1) 미강 추출물의 생리활성 .....	145
(2) 목재추출물의 생리활성 .....	156
(3) 왕겨추출액의 생리활성 .....	158
(4) 미강추출 기능성분획의 대식세포 활성 조절 .....	163
(5) 한약재 추출물의 염증반응 및 세균감염에 대한 조절활성 .....	184
제4절 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화 .....	195
1. 흑미미강 색소추출물 활용에 의한 미강의 산패억제 효과 .....	195
가. 재료 및 방법 .....	195
(1) 시료 .....	195
(2) 흑미 미강 색소추출물 .....	195
(3) 배아의 일반성분 분석 .....	195
(4) 배아 성분 조성 분석 .....	195
(5) 흑미 미강 색소추출물의 안정성 측정 .....	196
(6) 산가측정 .....	196
(7) 통계분석 .....	196
나. 실험결과 .....	196
(1) 흑미멥쌀과 흑미찹쌀의 색소 비교 .....	196
(2) 배아의 성분 특성 .....	196
(3) 흑미 색소의 안정성 .....	199
2. 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 미강의 활용 .....	204
가. 재료 및 방법 .....	204
(1) 시료 .....	204
(2) 흑미 미강 색소추출물 .....	204
(3) 떡 고물, 소 및 배아젤리 제조법 .....	204
(4) 관능검사 .....	204
(5) 배아젤리의 물성측정 .....	204
(6) 통계처리 .....	205
나. 실험결과 .....	205
(1) 배아고물, 소 및 배아젤리의 성형성 .....	205
(2) 배아고물 및 소의 관능검사 .....	208

(3) 배아젤리의 물성 비교 .....	209
(4) 배아젤리의 관능검사 .....	211
3. 쌀 배아젤리 급여 동물의 만성대사성질환 억제효능 검정 .....	212
가. 재료 및 방법 .....	212
(1) 실험재료 .....	212
(2) 실험동물 사육 및 식이 .....	213
(3) 체중측정, 식이섭취량 및 식이효율 .....	215
(4) 혈액과 장기의 채취 .....	215
(5) 혈장 및 간 조직의 지질 함량 분석 .....	215
(6) 혈장 GOT, GPT 농도 측정 .....	215
(7) 혈장과 간 조직의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 측정 .....	215
(8) 간 조직 지질과산화물 농도 측정 .....	216
(9) 간 조직의 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione peroxidase (GSHpx) 활성 측정 .....	216
(10) 통계분석 .....	217
나. 실험결과 .....	217
(1) 식이섭취량, 체중증가량, 식이 효율 및 장기무게 .....	217
(2) 혈장과 간의 지질 수준 .....	218
(3) 혈장 GOT와 GPT 활성 .....	220
(4) 혈장과 간의 지질과산화물 함량 .....	222
(5) 간 조직의 항산화효소 활성 .....	223
4. 간장 및 신장손상 회복 효능이 검증된 한약재 열수추출물 활용	
쌀 배아젤리 가공성 .....	224
가. 재료 및 방법 .....	224
(1) CCl <sub>4</sub> 처리에 의해서 손상된 장기 조직들의 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자 등 한약재 열수추출물 투여에 의한 손상장기 회복 효능 검정 .....	224
(가) 연구에 사용한 한약재들의 생리활성 효능 및 특성 .....	224
(나) 재료 .....	226
(다) 실험방법 .....	226
① 투여방법 및 혈액채취, 조직적출 .....	226
② 혈액학적 및 혈액 생화학적 분석 .....	227
③ 조직학적 및 조직 형태 계량학적 분석 .....	227
④ 통계분석 .....	227
(2) 한약재 열수추출물 활용 쌀 배아젤리 가공성 검정 .....	227
(가) 시료 .....	227

(나) 배아젤리 제조법 .....	228
(다) 배아젤리의 물성측정 .....	229
(라) 관능검사 .....	229
(마) 통계처리 .....	230
나. 연구 결과 .....	231
(1) CCl <sub>4</sub> 처리에 의해서 손상된 장기 조직들의 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자 등 한약재 열수추출물 투여에 의한 손상장기 회복 효능 검정 .....	231
(가) Complete blood cell(CBC) count .....	233
(나) Biochemical analysis .....	236
(2) 한약재 열수추출물 활용 쌀 배아젤리 가공성 검정 .....	241
(가) 물성 특성 .....	241
(나) 관능적 특성 .....	244
 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	247
제1절 목표달성도 .....	247
제2절 관련분야에의 기여도 .....	251
 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	253
 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	255
 제7장 참고문헌 .....	259



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 서 론

쌀은 삼국시대부터 한민족의 주식의 하나로 재배되기 시작하여 현재 한국의 식문화에서 빠질 수 없는 중요한 위치를 차지하고 있다. 쌀은 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 대만, 태국, 파키스탄 등과 같은 아시아에 위치한 국가에서는 주식으로 생산, 소비하고 있다. 우리가 쌀이라고 할 때는 주로 벼를 도정한 백미를 뜻한다. 현미를 도정하여 속껍질을 벗겨낸 것을 백미라고 하는데 미강이란 현미에서 백미로 도정하는 과정에서 생기는 쌀눈과 쌀겨로 이루어진 속껍질 가루를 말하며 현미의 약 8%를 차지한다. 최근 건강기능성 식품의 신소재로서 각광 받고 있는 소재 중 미강은 쌀의 재배 및 도정 과정에서 대량 방출되지만 청결한 상태의 미강 회수가 곤란한 상황이므로 식용으로의 활용에 부정적인 경향이 있어서 식용으로의 활용보다는 사료나 비료로 사용되고 있는 실정이다. 또한 미강에는 지질 함량이 높기 때문에 열화의 가능성과 더불어 미세분말화가 불가능하며 그 결과 미강을 첨가하여 제조되는 제품들의 경우 조직감이 매우 떨어진다. 그러므로 미강은 생리활성물질의 보고임에도 불구하고 식품 소재로서의 적용에 어려움이 있다. 그러나 미곡종합처리장과의 협력으로 도정시에 청결한 미강을 얻는다면 미강에 함유되어있는 여러 생리활성 물질들을 분리하여 기능성 건강식품 및 부재료로서의 활용이 가능할 것이다. 근래 미강을 신소재로 생리활성 물질을 규명하고자하는 노력들이 시도됨에 따라 미강의 성분과 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

미강의 생리활성 성분으로 tocopherol과 tocotrienol등의 tocol류,  $\gamma$ -oryzanol 등의 지용성 성분과 ferulic acid, p-coumaric acid, benzoic acid등의 페놀성화합물이 함유되어 있으며, 체내콜레스테롤 대사조절에 도움을 주는  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등과 같은 식물성 스테롤도 함유되어 있다고 알려져 있는데 최근까지 미강의 생리활성 성분이 항산화효과, 항암효과, 항염증효과 및 콜레스테롤 저하효과 등 여러 방면에 유효한 약리작용이 있다고 보고되었다.

한편, 각종 식품첨가물에 대한 국제적인 규제가 강화되면서 식품첨가물로서 천연물의 이용가치는 더욱 높아지고 있으며, 특히 생리활성의 효과가 큰 천연물 소재의 개발은 중요한 산업분야로 부각될 것이다. 그 중 미강이 식품산업뿐 아니라 의약 관련 산업의 새로운 소재로 활용할 수 있는 길이 열려 농촌경제의 향상에 크게 기여할 것으로 사료되며 미곡 정제과정에서 폐기물로 발생하는 미강을 만성 대사성 및 염증성 질환 예방용 건강 기능성 식품소재로 이용하기 위한 기반기술을 확보하기 위해서는 식품공학, 면역학 및 식품학 분야 간의 학제간 연구가 수행되어야만이 건강기능성 소재의 발굴, 기능성 성분의 효과적 추출방법의 확립, 그리고 기호성이 높은 식품의 개발과 더불어 생리활성에 대한 적절한 평가법을 적용한 기능성 및 안

전성의 표준화가 이루어질 수 있어서, 주곡작물인 쌀의 새로운 부가가치 창출 및 국민보건 증진을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본연구에서는 미강으로부터 미셀룰로오스,  $\beta$ -글루칸 등의 식이섬유와 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol과 octacosanol등의 생리활성물질을 효율적으로 분리하기 위하여 추출공정을 최적화하고, 미강의 기능성 분획인 ferulic acid, oryzanol, rice trienol, phytic acid들과 목재 열 추출물, 그리고 다양한 한약재를 시료로 하여 염증세포의 과민성반응에 대한 억제활성 및 세균성 감염에 대한 저항성, 생체 종양형성에 대한 억제활성, 그리고 종양보유 동물의 내재면역세포의 기능저하에 대한 개선효과를 평가하고, 아울러 임산자원으로부터 기능성 물질을 탐색한 후 추출한 기능성 식품첨가용 물질을 혼합하여 새로운 기능성 제품을 개발하고자한다. 또한 현대인들은 환경오염, 불규칙한 식사, 스트레스, 피로 영양섭취의 불균형으로 신체의 면역력이 점차적으로 상실되고 있는 실정이며, 약물과 이물질의 대사과정에서 생긴 독성물질은 신체를 보호하고 있는 간의 기능을 저하시켜 만성간염, 간경변 및 간암의 진행 형태로 이행하여 현대인들에게 건강상 큰 위협이 되고 있는 실정이므로, 독성물질에 의해서 장기에 손상이 일어나는 경우, 손상된 장기의 회복에 미치는 한약재 열수 추출물 조합의 효과를 검정하고, 이들 한약재 조합물과 미강을 혼합사용하여 쌀가공 식품 제조용 부재료로써의 가공적성을 검정함으로써, 쌀가공 제품의 고부가가치화를 실현하고자 한다.

## 제2절 연구개발 내용 및 범위

### 1. 미강의 건강기능성 식품 소재화 기술개발

- 미강함유 식이섬유의 분석 및 추출
- 미강함유 지용성 분획의 분리 및 추출
- 추출물을 이용한 다양한 형태의 제품 개발

### 2. 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발

- 목재인자별 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색
- 소재물질의 물리적, 화학적 성분분석
- 원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립

### 3. 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증

- 비만세포주 및 대식세포주를 사용하여 염증관련물질( $\beta$ -hexosaminidase, 염증 cytokines, eicosanoids) 및 활성라디칼 생성(ROS 및 NO)에 대한 억제활성을 조사
- 암세포이식으로 종양을 형성한 생쥐에 기능성성분을 식이했을 때 식이에 의한 종양형성의 억제도와 종양보유 동물의 대식세포 및 자연살해세포의 종양 살해 기능이 향진 여부를 대식세포의 활성라디칼 생성도, 포식활성도, 그리고

자연살해세포의 종양살해능을 측정하여 평가

- 실험생쥐에서 Salmonellosis 실험계를 사용하여 활성물질이 세균감염증에 대한 예방 및 억제효과를 평가

4. 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화

- 흑미미강 색소추출물 활용에 의한 미강의 산패억제 효과
- 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 미강의 활용
- 쌀 배아젤리 급여 동물의 만성대사성질환 억제효능 검정
- 한약재 열수추출물 혼합 사용에 의한 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품제조 및 가공적성 검정

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

미강의 생리활성 성분으로 tocol류,  $\gamma$ -oryzanol, 페놀성화합물 및 식물성 스테롤이 함유되는데 이러한 미강의 생리활성 성분이 항산화효과, 항암효과, 항염증효과 및 콜레스테롤 저하효과 등 여러 방면에 유효한 약리작용이 있다고 보고되어 있지만 미강은 현재 대부분 가축의 대체사료로 소비되고 있으며 일부는 미강유 제조에 사용되고 있는 실정으로서, 미강의 고부가가치화에 대한 기술개발 및 생리활성 평가는 미미한 수준이다. 또한 목재 탄화추출물 (목초액)도 단순하게 작물 재배시의 대체농약 정도로 이용되고 있지만 미강과 마찬가지로 건강기능성 식품으로서의 활용 가능성에 대한 검토는 전무한 상태이다. 한약재의 경우, 약리학적 생리활성에 대한 연구는 다수 수행되어야 있으나 염증성증식성 질환의 예방을 위한 식품의 개발연구는 초보적인 단계이다.

현재까지 미강의 유용성분의 효능에 대하여 보고된 연구에 따르면 미강의 지용성 생리활성 물질 중 하나인  $\gamma$ -oryzanol은 campesterol,  $\beta$ -sitosterol 등의 sterol 및 trierpenoid alcohol이 모핵인 ferulic acid와 ester 결합을 하고 있는 무색, 무취의 혼합물질로 혈중 콜레스테롤 감소시키고 항산화 기능 및 항궤양작용이 있다고 보고되었다. 또한 쌀과 미강의 주요 phenolic acid이며  $\gamma$ -oryzanol의 모핵인 ferulic acid는 LDL(low density lipoprotein) 산화 억제, radicals에 의한 세포손상 보호등 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라 당뇨 유도 쥐의 혈중 지질 개선 효과등 여러 생리활성이 보고되었다. 미강에는 비타민 E의 함량도 풍부한데 비타민 E는 tocopherol과 tocotrienol을 총칭한 말로서 tocopherol의 효능에 대하여 보고된 바에 의하면 항산화 효과와 항암작용 및 관상동맥성 심질환, 알츠하이머질환과 알러지예방 효과도 있다 한다. Tocotrienol의 효능은 암세포의 성장을 억제, 심혈관계 질병의 개선효과, 자외선 노출에 의한 피부보호 효과, HMG-CoA의 reductase의 활성을 억제하여 혈중 cholesterol 저하, 혈압강하 효과 및 유도지질 과산화 방지에 있어  $\alpha$ -tocopherol보다 tocotrienol이 40-60배 효과가 있다고 하였다. 한편 근래들어 octacosanol의 효능에 대하여 많이 보고되었는데 octacosanol은 에너지 저장량을 증가시키고 혈중 HDL 증가 및 근육의 지방 이용률을 증가시키는 기능을 한다고 보고되었으며, 파킨슨병과 루게릭병의 치료제로서 효과가 있다고 보고되었다. 최근 의학보고에 따르면 octacosanol이 혈중 cholesterol에 영향을 주지 않고 cholesterol 대사에서 유도된 부산물 함량을 감소시킨다고 보고되었다.

가까운 일본을 비롯한 선진국에서 참나무 추출물의 성분, 수종별 차이점 등에 대한 연구 등을 해왔으며, 참나무의 페놀성 화합물, VOC에 대한 연구들도 많이 보고되고 있다. 오래전부터 쌀과 관련된 연구는 일본에서 주로 이루어져 왔는데 미강과 관련된 연구나 개발도 우리나라보다 발전되어 있으며 미강 추출물을 활용하여 식품산업 뿐만 아니라 관련 산업에 응용시켜 상품화가 된 경우도 많다. 현재 우리나라는 미강의 유용성분의 기

능성에 대한 연구는 활발히 진행되고 그 효능에 대한 보고가 많지만 미강의 유용성분 효율적인 추출공정 및 정제에 관한 보고는 아직 미흡한 상태이다.

한편 식품에 함유되어 있는 생리활성 성분들을 활용한 건강 증진용 기능성 식품 개발의 패러다임이 영양유전체학의 발전과 더불어 진일보하면서 건강·질환별 개인 맞춤형 식품에 대한 관심이 집중되기 시작하고 있는데, 미강의 유용성분 추출 및 분리 공정을 확립하고 추출물의 기능성이 검증된 가공제품을 개발하여 산업적 이용에 있어서 미강의 부가가치를 더욱 높일 수 있을 것으로 사료된다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
제 1세부	미강함유 식이섬유의 분석 및 추출	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A.O.A.C법에 의한 이화학적 성분 분석</li> <li>- 헤미셀룰로오스 추출 공정 최적화 (SAS program을 이용하여 GLM procedure로 분석)</li> </ul>
	미강함유 지용성 분획의 분리 및 추출	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC 및 GC를 이용한 Ferulic acid, <math>\gamma</math>-oryzanol, 및 octacosanol 함량 분석</li> <li>- HPLC 및 GC 분석을 위한 지용성 분획물의 전처리</li> <li>- SAS program을 이용하여 지용성 성분 최적추출공정 수립</li> </ul>
	추출물을 이용한 다양한 형태의 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과립기 및 타정기를 이용한 미강 추출물 가공제품 제조</li> <li>- 가공제품의 이화학 성분 분석 및 품질 분석</li> </ul>
제 2세부	목재성분의 효율적인 추출 조건 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수증선정 및 전처리 조건 탐색</li> <li>- 기능성 물질추출을 위한 전처리 목재의 물성 측정</li> </ul>
	산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 베이스 화합물의 화학적 조성과 탄수화물 조성분석 및 고온고압 수증기 전처리재의 성분 분리 및 조성분 분석</li> </ul>
	원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생약소재의 효율적인 추출을 위한 전처리연구 및 전처리재의 성상 분석</li> </ul>
제 3세부	미강 및 목재추출물의 <i>in vitro</i> , <i>in vitro</i> 생리활성 효능검정(대식세포의 활성화조절)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료의 세포독성 보유여부를 세포독성을 측정하는 MTT법을 이용하여 그 안전성을 평가</li> </ul>
	미강활용 건강기능성 식품의 만성대사성/만성염증증식성질환 억제 효능 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미강활용 식품 및 추출물을 이용한 제품의 식이가 지질/당질대사에 대한 개선효과 검정</li> <li>- 미강활용 식품 및 추출물을 이용한 제품의 식이가 염증관련 비만세포 및 대식세포 기능에 미치는 효과 검정</li> <li>- 미강활용 식품 및 추출물을 이용한 제품의 식이가 생체 종양형성과 종양살해 세포의 기능에 미치는 효과 검정</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미강활용 식품 및 추출물을 이용한 제품의 식이가 지질대사의 개선 및 염증과 중양억제 기작의 구명</li> </ul>
	<p>실험 생쥐에서 Salmonellosis 실험계를 사용하여 활성물질이 세균감염증에 대한 예방 및 억제효과를 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포 NO 활성 제어</li> <li>- 대식세포 NO 발생 촉진기작</li> <li>- Salmonellosis 모델에서 고향추출물의 병 발생 억제효과</li> </ul>
제 4세부	<p>흑미 색소분획 첨가에 의한 도병 제조시 가공적성 검정, 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 건강 기능성 식품 및 쌀가공 식품의 상품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 도병의 물성 측정</li> <li>- 색도측정</li> <li>- 관능검사</li> </ul>
	<p>흑미 색소분획 및 배아의 떡 및 한과 제조시 부재료(고물, 소)로서의 가공적성 검정 및 만성대사성 질환 억제 효능 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 색소 안정성 측정</li> <li>- 물성 측정</li> <li>- 고콜레스테롤 혈증을 유도한 흰쥐에 의한 동물실험</li> </ul>
	<p>한약재 열수추출물 혼합 사용에 의한 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품 제조, 가공적성 검정 및 상품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사염화 탄소 처리에 의해서 간장 및 신장조직의 손상을 유도한 흰쥐에 의한 동물실험</li> </ul>

# 제1절 미강의 건강 기능성식품 소재화 기술개발

## 1. 미강함유 식이섬유의 분석 및 추출

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 재료

미강은 2006년 7월 경상북도 김천 (주)건양RPC으로부터 분쇄된 시료를 공급받았으며, 표준망체 No. 40(aperture 425  $\mu\text{m}$ )을 통과하는 시료를 4배가량의 hexane(Sigma Chemical Co.  $\geq 99.9\%$ )을 이용하여 12시간 진탕한 후 탈지하여 50°C에서 5시간 건조한 시료를 -20°C의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

#### (2) 이화학적 성분 분석

##### (가) 일반성분

미강의 일반성분의 분석은 A.O.A.C 법(1)에 준하여 수분은 적외선 수분 측정기(SARTORIUS AG GOTTGEN MA 35M-000230V1, Germany)를 이용하였고, 조지방은 Soxtec(FOSS QUALITY ASSURANCE., Sotex<sup>TM</sup> 2045, Hogans, Sweden)를 이용하였으며, 조회분은 550°C 회화법, 조단백질은 Kjeltac Auto sampler System 1035 Analyzer를 이용하였고, 조섬유는 Hennber-Stohmann법에 따라 구하였다. 가용성 무질소물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유 함량을 제한한 값으로 하였고 모든 실험은 3회 반복하여 그 평균값으로 나타내었다.

#### (3) 헤미셀룰로오스 추출

##### (가) 헤미셀룰로오스 추출 공정

헤미셀룰로오스(Hemicellulosic polymer)는 매우 다양한 다당류의 중합체이며, 그 수율과 중합체의 성분은 분리(isolation) 방법에 의존하여 달라진다(2). 따라서 정제된 헤미셀룰로오스를 분리하기 위해서는 알칼리 용매를 이용한 헤미셀룰로오스 추출 이전에 왁스(wax), 클로로필(chlorophyll)과 같은 미세포벽성분을 제거하는 것이 필수적이다(3). 일반적으로 미강은 조지방 함량이 20% 이상으로 함량이 비교적 높은 편이다(4). 따라서 본 연구에서도 헥산(Sigma Chemical Co.  $\geq 99.9\%$ )을 이용하여 지용성 성분 및 왁스 성분을 제거한 후 추출용 시료로 사용하였다.



### ① 다당류의 추출

본 연구에서의 미강으로부터의 헤미셀룰로오스 추출 공정은 Fig. 1.에 나타난 바와 같이 미강 10 g를 사용하여 아밀로글루코시다아제(amlyoglucosidase, 3,260 U/mL, Megazyme Ltd., IRELAND)를 0.1%로 조제하여 500 mL을 가하여 40℃에서 24 시간 동안 전분 가수분해 하였다. 상기의 추출액을 원심 분리하여 여액은 제거하고 잔사를 Fig. 1.에서 나타난 바와 같이 추출 조건을 달리하여 수산화나트륨(sodium hydroxide)용액 100 mL를 가하여 실온(25℃)에서 진탕 추출기(Shaking Incubator SW-90R, SANG WOO SCIENTIFIC Co. KOREA)를 이용하여 알칼리 용해성 다당류를 추출하였다. Xu 등의 연구(5)에서 *Lolium perere*로부터 알칼리 용매인 수산화나트륨(sodium hydroxide)과 수산화칼륨(potassium hydroxide)로 추출하였을 시, 수산화나트륨보다 수산화칼륨으로 추출 하였을 시 추출수율이 더 높다는 결과를 참고하여, 수산화나트륨을 추출 용매로 선택 하였다. 추출한 알칼리 용해성 다당류를 80,000 rpm에서 15 분 동안 원심 분리하여 잔사를 분리하고 그 상등액을 얻었다.

### ② 다당류의 분리

상기의 상등액에 아세트산(Kanto Chemical Co., Inc.)을 첨가하여 pH meter (HANNA Instruments pH 211, USA)를 이용하여 pH 6.95~7.00로 중화시킨 후, 트리클로로아세트산(JUNSEI Chemical Co., Ltd.)를 최종 농도가 7%가 되도록 첨가하여 8,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 알칼리 용해성 단백질을 침전시켜 제거하였다.

### ③ 헤미셀룰로오스의 분리

상기의 상등액에 다시 150 mL의 증류수를 가하여 희석을 한 후 최종부피가 100 mL이 되도록 농축하였다. 알콜 불용성 헤미셀룰로오스(alcohol insoluble hemicellulose)를 얻기 위해 4배(v/v)의 95% 알콜(ethyl alcohol)을 가하여 12 시간 동안 4℃에서 냉장 보관하여 알콜 불용성 헤미셀룰로오스를 침전시켰다. 이 용액을 8,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 얻은 침전물을 알콜 불용성 헤미셀룰로오스로 하였다. 이 침전물을 다시 증류수 20 mL에 완전히 용해시킨 후 동결 건조하여 최종 헤미셀룰로오스를 획득하였다. 그리고 상기의 헤미셀룰로오스는 -20℃ 압소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

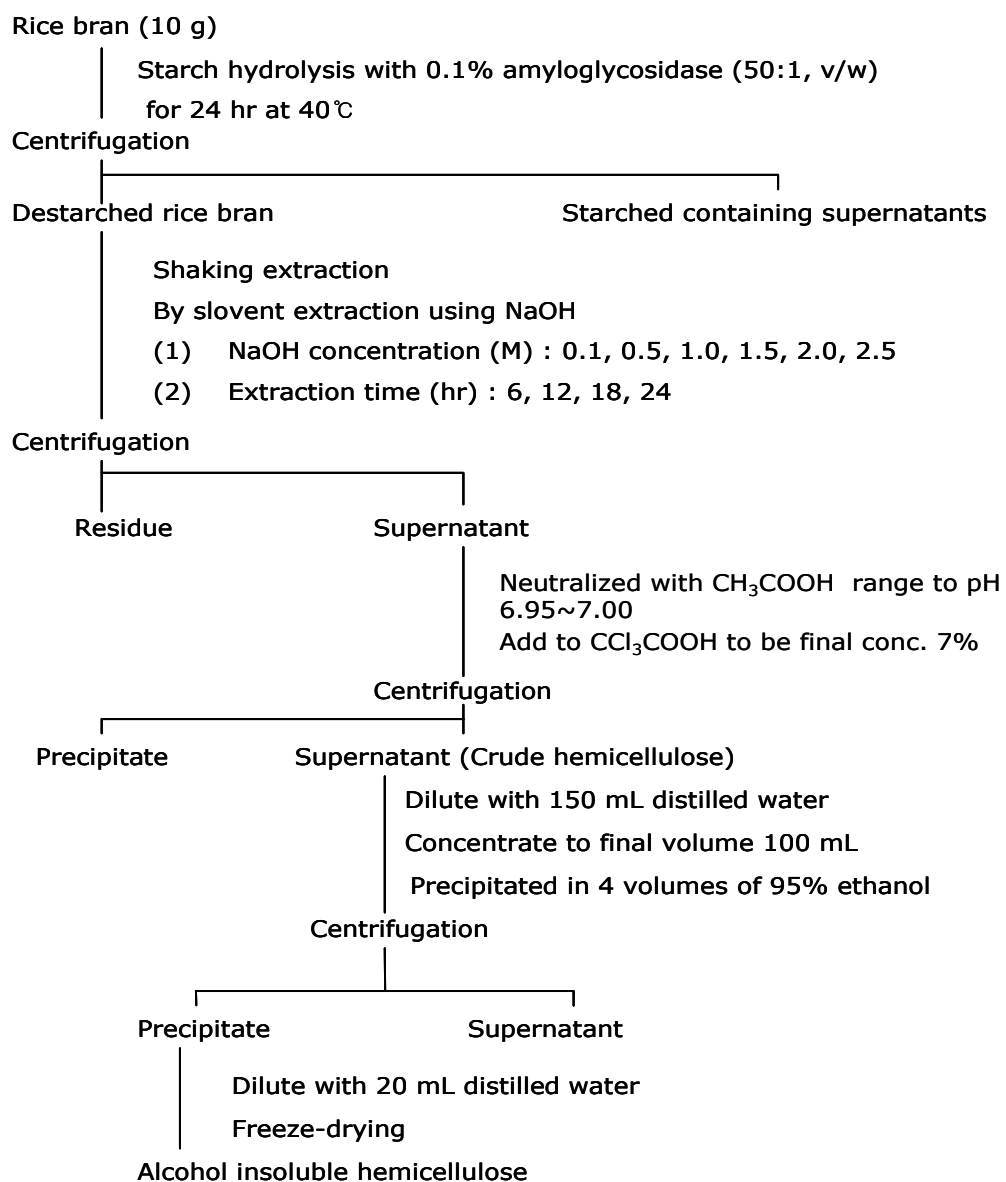


Fig. 1. Scheme for extraction of hemicellulose from rice bran.

(나) 추출 조건에 따른 헤미셀룰로오스 추출

추출 조건을 예비 설정하기 위한 기초 실험으로서 추출용매의 농도(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 M)별로 추출 시간(6, 12, 28, 24 hr)을 달리하여 추출하여 추출용매의 농도와 추출 시간이 헤미셀룰로오스 추출물의 품질 특성에 미치는 영향을 조사하였다. 기능성 성분의 특성으로는 추출 수율, Xyl/Ara ratio, 우론산, 베타 글루칸, 총 당을 측정하였으며, 각 실험구간의 통계분석은 SAS(statistical analysis system, USA, 1999) program을 이용하여 GLM(General Linear Model) procedure를 통하여 분석하였으며, 처리구간의 평균 간 비교는 Duncan's multiple range test를 통하여 1%이내의 유의성 검정을 실시하였으며(6), 이 중 우수한 추출 조건을 선발하여 최적화 실험에 사용하였다.

(4) 헤미셀룰로오스 추출 최적화 실험계획

본 실험에서 미강으로부터 헤미셀룰로오스 추출 시 최적 추출조건을 구하기 위하여 중심합성계획법(central composite design)을 사용하였으며, 반응표면을 이용한 회귀분석을 위해 SAS(statistical analysis system, USA, 1999) program을 사용하였다(7). 추출공정의 독립변수( $X_i$ )는 추출 용매 농도( $X_1$ )와 추출 시간( $X_2$ )에 대한 실험 범위를 선정하여 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 Table 1에 나타내었다. 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수 ( $Y_n$ )는 추출 수율( $Y_1$ ), Xyl/Ara ratio( $Y_2$ ), 우론산( $Y_3$ ), 베타 글루칸( $Y_4$ ), 총 당( $Y_5$ )을 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{22}X_2^2$$

추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 반응표면분석을 행하였다.

Table 1. Levels of extraction conditions for hemicellulose from rice bran by central composite design

$X_i$	Extraction conditions	Coded levels				
		-2	-1	0	1	2
$X_1$	NaOH concentration (M)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
$X_2$	Extraction time (hr)	6	12	18	24	30

Table 2. The central composite design for optimization of extraction conditions for hemicellulose from rice bran

Experiment No. <sup>1)</sup>	Extraction condition	
	NaOH concentration (M)	Extraction time (hr)
1	1 (2.0)	1 (24)
2	1 (2.0)	-1 (12)
3	-1 (1.0)	1 (24)
4	-1 (1.0)	-1 (12)
5	0 (1.5)	0 (18)
6	0 (1.5)	0 (18)
7	2 (2.5)	0 (18)
8	-2 (0.5)	0 (18)
9	0 (1.5)	2 (30)
10	0 (1.5)	-2 ( 6)

1) The number of experimental conditions by central composite design.

#### (5) 헤미셀룰로오스 추출물의 이화학적 성분 분석

##### (가) 추출 수율

각 조건에서 획득한 추출물의 추출 수율(total extract yield)은 미강 10 g로부터 추출한 헤미셀룰로오스(Alcohol insoluble hemicellulose)를 동결 건조 한 후 그 무게를 측정하였으며, 추출액에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로 하여 추출 수율(%)을 계산하였다.

##### (나) Xyl/Ara ratio

각 추출시료를 일정하게 정량한 후, 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 35°C에서 1 시간 동안 가수분해 시킨 후, 다시 증류수를 더하여 전체 농도가 1 mg/mL이 되게 하여 100°C에서 1 시간 동안 가수분해 한 것을 시료로 사용하였다(8). 가수분해물 3 mL에 internal standard인  $\beta$ -D-allose(Fluka EC No. 2199944,  $\geq 99.0\%$  HPLC)를 1

mg/mL의 농도로 조제한 후 1 mL을 첨가하여 alditol acetate화 하였다. Alditol acetate화 한 시료를 gas chromatography(HP 6869 plus (GC), Jeol JMs700 (Mass))를 이용하여 자일로스(xylose)와 아라비노오스(arabinose)의 함량 그리고  $\beta$ -D-allose의 함량을 구하였다(9). Xyl/Ara의 비율은 xylose/arabinose의 함량 비율로 계산하였다. 분석조건은 Table 3에서 나타낸 바와 같다. 성분 당은 internal standard인  $\beta$ -D-allose의 양을 기준으로 하여 peak의 면적을 계산하고 자일로스, 아라비노오스,  $\beta$ -D-allose의 상대적인 백분율로 계산하였다.

Table 3. HPLC conditions for analysis of xylose, arabinose and  $\beta$ -D-allose contents in hemicellulose from rice bran

Items	Conditions
Instrument	HP 6869 plus (GC), Jeol JMS700 (Mass)
Column	DB-225, 30 m (length) $\times$ 0.25 mm (I.D) $\times$ 0.25 $\mu$ m (Film)
Carrier Gas	He (1 mL/min)
Injection Temp.	250 $^{\circ}$ C
Oven Temp.	150 $^{\circ}$ C (2 min) $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C (10 min)
Injection volume	1 $\mu$ l, splitless
I o n i z a t i o n Energy	70 eV
Ion source Temp.	230 $^{\circ}$ C

#### (다) 우론산

각 추출 시료의 우론산 함량은 Filisetti-Cozzi and Carpita (1991)법(10)에 따라 비색 정량하였다. 각각의 추출 시료 5 mg에 1 mL의 진한 황산을 더하여 5 분간 차가운 상태로 강하게 진탕 한 후 1 회 더 반복 후 0.5 mL의 증류수를 가해서 차가운 상태로 5 분 동안 진탕한 후 다시 증류수를 더하여 총 부피가 10 mL이 되도록 하고서 2,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 시료를 조제 하였다. 각 가수분해물의 상등액 400  $\mu$ L를 취한 후, 4 M sulfamic acid/potassium sulfamate solution(pH 1.6) 40  $\mu$ L를 넣은 후 강하게 진탕 한 후, 2.4 mL의 75 mM sodium tetraborate를 넣어 강하게 진탕 시키고 100 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 반응시켰다. 차가운 물에서 10 분 동안 냉각 시킨 후, sample test tubes에는 80  $\mu$ L meta-hydroxyldiphenyl을 넣고, reagent control tubes에는 0.5% sodium hydroxide

80  $\mu$ L을 넣어 강하게 진탕한 후 방치하고 10 분에서 1 시간 이내에 UV-visible spectrometer(TU-1800 Human crop. Korea)을 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 sample tests와 reagent control의 차이를 계산하여 우론산의 함량을 구하였다. 이 때 표준 곡선은 D-glucronic acid(Sigma chemical co. , HPLC)로 200 mg/mL stock solution을 만든 뒤 희석하여 10~200  $\mu$ g/mL 정도의 범위가 되도록 용액을 조제하여 표준 곡선을 작성하여 시료 중의 우론산 함량(%)을 계산하였다.

#### (라) 베타 글루칸

각 추출 시료의 베타 글루칸 함량은 Mixed-Linkage Beta-glucan Assay Procedure인 AOAC Method 995.16 와 32-23법(10-13)에 준하여 정량하였다. 실험에 사용한 시약은 Megazyme International Ireland Ltd.로부터 구입한 Mixed-Linkage Beta-glucan and Glucose kits를 사용하였으며 추출액은 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (마) 총 당

당 함량 분석은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법을 이용하였다 (14). 즉 시료 1 mg/mL에 5% phenol solution 1 mL를 가한 후 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mL를 가하여 혼합하고 20 분 간 방치한 뒤에 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (6) 최적 추출 조건의 예측 및 실증시험

조건에 따른 각 추출 시료의 최적 추출조건을 예측하기 위하여 각 추출물의 기능성 성분에 대하여 contour map을 이용하여 superimposing했을 때 중복되는 부분의 범위를 설정하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 최적점을 설정하여 최적조건으로 예측하고 각 회귀식에 대입한 후 그 예측된 최적값들에 대하여 검증하였다.

#### (7) 미강유래 헤미셀룰로오스 최적 추출물의 구조적 특성

##### (가) 전계 방사형 주사 전자현미경

전계 방사형 주사 전자현미경(Hitachi, S-4300, Japan)을 이용하여 최적 추출 조건에서 추출한 시료의 조직상의 특징을 관찰하기 위해 각각의 시료를 백금으로 도금시켜 전도성을 갖게 하였다. 이 시료를 전계 방사형 주사 전자현미경(FE-SEM, Field Emission Scanning Electron Microscope)을 사용하여 일정한 가속전압으로 10,000배, 50,000배, 100,000배의 배율로 관찰하였다.

(나) GPC에 의한 분자량 측정

0.02 M NaNO<sub>3</sub>에 추출 시료를 일정한 농도로 용해시킨 후, HPLC(breeze HPLC system, Waters, USA)에 50 µL를 주입하여 0.8 mL/min의 유속으로 분자량 측정을 실시하였다. 정제 다당류의 분자량은 Pullulan (M.W. 5,900, 11,800, 22,800, 47,300, 112,000, 212,000, 404,000, 788,000)을 일정한 농도로 조제하여 분자량을 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 이화학적 성분 특성

(가) 일반성분

본 실험에 사용된 미강과 탈지미강의 일반성분 분석 결과는 Table 4와 같다. 탈지 미강은 수분 7.87%, 조단백질 15.45%, 조지방 4.28%, 조회분 9.63%, 조섬유 14.64%, 가용성 무질소물의 함량 48.13%이고, 탈지 전 미강은 조지방 22.83%, 조단백질 9.40%, 조회분 10.02%였다. 가용성 무질소물을 제외한 조단백질, 조섬유의 함량이 미강의 일반성분 중 상대적으로 높은 비율을 차지하였다. 그리고 탈지 미강의 조지방 함량은 탈지전과 비교 시 약 18%이상 줄어들었고, 상대적으로 조단백질과 조섬유의 함량이 증가하였다. 이는 김성란 등(15)의 연구에서 미강의 지방과 회분 함량이 15.82~20.80%, 6.92~10.34%의 보고와 유사하게 나타났고, 조단백질 9.88~13.40%인 것과 비교 시 감소되는 경향을 나타내었다.

Table 4. Proximate composition of rice bran and defatted rice bran

Rice bran		Defatted rice bran	
Composition	Content(%)	Composition	Content(%)
Moisture	8.59	Moisture	7.87
Crude protein	9.40	Crude protein	15.45
Crude lipid	22.83	Crude lipid	4.28
Crude ash	10.02	Crude ash	9.63
Crude fiber	6.36	Crude fiber	14.64
N-Free ext.	42.80	N-Free ext.	48.13

## (2) 추출조건에 따른 헤미셀룰로오스 성분 특성

### (가) 추출 수율

미강으로부터의 추출 조건에 따른 헤미셀룰로오스의 추출 수율을 알아보기 위해 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 NaOH 농도와 추출 시간만을 달리하고 나머지 조건은 동일하게 하여 추출하였고, 그 결과는 Table 6 와 Fig 2에 나타낸 바와 같다. 통계 분석 결과, 추출 조건에 따른 추출 수율은 0.5%이내에서 유의하게 나타났으며, R-square는 0.9641로 나타났다.

추출 수율은 NaOH 농도와 추출 시간의 추출 조건의 변화에 따라 1.05~14.66%로 나타났다. 이는 콩 100 g로부터 4.02 g의 헤미셀룰로오스를 얻은 연구 (16)와 비교 시, NaOH 농도 0.5 M 이상에서 추출 시 헤미셀룰로오스의 추출 수율은 비교적 높았다.

통계분석 결과, 헤미셀룰로오스 추출 시 NaOH 농도가 추출 수율에 미치는 영향을 보면 Fig. 2와 같이 용매 농도가 증가함에 따라 추출 수율이 매우 유의하게 증가하였다( $P < 0.001$ ). 그리고 추출 수율의 증가율은 NaOH 농도가 높아짐에 따라 감소하였다. 특히, 처리 구간내의 비교 분석 결과(Duncan's multiple range test), NaOH 2.0 M과 2.5 M에서의 추출 수율은 모두 A그룹에 속하여 두 구간사이에 추출 수율은 유의하게 차이가 나지 않는 것으로 나타났다.

추출 시간이 추출 수율에 미치는 영향은 Fig. 2과 같이 0.1 M NaOH에서 추출을 포함하여 전 구간에서 추출 시간이 증가함에 따라 추출 수율도 유의하게 증가하였다( $p < 0.005$ ). 이는 Xu 등(5)의 연구에서와 같이, 10% 알칼리 용매로 추출 하였을 시 추출 시간이 증가함에 따라 헤미셀룰로오스의 추출 수율이 한 것과 유사한 경향이였다. 이는 추출 시간이 증가함에 따라 알칼리 추출 용매에 의한 미강으로 침투가 활발해짐에 따라 미강내의 알칼리 용해성 다당류인 헤미셀룰로오스의 추출 수율이 증가하였기 때문이다. 그리고 추출 시간이 6시간과 12시간 일 때의 추출 수율은 b였고, 추출 시간이 18시간과 24시간일 때 추출 수율은 a에 속하였다. 헤미셀룰로오스의 추출은 12 시간에서 18시간 사이에 활발하게 추출되는 것으로 확인되었다. 그리고 추출시간보다 NaOH 농도가 추출 수율에 더 유의하게 영향을 미치는 것으로 나타났다.



Table 6. Effect of extraction condition on total yield of hemicellulose from rice bran

Extraction conditions		Total yield (%)
NaOH conc. (M)	Extraction time (hr)	
0.1	6	<sup>b</sup> 1.05 <sup>E</sup>
0.1	12	<sup>b</sup> 1.53 <sup>E</sup>
0.1	18	<sup>a</sup> 1.15 <sup>E</sup>
0.1	24	<sup>a</sup> 1.30 <sup>E</sup>
0.5	6	<sup>b</sup> 4.34 <sup>D</sup>
0.5	12	<sup>b</sup> 4.53 <sup>D</sup>
0.5	18	<sup>a</sup> 5.69 <sup>D</sup>
0.5	24	<sup>a</sup> 5.45 <sup>D</sup>
1.0	6	<sup>b</sup> 6.49 <sup>C</sup>
1.0	12	<sup>b</sup> 7.09 <sup>C</sup>
1.0	18	<sup>a</sup> 10.23 <sup>C</sup>
1.0	24	<sup>a</sup> 9.46 <sup>C</sup>
1.5	6	<sup>b</sup> 7.90 <sup>B</sup>
1.5	12	<sup>b</sup> 9.80 <sup>B</sup>
1.5	18	<sup>a</sup> 9.98 <sup>B</sup>
1.5	24	<sup>a</sup> 11.80 <sup>B</sup>
2.0	6	<sup>b</sup> 10.53 <sup>A</sup>
2.0	12	<sup>b</sup> 10.66 <sup>A</sup>
2.0	18	<sup>a</sup> 13.66 <sup>A</sup>
2.0	24	<sup>a</sup> 14.66 <sup>A</sup>
2.5	6	<sup>b</sup> 8.81 <sup>A</sup>
2.5	12	<sup>b</sup> 10.69 <sup>A</sup>
2.5	18	<sup>a</sup> 13.24 <sup>A</sup>
2.5	24	<sup>a</sup> 13.77 <sup>A</sup>

A-EDuncan's multiple range test with NaOH conc.. The same letter is not significantly different ( $p < 0.001$ ).

a-bDuncan's multiple range test with extraction time. The same letter is not significantly different ( $p < 0.005$ ).

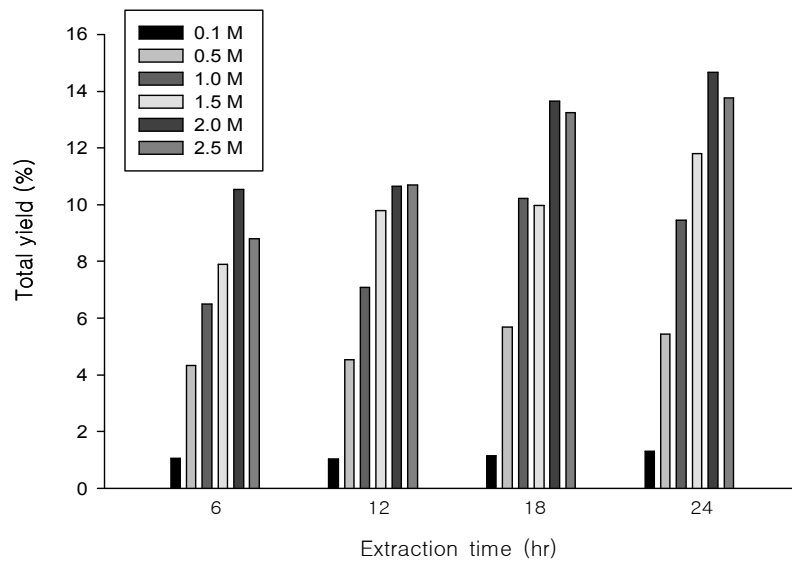
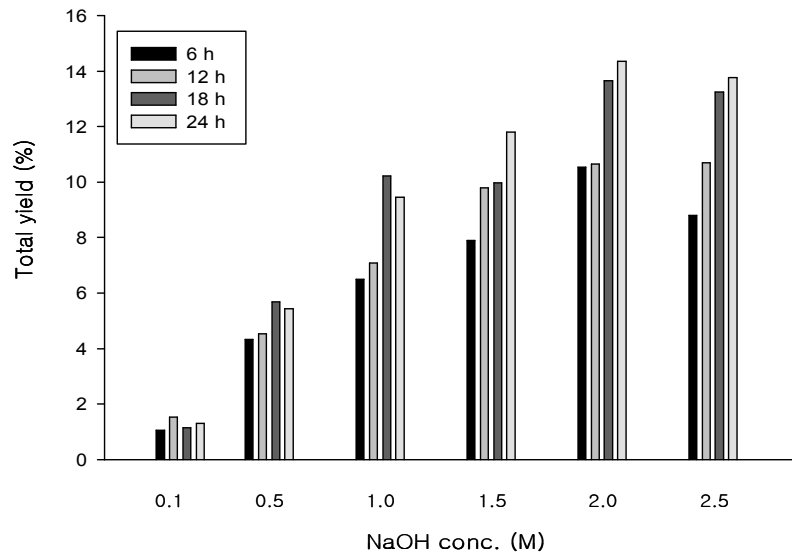


Fig. 2. Changes of total yields depending on NaOH concentration (M) and extraction time (hr) for the extraction of hemicellulose from rice bran.

#### (나) Xyl/Ara ratio

추출 조건에 따른 추출물의 Xyl/Ara ratio는 Table 7과 Fig. 3에 나타난바와 같다. 헤미셀룰로오스의 Xyl/Ara ratio는 추출 조건에 매우 유의하게 영향을 받았다( $p < 0.005$ ), R-square는 0.7640이었다.

Xyl/Ara ratio은 아라비노자일란의 선형 또는 비선형인 가지사슬화의 정도를 나타낸다(17,18). Xyl/Ara ratio가 높은 것은 다른 단당류와 거의 bonding하지 않고 중합체의 정도가 높음을 나타내며, Xyl/Ara ratio가 낮은 것은 다른 단당류와의 branching 정도가 높아 비선형인 short-chain polymer의 형태를 의미한다. 그리고 Xyl/Ara ratio는 아라비노자일란의 수용성과 밀접한 관련이 있는데, 값에 비례하여 수용성도 증가한다(19,20). 본 실험에서의 추출물의 Xyl/Ara ratio는 0.84~1.21의 범위로 나타났다 이는 J.P. Roubroeks et al.(21)이 호밀겨(rye bran)에서 NaOH를 이용하여 아라비노자일란을 추출한 결과 Xyl/Ara ratio가 1.05인 것과 유사한 경향을 나타내었다. 특히 0.5 M에서 추출 하였을 시, 헤미셀룰로오스내의 아라비노자일란의 수용성이 가장 높은 것으로 나타났다. 그리고 추출 과정에서 NaOH 농도가 높아짐에 따라 Xyl/Ara ratio가 감소하여 아라비노자일란의 수용성 또한 감소하였다. 즉, 아라비노자일란이 인체 내에서 생리 기능성이 증가하기 위해서는 수용성이 매우 중요하며, 이를 고려하였을 시 0.5 M에서 추출한 헤미셀룰로오스에서 우수한 생리 기능성을 지닌 아라비노자일란을 얻을 수 있다. 그리고 처리 구간내의 비교 분석 결과(Duncan's multiple range test), Xyl/Ara ratio에 NaOH 농도가 매우 유의하게 영향을 미치며( $p < 0.005$ ), 추출 시간은 Xyl/Ara ratio에 크게 영향을 주지 않았다.

Table 7. Effect of extraction condition on Xyl/Ara ratio of hemicellulose from rice bran

Extraction conditions		Xylose (%)	Arabinos e (%)	Xyl/Ara ratio
NaOH concentration (M)	Extraction time (hr)			
0.5	6	18.83	17.57	<sup>a</sup> 1.08 <sup>A</sup>
0.5	12	24.68	20.29	<sup>a</sup> 1.21 <sup>A</sup>
0.5	18	22.56	20.90	<sup>a</sup> 1.08 <sup>A</sup>
0.5	24	22.21	21.67	<sup>a</sup> 1.02 <sup>A</sup>
1.0	6	20.79	19.69	<sup>a</sup> 1.05 <sup>AB</sup>
1.0	12	13.37	12.12	<sup>a</sup> 1.10 <sup>AB</sup>
1.0	18	15.59	14.98	<sup>a</sup> 1.05 <sup>AB</sup>
1.0	24	17.75	17.56	<sup>a</sup> 1.01 <sup>AB</sup>
1.5	6	20.93	20.93	<sup>a</sup> 1.00 <sup>CD</sup>
1.5	12	21.02	21.56	<sup>a</sup> 0.97 <sup>CD</sup>
1.5	18	21.31	22.32	<sup>a</sup> 0.95 <sup>CD</sup>
1.5	24	19.74	20.51	<sup>a</sup> 0.96 <sup>CD</sup>
2.0	6	19.44	17.99	<sup>a</sup> 1.08 <sup>BC</sup>
2.0	12	20.41	20.75	<sup>a</sup> 0.98 <sup>BC</sup>
2.0	18	19.75	18.94	<sup>a</sup> 0.96 <sup>BC</sup>
2.0	24	18.56	19.30	<sup>a</sup> 0.96 <sup>BC</sup>
2.5	6	18.84	15.89	<sup>a</sup> 0.84 <sup>D</sup>
2.5	12	17.60	18.61	<sup>a</sup> 0.94 <sup>D</sup>
2.5	18	17.68	18.24	<sup>a</sup> 0.97 <sup>D</sup>
2.5	24	18.52	20.84	<sup>a</sup> 0.88 <sup>D</sup>

A- DDuncan's multiple range test with NaOH conc.. The same letter is not significantly different (p<0.005).

a- Duncan's multiple range test with extraction time. The same letter is not significantly different (p<0.005).

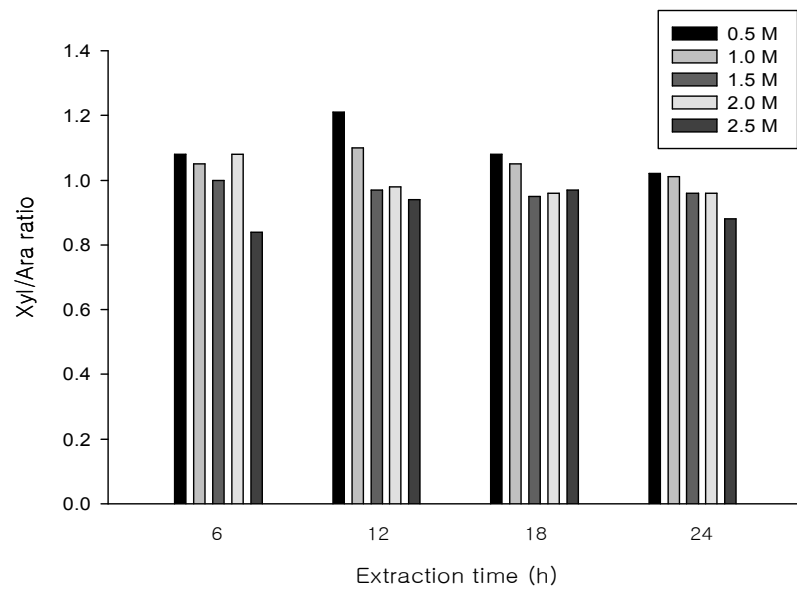
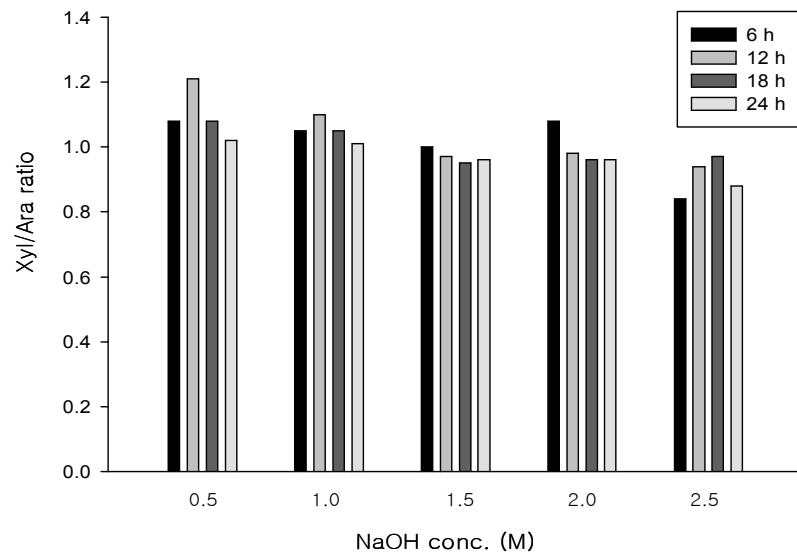


Fig. 3. Changes of Xyl/Ara ratio depending on NaOH concentration (M) and extraction time (hr) in the extraction of hemicellulose from rice bran.

#### (다) 우론산 함량

미강으로부터의 추출 조건의 변화에 따른 우론산(uronic acid) 함량의 변화는 Table 8과 Fig 4에 나타내었다. 그 결과 추출 조건에 따른 우론산 함량은 1%이내에서 유의성을 나타내었고, R-square는 0.7701이었다.

추출물의 우론산 함량은 2.0 M과 0.5 M의 NaOH 조건에서 추출 시, 우론산 함량이 유의하게 높았다( $p < 0.01$ ). 미강으로부터 추출한 헤미셀룰로오스내의 우론산 함량은 평균적으로 10~21% 정도 함유하였으며, 다시마류(tangle)로부터 분리한 수용성 비전분성 다당류내의 우론산 함량이 10.24 g/100 g로 보고한 김은희 외 등(22)의 보고와 비교 시 우론산 함량이 보다 많이 추출되었음을 확인할 수 있었다.

그리고 추출 시간을 고려해보면 18 시간동안 추출하였을 시 우론산 함량이 가장 유의하게 높았고, 6 시간과 12 시간 구간에서의 우론산 함량은 유의성이 없었고, 24 시간으로 추출하였을 때는 우론산 함량이 가장 작았다. 산성 다당체(acidic sugars; glucuronic acid and/or 4-O-methyl-glucuronic acid)는 추출된 알칼리 용해성 헤미셀룰로오스가 추출 시간이 증가함에 따라 알칼리 용매로 인해 가수분해되면서 우론산이 소량 추출 되는 것(5)으로 알려져 있으며, 본 추출물에서의 우론산 함량은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 12 시간에서 18 시간 사이에 우론산의 추출이 활발하게 일어났고, 이는 헤미셀룰로오스의 추출 수율과 유사한 경향을 보였다. 그리고 추출 시간이 18시간이 지난 후에는 우론산은 알칼리 용매와의 가수분해가 활발하게 일어나면서 그 함량이 감소하는 것으로 사료된다.

그리고 전체적으로 우론산 추출에 있어 추출시간보다 NaOH 농도가 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, NaOH 농도와 추출 시간의 교호 작용에 의해서 우론산 함량이 유의하게 영향을 받았다( $p < 0.01$ ).

Table 8. Effect of extraction condition on uronic acid of hemicellulose from rice bran

Extraction conditions		Uronic acid (%)
NaOH concentration (M)	Extraction time (hr)	
0.5	6	<sup>bc</sup> 14.94±3.42 <sup>A1)</sup>
0.5	12	<sup>b</sup> 17.03±1.59 <sup>A</sup>
0.5	18	<sup>a</sup> 18.60±0.64 <sup>A</sup>
0.5	24	<sup>c</sup> 15.37±3.14 <sup>A</sup>
1.0	6	<sup>bc</sup> 16.93±2.17 <sup>B</sup>
1.0	12	<sup>b</sup> 12.25±0.18 <sup>B</sup>
1.0	18	<sup>a</sup> 10.91±0.46 <sup>B</sup>
1.0	24	<sup>c</sup> 12.57±0.56 <sup>B</sup>
1.5	6	<sup>bc</sup> 10.48±0.09 <sup>B</sup>
1.5	12	<sup>b</sup> 15.42±0.40 <sup>B</sup>
1.5	18	<sup>a</sup> 13.67±0.49 <sup>B</sup>
1.5	24	<sup>c</sup> 13.75±2.01 <sup>B</sup>
2.0	6	<sup>bc</sup> 17.30±2.11 <sup>A</sup>
2.0	12	<sup>b</sup> 16.06±1.21 <sup>A</sup>
2.0	18	<sup>a</sup> 21.44±4.79 <sup>A</sup>
2.0	24	<sup>c</sup> 13.11±0.70 <sup>A</sup>
2.5	6	<sup>bc</sup> 13.33±0.61 <sup>B</sup>
2.5	12	<sup>b</sup> 13.38±0.46 <sup>B</sup>
2.5	18	<sup>a</sup> 17.36±0.40 <sup>B</sup>
2.5	24	<sup>c</sup> 12.14±0.64 <sup>B</sup>

1)Mean of triplecates ± Std. Dev.

A-BDuncan's multiple range test with NaOH conc.. The same letter is not significantly different(p<0.01).

a-cDuncan's multiple range test with extraction time. The same letter is not significantly different(p<0.01).

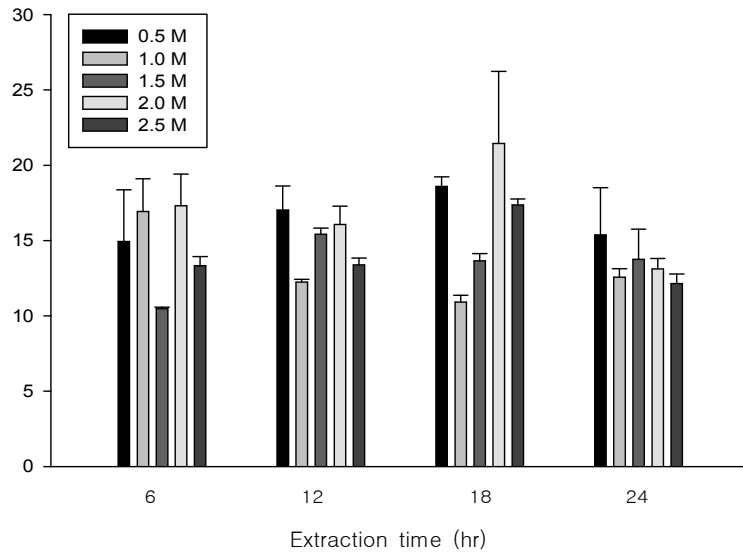
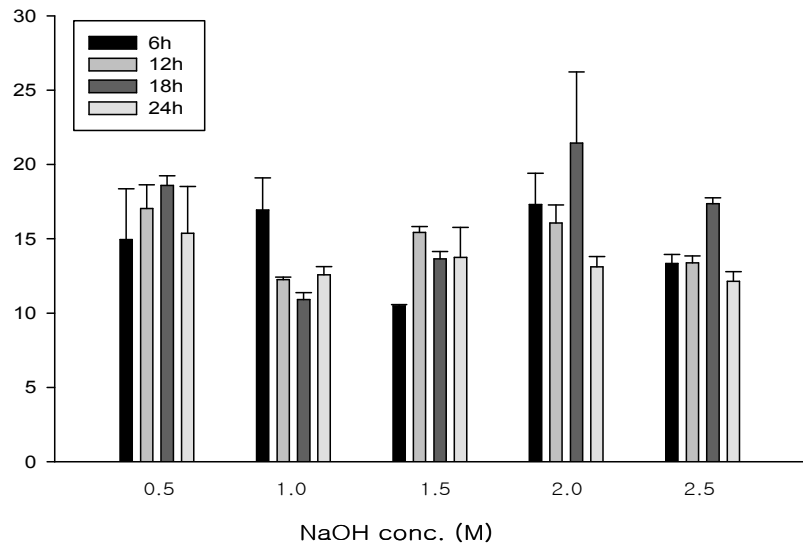


Fig. 4. Changes of uronic acid depending on NaOH concentration (M) and extraction time (hr) in the extraction of hemicellulose from rice bran.



(라) 베타 글루칸

추출 조건에 따른 추출물의 베타 글루칸 함량은 Table 9와 Fig. 5에 나타난바와 같다. 그리고 통계 분석 결과, 추출 조건에 따른 베타 글루칸 함량의 0.01%이내에서 유의성을 보였고, R-square는 0.9708로 나타났다.

NaOH의 농도가 베타 글루칸 함량에 미치는 영향을 보면 Fig. 5와 같이 2.5 M NaOH로 추출하였을 때 베타 글루칸 함량이 가장 높게 나타났으며, 특히, 2.5 M, 6 시간 추출하였을 때 베타 글루칸 함량은 0.91%로 값이 가장 높았다. 0.5 M에서 추출하였을 시에 베타 글루칸 함량이 0.2~0.3%의 범위로 비교적 낮은 편이었다. 이는 J.Y. Han(23)은 malt, beer에서 베타 글루칸 함량이 0.3~0.6%의 범위와 유사하게 나타났다. 그리고 이 추출물의 베타 글루칸 함량이 전반적으로 낮은 이유는 헤미셀룰로오스는 오타당이 주를 이루는 세포벽내의 다당류로 glucose의 함량이 비교적 낮은 편이며, 특히  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,4 결합을 하고 있는 glucose의 함량은 극히 소량 함유되어 있기 때문이다. 그리고 헤미셀룰로오스내의 베타 글루칸은 NaOH 농도에 유의하게 영향을 받았다( $p < 0.001$ ).

추출 시간의 변화에 따른 베타 글루칸 함량은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 추출 시간이 증가함에 따라 함량이 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 2.5 M, 6 시간 추출 시 0.91%로 베타 글루칸 함량이 가장 높았고, 0.5 M에서 6, 12 시간 추출하였을 시 0.21%로 함량이 가장 낮았다.

헤미셀룰로오스내의 베타 글루칸 함량은 NaOH 농도와 추출 시간 모두에 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났으며( $p < 0.001$ ), NaOH 농도와 추출 시간의 교호작용에도 유의하게 영향을 받았다( $p < 0.001$ ).

Table 9. Effect of extraction condition on  $\beta$ -glucan of hemicellulose from rice bran

Extraction conditions		$\beta$ -glucan (%)
NaOH concentration (M)	Extraction time (hr)	
0.5	6	<sup>a</sup> 0.21±0.00 <sup>D1)</sup>
0.5	12	<sup>b</sup> 0.21±0.03 <sup>D</sup>
0.5	18	<sup>d</sup> 0.31±0.02 <sup>D</sup>
0.5	24	<sup>c</sup> 0.24±0.03 <sup>D</sup>
1.0	6	<sup>a</sup> 0.38±0.03 <sup>C</sup>
1.0	12	<sup>b</sup> 0.49±0.05 <sup>C</sup>
1.0	18	<sup>d</sup> 0.29±0.07 <sup>C</sup>
1.0	24	<sup>c</sup> 0.31±0.03 <sup>C</sup>
1.5	6	<sup>a</sup> 0.49±0.03 <sup>B</sup>
1.5	12	<sup>b</sup> 0.46±0.01 <sup>B</sup>
1.5	18	<sup>d</sup> 0.36±0.02 <sup>B</sup>
1.5	24	<sup>c</sup> 0.40±0.02 <sup>B</sup>
2.0	6	<sup>a</sup> 0.44±0.00 <sup>C</sup>
2.0	12	<sup>b</sup> 0.35±0.07 <sup>C</sup>
2.0	18	<sup>d</sup> 0.34±0.01 <sup>C</sup>
2.0	24	<sup>c</sup> 0.33±0.02 <sup>C</sup>
2.5	6	<sup>a</sup> 0.91±0.03 <sup>A</sup>
2.5	12	<sup>b</sup> 0.67±0.01 <sup>A</sup>
2.5	18	<sup>d</sup> 0.28±0.01 <sup>A</sup>
2.5	24	<sup>c</sup> 0.53±0.03 <sup>A</sup>

1)Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.

A-DDuncan's multiple range test with NaOH conc.. The same letter is not significantly different( $p < 0.001$ ).

a-dDuncan's multiple range test with extraction time. The same letter is not significantly different( $p < 0.001$ ).

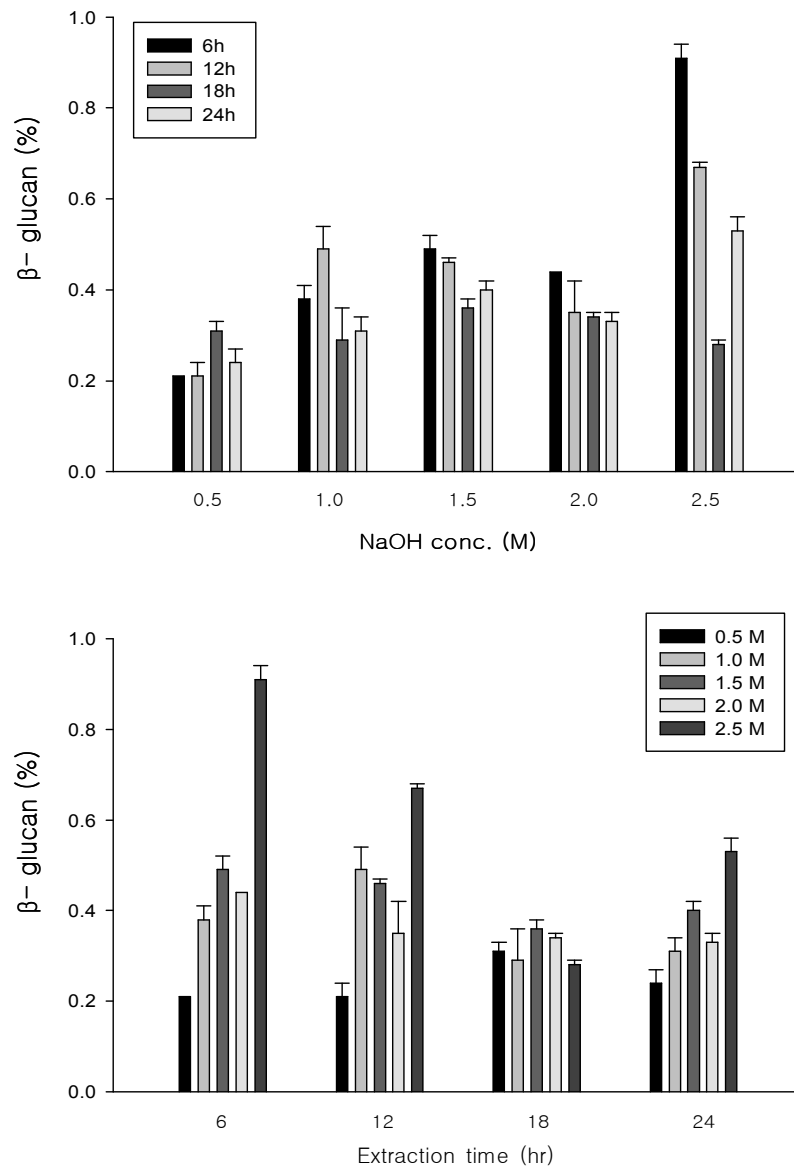


Fig. 5. Changes of  $\beta$ -glucan depending on NaOH concentration (M) and extraction time (hr) in the extraction of hemicellulose from rice bran.

## (마) 총 당

미강으로부터의 추출 조건에 따른 헤미셀룰로스의 총 당 함량을 알아보기 위해 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 NaOH 농도와 추출 시간만을 달리하고 나머지 조건은 동일하게 하여 추출하였으며 그 결과는 Table 10과 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 추출 조건에 따른 총 당 함량의 0.1%이내에서 유의하게 인정되었으며, R-square는 0.9835로 나타났다.

헤미셀룰로스의 총 당은 1.0 M에서 18 시간 추출 하였을 시 84.45% 인 것을 제외하고, 약 25~46%의 범위로 나타났다. 이는 황재관 외 등(24)이 보고한 밀기울로부터 열처리를 하여 수용성 분획을 얻은 연구논문에서 raw 상태로의 총 당 함량이 32.4%인 것과 비교 시 2.5 M로 추출 한 헤미셀룰로스의 총 당 함량이 41~47%범위로 더 높게 나타났다. 하지만, 열처리를 가하여 처리한 시료내의 총 당 함량이 55~68% 인 것과 비교 시에는 1.0 M 18 시간을 제외하고는 총 당 함량이 낮은 것으로 나타났다. 그러나 알칼리 추출물에서 분리한 구름버섯의 총 당이 29.10~33.76%인 이현순 외 등(25)의 연구 보고와 비교 시 총 당 함량이 비교적 높았다.

NaOH의 농도가 총 당 함량에 미치는 영향을 보면 Fig. 6와 같이 1.0 M에서 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, NaOH 농도에 따라 헤미셀룰로오스 내의 총 당 함량이 매우 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났으며( $p < 0.001$ ), 0.5 M에서 추출한 헤미셀룰로오스 내의 총 당 함량이 가장 낮았다.

추출 시간이 총 당 함량에 미치는 영향은 Fig. 6과 같이 18 시간 추출 하였을 시 그 함량이 가장 높았고, 12 시간과 6 시간 추출하였을 시 가장 낮았다. 그리고 12 시간과 6 시간 구간에서의 총 당 함량은 유의성이 없는 것으로 나타났다. 즉, 12 시간과 18 시간 사이에 미강내의 당 성분이 추출 용매로의 활발하게 추출 되었고, 추출 수율의 변화와 유사하게 나타났다. 총 당 함량은 추출 시간의 변화에 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ).

Table 10. Effect of extraction condition on total sugar of hemicellulose from rice bran

Extraction conditions		Total sugar (%)
NaOH concentration (M)	Extractio time (hr)	
0.5	6	<sup>c</sup> 25.75±1.09 <sup>E1)</sup>
0.5	12	<sup>c</sup> 27.93±2.05 <sup>E</sup>
0.5	18	<sup>a</sup> 35.61±0.75 <sup>E</sup>
0.5	24	<sup>b</sup> 36.91±1.14 <sup>E</sup>
1.0	6	<sup>c</sup> 28.94±1.00 <sup>A</sup>
1.0	12	<sup>c</sup> 46.26±0.40 <sup>A</sup>
1.0	18	<sup>a</sup> 84.45±1.00 <sup>A</sup>
1.0	24	<sup>b</sup> 33.73±1.18 <sup>A</sup>
1.5	6	<sup>c</sup> 44.59±1.25 <sup>C</sup>
1.5	12	<sup>c</sup> 34.74±0.75 <sup>C</sup>
1.5	18	<sup>a</sup> 33.64±0.46 <sup>C</sup>
1.5	24	<sup>b</sup> 42.85±2.39 <sup>C</sup>
2.0	6	<sup>c</sup> 38.58±1.37 <sup>D</sup>
2.0	12	<sup>c</sup> 29.08±0.00 <sup>D</sup>
2.0	18	<sup>a</sup> 36.48±1.89 <sup>D</sup>
2.0	24	<sup>b</sup> 40.48±1.21 <sup>D</sup>
2.5	6	<sup>c</sup> 41.18±1.21 <sup>B</sup>
2.5	12	<sup>c</sup> 47.41±0.65 <sup>B</sup>
2.5	18	<sup>a</sup> 41.12±6.30 <sup>B</sup>
2.5	24	<sup>b</sup> 46.20±1.72 <sup>B</sup>

1)Mean of triplicates ± Std. Dev.

A–EDuncan’s multiple range test with NaOH conc.. The same letter is not significantly different (p<0.001).

a–cDuncan’s multiple range test with extraction time. The same letter is not significantly different(p<0.001).

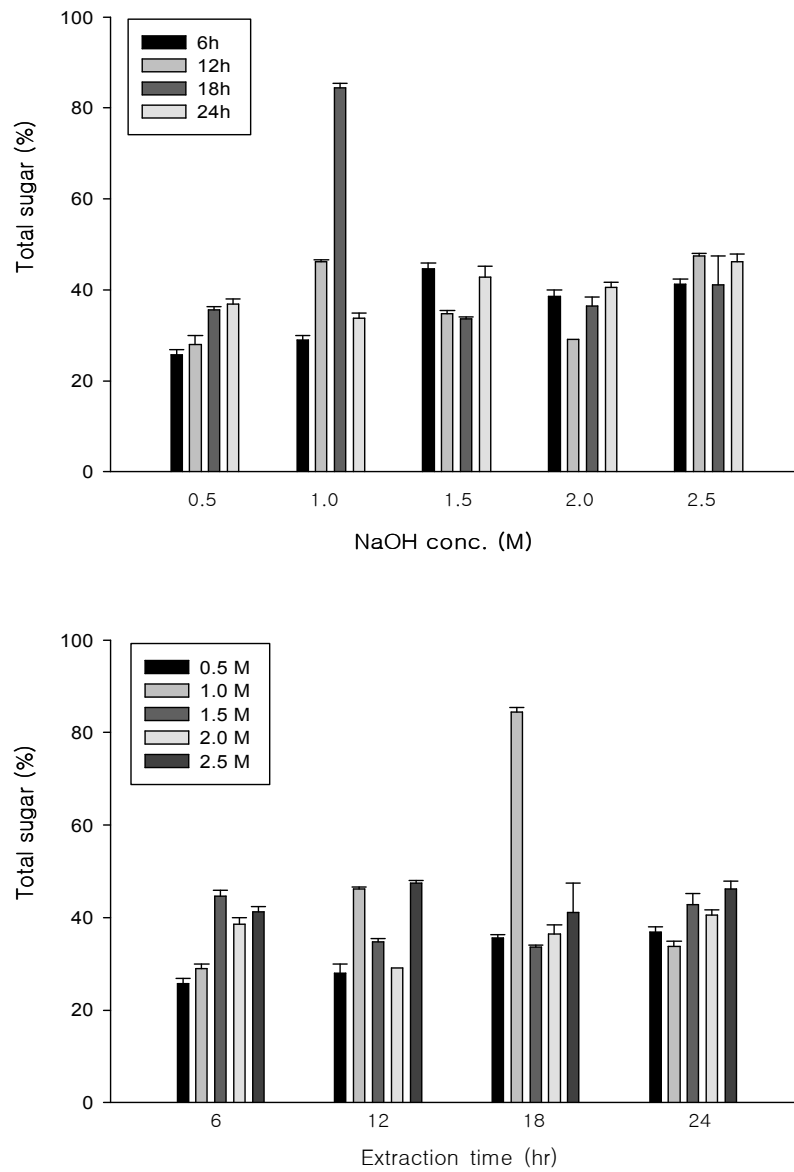


Fig. 6. Changes of total sugars depending on NaOH concentration (M) and extraction time (hr) in the extraction of hemicellulose from rice bran.

### (3) 헤미셀룰로오스 추출 조건 최적화

미강 식이섬유인 헤미셀룰로오스의 최적 추출 조건을 알아보기 위해 중심합성계획을 실시하였으며 본 실험에서 공정변수인 NaOH 농도와 추출 시간에 따른 헤미셀룰로오스 추출물의 추출 수율, Xyl/Ara ratio, 우론산, 베타 글루칸, 총 당 함량을 조사한 결과를 Table 11에 나타내었다. Table 12는 독립변수에 대한 종속변수(Yn)에 반응정도를 RSM program을 이용하여 2차 다항방정식으로 나타내었고, Table 13은 통계적 유의성을 나타내었다. 추출 수율, Xyl/Ara ratio, 우론산, 베타 글루칸, 총 당과 같은 기능성 성분이 추출 조건이 미치는 영향은 Fig. 7-11에 반응표면곡선으로 나타내었다.

#### (가) 반응표면분석

##### ① 추출 수율

추출 조건에 따른 추출 수율 함량 변화의 반응표면분석 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 NaOH 농도와 추출 시간 증가함에 따라 추출 수율이 증가하였다. 헤미셀룰로오스 추출에 있어 Table 14에 나타난 바와 같이 추출 시간보다 NaOH 농도가 더 유의하게 영향을 주는 것으로 나타났다. 그리고 추출 농도가 증가함에 따라 추출 수율이 비례하여 증가하였으나, 증가율은 추출 농도가 증가함에 따라 점차 둔화하였다. 추출 농도가 증가함에 따라 용매와 용질사이에 추출이 활발하게 진행되면서 헤미셀룰로오스의 추출수율이 증가하는 것으로 사료된다.

R-square값은 Table 12에 나타난 바와 같이 0.9153로 높은 상관관계를 보였고, 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점(Maximum point)이고 최대값은 14.34%로 예측되었고, 이때의 추출조건은 NaOH 농도 2.39 M, 추출시간은 23.50시간이었다(Table 13).

Table 11. Experimental data on total yield, Xyl/Ara ratio, uronic acid,  $\beta$ -glucan and total sugars of hemicellulose from rice bran under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Exp. No. <sup>1)</sup>	Total yield (%)	Xyl/Ara ratio	Uronic acid (%)	$\beta$ -glucan (%)	Total sugars (%)
1	14.36	0.96	13.11	0.33	40.48
2	10.66	0.98	16.06	0.40	29.09
3	9.46	1.01	12.57	0.31	33.73
4	7.09	1.10	12.25	0.49	46.26
5	9.41	0.95	12.25	0.37	32.01
6	10.74	0.97	13.67	0.36	27.96
7	13.24	0.97	17.36	0.28	41.12
8	5.69	1.08	18.60	0.32	35.61
9	9.81	0.93	10.96	0.35	49.35
10	7.90	1.00	10.48	0.49	44.60

1)The number of experimental conditions by central composite design

## ② Xyl/Ara ratio

추출 조건에 따른 미강내의 헤미셀룰로오스의 Xyl/Ara ratio의 변화는 Fig. 8와 같이 Xyl/Ara ratio는 NaOH 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 추출 시간은 Xyl/Ara ratio에 영향을 미치지 않았다. 본 연구에서 Xyl/Ara ratio은 0.93~1.10로 대부분의 xylose에는 arabinose가 1개 치환되어 있는 아라비노자일란 (arabinoxylan)이었다.

결과에 따른 Xyl/Ara ratio의 반응표면 회귀식은 Table 12와 같다. Xyl/Ara ratio의 회귀식에서 R-square값은 0.8626로 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점(Saddle point)으로 능선 분석한 결과, 이때의 추출조건은 NaOH 농도 0.64 M, 추출시간은 11.8 시간에서 최대값은 1.12로 예측되었다.



Table. 12. Estimated coefficients of second order response models for hemicellulose from Rice bran

	Total yield (%)	Xyl/Ara ratio	Uronic acid (%)	β-glucan (%)	Total sugars (%)
Intercept	+0.03142 9	+1.360000	+23.78285 7	+0.74571 4	+137.88857 1
X <sub>1</sub>	+4.42761 9	-0.245833	-19.89809 5	+0.02214 3	-60.009286
X <sub>2</sub>	+0.33146 8	-0.010347	+1.870714 3	-0.03343 3	-7.045496
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-0.33146 8	+0.017500	+10.11714 3	-0.07071 4	+8.076429
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.83142 9	+0.005833	-0.545833 7	+0.00916 7	+1.993333
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-0.01001 0	-0.00005208 3	-0.030506 2	+0.00034 2	+0.115878
R <sup>2</sup>	0.9153	0.8626	0.8884	0.9319	0.8815
Pr>F	0.0288	0.0715	0.0486	0.0189	0.0544

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{22}X_2^2$$

### ③ 우론산

추출 조건에 따른 미강으로부터의 헤미셀룰로오스내의 우론산 함량은 Table 11에 나타내었고, 그 결과에 따른 우론산 함량에 대한 반응표면 회귀식은 Table 12와 같다. 우론산은 Fig. 9의 반응표면에서 나타난 바와 같이 NaOH 농도가 0.5 M과 2.5 M부근에서 우론산 함량이 증가하였으며, 추출 시간이 증가함에 따라 우론산 함량이 증가하였다. 추출물의 회귀식에서 R-square값은 0.8884로 비교적 높은 상관성을 보였고, 5% 이내에서 유의하게 나타났다. 그리고 NaOH농도도 헤미셀룰로오스의 우론산 함량 변화에 매우 유의하게 영향을 주었다(p<0.1). 반응표면분석 결과 예측된 정상점은 안장점(saddle point)의 형태로 능선분석을 실시하여 본 결과, NaOH 농도 2.47 M, 추출 시간 15.32시간일 때 최대값 18.58%로 예측되었다.

### ④ 베타 글루칸

추출 조건에 따른 헤미셀룰로오스의 베타 글루칸 함량은 Table 11에 나타내었고, 그 결과에 따른 베타 글루칸 함량에 대한 반응표면 회귀식은 Table 12와 같다. 추출물의 회귀식에서 R-square값은 0.9319이고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다.

베타 글루칸 함량의 변화는 Fig. 11의 반응표면과 같이 NaOH 농도가 증가함에 따라 베타 글루칸 함량은 감소하였고, 추출 시간이 증가함에 따라 베타 글루칸 함량이 감소하였다. 예측된 정상점은 안장점(Saddle point) 형태로 능선분석을 실시하여 본 결과 NaOH 농도 1.15 M, 추출시간은 6.72 시간에서 최대값 0.53%로 예측되었다. 그리고 추출물의 베타 글루칸 함량은 NaOH 농도와 추출 시간 모두에 매우 유의하게 영향을 받고 있으며, 특히 추출 시간이 추출 농도와 비교 시 더 유의하게 영향을 주는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

#### ⑤ 총 당

추출 조건에 따른 미강으로부터의 헤미셀룰로오스내의 총 당 함량은 Table 11에 나타내었으며, 그 결과에 따른 총 당 함량에 대한 반응표면의 회귀식은 Table 12에 나타내었으며 R-square값은 0.8815이고 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. 총 당의 범위는 27.96~49.35%로 Table 14에서 보듯이 NaOH 농도가 총 당에 유의하게 영향을 미치는 것으로 확인 되었으며( $p < 0.1$ ), 추출 시간도 총 당 함량의 변화에도 유의하게 영향을 주었다( $p < 0.05$ ). 예측된 정상점은 안장점(Saddle point)으로 능선분석을 실시하여 본 결과 NaOH 농도 2.06 M, 추출시간은 27.91 시간에서 최대값은 56.88%로 예측되었다.

Table 13. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis

Response	X <sub>1</sub> (NaOH conc. M)	X <sub>2</sub> (Extraction time, hr)	Maximum	Morphology
Total yield (%)	2.39	23.5	14.34	maximum
Xyl/Ara ratio	0.64	11.8	1.12	saddle
Uronic acid (%)	2.47	15.32	18.58	saddle
β-glucan (%)	1.16	6.73	0.03	saddle
Total sugars (%)	2.06	27.91	56.88	saddle

1)NaOH concentration (M)

2)Extraction time (hr)

Table 14. Regression analysis for regression model of variables in extraction condition

Extraction conditions	F-Ratio	
	NaOH conc. (M)	Extraction time (hr)
Total yield	11.98**	2.71
Xyl/Ara ratio	6.85**	1.78
Uronic acid	5.24*	1.55
$\beta$ -glucan	4.30*	12.33**
Total sugars	4.77*	9.91**

\*Significant at 10% level; \*\*Significant at 5% level

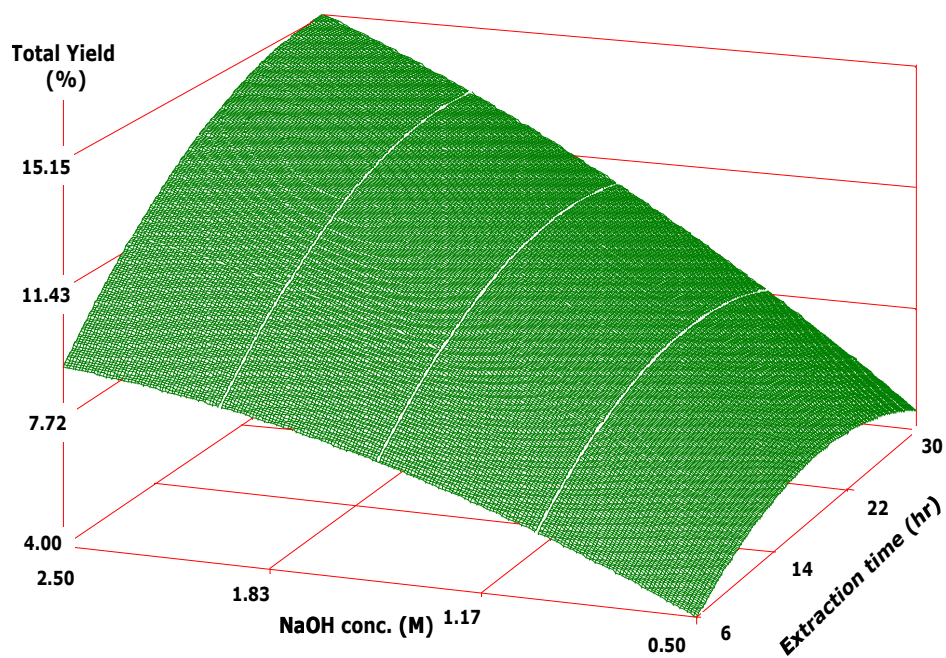


Fig. 7. Effects of extraction conditions on total yield.

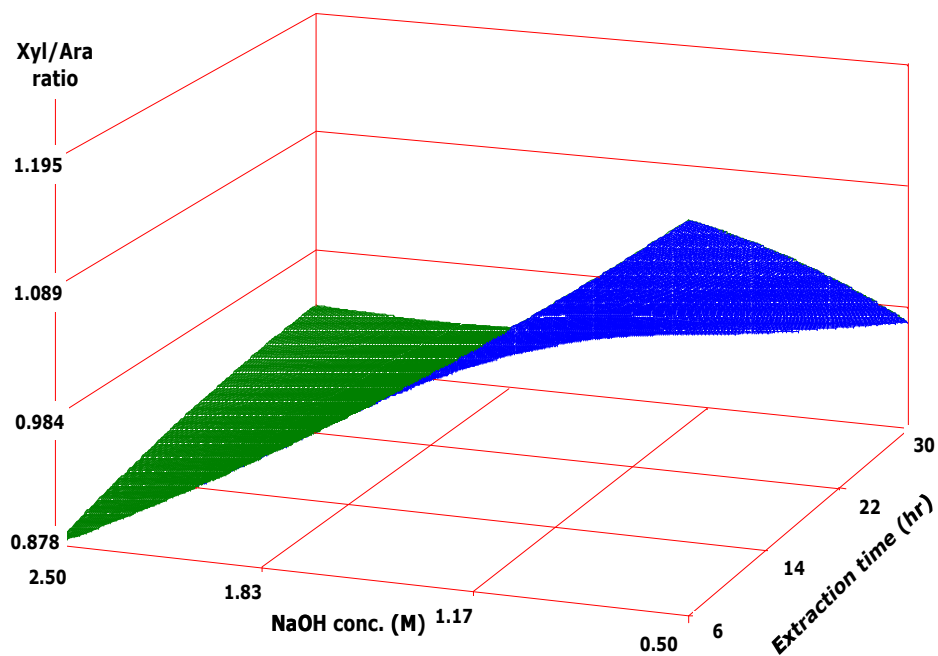


Fig. 8. Effects of extraction conditions on Xyl/Ara ratio.

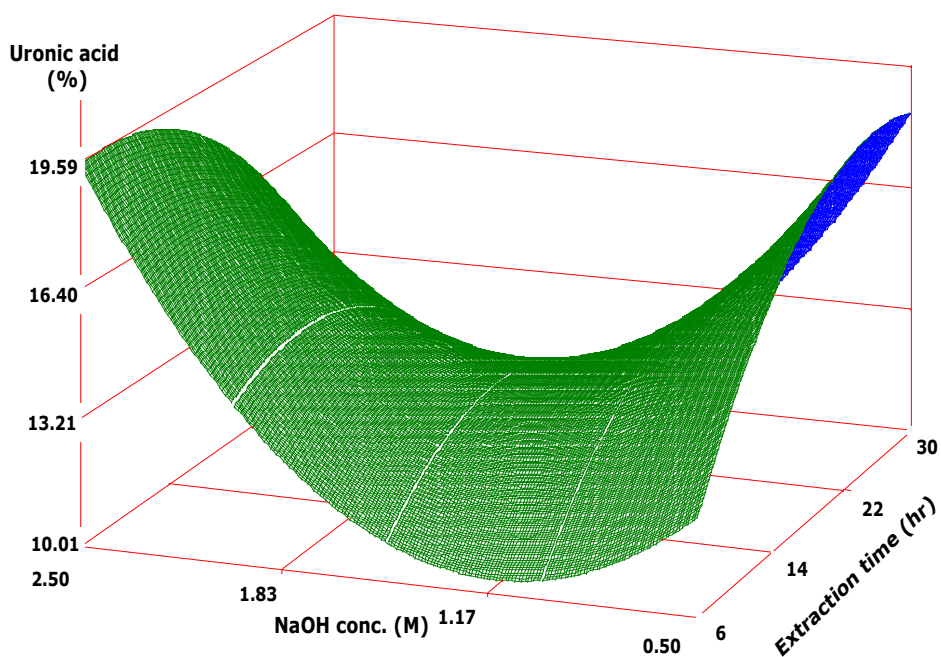


Fig. 9. Effects of extraction conditions on uronic acid.

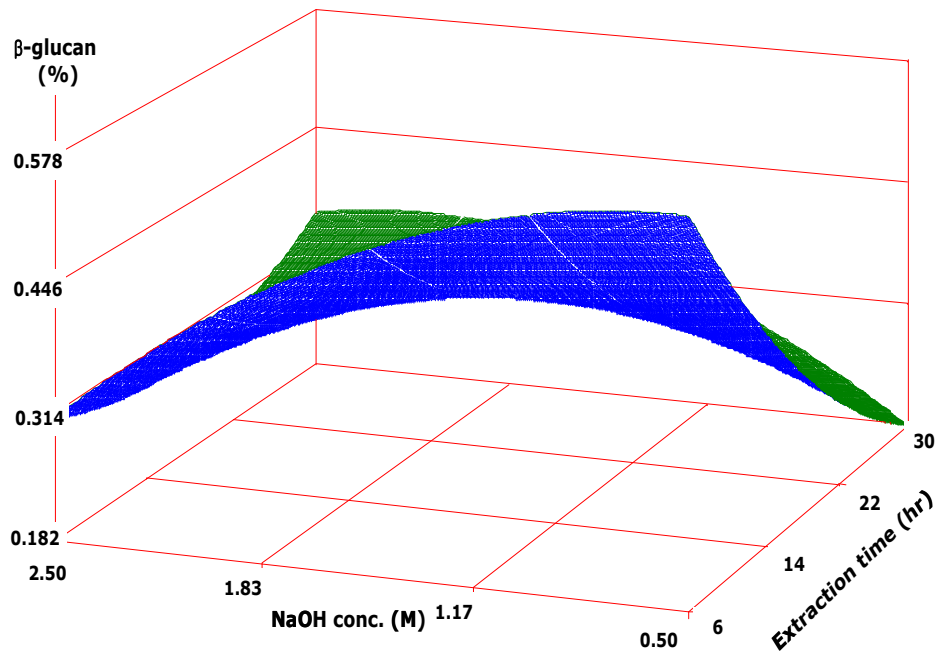


Fig. 10. Effects of extraction conditions on  $\beta$ -glucan.

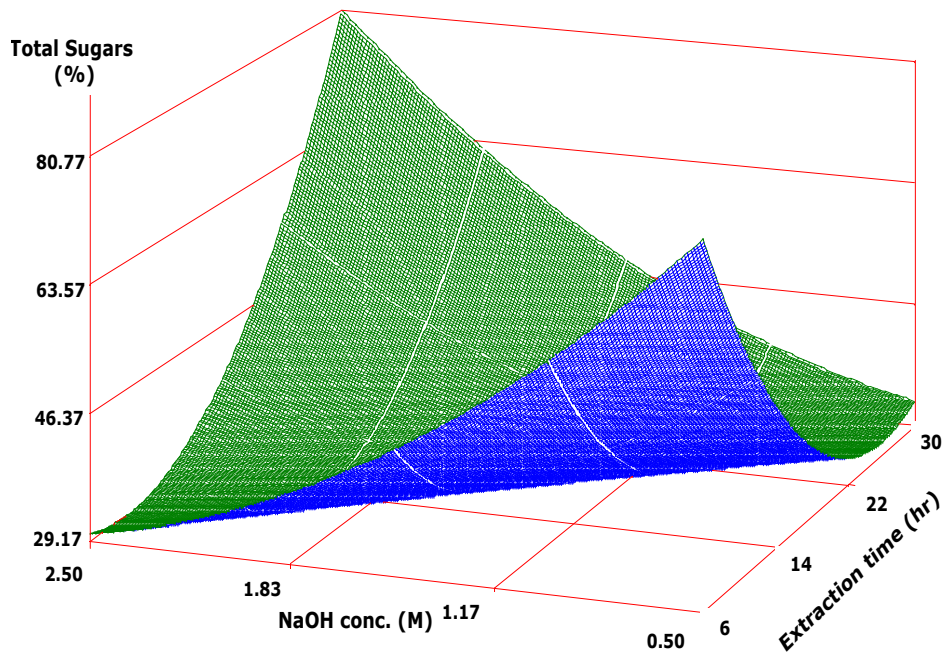


Fig. 11. Effects of extraction conditions on total sugars.

(나) 최적 추출 조건 예측 및 실증

NaOH를 추출 용매로 하여 진탕 추출기를 이용한 미강내의 헤미셀룰로오스 추출 시, NaOH 농도와 추출 시간을 추출 조건으로 하여 이로부터 추출 조건 최적화를 위해 추출물의 특성인 추출 수율( $Y_1$ ), Xyl/Ara ratio( $Y_2$ ), 우론산( $Y_3$ ), 베타 글루칸( $Y_4$ ), 총 당( $Y_5$ )의 contour map을 superimposing하여 Fig. 12.와 같이 최적 추출 조건 범위를 예측하였다. 이 때, 반응표면이 중복된 부분의 범위는 Table 14.에 나타난 바와 같이 NaOH 농도 2.4 ~ 2.5 M, 추출 시간 24 ~ 24.4 시간으로 나타났다.

최적 추출조건에 대한 예측값과 동일 조건에서 실측치와 추출 성분 특성을 확인하여 Table 15에 나타내었다. 예측된 최적 추출 조건에서 얻어진 헤미셀룰로오스 예측 추출 수율은 14.61%, 우론산 15.35%, 베타 글루칸 함량 0.31%, 총 당 54.71%이었다. 이에 대한 실측치는 추출 수율은 14.48%, 우론산 14.40%, 베타 글루칸 0.34%, 총 당 55.36%로 예측된 값과 실측값은 오차를 고려하여 거의 유사한 값을 나타내어 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있었다.

Table 14. The optimum range of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps for hemicellulose from rice bran

Extraction conditions	Optimum ranges	Optimum condition
NaOH conc. (M)	2.4 ~ 2.5	2.45
Extraction time (hr)	24 ~ 24.4	24.2

Table 15. Predicted and experimental values of response variables for hemicellulose from rice bran at a given conditions<sup>1)</sup> within the range of optimum shaking extraction conditions

Response variables	Predicted values	Experimental values
Total yield (%)	14.61	14.48±0.16
β-glucan (%)	0.31	0.34±0.004
Uronic acid(%)	15.35	14.40±0.34
Total sugars (%)	54.71	55.36±0.41

1) NaOH concentration 2.45 M, extraction time 24.2 hr.

2) Means of triplicate±SD.

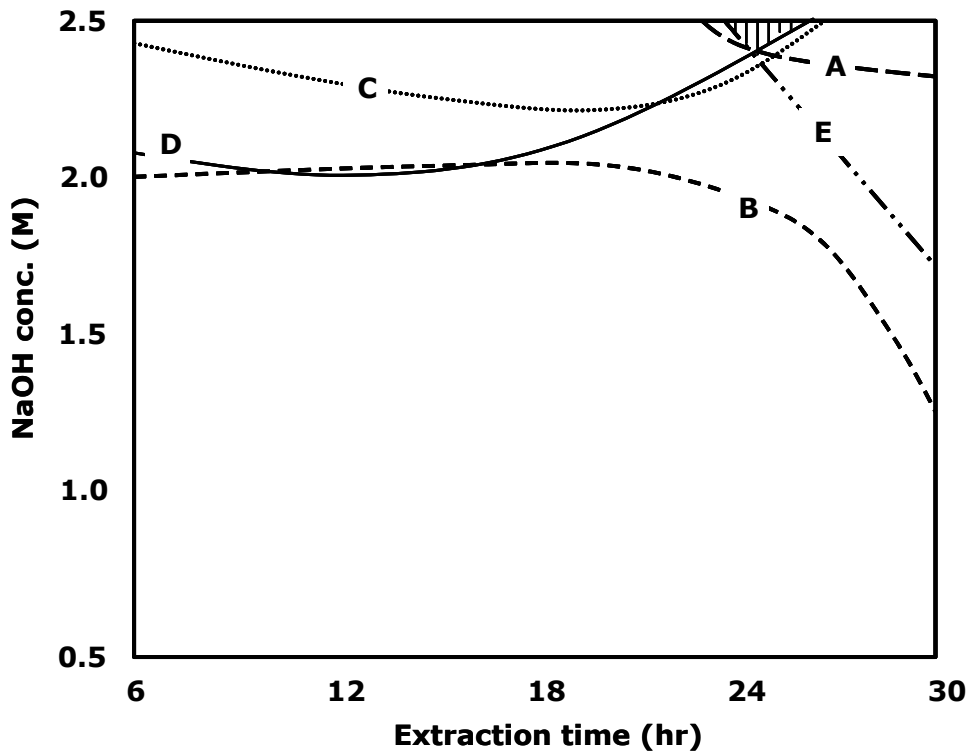


Fig. 12. Superimposing contour map of optimized conditions for total yield, Xyl/Ara ratio, uronic acid,  $\beta$ -glucan and total sugars of hemicellulose from rice bran as functions of NaOH concentration and extraction time by shaking extraction.

(A): Total yield, (B): Xyl/Ara ratio, (C): Uronic acid, (D):  $\beta$ -glucan, (E): Total sugars

#### (4) 미강 식이섬유 헤미셀룰로오스 최적 추출물의 구조적 특성

##### (가) 전계 방사 주사 전자현미경

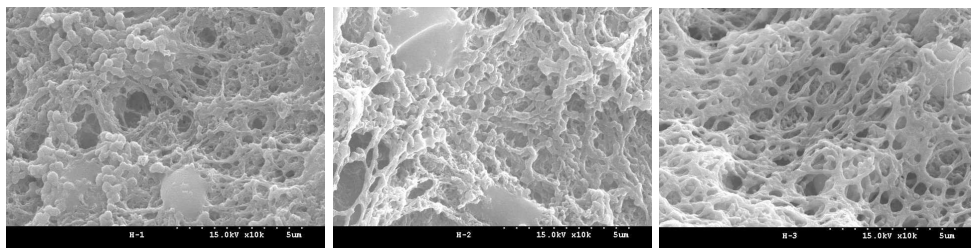
헤미셀룰로오스 최적 추출물의 구조적 특성을 조사하기 위해 최적 추출 조건에서 추출한 시료 3개의 표면을 10,000배, 50,000배, 100,000배로 확대하여 전계 방사 주사전자현미경으로 비교 관찰한 결과를 Fig. 13에 나타내었다.

추출물의 표면을 관찰한 결과, 10,000배로 관찰하였을 시에 전체적으로 불규칙한 망상 구조를 이루고 있었으며 그 사이에 작은 입자와 큰 덩어리의 형태인 입자들이 함께 공존하고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 50,000배로 확대 관찰 한 결과, 입자의 표면이 대체로 부드러우며 둥근 형태를 나타내고 있었고, 기공은 평균 1  $\mu\text{m}$  이하이며, 불규칙한 망상구조가 세부적으로 진행되는 것으로 확인 되었다. 10,000배 확

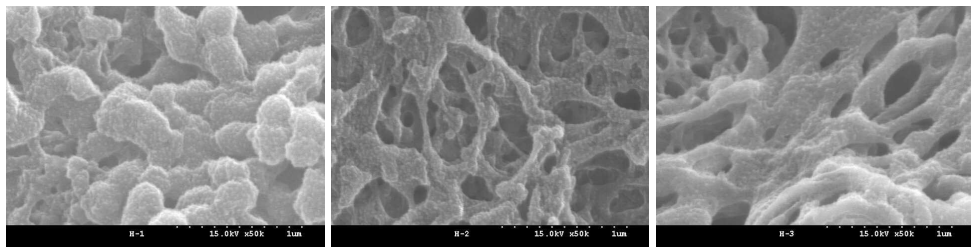
대 하였을때, 추출물의 표면에 작은 입자가 부착되어 있었고, 망상 구조 또한 관찰 가능하였다. 이 입자의 크기는 50 nm이하의 매우 작은 입자로 관찰 되었다.

Fig. 13. 에 나타난 바와 같이 헤미셀룰로오스 추출물에서 관찰 되고 있는 불규칙한 분자 구조가 다당류의 수화를 용이하게 만들어 물에 쉽게 용해 되도록 하면서 추출물의 수용성이 증가되었다. 그리고 분자의 가지구조 또는 이와 유사한 망상구조는 다당류 분자들이 서로 회합하는 것을 감소시키면서 다당류의 수용성을 증가시킨다(26). 따라서 본 연구에서 추출한 헤미셀룰로오스의 수용성이 높은 것도 Fig. 13에 나타난 바와 같이 불규칙한 망상 구조 때문인 것으로 사료된다.

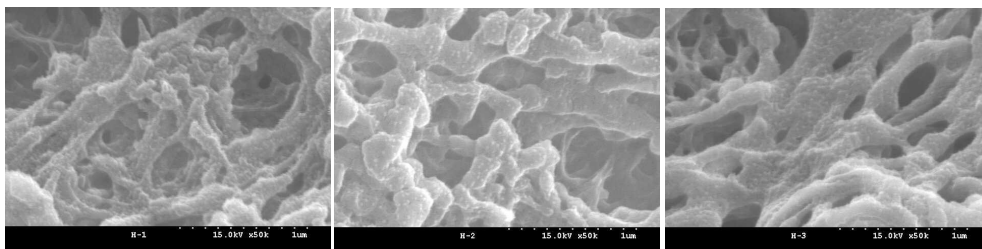
10,000 배



50,000 배



100,000 배



H-1

H-2

H-3

Fig. 13. FI-SEM pictures of the hemicellulose extracts from rice bran at the optimal condition.



(나) GPC에 의한 분자량 측정

GPC 분석 결과 추출물의 분자량은 Table 16에 나타난 바와 같다. 첫 번째 분획물(1st Peak)의 Mn은 141~169 kDa 이며, Mw은 235~240 kDa로 나타났다. 두 번째 분획물의 Mn은 7.8~8.9 kDa, Mw 8.0~9.4 kDa로 분자량이 낮은 것으로 관찰되었다. 이는 B.R. Cordenunsi et al.(27)의 보고에서 Nanicao CDTA의 분획물 3632 kDa, 192 kDa, 83 kDa인 것과 비교 시 분자량이 작은 것을 알 수 있었다. polydispersity는 천연 다당류의 경우 1.5~2.0의 범위인 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 추출한 헤미셀룰로오스의 고분자량의 분획물의 polydispersity는 1.3~1.7로 천연 다당류와의 유사한 값을 나타내었다. 그리고 저분자량 분획물의 polydispersity는 1.02~1.04로 약 1.0에 가까운 값을 나타내었다. 이는 J.L. Ren et al.(28)이 sugarcane bagasse로부터 추출한 헤미셀룰로오스의 polydispersity가 2.47~3.13인 것과 비교하였을 때 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 낮은 polydispersity는 추출 시에 특정한 fraction technique나 fraction precipitation을 사용하였을 시 1.0 정도를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 추출물의 polydispersity는 유사한 경향을 나타내었으며, 본 연구에서의 헤미셀룰로오스 추출 및 정제 공정은 추출 다당류의 polydispersity에 영향을 주는 것으로 확인된다.

Table 16. Molecular weight of optimal extracts of hemicellulose from rice bran

Sample	GPC characteristics					
	retention time (min)	M <sub>n</sub> (kDa)	M <sub>z</sub> (kDa)	M <sub>w</sub> (kDa)	Polydispersity	
Peak 1st	H-1	25.783	169.009	302.152	235.718	1.394704
	H-2	25.750	145.179	333.135	238.331	1.641633
	H-3	25.800	141.338	342.929	240.605	1.702336
Peak 2st	H-1	33.550	7.875	8.285	8.070	1.024788
	H-2	32.767	8.581	9.240	8.901	1.037273
	H-3	32.583	8.997	9.883	9.425	1.047537

Mn : number average molecular weight (Mn)

Mw : weight average molecular weight (Mw)

Mz : z-average molecular weight (Mz)

## 2. 미강함유 지용성 분획의 분리 및 추출

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험재료

미강은 2008년 8월 경상북도 김천 건양RPC(주)로부터 분쇄된 시료를 공급받았으며, 표준망체 No. 40(aperture 425  $\mu\text{m}$ )을 통과한 분말을 취하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### (2) 추출조건 설정을 위한 예비실험

추출조건을 예비 설정하기 위한 기초 실험으로서 시료에 대한 용매비(1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25)별로 추출하여 추출물의 생리활성 성분 함량을 확인하였다. 여기에서 결정된 시료에 대한 용매비에서 추출 온도( $20, 40, 60, 80, 100^{\circ}\text{C}$ )별로 추출하여 그 결과를 비교하였으며, 또한 위의 결정된 두 조건에서 추출 시간(240, 360, 480, 600, 720 min)에 대한 추출 함량을 비교하였다.

#### (3) 미강의 지용성 생리활성 물질 추출

##### (가) 추출 공정

본 연구에서 미강으로부터의 기능 성분 추출 방법은 Fig. 14.에 나타난 바와 같이 미강 10 g에 ethanol을 가하여 Table 17에 나타난 각각 변수별로 환류냉각기를 이용하여 추출한 후  $32^{\circ}\text{C}$ 에서 진공농축(Model 2007GV, H.S.Co., Deagu, Korea)시킨 추출물을 사용하였다.

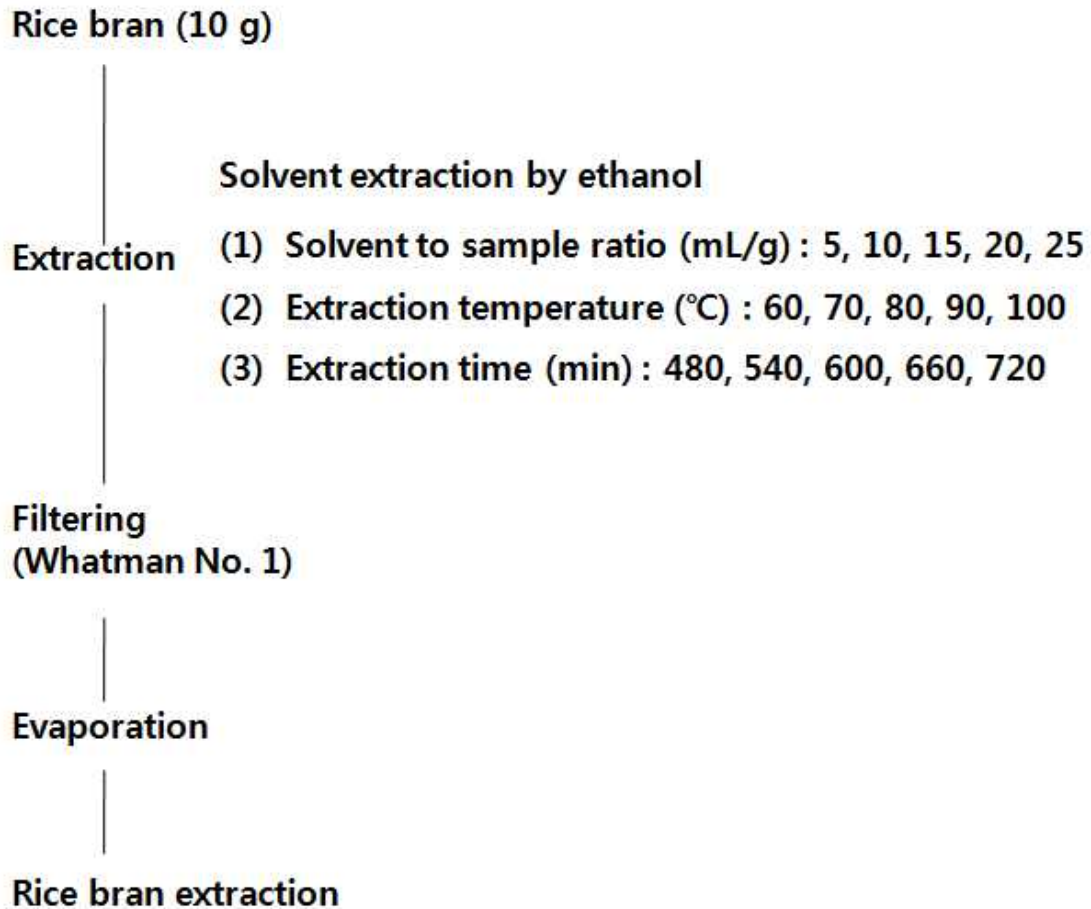


Fig. 14. Scheme for extraction process from rice bran.

(나) 미강의 지용성 생리활성물질 추출 공정 최적화 실험계획

미강의 기능성분의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 예비실험의 결과를 바탕으로 중심합성계획법(central composite design)을 사용하여(29), 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용한 회귀분석을 위해 SAS(statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였다. 추출공정의 독립변수( $X_n$ )는 시료에 따른 용매비( $X_1$ )와 추출 온도( $X_2$ ), 추출 시간( $X_3$ )에 대한 실험범위를 선정하여 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 Table 18과 같다. 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수( $Y_n$ )는 ferulic acid( $Y_1$ ),  $\gamma$ -oryzanol( $Y_2$ ), tocopherol( $Y_3$ ), tocotrienol( $Y_4$ ), octacosanol( $Y_5$ )를 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2$$

Table 17. Independent variables and their coded and actual values used for analysis

Symbol	Independent variable	Coded level				
		-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub>	Solvent to sample ratio (mL/g)	5	10	15	20	25
X <sub>2</sub>	Extraction temperature (°C)	60	70	80	90	100
X <sub>3</sub>	Extraction time (min)	480	540	600	660	720

Table 18. The central composite design for optimization of extraction conditions for fat soluble functional components from rice bran

Experiment No. <sup>1)</sup>	Extraction conditions		
	Solvent to sample ratio (mL/g)	Extraction temperature (°C)	Extraction time (min)
1	10(-1)	70(-1)	540(-1)
2	10(-1)	70(-1)	660(1)
3	10(-1)	90(1)	540(-1)
4	10(-1)	90(1)	660(1)
5	20(1)	70(-1)	540(-1)
6	20(1)	70(-1)	660(1)
7	20(1)	90(1)	540(-1)
8	20(1)	90(1)	660(1)
9	15(0)	80(0)	600(0)
10	15(0)	80(0)	600(0)
11	5(-2)	80(0)	600(0)
12	25(2)	80(0)	600(0)
13	15(0)	60(-2)	600(0)
14	15(0)	100(2)	600(0)
15	15(0)	80(0)	480(-2)
16	15(0)	80(0)	720(2)

1) The number of experimental conditions by central composite design.

(4) 미강 추출물의 이화학적 성분 분석

(가) Ferulic acid

미강 시료에서 추출한 추출물에 ethanol 100 mL로 정용화한 후 HPLC(Agilent 1100, Hewlett Packard, Germany)를 사용하여 분석을 하였다. Ferulic acid 함량 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 19에 나타낸 바와 같다. 이 때 표준 용액의 검량선은 Ferulic acid(Sigma Chemical Co., U.S.A)로 200 mg/mL stock solution을 만든 뒤 희석한 후 검량선을 작성하여 시료 중의 ferulic acid를 계산하였다.

(나)  $\gamma$ -oryzanol

추출된 rice bran oil 0.1 g에 ethanol 5 mL와 ascorbic acid 0.1 g을 첨가하여 혼합한 후 KOH 0.15 mL를 첨가하여 water bath에서 80°C로 10분간 비누화(saponification)시켰다. 그 후 냉각한 후 hexane 5 mL와 증류수 5 mL를 첨가하여 혼합하였다. 이 용액을 분액여두에 취하여 진탕한 후 두층으로 분리될 때까지 방치하였다. 분리된 상층액을 취하고 남은 시료에 hexane 5 mL를 재첨가하여 위 과정을 2차례 반복하였다. 수집한 상층액은 32°C에서 진공농축한 후 hexane 3 mL를 가하여 HPLC 분석을 하였다. 이 때의 HPLC 분석 조건은 Table 19에 나타내었다.

표준용액 조제는  $\gamma$ -oryzanol(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)을 사용하여 검량선을 작성한 후 각 함량을 계산하였다.

Table 19. HPLC condition for analysis of ferulic acid and  $\gamma$ -oryzanol components in rice bran extracts

Specification	Operation condition	
	Ferulic acid	$\gamma$ -Oryzanol
Column	Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5 $\mu$ m, Agilent Inc., U.S.A)	Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5 $\mu$ m, Agilent Inc., U.S.A)
Mobile phase	Acetonitrile/dichloromethane/ acetic acid(88:6:6) : methanol/ n-butyl alcohol/ water(90:2:8) =72:25	methanol/acetonitrile/dichloro methane/acetic acid=50:44:3:3
Detection	UV <sub>325nm</sub>	UV <sub>330nm</sub>
Flow rate	1 mL/min	1 mL/min
Injection volumn	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

(다)  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol

Tocopherol과 tocotrienol도 위와 같은 방법으로 비누화한 후 농축물을 isooctane 3 mL에 녹여 분석 시료로 사용하였다. Tocopherol과 tocotrienol 함량 분석은 보통 FID detector를 이용한 연구가 많은데 본 실험에서는 Kim등(30)의 분석 조건을 참고하여 UV detector를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 Table 20에 나타낸 바와 같다. 표준용액 조제는  $\alpha$ -tocopherol(Sigma Chemical Co., U.S.A),  $\gamma$ -tocotrienol(Sigma Chemical Co., U.S.A)을 사용하여 검량선을 작성한 후 각 함량을 계산하였다.

Table 20. HPLC condition for analysis of  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocotrienol components in rice bran extracts

Specification	Operation condition
Column	Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm L, 5 $\mu$ m, Agilent Inc., U.S.A)
Mobile phase	hexane : isopropanol(98:2)
Detection	UV <sub>290nm</sub>
Flow rate	1.6 mL/min
Injection volumn	20 $\mu$ L

(라) Octacosanol

미강 내 octacosanol 함량은 또한 추출물을 비누화한 후 농축물을 chloroform 3 mL에 녹여 GC 분석시료로 사용하였다. 분석 조건으로 column은 HP-5(30 m  $\times$  0.32mm  $\times$  0.25 $\mu$ m), carrier gas는 He을 사용하였다. Injector temperature는 250 $^{\circ}$ C에서 1분간 유지 후 2 $^{\circ}$ C/min의 속도로 300 $^{\circ}$ C까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. Flow rate는 2 mL/min, injection volume은 1  $\mu$ L로 하여 분석하였다. 표준용액 조제는 1-octacosanol(Sigma Chemical Co., U.S.A)으로 검량선을 작성한 후 함량을 계산하였다.

(5) 최적 추출 조건의 예측 및 실증시험

조건에 따른 각 추출물의 최적 추출조건을 예측하기 위하여 각 추출물의 기능성

분에 대하여 contour map을 이용하여 superimposing했을 때 중복되는 부분의 범위를 설정하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 최적점을 설정하여 최적조건으로 예측하고 각 회귀식에 대입한 후 그 예측된 최적값들에 대하여 검증하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 추출조건의 예비 설정

#### (가) 시료에 대한 용매비가 추출함량에 미치는 영향

미강으로부터 추출조건에 따른 미강의 지용성 생리활성 물질의 추출함량을 알아보기 위해 시료에 대한 용매비만 달리하고 추출온도는 80°C, 추출시간은 720 min으로 동일하게 추출하였고 그 결과를 Table 21에 나타내었다. Ferulic acid, oryzanol과 octacosanol 함량은 시료에 대한 용매비가 1: 15(w:v)일 때 각각 214.03 mg/100g, 510.60 mg/100g, 7.94 mg/100g으로 가장 높은 값을 나타내었으며, tocopherol과 tocotrienol은 시료에 대한 용매비가 증가할수록 추출함량도 증가하였다.

Table 21. Effect of solvent ratio condition on extraction from rice bran

Solvent ratio (mL/g)	Ferulic acid	$\gamma$ -Oryzanol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocotrienol	Octacosanol
5	126.48±13.68	150.90±7.25	8.34±0.38	5.23±0.20	3.43±0.19
10	194.75±7.34	193.42±17.08	9.12±0.57	9.99±0.25	6.48±0.13
15	214.03±13.65	510.60±14.78	10.24±0.04	13.83±0.77	7.94±0.25
20	149.99±7.81	423.88±11.50	10.89±0.26	15.96±0.78	5.13±0.09
25	69.43±4.39	475.57±89.96	10.94±0.11	19.26±0.88	4.33±0.18

1) Extraction was performed for 720 min at 80°C

2) Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.

(나) 추출온도가 추출함량에 미치는 영향

추출온도에 따른 미강의 추출물 함량은 Table 22에 나타난 바와 같다. 추출조건은 시료에 대한 용매비는 1:15(w:v), 추출시간은 720 min으로 고정하고 추출온도만 20~100℃까지 달리하여 실험하였다. Ferulic acid, tocopherol, tocotrienol과 octacosanol은 온도가 높아질수록 추출함량이 증가하였으며 80℃에서 348.39 mg/100g, 10.14 mg/100g, 16.13 mg/100g, 8.73 mg/100g으로 최대값을 나타내었다. 한편 oryzanol은 60℃에서 326.59 mg/100g으로 최대값을 나타내었는데 80℃에서 추출된 함량과 약 23 mg/100g 차이로 60℃와 80℃간의 함량차이는 적었다. 그러나 100℃에서는 모든 추출물의 함량이 급격히 감소하였다. 실험시 100℃에서는 추출용매가 시간의 경과에 따라 급격하게 감소하였는데 추출용매의 손실에 의해 추출함량 또한 감소한 것으로 사료된다.

(다) 추출시간이 추출함량에 미치는 영향

미강으로부터 추출시간의 변화에 따른 추출함량의 변화를 Table 23에 나타내었다. 이때 시료에 대한 용매비는 1:15(w:v), 추출온도는 80℃로 고정시켰다. 시간의 경과에 따라 추출물의 함량이 증가하는 경향을 보였다. Ferulic acid와 oryzanol의 경우 480 min에서 111.10 mg/100g과 356.45 mg/100g으로 최대값을 나타내었고 그 이상의 시간에서도 유사한 값을 나타내었다. Tocopherol과 tocotrienol은 600min에서 10.69 mg/100g과 20.40 mg/100g으로 최대값을 나타내었고, octacosanol의 경우 시간이 경과할수록 높은 값을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 최소 600 min이상 추출하여야 모든 추출물의 함량을 최대로 추출할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 22. Effect of extraction temperature condition on extraction from rice bran

Extraction Temperature (°C)	Ferulic acid	$\gamma$ -Oryzanol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocotrienol	Octacosanol
20	233.51±5.17	301.28±19.72	7.94±0.40	11.07±0.11	6.61±0.10
40	240.79±10.39	275.73±5.25	8.90±0.30	12.80±0.32	7.79±0.06
60	276.15±7.47	326.59±9.47	9.45±0.17	11.80±0.26	8.21±0.19
80	348.39±29.29	303.80±7.12	10.14±0.18	16.13±1.02	8.73±0.25
100	241.57±8.26	226.40±10.53	8.50±0.10	8.79±0.18	5.80±0.11

1) Extraction was performed for 720 min on a mixture composed of 10 g of sample and 150 mL of solvent.

2) Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.



Table 23. Effect of extraction time condition on extraction from rice bran

Extraction Time (min)	Ferulic acid	$\gamma$ -Oryzanol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocotrienol	Octacosanol
240	55.34±4.38	268.05±11.65	8.95±0.54	10.82±0.40	5.80±0.13
360	74.35±1.46	304.88±8.27	9.76±0.14	14.31±0.99	5.97±0.26
480	111.10±7.40	356.45±6.39	10.34±0.15	17.48±0.63	6.79±0.16
600	100.50±3.08	346.67±5.91	10.69±0.09	20.40±1.25	7.41±0.38
720	96.78±3.50	340.95±5.57	11.70±0.17	19.41±0.41	8.19±0.16

1) Extraction was performed for 80°C on a mixture composed of 10 g of sample and 150 mL of solvent.

2) Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.

## (2) 추출조건에 따른 미강의 지용성 생리활성 물질 특성

### (가) Ferulic acid

Ferulic acid 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.9557로 1%의 수준에서 유의성이 인정되었으며 예측된 회귀식은 Table 25와 같고 반응표면은 Fig. 15에 나타내었다. Devi와 Arumughan(32)의 ferulic acid 추출함량 결과와 비교하였을 때 본실험에서는 ferulic acid 함량결과는 Table 24와 같으며 Devi와 Arumughan(32)의 실험과 비교했을 때 본 실험의 ferulic acid 함량이 약 88-286 mg정도 적었다. Fig. 15에서 Ferulic acid 함량은 시료에 대한 용매비가 낮아질수록 시간이 길어질수록 증가하였고, 추출온도는 높아질수록 함량이 증가하다 감소하였다. 이는 ethanol의 끓는 점인 약 80°C까지는 함량이 높아지다가 그 이상으로 온도가 높아질수록 ferulic acid 함량이 감소하는 것을 알 수 있는데 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 함량이 감소하는 것으로 사료된다. Ferulic acid 함량은 시료에 대한 용매비와 온도에 유의적으로 영향을 받는 것을 알 수 있었다(Table 27). 예측된 정상점은 안장점 (saddle point)으로 이때의 추출조건은 시료에 대한 용매비 5.22 mL/g, 추출 온도 79.66°C, 추출 시간 575.24 min일 때 최대값 210.47 mg/100g이었다(Table 26).

Table 24. Experimental points of the central composite design and the experimental data of Rice bran under different conditions based on central composite design for response surface analysis

No.	Ferulic acid (mg/100g)	$\gamma$ -oryzanol (mg/100g)	$\alpha$ -tocopherol (mg/100g)	$\gamma$ -tocotrienol (mg/100g)	Octacosanol (mg/100g)
1	144.91±10.34	427.42±9.34	7.93±0.54	7.12±0.98	4.80±0.28
2	115.60±9.94	388.44±11.93	7.98±0.83	8.79±0.86	4.28±0.07
3	140.18±12.43	499.34±13.93	9.57±0.44	12.97±0.11	5.42±0.17
4	125.83±7.65	448.19±16.03	10.11±0.28	13.91±0.34	5.01±0.38
5	81.13±3.55	218.92±22.43	10.17±0.43	15.34±0.40	5.72±0.11
6	83.39±5.77	205.51±25.39	10.41±0.58	16.83±0.54	2.63±0.03
7	60.26±9.43	221.22±19.43	11.33±0.11	17.51±0.02	3.99±0.33
8	81.26±8.52	212.34±10.43	11.52±0.48	18.76±0.54	4.84±0.55
9	106.63±11.34	277.31±29.43	10.07±0.65	15.05±0.50	7.89±0.11
10	113.27±15.32	320.61±14.32	10.19±0.62	13.08±0.22	7.94±0.25
11	209.15±17.43	653.08±13.00	8.33±0.48	5.25±0.88	3.43±0.19
12	65.07±7.49	166.91±28.50	10.92±0.48	19.33±0.69	4.33±0.18
13	62.57±4.73	278.39±13.43	6.48±0.11	3.71±0.28	4.28±0.16
14	11.21±4.53	184.34±18.43	10.06±0.32	11.84±0.66	2.25±0.10
15	86.56±3.85	294.72±9.53	10.23±0.54	16.81±0.73	4.20±0.14
16	83.73±2.43	279.99±8.43	10.28±0.87	11.27±0.12	5.07±0.32

1) The number of experimental conditions by central composite design.

2) Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.

(나)  $\gamma$ -oryzanol

추출 조건에 따른 미강으로부터의  $\gamma$ -oryzanol 함량에 대한 회귀식은 Table 25에 나타내었으며  $R^2$ 는 0.9621이고 5% 이내의 유의성이 인정되었다.  $\gamma$ -oryzanol 함량의 반응표면은 Fig. 16에 나타내었다. Oryzanol 함량은 ferulic acid와 비슷한 경향을 보였다. 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 감소할수록 추출 함량은 증가하였으며 추출 온도가 높아질수록 함량은 증가하다 감소하였다. Xu등(32)의 실험에서 추출온도가 높아질수록 추출되는 oryzanol 함량이 증가한다고 하였는데 본 실험에서도 온도가 높아질수록 추출 함량이 조금씩 증가한 결과와 유사하였으며, 추출온도가 81.83°C보다 높아질 때 추출함량이 낮아지는데 이는 끓는점 이상으로 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 oryzanol 함량이 감소하는 것으로 사료된다. Britz등(33)의 실험에서는 종(種)별로 분류된 6가지 현미 시료를 ethanol을 사용하여 oryzanol 추출을 한 결과 japonica종은 220-383 mg/100g으로 나왔다. 본 실험에는 Table 24에서 나타낸 바와 같이 166.91-653.08 mg/100g으로 oryzanol 함량은 시료에 대한 용매비 가장 유의하게 영향을 미치는 것으로 확인되었다( $p < 0.01$ ). 본 실험의 결과가 Britz(33)등의 실험보다 조금 더 높음 함량을 나타내었는데 현미보다 미강에 oryzanol을 더 많이 함유하여 이와 같은 결과가 나온 것으로 사료된다. Lilitchan(34)등은 hexane, ethanol 및 isopropanol등 다양한 용매를 사용하여 oryzanol을 추출한 결과 ethanol과 isopropanol을 용매로 사용하였을 때 hexane을 비롯한 다른 용매보다 추출 함량이 높았으며 ethanol의 경우 379 mg/100g, isopropanol의 경우 374 mg/100g으로 함량이 유사하게 나왔다. Table 24에 나타낸 바와 같이 본 실험의 oryzanol 함량과 비교하였을 때 평균 409.5 mg/100g으로 Lilitchan(34)보다는 30 mg/100g 정도의 차이로 거의 비슷한 결과가 나올 수 있었다. 이는 ethanol도 short-chain alcohol 중 하나로 이러한 용매로 추출된 oil에 phosphatide와 비비누화물질이 좀 더 많이 함유되어 isopropanol과 유사한 결과가 나온 것으로 사료된다. Table 26에 나타낸 바와 같이 예측된 정상점은 안장점(saddle point)형태였으며 시료에 대한 용매비 5.10 mL/g, 추출온도 81.83°C, 추출시간 587.39 min에서 최대값 660.39 mg/100g을 나타냈다.

Table 25. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of rice bran.

Responses	The second order polynomial <sup>1)</sup>	$R^2$	significance
Ferulic acid (mg/100g)	$Y_1 = -937.909375 - 25.536000 X_1 + 25.328875 X_2$ $+ 1.060021 X_3 + 0.271600 X_1^2 - 0.071250 X_2 X_1$ $- 0.182650 X_2^2 + 0.027883 X_3 X_1 + 0.007021 X_3 X_2$ $- 0.001723 X_3^2$	0.9557	0.0021
$\gamma$ -Oryzanol (mg/100g)	$Y_2 = -537.698125 - 49.234250 X_1 + 32.292625 X_2$ $+ 0.522625 X_3 + 1.110350 X_1^2 - 0.306350 X_2 X_1$ $- 0.168988 X_2^2 + 0.028267 X_3 X_1 - 0.001592 X_3 X_2$ $- 0.000806 X_3^2$	0.9621	0.0013
$\alpha$ -tocopherol (mg/100g)	$Y_3 = -28.000579 + 0.652349 X_1 + 0.828351 X_2$ $- 0.015375 X_3 - 0.005036 X_1^2 - 0.003745 X_2 X_1$ $- 0.004651 X_2^2 - 0.00065179 X_3 X_1$ $+ 0.000090772 X_3 X_2 + 0.000008550 X_3^2$	0.9643	0.0011
$\gamma$ -tocotrienol (mg/100g)	$Y_4 = -142.204343 + 2.545818 X_1 + 3.090490 X_2$ $+ 0.011310 X_3 - 0.017733 X_1^2 - 0.017188 X_2 X_1$ $- 0.015724 X_2^2 + 0.000056476 X_3 X_1 - 0.000202 X_3$ $X_2 - 0.000001664 X_3^2$	0.9015	0.0196
Octacosanol (mg/100g)	$Y_5 = -122.646875 + 1.705375 X_1 + 1.372438 X_2$ $+ 0.212531 X_3 - 0.040350 X_1^2 - 0.002175 X_2 X_1$ $- 0.011625 X_2^2 - 0.000546 X_3 X_1 + 0.000844 X_3 X_2$ $- 0.000228 X_3^2$	0.8024	0.1190

$$1) Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{21} X_2 X_1 + b_{22} X_2^2 + b_{31} X_3 X_1 + b_{32} X_3 X_2 + b_{33} X_3^2$$

(다)  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol

미강의 추출조건에 따른  $\alpha$ -tocopherol 및  $\gamma$ -tocotrienol의 함량 결과는 Table 24에 나타낸 바와 같다. Table 24에 나타낸  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol 함량은 각각 6.48-11.52 mg/100g, 3.71-19.33 mg/100g으로  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol은 시료에 대한 용매비와 추출온도에 유의적으로 영향을 받았다(Table 27). Park(35)등의 벼 품종에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 함량 평가에서  $\alpha$ -tocopherol 함량 2.36-10.59 mg/100g,  $\gamma$ -tocotrienol 함량 14.11-33.44 mg/100g의 결과와 유사하였다. 본 실험에서는 tocopherol 및 tocotrienol의 이성체 중에서 함량비율이 가장 높은  $\alpha$ -tocopherol과  $\gamma$ -tocotrienol을 분석하여 비교해 본 바와 같이 유사한 결과가 나와 전체 함량도 이와 비슷한 경향으로 나타날것이라고 사료된다. 회귀식은 Table 25에 나타내었고 이에 대한 반응표면은 Fig. 3와 Fig. 4에 각각 나타내었다. 결과에 따른  $\alpha$ -tocopherol의  $R^2$ 값은 0.9643으로 5% 이내의 유의성이 인정되었고  $\gamma$ -tocotrienol의  $R^2$ 값은 0.9015이었다. Tocopherol과 tocotrienol의 반응표면분석은 유사한 경향을 보였는데 Fig. 17과 Fig. 18에 나타낸 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 증가할수록, 추출온도가 높아질수록 함량이 증가하였으나 추출시간은 함량에 크게 영향을 미치지 못했다. 한편, 추출온도가 100°C로 높아질수록 함량이 조금씩 줄어들었는데 이는 고온에서 추출용매의 손실에 따른 것으로 사료된다. 예측된 최적 조건은 Table 26에 나타낸 바와 같이  $\alpha$ -tocopherol은 시료에 대한 용매비 23.92 mL/g, 추출온도 84.96°C, 추출 시간 645.45min일 때 최대값 11.53 mg/100g으로  $\gamma$ -tocotrienol은 시료에 대한 용매비 24.77 mL/g, 추출온도 80.84°C, 추출시간 575.05min일 때 최대값 20.03 mg/100g으로 예측되었다.

Table 26. Predicted values of optimum condition for the maximized and minimized responses to variables by the ridge analysis by their response surface

Responses	Extraction condition			Estimated Responses	Morphology
	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup>		
Ferulic acid (mg/100g)	18.67	98.17	576.16	11.61(min)	Saddle
	5.22	79.66	575.24	210.47(max)	
γ-oryzanol (mg/100g)	21.68	94.88	598.57	129.79(min)	Saddle
	5.10	81.83	587.39	660.39(max)	
α-tocopherol (mg/100g)	10.39	62.26	600.31	6.19(min)	Saddle
	23.92	84.96	645.45	11.53(max)	
γ-ocotrienol (mg/100g)	9.17	63.76	602.20	1.50(min)	Maximum
	24.77	80.84	575.05	20.03(max)	
Octacosanol (mg/100g)	15.80	98.22	551.41	2.38(min)	Maximum
	15.02	78.71	590.80	7.75(max)	

1)X1:Solvent to sample ratio (mL/g)

2)X2: Extraction temperature (°C)

3)X3: Extraction time (min)

(라) Octacosanol

추출 조건에 따른 추출물의 octacosanol을 측정된 결과에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>값은 0.8024이고, Fig. 19에 반응표면 그래프로 나타내었다. 그리고 각 조건에 따라 추출된 octacosanol 함량을 Table 24에 나타내었다. 실험결과 미강에서 추출된 octacosanol 함량은 2.26-7.94 mg/100g이었다. 한편, Irmak등(36)의 실험에서는 유전자형이 다른 pasago 밀의 밀겨(wheat bran)에서 polycosanol을 추출하였는데, 그 중 octacosanol 함량은 1.7-4.4 mg/100g으로 미강의 octacosanol 함량이 밀겨보다 약 0.56-3.54 mg 더 많은 것을 알 수 있었다. Fig. 19에 나타낸 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 높아질수록 증가하다 감소하였고, 온도도 높아질수록 증가하다 감소하는 경향을 보였다. Table 27에서 보듯이 octacosanol 함량도 시료에 대한 용매비와 추출온도에 영향을 받았다(p<0.05). 또한, 추출시간도 octacosanol 함량에 비교적 영향을 미치는데 추출 시간이 길어질수록 함량이 증가하다 감소하는 경향을 보였는데 시료에 대한 용매비나 온도보다는 영향을 적게 받았다. 이와 같은

결과로 보아 Octacosanol의 추출의 경우 본 실험에서 설정한 변수를 모두 고려할 때 최대 함량을 추출 할 수 있는 것으로 사료된다. 반응표면 분석에 따라 예측된 정상점은 최대점(Maximum point)이고 최대값은 7.75 mg/100g으로 이때 추출조건은 시료에 대한 용매비 15.02 mL/g, 추출온도 78.71℃, 추출시간 590.80 min이었다 (Table 26).

Table 27. Regression analysis for regression model of variables in Extraction condition

Responses	F-Ratio		
	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup>
Ferulic acid (mg/100g)	19.75**	7.29*	1.53
γ-oryzanol (mg/100g)	34.70**	0.97	0.29
α-tocopherol	16.77**	22.13**	0.18
γ-tocotrienol	8.60*	4.84*	0.10
Octacosanol (mg/100g)	3.54*	5.14*	2.81

1)X<sub>1</sub>:Solvent to sample ratio (mL/g)

2)X<sub>2</sub>: Extraction temperature (°C)

3)X<sub>3</sub>: Extraction time (min)

\*Significant at 5% level; \*\*Significant at 1% level

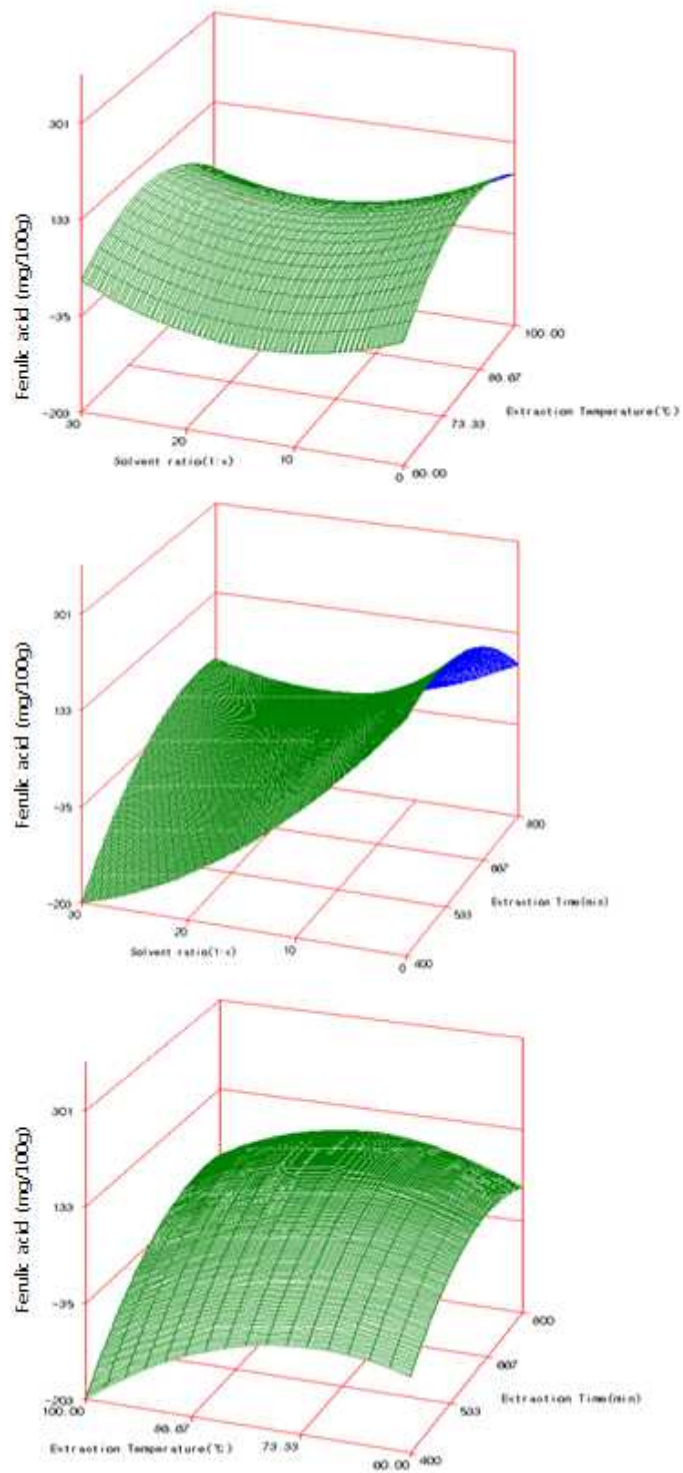


Fig. 15. Response surface for the effects of extraction conditions on ferulic acid (mg/100g)



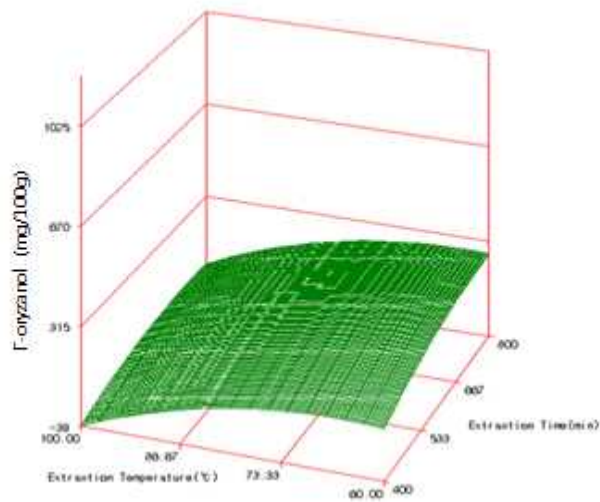
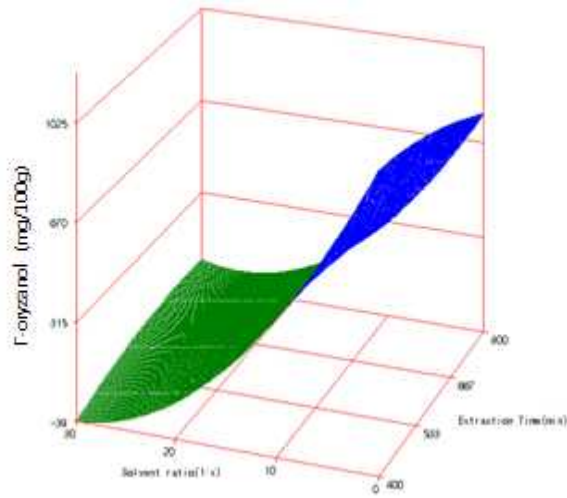
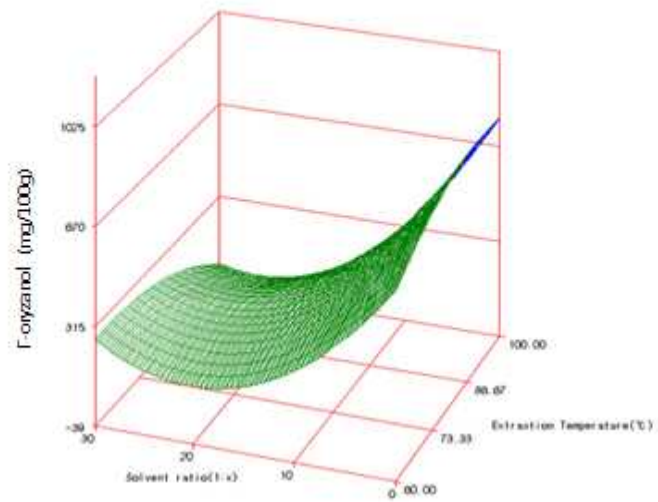


Fig. 16. Response surface for the effects of extraction conditions on  $\gamma$ -oryzanol (mg/100g)

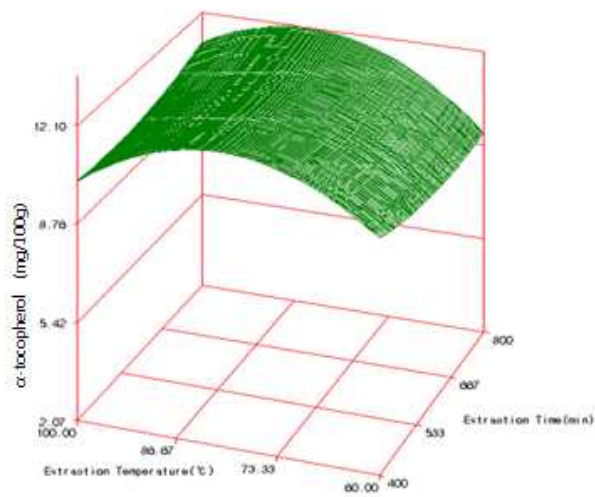
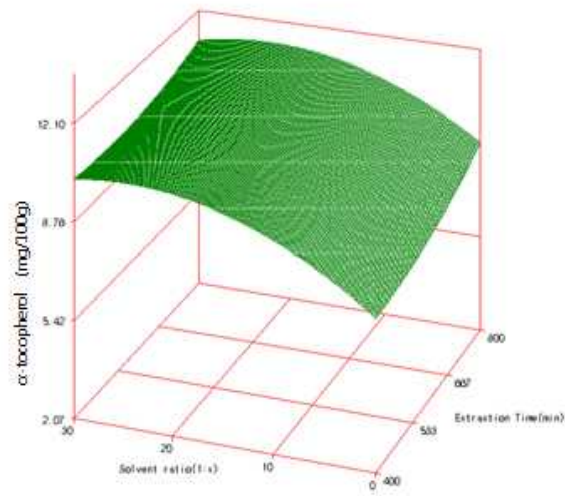
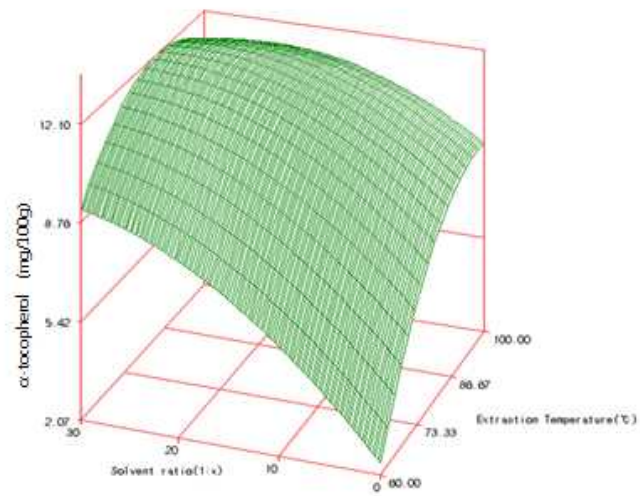


Fig. 17. Response surface for the effects of extraction conditions on  $\alpha$ -tocopherol (mg/100g)

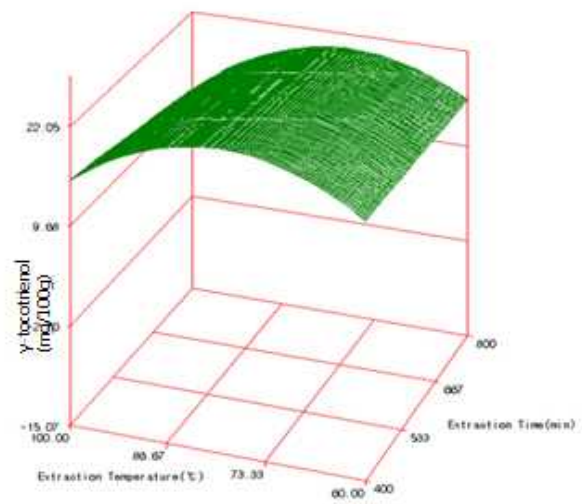
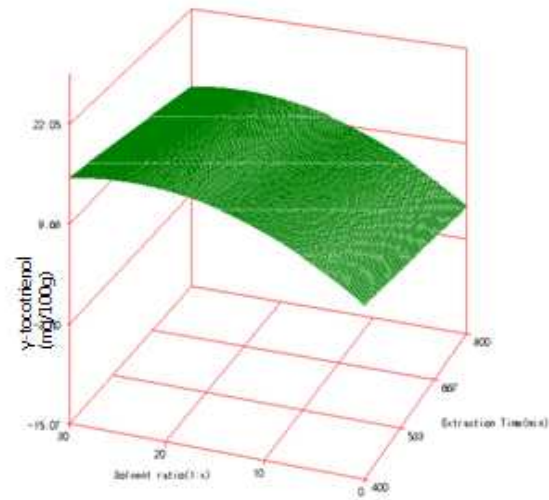
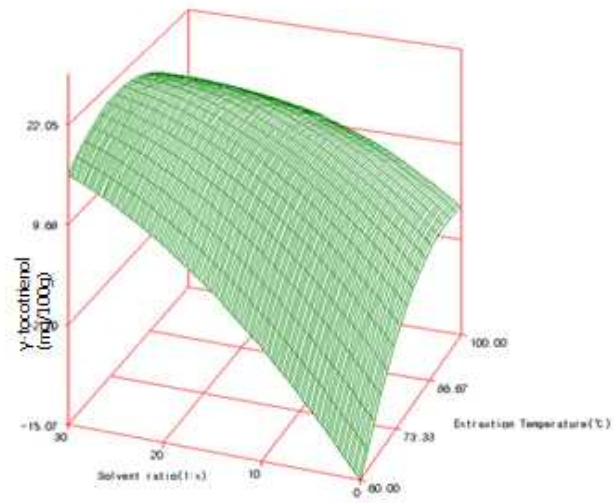


Fig. 18. Response surface for the effects of extraction conditions on  $\gamma$ -tocotrienol (mg/100g)

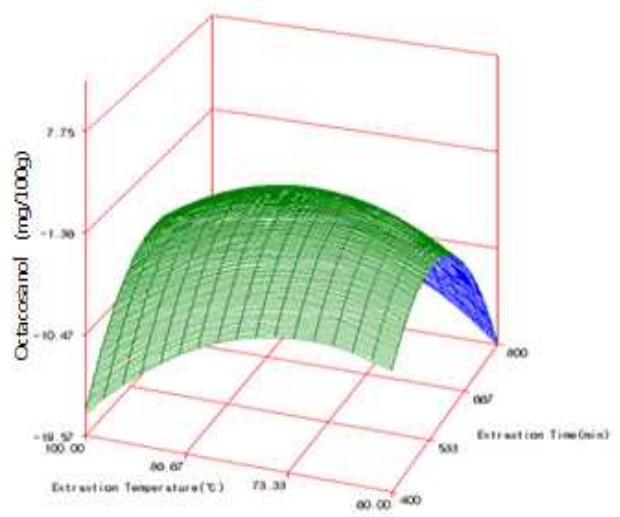
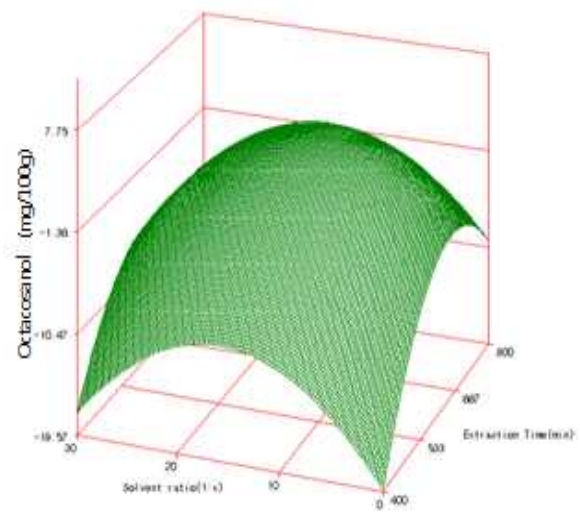
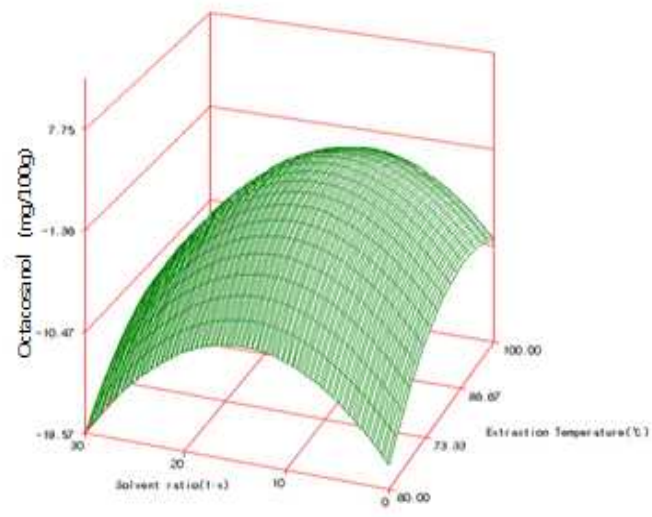


Fig. 19. Response surface for the effects of extraction conditions on octacosanol (mg/100g)

(3) 최적 추출조건의 예측 및 실증

미강의 지용성 생리활성물질의 최적 추출조건 설정을 위해 추출조건에 따른 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocotrienol과 octacosanol 함량의 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건의 범위를 예측하였다. Fig. 20에서 시료에 대한 용매비( $X_1$ )와 추출 온도( $X_2$ ), 시료에 대한 용매비( $X_1$ )와 추출시간( $X_3$ ), 추출온도( $X_2$ )와 추출시간( $X_3$ )의 조건에 따른 변화를 알아본 결과 최적조건은 어두운 부분에 나타난 바와 같다. 최적 추출조건은 7.85 mL/g, 81.5°C, 579 min이었으며 Table 28에 나타내었다. 이들을 각 회귀식에 대입하여 구한 예측값과 동일 조건에서 추출 실험을 한 결과를 Table 29에 나타내었는데 ferulic acid 185.42 mg/100g, oryzanol 530.43 mg/100g, tocopherol 8.62 mg/100g, tocotrienol 9.08 mg/100g, octacosanol 5.32 mg/100g으로 예측된 값과 실측값의 오차를 고려했을 때 거의 유사한 값을 나타내었다.

Table 28. Predicted optimum range and optimum values for Rice Bran extraction by response surface methodology

Condition	Optimum range	Optimum value
Solvent to sample ratio (mL/g)	5.3-10.4	7.85
Extraction temperature (°C)	79-84	81.5
Extraction time (min)	532-626	579

Table 29. predicted and observed values of the response variables at a given condition within the range of optimum extraction conditions

Response variables	Predicted value	Experimental value
Ferulic acid (mg/100g)	178.06	185.42±8.69 <sup>2)</sup>
$\gamma$ -oryzanol (mg/100g)	543.38	530.43±24.62
$\alpha$ -tocopherol (mg/100g)	8.98	8.62±0.42
$\gamma$ -tocotrienol (mg/100g)	9.82	9.08±0.89
Octacosanol (mg/100g)	5.47	5.32±1.04

1) Given conditions : 8 mL/g in solvent ratio, 82°C in temperature and 580 min in extraction time

2) Mean of triplicates  $\pm$  Std. Dev.

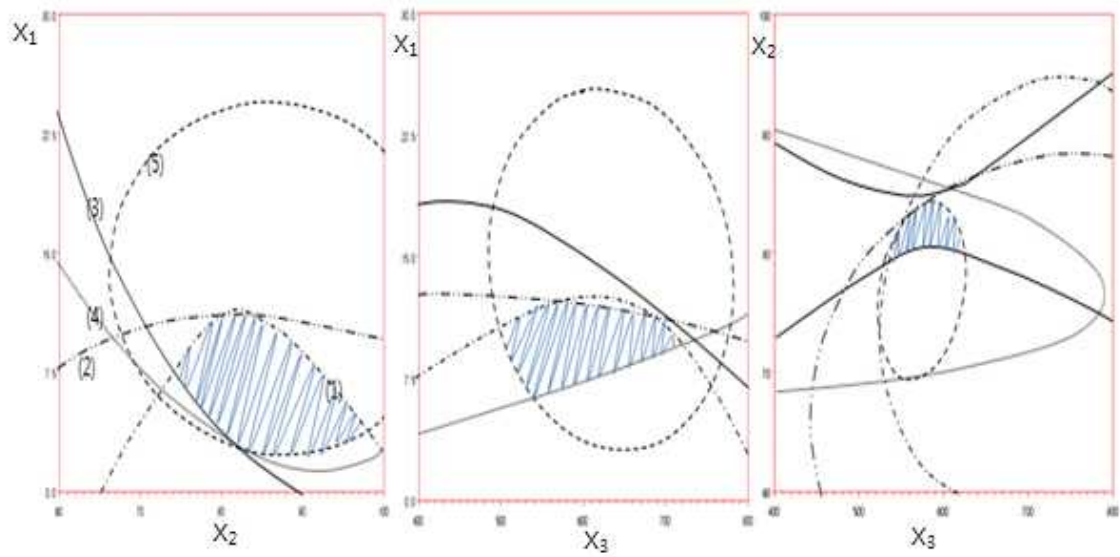


Fig. 20. Superimposing contour map of optimized conditions.

(1): Ferulic acid, (2):  $\gamma$ -oryzanol, (3):  $\alpha$ -tocopherol, (4):  $\gamma$ -tocotrienol, (5): Octacosanol

### 3. 추출물을 이용한 다양한 형태의 제품개발

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 재료

미강은 경상북도 김천 건양RPC(주)로부터 분쇄된 시료를 공급받아 표준망체 No. 40(aperture 425  $\mu$ m)을 통과한 분말과 추출용매를 1:10으로 조절하여 80°C에서 10시간 추출한 후 여과하여 사용하였다.

##### (2) 제형

미강추출물의 제형은 Park등(37)의 방법을 변형하여 제조하였다.

##### (가) 과립의 제조

과립은 미강 추출액을 24°Bx까지 농축시킨 농축액 115 mL에 옥수수전분 170g, 유당 100g, 포도당 50g을 혼합한 후 전분 paste를 가하여 만든 반죽을 20 mesh의 과립체를 사용한 과립기(BE230, Hanyoung, Korea)에 통과시켜, 체질한 다음 50°C에

서 2시간 건조하여 과립을 제조하였다.

(나) 타블렛의 제조

타블렛은 미강 과립 50 g에 활택제로 stearic magnesium 1.5 g을 첨가한 후, 타정기에 0.5 g씩을 넣어 유압프레스(MH-12, Masada Seisakusho Co. LTD., Japan)를 이용하여 250 kg/cm<sup>2</sup> 압력으로 1분간 성형하여 타블렛을 제조하였다.

(3) 이화학적 품질특성

(가) 수분함량

수분함량은 시료 0.5 g을 적외선 수분측정기(Moisture analyzer, HG53, Mettler Toledo, USA)를 이용하여 측정하였다.

(나) 당함량

당함량은 phenol-sulfuric acid법(38)에 따라 측정하였다. 시료 1mL에 5% phenol 1mL와 sulfuric acid 5 mL를 가하여 발색시킨 다음 20분간 방치 후 spectrophotometer(TU-1800 Human Crop. Co., Deagu, Korea)를 이용하여 470nm에서 측정하였고, 정량은 glucose 표준품을 사용하여 검량선을 작성하여 실시하였다.

(다) 미강의 지용성성분함량

지용성성분함량은 시료 0.5 g을 diethyl ether를 가하여 성분을 추출한 후 농축시킨 농축물 0.1 g에 ethanol 5 mL와 2N-ethanolic-KOH 0.15 mL를 가한 후 80℃에서 10분간 비누화를 시킨 후 냉각시켰다. n-Hexane 3 mL와 증류수 1 mL를 가한 후 강하게 진탕하였다. 분리된 상층액을 취하여 농축시킨 후 n-hexane 3 mL에 녹여 HPLC(Agilent 1100, Hewlett Packard, Germany) 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석 조건으로 column은 Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5 μm, Agilent Inc., U.S.A)을 사용하였고 mobile phase는 methanol/acetonitrile/dichloromethane/acetic acid=50:44:3:3가 되도록 하여 사용하였다. Flow rate는 1 mL/min, injection volume은 10 μL로 하여 330 nm에서 분석하였다. 표준용액 조제는 γ-oryzanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)을 사용하였고 검량선을 작성하여 시료 중의 γ-oryzanol을 계산하였다.

## (라) 색 도

색도는 시료 0.5 g을 증류수 20 mL에 녹인 후 색차계(CR-400, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L(lightness), a (green to red) 및 b (blue to yellow)값을 각각 측정하였다.

## (마) 수분결합지수

수분결합지수는 시료 0.5 g을 20°C의 증류수 20 mL에서 1분간 녹인 후 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 남은 고형분량을 측정하였다.

## (바) 흡습성

흡습성은 시료 0.5 g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣은 후 1시간 간격으로 흡습에 따른 무게 증가를 측정하여 나타내었다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 제형화

본 연구에서 미강의 기능성 성분을 효과적으로 섭취하기 위하여 과립, 타블렛 제품을 제조하였으며 제조된 미강 제품은 Fig. 21에 나타내었다. 과립 제품은 일반적으로 분말제품보다 물리적, 화학적으로 안정하다. 타블렛 제품은 과립을 작은 원판 모양으로 압축하여 만든 것으로 휴대, 복용, 보관이 용이하며 보통 내용물 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제 등을 첨가하여 과립으로 제조한 후 이것을 압축기를 이용하여 압축하여 성형한다.

### (2) 제형제품의 품질 특성

미강 추출물 함유 제품의 수분함량을 측정한 결과는 Fig. 22에 나타내었다. 수분함량은 과립>타블렛 순으로 그 값은 각각 1.40%, 0.40%로 나타났다.

미강 제품의 총당을 측정한 결과는 Fig. 23에 나타내었다. 총당함량은 각각 32.42 g%, 31.12 g%로 Park등(37)의 결과보다는 낮게 나왔지만 과립과 타블렛의 함량차이는 유사하게 나타났다.

미강 제품의 수분결합지수를 측정한 결과는 Fig. 24에 나타낸 바와 같다. 수분결합지수는 타블렛이 과립보다 높게 나타났으며 그 값은 과립 0.08 g/g, 타블렛이 0.41



g/g로 나타내었다. 타블렛의 수분결합지수가 약간 높은 것으로 나타났는데 이는 Park 등(37)의 보고에서와 같이 타블렛이 과립보다 수분결합지수가 약간 높게 나타난 것은 타블렛의 경우 제조시 성형압력을 가하여 조직이 치밀해져 봉해성이 낮기 때문인 것으로 사료된다.

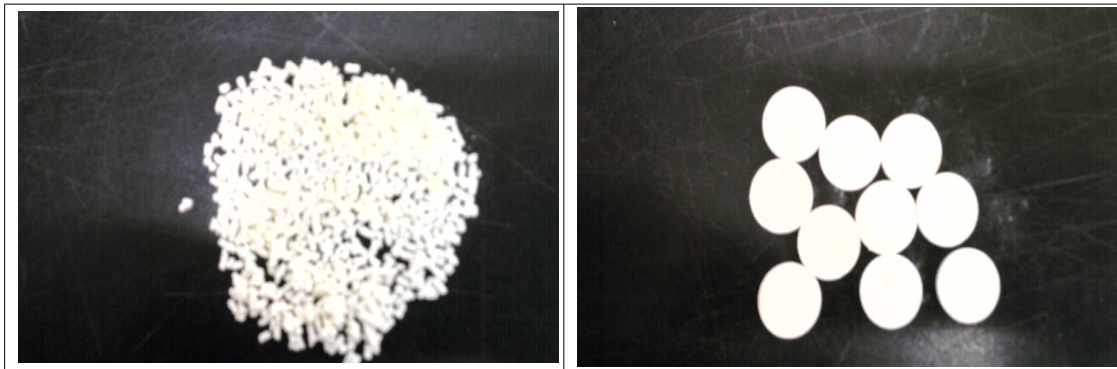


Fig. 21. Photographs of granule(left), tablet(right) made of rice bran extracts.

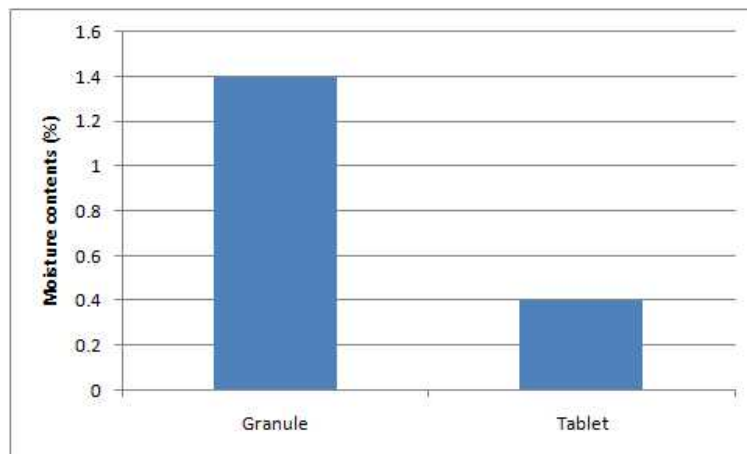


Fig. 22. Moisture contents of granule and tablet made of rice bran extract.

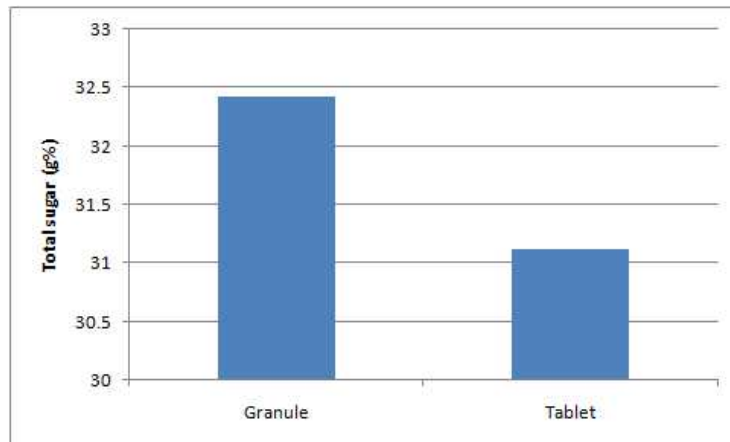


Fig. 23. Total sugar contents of granule and tablet made of rice bran extract.

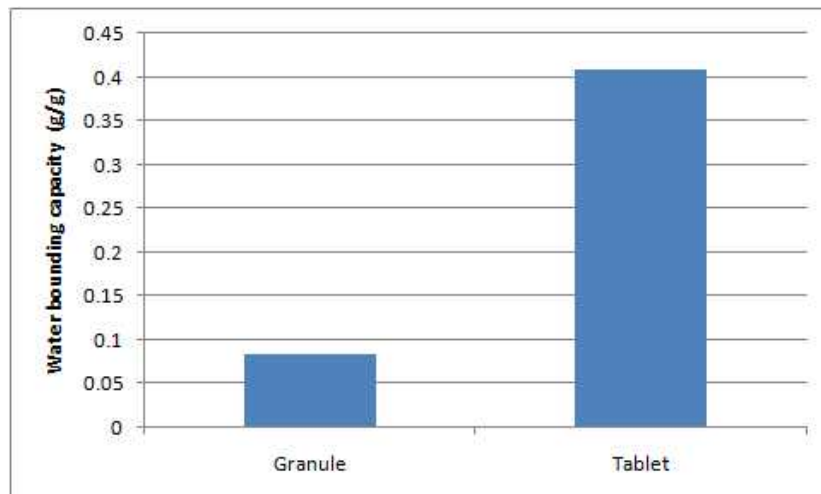


Fig. 24. Water bounding capacity of granule and tablet made rice bran extract.

(3) 색도

미강 추출물로 제형한 과립과 타블렛의 색도를 측정한 결과는 Table 30에 나타낸 바와 같다. L 값은 과립 85.54, 타블렛 92.68으로 비교적 밝게 나타났는데 이는 제조 시 흰색계열의 밝은색 부형제가 많이 사용되어 결과에도 영향을 준 것으로 사료된다. a값은 과립과 타블렛의 결과가 비교적 유사하게 나왔으며 황색도를 나타내는 b 값은 과립보다 타블렛이 낮게 나타났다.

Table 30. Color properties of granule and tablet made rice bran extract

	Color		
	L	a	b
Granule	85.54±0.40	-2.34±0.14	17.61±0.61
Tablet	92.68±0.17	-1.56±0.18	10.75±0.50

1) Mean of quintuplicate ± Std. Dev.

(4) 흡습성

미강 추출물의 제형 저장성을 알아보기 위하여 흡습성을 알아본 결과 타블렛보다 과립이 더 높은 흡습성을 나타내었다. 흡습성도 Park등(37)의 연구결과와 유사하였는데 과립과 타블렛 모두 1시간 경과 시 무게 증가가 가장 빠르게 나타났고 그 이후부터의 증가폭은 크지 않았다.

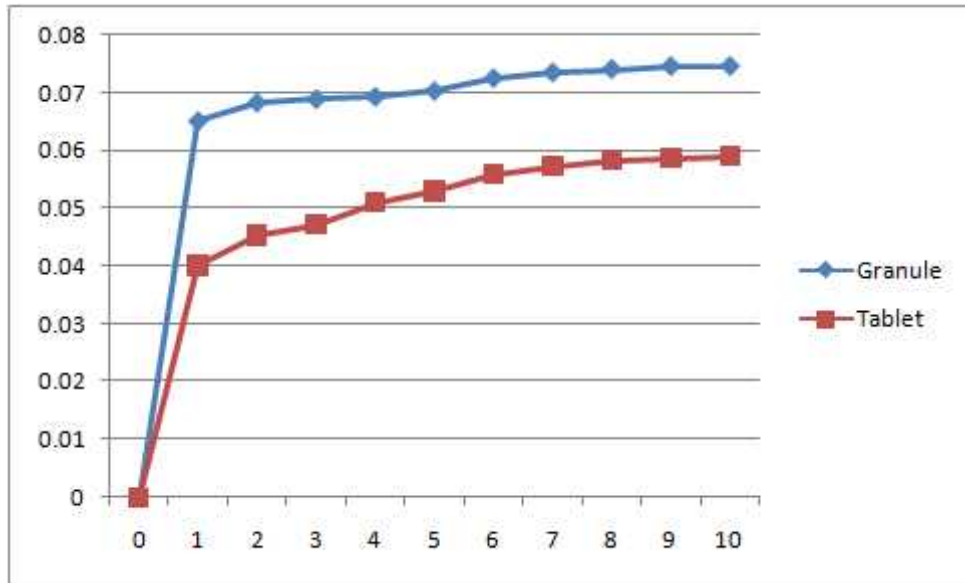


Fig. 25. Water uptake of granule and tablet made rice bran extract

## 제2절 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술 개발

### 1. 목재인자별 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색

지구상에서 가장 많은 양을 차지하며 매년 가장 많은 양의 바이오매스 자원을 생산하고 있는 목재 자원은 천연의 무공해 자원으로서 친환경적인 영속적인 소재로서 일반 재료로서의 이용은 물론, 분해하여 그 성분을 적절하게 이용함으로써 인간 생활에 유익한 재료로 활용하는 것은 매우 유의미한 일이다. 최근 에너지와 식량, 보건에 대한 전 세계적인 관심이 집중되는 가운데, 목질계 바이오매스 자원의 미래 개발 가능성에 대해 많은 연구들이 행해지고 있다. 최근 바이오매스 에너지원으로서 뿐만 아니라, 화학공업 원료나 의약품 및 식품첨가물로서 목재성분이 기능성 물질로서 탐색되는 과정에 있다고 할 수 있다. 이에 제 2세부 연구과제의 1년차 연구과제 내용은 목재로부터 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색으로서 먼저 실험에 제공할 수종을 선정하여 추출조건 설정과 제조법에 대하여 조사검토하고, 제조법에 대해서는 전처리 조건 탐색 및 이에 영향을 미치는 목재인자와 목재외 인자에 대해 검토하고, 이들 전처리재의 흡습능에 대하여 평가 고찰하였다. 목질계 자원은 주성분인 셀룰로오스 분자량이 81만에서 160만정도의 직쇄상 고분자이고 이들을 접합하고 있는 무정형 고분자체인 리그닌이 페닐 프로판의 기본골격 구조로서 이들을 강고하게 지탱해 주고 있어 저분자화시키는 방안이 이 과제의 핵심 키가 될 것으로 판단되며, 고온·고압상태에서의 열수추출 시스템을 고려할 수 있다. 이에 국산 활엽수종에서 대표적인 수종인 신갈나무 및 포플러를 이용하여 고온·고압상태에서 전처리하여 원료성분의 흡착성능을 평가하여 열수추출시에 잘 분리되어 나올 수 있는 기능성 원료물질의 결과에 대해 평가하였다. 그 결과, 고온·고압 상태 하에서의 수증기 처리가 목재성분의 분해에 매우 적절한 물리적 전처리 방법으로 판단되었으며, 수종별로 그 조건을 세부적으로 잡을 필요가 있을 것으로 판단되었다. 리그닌은 당 성분의 분리에 저해요인으로 작용하는바 탈리그닌 처리시에 흡습량 및 비표면적은 상대적으로 미 처리재에 비해 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 고온·고압의 수증기 상태하에서 기능성 원료소재의 제조 조건은 결정할 수 있었으며, 수종별로 약간씩 다양화 시킬 필요가 있으나, 기능성 발현을 평가할 수 있는 측면에서 이들 소재가 그 경쟁력이 충분히 있음을 알 수 있었고, 환경친화적인 생활대사성 질환 예방을 위한 기능성 물질의 개발은 매우 유용할 것으로 판단된다.

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발

(가) 수종선정 및 목재인자별 전처리 조건 탐색

목재나 수목의 이용형태의 하나로써 그 성분을 변환하는 것에 의해 소재와는 전혀 다른 기능을 가지게 하는 것이 가능하다. 목재를 펄프나 수지, 수목정유의 재료로서 이용하는 것은 그 단적인 예라고 할 수 있다. 이와같이 목재를 전처리 하는 방법으로 바이오테크놀러지가 이용되는 것은 극히 최근의 일이고, 미생물에 의한 생물학적 전처리법이 여러 방면에서 연구되고 있다. 그러나 공정상 미생물에 의한 리그닌의 제거 등에는 아직 한계가 있으며 해결해야 할 문제점이 많이 있다고 할 수 있다. 목재소재에서 바로 분해 추출이 불가능하므로 전처리 공정을 반드시 거쳐야 하며, 목재성분 추출을 위한 전처리 방법에는 미생물 등을 활용한 생물학적 방법 및 약품에 의한 화학적 처리 방법, 또는 열과 압력을 이용한 물리적 방법, 또는 화학적 방법과 물리적 방법을 변용한 복합적 방법을 생각할 수 있다. 이들 방법중에서 산업화에 의해 대량으로 단시간에 추출할 수 있는 유일한 방법은 물리적 전처리법이며, 에너지나 비용면에서는 불리하다고 할지라도 생산량과 제품생산에 이르는 비용절감에는 가장 효율적인 방법이라고 할 수 있겠다.

따라서 본 연구에서는 공시재료로 포플러와 신갈나무를 이용하였고, 물리적 전처리를 용이하게 하기 위해 일정크기의 chip으로 조제하였다. 원료목재 칩은 기건상태로서, 전처리 조건은 다양한 온도와 압력상태에서 실시하였다.

### 목재의 주성분 및 함량

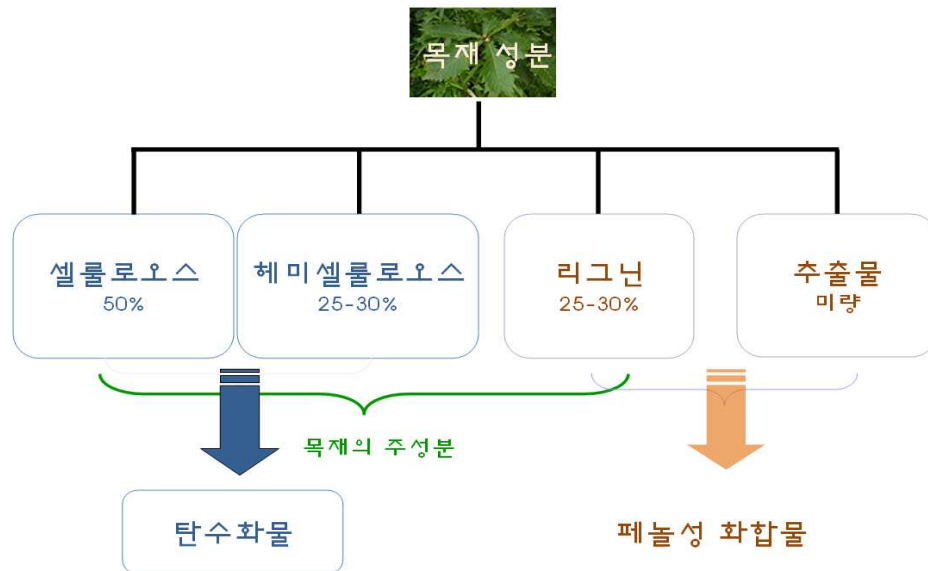


Fig. 26. 목재의 주성분 및 함량

## (나) 목재로부터 기능성물질 분리를 위한 추출기술 개발

다양한 온도 및 압력조건에서 기건상태의 목재 칩을 전처리하여 기능성 물질 추출을 위한 원재료로서 사용하였다. 목재는 다공질의 흡습성 소재로서 수분에 의해 팽윤하며 열에 의해 열팽창하는 열적 성질을 가지고 있다. 세포벽속에 포화된 섬유포화점 상태의 수분은 목재성분의 열연화에 도움을 주며 고압의 수증기처리에 의해 분자 유동성이 커진 상태에서 전처리하게 되면 목재섬유는 쉽게 물리적 파괴를 일으키게 된다. 이 상태의 전처리한 목재소재를 일반목분 및 탈리그닌 처리한 목분들과 비교하여 물리적 특성을 조사하여 효율적인 전처리 조건을 탐색하였다.

## (다) 목재내외 인자에 따른 전처리재의 물리적 특성 조사

다양한 조건에서 처리한 전처리 목재의 목분과 미처리 목분을 시료로 대비시켜 목재로부터 추출가능한 표면적의 양 및 흡착평형 함수율을 측정하여 효율적인 전처리방법이 어떤 것인지에 대하여 그 특성을 조사하였다. 평형함수율은 전건법에 의해서 산출하였으며, 상대수증기압 0.05~0.35범위에서 단위 질량당 흡착량으로서 BET법에 의거하여 단분자층 흡착량 및 비표면적을 산출하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 수증선정 및 목재인자별 전처리 조건 탐색

목재는 침엽수재와 활엽수재로 구분되며 가도관이 대부분의 구성요소로 된 소나무와 같은 침엽수재는 수지구를 가지고 있어 상해를 입으면 자체 치유능력을 발휘하여 수지를 뿜어내게 된다. 이 수지는 수증기 증류법에 의해 추출할 수 있는데, 그 추출물을 수목정유 또는 에센셜 오일이라 하며 약 3% 수준으로 얻어진다고 알려져 있다. 이 침엽수재 수목정유는 항균성이나 해충기피효과, 아토피 등에 효능이 알려져 있고 피톤치드라는 이름으로 널리 통용되고 있다. 그러나 유익한 것 같아 보여도 사람이 식용으로 취할 수는 없는 물질이기 때문에, 본 연구의 재료로서는 활엽수를 선택해야 하며, 일반적으로 항균성이 있다고 알려진 국산 주요 활엽수 중의 하나인 신갈나무와 속성수로서 과거 신탄림으로 다량 식재한 포플러를 공시재료로 선정하였다. 일반적으로 목질계 물질의 전처리방법에는 화학적인 방법, 생물학적인 방법, 물리적인 방법이 있으며, 처리시간과 효율성 측면에서 전처리 방법에 따른 장단점이 있다. 고분자체인 목재의 전처리법으로는 시간적인 효율성과 에너지 소비 측면, 환경적인 영향 측면에서 수증기 처리법의 물리적 방법을 선택하여 목재를 전처리하였다. 따라서 본 연구에서는 고분자소재인 임산자원 목재의 전처리 방법으로

고온·고압상태에서 수증기로 처리하는 방법을 선택하였으며, 이 방법은 목질계 소재의 전처리법으로서 가장 효율적인 방법 중의 하나라고 널리 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 고온·고압 처리장치는 현재 농업용자재를 생산하는 산업체에서 보유중인 장치를 사용하였으며, 그 장치의 사진을 Fig. 29에 나타내었다. 원료의 최적 처리조건에서 우선 검토 되어야 할 사항은 1회 처리량이며, 처리 조건에 따른 처리 수율 및 과쇄상태를 육안적으로 검토해야 할 필요성이 있다. 전처리 조건은 수증기압을 25기압 및 30기압, 처리시간을 3분, 6분, 9분간으로 조정하여 실시하는 것이 경험상 적절할 것으로 판단되어 물리적 전처리를 실시하였다. 본 연구에서 사용된 전처리장치의 1회 최대 처리량은 약 15kg으로서 처리 수율은 약 97%로 나타났다. 처리후 약 3%의 손실은 처리공정상 완전하게 100% 회수하기는 어려웠으며, 이것은 전처리과정 동안 휘발성분 등이 열에 의해 소실되었기 때문으로 생각되어졌다. 본 연구에서 행해진 원료소재의 육안적인 사진을 Fig. 27, 28, 29에 각각 나타내었다.



Fig. 27. 활엽수 목재 원료 칩



Fig. 28. 칩의 크기



Fig. 29. 수증기 처리 시스템

## (2) 목재로부터 기능성물질 분리를 위한 추출기술 개발

일반적으로 목재실질부인 세포벽에서 우리가 활용하고자 하는 유용물질 분리를 위해서는 적당한 물리적 전처리 조건에서 수증기 처리하고, 화학적 처리법 등에 의해 추출하는 것이 수순으로 생각되고 있다. 본 연구과제에서 채택한 수증기 처리법은 20세기 초반에 Mason이 발견한 방법으로서 극히 간단한 고압수증기 처리에 의해 목재 실질부간의 분자 유동성을 극대화시키고, 고분자인 셀룰로오스와 리그닌 성분이 저분자화되어 화학약품을 사용하지 않아도 열수에 쉽게 추출되는 것을 확인하였다. 본 수증기 처리조건에서는 압력을 25기압과 30기압, 처리시간을 3분, 6분, 9분간 각각 처리하였으며, 수증기 전처리후 열수에 의해 쉽게 추출되며, 필터링하여 정제 과정을 거치고 농축화시킴으로서 기능성 식품 첨가물 제제로서 활용가능함을 추정할 수 있었다. 다만 기능성을 발현하는가의 문제는 본 연구년도의 목표와는 별개의 문제이며 차후 미강재료와 복합화에 의해 동물실험 등을 거쳐 식품첨가물로서 기능성을 탐색해야 할 것으로 판단되어진다. 전처리 목재의 물리적 특성을 검토하면 최



적의 조건을 알 수 있지만, 본 연구결과 25기압에서 6분 또는 9분간 수증기 처리함으로써 실험에 제공된 크기의 원료칩 상태에서는 최적의 전처리 조건임을 알 수 있었다. .

### (3) 전처리 목재의 물리적 특성 조사

#### (가) 수분흡착 실험에 의한 평형 흡수율의 변화

포화염 수용액을 이용하여 데시케이터법에 의거하여 흡착 평형흡수율을 측정하였다. 포화염수용액으로 흡습실험은  $25 \pm 0.3^\circ\text{C}$  항온상태에서 상대습도 11%에서 95%까지 순차적으로 실시하였고, 각각의 상대습도 조건에서 흡습량을 측정하였다. 흡습량은 각 시료를 칭량병에 넣은 상태에서 신속하게 0.1mg 정밀도의 전자저울로 측정함으로써 산출하였다. 흡착평형에 이르기까지는  $25^\circ\text{C}$  항온상태에서 약 170여 시간이 걸렸으며, Fig 30과 같이 수분 흡습 경과 곡선이 각 상대습도에 따라 포물선적인 증가분포를 나타내었다. 상대습도가 낮은 시료가 상대적으로 높은 상대습도상태보다 흡착 평형에 도달하는 시간이 빨랐으며, 흡습속도는 고 상대습도일수록 빠른 경향을 나타내었다.

Fig. 31에는 고온·고압하에서의 수증기 전처리에 의한 포플러재의 시료에 대한 흡착 평형흡수율의 값을 전처리하지 않은 소재와 비교하여 흡착등온선을 도시하였다. 목재는 전형적인 역 시그모이드형 흡착을 나타내는 것이 일반적이며 수증기 전처리재는 낮지만 그런 형태를 보여주고 있다. 컨트롤재에 비해 낮은 흡수율을 나타내는 원인은 열적 변형때문으로 추정된다. 열처리 시간이 길고 온도가 높을수록 평형흡수율이 감소하는 경향을 나타내었다. 열처리에 의하여 흡습량이 줄어드는 것은 열처리시의 고온에 의하여 헤미셀룰로오스의 분해 및 변질에 의한 흡습량 감소와 목재구성성분의 구조변화, 분자쇄 절단에 의한 경우, 가교형성이나 결정영역의 증가 또는 일시적인 응집구조 형성도 생각할 수 있겠다. 또한 흡습성 저하에 더 큰 영향을 주는 것은 열처리 온도보다 열처리 시간이 더 큰 것으로 나타났다.

또한 각각의 수증기 가열처리 시간에 있어서 온도가 증가할수록 흡습량이 저하되지만, 경우에 따라서는 가열처리한 경우에는 오히려 흡습량이 증가하는 수가 있는데 이것은 열처리되는 동안에 목재내의 수분이동통로의 장애물제거, 성분분해로 일시적 모관응축현상이 발생하는 것으로 알려져 있다. 원료목재의 수증기 전처리 당시 고온의 열이 발생하여 헤미셀룰로오스가 분해 및 변질이 심하게 되었고, 고온에 의하여 보다 미세하게 분리된 세포벽 간층의 노출 및 여기서 분리된 리그닌이 비교적 수분과 결합력이 높은 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스를 둘러싸고 있기 때문이라 추정되었다.

Fig. 32에는 수증기 가열 전처리한 목재원료를 탈리그닌한 시료에 대하여 데시케이터법으로 측정한 흡착등온선을 나타내었다. 목재소재를 탈리그닌 한 시료와 수증

기 전처리 목분탈리그닌 처리시료의 평형함수율은 Fig. 31의 탈리그닌 천리하지 않은 목분 시료에 비하여 높은 값을 나타내었다. 이것은 고온과 고압상태하에서의 가열처리에 의한 목분의 리그닌에 의한 피복 및 흡착점의 소실 등, 물리적 영향인자를 탈리그닌 처리가 제거해 준 때문으로 평가된다.

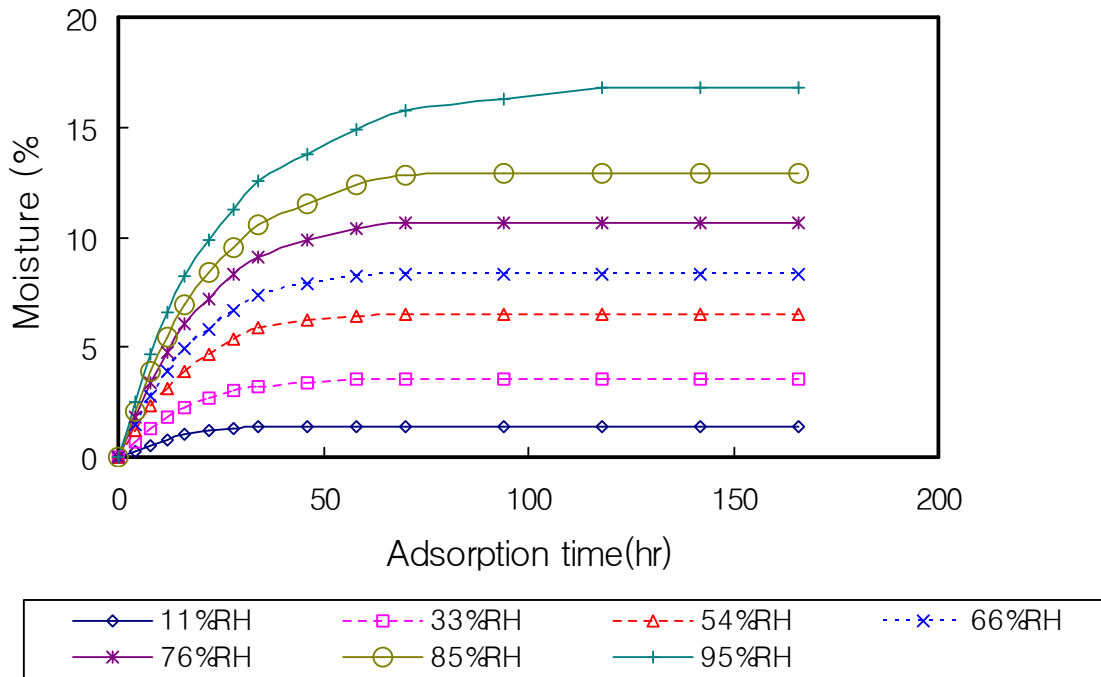


Fig. 30. Moisture absorption curves at various relative humidity conditions.

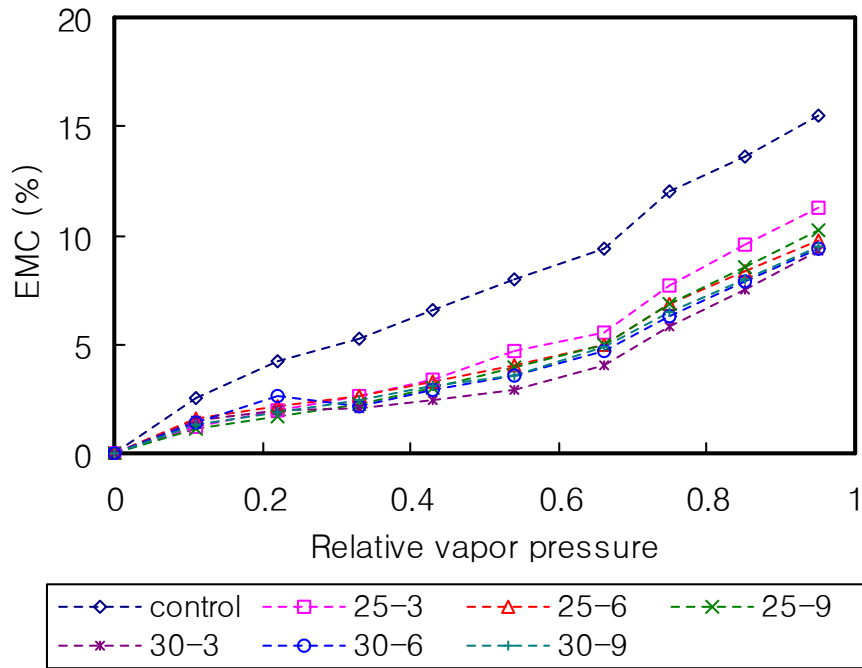


Fig. 31. Equilibrium moisture contents(EMC) at 25°C of poplar wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Legend: for example, 25-3: first figure is vapor pressure; 25kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 3min.

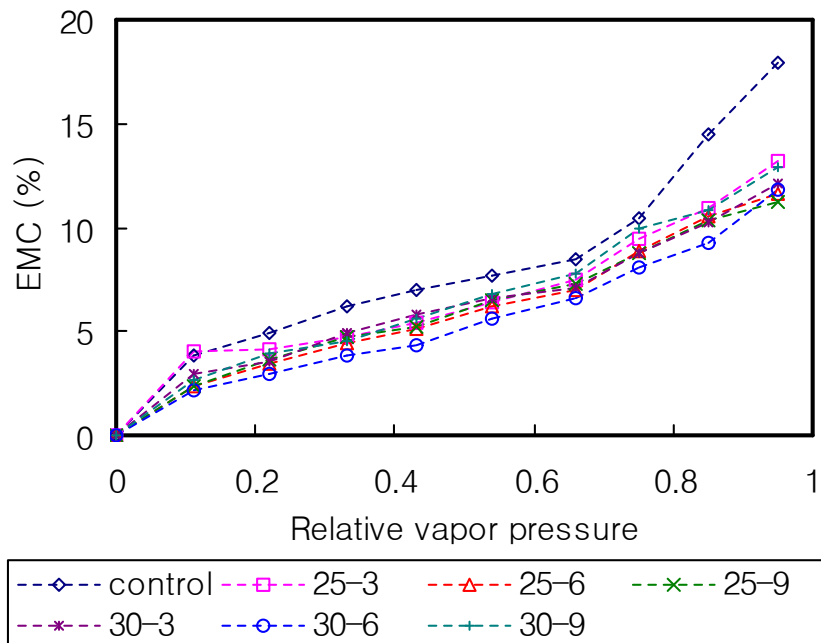


Fig. 32. Equilibrium moisture contents(EMC) at 25°C of delignified poplar wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Legend: for example, 30-6: first figure is vapor pressure; 30kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 6min.

(나) 단분자층 흡착량 및 내부표면적 변화

흡착등온선으로부터 상대습도 5%부터 35% 범위에 있어서 흡착량의 직선부를 취하여 그림 8과 같이 BET법에 의거하여 직선의 기울기로부터 단분자층 흡착량과 내부 표면적의 크기를 산출하였다. 표1에 제시한 비표면적 변화는 목분과 수증기 가열 전처리시간에 따른 조건에서 목분의 비표면적 변화를 나타내었고, 탈리그닌 처리한 목분 및 수증기 처리 목분의 비표면적 변화를 나타내었다. 25기압하에서 단분자층 평형흡수율이 30기압 처리시에는 약간 낮은 값을 나타냈고, 수증기압력에 의한 큰 차이는 보이지 않았다. 또한 수증기 가열 전처리 시간에 따른 차이는 시간이 길어질수록 약간 낮아지는 값을 나타냈으나 큰 차이는 보이지 않았다.

탈리그닌 처리한 목분재료에 있어서 단분자층 흡착 평형흡수율은 탈리그닌 처리하지 않은 시료에 비하여 약 1% 정도 높은 값을 나타내었으나, 탈리그닌 처리 시료간에 있어서는 수증기압력의 차이에 따른 차는 나타나지 않았다. 내부표면적에 있어서는 탈리그닌하지 않은 목재시료의 경우, 기준 시료에 비하여 수증기 전처리재가 낮은 값을 나타냈으며, 정상재에 비해 물리적 전처리 시료의 경우가 50%이하의 낮은 값을 나타냈다. 25기압하에서는 처리 시간증가와 더불어 더 낮은 값을 나타냈으나 30기압에서는 처리시간이 증가할수록 내부표면적은 증가하는 경향을 나타냈다. 탈리그닌 처리한 시료에 있어서, 내부표면적은 미처리 목재소재에 비해 더 큰 값을 나타냈지만 30기압하에서는 수증기가열 전처리 시간과 더불어 증가했으나 30기압하에서는 일정경향이 보이지 않았다. 그러나 탈리그닌 처리함으로써 수분흡착 사이트의 회복 등에 의해 탈리그닌처리 전에 비하여 약 60%이상의 값을 나타내었고, 25기압 이상이 되면 처리시간과는 별 상관없이 우리가 목표로 하는 재료를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

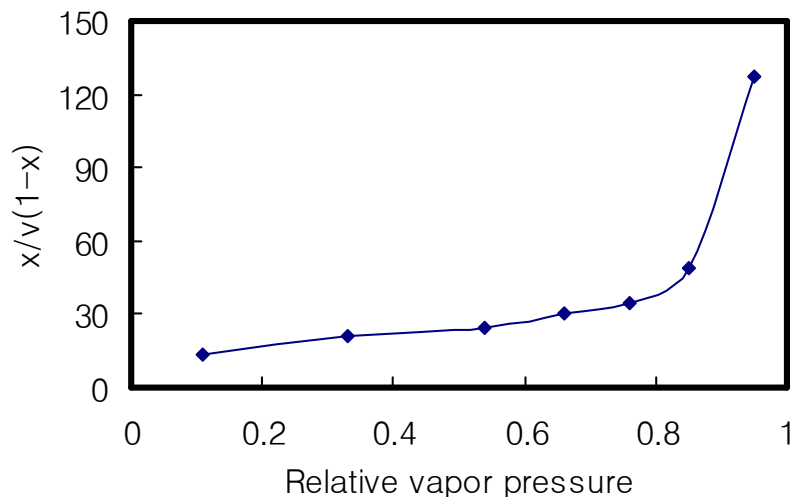


Fig. 33. BET-plot between  $P/P_o(=x)$  and moisture vapor sorption amount  $V$ .

(다) 수증기 전처리 시료의 입자분포 측정

수증기압 25기압 및 30기압하에서 3분, 6분, 9분간 각각 수증기 전처리한 시료에 대하여 공기중에서 건조시킨후 각 처리조건에 있어서의 시료의 입자분포도를 조사하였다. 입자의 크기는 전처리 후에 오는 온수추출공정에서 얻어지는 탄수화물의 양과 관련되어 있을 것으로 기대된다. 먼저 기건시킨 수증기 전처리 시료 각 조건 별로 1 kg씩을 20mesh, 40mesh, 60mesh, 80mesh 망으로 진탕기에서 일정시간 동안 진탕 후, 20mesh 이상, 20~40mesh, 40~60mesh, 60~80mesh, 80mesh이하 부분을 회수하여 각각 전건기준 대비 질량비를 구하였다. 그림9에서 그림12에는 신갈나무재 칩과 포플러재 칩을 여러 가지 수증기 처리조건에서 각각 수증기 전처리한 후, 기건시켜 입자분포를 측정한 결과를 나타냈다. Fig. 34에는 신갈나무재, Fig. 35에는 포플러재의 전처리시료를 전처리조건에 대하여 입자크기의 분포도를 각각 도시한 것이다. 전처리조건이 강할수록(수증기압이 높고 처리시간이 긴 경우) 20mesh 이상의 시료가 감소하는 경향을 나타내었으며, 나머지는 처리강도가 클수록 각 시료의 사이즈가 점진적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 포플러재에 있어서도 유사한 경향을 나타냈으며 20 mesh 이상 부분이 보다 완만한 감소를 나타냈다. 두 수종 모두 수증기 처리 시 동일압력에서 처리시간이 길어짐에 따라 20 mesh 이상 부분이 감소하고, 80 mesh 이하 부분이 증가하는 경향을 보였으며, 또한 동일 처리시간에서 압력을 증가시키기에 따라 20 mesh 이상 부분이 감소하고 80 mesh 이하 부분이 증가하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 전처리 압력과 전처리 시간의 증가에 따라, 즉 수증기 전처리 조건이 강해질수록 목분시료의 입자는 보다 미세화 된다는 것을 확인할 수 있었다.

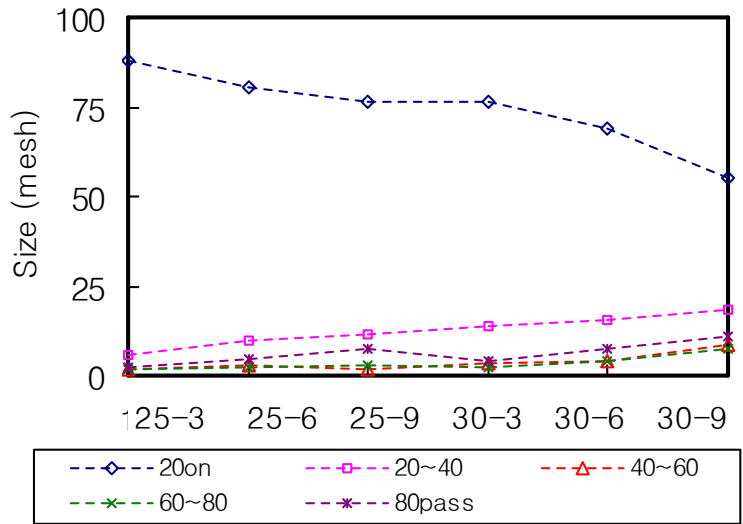


Fig. 34. Size distribution of oak wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Note: for example of X-axis, 25-3: first figure is vapor pressure; 25kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 3min. Number of legend is mesh size.

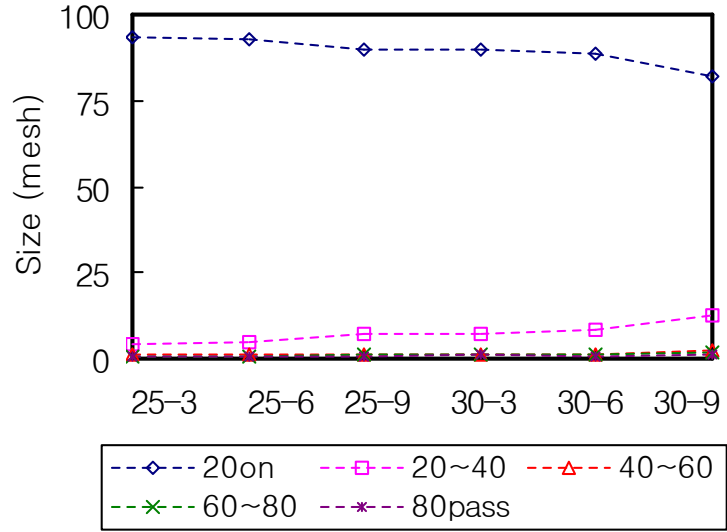


Fig. 35. Size distribution of popular wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Note: for example of X-axis, 25-3: first figure is vapor pressure; 25kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 3min. Number of legend is mesh size.

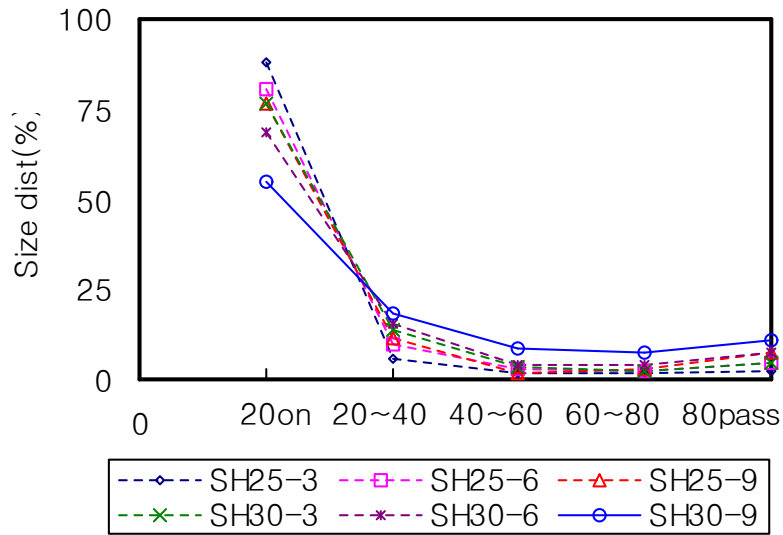


Fig. 36. Size distribution of oak wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Legend: for example, SH30-9: Initial SH is oak wood, first figure is vapor pressure; 30kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 9min.

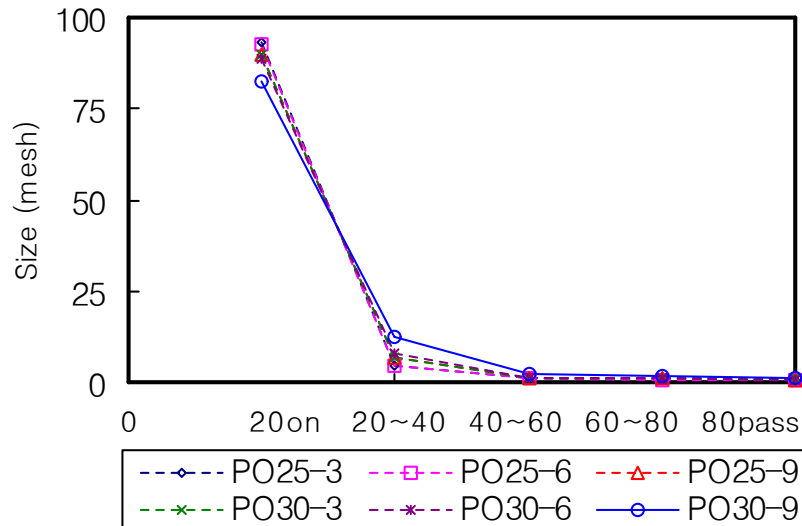


Fig. 37. Size distribution of popular wood particle as a function of different physical pre-treatment conditions.

Legend: for example, PO25-3: Initial PO is popular wood, first figure is vapor pressure; 25kgf/cm<sup>2</sup>, second figure is treatment time; 3min.

## 2. 소재물질의 물리적, 화학적 성분분석

지금까지 기능성 발현 시료조제에만 주목하였지만, 생활대사성 질환예방을 위한 소재로서의 개발을 위해서는 식품첨가물로서 적용가능한 재료를 이용한 목표물질의 추출기술이 필요할 것으로 생각된다. 또한 화학적 성분의 분석과 더불어 동물에 대한 항산화성 적용에 대한 기초실험이 필요할 것으로 생각되며, 수목추출물의 근본적인 성질과약을 위한 물리화학적인 메카니즘 분석 등이 보다 심도있게 진행되어야 할 것으로 생각한다. 최근의 농림기술개발사업의 추진방향은 농업신성장동력 확충을 위한 미래유망기술의 개발과 더불어 식품의 고부가가치화 실현을 위한 고 기능성 소재발굴쪽으로 중점기술을 지원하고 있다. 이런 추세에 맞추어 본 과제에서 추진하는 목질계 자원을 활용한 식품첨가물에 대한 소재연구는 매우 시의적절한 테마라 할 수 있겠다. 목질계 바이오매스 자원은 유기자원중 재생산 가능한 지속자원으로서 총 축적량이 약 1.9×10<sup>12</sup>톤으로 매년 1.7×10<sup>10</sup>톤이 재생산되며, 이 양은 연간 지구전체 화석자원 사용량의 약 10배에 달하고 있다. 이러한 목질계 자원의 활용에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있으며, 골격요소인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 이용하기 위해서는 이들 집단을 촉진하고 있는 망목상 구조체인 리그닌을 우선 제거할 필요가 있다. 탈리그닌 처리만 된다면, 식품첨가물이나 사료화, 당화, 알콜발효 및 기타 화학공업원료로서 활용될 수 있는 길은 매우 광범위하다고 하겠다.

이에 목재로부터 기능성 성분의 효율적인 추출을 위한 전처리 조건 탐색에 이어, 전처리 소재물질의 성분분석을 행하였다. 목질계 자원은 주성분인 셀룰로오스가 직쇄상 고분자이고 이들을 접합하고 있는 무정형 고분자체인 리그닌이 페닐 프로판의 기본골격 구조로서 이들을 강고하게 지탱해 주고 있어 저분자화시키는 전처리방안으로 고온상태에서의 열수추출 시스템을 이용하였다. 기타 용매추출법이나 초임계법, 숄보리시스법 등이 있으나 단시간에 대량처리가 가능한 이점이 있으며, 국산 활엽수중에서 신갈나무를 이용하여 먼저 전처리전 시료의 일반분석을 행하고, 다시 고온의 극한상태에서 전처리하여 처리재의 조성을 일반분석법에 준하여 분석 평가하였다. 그 결과, 고온상태 하에서의 수증기 처리재는 미처리 일반 목분의 분석결과에 비하여 온도조건이 높아질수록 헤미셀룰로오스의 대부분이 감소하였으며, 글루코스 함량은 증가하였다. 온도처리조건이 높아질수록 헤미셀룰로오스가 급격하게 감소하는 것은 고온의 수증기처리에 의해 헤미셀룰로오스의 가수분해가 많이 일어났고 생성된 다당류도 furfural 등으로 변화되어 시료 배출시 유실되거나 당류가 변질되어 리그닌과 축합된 것으로 생각된다. 고온의 수증기처리조건이 강해질수록 글루코스의 함량은 증가하지만, 처리시의 에너지 효율 등을 생각하여 추출산물의 생산을 고려할 필요가 있을 것으로 판단되어진다. 따라서 고온의 수증기 조건을 고려한 극한가공 상태하에서 기능성 원료소재의 전처리 조건은 약 220℃ 이하에서 결정할 수 있었으며, 처리할 바이오매스의 종류에 따라 구분하여 세분화할 필요가 있다고 하겠다.

## 가. 재료 및 방법

### (1) 전처리 소재물질의 성분분석

#### (가) 베이스 화합물의 화학적 조성과 탄수화물 조성분석

본 연구에서는 공시재료로 신갈나무 기건재를 이용하였고, 조성분 분석은 물리적 전처리를 용이하게 하기 위해 일정크기의 chip으로 조제하여 80mesh 목분을 준비하였다. 실험분석은 목재과학실험서에 의거하여 분석하였으며, 냉수추출, 온수추출, 알칼리추출, 유기용제추출, Klason 리그닌을 분석, 정량하였으며, 구성당 분석은 시료를 산가수분해한 다음 alditol-acetate법에 의해 전처리한 후 GC로 분석하였다. 목재성분은 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌의 주성분과 회분, 함질소화합물, 지방족 화합물, 방향족화합물, 펙틴질 등으로 구성된 부성분으로 대별된다. 목재중의 약 50%는 글루코스의 쇄상중합체인 셀룰로스이고, 헤미셀룰로스는 자일로스, 아라비노스, 글루코스, 만노스, 갈락토스 등의 단당류로 구성된 고분자물질로 약 20~30%를 점유한다. 이들 홀로셀룰로스가 다당류인 것에 비해, 리그닌은 페닐프로판 단위로 구성된 방향족 고분자 화합물로서 약 20~30%를 차지한다. 이들 주성분이 목재중의



약 90% 이상을 차지하며, 이외에도 미량의 추출성분 등 휘발성분들이 존재한다. 목재의 원소조성은 탄소가 약 50%, 산소 약 44%, 수소가 약 6%로서 수중에 의한 차이는 적다고 할 수 있다. 따라서 전건목재상태의 원소조성식은  $C_4.17H_6O_{2.75}$ 이며, 함수율  $u\%$ 에서의 원소조성식은  $C_{4.17}H_{6+u/9}O_{2.75+8u/9}$  으로 표현할 수 있다.

(2) 고온고압 수증기 전처리재의 성분분리 및 조성분 분석

다양한 온도 및 압력조건에서 기건상태의 목재 칩을 전처리하여 기능성 물질 추출을 위한 원재료로서 사용하였다. 목재는 다공질의 흡습성 소재로서 수분에 의해 팽윤하며 열에 의해 열팽창하는 열적 성질을 가지고 있다. 세포벽속에 포화된 섬유포화점 상태의 수분은 목재성분의 열연화에 도움을 주며 고압의 수증기처리에 의해 분자 유동성이 커진 상태에서 전처리하게 되면 목재섬유는 쉽게 물리적 파괴를 일으키게 된다. 이 상태의 전처리한 목재소재를 일반목분 및 탈리그닌 처리한 목분들과 비교하여 물리적 특성을 조사하여 효율적인 전처리 조건을 탐색하였다.

공시재료로 사용한 신갈나무 기건재의 칩형태의 재료를 약 20~30kgf/cm<sup>2</sup>의 압력하에서 3분에서 9분의 일정시간 간격으로 수증기처리하였다. 이렇게 전처리한 시료의 성분분리는 아래 그림 1과 같은 수순으로 행하였으며, 전처리재료의 분석은 처리된 상태에서 건조시켜 일반분석법에 준하여 실시하였다.

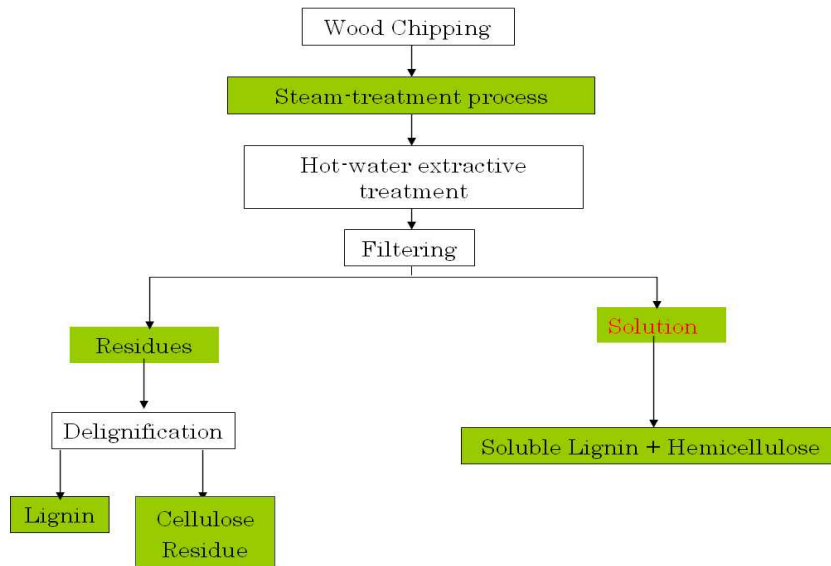


Fig. 38. 목재소재로부터 성분의 추출 수순.

#### (가) 냉수추출

전처리시료 2g을 500ml 삼각 플라스크에 넣고 300ml의 증류수를 넣어 25±5℃에서 교반하면서 48시간 방치하여 중량을 알고 있는 glass filter에 흡인 여과하여 증류수로 세정하고 일반 드라이오븐 건조기에서 항량에 달할 때까지 건조 칭량하여 시료의 전건중량과의 차이로 가용분량을 구하였다.

#### (나) 온수추출

수증기처리 시료 2g을 환류냉각기각 부착된 500ml 용량의 둥근 플라스크에 넣고 0.1%, 1%, 5%, 10%의 수산화나트륨 용액 200ml를 넣어 1시간 비등처리하였다. 이것을 열수, 10% 초산용액, 열수순서로 세정한 후에 드라이오븐에서 전건시켜 그 중량차이에 의해 가용분량을 구하였다.

#### (다) 수산화나트륨 추출

수증기처리 시료 2g을 환류냉각기각 부착된 500ml 용량의 둥근 플라스크에 넣어 1시간 비등처리하였다. 흡인여과시 열수로 세정한 후에 드라이오븐에서 전건시켜 그 중량차이에 의해 가용분량을 구하였다.

#### (라) 메탄올추출

수증기처리 시료 2g을 삼각 플라스크에 넣어 200ml의 메탄올을 첨가하여 25±5℃에서 교반하면서 2시간 추출한 후 메탄올과 증류수로 순차적으로 세정한 후에 드라이오븐에서 전건시켜 그 중량차이에 의해 가용분량을 구하였다.

#### (마) 추출잔사의 리그닌 정량

추출된 잔사내의 리그닌 함량은 황산법(Klason lignin 정량법)으로 정량하였다.

### 나. 연구수행 결과

#### (1) 시료의 일반분석

Table 31에 시료의 일반분석 결과를 나타내었으며, Table 32에는 구성당 분석결과를 나타내었다. 침엽수재에 비하여 본 실험시료인 신갈나무재에서는 xylose잔기와 glucose잔기의 비율이 높고, 이들은 셀룰로스에서 유래한 것으로 생각되고 있다.

Table 31. Composition of wood material.

Characters	content (%)
Cold water extractive	1.7
Hot water extractive	3.2
Alcohol-benzene extractive	4.6
Alkali extractive	18.6
Klason lignin	19.2
Ash	0.6

Table 32. Sugar composition of wood material.

Characters	content (%)
Arabinose	3.2
Xylose	25.3
Mannose	2.4
Galactose	Trace
Glucose	69.7
Rhamnose	Trace

\* Trace is below 0.1%

## (2) 수증기처리조의 온도와 압력

목질계 바이오매스의 전처리조건으로서 수증기 전처리법은 물리적 처리법으로서 성분의 분리에 매우 효율적인 방법으로 알려져 있다. 이에 가온온도와 그에 상응한 수증기압력의 관계를 조사하였다. 그 결과 100℃ 이상의 고온영역에서 수증기압력은 지수함수적으로 상승하며, 처리조건인 120℃에서 2kgf/cm<sup>2</sup>에 불과하던 수증기 압력이 180℃에서 10.5kgf/cm<sup>2</sup>, 200℃에서 16.2kgf/cm<sup>2</sup>, 210℃에서 20kgf/cm<sup>2</sup>, 220℃에서 25kgf/cm<sup>2</sup>, 230℃에서 30kgf/cm<sup>2</sup>, 250℃에서 40kgf/cm<sup>2</sup>에 도달하여 고온에서의 수증기압력이 목재성분 분해에 극히 중요하게 영향을 미치고 있음을 잘 알 수 있었으며, 원하는 수증기압은 열처리 온도조건으로 얻을 수 있었다(Fig. 39,40).

Fig. 41에는 수증기가 있는 경우와 없는 경우에 있어서 목재시료의 질량감소 경과를 열처리온도에 따라 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 물분자의 역할이 명확하게 드러나는 결과를 보였는데, 목재 세포벽속의 성분분해 및 휘발성 화합물 등의 용출이나 분해가 수분이 있는 경우에 매우 활발하게 일어나고 있으며, 고온이 될수록 질량감소의 효과는 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. Fig. 42에는 열처리전(pre)과 후(post)에 있어서 목재시험재료의 질량감소율을 나타내었다. 기준점을 어디에 두느냐에 따라 감소율의 측정값에 오차가 생기는 것을 감안하여 실험한 결과, 큰

차이가 없었으며 온도가 증가할수록 분해량은 직선적으로 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 이 수증기처리법을 사용하면 목재의 성분을 분해할 수 있는 전처리방법으로서 효과가 기대되었다.

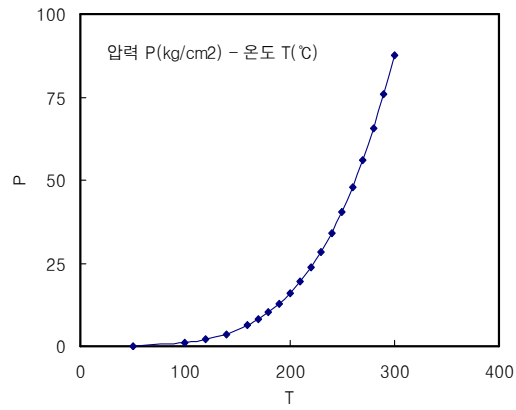


Fig. 39. Relationship between temperatures and vapor pressures.

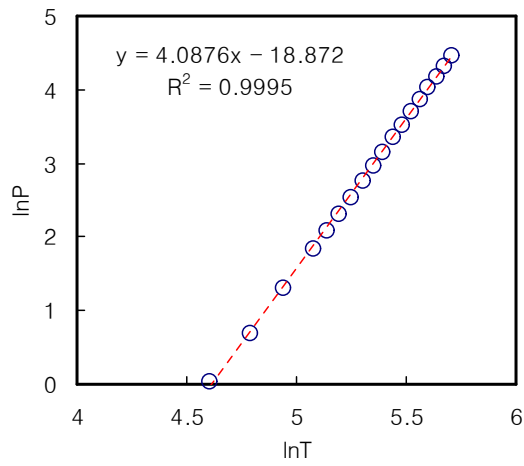


Fig. 40. Logarithm values between temperatures(T) and pressures(P).

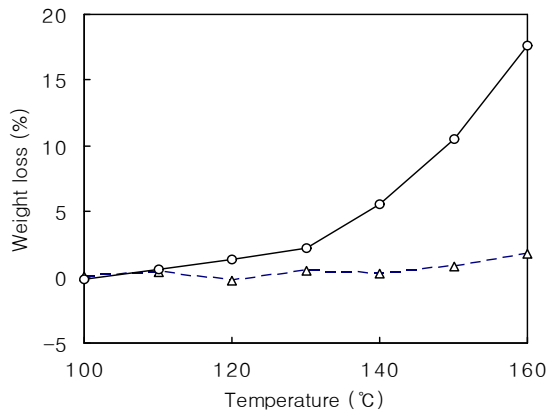


Fig. 41. Relationships between temperatures and weight loss of wood.  
 Note : water vaposaturation(○), without water vapor(△)

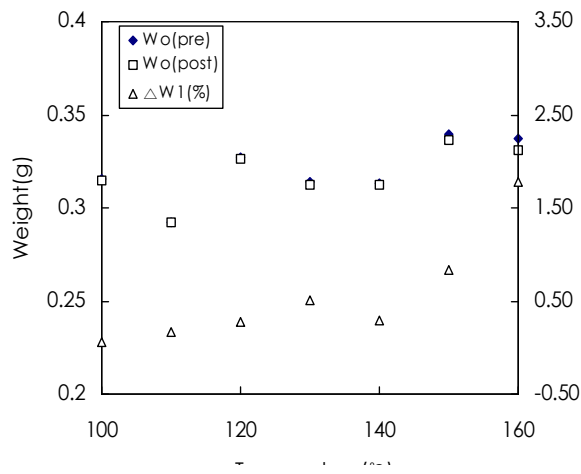


Fig. 42. Rate of weight loss in without water vapor

### (3) 고온 수증기처리재의 조성분 분석

Fig. 43에는 고온 수증기 처리재의 각종 용매추출의 결과를 나타내었다. 냉수 및 열수 추출에서는 수증기압력이 낮을 경우 처리시간이 길어지면 추출물량이 증가하지만, 압력이 높아지면 감소하는 경향이 있었다. 이것은 헤미셀룰로스의 가수분해 또는 열분해에 의하여 생성된 단당이 2차적으로 열처리에 의한 변화로 생각되며, 메탄올 추출물은 처리시간과 수증기압이 높을수록 추출물량이 증가하는 경향을 나타내었다. 이 현상은 헤미셀룰로스는 2차적 변화를 받아 그 양이 감소하지만 리그닌은 분해속도는 느리나 수증기처리시간의 증가에 따라 저분자화된 리그닌 분해물의 용출에 의한 것으로 판단된다. 알칼리용액의 농도별 추출물량은 농도가 증가할수록, 그리고 수증기처리조건이 심할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 이 현상은 대부분의 헤미셀룰로스의 추출과 더불어 일부 탈리그닌에 기인하는 것으로 추정된다. 또한 고온의 높은 수증기압력하에서 장시간 처리시에 고농도의 알칼리추출에서 약 60% 가까운 고수율로 얻어진 것은 많은 양의 셀룰로스가 수증기처리에 의해 세포벽성분이 세분화되어 알칼리 가용화가 일어난 것으로 생각된다.

Fig. 44은 참나무 수증기 처리재를 각종 용제로 추출한 잔사중의 리그닌 함량을 도시한 것이다. 메탄올 추출 잔사중의 리그닌 함량에 큰 차이는 없었지만 높은 수증기처리온도와 같은 극한 가공 처리조건하에서는 리그닌의 함량 차이가 나타났다. 1% 알칼리농도까지는 리그닌 함량이 급하게 감소하였고, 알칼리농도가 증가함에 따라 탈리그닌율도 증가하는 경향을 나타냈으나, 1% 이상의 농도에서는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 고온의 수증기압 처리시간이 강해질수록 저분자화된 리그닌이 재축합되어 알칼리추출이 어려워진 것으로 생각되며, 알칼리 용액의 농도가 증가함에 따라 탈리그닌도 일어나지만 이와 더불어 알칼리 용액에 의한 탄수화물의 추출량도 많아져서 상대적으로 리그닌함량이 증가되었다고 생각된다. 이 결과들로부터 목재원료의 분석에서 얻어진 리그닌함량보다 수증기처리재의 리그닌함량이 많아진 것은 헤미셀룰로스 및 추출성분의 대부분이 용출되었고 이와 더불어 셀룰로스 및 리그닌도 용출되어 잔사중의 잔존 리그닌양이 상대적으로 증가한 때문으로 추정된다. 또한 용제추출 결과와 황산법에 의한 리그닌 정량 결과로부터, 탈리그닌 처리에는 메탄올보다 수산화나트륨처리가 효과적이었으며, 알칼리용액 처리농도는 처리수율이나 열량 등을 감안할 때 1% 농도가 가장 적합할 것으로 판단되었다.

결과적으로 냉수추출물을 비롯한 대부분의 추출물의 함량은 수증기처리하지 않은 일반 목분에 비하여 아주 높게 나타났다. 수증기처리재를 일반목분과 비교해 보면, 냉수추출물은 약 2~3배, 열수추출물은 약 3~4배, 알칼리 용액 추출물은 약 2배, 유기용제 추출물은 약 10배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이들 현상은 100℃ 이상의 고온의 수증기 처리에 의해 목재 세포벽이 열화 및 연화되는 과정에 목재 주요 구성성분인 셀룰로스와 헤미셀룰로스, 리그닌의 화학적 구조변이로 인하여 각종 추출물이 용출되기 쉬운 구조의 변화 및 열적 변환과 분해로 인한 저분자화가 일어나

추출량이 많아진 것으로 생각되어진다.

Table 33에는 수증기처리 온도와 시간에 따른 탄수화물 조성의 변화를 정리하였다. 일반 목분과의 탄수화물 조성을 비교해 보면, 처리조건이 가혹할수록 펜토스계 당류인 아라비노스와 자일로스의 함량이 급격하게 감소되었다는 것을 알 수 있다. 아라비노스와 자일로스가 전체 탄수화물중에 차지하는 비율이 약 30%이지만 수증기 처리로서 이들 성분이 매우 많이 유실된다는 것을 잘 알 수 있다. 신갈나무재의 글루코스 함량은 일반적으로 약 65% 전후로 알려져 있지만, 고온의 수증기 처리에 의하여 20% 이상 증가하는 것을 알 수 있으며, 이들 결과로부터 고온의 수증기 처리에 의해 목재 탄소화물중 글루코스 함량을 상대적으로 증가시킬 수 있는 좋은 방법이라고 생각되어진다. 그 효과는 같은 온도범위에서도 처리시간이 길어질수록 약간 증가하는 경향이 있으나, 220℃ 이상의 조건에서 큰 차이가 안 보이는 것으로부터 열효율을 감안할 때 이 정도 온도범위에서 수증기 처리하는 것이 가장 좋을 것으로 판단되어진다.

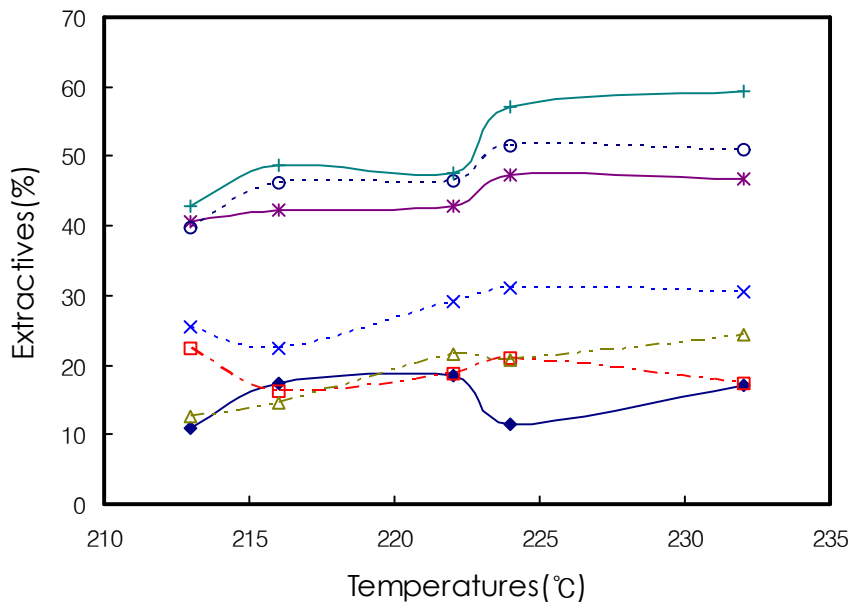
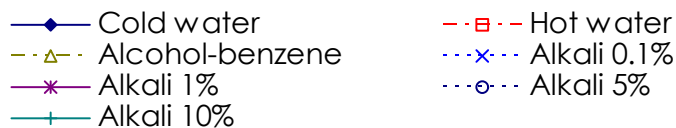


Fig. 43. Extractives of steam treatment wood



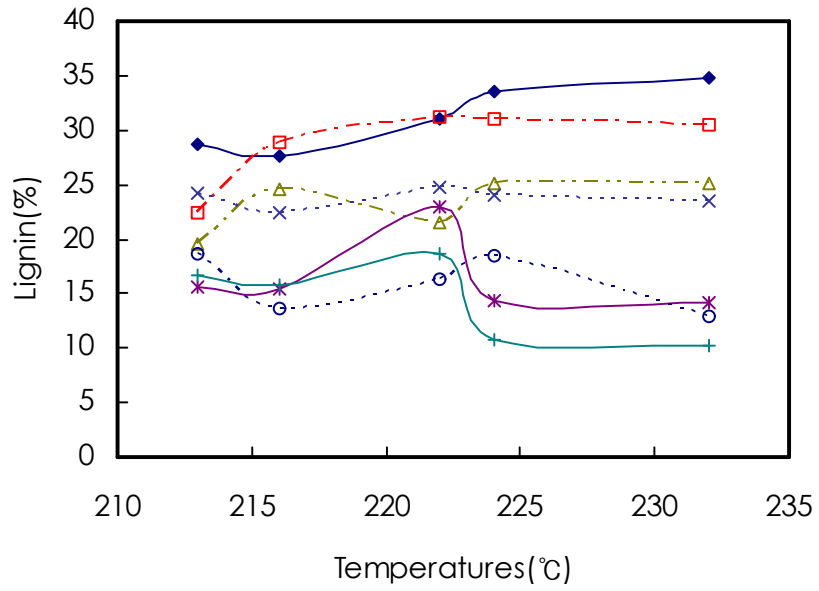


Fig. 44. Lignin content of steam treatment wood

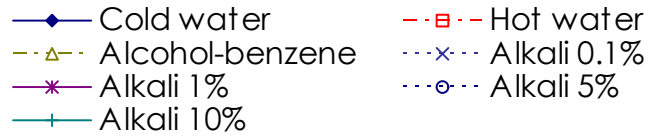


Table 33. Sugar composition of steam treatment(온도-처리시간) wood material.

Characters	raw material	120°C	210°C	220°C	230°C	230°C	230°C
		-30분	-6분	-6분	-3분	-6분	-9분
Arabinose	3.2	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Xylose	25.3	11.4	6.2	3.6	1.6	1.3	0.6
Mannose	2.4	1.4	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6
Galactose	Trace	T	T	T	T	T	T
Glucose	69.7	86.7	93.4	97.5	97.5	97.9	98.9
Rhamnose	Trace	T	T	T	T	T	T

\* Trace is below 0.1%



### 3. 원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립

지금까지 기능성 발현 시료조제에만 주목하였지만, 생활대사성 질환예방을 위한 소재로서의 개발을 위해서는 식품첨가물로서 적용가능한 재료를 이용한 목표물질의 추출기술이 필요할 것으로 생각된다. 식품 첨가물로서 고기능성 소재 개발에 역점을 두고 있는 형편에서, 결과물의 식품첨가물 이용시 식품의약품 안전청에 등록고시된 식용가능한 소재에 대하여 한정되어 있는 이유로 이번 3차년도에는 식용가능한 버드나무와 뽕나무 등의 생약재 자원소재에 대하여 실험을 지속해 나갈 예정으로 있다. 또한 이들 소재의 기능성 확인을 위해 화학적 성분의 분석과 더불어 동물공학 전공자의 도움을 받아 동물에 대한 항산화성 적용에 대한 기초실험이 필요할 것으로 생각되며, 수목추출물의 근본적인 성질과약을 위한 물리화학적인 메카니즘 분석 등이 보다 심도있게 진행되어야 할 것으로 생각하며, 이에 근거하여 차년도 연구를 진행하고자 한다.

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 식품사용 가능한 생약소재의 선별

국산 참나무는 그 종류가 6종으로서 신갈나무, 상수리나무, 졸참나무, 떡갈나무, 굴참나무, 갈참나무가 있으며, 최근 북미 등으로부터 조정수용으로 도입된 몇가지 수종이 있다. 본 연구에서는 국내 주요 활엽수종을 대상으로 처음 연구한 바, 참나무 재료로 실험하였으나 식약청에 식품원료로서 등재되어 있지 않은 원료이다. 본 연구결과물을 생활대사성 질환 예방을 위한 식품 첨가물로서 적용하기 위해서는 식약청의 식품원료로 등록해야만 한다.

그러나 이미 유럽이나 북미 선진제국에서는 수백년 전부터 위스키와 와인 등의 주류의 풍미를 돋구기 위해 첨가물로서 사용해 온 역사가 깊고, 안전성에 대해서는 이미 입증된 것이 사실이다. 가까운 일본만 하더라도 인터넷 상에서 참나무 칩을 식품첨가물로서 판매하고 있으며, 프랑스나 이탈리아 등지에서도 같은 현황이다. 특히 이탈리아에서는 약 6년전에 와인배럴을 취급하는 인건비 상승으로 인해 와인배럴을 사용하지 않고 대형 알루미늄 양조배럴을 이용하여 와인을 생산하기 시작하여, 노동자들과 법적 대응이 있었다. 그 결과, 이렇게 만든 와인도 정식 와인으로 유럽연합에서 인정을 받아 현재는 대량생산 체제를 이루었다. 기존의 와인제조 방법에서는, 와인을 숙성시킬때 참나무 배럴을 이용하였으나 숫자가 많고 노동력이 많이 들고 인건비가 비싸 운영난이 가중되었다. 그러나 새롭게 만드는 제법은 와인을 숙성시킬때 참나무 배럴 대신에, 참나무 칩을 대량으로 집어 넣거나 참나무 열수추출물을 일정양 배합함으로써 그 맛을 느끼게 하는 방법이다.

따라서 선진외국에서는 이처럼 이미 참나무 추출액을 식품 첨가물로 사용하고 있

기에 한국에서도 이 사실을 인지하고 참나무 추출물의 식용으로서의 허가를 요청하였다. 참고로 우리는 한방약재로서 동의보감에 실려있는 초본 및 목본류는 식품원료로서 인정을 하고 있으나, 참나무는 타르성분이 있는 것으로 인정하되, 동의보감에는 실려있지 않고 있다. 따라서 허가를 취득하기 위해서는 일정 절차가 필요하고, 프랑스 와인식품회사의 도움을 받아 자료를 제출하여 현재 참나무 추출물도 식약청의 허가를 취득하였다. 따라서 현재는 참나무 추출물을 식품첨가물로서 인증되고 있으나, 국내산 수종 6종 중에서 신갈나무, 상수리나무, 졸참나무 3 수종에 대해서 허가를 취득하였다. 따라서 이제는 참나무 추출물의 약리작용이나 건강기능성 식품으로서 사용할 수 있는 분야이면 식품 첨가물로서는 그 양에 상관없이 사용할 수가 있다. 의학잡지에서는 참나무 추출물, 특히 완인의 효능에 대해서 포도의 효능도 있지만 참나무 추출물의 의학적 효능에 대한 연구결과들도 일본 의학잡지에 보여지고 있다. 연구결과로서 얻어진 효능을 식품허가가 없어 사용할 수가 없다면 참으로 안타까운 일이 아닐 수가 없다.

여기서는 참나무 재료가 아닌 농업생약재로서 식품으로 사용 가능한 수목을 선별한다면, 전통적으로 동의보감에 등재되어 있는 생약재를 기반으로 하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단되어진다. 특히 우리 주변에서 흔히 볼 수 있고, 구하기 쉬운 재료라면 더할 나위가 없을 것이다. 전통약재와 흔히 볼 수 있는 농업 생약재를 참고로 하여 고온 고압에서의 추출기술을 활용하여 생활대사성 질환예방을 위한 식품 재료 및 첨가물을 개발할 수 있을 것으로 예상되어진다. Table 34에는 식품의약품 안전청에 등재되어 있는 활용 가능한 농업생약재를 나타내었다. 그리고 그 하단부에 식품첨가물로서 참나무 3수종의 개정안에 대한 내용을 첨부하였다.

Table 34. 식품원료로 이용 가능한 생약소재(목본류)

원재료	학명	이명	생약명	식용 여부	공진등재 여부
<a href="#">참나무</a>	<i>Quercus spp.</i>	참나무속		가능	사용가능원료
<a href="#">버드나무</a>	<i>Salix koreensis</i> Anderss	버들, 뚝버들, willow		가능	제한적사용원료
<a href="#">검은뽕나무</a>	<i>Morus nigra</i> L.	Black Mulberry, 흑상(黑桑)		가능	사용가능원료
<a href="#">검은뽕나무</a>	<i>Morus nigra</i> L.	Black Mulberry, 흑상(黑桑)		가능	사용가능원료
<a href="#">꾸지뽕나무</a>	<i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Bur. exLav	-	자목백피- 민간생약	가능	등재안됨
<a href="#">돌뽕나무</a>	<i>Morus cathayana</i> Hemsl.	-		가능	등재안됨
<a href="#">붉은뽕나무</a>	<i>Morus rubra</i> L.	Red Mulberry, 루브라뽕나무		가능	사용가능원료
<a href="#">뽕나무</a>	<i>Morus alba</i> L.	오디나무, 상지, White Mulberry 상백피: 상근백피(桑根白皮), 상근, 목맥, 오목이, 뽕나무껍질, 누 상엽: 철선자(鐵扇子), 경상상엽(經霜桑葉), Sang ye, 오디나무, 백상(白桑)엽, 뽕나무 잎 상지: 눈상지(嫩桑枝), 상조(桑條), 뽕나무 가지, Mulberry twig, Sang zhi(상지/桑枝), 자명심 상심자: 오디	상백피 (桑白皮, Mori Cortex), 상엽 (桑葉, Mori Folium), 상지 (桑枝, Mori Ramulus), 상심자 (桑심子, Mori Fructus), 상실(桑實, 오디)	가능	사용가능원료
<a href="#">회화나무</a>	<i>Sophora japonica</i> L.	회나무, 피나무, Japanese pagoda tree, Chinese scholar tree 괴각: 황괴, 흑괴, 두괴, 백괴, 자괴, 괴각자	괴화 (槐花, Soph orae Flos), 괴각(槐角, Sophorae Fructus), 괴목피	가능	등재안됨
<a href="#">느티나무</a>	<i>Zelkova serrata</i> (Thunb.) Mak.	Zelkova tree		가능	등재안됨
<a href="#">라디에타 소나무</a>	<i>Pinus radiata</i> D. Don	Monterey Pine, Radiata Pine, 라디에타파인, 라디아타소나무		가능	등재안됨
<a href="#">밤나무</a>	<i>Castanea</i>	관율, 울과, 울자,		가능	사용가능원료

	<i>crenata</i> Siebold & Zucc.	울황, chestnut, 밤보늬(속껍질), 율피			
<a href="#">차나무</a>	<i>Camellia sinensis</i> L. <i>Thea sinensis</i> L.(이명)	녹차나무(Green Tea), 다목, Tea, 다엽	다실(茶實) -열매, 산차아목(山茶亞木), 산차과(山茶科), 차속(茶屬)	가능	사용가능원료
<a href="#">고로쇠나무</a>	<i>Acer pictum</i> subsp. <i>mono</i> (Maxim.) Ohashi <i>Acer mono</i> Maxim.(이명)	painted maple, korosoe tree, sap		가능	사용가능원료
<a href="#">구기자나무</a>	<i>Lycium chinense</i> MILL	기자, 지골피, Chinese matrimony vine	구기자(枸杞子, Lycii Fructus), 구기엽, 구기피, 지골피	가능	사용가능원료
<a href="#">느릅나무</a>	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (Rehder) Nakai	느릅나무, 춘유(春榆), 가유(家榆), Japanese elm, <i>Ulmus davidiana</i>		가능	등재안됨
<a href="#">느티나무</a>	<i>Zelkova serrata</i> (Thunb.) Mak.	Zelkova tree		가능	등재안됨
<a href="#">대나무</a>	<i>Bambusoidae</i> (대나무아과)	bamboo, Bambusoidae		가능	사용가능원료
<a href="#">두충나무</a>	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Hardy Rubber Tree, 들충나무, 사선목	두충(杜沖, <i>Eucommiae Crotex</i> ), 두충엽(杜沖葉, <i>Eucommiae Folium</i> )	가능	사용가능원료
<a href="#">벚나무</a>	<i>Prunus serrulata</i> var. <i>spontanea</i> (Maxim.) E.H.Wilson	cherry		가능	등재안됨
<a href="#">복숭아나무</a>	<i>Prunus persica</i> (Linne) Batsch <i>Prunus persica</i> Siebold et Zucc. var <i>vulgars</i> Maxim (이명)	복사나무, 복숭나무, peach, 도화(桃花, <i>Persicae Flos</i> ), 도화약(桃花{약}, <i>Persicae Calyx</i> )	도인(桃仁, <i>Persicae Semen</i> )-종자, 도엽- 잎	가능	사용가능원료
<a href="#">생강나무</a>	<i>Lindera obtusiloba</i> Blume	-	황매목(黃梅木)	가능	사용가능원료

<a href="#">소나무</a>	<i>Pinus densiflora</i> Siebold & Zucc.	솔잎(pine needle), 호박: 홍송지(紅松脂), 琥珀, Succinum	송화분(松花粉, Pini Pollen), 송절(送節), 송엽(松葉), 송화(松花), 호박(琥珀, Succinum)	가능	사용가능원료
<a href="#">오갈피나무</a>	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (Rupr. et Maxim.) S. Y. Hu <i>Acanthopanax sessiliflorus</i> (Rupr. et Maxim.) Seem. (이명)	오가, 오가피나무 (Five-leaved aralia), 오갈피나무(五加皮), 섬오갈피, 남오가피(南五加皮), 오화(五花), 목골(木骨), 오엽목(五葉木), 오주	오가피(五加皮, Acanthopanax Root Bark)	가능	사용가능원료
<a href="#">오리나무</a>	<i>Alnus japonica</i> (Thunberg) Steudel	오리목, Japanese alder	적양(赤楊) -어린가지, 뿌리껍질	가능	제한적사용원료
<a href="#">읍나무</a>	<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb. ex Murray) Koidz. <i>Kalopanax pictus</i> (Thunb.) Nakai (이명)	읍나무, 읍목, 개두릅나무, 명구나무, 며느리채찍나무, Caster Aralia	해동피(海桐皮, Kalopanax Cortex)	가능	등재안됨
<a href="#">헛개나무</a>	<i>Hovenia dulcis</i> Thunberg	호리개나무, 불개나무, 열매: 지구자(Korean raisin)		가능	사용가능원료
<a href="#">황칠나무</a>	<i>Dendropanax morbifera</i> Nakai	노란웃나무, 풍하이(楓荷梨), Korean Dendropanax		가능	제한적사용원료

### 식품의약품안전청 고시 제2008-62호

「식품위생법」 제7조제1항의 규정에 의한 「식품첨가물의 기준 및 규격」(식품의약품안전청 고시 제2008-34호, 2008. 6. 24)을 다음과 같이 개정합니다.

2008년 8월 27일

식품의약품안전청장

II. 제 3. 나. 157. 천연착향료 중 78번. Cork, oak의 기원물질 “참나무과 참나무(*Quercus suber* L. or *Q. occidentalis* F.Gay)” 를 “참나무과 참나무(*Quercus suber* L., *Q. occidentalis* F. Gay, *Q. acutissima*(상수리나무), *Q. mongolica*(신갈나무), *Q. serrata*(줄참나무))” 로 한다.

## (2) 수증기처리에 의한 추출물의 성분분석

### (가) 저분자 리그닌계 원료생산을 위한 전처리 연구

본 연구에서는 신갈나무와 이태리 포플러재의 전처리원료로부터 저분자 페놀류의 추출을 위해 냉수추출, 가성소다처리를 행하였다. 이들 수종의 목재 조성분과 전처리한 목재원료의 성상을 연구하여 원료의 최적 전처리 추출 가능성을 조사하였다.

### (나) 원료물질 추출을 위한 전처리재의 성상

원료물질 추출을 위한 전처리재의 구성당 분석 및 리그닌 함량 측정은 신갈나무 및 이태리포플러재의 칩을 고압수증기 처리하여 냉동건조기로 충분히 건조한 후, 분쇄한 시료를 사용하였다. 본 실험의 목적은 고압의 수증기처리에 의해 목재의 주요 성분변화를 관찰하기 위하여 실시되었다.

### (다) 효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출

저분자 목재 추출물의 대량생산을 위한 최적 전처리 공정시스템에 대하여 검토하였으며, 검토조건은 목재칩의 투입량, 수증기 전처리 후 목재유효성분의 온수 추출과 탈수 및 여과에 의한 1차적인 수율, 회수액 증발처리에 의한 수율을 평가하여 결정하였다. 또한 저분자 리그닌계 당화액 생산을 위한 최적 전처리 공정시스템을 도출하였다.

### (라) 참나무 수액의 항산화 및 면역증강 활성 검증

#### ① 세포배양

사람 동맥평활근 세포 (HASMC)를 배양 (57)하여 (smooth muscle cell growth medium-2: 10% FBS, 2ng/ml human basic fibroblast growth factor, 0.5 ng/ml human epidermal growth factor, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, 50  $\mu$ g/ml amphotericin-B, 5  $\mu$ g/ml bovine insulin). 모든 실험에는 초대passage HASMC를 80-90% confluence로 배양하고 serum starvation (0.1% FBS)에서 보존하였다.

#### ② 생약추출

건조 참나무추출액 500 g을 세절하여, 50 mM PBS (pH 7.2)용액에서 분쇄한 뒤, 4  $^{\circ}$ C, 15,000 xg에서 20분간 원심분리하였다. 그후 Sample 5g을 취하여 10배량

의 MeOH을 가하여 70°C에서 3시간 동안 가온 침출하여 여과(동양여지 No. 1)하고 여액을 모아 감압농축 후 정량하여 실험에 사용하였다.

### ③ 세포증식 측정 (XTT 증식측정)

세포독성 검사는 HASMC에서 XTT kit (XTT II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) (Ha et al., 2004c)로 측정하였다. 세포를 96-well culture plate에서 2시간동안  $1 \times 10^4$  cells/well DMEM로 키우고 참나무추출액을 다른 농도로 (0, 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 g/ml) 3실험군 나누어 처리한 후 72시간 후에 50:1의 XTT환원용액 (sodium 3'-[1-(phenyl-aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate; 50:1로 혼합)을 첨가하였다. 그리고 4시간 후에 490 nm에서 ELISA plate reader로 XTT와 함께 incubator에서 측정 (37°C, 5% CO<sub>2</sub> + 95% air)하였다. 실험은 3회씩 독립적으로 실시하였으며 결과는 mean±SD로 표시하였다.

### ④ 이주능 시험

Matrigel migration assay를 사용 (Chung et al., 2004b; Ha et al., 2004c)하였다. Matrigel-코팅된 filter inserts (8 mm공작크기)를 Becton-Dickinson (NJ, USA)사의 24-well invasion chambers에 고정후, HASMC ( $5 \times 10^4$  cells/well)세포를 일정 키운 뒤 TNF-처리하였고 HASMC를 24시간 배양 후 을 여러 농도로 (0, 50, 100, 250 and 500 g/ml) 처리하였다. 500:1의 배양액을 invasion chamber에 첨가하였고 TNF-처리배지를 처리하지 않은 세포는 대조군으로 사용하였다. Matrigel invasion chamber를 37°C, 24시간, 5% CO<sub>2</sub>에서 보온하였다.

### ⑤ 참나무추출액의 MMP-9 젤라틴젤 zymography측정

건조 참나무추출액 구성약재를 세절하여, 50 mM PBS (pH 7.2)용액에서 분쇄한 뒤, 4 °C, 15,000 xg에서 20분간 원심분리하였다. 그 후 Sample 5g을 취하여 10배량의 MeOH을 가하여 70°C에서 3시간 동안 가온 침출하여 여과(동양여지 No. 1)하고 여액을 모아 MMP-9저해실험에 사용하였다. MMP-9 활성은 (39-41)방법으로 실시하였다. 참나무 추출액은 농도별로 ( 0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 g/ml) 실시하였다.

### ⑥ Densitometric 및 통계분석

MMP-9활성의 자이모그램 Gel-Print System (Core Bio Corp., Seoul, KOREA)

로 측정 수치는 means±SD로 표시하였다.

## 나. 연구수행 결과

### (1) 수증기처리에 의한 추출물의 성분분석

#### (가) 저분자 리그닌계 원료생산을 위한 전처리 연구

본 실험에서 제공된 공시재료의 베이스 화합물의 화학적 조성분석 결과를 Table 35에 나타냈다. 냉수, 온수, 유기용제, 알칼리추출물과 같은 추출성분은 신갈나무가 이태리포플러보다 약간 많았으며, 리그닌 함량을 나타내는 클라손리그닌 함량은 20% 전후로 거의 비슷하였다. 알칼리 추출물 함량이 다른 추출물에 비해 양이 많은 이유는 알칼리 가열처리에 의해 냉수, 온수 추출물 및 유지, 수지, 밀랍, 정유, 리그닌 및 헤미셀룰로오스의 일부가 동시에 추출되기 때문이다. 본 실험에 사용된 공시재료인 신갈나무와 이태리포플러의 탄수화물 분석은 알디톨 아세테이트법에 의해 GC로 분석하였으며, 내부 표준물질로는 inositol을 사용하였다. 그 분석 결과는 Table 36에 나타냈다.

목재 전체의 탄수화물 중 글루코스 잔기의 함량은 신갈나무 64.8%, 이태리포플러 71.2%로서 신갈나무보다 약간 높게 나타났다. 이때 글루코스 잔기는 거의 대부분 셀룰로오스에서 유래되지만 일부는 헤미셀룰로오스에서도 유래되는 것으로 알려져 있다. 또 활엽수재 헤미셀룰로오스의 주체인 4-O-methyl glucurono-xylan으로부터 유래되었다고 생각되는 xylan잔기는 25~30%로, 신갈나무가 이태리포플러보다 약 5% 높게 나타났다. 따라서 본 연구에 사용된 목재의 헤미셀룰로오스는 거의 대부분 xylose잔기로 구성되어 있다고 추정할 수 있다. 아라비노스와 갈락토스 잔기는 아라비노갈락탄에서 유래되며, 활엽수재 헤미셀룰로오스에는 갈락토글루코만난이 존재하지 않기 때문에 만노스 잔기는 글루코만난에서 유래되었다고 생각된다.

Table 35. 목재의 화학적 조성(%)

Characters	Quercus	Populus
cold water extractive	2.0	1.7
hot water extractive	4.8	3.4
ethanol-benzene extractive	2.6	1.1
alkali extractive	24.2	22.4
Klason lignin	20.8	21.7
ash	0.6	0.8



Table 36. alditol-acetate법에 의한 목재의 탄수화물 조성

species	sugar composition(%)					
	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Rhamnose
Quercus	2.9	29.6	1.7	1.4	64.8	T
	(1.9)	(21.4)	(1.1)	0.8	(46.1)	(T)
Populus	0.9	25.4	3.8	T	71.2	T
	(0.6)	(18.4)	(2.7)	(T)	(55.6)	(T)

(나) 원료물질 추출을 위한 전처리재의 성상

신갈나무재와 이태리포플러재의 수증기 전처리후의 탄수화물 분석 및 리그닌 함량 측정 결과를 Table 37에 나타냈다.

신갈나무재 및 이태리포플러재의 고압 수증기 전처리재에서는 수증기 처리조건(처리압력 ,kgf/cm<sup>2</sup>- 처리시간, min.)에 따라서 목재구성 탄수화물의 구성성분 함량이 달라졌다. 수증기 전처리조건에서 같은 압력하에서 전처리 시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 감소하였으며, 특히 xylose잔기의 함량이 급격하게 감소하였다. 또 같은 전처리 시간에 있어서 수증기압이 높아질수록 비슷한 경향을 나타내었다. 이런 경향은 수증간에도 차이가 없었으며, 전처리 조건에 의한 영향으로 판단되었다.

지난해 보고한 내용과 같이 Table 36과 같은 전처리조건에서 처리후 기건시킨 목분의 입자분포를 측정한 결과, 같은 수증기압 조건하에서 처리시간이 길어질수록 20mesh이상이 감소하고 80mesh이하 부분이 증가하는 경향을 나타냈고, 같은 전처리 시간하에서 수증기압을 증가시킨 경우에도 같은 경향을 나타낸 것으로 보아서, 전처리 조건이 가혹해질수록 전처리후의 목재입자는 더욱 미세화됨을 알 수 있었다.

Table 37. 고압 수증기 전처리에 의한 탄수화물 조성과 리그닌 분석

species	material (kgf/cm <sup>2</sup> -min.)	sugar composition (%)						Klason lignin(%)
		ara.	xyl.	man.	gal.	glu.	rham.	
Quercus	25-3	0.7	18.6	1.6	T	78.9	0.2	28.3
	25-6	0.5	11.4	1.4	T	86.7	T	33.5
	25-9	0.4	5.9	1.0	T	92.4	0.3	38.0
	30-3	0.3	10.3	0.8	T	88.6	T	36.3
	30-6	0.7	3.8	1.0	T	94.5	T	42.8
	30-9	0.4	2.1	0.5	T	97.0	T	45.1
Populus	25-3	0.4	17.2	2.4	T	80.0	T	31.3
	25-6	0.4	7.9	2.4	T	89.3	T	36.4
	25-9	T	3.8	1.0	T	95.1	T	36.9
	30-3	T	6.2	1.8	T	92.0	T	32.1
	30-6	T	1.5	T	T	98.4	T	40.2
	30-9	T	2.1	T	T	97.9	T	44.4

(다) 효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출

Table 36에서 보는 바와 같이 에너지 효율적인 측면에서 고압의 수증기 전처리조건은 25-9(kgf/cm<sup>2</sup>-min.)이 적당할 것으로 판단되었으며, 수증기 전처리재의 처리수율과 시료의 파쇄상태 등의 검토로부터 원료의 1회 고온 고압처리조건에서의 장비의 최대 처리량은 장비의 용량에 의존하지만, 약 10 ~15kg의 목재칩 투입이 효율적일 것으로 판단되었다. 이때의 처리 수율이 95% 이상으로 나타났으며, 고압의 수증기 전처리된 원료를 회수하여 열수추출 장치에서 약 60℃로 1시간 교반하여 저분자 목질계 섬유를 추출한 후 여과와 탈수공정을 거친 후, 당액과 섬유소를 분리하였다. 이렇게 분리시킨 당액은 재차 정제과정을 거친 후, 생활대사성 질환 예방을 위한 식품첨가물 등으로 활용 가능하고, 당화액 원료자체는 수율이 낮긴 하지만 알콜 발효 등의 과정을 거친다면 바이오에탄올 등으로 전환 가능하다. 저분자화된 분리 섬유소는 식이섬유소로서 활용이 가능하며, 전체 시스템 플로우 는 다음과 같이 요약 가능하다.

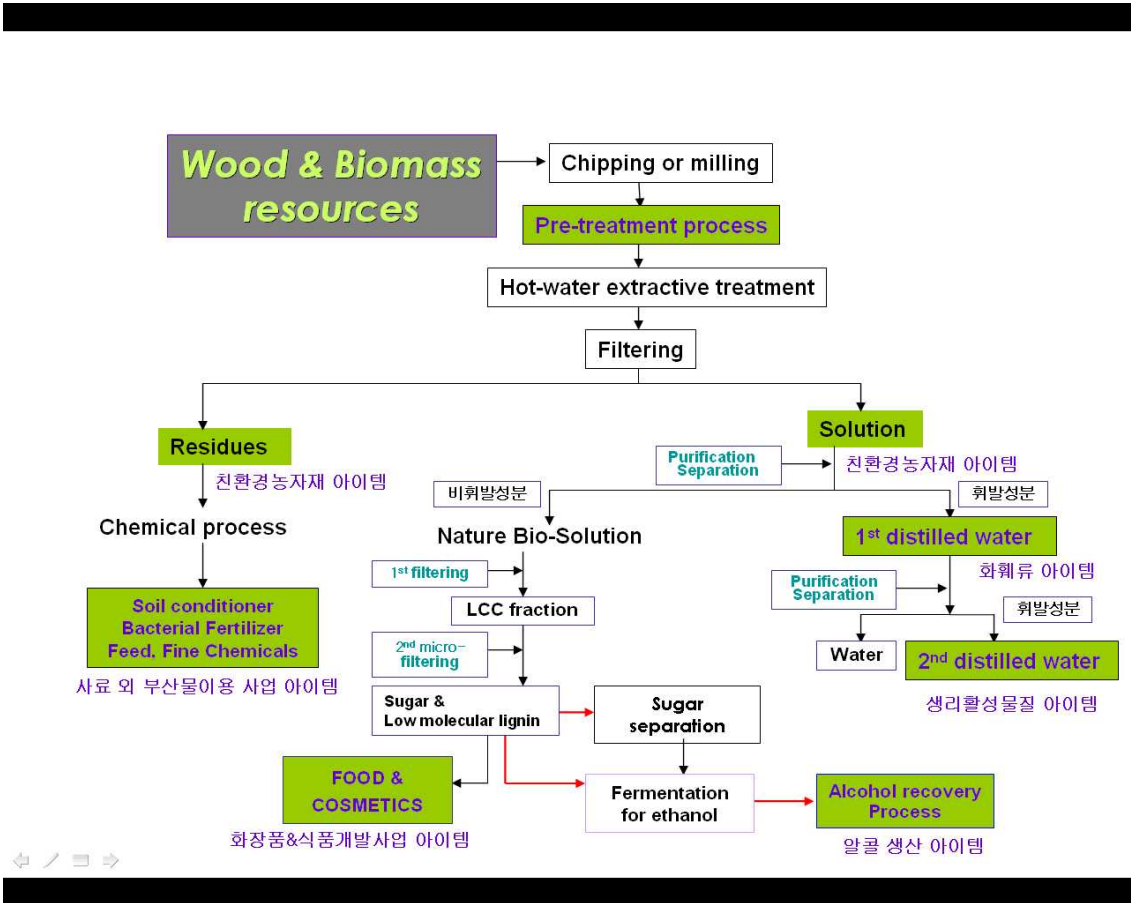


Fig. 45. 전처리 공정시스템의 도출 및 추출기술 system flow.

(라) 항산화제 및 면역증강 활성을 갖는 참나무 수액

본 연구는 국내산 신갈나무(학명: *Quercus mongolica*, 이하 참나무) 추출액에 관한 것으로, 열수 추출액은 항종양활성, 심혈관예방치료, 항종양, 노화방지(항산화제), 면역증강 활성을 가짐으로써 항종양제, 노화방지(항산화제) 및 면역활성화제용 치료제로 유용하게 사용될 수 있다. 참나무 추출액의 사람동맥유래 평활근세포의 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  유발 이주활성 억제효과 및 matrix metalloproteinase-9 억제활성을 확인하였다. 참나무 추출액을 세절하여 50 mM 인산 완충용액에서 분쇄한 뒤 원심분리 후의 침전물을 열수추출하여 제조되고 항종양활성, 노화방지(항산화제) 및 면역증강 활성을 가지는 열수추출액을 제공한다. 또한, 상기의 참나무추출액은 B-림프구 자극활성 및 항종양활성을 갖는다.

참나무 추출액 500g을 세절하여, 50 mM 인산완충액-생리식염수 (PBS) (pH 7.2)용액에서 분쇄기 (Tekmar Co., Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 분쇄한 뒤, 4°C, 15,000 xg, 20분간 원심분리하고 그 침전물을 열수추출하여 우선, 참나무 추출

액을 얻고 이것은 시험관에서의 다클론 항체 (poly-clonal antibody)생성을 촉진하며, 추출한 모든 분획을 생쥐에 투여시 B-림파구 (lymphocyte) 자극활성을 나타낸다.

본 연구의 참나무 추출액은 임상투여시에 경구 또는 비경구 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 연구의 참나무 추출액은 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 생약 참나무 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용 될 수 있다. 참나무추출액의 유효용량은 (350)~(600)mg/kg 이고, 바람직하기로는 (200)~(500) mg/kg 이며, 하루 1~3 회 투여될 수 있다. 또한, 본 연구의 열수 추출액중에서 선택되는 하나이상을 유효성분으로 하는 기능성 건강보조식품을 제공하는데 이용될 수도 있다.

- 혈관평활근세포 이주능과 matrix metalloproteinases (MMPs)생성억제를 통한 동맥경화억제효과

혈관평활근세포 vascular smooth muscle cells (VSMC) 의 이주능과 matrix metalloproteinases (MMPs)생성능은 동맥경화의 중요한 요인이다. 본 연구에서는 참나무추출액의 혈관계질환치료예방에 효과가 있음을 확인하고 TNF-로 유발된 사람동맥평활근세포 (HASMC)의 이주능, MMP-9활성에 대한 억제활성을 검토하였다. 참나무추출액의 사람동맥평활근세포에 대한 독성을 XTT방법으로 검토한 결과, IC50 = 90 ug/ml에서 약한 세포독성을 나타내었다. gelatin zymography법으로 이들 참나무추출액 분획에 대한 matrix metalloproteinase (MMP)-9 활성화에 대한 억제도를 검토한 결과, TNF-a처리 HASMC는 세포이주 활성이 관여하는 MMP-9을 분비하였으며 참나무추출액은 이 효소를 강하게 억제하였다. 참나무추출액은 농도의존적으로 MMP-9활성을 억제하였으며 Matrigel migration방법에서 농도의존적으로 TNF-유발 HASMC세포이주를 억제하였다 (IC50 = 65 ug/ml). 이러한 결과는 참나

무추출액이 TNF-유발 HASMC세포의 이주억제활성을 가진 항동맥경화활성을 가짐을 알 수 있었다.

혈관평활근세포vascular smooth muscle cells (VSMC)의 증식과 이주능은 동맥경화와 동맥벽손상후 혈관협착(intimal thickening, stenosis)발생의 주요요인이다 (42). 혈관조직 중간층(media)에 존재하는 VSMC는 낮은 세포분열능을 가지지만, 동맥경화나 혈관벽 손상 개시단계에서 혈관평활근세포 (aortic smooth muscle cells)는 여러가지 성장인자들의 협조로 증식단계로 들어가 혈관비대를 유발시킨다 (43-45). 그러나, VSMC의 복제와 이주는 세포주위의 세포외기질의 리모델링과 분해를 필요로한다 (46, 47). VSMC는 collagens, elastin, 그리고 proteoglycans을 포함한 세포외기질성분들을 합성한다 (48, 49). 세포외기질의 축적과 분해에서 불균형은 혈관벽손상이후 진행되는 혈관내피조직 두꺼워짐 현상을 유발시킨다 (49). SMC침윤과 이주기전의 이해가 평활근세포이주와 혈관벽 두꺼워짐현상을 특징으로 하는 동맥경화를 예방하고 치료하는데 중요한 요소이다.

MMP들은 zinc-의존성 endoproteinase일종으로 세포외기질 extracellular matrix (ECM)을 분해한다 (50). MMP는 interstitial collagenases (MMP-1), type IV collagenases 또는 gelatinases (MMP-2, -9), 그리고 stromelysins (MMP-3)으로 구성된다 (51, 52). 이들 MMP중에서, gelatinase는 collagen인 천연기저막을 분해하며, MMP-2/-9의 발현은 동맥경화병변을 유발한다 (53). 최근의 in vivo 연구결과, MMP-9가 VSMC 이주와 증식을 통하여 동맥병변유발에 결정적임이 알려져 있다(54). 또한 MMP-9기본 활성은 매우 낮지만 TNF-에 의해 동맥평활근세포가 그 생성을 유도한다 (48, 55, 56). 본 연구그룹에서는 ERK1/2가 TNF-유발 동맥평활근세포에서 NF- $\kappa$ B와 AP-1전사인자를 경유하여 MMP-9생성을 촉진함을 밝혔다(55, 57, 58).

세포의 내인성 MMP inhibitor들은 tissue inhibitorsof metalloproteinase (TIMPs)로 알려져 있으며 matrix형성과 파괴균형을 유지시킨다 (59). 그러므로 합성MMP억제제들 (예, BB94 batimastat)와 BB2516 marimastat)들이 개발된바 있다. BB94는 collagen유사구조를 갖으며 MMP효소분자의 활성부위에 있는 Zn이온을 착염시키는 활성을 갖으므로 불활성형의 효소를 만들게 된다 (60). 이러한 MMP저해제들이 지난 몇 년간개발되어 rheumatoid arthritis, cancer invasion 및 cardiovascular diseases등 여러질병의 세포외기질 리모델링에 중요하게 연구되고 있다. 그래서 합성MMP inhibitor들은 손상된 rat 동맥에서 상처치유활성이 있음이 알려졌다 (61, 62).

동맥중간층에서 분리한 동맥평활근세포의 이주능을 줄이기 위해 (63), 그리고 배양된 토끼 동맥평활근세포의 세포증식억제와 탐식세포조절능을 억제하기 위하여 MMP-9 inhibitor들이 고안되었다 (64). 또한 일부 천연물들이 동맥경화억제에 사용되고 있으며 (65), 전통한약자원들이 동맥경화치료에 쓰이고 있다. 일반 목재탄화시 얻어지는 목초액은 한방에서 혈관질환에 사용되지만 동맥경화억제기전이 해명되

지 않았다.

참나무 추출액이 폐놀계화합물을 함유하며 간세포보호능, 적혈구 산화방지등이 알려져 있다. 그리고, acetylcholinesterse저해활성과 항염증활성이 있다. 이러한 연구에도 불구하고 아직 혈관계증식억제연구는 없다. 특히 사람의 동맥평활근세포의 이주능을 억제하는 활성은 보고된바 없기에 본 연구에서는 동맥평활근세포의 이주능억제활성을 보고한다.

항동맥경화제제들이 녹차의 polyphenols, resveratrol, limonene, 마늘의 organosulfur 성분에서 보고된 바 있다(66). 특히 녹차의 polyphenol과 그 성분인 epigallocatechin gallate는 MMP-9활성을 억제한다 (39, 40, 41, 67, 68). 본 발명에서 참나무 추출액이 MMP활성억제를 통하여 혈관내피 두꺼워짐 현상을 억제한다는 가설을 세우고 TNF-에 의한 동맥평활근 세포의 이주능 억제활성을 보고한다. 참나무 추출액이 MMP-9효소를 저해하며 동맥평활근세포의 이주능을 억제하여 동맥경화를 억제함을 보고한다. 동맥경화치료의 핵심이 평활근세포의 이주능억제와 MMP-9활성억제를 알려진 감안할때 MMP-9억제활성과 이주억제활성을 갖는 천연항방제제개발은 동맥경화예방 치료의 지름길이다 (40, 41, 68). 본 연구에서는 참나무 추출액의 MMP-9활성억제능과 세포이주능억제능을 발견하고 항동맥 경화제제로서 응용성을 보고한다. 참나무 추출액은 부작용이 없고, 구강 식이가 가능하고, 가격이 저렴하며, 인체응용의 오랜역사성을 가지고 있으므로, 동맥경화예방 치료제로 보고하고자 한다.

● MMP저해활성을 통한 암전이 및 암화억제활성의 검정

한편, 암의 전이(metastasis)는 초기종양으로부터 암세포가 신체의 다른 부위로 전파되는 과정으로 악성 종양의 가장 큰 특징이라 할 수 있다. 최근 암 연구 보고에서 암의 전이로 인한 사망은 암 관련환자 사망의 약 90%를 차지하며, 바로 암의 전이가 암환자 사망의 중요한 원인임을 역설하였다. 지난 수년간의 종양세포에 확산에 대한 집중적인 연구는 암 전이 과정의 분자적인 기작에 대한 적지 않은 이해를 가져왔다. 암의 전이는 암세포와 암세포 주위와의 복잡한 상호작용으로 발생한다. 암세포 주위는 암세포가 정상적으로는 통과할 수 없는 지지구조체인 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane)으로 되어 있다. 암세포는 이러한 세포외 장벽을 극복하기 위하여 ECM과 기저막을 분해할 수 있는 다양한 종류의 proteinase를 생산, 분비하는데, 그중에서도 특히 matrix metalloproteinase(MMP)가 중요한 역할을 담당한다. 정상적인 생리적 환경에서의 MMP들은 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP)라는 내생 MMP 저해제에 의하여 엄격하게 조절된다. 그러나 암의 증식, 침윤(invasion), 전이 과정 중에는 MMP와 TIMP 간의 평형이 무너지고 과다한 MMP가 분비된다. 따라서 MMP 저해제는 암의 침윤과 전이를 효과적으로 막을 수 있는 새로운 표적으로 기대되어

많은 암 연구자들이 새로운 개념의 항암 치료제로서 MMP 저해제 개발에 연구를 집중하고 있다.

현재 많은 연구자들에 의해 MMP에 대한 저분자의 선택적 저해제의 탐색 및 합성 design의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 화학적으로 합성된 저해제와 천연물로부터 분리된 저해제의 전 임상 또는 임상 실험의 결과는 MMP 저해제가 암의 치료에 있어서 새롭고 유망한 치료제가 될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 기존의 peptide 구조의 부분적인 변형에 관한 것으로 합성 저해제의 경우, 이들의 제한된 생체이용성(bioavailability), 짧은 반감기(half-life), 효소 선택성의 결여, 수용액에서 낮은 용해도 등의 적지 않은 문제점들이 있다. MMP의 중요한 생리적 활성화에 비추어 볼 때 특정 MMP에 대해 선택성이 떨어지는 강력한 저해제의 지속적인 투여는 심각한 부작용을 야기할 것으로 예상할 수 있다. 식물이나 미생물 등의 천연물로부터 몇 종류의 MMP 저해제가 탐색되어 개발과정 중에 있지만 효소 저해활성의 빈약함과, 강한 세포 독성 때문에 치료약으로 개발되기까지는 많은 문제점이 있다. 기존의 MMP 저해제들의 이러한 문제점들을 극복하기 위한 한 방법으로 민간에서 임상효능이 실증되어온 한약재로부터 MMP 저해제를 탐색하여 치료약으로의 개발은 매우 실제적이고 효과적인 전략이라 할 수 있다.

Type IV collagenase(gelatinases) 인 MMP-2와 MMP-9가 암의 전이와 밀접한 관련이 있다. 암의 전이에 가장 큰 장벽인 ECM과 기저막의 주된 성분은 type IV collagen인데, MMP-2와 MMP-9는 catalytic domain 내에 gelatin과 collagen에 대해 친화성이 있는 fibronectin-like domain을 포함하고 있으며, type IV collagen에 대하여 기질 특이성을 갖고 있다. 뿐만 아니라 인간 암세포주 배양과 실험 동물모델에서 MMP-2와 MMP-9가 암의 전이와 연관되었다고 입증되었으므로, 이를 분비하는 세포주를 이용하여 MMP 저해제를 탐색하는 전략이 효과적이다. Type IV collagenase를 분비하는 세포주 탐색을 위해 HT1080, C32TG, HepG2 T98G, MIA-PaCa2, UAcc62, U937, G361 등 다양한 종양 세포주를 이용하여 무혈청 배지에 TPA와 TGF- $\beta$ 1등의 첨가에 따른 type IV collagenase의 유도정도를 확인한다. Gelatinase의 효소 활성측량방법으로는 방사능 동위원소가 표지된 gelatin(3H-acetylated gelatin)이나 광합성 peptide(fluorogenic MMP-2/MMP-9 substrate, DNP-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-OH)를 이용하여 분해산물의 방사능량이나 형광량을 측정하는 방법과, 활성 단백질 전기영동법을 이용한 gelatin zymography가 있다. 이들 중 gelatin zymography가 비교적 간편하고, 적은 시료량으로 효소활성을 측량이 가능하다. 또한 대략적인 분자량을 알 수 있기 때문에 분비되는 MMP를 동정할 수 있으므로 편리하다.

#### ● MMP 저해제 탐색

본 실험에서는 gelatin zymography를 약간 변형하여 MMP 저해제 탐색에 이용

하였다. 먼저 acrylamide 젤 제조시 기질인 gelatin을 1.0mg/ml 첨가한 분리 젤을 만들어 SK-Hep1세포 혈청 배양액을 SDS시료 완충용액(4% SDS, 125mM Tris-Cl(pH 6.8), 10% glycerol)으로 전기영동한 후 Triton X-100이 포함된 50mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액으로 30분간 2회 세척하여 SDS를 제거한 후 zymography 용 incubation 완충용액(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>)으로 20분간 다시 세척하였다. 용매 참나무 추출액과 zymography 용 incubation 완충용액을 혼합하여 37°C에서 20시간 배양한 다음 gel을 2.5% Gel을 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색시킨 후 탈색하여 gelatin 분해능이 현저하게 저하된 것을 MMP 저해제 활성이 있는 것으로 판단하였다.

최근, 생약의 약리활성을 이용한 암의 치료 및 예방이 중요시되고 있다. 예를 들어, 대나무 잎에서 추출한 다당류는 사르코마-180 (Sarcoma-180)이 이식된 생쥐의 복강암에 효과적인데, 이러한 종양억제 약리활성은 간접적인 숙주를 매개로 한 면역증강효과에 기인하며, 특히 담자균류 세포벽에 존재하는 다당류의 활성이 중요한 것으로 알려져 있다. 이러한 약리활성을 가지는 식물은 숙주방어활성 (host-defense activity)과 탐식세포 (macrophage)활성을 촉진하므로써 면역증강 (immuno-potentiating)과 항종양활성 (anti-tumoral activity)을 나타내는 것으로 평가된다. 또한, 면역계 활성화와 항종양에 대하여 임상적으로 효과가 인정되는 약물은 소수에 불과하므로 현재까지 항종양에 유효한 약물탐색이 많은 연구자에 의해 이루어지고 있다.

참나무 추출액은 건조한 약재이다. 비록 다른 약재와의 복합처방에 한정되어 있을지라도, 과거 한방약재로서 일반 목재추출액(목초액)은 청열해독에 주로 사용되어 왔으며 특히, 인체 질환 염증질환 및 암의 치료에 효과적임이 알려져 있다. 그러나 생리활성에 대한 연구는 거의 없다.

#### ① 참나무추출액의 사람 동맥평활근 세포 (HASMC)에 대한 독성

참나무추출액의 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성은 키트를 사용하여 HASMC cells ( $5 \times 10^4$  cells/well)를 24시간동안 96-well microplates로 참나무추출액농도 (0, 50, 100, 200, and 500 ul/ml)에서 측정된 결과 농도 의존적으로 세포독성이 인정되었다 (Fig. 46). 참나무추출액은 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대해 (IC<sub>50</sub> > 500 ul/ml)농도로 독성을 나타내어 독성이 미약하여 인체에 해가 없을 것으로 보인다.

HASMC cells에 대한 독성효과를 알아보기 위하여 XTT cell proliferation assay kit를 사용하여 측정하였다.  $5 \times 10^4$  cells를 24시간동안 96-well microplates (volume 100 l/well)배지에서 여러 가지 농도의 참나무추출액 (0, 50, 100, 200, and 500 ug/ml)과 보온하였다. 각각의 수치는 대조군의 %로 표시하고 표준편차로 표현하였다.



## ② 참나무추출액의 농도 의존적인 MMP-9 저해활성

참나무추출액의 MMP-9억제활성을 검토한 결과, Fig. 47에 나타난 바와 같이 농도의존적으로 MMP-9 활성을 억제하였다(IC<sub>50</sub>: 24 g/ml). 참나무추출액은 이 이상의 농도에서도 MMP-9활성을 강력하게 저해하여 세포독성은 미약하면서 MMP-9 활성은 강하게 저해하였다.

## ③ 참나무추출액의 사람 동맥평활근 세포 이주능에 미치는 영향

사람 동맥평활근 세포를 조건배지에 세포수 (5 x 10<sup>4</sup> cells/200 ul)로 조정하여 matrigel invasion chamber에서 여러 농도의 참나무추출액 (0, 20, 50, 100, 200 ug/ml)을 첨가하여 24시간동안 37C, 5% CO<sub>2</sub>에서 보온하였다. Fig. 48에 나타내었듯이, 필터 안으로 침윤한 세포수가 참나무 추출액 농도의존적으로 크게 감소하였다(IC<sub>50</sub> = 22 ug/ml). 이러한 결과는 참나무추출액이 사람 동맥평활근 세포의 침윤-이주능을 효과적으로 억제함을 제시한다.

필터 안으로 침윤한 세포수를 수목추출액을 첨가하면서 측정함. 참나무 추출액은 농도 의존적으로 이주도를 크게 감소시켰었다 (IC<sub>50</sub> = 46ug/ml). 이러한 결과는 참나무추출액이 사람 동맥 평활근 세포의 침윤-이주능을 효과적으로 억제함을 제시한다.

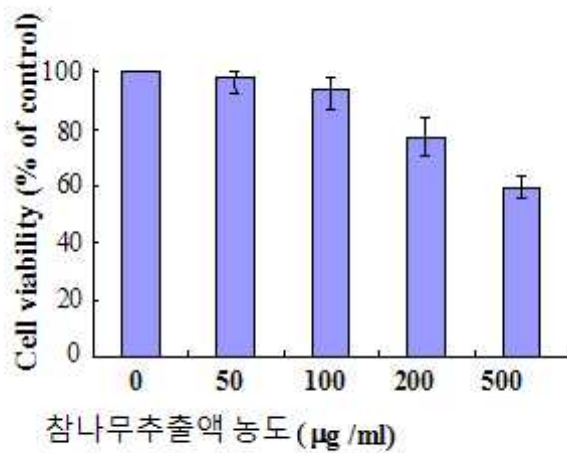


Fig. 46. 참나무추출액의 세포증식에 미치는 영향.

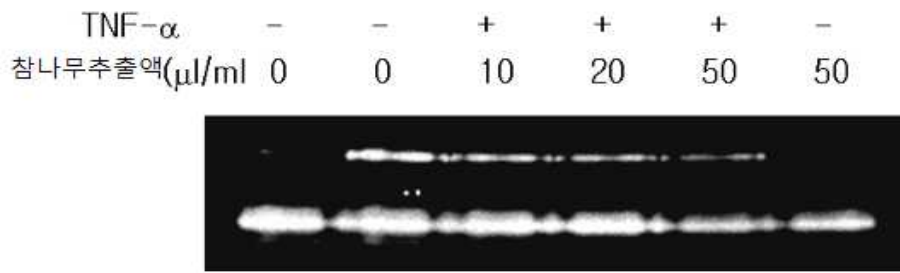


Fig. 47. TNF- $\alpha$  처리 사람 동맥평활근 세포에서 참나무추출액 분획의 MMP-9활성에 대한 효과.

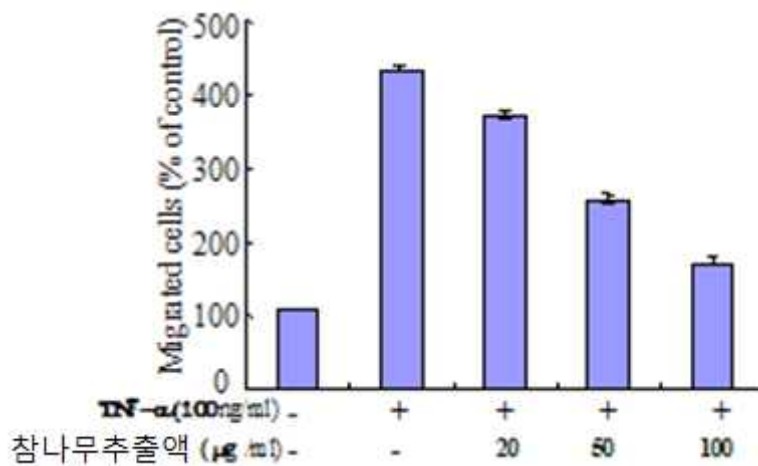


Fig. 48. 사람 동맥평활근 세포 이주능시험

④ 참나무추출액의 사람정상 간세포주(Chang)에 대한 세포독성

사람의 간세포(Chang,  $5 \times 10^3$ )를 각각 96well microplate에 well당  $198 \mu$ l씩 분주한 후 MTT assay를 실시하였던 바, 세포 독성이 없거나 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 49).

⑤ 참나무추출액의 사람간암세포(Hep 3B)에 대한 세포독성

사람의 간암세포(Hep3B,  $5 \times 10^3$ )를 각각 96well microplate에 well당  $198 \mu$ l씩 분주한 후 세포독성을 검사한 결과, 간암세포에는 강한 선택적인 독성을 나타내었다.

⑥ 참나무추출액의 B-림파구 자극활성

참나무 추출액의 모든 분획에 대한 B-임파구 자극활성을 검토하기 위해 실험동물은 암컷의 생쥐 (C57BL/6XC3H) F1 (B6C3F1)을 구입하여 17-22g 중량이 될 때 비장적출실험에 이용하였다. 양의 적혈구(sRBC)는 한국배지주식회사(서울)에서 구입하였고 기니아피그 보체와 RPMI 1640배지는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)사 제품을, 리포폴리사카라이드 (Lipopolysaccharide, LPS)는 시그마사 제품을 사용하였다. 임파구의 시험관 내 활성화 및 항체생성 세포수 (AFC) 검정은 다음과 같다. 비장세포를 RPMI 1640배지 (10 % 소태아혈청함유)에서 배양하여 세포수를  $5 \times 10^6$  cells/ml로 조정 한 후, 웰당 0.5ml씩 (처리군당 4개씩) 48-웰의 플레이트 (Costar사 제품)에 옮긴 후, 시료 또는 LPS (25 $\mu$ g/ml, 시그마)를 첨가한다. 시험관 내 자극을 위하여 플레이트를 37C의 Bellco (Bellco Biotech., Vineland, NJ, USA) 스테인레스철 조직배양기에서 흔들며 가면서 배양한다.

항체생성은 배양 2일뒤에 측정하며 TNP(trinitrophenyl)-합텐 처리된 sRBC에 대한 AFC를 Jerne 플라크검정법으로 측정하고 세포수는 헤마시토미터 (hemacytometer)를 사용하였다. 이때 항체생성 세포수를 활성치로 나타내고 비활성은 다음과 같이 나타냈다; 즉, 일반적으로 항체생성능이 강한 대조군으로 사용되는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide; LPS) 25ug/ml를 대조군으로 처리 하였을 때를 기준으로 분획 Fr.-1 1mg 투여시의 활성을 1로 하여 보정하였다. 즉, 비활성 = LPS 25ug/ml 을 처리할 때 나타나는 항체생성치로서 분획 Fr.-1의 경우 1.03mg에 해당한다. LPS의 활성이 거의 25ug/ml농도에서 포화되므로 이 양을 대조군으로 사용하였다. 참나무 추출액의 모든 분획 2 mg씩 B-임파구 자극활성을 C57BL/6XC3H 생쥐에서 다클론 항체생성으로 검정한 결과, 특히 분획 Fr.-2가 가장 강한 B-임파구 자극활성을 나타내었다(Table 38).

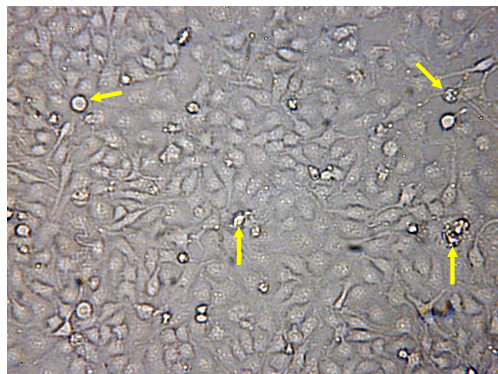


Fig. 49. 정상간세포주 독성.

화살표는 apoptosis유발 약간의 세포독성을 나타냄.

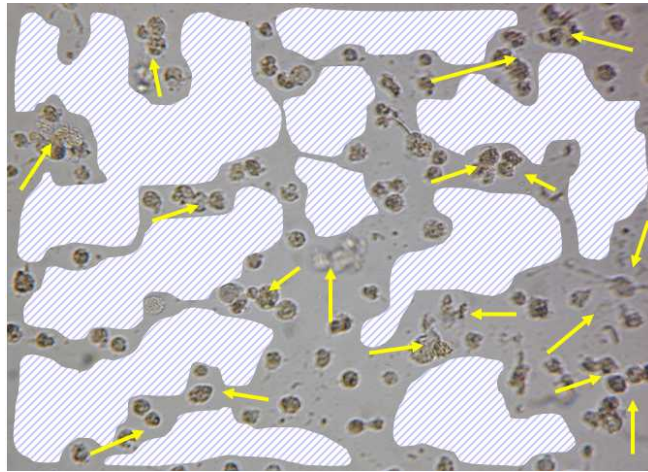


Fig. 50. 간암세포주에 대한 독성.  
 화살표는 apoptosis유발 강한 세포독성을 나타냄.

Table 38. 참나무 추출액의 B-임파구 자극활성 검정

분획	투여량(mg)	비활성 <sup>a)</sup>
참나무추출액	2.0	2
대조군	-	1

<sup>a)</sup> 대조군 LPS 25 ug처리시의 활성을 100 %로 하였다.

⑦ 참나무추출액의 B-임파구 자극 활성의 LPS군과 비교 검정

참나무 추출액을 각각의 시료 0.1mg/ml에 대한 면역자극 검정을 한 결과, 대조군인 LPS군의 89%활성을 나타내었다(Table 39).

⑧ 항종양활성의 검정

참나무 추출액에 있는 다당류의 항암작용을 다음 방법으로 검정하였다. 생후4주 된 ICR계 생쥐에 사르코마 (Sarcoma) 180세포를 (0.1ml,  $7 \times 10^6$  세포) 쥐의 우측 서혜부 피하에 이식하였다. 실험표본 물질은 PBS에 적당한 농도로 용해시켜 고압 멸균한 뒤 내부복막 가까이에 종양이식한 후, 24시간 이후부터 10일동안 매일 주사 (2 mg/100 g)하였다. 모든 쥐들을 5주간 관찰한 후 종양의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해, 쥐를 죽이고 종양을 절제하여 무게를 측정하므로써 다음의 식으로부터 종양의 성장억제비율을 구하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = 100 (A-B)/A$$

A는 대조군의 조양무게의 평균값이며 B는 실험군의 조양무게의 평균값이다. 완전한 퇴행은 실험쥐 숫자에 대한 완전한 퇴행을 보이는 쥐 숫자의 비율이다. 그 결과 사르코마 180 고형종양을 이식한 쥐에서 항종양활성이 2ml/100 g 투여로 95.3%의 종양억제율을 나타내었다(Table 40).

Table 39. 참나무 추출액의 B-임파구 자극활성

분획	투여량(mg)	비활성
LPS <sup>a)</sup>	2.0	100
참나무추출액	2.0	89
a) 대조군 LPS의 활성을 100%로 하였다.		

Table 40. 참나무 추출액의 사르코마 (Sarcoma)-180에 대한 종양억제효과

분획	투여 (mg/100 g x 10일간)	종양무게	억제율	종양생쥐에서 완전한 억제갯수
대조군	2.0	12.04±1.55	-	0/10
참나무추출액	2.0	6.65±1.52	44.7	1/10

⑨ 참나무추출액의 탐식세포 자극활성 (macrophage-stimulating activity)

열수 참나무 추출액의 복강 및 구강식이를 위해 PBS에 녹인뒤 투여하였다. 구강식이를 위해서 강제로 섭취하게 하였으며, PEC 분리와 비장의 탐식세포 활성을 위해 적출하였다. 비장의 탐식세포 (Splenic macrophage)분리는 조직을 부드럽게 부순 뒤 Tris 완충액-염화 암모늄 용액으로 조직을 단일 세포화시키고, 세포 추출기 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)을 통과시켜 수행하였다. 잔존세포는 HBSS를 완벽하게 세척하고, RPMI배지 (10 % 가열불활성화 소태아혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 함유, RPMI-FCS)로 재희석하였다. 희석된 세포는 플라스틱용기에, 배양된 탐식세포는 RPMI-FCS-HEPES에 부착시키도록 만들었다.

PEC는 참나무 추출액을 복강 및 구강 섭취 후에 5ml의 Hank의 균형용액 (HBSS)으로 말초동공으로부터 분리하고, 원심분리하여 세포덩어리를 HBSS로 두번 세척한 후 HBSS (25 mM-HEPES -2-hydroxyethyl -peperazine-N-2-ethane sulfonic acid 함유) 1 ml에 녹였다. 이렇게 얻은 PEC는 F-300 세포측정기 (Medical Electronics, Kobe, Japan)를 사용하여 그 수를 측정하였다.

PEC의 탐식활성의 측정은 형광 마이크로파티클 (microparticle)에서 배양하여 측

정한다. 즉, PEC ( $1 \times 10^5$ )를 원심분리하고 100 $\mu$ l의 HBSS-HEPES에 재회석 한 뒤, HBSS-HEPES로 100배 희석시킨 홀루오레스브라이트 카복실레이트 마이크로스피어즈 (Fluoresbrite carboxylate microspheres, 2.0 $\mu$ m; Polyscience, Warrington, PA, USA)를 20 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 배양액에 2ml의 냉PBS (3 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; EDTA-PBS함유)를 첨가하여 반응을 정지시킨후 세포덩어리를 모아 EPICS-프로파일 II 홀로우시토미터 (EPICS-Profile II flow-cytometer, Coulter, Hialeah, FL, USA)를 이용하여 탐식활성을 측정하였다. 화학 루미네센스 활성측정은 F-300 마이크로셀 (microcell)측정기를 사용하여 PEC와 비장의 탐식세포 밀도가  $4 \times 10^5$ /ml이 되도록 트리판 블루 (Trypan Blue)염색으로 세포수를 세고 RPMI-FCS-HEPES로 조정한 뒤, 500 $\mu$ l의 세포용액을 20 $\mu$ l의 0.2 % 루미놀 (luminol, 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, Sigma, Co., USA)이 함유된 폴리스티렌 큐벳에 옮긴다. 각각의 큐벳을 부드럽게 섞은 뒤 15분 후에 루미노미터 (luminometer, Multi-biolumat LB9505; Berthold, Wildbad, Germany)를 사용하여 측정하였다. 활성은 15분동안의 총활성으로 나타내었다.

비장의 탐식세포 활성에 대한 효과를 측정하기 위하여, 참나무 추출액을 10마리의 생쥐복강내에 투여하여 이중 3마리에서 비장의 탐식세포를 투여후 3, 6, 18일째에 분리하여 일시적인 화학 루미네센스를 측정하였다 (Table 41). 참나무추출액 투여 생쥐에서의 화학 루미네센스가 대조군보다 증가하였다. 생쥐 당 5mg씩 참나무 추출액을 투여한 생쥐의 PEC가 가장 높은 화학 루미네센스를 나타내었다. 이들 생쥐에서 비장의 탐식세포의 생성은 투여량 의존적임이 확인되었다. 참나무 추출액의 B세포자극활성을 다클론 항체생성 세포를 C57BL/6XC3H 생쥐에서 측정한 결과 5mg 투여에서 가장 높았으며(Table 42), B-세포자극활성을 나타내었다.

#### ⑩ 참나무 추출액의 독성 및 혈중누출효소에 대한 영향

상기에서 추출된 열수 참나무 추출액을 임상적으로 사용하려면 독성이 없어야 하므로, 독성검사와 간세포계 효소에 미치는 영향을 검토하였다. 무처리군의 정상랫트 (1군 5마리)에 대한 열수추출 다당류의 복강내 투여시의 치사량을 구하고자 하였으나, 5일동안 950 ug/kg이하 투여시에 사망을 일으키지 않았다. 또한 950 ug/kg을 복강내 투여시, 24시간 후의 S-GOT, S-GPT, S-Alp에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Table 43).

Table 41. 참나무 추출액의 비장 탐식세포의 화학 루미네센스 활성

처리일수	Count (x 10 <sup>-5</sup> )	
	대조군 (PBS)	목초액처리군
대조군	1.0	1.02
참나무추출액	1.61	2.11

3마리 생쥐의 복강내에 10 mg 를 투여한 뒤 3,6,18일째에 적출된 비장의 탐식세포의 화학루미네센스활성을 측정하였다. 대조군은 PBS처리군.

Table 42. 참나무 추출액의 B-임파구 자극활성

투여량 (ul)	상대활성 <sup>a)</sup>
LPS	100
참나무추출액 <sup>b)</sup>	11
대조군 <sup>c)</sup>	1

<sup>a)</sup>대조군으로서 LPS처리군을 100%로 하였다. <sup>b)</sup>참나무 추출액처리군. <sup>c)</sup>무처리군

Table 43. 참나무 추출액의 독성 및 혈중누출효소에 대한 영향

투여량(ul/kg)	시간(h)	활성(%)		
		S-GOT <sup>a</sup>	S-GPT	S-Alp
정상군(무처리군)		100	100	100
참나무 추출액 500	1	101.4± 8.1	100.6± 6.2	98.3± 5.2
	6	98.7± 5.2	105.3± 5.3	101.5± 3.3
	12	99.4± 7.5	105.3± 3.7	109.5± 9.6
	24	103.2± 6.3	96.5± 7.3	103.3± 8.6
참나무 추출액 1000	1	102.2± 3.3	101.2± 4.8	100.5± 8.6
	6	99.3± 7.3	109.3± 8.8	105.8± 12.1
	12	104.7± 10.2	105.2± 7.4	98.6± 8.7
	24	98.4± 8.7	106.4± 8.1	105.2± 9.4

<sup>a</sup> 각각의 수치는 5마리씩 3회 반복실험의 결과이다 (± S.E).

## ⑪ 참나무 추출액의 노화방지(항산화성)에 대한 효과

열수 참나무 추출액의 모든 분획에 대한 항산화성 유무를 확인하기 위해서 실험 동물은 일본 Air Logistics사의 4주령 B6C3F1 숫컷 생쥐로 한국 바이오 제노믹스사를 통하여 구입하여 다섯 군(1군 10마리)으로 나누어서 실험을 하였다. 제 1군(이하, 1군)은 정상군으로 물과 사료만으로 사육하였다. 제 2군(이하, 2군)은 생쥐당 17.5mg/Kg 의 비율로 DEN(N,N-diethylnitrosoamine)을 주 2회씩 8주간 복강 주사하였고[Kolaja, K. L., Xu, Y., Walborg, E. F., Jr., Stevenson, D. E. and Klaunig, J. E. (1998) J. Toxicol. Environ. Health A 53: 479-492] 이후에 12주를 더 사육한 다음에 경추 탈구법으로 도살하여 생화학적 검사를 실시하는데 이용하였다. 제 3군(이하, 3군)은 처음부터 열수 참나무 추출액을 물에 희석하여(500 ppm) 사료와 함께 사육하였고, 제 4군(이하, 4군)은 DEN을 8주간 복강 주사한 후에 9주부터 열수 참나무 추출액을 물에 희석하여 사료와 함께 사육하였다. 제 5군(이하, 5군)은 DEN을 복강 주사하면서 열수 참나무 추출액과 사료로 사육하는 군으로 분류하여 실험하였다.

Glutathione peroxidase는 생체내에서 생성되는 과산화수소를 물로 바꿔주는 과정에 관여하는 효소이며, Glutathione peroxidase의 활성도는 이 효소에 의해 생성된 oxidized glutathione(GSSG)이 glutathione reductase에 의해 glutathione(GSH)으로 되어 일정 수준의 GSH를 유지할 때, NADPH가 산화되는 것을 측정하는 방법으로 그 측정 방법은 다음과 같다. 0.1 mM EDTA를 함유하는 0.1 mM 인산염 완충용액(pH 7.0) 0.5 ml와 glutathione reductase 0.1 ml(0.24 unit), 10 mM GSH 0.1 ml 그리고 시료 0.1 ml를 혼합하였다. 이 혼합용액에 1.5 mM NADPH 용액 0.1 ml를 넣고 12 mM cumene hydroperoxide 0.1 ml를 가하여 340 nm에서 5분간 흡광도의 감소를 측정하였다. 1분동안에 1 $\mu$ M의 NADPH를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

암 유발 물질을 투여하지 않은 군들(1군과 2군)간의 비교에서 열수 참나무 추출액의 투여군에서 과산화물분해효소의 활성이 29 % 이상 증가함을 나타내었다, 또한 암 유발 물질의 투여군들간(2군, 4군 그리고 5 군)의 비교에서도 열수 참나무 추출액의 투여군(4군과 5군)에서 과산화물 분해효소의 활성이 유의적으로 증가하였다 (Table 44).



Table 44. 참나무 추출액의 과산화물분해효소에 대한 영향

Group(군)	unit/ mg protein ( % 활성)
정상군(1 군)	1.018 ± 0.063 (100)
대조군(2 군)	0.871 ± 0.074 (85.53)
(3 군)	1.315 ± 0.148 (129.15)
(4 군)	0.980 ± 0.111 (96.30)
(5 군)	1.168 ± 0.100 (114.87)

#### 4. 참나무 추출물의 항당뇨 효능

Glucokinase와 hexokinase는 간과 췌장에서 인슐린에 의한 혈당이용을 증대시키며 혈당농도를 감지하여 인슐린분비를 조절하는 효소로서 인슐린 비의존성 당뇨병(NIDDM)의 병인과 밀접한 관계가 있는 효소이다. Cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 췌장 도세포에서 인슐린 분비와  $\beta$ -cell에 대한 세포 독성을 조절하여 장기간 노출 시 인슐린 분비와 생합성을 저해하며  $\beta$ -cell을 파괴하여  $\beta$ -cell손상을 초래하여 IDDM을 유발한다. 신갈나무(*Quercus mongolica*, 이하 수목) 추출액 효과를 해명하기 위하여 IL-1 $\beta$ 유발 실험적 당뇨마우스의 glucokinase와 hexokinase의 활성을 검토한 결과 IL-1 $\beta$ 주사에 의해 체중과 공복 시의 glucose 및 insulin 분비가 증가되나 수목추출액 투여로 공복 시의 insulin분비가 감소하고 체중과 공복 시의 혈당은 유의성은 없으나 대조군에 비하여 감소하였다. 그러나 혈당수치가 정상군에 비하여 증가되며 수목추출액 투여로 현저히 감소하고 Insulin치의 상승과 분비지연도 수목추출액 투여군에서는 정상군과 유사하였다. 한편, 혈중 glucokinase와 hexokinase의 활성은 IL-1 $\beta$ 주사에 의해 현저히 감소되나, 수목 추출액 투여로 유의성 있게 상승되었다. 즉, 수목추출액은 IL-1 $\beta$ 로 유발된 실험적 당뇨병에서 포도당인산화 효소인 glucokinase와 hexokinase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

당대사와 인슐린 분비조절에 관여하는 효소인 glucokinase는 췌장의  $\beta$ -cell에서 대사 과정에 필요한 glucose 인산화 효소로, glucose를 glucose-6-phosphate (G-6-P)로 인산화시켜 glycogen을 합성시켜 肝의 포도당 합성을 조절한다. 또한, 췌장의 glucokinase는 혈당에 의해 효소 활성이 변화하며, hexokinase는 혈중 당을 조직 내로 흡수하여 G-6-P로 바꾸어 주어 일정한 동적 평형 상태를 유지시켜 준다. Alloxan에 의해 유도된 당뇨병 동물 모델에서는 glucokinase의 불활성화가 glucose를 초기에 인산화시키지 못해 결정적으로 당뇨병을 유도한다. 한편, cytokine의 일종인 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 염증 질환 시 췌장의  $\beta$ -cell에 손상을 주어 인슐린 의존형 당뇨병을 동시에 유발시키는데, IL-1 $\beta$ 의 과잉 발현이 췌장에서의 glucose 산화에 영향을 준다. 이에 본 연구에서는 수목추출액의 당뇨병 치료 기전을 구명하기 위한 일환으로 실험동물에 IL-1 $\beta$ 로 당뇨병을 유발시킨 후 혈당, insulin 및

glucokinase와 hexokinase 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 가. 재료 및 방법

### (1) 재료

#### (가) 동물

Male mice는 생후 3주째에 (체중 12-18 g) 한국실험동물 사업실에서 분양 받았다. 모든 마우스들은 10마리씩 나누어 플라스틱 cage에 수용하고 물과 식이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였다. 실험기간 동안 사육 환경은 실온에서, 습도는 60%, 명암주기는 12시간 간격으로 유지하였다.

#### (나) 시약

모든 일반적인 시약들은 주로 Sigma Co. 및 Wako Pure Chemicals Co. (Tokyo, Japan), Daiichi Co.와 Boehringer Mannheim Biochemicals Co.에서 구입하였다. Cytokine인 Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 BS사의 재조합 마우스 IL-1 $\beta$ 를 사용하였다.

### (2) 실험방법

#### (가) 검액의 조제

수목추출액 500 g을 증류수로 추출, 여과하여 그 용액을 동결 건조한 후 분말화 시킨 후 필요에 따라 증류수에 녹여 검액으로 사용하였다.

#### (나) 당뇨병의 유도 및 검액의 투여

당뇨병의 유발은 Kim등(69) 방법을 따랐다. 실험동물은 정상군, IL-1 $\beta$ 처리 당뇨군 (이하 대조군이라 함), IL-1 $\beta$ 처리 당뇨유발 후 수목추출액 처리군 (이하 수목추출액 처리군이라 함)으로 각 군에 20마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 대조군과 수목추출액 처리군은 IL-1 $\beta$  (50  $\mu$ g/마리)를 마우스 복강내 3일간에 걸쳐 3회 주사하였다. 수목추출액 처리군은 IL-1 $\beta$ 주사 후 수목추출액 농축액을 0.2 mg/20 g씩 1일 2회 2주간 경구로 투여하였으며, 대조군은 증류수를 2주간 경구 투여하였다.

(다) 시료 수집 및 前 처리

반복적으로 혈당을 측정하고자 할 때는 heparin 처리 모세관으로 眼球下 정맥에서 혈액을 약 200  $\mu$ l 뽑아 사용하였다. 마우스들은 decapitation 방법으로 희생시킨 후 혈액을 eppendorf tube에 받아 30분간 세워둔 후 microcentrifuge로 10분간 15000 rpm에서 원심분리하였다. 혈청은 바로 50  $\mu$ l씩 分注하여 보관하였고 혈청 인슐린 분석시 사용하였다. 췌장 조직은 적출하여 차가운 식염수에 세척한 후 흡습지로 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 췌장 조직은 곧바로 10배의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)을 가하여 Homogenizer로 균질화하고 4°C, 100,000 $\times$ g에서 1시간 동안 초원심 분리하여 cytosol 분획을 얻었다. 이 중 일부를 냉동 보관하거나 효소 활성 측정과 단백질 함량 분석에 이용하였다.

(라) 혈당 및 혈청 인슐린 정량

혈당은 Glucose oxidase법으로 측정하였고 인슐린은 mouse insulin assay kit (Daiichi radioisotope Labs, Tokyo, Japan, #20008)을 사용하거나 당뇨 자동 분석기로 측정하였다.

(마) Glucokinase와 hexokinase 활성 측정

Glucokinase와 hexokinase 활성 측정은 다음과 같이 측정하였다. 반응 완충용액 {50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 0.2 unit Glucose-6-phosphate dehydrogenase} 1.0 ml에 (A) 100 mM Glucose, (B) 0.1 mM Glucose, (C) 100 mM N-acetylglucosamine 100  $\mu$ l씩과 조직 추출물 100  $\mu$ l, 증류수 300  $\mu$ l를 각각 넣어 반응시켰다. 반응후 분광 광도계를 사용하여 340 nm에서 분당 흡광도 변화를 측정한 다음 (A)-(B)=glucokinase 활성, (B)-(C)=hexokinase 활성으로 계산하였다. 동시에 보다 정확하게 하기 위해서 D-[U-14C]glucose (1900-1920 dpm/nmol)로부터 생성되는 D-[U-14C]glucose-6-phosphate 양을 측정하였다(70).

(바) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법(71)을 사용하였으며 비활성도 측정에 사용하였다. 한편, 실험 결과의 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하여 상호 비교하여 관찰하였으며, 검정 시 P값이 0.05미만일 때를 통계적으로 유의하다고 보았다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 체중의 변화

당뇨병은 糖質대사 이상으로 인슐린 작용 부전에 의해 고혈당과 요당을 나타내며 多飮, 多食, 多尿 등 3가지 증상을 수반한다(72). glucose는 인슐린 분비를 자극할 수 있는 가장 중요한 생리적 요소이며 glucose를 대사하기 위해서는 초기 반응 효소로 glucose 인산화 효소를 필요로 한다. 즉, 인슐린 분비를 자극하기 위하여 췌장 島細胞 (pancreatic islet  $\beta$ -cell)에서 대사 과정에 필요한 glucokinase는 간과 췌장 도세포의 解糖 과정의 조절 효소이다(73-75). 목초액이 glucose 인산화 효소 활성에 영향을 주어 당뇨병 치료 효과가 나타나는 지를 검토하고자 본 실험을 시도하였다. 먼저 실험동물에 IL-1 $\beta$ 를 주사한 다음 1일, 10일, 20일의 각 실험군의 특성을 살펴 보았는데 20일의 각 실험군의 특성은 IL-1 $\beta$  주사 후 10일의 특징과 별다른 변화가 없었다. 여기에서 주사 후 10일의 특성을 살펴보면, 각 실험군의 식이 섭취량에 있어서 대조군의 식이 섭취량이 정상군에 비하여 유의성 있게 증가되었으며, 수목 추출액 투여군에서는 대조군에 비하여 식이 섭취가 감소하였으나 유의성은 없었다. 체중에 있어서는 정상군의  $13.3 \pm 1.6$  g에 비하여 IL-1 $\beta$ 으로 당뇨가 유발된 대조군은 1주일 후  $23.2 \pm 3.4$  g 으로 유의하게는 증가하였으며, IL-1 $\beta$ 주사 후 수목추출액을 투여한 실험군의 경우는  $17.5 \pm 1.6$  g 으로 감소하였다. 또한, 공복 시의 혈청 중 glucose와 insulin 양이 대조군에서는 정상군에 비하여 모두 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 수목추출액 투여군에서는 당뇨병으로 증가된 insulin 양을 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타나 당뇨병에 효과가 있음을 시사하였다. 이러한 결과는 비만한 상태에서는 인슐린이 과다 분비된다는 것을(76) 다시 입증한 것이며, 당뇨병이 있는 경우 비만의 발생 빈도가 정상인에 비하여 약 2배정도 높으며, 체중이 표준보다 증가할수록 당뇨병의 빈도가 높다는 보고(77)와 관련시켜 볼 때 의미하는 바가 크다고 여겨진다.

Table 45. General characteristics of control diabetic mice

	Normal	Control	수목추출액
Body weight(g)	13.3±1.6	23.2±3.4*	17.5±2.6
Diet intake(g/day)	2.4±0.24	3.4±0.8	3.1±0.5
Serum glucose (mg/l)			
feed	145.4±13.5	237.6±28.6	182.3±21.3
fast	53.5±4.7	187.5±32.3*	137.6±35.5#
Plasma insulin (nU/ml)			
feed	45.4±4.6	111.2±12.4	78.9±8.0
fast	27.8±4.6	75.4±6.7*	45.6±7.4

Values are mean ± S.E. for 20 animals.

\* : significantly different from normal mice at P<0.05 by t-test.

# : significantly different from control mice at P<0.05 by t-test.

## (2) 혈당과 인슐린의 변화

수목추출액이 혈당 상승에 대하여 어떠한 작용을 나타내는 지를 검토하기 위하여 정상군, 대조군 및 수목추출액 처리군에 glucose를 복강 내 주사한 다음 시간별 혈당과 혈청 인슐린 분비 변화를 관찰하였다. 혈당은 정상군에서 glucose가 주사되자마자 증가하여 30분 후 최고치를 나타내다 주사 후 1시간부터 점차 감소하기 시작하여 정상치 수준으로 회복되었으며, 혈청 인슐린도 glucose 주사 후부터 분비되기 시작하여 30분에 최고치를 나타낸 후 점차 정상화하는 경향을 보였다. 그러나 IL-1 $\beta$ 으로 당뇨가 유발된 대조군은 基底値의 혈당 자체가 정상군보다 유의성 있게 높았으며 주사 후 30분에 최고치를 기록한 후 점차 감소하였으나 10시간 이후에도 여전히 유의성 있게 혈당이 증가되어 있었다. 혈청 중의 인슐린치는 糖負荷 이전에 이미 정상군보다 유의성 있게 높았으며, glucose 주사 후 1.5시간 이후에나 인슐린 분비가 최고를 나타내어 초기 인슐린 분비에 심각한 장애가 있음을 시사하였고, 10시간 이후에도 여전히 당부하 이전보다 인슐린 분비가 약 2배 정도 증가되어 있었다. 그 반면, 수목추출액 투여군은 기저치의 혈당과 인슐린치 자체가 대조군보다 현저히 낮았으며 glucose 주사 30분 후 혈당과 인슐린치가 최고에 달한 후 시간이 경과함에 따라 전체적으로 정상군보다는 높지만 대조군에 비해 현저하게 그 수치가 감소하는 것으로 나타나, 당뇨병으로 인하여 높아진 혈당을 정상화하는데 수목추출액이 효과적임을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 수목추출액은 IL-1 $\beta$ 으로 유발된 당뇨병 마우스에서 glucose 인산화 효소인 glucokinase와 hexokinase의 활성을 증가시켜 당뇨병의 치료에 효과가 있을 것으로 여겨지며, IL-1 $\beta$ 의 glucokinase에 대한 작용 기전을 분자 수준에서 해명해야 할 것으로 사료된다.

## 제3절 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험재료

흑미는 농협에서 시판하는 흑진주벼를 사용하였다. 도정한 쌀겨는 70% 에탄올에 침지하여 80°C에서 3시간 동안 reflux하면서 추출하였다. 한약재는 용인시의 한 한의원에서 기증받아 가가 건조중량 8 g의 시료에 탈이온수를 150 mL을 넣고 autoclave를 사용하여 30분간 추출한 것을 탈수시켜 한약재 추출물을 제조하였다. DMSO와 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate), DCA-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), thioglycollate, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 모두 Sigma에서 구입하였다. Murine recombinant interferon- $\gamma$ 는 Calbiochem에서 구입하였고, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 정량을 위한 ELISA kit는 Bioscience의 제품을 사용하였다.

#### (2) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

0.1 mM DPPH, 40% 에탄올, 0.04 mM sodium acetate (pH 5.5)를 포함한 용액 2.5 mL에 적당량의 추출물 시료를 넣어서 실온에서 30분간 반응시킨 후, 잔존하는 DPPH 라디칼을 517 nm의 흡광도에서 spectrophotometer로 측정하였다. 전자공여능 (%)은  $(1 - A_s/A_c) \times 100$ 으로 산출하였고 여기서  $A_s$ 와  $A_c$ 에는 각각 실험구와 대조구의 흡광도를 대입하였다.

#### (3) 배양세포를 이용한 항산화활성의 측정

RAW264.7 세포를  $1.5 \times 10^6$  cells/mL로 세포밀도를 조절한 다음,  $1.2 \times 10^6$  cells을 tube에 분주한 다음, 1 M luminol과 10 mg/mL zymosan을 각각 0.1 mL씩 순서대로 RAW264.7 세포에 첨가하였다. 진탕배양기를 사용하여 tube를 37°C에서 85 rpm으로 천천히 35분간 진탕하면서 반응시키고 반응이 끝나면 luminometer로 측정하여 세포의 산화수준을 평가하였다.

#### (4) SOS chromotest

37°C에서 하룻밤 배양한 E. coli PQ37세포를 LB배지로 4배수 희석한 다음, 적당량의 시료와 신선배지를 첨가하여 총 4 mL로 조정하고 2시간 동안 배양한다. 배양

후, 0.2 mL의 배양액을 위하여 여기에 1.8 mL의 buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>)와 1.6 mg의 ONPG를 첨가하여 37°C에서 반응한다. 반응후, β-galactosidase 활성을 420 nm의 흡광도에서 측정하였다. 세균 수를 나타내는 alkaline phosphatase 활성은 동일한 배양액 0.2 mL에 1.8 mL의 buffer (1 M Tris, 0.1% SDS)와 1.6 mg의 PNPP를 첨가하여 37°C에서 반응한다. 반응 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 unit는 [1,000×A420/t, t: 반응 시간]으로 정의하였다.

#### (5) 종양축진 억제활성의 측정

Epstein-Barr 바이러스의 지속감염 세포주인 B95-8세포를 지시세포로 사용하였다. B95-8 세포를 1×10<sup>6</sup> cells/mL의 밀도에서 적당량의 시료와 50 nM TPA가 함유된 RPMI 1640 배지에서 48시간 배양하였다. 배양 후, 세포를 4%의 포르말린에서 고정하고 0.1%의 Triton X-100로 재차 고정된 세포를 처리한 다음, EBV-EA에 대한 항체를 고정 세포에 처리하였다. 1차항체 처리된 세포를 다시 이차항체인 FITC로 표식된 anti-mouse IgG로 처리하였다. 항체로 표식된 세포는 FACSvantage를 사용하여 flow cytometry를 수행하였다. 5×10<sup>4</sup> cells의 EBV-EA 발현 수준을 형광항체의 형광도의 평균값으로 계산하여 추정함으로써 종양축진도로 사용하였다.

#### (6) 대식세포의 포식활성

적당량의 시료를 1×10<sup>7</sup> cells의 RAW264.7 세포에 첨가하여 37°C에서 15분간 배양하였다. 배양 후, D-MEM 배지를 사용하여 9×10<sup>5</sup> cells를 tube에 분주하고 미리 YPD 배지에서 배양해 둔 인체감염 효모인 *Candida albicans*를 2,000 : 1 (RAW264.7 : *C. albicans*)의 세포비율로 조정하여 37°C에서 재차 배양하였다. 배양이 끝나면 상징액을 회수하여 YPD 고체배지에 도말하여 형성된 효모집락을 계수하여 대식세포의 포식작용에 의한 효모세포의 감소율을 계산하였다.

#### (7) 세포독성의 측정

MTT법에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 지시세포를 96-well plate에 well 당 1×10<sup>5</sup> cells을 접종하여 24시간 배양하고 여기에 적당량의 시료를 첨가한 후, 배양액에 Sigma에서 판매하는 MTT용액 50 μL를 첨가하고 37°C에서 3시간 반응하였다. 그 다음, 150 μL의 DMSO를 사용하여 세포에 들어간 formazan 색소를 용출시켰다. 용출된 색소의 양은 microplate reader를 사용하여 570 nm와 690 nm의 흡광도에서 정량하였고 세포독성은 시료 무처리군에 대한 시료 처리군의 배분율로서 나타내었다.

#### (8) 복강대식세포의 분리

5주령 BALB/c 마우스의 복강에 1 mL의 thioglycollate를 주사하고 4일 후 경추탈골로 희생시켰다. 복막이 드러나게 가죽을 벗긴 후 PBS 10 mL을 복강 내에 주입하여 복강세포를 회수하였다. trypan blue 염색으로 생존세포수를 조사하고 10% FBS를 함유한 RPMI 1640배지로 세포밀도를  $5 \times 10^5$  cells/mL로 조절하여 96-well plate에 분주하고 CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상정액을 제거하고 부착된 세포를 복강대식세포로 사용하였다.

#### (9) 대식세포의 NO 생산 측정

96-well plate의 well 당  $1 \times 10^5$  cells을 접종하고 24시간 동안 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다. 배양 후 상정액을 제거하고 적당량의 시료를 포함한 반응액 0.2 mL을 세포에 첨가하였다. 복강 대식세포의 경우에는 IFN- $\gamma$ 를 10U/mL로 배지에 첨가하였다. 48시간 배양 후, 상정액 0.1 mL을 회수하여 새로운 well plate에 옮긴 후, 동량의 Griess reagent를 첨가하고 15분간 방치하였다. 발색도는 microplate reader를 사용하여 570 nm의 흡광도에서 측정하였다.

#### (10) 복강비만세포의 분리

7주령의 SD rat을 이산화탄소로 희생시킨 다음, 복막이 드러나도록 가죽을 벗긴 뒤 Tyroid buffer (137 mM NaCl, 5.3 mM glucose, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)를 복강에 주입하고 복강 내부를 충분히 세척한 후 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 Histoplaque 1119 층위에 놓고 원심분리하여 buffer와 Histoplaque 사이에 생성된 세포층을 회수하였다. 회수된 세포는 다시 Tyroid buffer로 세척한 다음, 실험에 사용하였다.

#### (11) 비만세포 탈과립 억제활성의 측정

Rat basophilic cell line인 RBL-2H3 세포주와 rat의 복강비만세포를 지시세포로 사용하였다. 탈과립으로 방출된 histamine을 측정하기 위하여, RBL-2H3는 10% FBS를 포함한 D-MEM배지에서 배양하였다. 세포수를  $1 \times 10^6$  cells/mL로 조절한 후, 1  $\mu$ g/mL의 IgE를 첨가하여 20시간 배양하였다. 배양 후, 수거한 세포에 Tyroid buffer로 세포밀도를  $1 \times 10^6$  cells/mL로 조절한 다음, 24 well plate에 분주하였다. 여기에 적당량의 시료를 첨가하여 반응하고 ionophore A23187을 최종농도 10  $\mu$ M이 되도록 첨가하고 30분간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응하였다. 반응 후, 회수한 상정액 1 mL에 0.2 mL의 1 N NaOH, 0.1 mL의 1% OPT를 첨가하고 다시 5분간 반응하였



다. 1 N HCL 첨가로 반응을 종결한 다음, fluorometer로 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다. 탈과립된  $\beta$ -hexosaminidase 활성은 다음과 같이 측정하였다. histamine의 경우와 마찬가지로 회수한 상정액에 동량의 1 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -acetylglucosamide를 넣고 30분간 반응하였다. 반응 후, 2배량의 sodium bicarbonate (pH 10.2)를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, 407 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -hexosaminidase의 분비지표는  $(A_{470} \text{ of sample}/A_{470} \text{ of positive control}) \times 100$ 으로 계산하였다.

#### (12) 피부부종의 유발

적당량의 시료를 CD-1 마우스의 복강에 주사하였다. 주사 14일 후, 마우스의 양쪽 귀에 피부에 160  $\mu$ M의 TPA를 10  $\mu$ L씩 하루에 한번 씩 4일간 도포하였다. 4일 후 마우스 귀의 부종유발에 따른 귀 두께를 thickness gauge를 사용하여 측정하였다.

#### (13) 종양이식

CT-26 mouse 대장암 세포주를 BALB/c mouse 의 피하에  $1 \times 10^6$  cells/mouse 로 주사하였다. 종양을 이식한 당일부터 적당량의 시료를 14일간 매일 복강주사 하였고, 2주 후 자란 종양을 적출하여 실험에 사용하였다.

#### (14) RNA 추출 및 RT-PCR

세포의 total RNA는 phenol-guanidium thiocyanate-chloroform법에 의하여 추출하였다. 추출된 RNA 1  $\mu$ g을 주형으로 AMV reverse transcriptase와 oligo dT<sub>18</sub>를 사용하여 1st strand DNA를 합성하였다. TNF- $\alpha$  등 표적 유전자를 대표하는 sense 및 anti-sense primer를 제작하여 표적 유전자 단편의 합성에 사용하였다. 1st strand DNA에 20  $\mu$ M의 합성된 primer와 400  $\mu$ M의 dNTP mix, 2.5 unit의 Taq DNA중합효소를 넣고 thermal cycler를 사용하여 94, 55, 72°C에서 각각 30 cycle 반응하였다. 반응 후 합성된 DNA단편은 1.5% agarose gel 전기영동을 수행하여 각 유전자 단편의 띠를 확인하고 각 DNA 띠의 강도를 densitometer로 측정하여 표적 유전자의 발현도를 평가하였다.

#### (15) Western blot 분석

$1 \times 10^6$ 의 지시세포를 lysis buffer (50 mM Tris-Clat pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail)에서 20분간 반응하여 세포추출물을 제조하였다. 제조된 추출물의 단백질 함량을

Bio-Rad의 단백질 정량 kit를 사용하여 정량한 다음, 30 µg의 단백질에 상당하는 세포추출물을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 단백질을 분획하고 분획된 단백질은 전기적으로 nitrocellulose membrane에 부착시켰다. Membrane을 5% skim milk로 blocking한 다음, 정량하고자 하는 단백질에 대한 일차항체와 상온에서 3시간 반응하였다. 그 다음, peroxidase-conjugate된 2차항체와 반응시킨 다음, ECL western blotting detection reagent를 사용하여 luminescent image analyzer로 표적 단백질 띠를 영상화하고 각 띠의 강도를 정량하였다.

#### (16) ELISA 측정

적당량의 시료에 의하여 자극된  $1 \times 10^6$  cells의 지시세포의 배양상징액을 회수하여 ELISA kit를 사용하여 pro-inflammatory cytokine의 양을 정량하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 미강 추출물의 생리활성

##### (가) 미강추출물의 세포 내 항산화활성

미강의 70% 에탄올 추출물을 제조하여 대식세포의 활성화에 대한 조절기능을 먼저 항원에 의하여 활성화된 세포가 생산하는 고독성의 활성산소종을 소거할 수 있는지 여부를 생쥐 대식세포주인 RAW264.7 세포를 지시세포로 사용하여 조사하였다. RAW264.7세포를 효모 막성분인 zymosan 자극할 때 생성되는 활성산소종이 미강 추출물에 의하여 소거되는 정도를 luminometer로 측정한 결과, 100 µg/mL의 추출물 조건에서 90%의 소거활성을 나타내어 (Table 46), 미강추출물의 세포 내 항산화활성이 매우 우수한 것으로 판단된다.

##### (나) 미강추출물의 대식세포 포식작용 항진효과

미강추출물이 대식세포의 기능활성화 지표의 하나인 포식작용을 촉진시킬 수 있는지 여부를 RAW264.7세포와 병원성 효모인 *Candida albicans*를 일정시간 공동배양한 후, 생존한 효모의 개체수를 고체배지 상의 집락의 숫자로 계산하였다. 그 결과, 미강추출물의 처리는 대식세포의 포식작용을 약 54% 증가시킨 것으로 나타났다 (Table 47).

Table 46. Scavenging effect of rice bran extract (RBE) on reactive oxygen species generated by zymosan-activated RAW264.7 cells

Experiments	Luminescence unit (% of inhibition)		
	µg/mL of concentration		
	1	10	100
Control	5.35±0.295 <sup>a</sup> (0.00)	5.35±0.295 <sup>a</sup> (0.00)	5.35±0.295 <sup>a</sup> (0.00)
RBE	4.02±0.356 <sup>b</sup> (24.44)	4.54±0.718 <sup>b</sup> (15.56)	0.58±0.196 <sup>b</sup> (90.33)

Values not sharing common letter in column were significantly different at  $p < 0.05$ .

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 47. Effects of rice bran extract (RBE) on phagocytosis activity in RAW264.7 cells

Experiments	Rate of killing <i>Candida albicans</i> (%)
Control <sup>1)</sup>	12.98 $\pm$ 2.65
RBE <sup>2)</sup>	19.98 $\pm$ 3.29

1)final 0.1% DMSO was used as vehicle. 2)100 µg/mL RBE

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

(다) 미강추출물의 대식세포 NO 생산 조절효과

대식세포 활성화의 또 다른 지표인 NO 생산에 대한 조절활성을 RAW264.7 세포를 지시세포로 조사한 결과, 세균 내독소인 LPS의 자극으로 유도된 NO 생산이 100 µg/mL의 추출물 조건에서 약 28% 정도 억제된 것으로 나타나 (Table 48), 대식세포의 과활성화를 미강추출물이 유의하게 억제할 수 있다고 생각된다. 또한 측정된 억제효과는 미강이나 LPS처리에 의한 지시세포의 사멸이 가져온 실험오차가 아님이 밝혀졌다 (Table 49).

Table 48. Inhibitory effect of rice bran extract (RBE) on nitric oxide (NO) generation in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Experiments	μM of NO (% of inhibition)		
	1 μg/mL	10 μg/mL	100 μg/mL
Unstimulation (-LPS)	3.82±5.22 <sup>b</sup> (100)	3.82±5.22 <sup>c</sup> (100)	3.82±5.22 <sup>c</sup> (100)
Stimulation (+LPS) <sup>1)</sup>	61.0±2.92 <sup>a</sup> (0)	61.0±2.92 <sup>a</sup> (0)	61.0±2.92 <sup>a</sup> (0)
RBE	59.2±5.63 <sup>a</sup> (3.15)	54.4±6.17 <sup>ab</sup> (11.5)	44.9±2.57 <sup>b</sup> (28.2)

Values not sharing common letter in column were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)100 ng/mL LPS used in this experiment.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 49. Cell viability of rice bran extract (RBE) measured by MTT method in RAW264.7 cells

Experiments	Cell viability (%)		
	1 μg/mL	10 μg/mL	100 μg/mL
Control <sup>1)</sup>	100.0±1.59 <sup>a</sup>	100.0±1.59 <sup>a</sup>	100.0±1.59 <sup>ab</sup>
RBE	99.2±3.28 <sup>ab</sup>	92.6±3.41 <sup>b</sup>	89.5±2.32 <sup>c</sup>

Values not sharing common letter in column were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)Vehicle only (final 0.1% DMSO).

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

(라) 미강추출물의 항암활성

미강추출물의 항암활성은 두 가지 방법으로 측정하였다. 첫 번째는 SOS chromotest를 사용하여 원핵세포에서 항돌연변이 활성을 조사함으로써, DNA의 변이에 의한 tumor initiation 단계에 대한 저해활성을 평가하였다. 지시세포는 대장균 PQ37 세포를 사용하였고 mitomycin C에 의하여 인위적으로 돌연변이를 유발하였다. Table 5에 정리된 결과에서 보듯이, 미강추출물은 500 µg/mL의 추출물 농도에서 약 12% 정도 유의하게 돌연변이를 억제하였으나, 그 효과는 크지 않은 것으로 판단된다. 그 다음으로는 EBV감염세포주인 B95-8세포를 사용하여 미강추출물의 처리가 tumor promoter인 TPA에 의하여 발현하는 EA항원의 발현을 억제하는 정도로 그 활성을 측정하였다. 그 결과, 미강추출물은 약 22% 정도 tumor initiation 단계를 억제하는 것으로 나타났다.(Table 51).

이상의 결과는 미강추출물이 종양발생단계 중 tumor initiation과 tumor promotion 단계를 유의하게 억제할 수 있음을 보여주기 때문에, 암 세포를 직접적으로 살해할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 따라서, 배양 암세포주를 대상으로 미강추출물의 처리가 암세포의 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 6종의 악성종양 유래의 세포주를 대상으로 조사하였다. 정확한 판단을 위하여 배양세포주이지만 악성종양세포가 아닌 생쥐 유래 fibroblast 세포주인 NIH3T3를 대조구로 사용하였다. 실험 결과, 미강추출물은 대조구인 NIH3T3 세포에 세포사멸을 유도하지 않았다. 암세포주로는 human lung cancer cell인 A549, human blast cancer cell인 MDA-MB-231, mouse lymphoblast leukemia cell인 L1210, human T lymphoblast leukemia cell인 Molt4, human monocyte leukemia cell인 U-937, mouse colon cancer cell인 CT-26을 사용하였다. 실험 결과, 미강추출물의 세포사멸 유도능은 Molt4 세포가 가장 높았고 (45% 사멸), U-937 세포가 그 다음으로 높았다 (약 37% 사멸). 그러나 CT-26, A549, MDA-MB-231세포에서는 세포사멸을 유도하지 않은 것으로 보아, 미강추출물은 대체로 조혈세포에 효과가 있음을 알았다.

Table 50. Suppressing effects of rice bran extract (RBE) on mitomycin C-induced mutagenesis in E.coli PQ37 indicator cell.

Experiments	Sample concentration (µg/mL)	Enzyme unit		R factor	antimutagenicity (%)
		β-galactosidase	alkaline phosphatase		
mitomycin C (+) <sup>1)</sup>	-	7.46±0.08	11.78±0.39	0.63±0.01	0
mitomycin C (-)	-	3.71±0.03	22.10±0.68	0.17±0.01	100
RBE	5	6.96±0.25	11.59±0.24	0.60±0.01	6.21
	50	5.61±0.08	9.52±0.67	0.59±0.03	8.41
	500	7.55±0.42	13.15±0.19	0.57±0.02	11.97

1)6 ng/mL mitomycin C used in this study.

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 51. Anti-tumor-promoting activity and cytotoxicity of rice bran extract (RBE) in TPA-stimulated B95-8 cells

Experiments	Inhibition of tumor-promoting activity (%)	
	RBE concentration (µg/mL)	
	40	200
Control <sup>1)</sup> (TPA+)	0	0
RBE	10.83 ± 2.16	21.52 ± 5.20

1)50 nM TPA was used in this study.

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 52. Effects of rice bran extract (RBE) on survival of various cancer cell lines

Cancer cell line	Cell viability (%)	
	DMSO (100 µg/mL)	RBE (100 µg/mL)
NIH-3T3	100.0 ± 7.2 (0.0)	109.5 ± 0.6 (-9.5)
A549	100.3 ± 2.2(0.0)	113.7 ± 1.8 (-12.0)
MDA-MB-231	99.9 ± 1.6 (0.0)	115.3 ± 5.4 (-13.1)
L1210	100.0 ± 2.4 (0.0)	102.4 ± 7.2 (-2.4)
Molt4	99.9 ± 13.0 (0.0)	44.7 ± 2.3 (55.4)
U937	100.0 ± 1.7 (0.0)	36.7 ± 0.4 (63.3)
CT-26	100.0 ± 5.4 (0.0)	98.3 ± 5.1 (1.7)

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

(마) 미강추출물의 비만세포 활성화 억제효과

비만세포는 알러지원에 반응하여 β-hexosaminidase, 히스타민 등, 과민성반응을 개시시키는 매우 중요한 염증관련 세포이다. 따라서 미강추출물이 만성염증성 질환을 예방 또는 완화할 수 있는지를 판단하기 위하여 비만세포의 탈과립에 대한 미강추출물의 억제활성을 측정하였다. 지시세포로는 rat의 비만세포주인 RBL-2H3세포를 사용하였고, calcium ionophore인 A23187처리에 의하여 발생한 탈과립을 미강추출물이 억제하는 정도를 β-hexosaminidase 활성으로 평가하였다. 그 결과, 미강추출물은 유의하게 비만세포의 탈과립을 억제하지 않음이 나타났다 (Table 53). 또한 미강추출물은 RBL-2H3 세포에 독성이 없음이 나타났다 (Table 54).

생체에서 비만세포의 탈과립은 알러지원에 대한 IgE가 비만세포의 Fcε 수용체에 결합한 후, 항원이 재차 IgE에 결합함으로써, Fcε 수용체의 cross-linking이 발생하여 개시된다. 따라서, ionophore가 아닌, 보다 자연적인 경로를 반영한 검정계에서 미강추출물의 효능을 측정할 필요가 있다. 따라서, DNP에 대한 IgE와 DNP-BSA복합체를 사용하여 비만세포주의 탈과립을 유도하는 방법으로 미강추출물의 비만세포 억제활성을 측정하였다. 그 결과, ionophore와 마찬가지로 유의한 억제활성은 발견되지 않았다 (Table 55).

이상의 실험에서 미강추출물이 비만세포 탈과립을 억제하지 못하는 결과가 나온 것은 아마도 세포주를 지시세포로 사용한 때문일 가능성을 배제할 수 없다. 따라서

세포주가 아닌 rat의 복강비만세포를 분리하여 지시세포로 사용하였다. 이때, 탈과립은 ionophore A23187처리로 유도하였다. 실험 결과, 이상의 세포주에서의 실험결과와는 달리 미강추출물은 약 28% 정도 비만세포의 탈과립을 억제함이 밝혀졌다 (Table 56). 이와 같은 억제효과가 미강추출물 처리로 인한 세포의 사멸에 의한 것인지를 밝히기 위하여 MTT assay로 세포독성을 측정하였다. 그 결과 약 80%의 세포 생존율을 보이고 있어서, 세포의 사멸에 의하여 탈과립 억제효과가 나타난 것이 아님을 보여주었다 (Table 57). 미강추출물의 처리는 anti-DNP antibody로 자극된 RBL-2H3세포와 rat 복강 비만세포의 IL-1 $\beta$  분비를 유의하게 억제하였다 (Fig. 51, Fig. 52).

Table 53. Effect of rice bran extract (RBE) on histamine and  $\beta$ -hexosaminidase releases in ionophore-stimulated RBL-2H3 cells

Experiments	ng/mL of Histamine ( % of Inhibition )	$\beta$ -hexosaminidase release (% of Inhibition)
Control (-A23187)	14.6 $\pm$ 3.44 <sup>b</sup> ( - )	37.12 $\pm$ 3.02 <sup>c</sup> ( - )
Control (+ A23187) <sup>1)</sup>	74.1 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup> (0.00)
RBE <sup>2)</sup>	67.1 $\pm$ 4.49 <sup>a</sup> (9.44)	115.82 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup> (-15.8)

Values not sharing common letter were significantly different at p<0.05.

1)10  $\mu$ M A23187 used in this study. 2)100  $\mu$ g/mL RBE used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 54. Effect of rice bran extract (RBE) on cell viability measured by MTT method in RBL-2H3 cells

Cultivar	Cell viability (%)		
	1 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
DMSO <sup>1)</sup>	99.9 $\pm$ 4.71 <sup>a</sup>	99.9 $\pm$ 4.71 <sup>a</sup>	99.9 $\pm$ 4.71 <sup>a</sup>
RBE <sup>2)</sup>	99.5 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	100.1 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	97.5 $\pm$ 4.51 <sup>a</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at p<0.05.

1) final 0.1% DMSO was used as a vehicle. 2)100  $\mu$ g/mL RBE used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).



Table 55. Effect of rice bran extract (RBE) on histamine and  $\beta$ -hexosaminidase releases in IgE-stimulated RBL-2H3 cells

Experiments	ng/mL of Histamine ( % of Inhibition )	$\beta$ -hexosaminidase release (% of Inhibition)
Control (-DNP-BSA)	3.98 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup> ( - )	36.18 $\pm$ 4.30 <sup>c</sup> ( - )
Control (+ DNP-BSA) <sup>1)</sup>	27.26 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 3.92 <sup>b</sup> (0.00)
RBE <sup>2)</sup>	33.21 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup> (-25.80)	110.11 $\pm$ 3.85 <sup>a</sup> (-15.88)

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1) 20  $\mu$ g/mL DNP-BSA used as an allergen in this study. 2) 100  $\mu$ g/mL RBE used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 56. Effect of rice bran extract (RBE) on histamine and  $\beta$ -hexosaminidase releases in ionophore-stimulated rat peritoneal mast cells (RPMCs)

Cultivar	ng/mL of Histamine ( % of Inhibition )	$\beta$ -hexosaminidase release (% of Inhibition)
Control (-A23187)	12.5 $\pm$ 6.23 <sup>b</sup> ( - )	39.1 $\pm$ 2.36 <sup>c</sup> ( - )
Control (+ A23187) <sup>1)</sup>	50.4 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup> (0.0)	100.00 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup> (0.0)
RBE <sup>2)</sup>	45.3 $\pm$ 4.98 <sup>a</sup> (10.2)	72.1 $\pm$ 3.72 <sup>b</sup> (27.9)

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1) 10  $\mu$ M A23187 used in this study. 2) 100  $\mu$ g/mL RBE used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 57. Effect of rice bran extract (RBE) on cell viability measured by MTT method in rat peritoneal mast cell (RPMCs)

Experiments	Cell viability (%)		
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
DMSO <sup>1)</sup>	100.0±5.96 <sup>a</sup>	100.0±5.96 <sup>a</sup>	100.0±5.96 <sup>a</sup>
RBE <sup>2)</sup>	84.5±2.43 <sup>b</sup>	85.9±1.74 <sup>b</sup>	79.2±7.19 <sup>b</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 0.1% DMSO was used as a vehicle. 2)100 µg/mL RBE used in this study.

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

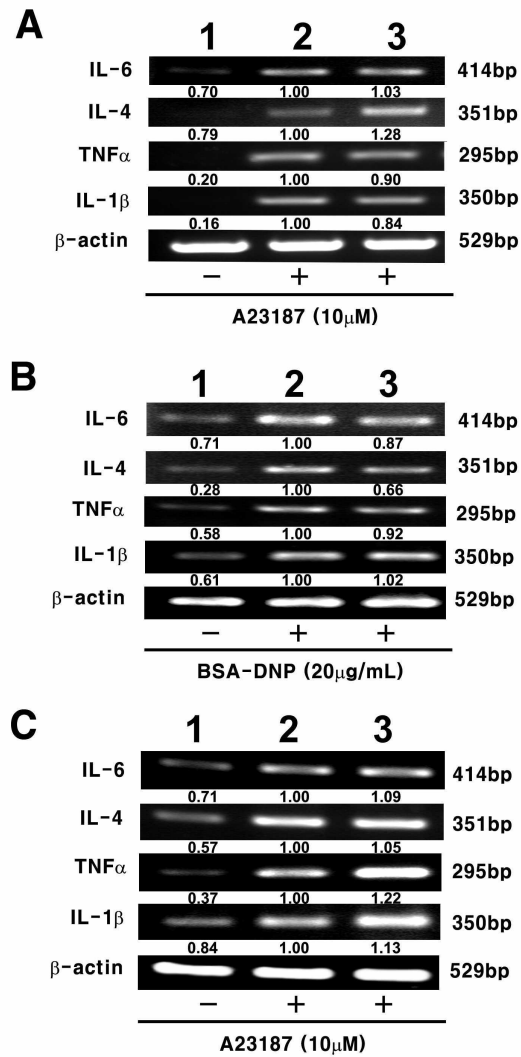


Figure 51. Semi-quantitative RT-PCR analysis of the effects of rice bran extract (RBE) on the pro-inflammatory cytokine gene expressions in A23187-stimulated RBL-2H3 cells (A); anti-DNP IgE-stimulated RBL-2H3 cells (B); A23187-stimulated rat peritoneal mast cell (C). Lane 1, unstimulated control; lane 2, stimulated control; lane 3, RBE treatment.

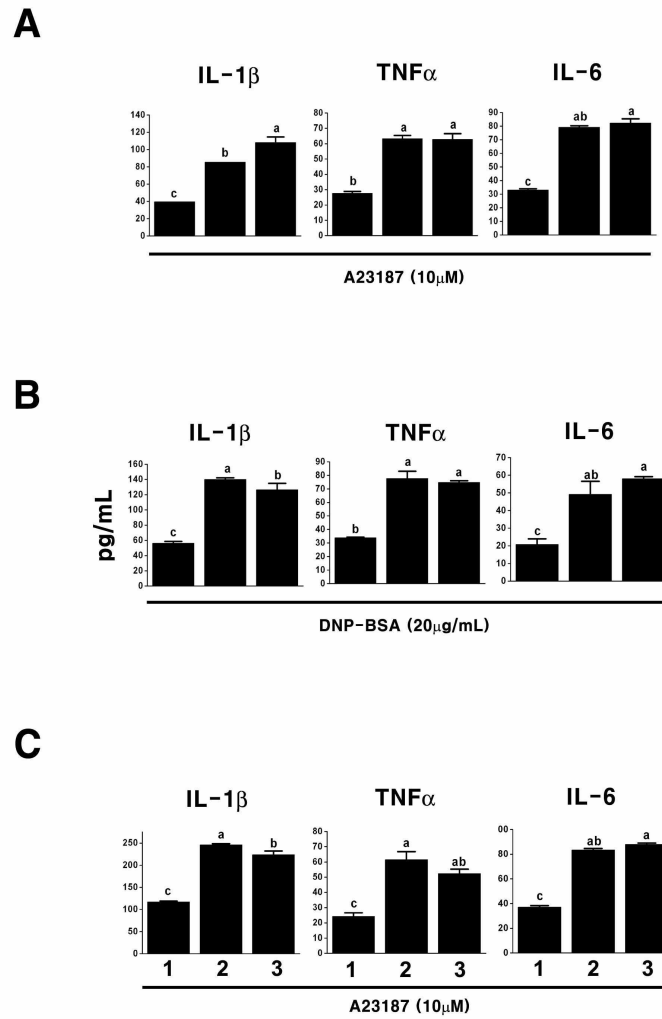


Figure 52. ELISA of rice bran extract (RBE) on the proinflammatory cytokine release in A23187-stimulated RBL-2H3 cells (A); anti-DNP IgE-stimulated RBL-2H3 cells (B); A23187-stimulated rat peritoneal mast cell (C). Lane 1, unstimulated control; lane 2, stimulated control; lane 3, RBE treatment.

(2) 목재추출물의 생리활성

목재추출액의 건강기능성을 평가하기 위하여 동일한 방법으로 먼저 대식세포의 활성화에 미치는 효과를 RAW264.7 세포를 지시세포로 사용하여 NO 생성 저해효과를 측정하였다. 그 결과, 목재추출액 그 자체는 대식세포의 NO 생산을 유도하는 효과가 없었으며, 반대로 LPS에 의하여 유도된 NO 생성을 억제하는 효과도 없었다. 단지, 2% 농도 조건에서 LPS에 의한 NO 생산을 최대 43%까지 증진시켰다 (Table 58). 이 부분에 있어서는 향후 인터페론과의 조합 등 추가적인 실험을 통하여 NO 생성 항진효과의 의미를 조사할 필요가 있다. 다음으로 목재추출액의 암세포 살해활성을 조사하였다. 각 암세포주에 목재추출액을 첨가하여 세포사멸이 유도되는지를 조사한 결과, Table 59에서 보듯이 목재추출액은 사용한 모든 암세포주의 사멸을 유도하지 못하였다 (Table 59). 목재추출액이 비만세포의 탈과립을 조절하는지 여부를 비만세포주인 RBL-2H3세포로 측정하였다. Table 60에서 보듯이 목재추출액은 ionophore A23187로 유도된 비만세포의 탈과립을 유의적으로 억제하지 못하였으며, 목재추출액은 지시세포에 세포독성이 없음이 나타났다 (Table 61).

이상의 결과에서 목재추출액은 LPS로 자극한 대식세포의 NO 생산을 항진시켜주는 기능을 제외하고는 면역세포의 기능조절능이나 암세포 살해능이 우수하지 못하다는 사실을 알았다.

Table 58. Effects of Wood Extractives (WE) on NO production in RAW264.7 cells

pH adjustment (5.0)	LPS <sup>1)</sup> stimulation	NO production (µM of nitrite)			
		PBS <sup>2)</sup> (conc., v/v)	WE (conc., v/v)		
		2%	0.5%	1%	2%
(-)	(-)	2.262 ± 0.234	2.262 ± 0.234 <sup>a</sup>	2.262 ± 0.234 <sup>a</sup>	2.262 ± 0.234 <sup>a</sup>
(-)	(+)	41.064 ± 0.619	41.064 ± 0.619 <sup>c</sup>	41.064 ± 0.619 <sup>b</sup>	41.064 ± 0.619 <sup>c</sup>
(-)	(-)	-	2.225 ± 0.225 <sup>a</sup>	2.262 ± 0.283 <sup>a</sup>	2.861 ± 0.283 <sup>a</sup>
(+)	(-)	-	2.412 ± 0.234 <sup>a</sup>	3.161 ± 0.234 <sup>a</sup>	4.622 ± 0.283 <sup>b</sup>
(-)	(+)	-	45.034 ± 1.362 <sup>d</sup>	48.667 ± 2.368 <sup>c</sup>	55.184 ± 2.180 <sup>e</sup>
(+)	(+)	-	37.019 ± 2.011 <sup>b</sup>	48.030 ± 2.498 <sup>c</sup>	52.637 ± 0.789 <sup>d</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at p<0.05.

1)100 nM LPS used in this study. 2)Phosphate buffered saline without Ca<sup>2+</sup>.

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 59. Cytotoxic effects of Wood Extractives (WE) on various cancer cell lines

Cancer cell line	Cell cytotoxicity (%)			
	PBS <sup>1)</sup> (conc. v/v)	WE (conc. v/v)		
	2%	0.5%	1%	2%
RAW264.7	0.000±2.002 <sup>b</sup>	0.506±1.716 <sup>b</sup>	1.610±0.632 <sup>b</sup>	2.815±0.122 <sup>a</sup>
HGF-1	0.000±0.988 <sup>b</sup>	0.484±0.132 <sup>ab</sup>	1.099±0.166 <sup>a</sup>	0.550±0.132 <sup>ab</sup>
NIH-3T3	0.000±1.067 <sup>a</sup>	0.136±0.795 <sup>a</sup>	0.136±0.409 <sup>a</sup>	0.970±0.751 <sup>a</sup>
A549	0.000±2.341 <sup>a</sup>	-3.829±2.027 <sup>a</sup>	1.577±1.407 <sup>a</sup>	-0.751±1.690 <sup>a</sup>
MDA-MB-231	0.000±0.741 <sup>b</sup>	0.326±1.554 <sup>b</sup>	0.979±1.389 <sup>ab</sup>	2.742±0.299 <sup>a</sup>
CT-26	0.000±2.727 <sup>a</sup>	-0.112±3.069 <sup>a</sup>	1.228±1.534 <sup>a</sup>	4.241±2.037 <sup>a</sup>
L1210	0.000±0.323 <sup>b</sup>	1.743±0.566 <sup>a</sup>	2.049±0.816 <sup>a</sup>	2.336±1.046 <sup>a</sup>
U-937	0.000±2.961 <sup>b</sup>	1.735±1.079 <sup>ab</sup>	5.308±3.449 <sup>a</sup>	3.144±2.430 <sup>ab</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at p<0.05.

1)Phosphate buffered saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Results are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 60. Inhibitory effects of Wood extractives (WE) on β-hexosaminidase release in RBL-2H3 basophilic cells stimulated with ionophore 23187

Sample	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	release of β-hexosaminidase (% of inhibition)			
		WE (conc., v/v)			
		0.5%	1%	2%	4%
Control (A23187 -)		10.05 ± 30.35 <sup>b</sup>	10.05 ± 30.35 <sup>b</sup>	10.05 ± 30.35 <sup>b</sup>	10.05 ± 30.35 <sup>b</sup>
		(-)	(-)	(-)	(-)
Control (A23187 +)		100.00 ± 1.78 <sup>a</sup>	100.00 ± 1.78 <sup>a</sup>	100.00 ± 1.78 <sup>a</sup>	100.00 ± 1.78 <sup>a</sup>
		(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)
WE (+)		102.48 ± 2.08 <sup>a</sup>	104.61 ± 8.72 <sup>a</sup>	97.91 ± 8.53 <sup>a</sup>	95.19 ± 5.90 <sup>a</sup>
		(-2.76)	(-5.13)	(2.32)	(5.35)

Values not sharing common letter were significantly different at p<0.05.

1)final 10 μM A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean ± SD (n=3).

Table 61. Effects of Wood extractives (WE) on RBL-2H3 basophilic cell viabilities

Sample	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	% of cell viability			
		WE (conc., v/v)			
		0.5%	1%	2%	4%
Control (A23187 -)		100.00 ± 0.97 <sup>b</sup>	100.00 ± 0.97 <sup>b</sup>	100.00 ± 0.97 <sup>b</sup>	100.00 ± 0.97 <sup>b</sup>
Control (A23187 +)		109.49 ± 4.12 <sup>a</sup>	109.49 ± 4.12 <sup>a</sup>	109.49 ± 4.12 <sup>a</sup>	109.49 ± 4.12 <sup>a</sup>
WE	(-)	108.12 ± 2.85 <sup>a</sup>	107.27 ± 0.87 <sup>a</sup>	107.23 ± 1.14 <sup>a</sup>	105.04 ± 1.86 <sup>a</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 10  $\mu$ M A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

### (3) 왕겨추출액의 생리활성

#### (가) 왕겨추출액의 대식세포 활성화 조절효과

목재추출액과 비슷한 공정을 거쳐 왕겨추출액이 생산되고 있고, 최근 왕겨추출액의 생리활성에 많은 관심이 모아지고 있기 때문에 본 실험에서도 대식세포 활성화에 대한 왕겨추출액의 조절효과를 동일한 방법으로 측정하였다. Table 62에서 보듯이, 왕겨추출액은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NO 생산을 뚜렷하게 저해하였다 (약 88% 억제). 왕겨추출액은 그 자체로 산도가 3.0 이하의 강산성물질로서, 지시세포가 강산에 의하여 사멸하기 때문에 억제효과로 계산되었을 가능성이 매우 높다. 그러나 RBL-2H3 세포에서 조사한 바에 의하면, 산도를 5.0 이상으로 조절한 왕겨추출액은 세포독성이 거의 없어진 반면 (Table 65), 왕겨추출액의 효능은 그대로 보존되고 있음을 알 수 있었다 (Table 62). 따라서 이 결과들은 산도에 관계없이 대식세포의 NO 생성 억제활성을 가진 물질이 왕겨추출액에 포함되어 있음을 시사하고 있다.

#### (나) 왕겨추출액의 암세포 살해활성

왕겨추출액이 다양한 암세포에 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 왕겨추출액 (pH 5.0)은 대장암세포인 CT-26과 monocytic leukemia 세포인 U-937에서 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있음이 밝혀졌다 (Table 63).

#### (다) 왕겨추출액의 비만세포 탈과립 억제활성

왕겨추출액의 비만세포에 대한 탈과립 억제활성을 A23187로 자극한 RBL-2H3세포를 지시세포로 사용하여 조사하였다. Table 64에서 보듯이, 왕겨추출액은  $\beta$ -hexosaminidase의 탈과립을 효과적으로 억제하였다 (pH 5.0에서 거의 99% 억제).  $\beta$ -hexosaminidase 활성을 지표로 한 탈과립 억제활성의 측정에 있어서, 왕겨추출액에 의한 세포사멸이 억제활성의 측정에 장애가 될 수 있다는 판단에서 MTT법에 의하여 왕겨추출액의 세포독성을 병행하여 측정하였다. 그 결과, 2% 농도조건에서는 80%의 세포가 생존하고 있어, 현저한 탈과립 억제효과는 지시세포가 사멸한 결과가 아니라, 왕겨추출액에 비만세포의 탈과립을 지시하는 특정 성분이 존재한다는 사실이 암시되었다 (Table 65). 각각의 산도별로 조절한 왕겨추출액의 세포독성과 비만세포 탈과립 억제활성을 측정한 결과, 산도는 pH 5.0이며 시료농도는 2% 조건에서 충분히 세포독성이 없으면서도 효율적으로 비만세포의 탈과립이 억제된다는 사실을 알았고, 이 결과가 재현 가능한 결과임을 pH 5.0으로 조절한 왕겨추출액을 조제하여 재차 실험함으로써 증명하였다 (Table 66, Table 67). 이상의 결과는 pH 조절이라는 간단한 방법을 통하여 세포독성을 완화시키면서 생리활성이 보존된 왕겨추출액을 제조할 수 있다. 산도가 조절된 왕겨추출액은 대식세포나 비만세포의 활성화를 조절할 수 있기 때문에 염증반응의 완화나 예방, 그리고 특정 암세포의 사멸을 유도하는 기능성소재로 활용할 수 있는 가능성을 제시하였다.



Table 62. Effects of Rice Husk Extractives (RHE) on NO production in RAW264.7 cells

pH adjustment (5.0)	LPS stimulation <sup>1)</sup>	NO production ( $\mu$ M of nitrite)			
		PBS <sup>2)</sup> (conc., v/v)	RHE (conc., v/v)		
		2%	0.5%	1%	2%
(-)	(-)	2.262 $\pm$ 0.234	2.262 $\pm$ 0.234 <sup>a</sup>	2.262 $\pm$ 0.234 <sup>a</sup>	2.262 $\pm$ 0.234 <sup>a</sup>
(-)	(+)	41.064 $\pm$ 0.619	41.064 $\pm$ 0.619 <sup>b</sup>	41.064 $\pm$ 0.619 <sup>b</sup>	41.064 $\pm$ 0.619 <sup>c</sup>
(-)	(-)	-	1.551 $\pm$ 0.195 <sup>a</sup>	1.513 $\pm$ 0.172 <sup>a</sup>	1.738 $\pm$ 0.234 <sup>a</sup>
(+)	(-)	-	4.135 $\pm$ 0.337 <sup>a</sup>	3.985 $\pm$ 0.343 <sup>a</sup>	3.873 $\pm$ 0.172 <sup>a</sup>
(-)	(+)	-	2.449 $\pm$ 0.195 <sup>a</sup>	2.375 $\pm$ 0.343 <sup>a</sup>	2.899 $\pm$ 0.195 <sup>a</sup>
(+)	(+)	-	2.449 $\pm$ 0.112 <sup>a</sup>	3.685 $\pm$ 0.297 <sup>a</sup>	4.959 $\pm$ 0.343 <sup>b</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)100 nM LPS used in this study. 2)Phosphate buffered saline without Ca<sup>2+</sup>.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 63. Cytotoxic effects of Rice Husk Extractives (RHE) on various cancer cell lines

Cancer cell line	Cell cytotoxicity (%)			
	PBS <sup>1)</sup> (conc., v/v)	RHE (conc., v/v)		
	2%	0.5%	1%	2%
RAW264.7	0.000 $\pm$ 2.002 <sup>b</sup>	6.218 $\pm$ 2.020 <sup>b</sup>	8.030 $\pm$ 0.456 <sup>b</sup>	9.904 $\pm$ 0.746 <sup>a</sup>
HGF-1	0.000 $\pm$ 0.988 <sup>b</sup>	1.055 $\pm$ 0.267 <sup>bc</sup>	2.000 $\pm$ 0.713 <sup>b</sup>	4.001 $\pm$ 0.561 <sup>a</sup>
NIH-3T3	0.000 $\pm$ 1.067 <sup>a</sup>	0.873 $\pm$ 0.439 <sup>bc</sup>	1.843 $\pm$ 0.388 <sup>b</sup>	6.733 $\pm$ 0.583 <sup>a</sup>
A549	0.000 $\pm$ 2.341 <sup>a</sup>	2.252 $\pm$ 1.477 <sup>b</sup>	0.526 $\pm$ 2.031 <sup>b</sup>	6.381 $\pm$ 1.598 <sup>a</sup>
MDA-MB-231	0.000 $\pm$ 0.741 <sup>b</sup>	0.065 $\pm$ 0.688 <sup>b</sup>	1.110 $\pm$ 1.412 <sup>b</sup>	4.830 $\pm$ 2.044 <sup>a</sup>
CT-26	0.000 $\pm$ 2.727 <sup>a</sup>	6.473 $\pm$ 1.076 <sup>c</sup>	27.567 $\pm$ 4.050 <sup>b</sup>	54.129 $\pm$ 2.679 <sup>a</sup>
L1210	0.000 $\pm$ 0.323 <sup>b</sup>	1.420 $\pm$ 2.445 <sup>c</sup>	5.211 $\pm$ 1.583 <sup>b</sup>	10.979 $\pm$ 2.310 <sup>a</sup>
U-937	0.000 $\pm$ 2.961 <sup>b</sup>	25.112 $\pm$ 5.049 <sup>c</sup>	39.179 $\pm$ 1.063 <sup>b</sup>	55.696 $\pm$ 1.748 <sup>a</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)Phosphate buffered saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 64. Modulation of pH changes of Rice Husk Extractives (RHE) on inhibition of  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 basophilic cells stimulated with ionophore 23187

pH adjustment	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	release of $\beta$ -hexosaminidase (% of inhibition)		
		RHE (conc., v/v)		
		1%	2%	4%
Control (A23187 -)		22.42 $\pm$ 0.13 <sup>g</sup> (100.00)	22.42 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup> (100.00)	22.42 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup> (100.00)
Control (A23187 +)		100.00 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup> (0.00)
not adjusted	(+)	41.19 $\pm$ 0.62 <sup>d</sup> (70.74)	58.11 $\pm$ 11.7 <sup>b</sup> (40.97)	162.30 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup> (3.07)
3.0	(+)	52.83 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup> (60.80)	51.82 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup> (62.10)	105.43 $\pm$ 6.17 <sup>b</sup> (-7.00)
4.0	(+)	26.84 $\pm$ 2.10 <sup>f</sup> (94.30)	38.94 $\pm$ 3.71 <sup>c</sup> (78.70)	55.47 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup> (57.40)
5.0	(+)	31.19 $\pm$ 1.01 <sup>e</sup> (88.70)	21.80 $\pm$ 1.07 <sup>e</sup> (100.80)	22.50 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup> (99.90)
6.0	(+)	45.15 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup> (70.70)	27.08 $\pm$ 0.71 <sup>d</sup> (94.00)	30.72 $\pm$ 1.53 <sup>d</sup> (89.30)

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 10  $\mu$ M A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 65. Modulation of pH changes of Rice Husk Extractives (RSE) on RBL-2H3 basophilic cell viabilities

pH adjustment	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	% of cell viability		
		RHE (conc., v/v)		
		1%	2%	4%
Control (A23187 -)		100.00 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup>	100.00 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup>	100.00 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup>
Control (A23187 +)		98.53 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	98.53 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	98.53 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>
not adjusted	(-)	74.14 $\pm$ 2.56 <sup>d</sup>	9.76 $\pm$ 5.05 <sup>e</sup>	5.83 $\pm$ 0.15 <sup>e</sup>
3.0	(-)	57.40 $\pm$ 2.58 <sup>e</sup>	29.90 $\pm$ 1.57 <sup>d</sup>	5.09 $\pm$ 0.27 <sup>e</sup>
4.0	(-)	60.17 $\pm$ 2.48 <sup>e</sup>	45.11 $\pm$ 3.06 <sup>c</sup>	15.22 $\pm$ 4.65 <sup>d</sup>
5.0	(-)	88.25 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	83.15 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	63.70 $\pm$ 3.39 <sup>c</sup>
6.0	(-)	83.74 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	84.15 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup>	88.80 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 10  $\mu$ M A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 66. Inhibitory effects of Rice Husk Extractives (RHE) on  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 basophilic cells stimulated with ionophore 23187

pH adjustment (5.0)	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	release of $\beta$ -hexosaminidase (% of inhibition)			
		RHE (conc., v/v)			
		0.5%	1%	2%	4%
Control (A23187 -)		6.56 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> (-)	6.56 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> (-)	6.56 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> (-)	6.56 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup> (-)
Control (A23187 +)		100.00 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup> (0.00)	100.00 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup> (0.00)
(-)	(-)	74.64 $\pm$ 3.42 <sup>d</sup> (27.14)	67.95 $\pm$ 0.31 <sup>e</sup> (34.30)	44.60 $\pm$ 1.07 <sup>f</sup> (59.29)	106.64 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup> (-7.11)
(+)	(+)	81.29 $\pm$ 1.12 <sup>c</sup> (20.02)	66.25 $\pm$ 4.23 <sup>e</sup> (36.12)	10.68 $\pm$ 0.33 <sup>g</sup> (95.59)	10.32 $\pm$ 0.77 <sup>g</sup> (95.98)

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 10  $\mu$ M A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Table 67. Effects of Rice Husk Extractives (RSE) on RBL-2H3 basophilic cell viabilities

pH adjustment (5.0)	A23187 stimulation <sup>1)</sup>	% of cell viability			
		RHE (conc., v/v)			
		0.5%	1%	2%	4%
Control (A23187 -)		100.00 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	100.00 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	100.00 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	100.00 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>
Control (A23187 +)		94.80 $\pm$ 3.66 <sup>c</sup>	94.80 $\pm$ 3.66 <sup>c</sup>	94.80 $\pm$ 3.66 <sup>c</sup>	94.80 $\pm$ 3.66 <sup>c</sup>
(-)	(-)	91.09 $\pm$ 1.34 <sup>c</sup>	74.81 $\pm$ 5.38 <sup>d</sup>	74.81 $\pm$ 5.38 <sup>d</sup>	8.44 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>
(+)	(-)	108.04 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	112.62 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	112.47 $\pm$ 3.32 <sup>ab</sup>	106.67 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>

Values not sharing common letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

1)final 10  $\mu$ M A23187 was used in this study.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

#### (4) 미강추출 기능성분획의 대식세포 활성 조절

##### (가) 미강추출 기능성분획의 항산화활성

일반미의 미강에 함유된 주요활성 성분 중 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol 및 phytic acid 추출분획을 대상으로 우선 항산화활성을 조사하였다. 항산화활성은 먼저 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능을 지표로 측정하였다. 측정 결과, ferulic acid 분획의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 높았고, 그 다음이 ricetrienol 분획으로 나타났다(Table 68). 특히 ferulic acid는 0.4 및 0.8 mg/ml의 두 가지 농도에서 모두 93% 이상의 라디칼 소거활성을 보였고, ricetrienol 분획은 65% 이상의 라디칼 소거활성을 보였지만 phytic acid 분획에서는 오히려 산화활성이 측정되었다(0.02%와 0.04%에서 각각 약 -50 및 -77%의 소거활성). 또한 각 기능성 성분 추출분획은 미강 전체추출물에 비하여 라디칼 소거활성이 높은 것으로 나타났다. 그러나  $\gamma$ -oryzanol의 경우, 분획에 포함된 타 지용성성분이 반응액에 첨가될 때 응고되는 문제점이 해결되지 않았기 때문에 본 실험계에서 항산화활성을 측정하는 것이 불가능하였다.

다음으로 각 미강의 기능성성분 분획이 세포 내의 산화환경에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 측정하기 위하여 1.4%의 DMSO를 HL-60세포에 호중구 유사세포로 분화시킨 후 TPA 처리로 발생한 활성산소종을 기능성분획이 소거하는 활성을 지시시약인 DCA-DF가 산화될 때 방출되는 형광이 감소하는 정도를 측정하는 방법으로 대조군에 대한 각 시료의 상대적인 항산화활성을 측정하였다 (Table 69). 실험 결과, 역시 ferulic acid의 항산화효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 68. Scavenging effects of rice bran functional component fractions on DPPH radicals

Sample		Electron Donating Ability (%)
BHT	100uM	91.807 ± 4.558 <sup>a</sup>
.....		
Total bran extract	0.4mg/ml	46.012 ± 1.664 <sup>c</sup>
	0.8mg/ml	66.834 ± 2.339 <sup>b</sup>
Ferulic acid	0.4mg/ml	93.044 ± 4.199 <sup>a</sup>
	0.8mg/ml	94.140 ± 3.991 <sup>a</sup>
γ-oryzanol	0.4mg/ml	ND
	0.8mg/ml	ND
Ricetrienol	0.4mg/ml	65.979 ± 4.403 <sup>b</sup>
	0.8mg/ml	70.282 ± 5.380 <sup>b</sup>
Phytic acid	0.02%	-50.616 ± 8.597 <sup>d</sup>
	0.04%	-76.664 ± 16.809 <sup>c</sup>

ND: not determined

Table 69. Reactive oxygen radical species scavenging activities of rice bran functional component fractions in HL-60 cells

Sample	% of scavenging activity
Total bran extract (100ug/ml)	36.10 ± 4.82 <sup>c</sup>
Ferulic acid (100ug/ml)	88.56 ± 7.63 <sup>a</sup>
γ-oryzanol (100ug/ml)	ND
Ricetrienol (100ug/ml)	51.78 ± 3.44 <sup>b</sup>
Phytic acid (100ug/ml)	ND

ND: not determined

(나) 미강추출 기능성분획의 대식세포 NO 생산 조절활성

대식세포 활성화의 도 다른 지표인 NO 생산에 대하여 미강 전체추출물을 포함한 각 기능성 성분분획의 조절활성을 RAW264.7 세포를 지시세포로 조사한 결과, 세균 내독소인 LPS의 자극으로 유도된 NO의 생산이 ferulic acid 분획에서 유의하게 억제됨을 발견하였다(Table 70). 즉, ferulic acid 분획은 100 ug/ml의 농도에서 약 1% 정도 NO 생산을 억제하였다. Ricetrienol 분획의 NO 생산 억제능은 ferulic acid보다 약했으며 100 ug/ml의 농도에서 약 13% 정도 NO 생산을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나  $\gamma$ -oryzanol 분획과 phytic acid 분획은 항산화활성 측정의 경우와 마찬가지로 조추출분획 내에 잔존하는 지질 등의 혼입물 때문에 반응액 내에서 침전화 되는 경향이 강하기 때문에 세포의 NO 생산에 대한 억제능을 측정할 수 없었다.

이상 측정된 NO 생산 억제활성이 시료에 의한 세포독성 때문에 나타났을 가능성을 배제하기 위하여 MTT assay를 통하여 시료의 RAW264.7 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 그 결과, Table 71에 나타난 것처럼 100 ug/ml의 농도에서 ferulic acid와 phytic acid 분획은 각각 95%와 98%의 세포생존률을 보였다. 따라서 염려했던 세포독성은 없었으며, Table 25의 NO 생성 억제효과는 각 시료가 LPS 자극으로 발생한 NO를 소거했거나 NO의 생성을 근본적으로 억제했다는 사실을 가리킨다. 마찬가지로  $\gamma$ -oryzanol 분획과 phytic acid 분획은 사용한 용매의 문제점 때문에 본 실험계에서 측정이 불가능하였다.

Table 70. Inhibitory effects of rice bran functional component fractions on NO generation in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Sample		Nitrite (uM)
Vehicle		4.659 ± 0.283 <sup>d</sup>
LPS 100ng/ml		54.472 ± 2.727 <sup>a</sup>
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
Ferulic acid + LPS 100ng/ml	1ug/ml	45.820 ± 2.649 <sup>b</sup>
	10ug/ml	45.895 ± 1.799 <sup>b</sup>
	100ug/ml	32.412 ± 1.937 <sup>c</sup>
γ-oryzanol + LPS 100ng/ml	1ug/ml	ND
	10ug/ml	ND
	100ug/ml	ND
Ricetrienol + LPS 100ng/ml	1ug/ml	52.824 ± 0.908 <sup>a</sup>
	10ug/ml	50.127 ± 0.172 <sup>ab</sup>
	100ug/ml	47.655 ± 0.395 <sup>b</sup>
Phytic acid + LPS 100ng/ml	1ug/ml	ND
	10ug/ml	ND
	100ug/ml	ND

ND: not determined

Table 71. Viability of RAW264.7 cells treated with rice bran functional component fractions by MTT assay

Sample	Cell viability (%)
Vehicle	100.000 ± 1.555 <sup>a</sup>
LPS 100ng/ml	95.709 ± 1.131 <sup>b</sup>
-----	
Ferulic acid + LPS 100ng/ml	1ug/ml 10ug/ml 100ug/ml
	96.916 ± 1.335 <sup>b</sup> 97.154 ± 2.325 <sup>ab</sup> 95.283 ± 1.048 <sup>b</sup>
$\gamma$ -oryzanol + LPS 100ng/ml	1ug/ml 10ug/ml 100ug/ml
	ND ND ND
Ricetrienol + LPS 100ng/ml	1ug/ml 10ug/ml 100ug/ml
	98.772 ± 1.092 <sup>a</sup> 97.781 ± 1.236 <sup>a</sup> 97.962 ± 2.078 <sup>ab</sup>
Phytic acid + LPS 100ng/ml	1ug/ml 10ug/ml 100ug/ml
	ND ND ND

ND: not determined

(다) 미강추출 기능성분획의 비만세포 활성화 조절

① 미강 추출물 분획의 비만세포 탈과립에 대한 억제활성

미강 전체 추출물 및 각 기능성 추출분획이 가지는 과민성 염증반응에 대한 억제활성을 백서의 비만세포주인 RBL-2H3 세포를 지시세포로 사용하여 측정하였다. 즉, RBL-2H3 세포를 칼슘 ionophore인 A23187을 처리하여 Ca<sup>2+</sup> influx를 발생시킴으로써 세포의 탈과립을 유도하였고, 이때 각 시료의 처리가 탈과립에 미치는 영향을 과립구성원의 하나인  $\beta$ -hexosaminidase 효소활성을 측정함으로써 평가하였다. Table 72에 정리된 것처럼, ferulic acid 분획과 phytic acid 분획에서 유의할 수준의 억제활성이 발견되었지만(10 ug/ml ferulic acid에서 약 40%의 억제, 100 ug/ml의 phytic acid에서 약 70%의 억제), ricetrienol 분획에서는 뚜렷한 억제활성을 발견할 수 없었다. 또한  $\gamma$ -oryzanol 분획은 배양배지에 첨가했을 때 시료가 침전하는 현상 때문에 탈과립에 미치는 효과를 측정할 수 없었다.



Table 72. Inhibitory effects of rice bran functional component fractions on  $\beta$ -hexosaminidase release from ionophore A23187-treated RBL-2H3 cells

Sample	$\beta$ -hexosaminidase inhibition (%)
Vehicle	100.000 $\pm$ 0.567 <sup>a</sup>
A23187 (10uM)	0.000 $\pm$ 1.406 <sup>c</sup>
1ug/ml	18.564 $\pm$ 4.073 <sup>b</sup>
Ferulic acid 10ug/ml	40.347 $\pm$ 1.339 <sup>b</sup>
100ug/ml	2.351 $\pm$ 1.134 <sup>c</sup>
1ug/ml	ND
$\gamma$ -oryzanol 10ug/ml	ND
100ug/ml	ND
1ug/ml	13.738 $\pm$ 4.271 <sup>b</sup>
Ricetrienol 10ug/ml	1.980 $\pm$ 2.045 <sup>d</sup>
100ug/ml	-27.351 $\pm$ 2.884 <sup>d</sup>
1ug/ml	-46.658 $\pm$ 1.832 <sup>c</sup>
Phytic acid 10ug/ml	24.134 $\pm$ 3.024 <sup>c</sup>
100ug/ml	69.678 $\pm$ 1.485 <sup>b</sup>

ND: not determined

② 미강 추출물 분획의 비만세포에 대한 세포독성

$\beta$ -hexosaminidase 탈과립 억제현상이 시료에 의한 세포독성 때문에 나타났을 가능성을 배제하기 위하여 MTT assay를 통하여 시료가 RBL-2H3 세포에 미치는 세포독성을 측정하였다. 그 결과, Table 73에 나타난 것처럼 10 ug/ml 및 100 ug/ml의 phytic acid를 처리했을 경우, 세포활성은 각각 약 47% 및 14% 정도로 나타나, phytic acid가 세포독성이 강하다는 사실을 알 수 있었고, Table 72에서 나타난 phytic acid의 탈과립 억제활성은 세포독성 때문에 나타난 현상일 가능성이 높아졌다. 또한  $\gamma$ -oryzanol 분획은 배지에 첨가할 때 생기는 침전현상 때문에 정확한 세포독성을 측정할 수 없었다. 이상 기술한 것과 동일한 실험에서 목재추출물은 생리활성을 보이지 않았기 때문에 다음부터의 실험에서는 미강추출 기능성분획만을 가지고 실험을 수행하였다(data not shown).

Table 73. Viability of RBL-2H3 cells treated with rice bran functional component fractions by MTT assay

Sample	Cell Viability (%)
Vehicle	100.000 ± 0.475 <sup>a</sup>
A23187 (10uM)	101.326 ± 1.017 <sup>a</sup>
1ug/ml	99.256 ± 0.765 <sup>a</sup>
Ferulic acid 10ug/ml	102.302 ± 1.820 <sup>a</sup>
100ug/ml	102.884 ± 2.158 <sup>a</sup>
1ug/ml	ND
γ-oryzanol 10ug/ml	ND
100ug/ml	ND
1ug/ml	101.721 ± 1.912 <sup>a</sup>
Ricetrienol 10ug/ml	101.488 ± 1.836 <sup>a</sup>
100ug/ml	101.093 ± 0.545 <sup>a</sup>
1ug/ml	81.372 ± 1.939 <sup>b</sup>
Phytic acid 10ug/ml	47.163 ± 0.252 <sup>b</sup>
100ug/ml	13.698 ± 0.358 <sup>b</sup>

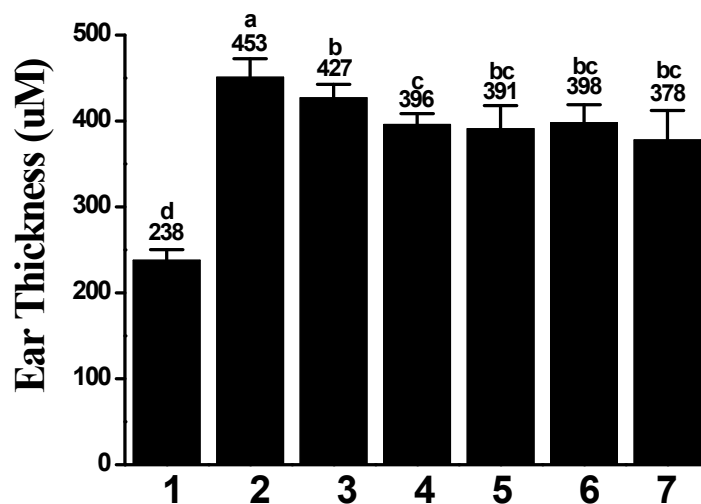
ND: not determined

(라) 미강추출 기능성분획이 생체 피부부종에 대한 조절활성

① TPA로 유도된 생쥐 피부부종에 대한 억제활성

일반미 미강추출물 및 미강에서 추출한 기능성 성분분획을 3주간 식이한 생쥐의 귀에 1.5 nm의 TPA를 10 ul씩 도포하여 유도된 피부부종이 미강기능성 성분에 의하여 억제되는 정도를 귀의 두께를 측정하여 평가하였다. 그 결과, ferulic acid 분획을 식이한 생쥐에서 유의한 수준의 피부부종 억제효과가 나타났지만(Fig. 53 A), phytic acid 분획의 식이구룹에서도 가장 현저한 억제효과가 관찰되었다(약 17% 억제). 미강 추출물 및 분리된 기능성분획의 식이가 생체에 미치는 역효과에 대해서는 각 구룹별 생쥐의 체중을 측정하여 평가하였다. Fig. 53B에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 기능성분획들은 실험동물의 체중에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보아, 특별한 생체 독성은 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

(A)



(B)

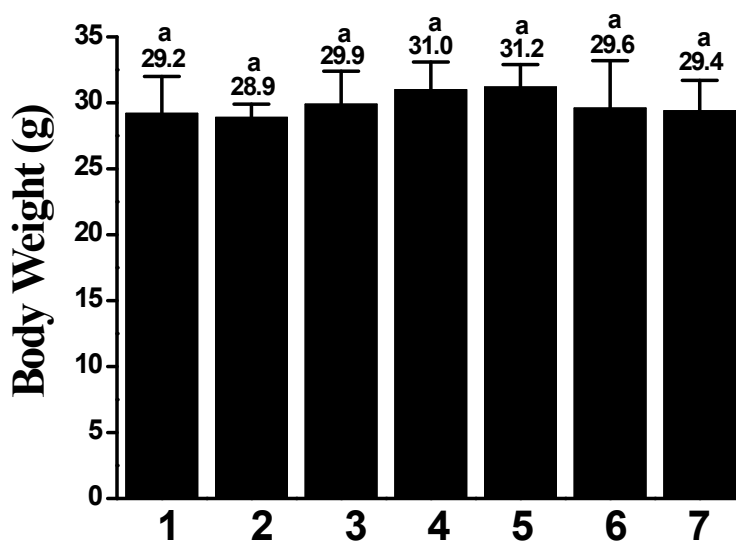


Fig. 53 Modulatory effects of rice bran functional component fractions on TPA-induced ear edema in mice. (A) Measurement of ear thickness. (B) Measurement of biosafety of rice bran functional component fractions using body weight as the safety indicator. lane 1, vehicle only; lane 2, TPA treatment only; lane 3, diet supplemented with total rice bran extract; lane 4, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 5, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 6, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 7, diet supplemented with 0.2% phytic acid.

## ② 미강추출 기능성분획의 염증억제 기작

피부염증을 일으키는데 관여하는 cytokine의 유전자 발현도를 RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 염증 cytokine 유전자로는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6를 선정하였고 염증을 유발하는 대표적인 eicosanoid로 PGE2와 LTB4 생성효소인 COX-2와 5-LOX 유전자의 mRNA 발현이 시료의 처리에 의하여 변화하는 정도를  $\beta$ -actin의 발현을 기준으로 측정하였다(Fig. 54). 그 결과, COX-2와 5-LOX 유전자의 발현이 phytic acid 분획의 식이에 의하여 가장 현저하게 감소하였다(Fig. 54, lane 7, 약 33% 억제). 반면, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 유전자 발현은  $\gamma$ -oryzanol 분획의 식이에 의하여 가장 크게 억제됨을 발견하였다(Fig. 54 lane 5, 각각 약 16%, 19%, 16% 억제).

특히 염증유발물질인 PGE2와 LTB4의 생합성에 관련된 효소인 COX-2와 5-LOX의 단백질 발현이 각 추출분획 식이에 의하여 변화하는 정도를 각 효소에 대한 항체를 이용한 western blot으로 조사하였다(Fig. 55). 그 결과, 억제도는 비교적 낮았지만  $\gamma$ -oryzanol 분획과 phytic acid 분획의 식이가 COX-2와 5-LOX 단백질 발현의 억제에 가장 효과적인 것으로 나타났다( $\gamma$ -oryzanol 분획의 COX-2와 5-LOX 억제, 각각 약 11% 및 20%; phytic acid 분획의 COX-2와 5-LOX 억제, 각각 약 13% 및 14%).

다음으로 미강추출 기능성분획의 식이가 부종조직 내 염증관련물질의 합성량에 미치는 효과를 측정하였다. 이를 위하여 각 식이 그룹별 생쥐의 부종조직 추출물에 함유된 염증 cytokine 및 eicosanoid인 PGE2와 LTB4양을 ELISA법으로 측정하였다(Table 74). 그 결과, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2의 양은 phytic acid 식이 그룹에서 가장 낮은 반면, IL-6와 LTB4의 생성량은  $\gamma$ -oryzanol 분획의 식이그룹에서 가장 낮게 나타났다.

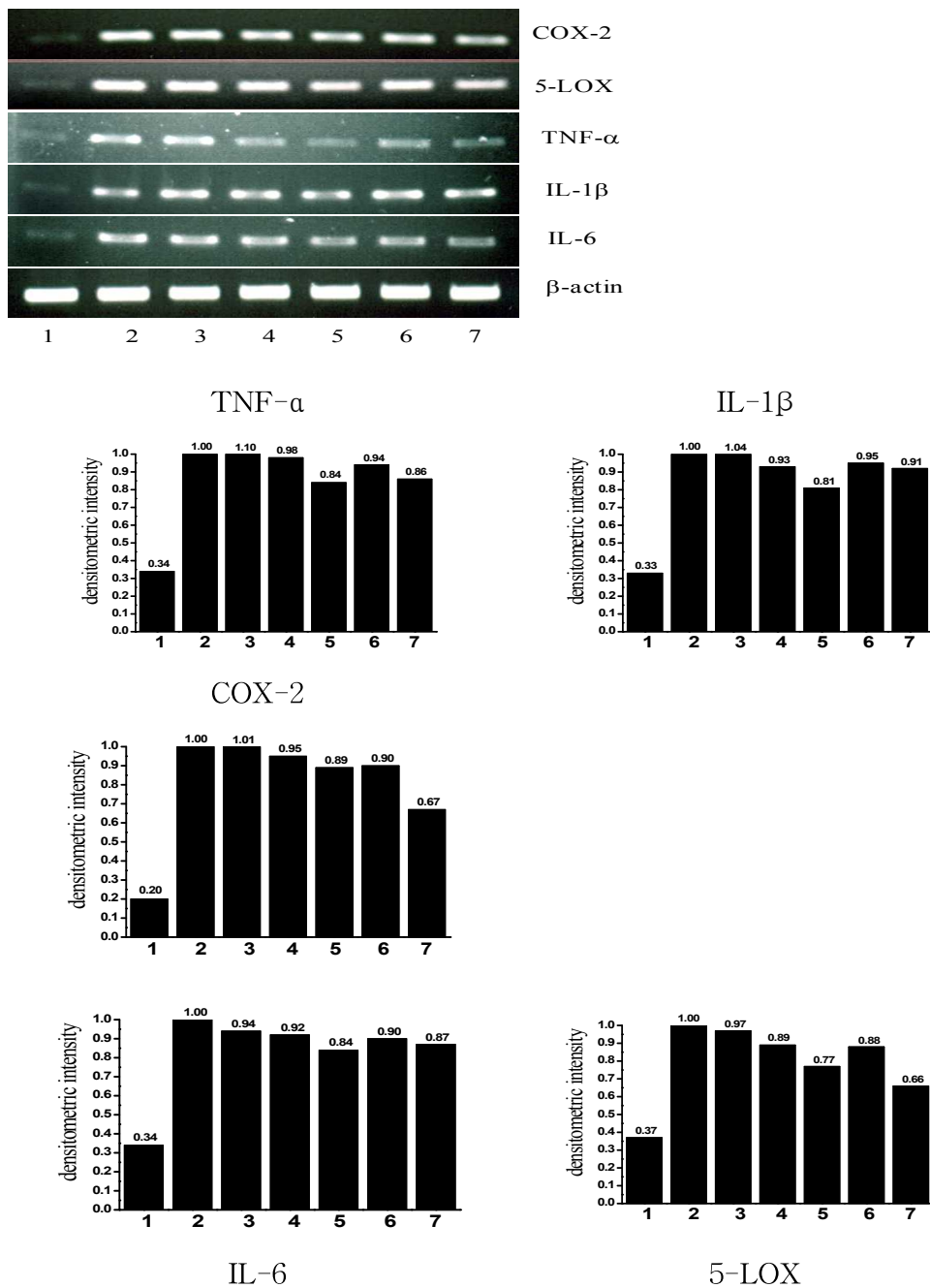


Fig. 54 Modulatory effects of rice bran functional component fractions on COX-2, 5-LOX and proinflammatory cytokine gene expressions using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. lane 1, vehicle only; lane 2, TPA treatment only; lane 3, diet supplemented with total rice bran extract; lane 4, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 5, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 6, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 7, diet supplemented with 0.2% phytic acid.

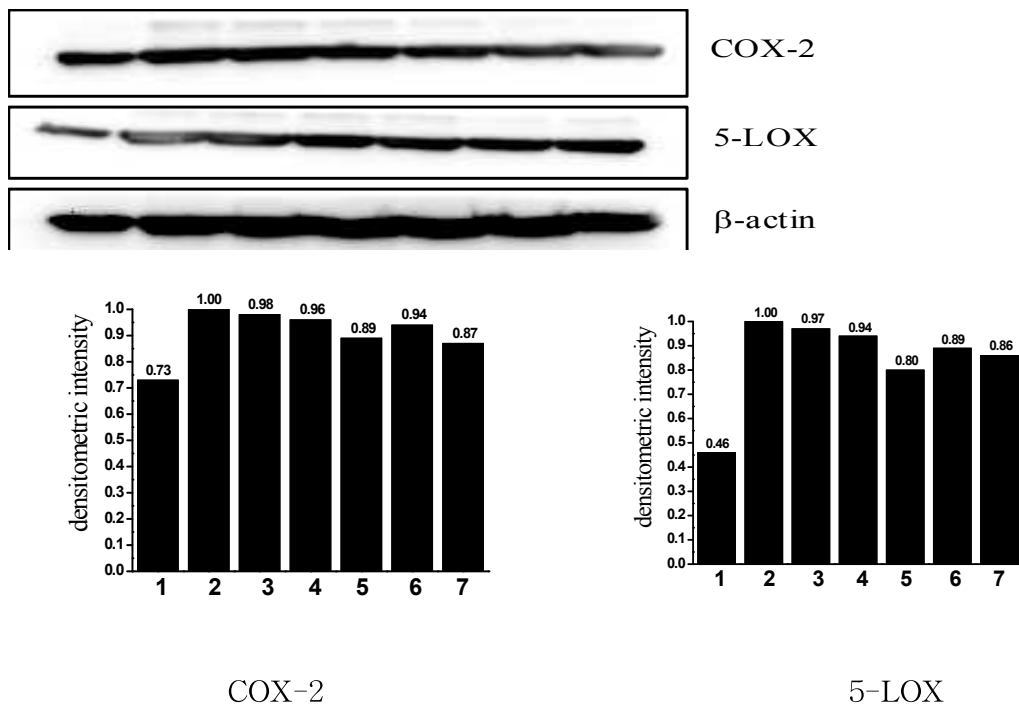


Fig. 55 Modulatory effects of rice bran functional component fractions on COX-2, 5-LOX and proinflammatory cytokine polypeptide expressions using western blotting analysis. lane 1, vehicle only; lane 2, TPA treatment only; lane 3, diet supplemented with total rice bran extract; lane 4, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 5, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 6, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 7, diet supplemented with 0.2% phytic acid.

Table 74. Modulatory effects of rice bran functional component fractions on proinflammatory eicosanoids and cytokine productions in edema-bearing ear tissue using ELISA method

Sample	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	LTB <sub>4</sub> (pg/ml)	
Vehicle	113.222 ± 21.752 <sup>d</sup>	62.333 ± 32.146 <sup>d</sup>	
TPA 160uM	988.222 ± 21.104 <sup>a</sup>	295.667 ± 35.119 <sup>a</sup>	
Total bran extract	970.444 ± 4.194 <sup>a</sup>	269.000 ± 17.321 <sup>ab</sup>	
Ferulic acid	806.000 ± 3.333 <sup>b</sup>	222.333 ± 20.817 <sup>b</sup>	
γ-oryzanol	786.000 ± 12.019 <sup>bc</sup>	205.667 ± 15.275 <sup>b</sup>	
Ricetrienol	812.111 ± 6.310 <sup>b</sup>	229.000 ± 17.321 <sup>b</sup>	
Phytic acid	771.556 ± 5.092 <sup>c</sup>	212.333 ± 5.774 <sup>b</sup>	
Pro-inflammatory cytokines (pg/ml)			
Sample	TNF-α	IL-1β	IL-6
Vehicle	10.739 ± 0.307 <sup>d</sup>	195.343 ± 3.839 <sup>c</sup>	193.377 ± 6.969 <sup>a</sup>
TPA 160uM	86.283 ± 1.383 <sup>a</sup>	1093.200 ± 26.668 <sup>a</sup>	933.739 ± 6.661 <sup>e</sup>
Total bran extract	84.652 ± 0.922 <sup>a</sup>	1076.343 ± 42.022 <sup>a</sup>	895.551 ± 13.527 <sup>b</sup>
Ferulic acid	66.500 ± 1.383 <sup>b</sup>	887.057 ± 5.051 <sup>b</sup>	751.275 ± 20.598 <sup>c</sup>
γ-oryzanol	65.087 ± 0.615 <sup>b</sup>	870.057 ± 61.417 <sup>b</sup>	713.449 ± 7.686 <sup>d</sup>
Ricetrienol	65.196 ± 0.461 <sup>b</sup>	873.200 ± 24.244 <sup>b</sup>	748.377 ± 5.431 <sup>c</sup>
Phytic acid	61.391 ± 1.230 <sup>c</sup>	847.486 ± 27.072 <sup>b</sup>	727.290 ± 9.633 <sup>cd</sup>



(마) 미강추출 기능성분획의 생체 종양발생에 대한 조절활성

① 미강추출 기능성분획의 식이에 의한 종양억제 활성

생쥐의 대장암 세포주인 CT-26을 BALB/c 생쥐에 약 105세포를 피하주사 하였다. 암세포가 이식된 3주 후, 피부에 형성된 종양의 크기를 적출된 종양조직의 중량을 측정하여 평가하였다. 결과를 보면, 미강 전체추출물도 이식된 암세포가 종양피를 형성하는 것을 억제하였지만, 특히  $\gamma$ -oryzanol 분획 및 phytic acid 분획의 식이를 투여 받은 그룹에서 종양피의 형성이 현저히 저해를 받았음을 알 수 있었다(Fig 56, lane 4, 6;  $\gamma$ -oryzanol과 phytic acid 각각 약 32%와 23% 억제).

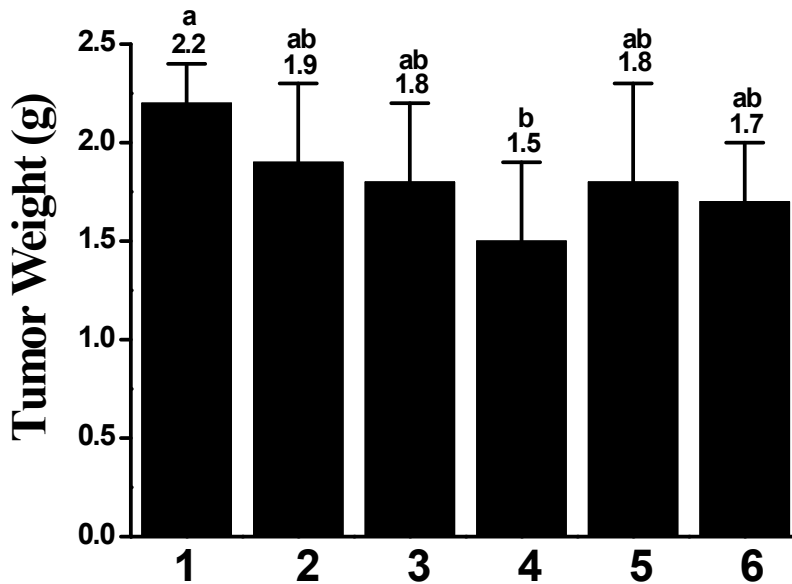


Fig. 56 Tumor size in colorectal carcinoma-bearing mice fed the diets supplemented with rice bran functional component fractions. lane 1, CT-26 bearing control; lane 2, diet supplemented with total rice bran extract; lane 3, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 4, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 5, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 6, diet supplemented with 0.2% phytic acid.

## ② 미강추출 기능성분획의 식이에 의한 종양발생 동물의 대식세포 활성화

종양을 가진 개체에 있어서 내재면역계 세포의 기능이 크게 저하되어 있음이 널리 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 미강 전체추출물을 포함하여 미강추출 기능성분획의 식이가 기능이 저하된 내재면역세포, 특히 대식세포의 기능을 향진시킬 수 있는가 여부를 복강 대식세포의 NO 생성량을 지표로 조사하였다. Table 75에 나타난 것처럼 CT-26 암세포의 이식으로 유발된 종양을 보유한 생쥐의 대식세포는 NO를 생성하는 능력이 매우 저하되어 있음을 알 수 있다. 이에 비하여 미강 추출 기능성분획 중 특히 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol을 식이한 생쥐의 대식세포들은 NO 생성량이 대조군에 비하여 현저히 상승되어 있음을 알 수 있었다(ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol에 있어서 각각 약 45%, 94%, 84% 증가).

대식세포에 의한 세포독성 중 중요한 것이 활성산소종을 방출하는 것이다. 따라서 본 실험에서는 미강 전체 추출물을 포함한 미강 기능성분획의 식이가 생체 대식세포의 활성산소종 발생에 미치는 효과를 측정하였다. 즉, 각 실험군 및 대조군 생쥐에서 복강 대식세포를 분리하여 zymosan의 자극으로 발생하는 활성산소종이 각 기능성분 분획의 식이에 의하여 변화하는 정도를 luminometer로 측정하였다. 그 결과, Table 76에 나타난 것처럼 ferulic acid 등 기능성분획의 식이는 대식세포의 활성산소종 생산을 획기적으로 증가시키는 것을 발견하였다. 특히,  $\gamma$ -oryzanol의 경우 종양보유 생쥐에 비하여 약 5배의 활성산소종의 생산이 증가된 것으로 나타났다.

각 기능성성분 분획의 식이가 대식세포에 있어서 활성산소종 방출량의 증가 뿐 아니라 세포 내부의 활성산소종 생성 관련기작의 활성화를 통한 세포 내 산화수준의 증가를 유도하는지 여부를 산화에 의하여 fluorescence를 방출하는 지시시약인 DCF-DA를 사용하여 조사하였다. Table 77에 정리된 바와 같이 미강 전체추출물을 포함한 각 기능성성분 분획의 식이는 전반적으로 대식세포 내의 산화수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 미강 전체 추출물 보다는 각 기능성성분 분획이 세포 내 산화수준을 증가시키는데 효과적이었으며, 특히  $\gamma$ -oryzanol, ferulic acid, ricetrienol의 효과가 높았다( $\gamma$ -oryzanol, ferulic acid, ricetrienol 식이의 경우 종양보유 대조군에 비하여 각각 약 210%, 190% 및 185% 증가). 종양피의 크기 감소와 항산화효과의 상관성을 보면 종양의 감소에 기능성성분 식이에 의한 활성산소종 생산의 증가가 크게 작용했음을 알 수 있었다.

미강 전체 추출물을 포함한 기능성성분 분획의 대식세포 기능증진을 평가하는 지표로 대식세포의 포식활성에 대하여 조사하였다. 포식대상의 표적물질로서는 FITC로 표식된 dextran을 사용하였고 dextran의 포식으로 fluorescence을 방출하는 세포군의 크기를 fluorometer로 측정하여 평가하였다. Table 78에 나타난 것처럼 미강 전체추출물 식이는 약간의 포식활성을 유도하는데 그친 반면, ferulic acid 등 기능성성분 분획의 식이는 유의한 수준의 활성 증가를 나타내었다. 특히 활성산소종 생산의 경우와 마찬가지로  $\gamma$ -oryzanol 분획의 식이에 의한 활성증가가 가장 크게 나

타났다(약 72% 증가).

다음으로 미강추출 기능성분획의 식이가 복강 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 조사하였다 (Table 79). 그 결과, 염증 cytokine의 양은  $\gamma$ -oryzanol 분획의 식이에 의하여 가장 현저하게 증가한 것을 알 수 있었다(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 종양보유 실험군에 비하여 각각 약 29%, 48%, 46% 증가).

Table 75. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on NO generation in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage

Sample	Nitrite (uM)
Vehicle	44.653 $\pm$ 0.719 <sup>a</sup>
CT-26 control	10.898 $\pm$ 0.652 <sup>e</sup>
-----	
Total bran extract	12.444 $\pm$ 0.706 <sup>d</sup>
Ferulic acid	19.853 $\pm$ 0.934 <sup>b</sup>
$\gamma$ -oryzanol	21.139 $\pm$ 0.710 <sup>b</sup>
Ricetrienol	20.094 $\pm$ 0.184 <sup>b</sup>
Phytic acid	16.600 $\pm$ 0.573 <sup>c</sup>

Table 76. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on reactive oxygen raical species generation in zymosan A-treated mouse peritoneal macrophage

Sample	Relative Luminoscence
Vehicle	92.333 $\pm$ 3.055 <sup>e</sup>
CT-26 control	66.333 $\pm$ 4.041 <sup>f</sup>
-----	
Total bran extract	249.000 $\pm$ 6.000 <sup>d</sup>
Ferulic acid	304.667 $\pm$ 7.638 <sup>b</sup>
$\gamma$ -oryzanol	338.667 $\pm$ 11.930 <sup>a</sup>
Ricetrienol	301.000 $\pm$ 3.000 <sup>b</sup>
Phytic acid	289.667 $\pm$ 6.028 <sup>c</sup>

Table 77. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on intracellular reactive oxygen radical species generation in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage using DCF-DA as an fluorescent indicator

Sample	Fluorescence Unit
Vehicle	200.828 ± 2.532 <sup>e</sup>
CT-26 control	136.234 ± 3.933 <sup>f</sup>
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Total bran extract	305.577 ± 6.234 <sup>d</sup>
Ferulic acid	392.359 ± 12.386 <sup>b</sup>
γ-oryzanol	428.838 ± 4.981 <sup>a</sup>
Ricetrienol	388.511 ± 7.812 <sup>b</sup>
Phytic acid	352.836 ± 9.608 <sup>c</sup>

Table 78. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on phagocytosis of LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage endowed with dextran-FITC

Sample	Fluorescence Unit
Vehicle	139.202 ± 4.693 <sup>c</sup>
CT-26 control	100.563 ± 2.988 <sup>e</sup>
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Total bran extract	112.249 ± 2.872 <sup>d</sup>
Ferulic acid	160.849 ± 3.053 <sup>b</sup>
γ-oryzanol	173.001 ± 3.464 <sup>a</sup>
Ricetrienol	162.370 ± 6.155 <sup>b</sup>
Phytic acid	146.793 ± 3.867 <sup>c</sup>

Table 79. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on proinflammatory cytokine release from LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage

Sample	cytokines (pg/ml)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Vehicle	637.478 $\pm$ 6.456 <sup>d</sup>	117.057 $\pm$ 1.818 <sup>de</sup>	125.478 $\pm$ 1.127 <sup>e</sup>
CT-26 control	597.043 $\pm$ 19.983 <sup>e</sup>	113.914 $\pm$ 1.818 <sup>e</sup>	120.023 $\pm$ 3.689 <sup>f</sup>
Total bran extract	643.783 $\pm$ 15.372 <sup>d</sup>	122.914 $\pm$ 2.828 <sup>d</sup>	132.362 $\pm$ 2.050 <sup>d</sup>
Ferulic acid	709.435 $\pm$ 14.757 <sup>b</sup>	189.057 $\pm$ 5.455 <sup>b</sup>	165.768 $\pm$ 1.537 <sup>b</sup>
$\gamma$ -oryzanol	768.022 $\pm$ 6.610 <sup>a</sup>	202.914 $\pm$ 2.424 <sup>a</sup>	175.043 $\pm$ 3.177 <sup>a</sup>
Ricetrienol	690.522 $\pm$ 13.835 <sup>b</sup>	197.629 $\pm$ 0.606 <sup>b</sup>	163.667 $\pm$ 0.820 <sup>b</sup>
Phytic acid	672.261 $\pm$ 1.845 <sup>c</sup>	158.771 $\pm$ 3.030 <sup>c</sup>	153.087 $\pm$ 0.615 <sup>c</sup>

③ 미강추출 기능성분획의 식이에 의한 자연살해세포 활성화

자연살해세포는 림프구의 일종이지만 내재면역계에서 종양세포를 살해하는데 중요한 역할을 담당하는 세포이다. 따라서 본 실험에서는 미강 전체추출물을 포함한 기능성성분 분획의 식이가 실험동물의 자연살해세포의 암세포 살해활성을 증진시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. 표적세포로는 calcein으로 표식한 Yac-1 암세포를 사용하였으며 생쥐에서 분리한 자연살해세포와 Yac-1세포를 3시간 공배양하여 자연살해세포의 암세포 살해능을 유도하였고 반응이 종료된 후, 세포살해에 의하여 배지에 유출된 calcein을 정량하여 세포살해능을 평가하였다. 그 결과, Table 80에 정리된 것처럼 일반미 미강 추출물을 포함한 모든 기능성성분 분획의 식이는 종양보유 대조군에 비하여 암세포 살해능력이 증진시킨다는 사실을 알 수 있었으며, 그 중에서도  $\gamma$ -oryzanol 분획의 효과가 가장 우수하였다(종양보유 대조군에 비하여 약 191% 활성화증진).

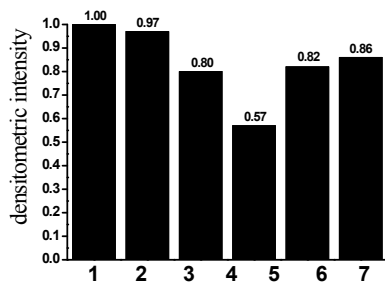
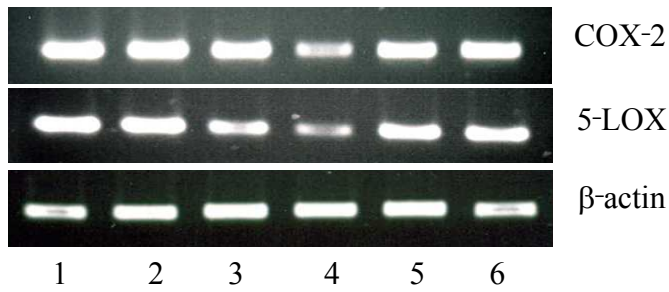
Table 80. Modulatory effects of the rice bran functional component fractions on cytotoxicity of natural killer cells from colorectal carcinoma-bearing mice

Sample	Cytotoxicity (%)
Vehicle	10.849 ± 3.068 <sup>e</sup>
CT-26 control	9.355 ± 0.516 <sup>e</sup>
-----	
Total rice extract	13.896 ± 0.319 <sup>d</sup>
Ferulic acid	22.520 ± 1.099 <sup>b</sup>
γ-oryzanol	27.387 ± 1.003 <sup>a</sup>
Ricetrienol	22.911 ± 3.193 <sup>bc</sup>
Phytic acid	19.366 ± 1.111 <sup>c</sup>

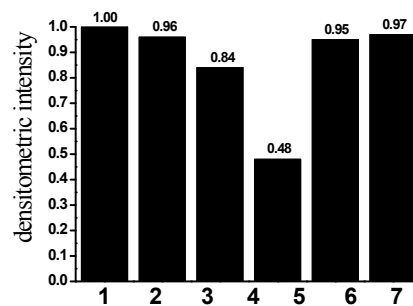
#### ④ 미강추출 기능성분획의 암세포 살해기작

미강 추출 기능성성분 분획이 종양의 형성을 억제하는 기작을 알아보기 위하여 우선 염증유발물질인 PGE2 및 LTB4의 생산에 관련된 효소인 COX-2와 5-LOX 유전자의 발현 정도를 RT-PCR 기법을 사용하여 조사하였다. 그 결과, Fig. 57에 나타난 것처럼 γ-oryzanol 분획을 식이한 동물에서 종양조직의 COX-2와 5-LOX의 발현도가 유의하게 감소되었으며 특히 5-LOX 유전자의 발현이 특히 저해됨을 알 수 있었다(lane 4, 종양보유 대조군에 비하여 COX-2와 5-LOX 각각 43%, 52% 억제). 단백질 수준에서 COX-2와 5-LOX의 세포 내 발현량을 western blot으로 측정 한 결과 (Fig. 58), γ-oryzanol 분획의 식이는 5-LOX의 발현을 유의하게 억제하였다 (종양보유 실험군에 비하여 약 43% 억제).

이상에서 조사한 COX-2와 5-LOX 산물인 PGE2 및 LTB4의 종양조직 내 함량이 미강추출 기능성분획의 식이에 의하여 제어될 수 있는지 여부를 ELISA 기법으로 측정하였다(Table 81). 실험 결과, 미강추출 기능성성분 분획 중 의 식이가 종양조직 내 PGE2 및 LTB4의 함량을 감소시키는데 가장 효과적으로 나타났다(종양보유 실험군에 비하여 각각 8 % 및 16 %의 PGE2와 LTB4 감소). 이상 기술한 일련의 실험 결과는 미강 추출 기능성분획 중 γ-oryzanol 분획은 활성산소종의 생산, 대식 세포 포식활성의 증진, eicosanoid 합성효소인 COX-2와 5-LOX의 발현도 저하, 그리고 염증cytokine TNF-α, IL-1β, IL-6의 발현 증진을 통하여 종양의 발전을 억제함을 알 수 있었다.

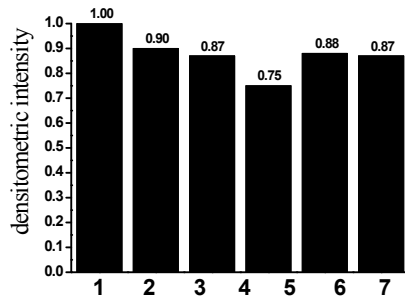
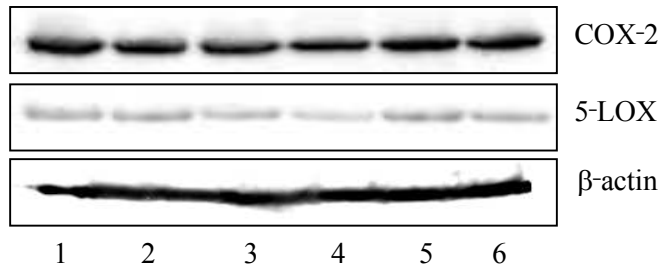


COX-2

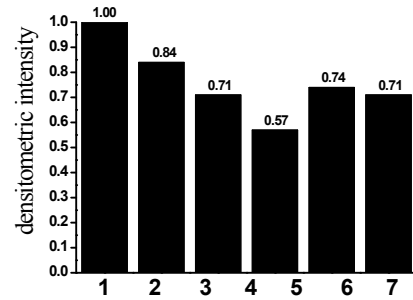


5-LOX

Fig. 57 Modulatory effects of rice bran functional component fractions on COX-2 and 5-LOX gene expression using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. lane 1, CT-26 bearing control; lane 2, diet supplemented with total rice bran extract; lane 3, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 4, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 5, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 6, diet supplemented with 0.2% phytic acid.



COX-2



5-LOX

Fig. 58 Modulatory effects of rice bran functional component fractions on COX-2 and 5-LOX polypeptide expression using western blotting analysis. lane 1, CT-26 bearing control; lane 2, diet supplemented with total rice bran extract; lane 3, diet supplemented with 0.2% ferulic acid; lane 4, diet supplemented with 0.2%  $\gamma$ -oryzanol; lane 5, diet supplemented with 0.2% ricetrienol; lane 6, diet supplemented with 0.2% phytic acid.



Table 81. Modulatory effects of rice bran functional component fractions on inflammatory eicosanoid synthesis in tumor from colorectal carcinoma-bearing mice

Sample	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
CT-26 control	1007.111 ± 5.853 <sup>a</sup>	2439.000 ± 20.000 <sup>a</sup>
Total bran extract	993.222 ± 4.194 <sup>b</sup>	2359.000 ± 36.056 <sup>ab</sup>
Ferulic acid	959.889 ± 4.194 <sup>c</sup>	2142.333 ± 25.166 <sup>c</sup>
γ-oryzanol	939.333 ± 4.410 <sup>d</sup>	2049.000 ± 10.000 <sup>d</sup>
Ricetrienol	963.222 ± 5.853 <sup>c</sup>	2165.667 ± 32.146 <sup>c</sup>
Phytic acid	978.778 ± 9.477 <sup>bc</sup>	2285.667 ± 41.633 <sup>b</sup>

(5) 한약재 추출물의 염증반응 및 세균감염에 대한 조절활성

(가) 한약재 추출물의 대식세포 NO 활성 제어

우리나라에서 전통적으로 사용해 온 한약재는 오랫동안 처방된 경험에 의거할 때 상당히 안전성이 보장된 건강기능성 소재의 후보군이라고 볼 수 있다. 따라서 활성화된 내재면역 세포를 억제하여 염증반응이 과도하게 증진되는 것을 억제하거나 또는 내재면역 세포를 활성화시킴으로써 세균성 감염증을 차단하는 활성을 보유한 한약재를 검정하였다. 검정 방법은 첫째로 한약재 열수추출물이 세균 내독소인 LPS에 의하여 활성화된 대식세포주인 RAW264.7 세포로부터의 NO 방출을 억제하는 활성을 측정하였고, 두 번째로는 한약재 열수추출물 자체가 RAW264.7 세포를 활성화시킬 수 있는지 여부를 역시 NO 방출여부로 측정하였다. Table 82에 나타난 것처럼, 길경과 상백피에서 최고 약 60%까지의 NO 방출 억제효과를 보였다. 100 µg/ml의 농도에서 이들 이외에도 음양곽, 우슬, 정향피, 감초가 42% 이상의 억제효과를 나타내었다. 아마도 이들 한약재 추출물들은 생체 내에서 세균 내독소에 의한 endotoxemia의 예방에 효과를 나타낼 것으로 추정된다. 두 번째 가능성을 측정한 실험 결과를 Table 83에 정리하였다. 실험 결과, 오로지 곱향만이 100 µg/ml의 농도에서 LPS와 비슷하게 RAW264.7 세포를 활성화시켜서 NO 방출을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이 경우는 Table 37에서 보인 길경이나 상백피의 결과와는 반대되는 것으로서, 세균 내독소에 의한 endotoxemia가 보다는 세균의 감염과 증식에 의한 질병발생에 대하여 예방 효과가 있을 것으로 생각된다.

## (나) 광항 추출물의 대식세포 NO 발생 촉진기작

광항이 내재면역세포, 특히 대식세포의 활성화를 통한 NO 생산증대로 생체 내 세균감염의 초기단계를 억제할 수 있다는 가능성은 향후 건강기능성 식품 개발에 있어서 매우 중요한 결과로 보여 지기 때문에, 광항 추출물의 대식세포 NO 생산 기작을 보다 상세히 연구하고자 하였다. 또한 생체 내에서 일어나는 현상을 가능한 유사하게 재현시키기 위하여 지시세포는 생쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포가 아닌 직접 생쥐에서 추출한 복강대식세포를 사용하여 *ex vivo*의 조건에서 실험을 수행하였다. 우선, 광항 추출물이 농도 의존적으로 대식세포의 NO 생산을 촉진시키는지 여부를 조사한 결과, Fig. 9에 나타난 것처럼 농도 의존적인 NO 생산을 관찰할 수 있었고 100 µg/ml의 농도에서 IFN- $\gamma$  처리 조건에서 NO 생성능력이 가장 높았다. Fig. 59에서와 같은 NO의 다량생산은 광항이 대식세포의 NOS2 (iNOS, inducible NO synthase)의 발현을 증진시켰을 가능성을 보여준다. 다음으로 광항 추출물에 의한 NO 생산의 생화학적 경로를 알아보기 위하여 NO 생산효소인 NOS의 억제제를 사용하여 각각 특이적 억제기작을 가진 억제제에 의한 NO 생산 양상을 분석하였다. NOS에 대한 일반적인 경쟁적 억제제인 NMMA의 사용 결과, Fig. 60에 나타난 것처럼 복강대식세포의 NO 생산은 농도 의존적으로 저하하는 것이 관찰되었다. 이 결과는 iNOS 특이적 억제제인 NIL에서도 관찰되었다. 이 결과는 광항 추출물의 자극에 의한 NO 생산도 일반적으로 알려진 아미노산 arginine을 기질로 한 경로임을 알려준다. 다음으로 항산화제이면서 전사인자 NF- $\kappa$ B의 억제제로 알려진 PDTC를 처리하였다. PDTC에 의한 NO 생산 억제는 광항 추출물에 의한 NO 생산에 전사인자 NF- $\kappa$ B가 관여함을 보여주며 농도증가에 따른 단속적인 억제 양상은 PDTC가 ROS의 소거에 의하여 NOS의 발현을 억제하기 때문으로 보여진다. 다음으로 광항 추출물의 자극에 의한 NO 생산이 iNOS의 활성화에 의한 것임을 유전자의 전사 수준 및 iNOS 단백질 수준에서 조사하였다. RT-PCR로 iNOS mRNA 발현을 조사한 결과, 광항의 처리는 복강대식세포에서 iNOS mRNA와 iNOS 단백질의 발현을 증진시킴을 알 수 있었고, 이 현상은 PDTC 동시처리에 의하여 억제되었다 (Fig. 61, 62). 따라서 광항추출물의 자극에 의한 대식세포의 NO 생산증가는 iNOS 유전자의 전사증진과 iNOS 단백질 합성증진에 의한 결과로 생각된다. 그리고 세균 등 미생물 감염이 성립되면 생체는 염증반응을 일으켜 감염체를 제거하는데, 이때 활성화된 대식세포가 분비하는 pro-inflammatory cytokine의 역할, 특히 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6이 중요하다. 따라서 이들 pro-inflammatory cytokine이 광항추출물의 자극에 의하여 발현이 증대되는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 광항 추출물 처리는 복강대식세포의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6 유전자의 발현 및 단백질 발현을 증진시키는 것으로 나타났다 (Fig. 61, Table 39). 따라서 광항추출물은 세균에 의한 생체 감염의 초기단계를 매우 유효하게 억제할 것으로 판단된다.

Table 82. Inhibitory effect of aqueous extract of various medicinal herbs on nitric oxide (NO) generation in LPS-stimulated RAW264.7 cells

시료이름(번호)	Nitrite (uM)		
	100ug/ml	10ug/ml	1ug/ml
(-) control		1.533	
(+) control (LPS 100ng/ml)		32.348	
조각자	22.010 ± 0.470	21.281 ± 2.536	23.369 ± 1.654
초두구	29.432 ± 1.315	24.031 ± 0.402	24.661 ± 2.018
산사	19.591 ± 0.884	25.423 ± 1.152	22.176 ± 0.000
삼릉	28.173 ± 0.639	24.330 ± 0.547	24.727 ± 0.996
사삼	22.010 ± 3.948	22.640 ± 2.009	22.872 ± 1.958
오가피	29.863 ± 0.733	24.727 ± 0.547	23.998 ± 0.547
빈랑	27.577 ± 0.470	25.920 ± 0.470	23.104 ± 1.541
백두구	31.553 ± 1.495	27.146 ± 1.093	28.339 ± 2.278
곽향	34.900 ± 1.996	31.056 ± 0.705	31.089 ± 0.803
비파엽	26.020 ± 0.207	28.405 ± 0.719	30.029 ± 0.263
감국	26.914 ± 0.746	27.279 ± 2.009	28.538 ± 0.652
후박	20.287 ± 2.412	28.770 ± 3.055	29.996 ± 1.989
두충	33.342 ± 0.500	33.375 ± 2.909	33.110 ± 0.867
진피	32.348 ± 0.834	33.707 ± 1.642	33.177 ± 1.054
속단	24.197 ± 2.488	30.426 ± 2.068	30.692 ± 2.267
사인	24.297 ± 1.455	13.727 ± 0.433	14.555 ± 1.897
길경	12.534 ± 1.434	13.793 ± 0.547	12.567 ± 0.349
상백피	13.163 ± 0.565	14.654 ± 0.547	13.130 ± 0.497
죽엽	21.845 ± 0.955	14.787 ± 1.448	14.522 ± 1.484
왕불유행	26.450 ± 0.596	13.462 ± 0.414	15.151 ± 2.730
음양곽	16.576 ± 0.639	12.534 ± 0.605	12.699 ± 0.845
우슬	14.356 ± 0.565	13.859 ± 0.349	12.865 ± 0.320
정향피	16.576 ± 1.866	14.356 ± 1.694	14.124 ± 1.822
저령	25.887 ± 0.599	26.218 ± 1.428	26.086 ± 1.342
백자인	26.947 ± 1.292	28.372 ± 0.803	27.544 ± 0.497
부평초	33.409 ± 0.553	27.378 ± 2.899	25.721 ± 0.845
청피	26.682 ± 0.320	27.312 ± 0.376	25.026 ± 0.490
백문동	26.119 ± 1.090	26.119 ± 1.414	26.119 ± 0.647
박하	28.869 ± 2.123	26.318 ± 1.640	26.218 ± 0.677
목통	28.836 ± 0.849	27.577 ± 0.845	26.517 ± 1.186
자완	26.848 ± 0.750	26.550 ± 0.433	26.815 ± 0.599
건강포	22.540 ± 1.267	21.546 ± 1.001	18.763 ± 0.490
익모초	22.872 ± 0.456	16.974 ± 1.928	21.215 ± 0.857
당귀	21.878 ± 0.456	21.712 ± 0.414	20.486 ± 0.776
선곡	26.384 ± 0.940	22.209 ± 1.278	21.447 ± 1.063
천궁	20.354 ± 1.063	19.989 ± 1.484	19.492 ± 0.959
창출	21.215 ± 0.490	21.281 ± 0.696	21.546 ± 0.414
봉출	21.149 ± 0.490	20.718 ± 0.845	21.845 ± 0.207
감초	18.995 ± 0.994	20.718 ± 1.350	21.016 ± 1.944

Table 83. Effect of aqueous extract of various medicinal herbs on nitric oxide (NO) generation in non-stimulated RAW264.7 cells

시료이름(번호)	Nitrite (uM)		
	100ug/ml	10ug/ml	1ug/ml
(-) control		1.533	
조각자	0.340 ± 0.115	-0.057 ± 0.230	-0.057 ± 0.402
초두구	0.108 ± 0.517	-0.356 ± 0.057	-0.057 ± 0.152
산사	0.075 ± 0.304	-0.024 ± 0.207	-0.024 ± 0.304
삼릉	-0.124 ± 0.152	0.605 ± 1.292	0.274 ± 0.304
사삼	0.009 ± 0.199	-0.389 ± 0.199	0.009 ± 0.172
오가피	0.407 ± 0.199	0.108 ± 0.358	0.373 ± 0.320
빈랑	0.672 ± 0.207	0.340 ± 0.230	0.672 ± 0.287
백두구	3.057 ± 1.035	1.898 ± 0.605	2.428 ± 0.320
곽향	29.499 ± 0.582	4.515 ± 0.304	3.190 ± 0.099
비과엽	1.798 ± 0.199	3.422 ± 0.565	3.786 ± 0.433
감국	1.500 ± 0.199	3.720 ± 0.304	5.012 ± 1.489
후박	2.593 ± 0.199	1.136 ± 0.304	1.732 ± 0.320
두충	1.931 ± 0.152	1.666 ± 0.402	1.831 ± 0.414
진피	2.262 ± 0.115	2.030 ± 0.230	2.063 ± 0.152
속단	2.229 ± 0.207	1.533 ± 0.250	2.030 ± 0.490
사인	-0.356 ± 0.250	-0.389 ± 0.172	-0.289 ± 0.099
길경	0.208 ± 0.696	-0.289 ± 0.172	-0.521 ± 0.057
상백피	0.009 ± 0.099	0.141 ± 0.304	0.175 ± 0.207
죽엽	0.639 ± 0.115	-0.455 ± 0.230	-0.124 ± 0.250
왕불유행	1.235 ± 0.647	-0.190 ± 0.172	-0.024 ± 0.115
음양곽	-0.389 ± 0.172	-0.157 ± 0.152	0.572 ± 0.459
우슬	0.208 ± 0.099	-0.223 ± 0.115	-0.157 ± 0.115
정향피	-0.190 ± 0.099	-0.223 ± 0.057	0.440 ± 0.448
저령	0.075 ± 0.230	0.042 ± 0.402	0.108 ± 0.199
백자인	0.141 ± 0.207	-0.057 ± 0.152	-0.124 ± 0.459
부평초	9.982 ± 0.490	-0.024 ± 0.304	-0.289 ± 0.172
청피	0.970 ± 0.376	-0.057 ± 0.402	0.340 ± 0.230
백문동	-0.090 ± 0.099	1.401 ± 2.325	0.009 ± 0.099
박하	0.141 ± 0.152	-0.090 ± 0.263	-0.024 ± 0.115
목통	0.340 ± 0.057	0.307 ± 0.099	0.307 ± 0.263
자완	0.274 ± 0.152	0.639 ± 0.414	0.373 ± 0.207
건강포	0.175 ± 0.402	0.075 ± 0.152	0.208 ± 0.199
익모초	0.904 ± 0.172	0.373 ± 0.115	0.373 ± 0.320
당귀	0.506 ± 0.000	0.440 ± 0.250	0.175 ± 0.057
선곡	0.771 ± 0.250	0.307 ± 0.172	0.605 ± 0.000
천궁	0.141 ± 0.057	0.141 ± 0.207	3.322 ± 0.207
창출	-0.057 ± 0.057	0.208 ± 0.172	0.672 ± 0.349
봉출	0.506 ± 0.199	0.373 ± 0.057	0.672 ± 0.115
감초	0.904 ± 0.398	0.937 ± 0.414	1.102 ± 0.099

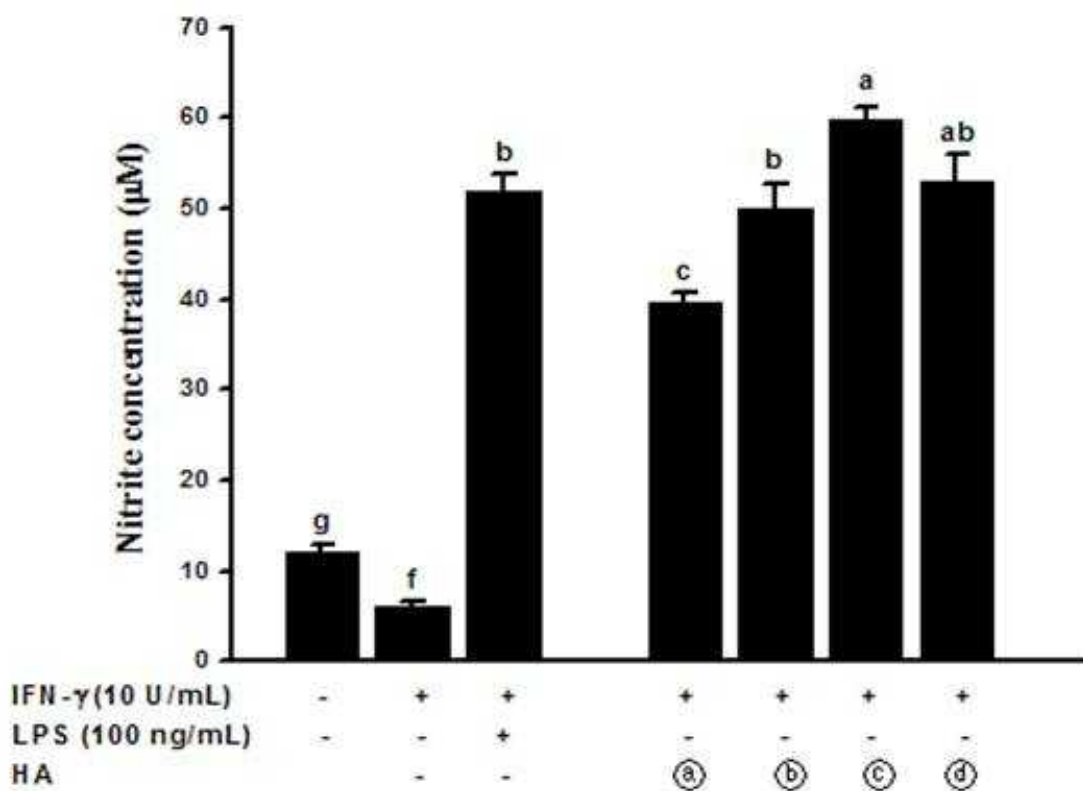


Fig. 59. Effects of HA on NO production in rIFN- $\gamma$ -treated peritoneal macrophages. NO release into the medium is expressed as the mean  $\pm$  SD. Ⓐ, Ⓑ, Ⓒ and Ⓓ indicate HA treatment at 1, 10, 100 and 1,000  $\mu$ g/ml concentrations. Bars not sharing a common letter are significantly different between groups at  $p < 0.05$  ( $n=3$ ).

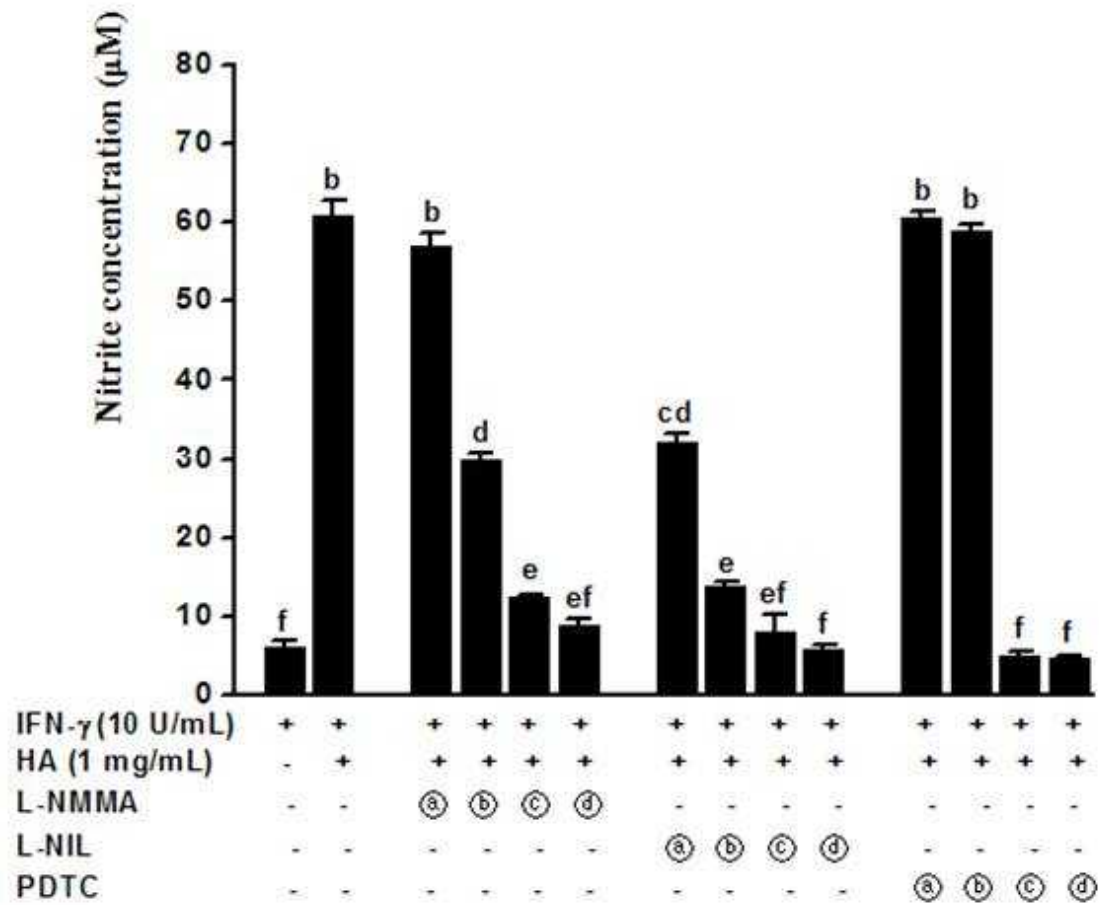


Fig. 60. Effects of L-NMMA, L-NIL and PDTC on NO productions in rIFN- $\gamma$  plus HA-treated peritoneal macrophages. NO release into the medium is expressed as the mean  $\pm$  SD. (a), (b), (c) and (d) indicate each NOS inhibitor treatment at 1, 10, 100 and 1,000  $\mu$ g/ml concentrations. Bars not sharing a common letter are significantly different between groups at  $p < 0.05$  (n=3).

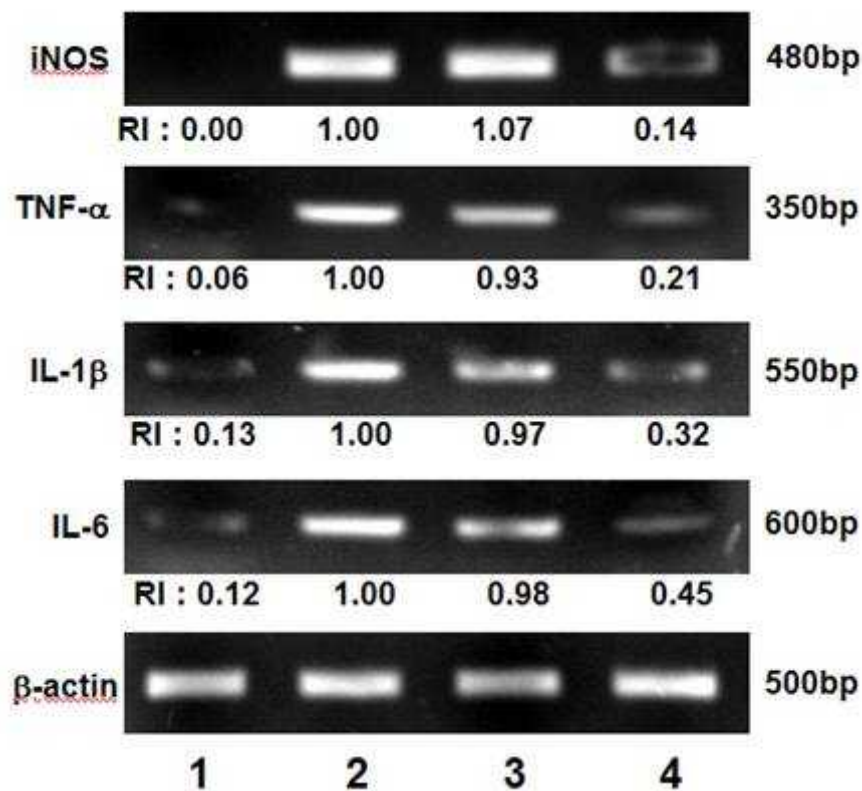


Fig. 61 Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the effect of HA on iNOS and pro-inflammatory cytokine gene expression in rIFN- $\gamma$ -treated peritoneal macrophages. Lane 1, non-primed cells; lane 2, Addition of LPS to rIFN- $\gamma$ -primed cells; lane 3, Addition of HA to rIFN- $\gamma$ -primed cell; lane 4, Addition of PDTC to HA-treated rIFN- $\gamma$ -primed cell. RI was defined as the ratio of band intensity of each amplified gene segment to that of  $\beta$ -actin. The figure is the representative of three independent experiments.

(다) Salmonellosis 모델에서 곽향추출물의 병발생 억제효과

이미 언급한 것처럼, 곽향 추출물이 복강대식세포를 자극하여 NO 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine의 발현을 증진시킨다는 결과를 볼 때, 곽향 추출물은 생체에서 세균 감염증을 효과적으로 억제할 것으로 생각된다. 이를 증명하기 위하여 Salmonellosis 실험동물 모델을 사용하였다.

우선 곽향 추출물의 처리가 대식세포의 포식능력에 미치는 효과를 측정하기 위하여 대식세포주인 RAW264.7 세포를 곽향추출물로 처리한 다음 S. enterica와 같이 배양하고, 대식세포 배양액에 존재하는 세균의 집락을 측정함으로써 대식세포에 의한 세균의 살해능을 계산하였다. 그 결과, Table 85에서 보는 바와 같이 곽향추출물의 처리로 대식세포의 포식능력은 세균 내독소인 LPS로 활성화된 대식세포의 포식능력의 80%까지 증진되는 것으로 나타났다.

다음으로, 곽향추출물의 Salmonellosis 에 대한 억제활성을 in vivo의 실험동물계에서 측정하였다. 실험동물 생쥐에 sub-lethal dose ( $1 \times 10^4$  cfu/ml)의 Salmonella enterica를 접종한 다음, 곽향추출물(HA)를 복강주사하고 2일 후 동물에서 회수한 복강대식세포의 NO 생산능을 측정하였다. Positive control은 곽향의 투여없이 Salmonella만을 감염시킨 경우를 말한다. 실험 결과, 곽향추출물의 투여는 복강대식세포의 NO 생산을 획기적으로 증진시키는 것으로 나타났다 (Table 86). 또한 Salmonella에 감염된 생쥐에서 곽향추출물의 투여는 곽향추출물의 투여가 없는 대조구와 비교할 때 약 35% 정도의 비장 내 림프구의 증식을 가져왔다. 이 사실은 곽향추출물의 투여가 대식세포와 같은 내재면역세포뿐 만 아니라 적응면역세포인 림프구도 활성화시킨다는 사실을 알 수 있었다 (Fig. 62). 다음으로는 곽향추출물의 투여가 lethal dose의 Salmonella 감염 ( $1 \times 10^5$  cfu/ml)으로 야기된 개체의 치사를 억제할 수 있는지 여부를 조사하였다. Fig. 63에서 보는 바와 같이, lethal dose의 세균만을 감염시킨 경우, 감염 8일째에 모든 개체가 사망한 반면, 세균 감염시 곽향추출물을 투여한 경우, 감염 19일째에 모든 개체가 사망하여 생존기간이 유의하게 연장됨을 볼 수 있었다. 따라서 곽향추출물은 주로 대식세포의 활성화, 일부는 림프구의 활성화, 를 통하여 Salmonella와 같은 세균의 감염으로 야기된 개체의 치사율을 낮출 수 있었다.



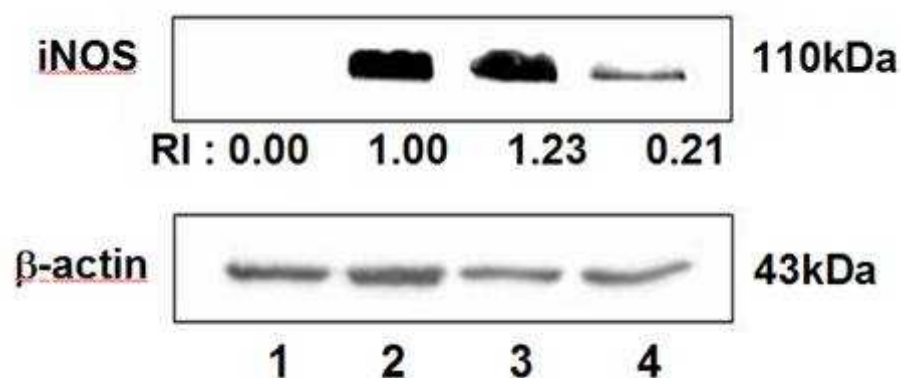


Fig. 62 Western blotting analysis of the effect of HA on iNOS protein expression in rIFN- $\gamma$ -treated peritoneal macrophages. Lane 1, non-primed cells; lane 2, Addition of LPS to rIFN- $\gamma$ -primed cells; lane 3, Addition of HA to rIFN- $\gamma$ -primed cell; lane 4, Addition of PDTC to HA-treated rIFN- $\gamma$ -primed cell. RI was defined as the ration of band intensity of each protein to that of  $\beta$ -actin. The figure is the representative of three independent experiments.

Table 84. Effects of PDTC on the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 from peritoneal macrophages treated with rINF- $\gamma$  and HA

Treatments				TNF- $\alpha$ release (pg/mL)	IL-1 $\beta$ release (pg/mL)	IL-6 release (pg/mL)
rIFN- $\gamma$ (10U/ ml)	LPS (100ng/ ml)	HA (1mg/ ml)	PDTC (100 $\mu$ M)			
-	-	-	-	28.63 $\pm$ 5.66	5.77 $\pm$ 2.02	16.13 $\pm$ 1.85
+	+	-	-	1,346.77 $\pm$ 73.74	242.20 $\pm$ 14.75	330.62 $\pm$ 24.19
+	-	+	-	1,102.49 $\pm$ 15.15	193.34 $\pm$ 3.03	283.38 $\pm$ 1.64
+	-	+	+	526.06 $\pm$ 20.20 *	78.06 $\pm$ 4.04 *	139.32 $\pm$ 14.76 *

Table 85. Effect of HA extract on phagocytosis of RAW264.7 cells

Sample	% of cell killing
Vehicle	6.205 ± 0.997
Positive control (+ LPS)	17.783 ± 1.352
HA (100ug/ml)	14.215 ± 1.031

Table 86. Effect of HA extract on NO production in peritoneal macrophages from mice infected with Salmonella

Sample	Nitrite (uM)
Vehicle	0.882 ± 0.077
Positive control	18.203 ± 1.332
HA (10mg/kg)	24.781 ± 2.200

Table 87. Effect of HA extract on spleen lymphocyte proliferation of peritoneal macrophages from mice infected with Salmonella

Sample	Lymphocyte proliferation (Fold Increase)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
Vehicle	1.000 ± 0.083	293.333 ± 20.778
Positive control	0.621 ± 0.044	322.176 ± 14.056
HA (10mg/kg)	1.890 ± 0.133	412.178 ± 30.667

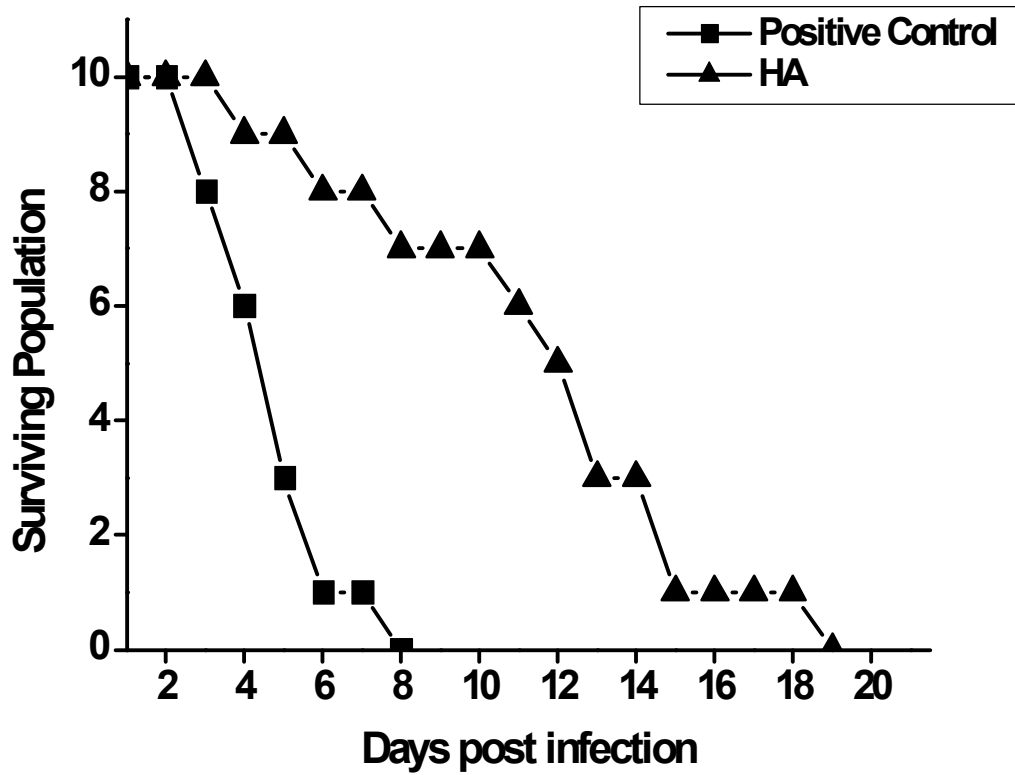


Fig. 63 Mortality rate of HA-treated mice with Salmonella infection

## 제4절 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화

### 1. 흑미미강 색소추출물 활용에 의한 미강의 산패억제 효과

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 시료

미강(일반계)으로부터 과피와 분리된 배아만을 (주)건양 RPC(김천)로부터 제공받았으며, 색소추출용 시료로는 시판되고 있는 흑미멥쌀(일반계)과 흑미참쌀(일반계)을 구입하여 사용하였다.

##### (2) 흑미 미강 색소추출물

흑미멥쌀 및 흑미참쌀의 미강은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 지질성분을 제거한 후 잔사에 5배의 30% Trifluoroacetic acid (TFA, Acros organics, USA)-70% methanol(Duksan pure chemical Co., Korea)을 넣고 30°C에서 SVC(SpeedVac Concentrator, As 260, Savarant Co., USA)를 이용하여 농축, 건조시켰다.

##### (3) 배아의 일반성분 분석

미강과 배아의 일반성분분석은 조단백질, 조지방, 조회분, 수분을 A.O.A.C 법(1990)에 따라 실시하였다. 조단백질 함량은 Kjeldahl 법에 의하여 측정하였고, 조지방 정량은 Soxhlet 추출법에 의해 각각 측정하였다. 조회분은 550~600°C의 회화로(HMF-3M, Dae Duck Hi-tech, Korea)에서 5~6시간 회화시킨 후 항량차를 산출하였으며, 수분함량은 적외선 수분 함량 측정기(FD-240, Kett Co., Japan)를 이용하였다.

##### (4) 배아 성분 조성 분석

아미노산 조성은 HPLC(HP 1100 Series, Hewlett-packard, PA, USA)에 의해서 하였으며, 지방산은 클로로포름:메탄올(2:1, v/v)을 추출용매로 사용하여 Folch et al(1957)의 방법에 의하여 추출하였다. 추출한 지방은 지방산을 methyl ester화 시킨 후 GC(HP 6890 series, Hewlett-Packard, PA, USA)를 이용하여 분석하였다(Chung et al 1991, Nike et al 2004). 무기질 성분은 ICP(OPTIMA 3200RL, Perkin

Elmer, USA)로 분석하였다.

#### (5) 흑미 미강 색소추출물의 안정성 측정

흑미 미강 색소추출물의 pH, 온도 및 저장기간에 따른 색소의 안정성은 색차계(JS-555, Color Techno System Co., Ltd., Japan)를 사용하여 5회 반복 측정한 평균 값을 Hunter 값인 L (lightness), a(redness) 및 b(yellowness)로 표시하였다.

#### (6) 산가측정

흑미 미강 색소추출물과 마쇄 배아를 섞은 후 온도 및 시간 경과에 따른 산패 정도를 산가로 측정하였다. 산가는 A.O.A.C. 법(1990)에 의해 분석하였다.

#### (7) 통계분석

각 항목에 따른 실험결과는 SPSS v. 12.0 (Statistical Package for Social Science Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다. 각 데이터는 평균과 표준편차로 제시되었다. 각 실험군의 평균치간 차이의 유의성은 Student's t-test로 검정하였다. 또한 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 흑미멥쌀과 흑미찹쌀의 색소 비교

흑미 미강으로부터 색소 분획을 추출한 결과는 Table 88과 같다. 두 품종의 색도를 측정한 결과, 흑미멥쌀이 흑미찹쌀에 비해 L 값(명도)은 유의적으로 높았으며 a 값(적색)과 b 값(황색)은 낮게 나타났다. 이는 흑미멥쌀에서 안토시아닌 색소의 용출이 더 많이 일어나 자홍색이 강해지면서 전체적으로 어둡게 나타난 것으로 추측된다.

#### (2) 배아의 성분 특성

미강과 미강으로부터 과피를 제거한 배아의 일반 성분을 분석한 결과는 Table 89에 제시하였다. 배아의 조단백질 함량은 22.1%, 조지방은 28.2%, 조회분은 8.8% 및 수분은 2.6%인 것으로 나타났다. 배아 중 조단백과 조지방 함량은 미강에 비해 유의적으로 높았다. 이는 Shin & Chung(1998)의 연구에서 쌀겨에서 분리한 쌀눈의 조지방(21.6~28.5%)과 조단백질(18.7~21.9%) 함량이 쌀겨에 비해 높게 나온 것과 유

사한 결과이다. 이와 같은 결과로 볼 때 배아는 단백질과 지방질 함량이 높아 건강 기능성식품 제조용 신소재로서의 사용 가능성이 있는 반면, 유지의 산패로 인해 저장 중 품질 저하가 유발될 것으로 보인다. 미강과 배아의 아미노산 조성은 Table 90에 나타내었다. 미강에는 glutamic acid가 232.3 ng/mg, aspartic acid가 165.5 ng/mg, 및 asparagine이 107.2 ng/mg으로 가장 많이 함유되어 있었으며, 배아에는 glutamic acid가 1668.2 ng/mg, aspartic acid가 1085.5 ng/mg 및 arginine이 948.8 ng/mg 순으로 많이 함유되어 있었다. 배아와 미강 모두 식미에 영향을 주는 glutamic acid와 aspartic acid가 많이 함유되어 있었으며 유황아미노산인 cystine과 methionine의 함량은 적었다. 따라서 배아가 미강에 비해 필수아미노산이 골고루 많이 분포되어 있어 주요한 아미노산 공급원으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

미강과 배아의 지방산의 조성은 Table 91와 같다.

미강과 배아는 oleic, linoleic 및 palmitic acid가 전체지방산의 92% 이상을 차지하고 있었으며 그 외에 linolenic acid, stearic acid 및 myristic acid 등의 지방산이 0.5~2%로 소량 함유되어 있었다. 이러한 결과는 Tsuda et al(1994)의 연구결과에서 보고된 미강 및 배아의 지방산 함량과 유사한 분포이다. 배아 회분의 무기질 조성 결과를 보면, 마그네슘(7486 ppm)과 칼륨(2055.7 ppm)이 가장 많이 함유되어 있었다(Table 92). 배아가 미강에 비해 마그네슘과 칼륨 함량이 높았으며 칼슘 함량은 낮게 나타났다.

Table 88. Color parameters of two kind of black rice varieties

Varieties	Hunter's Color Value		
	L <sup>1)</sup>	a	b
Black non-glutinous rice	60.4 ± 0.5 <sup>2)***</sup>	40.9 ± 0.5 <sup>***3)</sup>	15.8 ± 0.5 <sup>***</sup>
Black glutinous rice	77.4 ± 0.5	19.1 ± 0.7	7.4 ± 0.5

1) L: degree of lightness(white +100 ↔ 0 black), a: degree of redness (red +100 ↔ -80

green), b: degree of yellowness(yellow +70 ↔ -80 blue)

2) Data expressed as mean ± SD.

3) Means with two groups are significantly different \*\*\* p<0.001 by Student t-test.

Table 89. Proximate compositions of rice bran and rice embryo  
(% of total weight)

Sample	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Moisture
Rice bran	9.4±0.01 <sup>1)***</sup>	22.8±0.01 <sup>***2)</sup>	10.0±0.01 <sup>***</sup>	8.6±0.01 <sup>***</sup>
Rice embryo	22.1±0.01	28.2±0.00	8.8±0.01	2.6±0.01

1) Data expressed as mean ± SD.

2) Means with two groups are significantly different at \*\*\* p<0.001 by Student t-test.

Table 90. Amino acid composition of rice bran and rice embryo  
(ng/mg)

	Rice bran	Rice embryo		Rice bran	Rice embryo
Cys	0.00 <sup>2)</sup>	22.95±0.01 <sup>***</sup>	PRO	24.68±0.01	353.85±0.01 <sup>***</sup>
ASP	165.50±0.01	1085.50±0.01 <sup>***</sup>	TYR	13.30±0.01	106.25±0.01 <sup>***</sup>
GLU	232.29±0.00	1668.24±0.01 <sup>***</sup>	VAL	15.35±0.01	88.47±0.01 <sup>***</sup>
ASN	107.17±0.01	630.13±0.01 <sup>***</sup>	MET	6.84±0.01	25.10±0.01 <sup>***</sup>
SER	35.64±0.01	224.76±0.01 <sup>***</sup>	ILE	7.15±0.01	80.35±0.01 <sup>***</sup>
GLY	23.59±0.01	108.08±0.01 <sup>***</sup>	LEU	5.85±0.01	52.26±0.00 <sup>***</sup>
HIS	23.17±0.01	190.87±0.01 <sup>***</sup>	PHE	5.12±0.01	38.13±0.01 <sup>***</sup>
ARG	49.72±0.02	948.80±0.01 <sup>***</sup>	LYS	9.23±0.01	114.13±0.01 <sup>***</sup>
THR	14.68±0.01	106.90±0.01 <sup>***</sup>	GLN	15.38±0.01	81.18±0.01 <sup>***</sup>
ALA	60.64±0.32	515.69±0.01 <sup>***</sup>	Total	815.32±0.06	6636.11±0.12 <sup>***</sup>

Data expressed as mean ± SD.

Means with two groups are significantly different at \*\*\* p<0.001 by Student t-test.

Table 91. Fatty acid composition of rice bran and rice embryo

(peak area %)

Sample	Fatty acid composition							
	Myristic (C14:0)	Palmitic (C16:0)	Stearic (C18:0)	Oleic (C18:1)	Linoleic (C18:2)	Linolenic (C18:3)	Arachidic (C20:0)	Arachidonic (C20:1)
Rice bran	0.28±0.07 <sup>1)</sup>	17.68±1.47 <sup>*2)</sup>	1.42±0.50	41.92±2.23*	36.20±1.82*	1.27±0.39	0.56±0.02 <sup>***</sup>	0.42±0.00
Rice embryo	0.08±0.05	21.26±0.86	1.30±0.20	31.46±5.86	39.76±0.85	1.56±0.37	3.02±0.06	0.53±0.04

1) Data expressed as mean ± SD.

2) Means with two groups are significantly different at \*p&lt;0.05, \*\*\* p&lt;0.001 by Student t-test.

Table 92. Mineral composition of rice bran and rice embryo

(unit: ppm)

	K	Ca	Mg
Rice bran	82.6±0.5 <sup>1)***</sup>	2565.5±0.02 <sup>***2)</sup>	1147.5±0.02 <sup>***</sup>
Rice embryo	2055.7±37.8	677.6±1.5	7486.3±56.6

1) Data expressed as mean ± SD.

2) Means with two groups are significantly different at \*\*\* p&lt;0.001 by Student t-test.

## (3) 흑미 색소의 안정성

안토시아닌 색소는 적·자색의 천연색소로서 최고의 이용가치를 가지고 있으나 조리, 가공 및 저장 과정에서 불안정하여 천연색소로서의 이용에 문제를 가지고 있다. 이러한 불안정성은 flavyllium 양이온 구조에 기인하며, pH, 온도, 유기산, 아스코르브산, 당류, 금속이온 및 copigment 등에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(Yoon JM et al 1997). 본 연구에서는 천연색소원인 흑미로부터 색소를 추출하여 식품에서의 안전성을 보고자 여러 가지 조건의 pH, 온도 및 저장 기간에 대한 색도를 측정하였으며 그 결과는 Table 93에 나타내었다.

4℃에서는 흑미멤쌀 색소추출물의 L(명도)값이 저장 직전에는 pH 3에서 56.7 이던 것이 9일 경과 후에는 50.2로 감소하였으며, pH 5에서도 이와 비슷한 경향을 보



였다. pH 7인 중성 영역에서는 기간 경과에 따른 유의한 차이가 없었으나, 염기성 상태(pH 9와 pH 11)에서는 저장 후에 유의하게 증가하였다. a(적색)값의 경우에는 pH 7까지는 저장 후 수치가 증가하다 그 이후 염기성 상태에서는 유의하게 감소하였다. b(황색) 값은 저장 기간이 길어질수록 수치가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 30℃에서 저장 시에는 흑미멥쌀의 L(명도), a(적색) 및 b(황색) 값이 4℃와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 흑미멥쌀에서 추출한 색소는 9일간의 저장 후 본 실험에서 사용된 범위의 저장 온도에 따른 차이는 없었으며, L(명도) 값은 중성 영역에서, a(적색) 값은 산성에서 안정한 것으로 나타났다.

흑미참쌀 색소추출물의 경우, 9일 저장 후에 4℃에서 보관 시 L(명도) 값이 pH 3와 pH 5의 산성 상태에서는 유의한 차이가 없다가 그 후 pH가 증가함에 따라 수치가 증가하였다. a(적색) 값은 pH 3에서 안정적이다가 중성부근에서는 감소하였고, pH 11에서는 오히려 증가하였다. b(황색) 값은 산성부근에서 감소하다 그 이후 수치가 증가하였다. 30℃에서는 L 값은 산성부근에서 증가하다 중성영역에서 감소한 후 다시 증가하는 경향을 보였으며, a 값은 중성부근 까지는 감소하다 그 이후 염기성 상태에서 증가하였다. b 값은 pH 증가에 따라 수치가 높아졌다. 본 연구 결과 흑미참쌀 색소 추출물의 색소는 4℃의 온도에서 산성 상태를 유지 할 경우 9일간의 저장 후에도 비교적 안정한 것으로 나타났다. 이는 pH가 낮을수록 안토시아닌이 더 안정하다는 Francis FJ(1992)의 보고와 유사한 결과이다.

Table 93. Color parameters of pigment fraction from black rice bran at different pH, temperature, and storage time

	Black non-glutinous rice						Black glutinous rice					
	L		a		b		L		a		b	
	0 day	9 day	0 day	9 day	0 day	9 day	0 day	9 day	0 day	9 day	0 day	9 day
<b>4°C</b>												
pH 3	56.73±0.05 <sup>1)</sup>	50.21±0.21 <sup>**2)</sup>	48.04±0.00	48.74±0.15	22.24±0.02	22.44±0.11*	69.70±0.00	69.28±0.36	28.37±0.00	27.04±0.17	10.20±0.02	8.97±0.03 <sup>**</sup>
pH 5	68.54±0.00	61.52±0.19 <sup>†</sup>	18.79±0.00	20.88±0.11*	7.23±0.03	10.11±0.00 <sup>**</sup>	75.19±0.00	75.89±0.12	10.53±0.00	7.75±0.03 <sup>**</sup>	7.94±0.00	6.25±0.04 <sup>†</sup>
pH 7	64.66±0.00	63.37±0.27	17.15±0.00	18.94±0.00 <sup>**</sup>	5.64±0.00	15.18±0.01 <sup>**</sup>	73.38±0.00	79.43±0.42 <sup>†</sup>	8.96±0.00	6.73±0.02 <sup>**</sup>	7.39±0.01	8.40±0.00 <sup>**</sup>
pH 9	58.25±0.00	67.11±0.33 <sup>†</sup>	18.46±0.00	18.03±0.03 <sup>†</sup>	4.92±0.00	16.75±0.05 <sup>**</sup>	70.71±0.01	72.94±0.10 <sup>†</sup>	8.86±0.00	8.64±0.01 <sup>†</sup>	6.79±0.00	11.60±0.01 <sup>***</sup>
pH 11	41.75±0.00	61.79±0.10 <sup>†</sup>	21.98±0.00	19.38±0.00 <sup>***</sup>	4.75±0.00	39.82±0.06 <sup>**</sup>	64.88±0.00	66.98±0.47	10.17±0.00	10.71±0.04 <sup>†</sup>	7.08±0.00	26.96±0.12 <sup>**</sup>
<b>30°C</b>												
pH 3	56.73±0.05	53.76±0.25 <sup>†</sup>	48.04±0.00	48.76±0.23	22.24±0.02	29.31±0.11 <sup>**</sup>	69.70±0.00	74.62±0.28 <sup>†</sup>	28.37±0.00	25.18±0.20 <sup>†</sup>	10.20±0.02	11.83±0.05 <sup>†</sup>
pH 5	68.54±0.00	62.88±0.25 <sup>†</sup>	18.79±0.00	20.23±0.46 <sup>**</sup>	7.23±0.03	22.23±0.01 <sup>***</sup>	75.19±0.00	77.05±0.17 <sup>†</sup>	10.53±0.00	6.99±0.00 <sup>****</sup>	7.94±0.00	11.52±0.02 <sup>**</sup>
pH 7	64.66±0.00	46.60±0.73 <sup>†</sup>	17.15±0.00	20.52±0.12 <sup>†</sup>	5.64±0.00	29.47±0.11 <sup>**</sup>	73.38±0.00	65.78±2.97	8.96±0.00	8.28±0.06 <sup>†</sup>	7.39±0.01	17.34±0.00 <sup>***</sup>
pH 9	58.25±0.00	55.64±0.74	18.46±0.00	22.47±0.11 <sup>†</sup>	4.92±0.00	35.26±0.15 <sup>**</sup>	70.71±0.01	68.67±0.33	8.86±0.00	10.46±0.02 <sup>**</sup>	6.79±0.00	22.78±0.10 <sup>**</sup>
pH 11	41.75±0.00	62.58±0.10 <sup>**</sup>	21.98±0.00	21.09±0.02 <sup>†</sup>	4.75±0.00	43.80±0.00 <sup>***</sup>	64.88±0.00	74.71±0.40 <sup>†</sup>	10.17±0.00	9.95±0.04	7.08±0.00	28.72±0.01 <sup>***</sup>

1) Data expressed as mean ± SD.

2) Means with two groups in the same pH and temperature are significantly different at \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 by Student t-test.

#### (4) 배아 산패에 대한 흑미 미강 색소추출물의 항산화 효능

배아에 흑미 미강 색소추출물의 농도를 달리하여 첨가한 후 4℃와 30℃에 저장하면서 1, 15, 30일 간격으로 용매를 추출하여 얻은 유지에 대한 산가를 측정하였으며 그 결과는 Table 94에 제시하였다. 산가는 유지의 고유 특성은 아니며 유지 분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리 지방산의 척도이다. 미곡 저장 중 품질의 열화를 일으키고 묵은 쌀의 냄새를 생성하는 유리 지방산에 의한 변패의 척도인 지방산도는 저장 온도와 밀접한 관계가 있으며 저장 중 지질의 산화에 의해 증가한다고 하였다(Moritaka & Yasumatsu 1972). 또한 저장미의 품질에 가장 큰 영향을 미치는 인자중의 하나가 지방질 가수분해 효소와 자동산화에 의한 각종 가수분해물 및 산화물 증가인데 결합지질 보다는 유리지질의 변화가 더 심하고 n-hexanal 등의 카보닐 화합물에 의해 고미취가 발생한다고 하였다(Kim et al 1985).

본 연구 결과 배아는 모두 저장기간이 길어질수록, 저장온도가 높을수록 산패의 기준이 되는 산가가 증가하는 경향을 보였다. Shin & Chung(1998)은 쌀눈, 건조쌀눈 그리고 쌀겨 저장 중 함유 유지의 산가 변화에 대한 연구결과 저장 온도가 높아질수록 산가의 상승속도가 빨라졌다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다. 4℃ 저장 시 흑미멥쌀 미강 색소추출물을 배아에 5% 첨가하였을 때 무첨가군에 비해 산가가 유의하게 감소하였으나 1% 첨가군과 5% 첨가군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 30℃ 저장 시에는 저장 기간이 30일로 늘어나면 미강 추출물을 1% 만 첨가했을 때에도 무첨가군에 비해 유의하게 산패가 저하됨을 볼 수 있었다. 흑미참쌀 미강추출물을 첨가했을 때에도 흑미멥쌀의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. 흑미참쌀은 저장 1일째에도 저장온도가 상승하였을 때 미강 추출물의 첨가에 따른 산패 저하 효과를 나타내었다. 따라서 흑미 미강 색소추출물의 첨가가 배아 저장에 따른 유지의 산패를 저하시켜 저장성을 증진시킴을 알 수 있었다.

Table 94. Acidic values of rice embryo added with pigment fraction at different amount, temperature, storage time

Pigment rice bran extract (%)	Black non-glutinous rice			Black glutinous rice		
	1 day	15 day	30 day	1 day	15 day	30 day
4°C						
0	5.73±0.82 <sup>a</sup>	11.37±0.83 <sup>b</sup>	19.21±1.06 <sup>b</sup>	5.73±0.82 <sup>a</sup>	11.37±0.83 <sup>b</sup>	19.21±1.06 <sup>b</sup>
1	4.75±0.11 <sup>a</sup>	10.06±0.70 <sup>ab</sup>	17.90±0.55 <sup>ab</sup>	5.05±0.44 <sup>a</sup>	8.66±1.07 <sup>a</sup>	14.40±0.55 <sup>a</sup>
5	3.88±1.04 <sup>a</sup>	9.45±0.32 <sup>a</sup>	14.19±2.86 <sup>a</sup>	3.81±0.99 <sup>a</sup>	7.25±0.37 <sup>a</sup>	12.93±0.68 <sup>a</sup>
30°C						
0	8.59±2.09 <sup>a</sup>	12.04±0.37 <sup>b</sup>	18.82±0.61 <sup>b</sup>	8.59±2.09 <sup>b</sup>	12.04±0.37 <sup>b</sup>	18.82±0.61 <sup>b</sup>
1	7.79±2.53 <sup>a</sup>	10.93±0.56 <sup>ab</sup>	13.60±0.12 <sup>a</sup>	5.55±0.54 <sup>ab</sup>	10.35±1.53 <sup>ab</sup>	15.92±1.93 <sup>ab</sup>
5	5.72±0.56 <sup>a</sup>	9.62±1.43 <sup>a</sup>	13.43±0.24 <sup>a</sup>	5.11±0.72 <sup>a</sup>	7.87±0.93 <sup>a</sup>	12.87±2.37 <sup>a</sup>

1) Mean±SD

2) Means with different superscript within the column at same temperature and storage time are significantly different at  $p < 0.05$  by

Duncan's multiple-range test.

## 2. 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 미강의 활용

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 시료

청결 도정라인으로부터 회수한 미강을 쇠미선별기(RS-1, Taiwa Co., Japan)에 의해 배아와 과피를 완전히 분리하여 배아만을 회수한 것을 (주)건양 RPC(김천)로부터 제공받았다. 흑미 멥쌀은 농협에서 구입한 후 도정(MC-90, Toyo Co., Japan)하고 미강을 분리하여 사용하였다. 이밖에 식품용 젤라틴(웅천상사, 한국)과 한천(화인통상, 한국)은 시판하는 분말을 직접 구입하여 사용하였다.

#### (2) 흑미 미강 색소추출물

흑미 미강은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 지질성분을 제거한 후 5배의 30% Trifluoroacetic acid(TFA, Acros organics, USA)-70% Methanol(Duksan pure chemical Co., Korea)을 넣고 30℃에서 SVC (SpeedVac Concentrator, As 260, Savarant Co., USA)를 이용하여 농축·건조시켰다(Shin SY 2001).

#### (3) 떡 고물, 소 및 배아젤리 제조법

배아를 약한 불에 2분 정도 볶아 식힌 후 분쇄(HJMF-7900, 한일전기주식회사, 한국)하여 20 mesh 체를 통과시켜 시루떡 제조용 고물 및 송편의 소로 사용하였다. 배아젤리는 1% 흑미 미강 색소추출물, 20% 설탕, 4%의 젤라틴 또는 한천에 배아가루를 각각 5, 10, 15, 20% 씩 첨가하여 젤리상으로 제조하였다.

#### (4) 관능검사

패널로 선정된 10명의 숙련된 관능검사요원에게 배아고물로 만들어진 시루떡을 제공하여 색(color), 향미(flavor), 맛(taste), 거친 정도(toughness) 및 전반적인 기호도(overall acceptability)를 각각 평가하였다. 또한 gel 형성능 비교를 위해서 제조된 배아젤리는 일정크기 (2×2×2 cm)로 성형하여 각 항목에 대하여 평가하도록 하였다. 모든 항목은 5점 척도법을 이용하였으며, 3회 측정하여 평균값을 제시하였다.

#### (5) 배아젤리의 물성측정

젤라틴 및 한천을 사용하여 제조된 배아젤리의 물성은 Texture analyzer(TA-XT

plus, Stable Micro Systems Co., England)를 사용하여 측정하였다. 측정 조건은 20 mm rod를 사용하였으며 pre-test speed 5.0 mm/s, test speed 2.0 mm/s 및 post-test speed 2.0 mm/s 이었다. TPA(texture profile analysis) 방법에 의해 two bite compression test를 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였으며 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 검성(gumminess) 및 씹힘성(chewiness)을 측정하였다.

#### (6) 통계처리

모든 실험 결과는 SPSS v. 12.0(Statistical Package for Social Science Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였으며, 평균과 표준편차로 제시되었다. 각 실험군의 평균치간 차이의 유의성은 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 배아고물, 소 및 배아젤리의 성형성

배아 고물을 첨가하여 제조한 떡의 사진은 Fig. 64에 제시하였다. 노란 콩고물만을 사용하여 제조한 떡은 색상이 선명하고 쌀가루와의 뭉침이 용이한 반면, 배아만 사용한 경우는 색이 검어졌으며 외관상 부스러짐이 보였다. 콩가루와 배아가루를 50%씩 혼합한 경우에는 배아 고물만으로 만들었을 때의 단점인 부스러짐이 완화되었으며 두 재료 간의 뭉침도 양호하였고 색상도 100% 콩고물과 비슷해졌다. 송편의 경우는 외관상으로 참깨소의 색상이 배아소에 비해 더 짙은 것으로 나타났다.

배아가루에 흑미 미강 색소추출물 1%와 젤라틴 또는 한천을 넣어 제조한 젤리의 사진은 Fig. 65와 같다. 사전 조사로 흑미 미강 색소추출물을 0.1, 0.5, 1 및 5% 농도로 하여 제조한 젤리를 관능평가 한 결과, 1% 첨가 젤리가 기호도 측면에서 가장 높은 점수를 얻어 본 연구에서는 흑미 미강 색소추출물을 1%의 비율로 첨가하여 젤리를 제조하였다. 흑미 미강 색소추출물 및 젤라틴만으로 만든 젤리와 여기에 배아가루를 첨가하여 만든 젤리를 비교해 볼 때 외관상으로는 색상, 윤기 및 조직감에 있어서 차이를 보이지 않았다. 젤라틴 대신 한천을 넣고 제조했을 경우에는 배아가루를 첨가함에 따라 젤리의 색상이 더 검어졌으나 배아가루 첨가량에 따른 색상 및 조직감에서의 외관상 차이는 없었다.

(A) Steamed rice cake



SB



SBE



SE

SB: covering for steamed rice cake with soybean

SBE: covering for steamed rice cake with 50% soybean and 50% rice embryo

SE: covering for steamed rice cake with rice embryo

(B) Songpyon



SPS



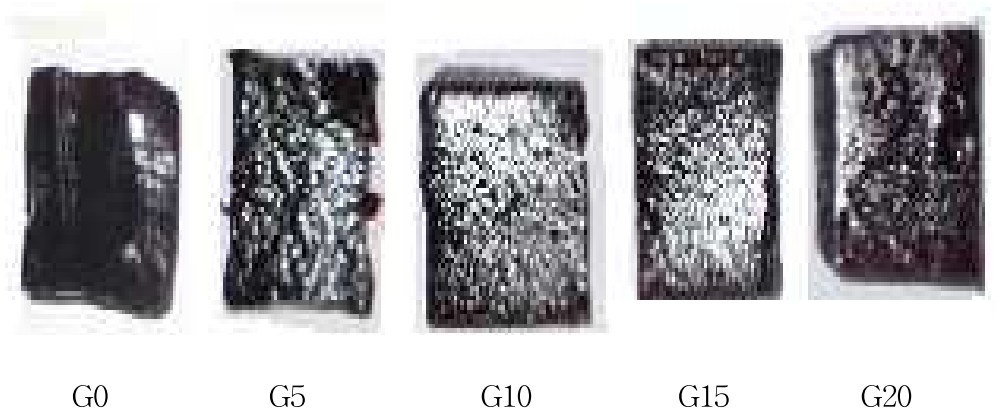
SPE

SPS: stuffing for songpyon with sesame

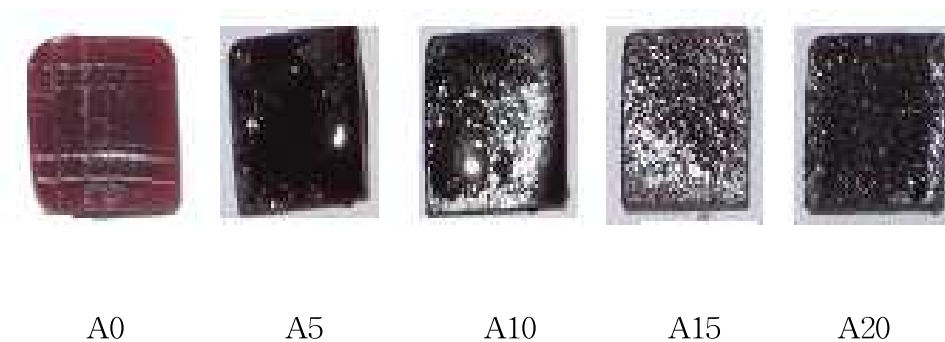
SPE: stuffing for songpyon with rice embryo

Figure 64. Covering and stuffing for steamed rice cake and songpyon with rice embryo.

(A) Gelatin jelly with rice embryo



(B) Agar jelly with rice embryo



(A) Gelatin jelly with rice embryo, (B) Agar jelly with rice embryo; 1) G0: 1% pigment fraction from black rice +gelatin, G5: 1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 5%, G10: 1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 10%, G15: 1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 15%, G20: 1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 20%; A0: 1% pigment fraction from black rice +agar, A5: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 5%, A10: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 10%, A15: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 15%, A20: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 20%

Figure 65. Jelly with 1% pigment fraction from black rice, gelatin or agar, and rice embryo.



(2) 배아고물 및 소의 관능검사

배아고물을 사용한 시루떡의 관능검사 결과는 Table 95에 나타내었다. 일반적으로 많이 보급된 콩고물 시루떡이 색상에서 가장 높은 점수를 얻어 배아고물만으로 만든 시루떡과는 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 향미, 맛 및 거친 정도는 배아가루 첨가에 따른 유의한 차이가 없었다. 전반적인 기호도는 한국인에게 익숙한 콩고물 시루떡이  $4.00 \pm 0.81$ 로 가장 높은 점수를 보였으며 100% 배아고물인 경우는  $3.10 \pm 0.87$ 로 가장 낮았다. 그러나 배아가루와 콩가루를 50% 씩 첨가하여 만든 고물은 색, 향미, 맛, 거친 정도 및 전반적인 기호도에 있어서 100% 콩고물 과 차이가 없었다. 따라서 배아가루를 50% 첨가하여 떡 고물을 제조할 경우 소비자의 기호도와 생리활성물질 섭취의 두 가지 측면을 모두 만족시킬 수 있는 건강 기능성 떡의 제조가 가능할 것으로 사료된다. 그리고 배아가루로 만든 송편 소의 관능검사 결과, 보편적으로 소로 많이 사용되고 있는 참깨와 비교했을 때 색, 향미, 맛, 거친 정도 및 전반적인 기호도에 있어서 유의적 차이를 나타내지 않았다(Table 96). 따라서 송편 소의 재료로서 기존의 재료 대신 필수아미노산과 항산화 물질을 포함한 여러 생리활성물질이 풍부한 배아가루의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 95. Sensory evaluation of rice cake with rice embryo

Sample <sup>1)</sup>	Color	Flavor	Taste	Toughness	Overall acceptability
SB	$4.20 \pm 0.63^{2) b3)}$	$3.90 \pm 0.99^{NS4)}$	$3.50 \pm 1.35^{NS}$	$3.70 \pm 1.05^{NS}$	$4.00 \pm 0.81^b$
SBE	$3.70 \pm 0.67^{ab}$	$3.90 \pm 1.10$	$3.70 \pm 0.94$	$3.80 \pm 0.91$	$3.90 \pm 0.99^{ab}$
SE	$3.30 \pm 0.94^a$	$3.40 \pm 0.69$	$3.00 \pm 0.81$	$3.10 \pm 1.13$	$3.10 \pm 0.87^a$

1) SB: covering for rice cake with soybean, SBE: covering for rice cake with 50%

soybean and 50% rice embryo, SE: covering for rice cake with rice embryo

2) Mean $\pm$ SD

3) Means with different superscript within the same column are significantly different at

$p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test.

4) NS: Not significant

Table 96. Sensory evaluation of songpyon with rice embryo

Sample <sup>1)</sup>	Color	Flavor	Taste	Toughness	Overall acceptability
SPS	4.10±0.73 <sup>2)NS3)</sup>	3.70±0.82 <sup>NS</sup>	4.20±0.78 <sup>NS</sup>	4.10±0.73 <sup>NS</sup>	3.80±0.63 <sup>NS</sup>
SPE	4.00±1.05	3.70±1.05	4.10±0.73	4.50±0.52	3.90±0.73

1) SPS: stuffing for songpyon with sesame, SPE: stuffing for songpyon with rice embryo

2) Mean±SD

3) NS: Not significant

### (3) 배아젤리의 물성 비교

흑미 미강 색소추출물 1%와 배아가루 첨가량을 달리하여 제조한 젤리를 Texture 분석계를 이용하여 경도, 응집성, 부착성, 탄력성 및 씹힘성의 물성변화를 측정하였다(Table 97). 젤라틴과 한천 농도를 3, 4 및 5%로 하여 응집력을 측정한 결과, 4%로 제조했을 경우 응집력이 가장 좋았으므로 본 연구에서는 젤리 제조 시 젤라틴과 한천의 농도를 4%로 하였다. 젤라틴 배아젤리의 경우 경도(hardness)와 탄성(springiness)은 배아 무첨가군과 5% 첨가군에서는 유의한 차이가 없었으나, 배아가루 첨가량이 증가함에 따라 감소하여 20% 첨가군에서 가장 낮은 수치를 나타내었다. 이는 은행분말 첨가에 따른 은행떡의 텍스처에 관한 연구에서 은행분말 첨가수준이 증가할수록 경도가 낮게 나타난 것(Kim et al 2004)과 동충하초 분말을 첨가한 동충하초젤리의 경도가 첨가량에 따라 감소한다는 보고(Kim et al 2007)와 일치하는 결과이다. 부착성(adhesiveness)은 배아가루를 첨가함에 따라 저하되었는데, 이는 배아젤리에 첨가한 배아가루가 젤라틴 입자를 분산 또는 이완시켜 젤라틴에 의한 부착성을 억제하는 것으로 생각된다(Kim et al 2004). 응집성(cohesiveness)은 배아 첨가에 따른 차이를 보이지 않아 배아가루가 젤라틴의 뭉침성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 검성(gumminess)은 배아가루를 5% 첨가하였을 때 307.85±69.52로 무첨가군의 232.52±56.77과 유의한 차이를 보이지 않았다. 씹힘성(chewiness)은 배아가루 무첨가 젤리에 비해 5% 첨가하였을 경우 증가하였으며, 첨가량이 증가함에 따라 수치가 낮아지는 것으로 나타났다. 한천 배아젤리의 경우 경도는 젤라틴 배아젤리와 유사한 경향을 나타내었다. 부착성, 탄성, 응집성 및 씹힘성은 배아가루 첨가에 따른 차이를 보이지 않았다. Park & Cho(1998)는 복숭아젤리를 제조한 연구에서 한천과 설탕 첨가 비율에 따라 조직 특성에 영향을 준다고 보고하였다. 또한 Kim et al(2006)은 빵잎 추출물에 한천을 첨가하여 제조한 젤리의 경도가 빵잎 추출물의 첨가량이 많아지면 경도는 커지나 파단응력이 감소하여 단단

하면서도 잘 부서진다고 보고하여 본 논문의 배아젤리와는 반대의 결과를 보였다. 본 연구 결과 배아가루를 5%로 첨가하여 젤리를 제조할 경우 탄성과 검성, 응집성 및 경도는 유지되면서 씹힘성은 증가되어 gel 조직 특성 상 가장 바람직한 것으로 나타났다.

Table 97. Textural properties of jelly with rice embryo

	Hardness (g/cm <sup>3</sup> )	Adhesiveness (g)	Springiness (%)	Cohesiveness (%)	Gumminess (g)	Chewiness (g)
G0	859.42±471.46 <sup>2b)</sup>	-21.76±1.36 <sup>b</sup>	0.53±0.12 <sup>b</sup>	0.34±0.00 <sup>NS</sup>	232.52±56.77 <sup>ab</sup>	92.57±6.40 <sup>b</sup>
G5	830.75±169.30 <sup>b3)</sup>	-31.06±7.29 <sup>a</sup>	0.55±0.10 <sup>b</sup>	0.37±0.01	307.85± 69.52 <sup>b</sup>	165.52± 18.49 <sup>c</sup>
G10	567.30± 53.35 <sup>ab</sup>	-34.28±2.39 <sup>a</sup>	0.35±0.05 <sup>a</sup>	0.35±0.02	201.03± 32.76 <sup>a</sup>	72.78± 22.98 <sup>ab</sup>
G15	419.26±103.93 <sup>ab</sup>	-28.94±3.39 <sup>a</sup>	0.37±0.01 <sup>a</sup>	0.34±0.00	144.94± 39.78 <sup>a</sup>	53.47± 12.75 <sup>a</sup>
G20	376.40 ± 6.25 <sup>a</sup>	-36.76±7.51 <sup>a</sup>	0.29±0.04 <sup>a</sup>	0.35±0.02	142.98± 5.11 <sup>a</sup>	50.09± 10.26 <sup>a</sup>
A0	537.74±123.96 <sup>ab</sup>	-4.69±1.31 <sup>NS4)</sup>	0.19±0.04 <sup>NS</sup>	0.10±0.01 <sup>NS</sup>	59.04±19.61 <sup>ab</sup>	11.86±6.63 <sup>NS</sup>
A5	645.02±156.70 <sup>b</sup>	-5.56±2.23	0.21±0.03	0.12±0.00	79.20±22.65 <sup>ab</sup>	17.28±7.77
A10	651.75± 38.68 <sup>b</sup>	-9.12±5.25	0.21±0.05	0.13±0.02	84.61±15.74 <sup>b</sup>	17.92±1.91
A15	564.03±158.92 <sup>ab</sup>	-9.96±4.13	0.20±0.02	0.12±0.00	72.03±23.53 <sup>ab</sup>	14.89±5.78
A20	382.83± 82.21 <sup>a</sup>	-10.51±3.20	0.16±0.01	0.10±0.01	42.79±15.15 <sup>a</sup>	7.15±3.47

1) G0: 1% pigment fraction from black rice +gelatin, G5: 1% pigment fraction from black rice+gelatin+rice embryo 5%, G10: 1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 10%, G15: 1% pigment fraction from black rice +gelatin + rice embryo 15%, G20:1% pigment fraction from black rice +gelatin +rice embryo 20%; A0: 1% pigment fraction from black rice +agar, A5: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 5%, A10: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 10%, A15: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice embryo 15%, A20: 1% pigment fraction from black rice +agar +rice

embryo 20%

2) Mean±SD

3) Means with different superscript within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test.

4) NS: not significant

(4) 배아젤리의 관능검사

흑미 미강 색소추출물과 배아를 첨가하여 제조한 젤라틴 배아젤리와 한천 배아젤리의 관능적 특성은 Table 98와 같다. 젤라틴 배아젤리의 경우, 색상은 배아가루를 20% 첨가하였을 때 가장 점수가 높았다( $P < 0.05$ ). 맛에 대한 기호도는 배아가루 무첨가군에 비해 첨가군에서 증가하였다. 그 외 향미, 거친 정도 및 전반적인 기호도에 있어서는 배아 첨가에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 한천 배아젤리의 경우에는 모든 항목에서 배아첨가에 따른 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때 5%의 배아가루를 첨가할 경우 다른 젤라틴젤리에 비해 향미, 거친 정도 및 전반적인 기호도에서 유의한 차이가 없었고, 맛에서 가장 높은 점수를 얻었으며, 또한 한천 배아젤리의 경우에도 배아가루 첨가에 따른 유의한 차이가 없으므로 배아젤리 제조 시 배아가루의 함량을 5% 정도로 할 경우 경제적인 측면에서도 가장 적합할 것으로 사료된다.

Table 98. Sensory evaluation of jelly with rice embryo

Sample <sup>1)</sup>	Color	Flavor	Taste	Toughness	Overall preference
G0	2.70±0.94 <sup>2)a3)</sup>	2.60±0.84 <sup>NS</sup>	2.50±1.17 <sup>a</sup>	3.00±1.17 <sup>NS</sup>	2.70±1.16 <sup>NS</sup>
G5	2.70±0.82 <sup>a</sup>	2.60±0.69	3.50±0.92 <sup>b</sup>	3.60±1.07	3.20±1.22
G10	2.90±0.73 <sup>ab</sup>	2.30±0.48	3.10±0.56 <sup>ab</sup>	3.60±1.17	3.10±0.99
G15	2.40±0.51 <sup>a</sup>	2.80±0.78	2.80±0.78 <sup>ab</sup>	3.60±1.07	2.50±0.52
G20	3.60±1.07 <sup>b</sup>	2.70±0.82	3.30±1.05 <sup>ab</sup>	3.50±1.08	2.90±0.73
A0	2.40±0.96 <sup>NS4)</sup>	2.20±0.91 <sup>NS</sup>	2.80±1.03 <sup>NS</sup>	2.20±0.78 <sup>NS</sup>	2.40±0.96 <sup>NS</sup>
A5	3.10±0.73	2.70±0.48	3.30±0.82	2.20±0.91	3.20±1.22
A10	3.30±0.48	2.60±0.69	3.60±1.07	2.70±1.05	3.20±0.78
A15	3.30±1.16	2.60±0.96	3.50±1.17	2.20±0.78	2.80±0.78
A20	3.00±1.05	2.50±0.70	3.50±1.17	2.50±1.17	3.00±0.94

### 3. 쌀 배아젤리 급여 동물의 만성대사성질환 억제효능 검증

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 배아는 청결 도정라인으로부터 회수한 미강을 쇠미선별기(RS-1, Taiwa Co., Japan)에 의해 배아와 과피로 완전히 분리하여 배아만을 회수한 것을 2007년 3월에 (주) 건양 RPC(김천)로부터 제공받았다. 배아는 약한 불에 2분간 볶아 식힌 후 분쇄(HJMF-7900, Hanil Electric Co., Korea)하여 20 mesh 체를 통과시킨 것을 사용하였다. 흑미 미강 색소는 흑미 멍쌀을 농협에서 구입하여 도정(MC-990, Toyo Co., Japan)한 후 미강을 분리하여 추출하였다. 흑미 미강 색소를 첨가한 배아젤리는 물, 20% 설탕 및 4%의 젤라틴과 한천을 약한 불로 3분 간 끓여 녹인 다음 20% 배아와 1% 흑미 미강 색소추출물을 첨가하여 냉장고에서 굳혔다. 그 후 동결건조기(Bondiro, Ilshin Co., Korea)로 건조한 다음 분말화하여 사용하였다. 배아 시료의 조성은 수분 10.3%, 조단백질 19.7%, 조지방 25.5%, 탄수화물 26.7% 및 회분 7.8%이었다. 또한 흑미 미강 색소를 첨가한 배아젤리의 조성은 수분 7.8%, 조단백질 12.2%, 조지방 9.0%, 탄수화물 67.7% 및 회분 3.3% 이었다

Table 99. Approximate composition of rice embryo and embryo jelly

Group <sup>1)</sup>	Crude protein (%)	Crude lipid (%)	Ash (%)	Moisture (%)	Carbohydrate (%)
RE	19.7	25.5	7.8	10.3	26.7
EJP	12.2	9.0	3.3	7.8	67.7

1) RE: rice embryo

EJP: embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

## (2) 실험동물 사육 및 식이

생후 3주령의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 (주) 오리엔트사(Korea)로부터 분양 받아 “Guide for Care and Use of Laboratory Animals”(U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1985)에 의하여 실험식으로 6주간 사육하였다.

실험동물은 stainless steel cages에 한 마리씩 분리하여 사육되었으며, 사육실은  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도와  $50\pm 5\%$ 의 습도에서 12시간 간격의 광주기로 일정한 조건을 유지하였다. 실험에 앞서 모든 실험동물에게 물과 고형배합사료를 제한 없이 급여하면서 일주일간 환경에 적응시킨 후 체중에 따른 난괴법(randomized block design)으로 각 군당 10마리씩 3군으로 분류하였다.

본 연구에 사용된 실험식은 AIN-76 식이조성(American Institute of Nutrition 1980)을 기본으로 하였으며, 고콜레스테롤혈증을 유도하기 위하여 모든 식이에 1% 콜레스테롤을 첨가하여 제조하였다. 즉, 고콜레스테롤 식이(AIN-76 식이+ 1% 고콜레스테롤)를 하는 대조군과 고콜레스테롤 식이에 15% 배아를 첨가한 식이군 및 25% 흑미 미강색소 배아젤리를 첨가한 식이군으로 나누어 각 군의 식이를 ad-libitum으로 6주간 제공하였다. 각 군의 식이 조성은 Table 100에 나타내었다. 실험에 사용된 배아와 배아젤리는 성분 분석을 하여 모든 식이군의 영양소 밀도가 동일하도록 제조하였다.

Table 100. **Composition of experimental diets**

(unit: % of diet)

Group Ingredients	Control <sup>1)</sup>	RE	EJP
Casein	20	16.7	16.4
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3
Sucrose	49	43	31.1
Corn Starch	15	15	15
Cellulose powder	5	5	5
Corn Oil	5	0.7	2.5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
AIN-Mineral <sup>2)</sup>	3.5	2.1	2.5
AIN-Vitamin <sup>3)</sup>	1	1	1
Cholesterol	1	1	1
Rice embryo powder	-	15	-
Embryo jelly powder	-	-	25
Total (%)	100	100	100

1) Control: 1% cholesterol diet, RE: 1% cholesterol diet + 15% rice embryo  
EJP: 1% cholesterol diet + 25% embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

2) AIN-76 mineral mixture contained (in g/kg of mixture): calcium phosphate dibasic, 500.0; Sodium chloride, 74.0; potassium citrate monohydrate, 220.0; potassium sulfate, 52.0; magnesium oxide, 24.0; manganous carbonate, 3.5; ferric citrate, 6.0; zinc carbonate, 1.6; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite, 0.01; chromium potassium sulfate, 0.55; and sucrose finely powdered, 118.03.

3) AIN-76 vitamin mixture contained (in g/kg of mixture): thiamin HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; niacin, 3.0; D-calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; D-biotin, 0.02; cyanocobalamin (vitamin B12), 1.0 ; dry vitamin A palmitate (500,000 U/g), 0.8; dry vitamin E acetate (500 U/g), 10.0; vitamin D3 trituration (400,000 U/g), 0.25; menadione sodium bisulfite complex, 0.15; and sucrose finely powdered, 981.08.

### (3) 체중측정, 식이섭취량 및 식이효율

식이섭취량은 매일 1회, 체중은 매주 1회 일정 시간에 측정하였다. 사육기간 중의 체중증가량을 같은 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(Feed Efficiency Ratio, FER)을 산출하였다(16).

### (4) 혈액과 장기의 채취

사육이 끝난 실험동물은 12시간 동안 절식시킨 후, 에테르와 ketamin-HCl(75 mg/kg body weight, 유한양행)로 마취시켜 복부 하대정맥혈관(inferior vena cava)에서 혈액을 취하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하고 분석 시까지 -70°C deep freezer에 보관하였다. 혈액 채취 직후 간, 심장 및 신장을 적출하여 phosphate buffered saline으로 여러 번 헹구 표면 이물질과 수분을 제거한 후 무게를 측정하고 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

### (5) 혈장 및 간 조직의 지질 함량 분석

혈장 중성지방(triglyceride, TG), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC) 및 HDL-콜레스테롤(HDL-C) 농도는 효소비색법을 이용한 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 분석하였다. LDL-콜레스테롤 농도는 Friedewald(17)의 공식을 이용하여 산출하였다. 동맥경화지수(atherogenic index, A.I.)는 Lauer(18)의 공식에 의해 구하였다. 간 조직의 지질함량을 측정하기 위해 간 조직 1 g에 인산완충액(pH 7.4) 4 ml를 넣고 glass homogenizer로 균질화한 후 Folch(19)의 방법으로 지질을 추출하였다. 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 Sale 등(20)의 방법을 적용하여 클로로포름에 용해된 지질추출물을 일정량 취하여 질소 가스로 건조시킨 후 triton X-100과 에탄올에 용해시켜 혈청 지질 측정과 동일한 방법으로 효소법을 이용한 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 분석하였다.

### (6) 혈장 GOT, GPT 농도 측정

혈장 GOT와 GPT 농도는 Retiman-Frankel 법(21)을 이용한 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

### (7) 혈장과 간 조직의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 측정

혈장과 간조직의 TBARS 농도는 강산 환경 하에서 thiobarbituric acid(TBA)와 지질과산화물의 2차 산물인 malondialdehyde의 함량을 532 nm에서 측정한 Ohkawa



등<sup>22)</sup>의 방법을 사용하여 측정하였다. 즉, 혈장 0.5 ml에 5% trichloroacetic acid 용액 3 ml와 0.06 M TBA 용액 1 ml를 넣어 잘 혼합한 뒤 80°C water bath에서 90분간 가열하였다. 이를 실온으로 식혀 2000 rpm, 25°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (8) 간 조직 지질과산화물 농도 측정

간 조직 균질액 0.2 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 용액 ml와 0.8% TBA 1.5 ml를 첨가하여 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 시료를 실온으로 냉각시켜 증류수 1 ml와 n-butanol:pyridine(15:1, v/v) 용액 5 ml를 첨가하고, 3000 rpm, 20°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. 측정값은 표준물질인 tetramethoxypropane으로 표준곡선을 작성하여 비교 정량하였다.

#### (9) 간 조직의 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione peroxidase (GSHpx) 활성 측정

간 조직 내 항산화 효소의 효소원을 분리하기 위해 Hulcher 등<sup>23)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. 흰쥐로부터 적출된 동일 간엽 2 g을 0.1 M triethanolamine, 0.2 M EDTA(pH 7.4) 및 2 mM DTT가 포함된 완충용액에 넣고 균질화한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리시켰다(HMR-2101V, Hanil Co., Korea). 그 후 상층액을 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 SOD와 GSHpx 용으로, pellet은 CAT 용으로 분리하였다. 상층액은 다시 32500 rpm에서 1시간 동안 초원심분리한 후(Beckman XL-100, USA) 상층액 1 ml를 취해 ethanol 0.25 ml와 chloroform 0.15 ml를 차례로 넣고 10000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 사용하였다. SOD 활성도는 pyrogallol을 이용한 Marklund and Marklund<sup>24)</sup>의 방법을 수정 사용하여 알칼리 상태에서 SOD가 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 정도를 측정하였다. 즉, 10 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5) 1.5 ml에 효소원 0.1 ml와 7.2 mM pyrogallol 용액 0.1 ml을 순서대로 잘 섞어 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 µl를 첨가하여 반응을 종결시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성 단위는 효소원을 넣지 않고 10분간 반응시킨 7.2 mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 단백질 양으로 계산하였다. CAT 활성도는 Aebi 등<sup>25)</sup>의 방법을 수정 보완하여 측정하였다. 즉, 50 mM potassium phosphate buffer(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>=1:1.5, pH 7.0) 2.89 ml와 효소원 10 µl를 섞어 25°C에서 5분간 반응시킨 후 0.3 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.1 ml를 첨가하여 240 nm에서 반응 전 흡광도를 측정한 다음, 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 240 nm에서 반응 후 흡광도를 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 흡광도의 변화를 구하였다. CAT 활성단위는 mitochondrial protein 1 mg당 1분간 감소된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 µmole로 나타내었다.

GSHpx 활성도는 Paglia 등<sup>26)</sup>의 방법을 수정 보완하여 산화형 glutathione(GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소되는 정도를 측정하였다. 즉, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 2.6 ml에 30 mM 환원형 glutathione(GSH) 용액 0.1 ml, 6 mM NADPH 용액 0.1 ml, 효소원 0.1 ml 및 25  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 ml를 혼합하여 340 nm에서 반응 전 흡광도를 측정하였다. 이어서 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 340 nm에서 반응 후 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화를 이용하여 GSHpx 농도를 구하였다. GSHpx 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg 당 1분간 산화된 NADPH의 nmole로 나타내었다.

#### (10) 통계분석

모든 실험결과는 SPSS v. 12.0(Statistical Package for Social Science Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였으며, 각 data는 평균과 표준오차로 나타내었다. 각 실험군의 평균치간 차이의 유의성은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 식이섭취량, 체중증가량, 식이 효율 및 장기무게

실험 식이를 6주 동안 섭취한 실험동물의 1일 평균 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율은 Table 101에 나타내었다. 평균 식이 섭취량은 대조군과 배아 및 흑미 미강색소 배아젤리군 간에 유의한 차이가 없었다. 체중 증가량과 식이 효율은 대조군에 비해 배아와 배아젤리 첨가군에서 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 간 무게는 대조군에서 높았으며( $p < 0.05$ ), 심장과 신장 무게는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(데이터 미제시). 따라서 배아와 흑미 미강색소 배아젤리의 첨가는 실험동물의 식이섭취에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 또한 식이로 섭취한 과량의 콜레스테롤이 체외로 정상적으로 배출되지 못하고 간장 내에 축적되어 간 무게와 체중이 증가되었으며, 배아와 배아젤리의 급여에 의해 간 조직에서의 지방축적이 억제되어 간 무게, 체중증가량 및 식이효율이 감소한 것으로 보인다.

Table 101. Food intake, body weight gains, and food efficiency ratio (FER) in rats fed experimental diets

Group <sup>1)</sup>	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/day)	FER <sup>5)</sup>
Control	19.8±0.1 <sup>2)NS3)</sup>	5.3±0.1 <sup>b4)</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>
RE	20.0±0.1	4.7±0.1 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>
EJP	19.7±0.2	4.9±0.2 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>

1) Control: 1% cholesterol diet, RE: 1% cholesterol diet + 15% rice embryo  
EJP: 1% cholesterol diet + 25% embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

2) Values are mean ± S.E. from ten rats done in triplicate.

3) Not significantly different among groups by Duncan's multiple range test at p<0.05.

4) Means with different superscript within the same column are significantly

5) FER = body weight gain/ food intake

## (2) 혈장과 간의 지질 수준

배아와 흑미 미강색소 배아젤리의 급여가 흰쥐의 혈장과 간의 지질 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였으며 그 결과는 Table 102에 제시하였다.

혈장 중성지방 함량은 대조군과 배아 및 배아젤리 첨가군 간에 유의한 차이가 없었다. 혈장 내 총 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 배아군이 6.1%, 배아젤리군이 25.2% 감소하였다. LDL-콜레스테롤 농도는 대조군이 64.4±4.9 mg/dl로 가장 높았고, 배아군은 58.8±5.8 mg/dl로 9.1% 감소하였으며, 배아젤리군은 41.6±5.3 mg/dl로 35.4% 감소하여 유의한 차이를 보였다. 동맥경화증에 예방적 효과가 있다고 알려진 HDL-콜레스테롤 농도는 세 군 간에 유의적 차이는 없었으나 대조군에 비해 배아와 흑미 미강색소 배아젤리 첨가에 의해 증가하는 경향을 보였다.

HDL-C/TC 비는 대조군에 비해 배아군에서 12.7%, 흑미 미강색소 배아젤리군에서 41% 증가하였다. 또한 임상에서 순환계와 관련한 진단지수 중 하나인 동맥경화지수(A.I.)는 대조군에서 가장 높았으며 배아와 흑미 미강색소 배아젤리첨가에 의해 각각 12.1% 와 31% 감소하여 배아젤리군에서 가장 낮은 수치를 나타내었다.

간 조직의 중성지방 농도는 대조군이 161.6 mg/g으로 가장 높았으며, 이는 배아

와 흑미 미강 색소 배아젤리 첨가에 의해 각각 40.1%와 56.1% 감소하였다. 총 콜레스테롤 함량 또한 대조군에 비해 배아군에서 12.2%, 배아젤리군에서 61.3% 감소하였다.

이러한 결과는 Kim 등(27)의 연구에서 고콜레스테롤 급여 흰쥐에게 매일 500 mg/kg B.W의 메밀 추출물을 경구 투여하였을 때 혈장의 중성지방 농도는 정상사료 급여군 및 고콜레스테롤 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다는 보고와 일치하였다. Kahlon 등(28)에 의하면 고콜레스테롤을 유도한 햄스터에게 쌀 미강을 급여하였을 때 혈중 콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소하였다. 미강의 콜레스테롤 강하 효과는 인체실험에서도 확인되었는데, Gerhardt 등(29)의 연구에서 매일 85 g의 미강을 14 명에게 6 주 동안 섭취시켰을 때 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도가 감소하였으며, HDL-콜레스테롤 농도는 증가하여 미강이 지질대사 개선 효과가 있음을 보고하였다.

HDL-콜레스테롤은 말초조직 및 혈관벽에 축적된 콜레스테롤을 간으로 이동시켜 담즙산으로 배설함으로써 혈액 중 콜레스테롤 농도를 저하시키고, 거품세포의 형성을 방해하여 동맥경화증과 고혈압 등 순화기계 질환을 개선시켜주는 요인으로 알려져 있다.(30) 고콜레스테롤 식이를 섭취한 동물은 식이 콜레스테롤의 장내 이용률 감소로 인해 이화작용과 배설을 위해 말초조직으로부터 간으로 운반되는 reverse cholesterol transport가 촉진되어 혈액 중 총콜레스테롤 함량이 증가하고 HDL-콜레스테롤 함량은 감소하는 것으로 보고되고 있다(31). Sharrett 등(32)은 45-64세 남녀 12,339명을 대상으로 10년간 역학조사를 한 결과 혈중 HDL-콜레스테롤 수준이 높은 사람일수록 심혈관 질환의 위험이 낮아진다고 하였다.

또한 Minhajuddin 등(33)의 연구에서는 고콜레스테롤혈증 쥐에게 쌀 미강유에서 분리 추출한 tocotrienol 분획을 투여하였을 때 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소하였으며, 이는 간의 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme (HMG-CoA) reductase의 활성을 억제하여 콜레스테롤 생합성이 감소된 것과 관련이 있다고 하였다. Wilson 등(34)은 고콜레스테롤혈증 햄스터에게 쌀 미강유와 oryzanol을 투여함에 따라 혈장의 지질과 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스터의 축적이 ferulic acid 보다 유의적으로 감소되었다고 보고하였다.

본 실험 결과 배아와 흑미 미강색소 배아젤리의 섭취는 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도는 감소시키고 HDL-콜레스테롤 함량을 증가시킴으로써 심혈관계 질환의 위험을 저하시킬 수 있는 가능성을 보여준다. 본 연구에서의 배아와 배아젤리에 의한 지질대사 변화도 쌀 배아에 함유되어 있는 tocopherol, tocotrienol,  $\gamma$ -oryzanol 및 피틴산 등의 항산화 성분이 혈장과 간의 지질대사에 관여한 결과로 볼 수 있겠다. 또한 항산화 효능이 큰 cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside과 peonidine 3-O- $\beta$ -D-glucoside을 함유하고 있는 흑미 미강 색소 추출물을 첨가한 배아젤리의 지질대사 개선 효과가 더 큰 것으로 추정된다.

### (3) 혈장 GOT와 GPT 활성

고콜레스테롤과 배아 및 흑미 미강색소 첨가 배아젤리가 혈장의 간 손상 지표로 사용하는 GOT와 GPT 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 102와 같다. 혈장 GOT와 GPT는 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로 간 조직 손상 시 혈중으로 다량 유출된다(35). GOT 활성도는 대조군이 가장 높았으며 배아와 배아젤리 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. GPT 활성도는 각 군 간에 유의한 차이는 없었지만 대조군에 비해 배아군과 배아젤리군에서 감소하는 경향을 보였다. 따라서 배아와 흑미 미강 색소 배아젤리는 고콜레스테롤혈증 상태에서 간 기능 보호 및 유지에 긍정적인 효과를 가지는 것으로 보인다.

Table 102. Plasma and hepatic lipid profile, GOT and GPT levels in rats fed experimental diets

	Control <sup>1)</sup>	RE	EJP
<b>Plasma</b>			
Triglyceride (mg/dl)	78.6 ± 5.7 <sup>2)NS3)</sup>	75.9 ± 5.6	71.8 ± 2.7
Total cholesterol (mg/dl)	93.9 ± 5.1 <sup>b4)</sup>	88.2 ± 5.5 <sup>b</sup>	70.2 ± 4.9 <sup>a</sup>
LDL-cholesterol (mg/dl) <sup>5)</sup>	64.4 ± 4.9 <sup>b</sup>	58.6 ± 5.8 <sup>b</sup>	41.6 ± 5.4 <sup>a</sup>
HDL-cholesterol (mg/dl)	13.8 ± 0.3 <sup>NS</sup>	14.5 ± 0.5	14.2 ± 0.4
HDL-C/TC (%)	15.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	16.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	21.1 ± 1.5 <sup>b</sup>
A.I. <sup>6)</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
GOT (U/ml)	65.8 ± 5.9 <sup>b</sup>	46.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	38.2 ± 4.3 <sup>a</sup>
GPT (U/ml)	85.0 ± 10.5 <sup>NS</sup>	76.3 ± 8.2	68.5 ± 5.9
<b>Liver</b>			
Triglyceride (mg/g)	161.6 ± 20.1 <sup>b</sup>	96.0 ± 9.0 <sup>a</sup>	70.9 ± 12.6 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg/g)	198.3 ± 14.2 <sup>b</sup>	174.1 ± 4.7 <sup>b</sup>	76.7 ± 7.7 <sup>a</sup>

1) Control: 1% cholesterol diet, RE: 1% cholesterol diet + 15% rice embryo  
EJP: 1% cholesterol diet + 25% embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

2) Values are mean ± S.E. from ten rats done in triplicate.

3) Not significantly different among groups by Duncan's multiple range test at p<0.05.

4) Means with different superscript within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple-range test.

5) LDL-cholesterol= TC - [HDL-C+(TG/5)]

6) A.I (Atherogenic index) =(TC - HDL-C)/HDL-C

(4) 혈장과 간의 지질과산화물 함량

배아와 흑미 미강색소 배아젤리를 급여한 흰쥐의 혈장과 간의 지질 과산화 정도는 Table 103에 나타내었다. 혈장의 TBARS 함량은 대조군에 비해 배아와 흑미 미강색소 배아젤리 첨가에 의해 유의하지는 않지만 각각 20%와 5% 감소하였다. 간의 TBARS 함량 또한 대조군에 비해 배아군에서 24.6%와 배아젤리군에서 10.1% 감소하였다. 이는 쥐에게 동맥경화식이를 급여하였을 때 혈장 TBARS 농도가 86% 증가하였다가 쌀 미강유의 tocotrienol 분획을 보충함에 의해 TBARS 농도가 52-67% 감소하였다는 보고와 유사하였다(33).

Free radical은 지질, 단백질 및 DNA를 손상시켜 세포손상을 초래함으로써 노화, 심혈관질환 및 암과 같은 만성질환의 원인이 된다고 알려져 있다. 또한 동맥경화증에서 혈관 변화를 가속화시키며 LDL-콜레스테롤을 변형시켜 관상동맥질환에 기여한다(36). Free radical에 의한 지질 손상의 지표 중에는 TBARS가 많이 사용되고 있다. 지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 질병에 의한 병태생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 가장 중요한 기전이며 이는 조직 내 세포의 산화적 스트레스와 생체 내 항산화 방어력 사이의 불균형으로 야기된다.37) 따라서 배아와 흑미 미강색소 배아젤리의 첨가에 따른 TBARS 함량의 감소는 높은 항산화능을 가진 배아가 각종 산화적 질환의 예방에 관여할 가능성이 높음을 시사한다.

Table 103. Plasma and hepatic TBARS levels in rats fed experimental diets

Group <sup>1)</sup>	Plasma TBARS(μmol/dl)	Hepatic TBARS(μmol/dl)
Control	50.0 ± 1.8 <sup>2)NS3)</sup>	24.0 ± 1.7 <sup>NS</sup>
RE	40.2 ± 1.5	18.1 ± 1.2
EJP	47.5 ± 1.0	21.6 ± 1.6

1) Control: 1% cholesterol diet, RE: 1% cholesterol diet + 15% rice embryo  
EJP: 1% cholesterol diet + 25% embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

2) Values are mean ± S.E. from ten rats done in triplicate.

3) Not significantly different among groups by Duncan's multiple range test at p<0.05.

#### (5) 간 조직의 항산화효소 활성화

생체막이나 지단백질로서 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 free radical의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 과산화물들과 분해산물 등은 반응성이 높아 주변의 생체분자들의 구조와 기능을 변환시켜 여러 가지 만성질환을 초래한다. 생체 내에는 이러한 free radical을 중화시키고 몸을 보호할 수 있는 여러 항산화 방어기구가 있다. 이 중 간과 적혈구에 있는 항산화 효소인 SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시키며 이때 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등은 GSHpX와 CAT 등의 작용에 의해 H<sub>2</sub>O로 전환되어 무독화됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호한다(38,39).

본 연구의 SOD 활성도는 대조군에 비해 배아와 배아젤리 첨가군에서 유의적으로 증가하였다(Table 104). CAT 활성도는 각 군 간에 유의적인 차이는 없었지만 배아와 배아젤리 첨가에 의해 증가하는 경향을 보였다. GSHpx 활성도는 대조군이 40.04 nmol/min/mg of protein으로 가장 높았으며 배아와 배아젤리 첨가군에서 낮은 수치를 나타내었다. Rana 등(40)은 쥐에게 N-nitrosodiethylamine으로 산화적 스트레스를 유도한 후 4주 동안 쌀 미강유를 급여하였을 때 적혈구와 조직의 지질 과산화 정도가 대조군으로 사용된 땅콩유에 비해 덜 증가하였으며, 간의 SOD와 GSHpX 활성도가 증가되어 식이에 쌀 미강유를 첨가함으로써 산화적 스트레스로부터 보호하고 항산화능을 향상시킬 수 있다고 하였다. 또한 암컷 albino 쥐에게 복강으로 Ehrlich ascites carcinoma 세포를 주입하고 변성된 쌀 미강 헤미셀룰로즈인 MGN-3/bio

bran을 25일 동안 일주일에 6번씩 복강으로 투여한 연구에서 MGN-3/biobran가 암세포 성장을 억제하고 혈장, 간 및 암조직의 SOD, CAT 및 GSHpX 활성도를 증가시켰으며, 간의 SOD, CAT 및 GSHpX의 mRNA 발현이 증가됨이 보고되었다(41)

이러한 결과로 고콜레스테롤 식이에 배아와 흑미 미강색소 배아젤리를 첨가함으로써 간의 항산화효소의 활성을 증가시켜 혈장과 간조직의 지질대사를 개선하고 지질과산화물 축적을 감소시켜 산화적 스트레스에 의한 조직의 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.



Table 104. **Hepatic antioxidant enzyme activity in rats fed experimental diets**

Group <sup>1)</sup>	SOD (unit/mg of protein)	CAT ( $\mu$ mol/min/mg of protein)	GSHpx (nmol/min/mg of protein)
Control	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>2)a3)</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>NS4)</sup>	40.04 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>
RE	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.24 $\pm$ 0.01	36.56 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
EJP	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.02	34.45 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>

1) Control: 1% cholesterol diet, RE: 1% cholesterol diet + 15% rice embryo  
EJP: 1% cholesterol diet + 25% embryo jelly with 1% pigment fraction of black rice

2) Values are mean  $\pm$  S.E. from ten rats done in triplicate.

3) Means with different superscript within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test.

4) Not significantly different among groups by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

#### 4. 간장 및 신장손상 회복 효능이 검증된 한약재 열수추출물 활용 쌀 배아젤리 가공성

##### 가. 재료 및 방법

(1) CCl<sub>4</sub> 처리에 의해서 손상된 장기 조직들의 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자 등 한약재 열수추출물 투여에 의한 손상장기 회복효능 검증

(가) 연구에 사용한 한약재들의 생리활성 효능 및 특성

**헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunberg:HDT)열매**는 지구자로 불리며 주취, 빈혈, 구갈, 구토, 사지마비, 류마티즘, 대소변 불통의 치료<sup>3-4)</sup>에 주로 쓰이며, 그 유효성분으로는 열매와 씨의 methanol 추출물에서 (+)-ampelopsin, laricetrin, myricetin, (+)-gallocatechin과 같은 flavonoids류<sup>5)</sup>, hovenitin I, II, III과 같은 flavonol류<sup>6)</sup>, peptide alkaloid인 frangulanine<sup>7)</sup>, jujuboside, hoveniosides<sup>8)</sup> 등이 분리되었으며, 현재까지 헛개나무열매에 관한 연구는 생물학적 기능과 조성, 간 보호작용, 항산화,

항미생물, 항암, 항돌연변이, 항균, 항당뇨, 저지혈증, 항고혈압, 알코올 해독작용 등이 보고되고 있다<sup>9)</sup>.

한방에서 택사(*Alisma orientale*)는 신체의 습기를 빨아들이고, 소변을 잘 보게 하며 신장의 화기를 없애주는 효능이 있고, 택사의 유효성분인 triterpenoid, sequiterpenoid 화합물 등이 간보호, 고지혈증 개선, 항알러지작용 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>10)</sup>.

감잎(*Diospyrus kaki Folium*)은 신장 및 심장 등의 순환기 질환에 효능이 있고 위궤양, 십이지장 및 당뇨병 등의 만성질환에 유효한 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>.

뽕나무(*Morus alba*)가지는 상지라고도 하며 부종, 비만, 소화불량, 소변불통 등에 효과가 있으며 주성분은 betulinic acid이다. 지금까지 뽕나무에 대한 성분분석 연구에서 ,8-hydroxybenzyl taxifolin, 8-hydroxybenzyltaxifolin, 6-hydroxybenzyltaxifolin 등이 뽕나무가지에서 성분이 분리동정되었다<sup>12)</sup>.

영실(*Rosa multiflora*)은 쌍떡잎식물 장미과의 덩굴성 활엽관목으로 덩굴짚레라고 불리며 그 열매는 신맛을 내고 성질은 서늘한 것이 특징이며 신장기능 개선, 부종, 불면증에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>13)</sup>.

동규자(*Malva verticillata Linn*)는 아욱과에 속하는 1년생 초본인 아욱의 성숙한 종자이며 이뇨 및 혈류량을 증가시키고, 대소변 불통, 혈액에 함유된 독소제거, 비만, 임신부의 유즙 부족, 유방의 염증 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>14)</sup>.

이와 같이 한약재의 조성과 생리기능에 대한 지금까지의 많은 연구가 수행되었으나 CCl<sub>4</sub> 투여로 유발된 간, 신장, 심장, 고환 및 위장 손상시 이들 한약재 열수 추출물의 개선효과에 대한 연구는 아직 이루어져 있지 않는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 헛개나무열매 및 택사, 감잎, 뽕나무가지, 영실, 동규자 열수 추출물이 CCl<sub>4</sub>로 유발된 흰쥐의 간, 신장, 심장, 고환, 위장 손상에 따른 그 개선효과를 조직학적 및 조직형태계량학적인 측면에서 확인하고자 연구를 수행하였다.

## (나) 실험재료

### ① 실험동물

실험동물로서는 생후 6주령의 평균체중  $150 \pm 20$ g인 Sprague-Dawley계 웅성 rat 80 두(Orient Bio Inc, GyeongGi-Do)를 1주일간 환경적응(온도  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $60 \pm 5\%$ , 채광은 12시간<06:00-18:00> 명암조명)을 시켰으며 물과 사료는 자유급식하였다.

### ② 시료추출

대구 약전시장의 한약 건재상에서 구입하여 음건한 헛개나무열매(*Hovenia dulcis* Thunberg), 택사(*Alisma orientale*), 감잎(*Diospyrus kaki Folium*), 뽕나무(*Morus alba*), 영실(*Rosa multiflora*), 동규자(*Malva verticillata Linn*)시료를 autoclave( $121^\circ\text{C}$ , 15psi, 3 hours) 후 여과하여(No. 2 filter paper) 얻은 추출물을 동결건조하여 냉동보관 하였으며 실험전 증류수에 용해하여 사용하였다.

## (다) 실험방법

실험동물을 일주일간 적응시킨 후 사염화탄소투여군(I), 사염화탄소투여 후 헛개나무열매투여군(II), 사염화탄소 투여 후 헛개나무열매와 5종 한약재투여군(III)으로 16두씩 3군으로 분류하였다. I-III군은 사염화탄소를  $2.5\text{ml/kg BW}$  용량으로 복강투여 6시간 후 I 군은 생리식염수를 II군은 헛개나무열매 추출액을  $100\text{mg/kg BW}$ , III군은 헛개나무열매 추출액 및 5종의 한약재(HDT 50% 5종의 한약재 각 10%씩)를  $100\text{mg/kg BW}$ 로 경구투여 하였다.

### ① 투여방법 및 혈액채취, 조직적출

사염화탄소 투여 후 실험 1일째, 3일째, 5일째, 7일째에 각 군당 5마리를 ether 마취하에 복강을 개방하여 descending aorta에서 채혈한 혈액은 heparin이 처리된 eppendorf tube에  $1.5\text{ml}$ 씩 분주하여 즉시 검사하였고 조직검사를 위하여 간장, 신장, 심장, 고환, 위장을 적출하였다. 각 조직들은 PBS buffer로 세척 후 여지로 남아있는 수분을 제거하여 bouin solution에 고정하여 paraffin 포매 후 Hematoxilin and Eosin(H&E) stain을 실시하였다.

## ② 혈액학적 및 혈액 생화학적 분석

혈액학적 검사는 자동혈구계산기(MS9-5 Vet, WBC 5 Diff, France)를 사용하여 RBC, WBC, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC, trombocyte를 측정하였다.

혈액생화학적 검사는 dry chemistry analyzer(Spotchem<sup>TM</sup> SP-4410<sup>®</sup>, Kyoto Daiichi kagaku Co., Ltd. Japan) 기기를 사용하여 aspirate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase

(ALT), alkaline phosphatase(ALP), triglyceride(TG), total cholesterol, total bilirubin, blood urea nitrogen(BUN), creatinine을 측정하였다.

## ③ 조직학적 및 조직 형태 계량학적 분석

조직처리하는 간, 신장, 심장, 고환 및 위 실질조직의 일부를 샘플하여 bouin solution 에 고정시킨 다음 Hematoxylin-eosin(H&E stain) 염색을 실시하고 각각 광학현미경하에서 관찰하였다. 간 실질 중 변성부위의 비율, 변성 간세포의 수, 신장 실질 중 변성부위의 비율, 변성 사구체의 수, 고환내 변성 정세관의 수 및 위점막 궤양/미란 부위의 비율을 자동영상분석장치(AnalysisSIS image processing; SIS, Germany)를 이용하여 분석하였다. 간 실질 변성 지역의  $\%/mm^2$ , 중심소엽 지역의 변성 세포수(N)/1000, 신장 실질 변성 영역의  $\%/mm^2$ , 신장의 확장, 위축된 사구체의 수(N)/100로 분석하였으며, 위점막 하 부종을 나타내는 빈도를 관찰하였다.

## ④ 통계분석

혈액학적 및 혈액생화학적 검사결과는 Student's *t*-test로, 조직학적 검사결과는 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test(MW test) with SPSS for Windows (Release 6. 1. 3., SPSS Inc., USA)로 유의성( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )을 검정하였다.

## (2) 한약재 열수추출물 활용 쌀 배아젤리 가공성 검정

### (가) 시료

청결 도정라인으로부터 회수한 미강을 쇠미선별기(RS-1, Taiwa Co., Japan)에 의해 배아와 과피를 완전히 분리하여 배아만을 회수한 것을 (주)건양 RPC(김천)로부터 제공받았다. 제공받은 배아는 약한 불에서 3분정도 볶아 분쇄기(HJMF-7900, 한일전기주식회사, 한국)에 넣고 분쇄한 후 20mesh 체를 통과시킨 후 사용하였다. 한약재인 헛개나무 열매(*Hovenia dulcis* Thunberg, 국산), 택사(*Alisma orientale*, 러시아산), 감잎(*Diospyrus kaki Folium*, 국산), 뽕나무(*Morus alba*, 러시아산), 영실

(*Rosa multiflora*, 러시아산), 동규자(*Malva verticillata* Linn, 국산)는 대구 약전 시장의 한약 건재상에서 구입하였다. 구입한 헛개나무 열매, 택사, 감잎, 뽕나무, 영실, 동규자를 음용할 수 있도록 열수 추출하였는데 각각의 건조 시료 중량의 10배의 물을 넣고 121℃에서 3시간 감압(15 psi)추출한 후 동결 건조하여 보관하였다. 배아젤리 제조 시에는 헛개나무 열매 추출물 50%와 5종의 한약재 추출물은 각각 10%가 되도록 100 ml 증류수에 녹여서 사용하였다(Lim MK 등 2007). 이밖에 식품용 젤라틴(분말상, 웅천상사, 한국), 한천(분말상, 화인통상, 한국), 설탕(정백당, 제일제당) 등은 시중에서 구입하였다.

(나) 배아젤리 제조법

- ① 재료 배합비 ; 한약재와 배아를 첨가한 젤라틴 및 한천 젤리의 제조를 위한 배합 비율은 예비실험을 거쳐 Table 105과 Table 106과 같이 정하였다. 배아를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하고 물 100 g에 한약재 추출물 1%, 설탕 20%, 4 %의 젤라틴 또는 한천에 배아가루를 각각 5, 10, 15, 20% 씩 첨가하여 제조한 젤리를 실험군으로 하였다.

Table 105. Formulation for Jelly with Gelatin, Chinese herbal extracts and Rice Embryo

(unit : g)

Sample *	Rice embryo	Chinese herbal extracts	Gelatin	Sugar	Water
G0	0	1	4	20	100
G5	5	1	4	20	100
G10	10	1	4	20	100
G15	15	1	4	20	100
G20	20	1	4	20	100

\* G0 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin

G5 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 5% Rice embryo

G10 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 10% Rice embryo

G15 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 15% Rice embryo

G20 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 20% Rice embryo

Table 106. Formulation for Jelly with Agar, Chinese herbal extracts and Rice embryo

(unit : g)

Sample*	Rice embryo	Chinese herbal extracts	Agar	Sugar	Water
A0	0	1	4	20	100
A5	5	1	4	20	100
A10	10	1	4	20	100
A15	15	1	4	20	100
A20	20	1	4	20	100

\* A0 : 1% Chinese herbal extract + Agar

A5 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 5% Rice embryo

A10 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 10% Rice embryo

A15 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 15% Rice embryo

A20 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 20% Rice embryo

② 제조방법 ; 젤리의 제조 방법은 Fig. 66에 도식화하였다. 먼저 100 g의 물을 70℃정도로 가열한 후 젤라틴이나 한천을 넣고 충분히 녹도록 끓인다. 여기에 분량의 설탕을 완전히 녹인 후 한약재 추출물과 배아를 넣고 잘 섞이도록 교반하여 일정한 크기의 사각틀(11×8×4 cm)에 붓고 상온에서 식힌 후 냉장고에서 굳혀 사용하였다.

③ 배아젤리의 물성측정 ; 젤리의 물성은 Texture analyzer(TA-XT plus, Stable Micro Systems Co., England)를 사용하여 측정하였다. 측정 조건은 20 mm rod를 사용하였으며, deformation 50%, pre-test speed 5.0 mm/s, test speed 2.0 mm/s, post-test speed 2.0 mm/s 이었다. 측정에 사용한 시료의 크기는 2×2×2 cm 로 하였고 TPA(texture profile analysis) 방법에 의해 two bite compression test를 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였으며 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 겹성(gumminess) 및 씹힘성(chewiness)을 측정하였다.

④ 관능검사 ; 숙련된 식품영양학과 대학원생 10명을 패널로 선정하여 일정크기(2×2×2 cm)로 성형된 젤리를 제공하여 색(color), 향미(flavor), 맛(taste), 질감

(texture)을 조사하였고 전반적인 기호도(overall acceptability)를 평가하였다. 모든 항목은 5점 척도법을 이용하였으며 강도나 기호도가 높을수록 높은 점수를 부여하였고, 3회 측정하여 평균값을 제시하였다.

- ⑤ 통계처리 ; 모든 실험 결과는 SPSS v. 12.0(Statistical Package for Social Science Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였으며, 평균과 표준편차로 제시되었다. 각 실험군의 평균치간 차이의 유의성은 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

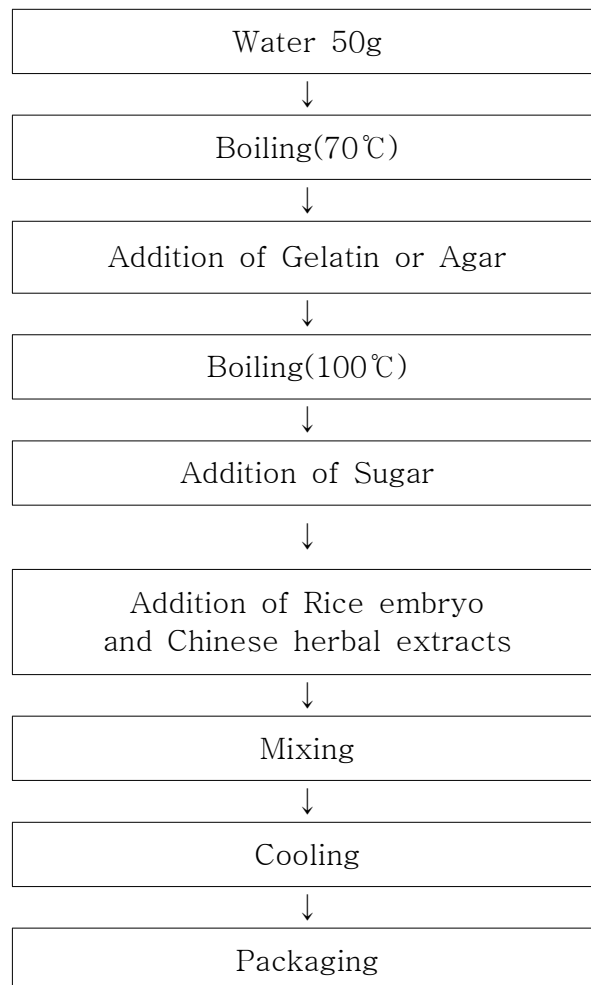


Fig. 66 Procedure for jelly made with rice embryo

## 나. 실험결과

- (1)  $\text{CCl}_4$  처리에 의해서 손상된 장기 조직들의 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자 등 한약재 열수추출물 투여에 의한 손상장기 회복효능 검증

사염화탄소 투여에 의해 간세포의 공포화, 염증세포 침윤 및 소엽중심성 괴사 소견이 관찰되었으며, 신장에서는 국소성 괴사, 염증세포의 침윤 및 섬유화가 인정되었다. 또한 고환에서는 이상 정자 및 세포 덩어리가 정세관의 내강내에서 인정되었으며, 정세관의 위축 소견이 인정되었고, 위점막에서는 관강면의 국소성 탈락을 주요 소견으로하는 궤양 또는 미란 소견과 위점막하 부종이 일부 인정되었다. 한편 심장에서는 별 다른 이상소견이 인정되지 않았다. 대부분의 실험군에서 1일부터 3일까지 이러한 간, 신장, 고환 및 위 변성 소견이 증가되는 경향을 나타낸 이후 점차 회복되는 경향을 나타내었다. 한편 이들 조직병리학적 변화와 Histomorphometry 변화는 잘 일치되는 경향을 나타내었다.

- 헛개나무열매 추출물 투여군에서는 매체 대조군에 비해 현저한 간 병성 소견의 감소가 사염화탄소 투여 3 및 5일후 인정되었으며, 신장 변성 소견역시 전 관찰기간 동안 감소되었고, 위점막 변성 역시 투여 1일 후에 국한되어 감소되는 경향을 나타내었다.

한편 histomorphometry 적으로 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 간 변성을 및 변성 간세포 수의 감소가 사염화탄소 투여 3 및 5일에 국한되어 인정되었으며, 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 신장 변성을 및 변성 사구체 수의 감소는 실험 전기간 동안 인정되었다. 또한 위점막 궤양/미란을 역시 사염화탄소 투여 1일에 국한되어 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 감소되었다. 따라서 헛개 추출물이 사염화탄소로 유발된 간변증, 신변증 및 위 점막 손상을 효과적으로 억제 또는 치료하는 것으로 생각된다. 한편 매체 대조군과 비교하여 매우 유사한 고환 및 심장의 조직병리학적 및 Histomorphometry 소견을 나타내었다.

헛개나무열매 추출물 투여군에서는 간 변성율이 매체 대조군에 비해 사염화탄소 투여 1, 3, 5 및 7일 후에 각각 -5.43, -62.71, -60.46 및 0.00%의 변화를, 변성 간세포 수는 각각 5.00, -49.19, -69.03 및 0.00%의 변화를, 신장 변성율은 각각 -17.77, -29.93, -28.88 및 -37.07%의 변화를, 변성 사구체 수는 각각 -23.50, -40.09, -35.35 및 -41.85%의 변화를, 변성 정세관 수는 2.04, -1.94, 5.86 및 -2.97%의 변화를, 위점막 변성율은 각각 -25.87, 3.81, -4.69 및 5.30%의 변화를 나타내었으며, 매체 대



조군 및 헛개나무열매 추출물 투여군에서는 사염화탄소 투여 1, 3, 5 및 7일 후에 각각 100, 100, 60 및 40%의 위 점막하 부종을 나타내었다.

- HDTmix 투여군에서는 매체 대조군에 비해 현저한 간변성 및 신장 변성소견의 감소가 전 관찰기간 동안 인정되었고, 위 변성 역시 투여 1또는 3일 후에 국한되어 감소되는 경향을 나타내었다. 한편 histomorphometry 적으로 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 간 변성율, 변성 간세포 수, 신장 변성율 및 변성 사구체 수의 감소는 실험 전기간 동안 인정되었으며, 위점막 궤양/미란 율 및 점막하부종 빈도 역시 사염화탄소 투여 1또는 3일 후에 국한되어 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 감소되었다. 한편 매체 대조군과 비교하여 매우 유사한 고환 및 심장의 조직병리학적 및 Histomorphometry 소견을 나타내었다. 헛개나무열매 추출물 투여군과 비교하여 더 우수한 간변증 및 신장 변성억제효과를 나타내었으나, 위점막 변성에 대해서는 유사한 억제효과가 인정되었다.

또한, HDTmix 투여군에서는 간 변성율이 매체 대조군에 비해 사염화탄소 투여1, 3, 5 및 7일 후에 각각 -27.27, -80.07, -91.61 및 0.00%의 변화를, 변성 간세포 수는 각각 -28.41, -63.14, -89.68 및 0.00%의 변화를, 신장 변성율은 각각 -34.20, -63.23, -39.47 및 -52.48%의 변화를, 변성 사구체 수는 각각 -35.25, -53.90, -60.40 및 -52.40%의 변화를, 변성 정세관 수는 -7.14, 6.07, -0.39 및 4.95%의 변화를, 위점막 변성율은 각각 -22.79, 2.18, -1.08 및 9.51%의 변화를 나타내었으며, 매체 대조군에서는 사염화탄소 투여 1, 3, 5 및 7일 후에 각각 100, 100, 60 및 40%의 위 점막하 부종을 나타내었으며, HDmix 투여군에서는 각각 60, 40, 60 및 40%의 위 점막하 부종을 나타내었다.

대조군과 유사한 소견을 나타내었다.

헛개나무열매 추출물은 사염화탄소로 유발된 간 및 신장 변성, 특히 급성변성을 현저히 억제하는 것으로 관찰되었으며, 일부 위점막 손상 역시초기에 억제하는 것으로 생각된다. 또한 헛개나무열매 추출물의 효과는 기존의 생약 추출물과의 혼합에 의해 증가되는 것으로 판단된다.

(가) Complete blood cell(CBC) count

Table 107. Changes of RBC levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	RBC levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	704.66±46.43	697.50±52.43	652.40±31.06	655.16±71.58
HDT extracts	579.25±32.01 *	711.25±12.91	666.20±43.03	609.25±5.12
HDTmix	616.20±28.83 * *	641.80±32.47 *	652.33±76.29	643.30±19.61

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 108. Changes of WBC levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	WBC levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	5.84±1.28	10.08±8.59	8.59±1.56	7.10±1.65
HDT extracts	7.46±1.11 *	5.01±0.64 * *	6.41±1.61	7.95±1.43
HDTmix	6.73±1.73	6.24±1.16	9.51±2.57	6.94±1.46

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 109. Changes of HB levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Hb levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	13.96±1.38	15.57±1.57	14.04±0.63	13.23±1.71
HDT extracts	13.34±1.48	15.6±0.29	14.04±0.47	12.20±0.45
HDTmix	14.08±1.11	14.44±1.08 * *	13.55±0.83	12.30±0.35

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 110. Changes of PCV levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	PCV levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	13.96±1.38	15.57±1.57	14.04±0.63	13.23±1.71
HDT extracts	13.34±1.48	15.6±0.29	14.04±0.47	12.20±0.45
HDTmix	14.08±1.11	14.44±1.08 * *	13.55±0.83	12.30±0.35

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 111. Changes of MCV levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	MCV levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	62.26±3.79	53.47±4.62	52.92±3.02	56.11±0.84
HDT extracts	58.9±5.60 * *	53.27±3.46	51.74±2.40	58.45±1.01 * *
HDTmix	53.36±4.68 * *	54.24±2.31	55.73±1.40	58.52±1.78 * *

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 112. Changes of MCH levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	MCH levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	13.96±1.38	15.57±1.57	14.04±0.63	13.23±1.71
HDT extracts	13.34±1.48	15.6±0.29	14.04±0.47	12.20±0.45
HDTmix	14.08±1.11	14.44±1.08 * *	13.55±0.83	12.30±0.35

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 113. Changes of MCHC levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	MCHC levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	31.78±1.48	41.85±2.25	40.78±2.15	36.00±1.15
HDT extracts	42.18±5.31 *	41.27±2.61	40.82±1.97	34.27±0.68 *
HDTmix	42.98±2.25 *	41.50±0.77	37.47±0.84	32.72±0.57 *

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 114. Changes of Thrombocyte levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Thrombocyte levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	13.96±1.38	15.57±1.57	14.04±0.63	13.23±1.71
HDT extracts	13.34±1.48	15.6±0.29	14.04±0.47	12.20±0.45
HDTmix	14.08±1.11	14.44±1.08 * *	13.55±0.83	12.30±0.35

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

## 2. Biochemical analysis

Table 115. Changes of AST levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	AST levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	1212.50±234.71	1903.50±902.83	83.60±16.45	102.66±28.07
HDT extracts	5820.00±400.74 *	779.00±176.99	131.20±26.77 * *	65.00±11.60
HDTmix	2833.33±625.64	524.33±228.50	110.75±21.65 *	86.66±12.09

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 116. Changes of ALT levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	ALT levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	835.00±350.14	361.00±192.63	24.40±10.50	37.50±36.76
HDT extracts	1636.66±499.43	260.50±67.99	33.00±2.00	16.00±5.41
HDTmix	578.33±385.74	125.66±73.90	31.00±5.97	17.50±6.45

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 117. Changes of ALP levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	ALP levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	1034.00±224.96	1374.50±411.27	428.40±29.09	408.80±99.57
HDT extracts	1150.50±590.42	822.00±258.07 * *	464.60±77.90	483.50±78.75
HDTmix	1094.75±258.41	850.60±201.77	865.50±281.30 * *	646.00±182.03 * *

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 118. Changes of Total cholesterol levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Total cholesterol levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	52.00±2.82	101.50±28.72	83.66±18.17	65.50±10.66
HDT extracts	58.25±10.40	100.66±15.01	68.50±13.47	73.66±14.15
HDTmix	54.50±6.36	130.25±18.73	81.00±12.00	75.00±11.97

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 119. Changes of Triglyceride levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Triglyceride levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	24.00±0.57	41.50±23.33	30.00±8.66	40.50±19.05
HDT extracts	53.66±45.39	54.00±24.33	24.00±1.00	30.00±5.56
HDTmix	26.00±1.15	130.00±89.28	24.25±0.95	53.66±31.94

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 120. Changes of Total bilirubin levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Total bilirubin levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	0.32±0.18	0.27±0.05	0.33±0.15	0.27±0.05
HDT extracts	0.74±0.16 *	0.27±0.05	0.28±0.08	0.20±0.00
HDTmix	0.57±0.20 * *	0.40±0.18	0.22±0.00	0.20±0.00

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 121. Changes of BUN levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	BUN levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	15.75±2.06	15.00±1.41	21.40±5.22	11.16±1.72
HDT extracts	14.60±1.34	15.50±1.91	17.25±5.85	12.50±0.57
HDTmix	20.00±4.24	13.00±1.73	41.50±10.72 *	11.00±2.16

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

Table 122. Changes of Creatinine levels in CCl<sub>4</sub>, HDT extracts, HDTmix group of rat.

Group ID	Creatinine levels			
	1 day	3 day	5 day	7 day
CCl <sub>4</sub>	13.96±1.38	15.57±1.57	14.04±0.63	13.23±1.71
HDT extracts	13.34±1.48	15.6±0.29	14.04±0.47	12.20±0.45
HDTmix	14.08±1.11	14.44±1.08 * *	13.55±0.83	12.30±0.35

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by students' *t*-test.

### Histomorphometry

Table 123. Changes on the percentage of hepatic degenerative regions(%/1mm<sup>2</sup> of hepatic parenchyma)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	78.88±8.06	87.18±2.66	21.17±5.02	ND
HDT extracts	74.59±5.76	32.51±9.48 *	8.37±3.31 *	ND
HDTmix	57.37±10.95 *	17.38±5.13 *	1.78±1.01 *	ND

n=5; Mean±S.D.;<sup>1)</sup>ND, not detected; \* p<0.01 compared to that of control by MW test.

Table 124. Changes on the percentage of hepatocytes in the centrolobular regions(N/1000 hepatocytes)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	707.40±72.92	835.60±60.34	93.00±17.99	ND
HDT extracts	742.80±53.03	424.60±98.46 *	28.80±19.85 *	ND
HDTmix	506.40±105.27 *	308.00±118.36 *	9.60±1.67 *	ND

n=5; Mean±S.D.;<sup>1)</sup>ND, not detected; \* p<0.01 compared to that of control by MW test.

Table 125. Changes on the percentage of kidney degenerative regions(%/1mm<sup>2</sup> of kidney parenchyma)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	84.70±10.68	82.72±2.85	65.16±10.10	51.00±8.41
HDT extracts	69.65±6.27 * *	61.15±7.90 * *	46.34±10.37 *	32.10±9.65 * *
HDTmix	55.73±10.69 *	32.09±12.94 *	39.44±14.57 *	24.23±4.84 *

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by MW test.

Table 126. Changes on the number of abnormal Glomeruli showing vasodilated atrophic changes(N/100 Glomeruli)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	80.00±8.31	89.80±4.87	89.40±5.41	62.60±10.45
HDT extracts	61.20±9.04 * *	53.68±12.79 * *	57.80±13.33 *	36.40±14.12 * *
HDTmix	51.80±15.25 * *	41.40±14.74 *	35.40±11.67 *	29.80±8.04 *

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.01 and \* \* p<0.05 compared to that of control by MW test.



Table 127. Changes on the number of abnormal testicular tubules showing ectopic cell clusters and degenerative spermatozoa in lumen with atrophic changes(N/100 Tubules)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	78.60±8.17	82.40±7.64	51.20±8.26	20.20±2.17
HDT extracts	80.20±7.05	80.80±12.56	54.20±16.84	19.60±2.70
HDTmix	73.00±13.78	87.40±6.95	51.00±21.41	21.20±9.01

n=5; Mean±S.D.

Table 128. Changes on the percentage of erosive/ulcerative gastric mucosa(%/mm of mucosa surface)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	24.46±4.11	34.60±4.87	30.86±5.88	14.42±3.13
HDT extracts	18.13±3.90 *	35.92±4.36	29.42±8.90	15.19±3.24
HDTmix	18.88±2.17 *	35.36±7.12	30.53±5.77	15.80±3.33

n=5; Mean±S.D.; \* p<0.05 compared to that of control by MW test.

Table 129. Changes on the frequencies of gastric submucosa edema encountered (N/total observed)

Group ID	Days after Dosing of CCl <sub>4</sub>			
	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	5/5(100%)	5/5(100%)	3/5(60%)	2/5(40%)
HDT extracts	5/5(100%)	5/5(100%)	3/5(60%)	2/5(40%)
HDTmix	3/5(60%)	2/5(40%)	3/5(60%)	2/5(40%)

## (2) 한약재 열수추출물 활용 쌀 배아젤리 가공성 검토

### (가) 물성 특성

헛개나무 열매, 택사, 감잎, 뽕나무, 영실, 동규자의 열수추출 혼합물 1%와 배아 첨가량을 달리하여 제조한 젤리를 Texture analyzer를 이용하여 경도, 부착성, 탄력성, 응집성, 검성, 씹힘성의 물성을 측정된 결과는 Table 130과 Table 131에 나타내었다.

젤라틴을 이용한 배아젤리의 경우, 경도(hardness)는 배아 무첨가군과 배아 첨가군은 유의적인 차이가 없었고 배아의 첨가량이 증가할수록 경도는 감소하는 경향이었는데 배아 20% 첨가군의 경도가 가장 낮았다. 이는 누에분말을 이용한 젤리의 물성 특성에서 누에 분말의 첨가량이 증가함에 따라 경도가 감소된 것(Kim AJ 등 2006), 꽃감 추출물 첨가비율에 따른 꽃감젤리의 품질연구에서 꽃감추출물의 첨가량이 증가할수록 경도가 감소된 것(Kim JH 와 Kim JK 2007), 돌나무즙을 첨가한 젤라틴 젤리의 품질특성에서 돌나무즙 첨가량이 증가할수록 경도가 감소되었다는(Mo EK 등 2007)보고와 일치하는 결과이다. 그러나 뽕잎(Kim AJ 등2006), 오디가루(Kim AJ 등 2007) 등을 이용한 젤라틴 젤리의 경우 첨가물의 양이 많아질수록 경도는 증가한다는 보고도 있어 상반된 결과를 보이기도 한다. 이것은 젤라틴을 겔화제로 쓸 경우 sol 상태의 pH가 젤라틴의 응고에 영향을 미치기 때문이라고 생각된다. 젤라틴은 pH 4.8~pH 5.2의 등전점을 지닌 단백질로 pH 5에서 최소의 점도와 최대의 겔형성능을 나타낸다. Lee JA 와 Park GS(2007)의 연구에서 마가루를 첨가함에 따라 pH는 5.6~5.7로 높아지는 경향을 보였고 젤리의 관능적 특성에서 경도가 다소 높게 평가된 점도 이를 반영한다. 이로써 젤라틴을 이용한 젤리를 제조할 때는 첨가되는 부재료의 첨가에 따라 pH가 다른 경향을 보이므로 섬세한 주의가 필요하며 본 연구에서도 첨가된 한약재 추출 혼합물, 배아가 sol 젤리의 pH에 미치는 영향을 조사하여야 할 것으로 생각된다. 부착성(adhesiveness)은 배아 무첨가군보다 첨가군들이 유의적으로 낮았는데 첨가군들간에는 비슷한 수준이었다. 이는 배아 젤리에 첨가한 배아가 젤라틴 입자를 분산 또는 이완시켜 젤라틴에 의한 부착성을 억제한 것으로 생각된다(Kim JM 등 2004). 탄력성(springiness)과 검성(gumminess)은 배아 무첨가군과 5% 첨가군은 유의적인 차이가 없었고 배아 첨가량이 증가함에 따라 감소하여 20% 첨가군의 수치가 가장 낮았다. 응집성(cohesiveness)은 시료들간에 유의적인 차이가 없었는데 이것으로 보아 배아의 첨가는 젤라틴의 뭉침성에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 씹힘성(chewiness)은 배

아 5% 첨가군이 다른 군들에 비해 유의적으로 높았다. 이상의 결과로 젤라틴을 이용한 배아젤리의 경우 배아 5% 첨가군이 응집성이 강하면서 탄력 있고 씹힘성이 좋은 젤리를 형성하였다.

한천을 이용한 배아젤리의 경우, 경도(hardness)와 검성(gumminess)은 배아 10% 첨가군이 가장 높았지만 무첨가군과 유의적인 차이는 없었고 배아첨가량이 증가함에 따라 감소하여 20% 첨가군에서 가장 낮았다. 젤라틴 젤리의 경우 배아의 첨가량이 많아질수록 경도나 점성이 점차 감소하였으나 한천젤리의 경우 배아 15%를 첨가할 때까지 큰 변화가 없었다. Yoshinura 등(1994)은 호박 추출물에 한천을 첨가하여 제조한 젤리의 경도가 호박추출물의 첨가량이 많아지면 경도는 증가하나 파단 응력이 감소하여 단단하면서 잘 부수지는 텍스처로 된다고 하였는데 배아 첨가시에도 비슷한 경향이였다. 부착성(adhesiveness)은 시료들간 유의적인 차이는 없었지만 배아 첨가량이 증가할 수록 낮아지는 경향이였다. 탄력성(springiness)은 군간 유의적 차이 없이 비슷한 경향이였고, 응집성(cohesiveness)도 유의한 차이 없이 군간 비슷한 수치를 나타내었는데 배아 10% 첨가군이 약간 높았다. 한천의 경우도 젤라틴과 마찬가지로 배아의 첨가가 뭉침성에 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. 씹힘성(chewiness)의 경우 군간 유의적인 차이는 없었지만 배아 10% 첨가군까지 증가하였다가 다시 감소하였다. 한천을 이용한 배아 젤리의 경우 10% 첨가군이 응집성이 좋고 탄성과 씹힘성이 좋은 젤리를 형성하였다.

일반적으로 한천 젤리는 펙틴이나 젤라틴보다 씹힘성이 크고 단단한 특성을 가지고 있지만 Choi EJ 등 (2007)은 고령자용 젤화제로 카르기난, gellan gum보다 한천을 사용할 경우 경도, 부착성, 탄력성이 모두 낮은 편이어서 적합하다고 하였다. 배아를 이용한 젤리의 경우에도 첨가량을 증가시켜도 겔의 경도, 점성, 응집성 등에 큰 영향을 미치지 않으므로 겔화제로 한천을 이용하는 것이 더 적당하리라 생각된다.

Table 130. Textural properties of Jelly with Gelatin, Chinese herbal extracts and Rice embryo

	Hardness (g/cm <sup>2</sup> )	Adhesiveness (g)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
G0	849.54±461.47 <sup>b</sup>	-23.47±1.26 <sup>b</sup>	0.64±0.21 <sup>b</sup>	0.43±0.01 <sup>NS</sup>	253.25±56.74 <sup>ab</sup>	95.72±6.04 <sup>b</sup>
G5	853.70±193.60 <sup>b</sup>	-33.04±7.30 <sup>a</sup>	0.65±0.10 <sup>b</sup>	0.47±0.02	305.78±65.29 <sup>b</sup>	162.25±19.48 <sup>c</sup>
G10	573.60±53.53 <sup>ab</sup>	-32.82±3.27 <sup>a</sup>	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.45±0.01	203.01±37.62 <sup>a</sup>	77.28±19.82 <sup>ab</sup>
G15	419.26±100.33 <sup>ab</sup>	-27.49±3.39 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>a</sup>	0.43±0.02	149.44±38.97 <sup>a</sup>	45.72±13.57 <sup>a</sup>
G20	375.40±5.62 <sup>a</sup>	-33.67±5.71 <sup>a</sup>	0.39±0.04 <sup>a</sup>	0.45±0.01	142.95±4.90 <sup>a</sup>	50.90±9.62 <sup>a</sup>

\* G0 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin  
 G5 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 5% Rice embryo  
 G10 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 10% Rice embryo  
 G15 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 15% Rice embryo  
 G20 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 20% Rice embryo

Mean±SD

Means with different superscript within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test

Table 131. Textural properties of Jelly with Gelatin, Chinese herbal extracts and Rice embryo

	Hardness (g/cm <sup>2</sup> )	Adhesiveness (g)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
A0	547.73±136.92 <sup>ab</sup>	-4.70±1.43 <sup>NS</sup>	0.28±0.04 <sup>NS</sup>	0.11±0.02 <sup>NS</sup>	54.90±16.91 <sup>ab</sup>	12.66±8.36 <sup>NS</sup>
A5	625.04±148.60 <sup>b</sup>	-5.65±3.22	0.33±0.02	0.13±0.01	72.90±25.60 <sup>ab</sup>	17.78±7.72
A10	635.71± 38.98 <sup>b</sup>	-9.21±5.30	0.32±0.04	0.14±0.01	83.64±14.75 <sup>b</sup>	17.72±2.90
A15	567.30±160.92 <sup>ab</sup>	-10.60±3.14	0.30±0.03	0.13±0.02	73.00±20.04 <sup>ab</sup>	15.81±8.75
A20	393.83±81.22 <sup>a</sup>	-10.61±2.37	0.27±0.02	0.10±0.01	43.70±23.35 <sup>a</sup>	7.10±4.37

\* A0 : 1% Chinese herbal extract + Agar  
 A5 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 5% Rice embryo  
 A10 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 10% Rice embryo  
 A15 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 15% Rice embryo  
 A20 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 20% Rice embryo

Mean±SD

Means with different superscript within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test

(나) 관능적 특성

헛개나무열매, 택사, 감잎, 뽕나무, 영실, 동규자 열수 추출 혼합물 1%와 배아 첨가량을 달리하여 제조한 젤라틴 배아젤리와 한천 배아젤리의 관능적 특성은 Table 132, Table 133에 나타내었다.

젤라틴 배아젤리의 경우, 색상은 배아 무첨가군에서 15% 첨가군까지 차이가 없었고 배아 20% 첨가군이 가장 높은 점수를 받았다. 한약재를 첨가한 상태여서는 배아의 첨가량이 15%까지 증가하여도 관능적으로 평가되는 색상은 유의하지 않은 것 같다. 향미는 배아 무첨가군과 첨가군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 맛은 배아 무첨가군보다 첨가군들이 모두 높은 점수를 받았고 특히 배아 5% 첨가군은  $3.5 \pm 0.92$ 로  $2.5 \pm 1.17$ 인 무첨가군보다 유의적으로 높은 점수를 받았다. 질감은 군간 유의적인 차이는 없었지만 미강을 첨가하면서 다소 씹히는 질감이 나타나지만 첨가량에는 무관한 것으로 보인다. 전반적인 기호도에서는 군간 유의적인 차이는 없었지만 5% 첨가군이 가장 높은 점수를 받았고 첨가량이 많아지면 기호도는 오히려 감소하였다. 한천젤리의 경우, 모든 항목에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 질감을 제외하고는 색상, 향미, 맛 그리고 전반적인 기호도에서 배아 무첨가군보다는 배아 첨가군들이 높은 점수를 받았고 특히 배아 10% 첨가군이 색상, 맛, 질감, 전반적인 기호도에서 다소 높은 점수를 받은 경향이 나타났다. 이상의 결과로 보아 한약재 추출 혼합물만 사용하는 경우보다 배아를 함께 사용하면 관능적인 특성들이 증가한다고 볼 수 있으며, 젤라틴 배아젤리의 경우 5%, 한천 배아젤리의 경우 10% 정도를 첨가하는 것이 가장 적당하였는데 물성 측정의 결과와 일치한다고 볼 수 있다.

Table 132. Sensory evaluation of Jelly with Gelatin, Chinese herbal extracts and Rice embryo

Sample*	Color	Flavor	Taste	Toughness	Overall preference
G0	2.60±0.74 <sup>a</sup>	2.50±0.48 <sup>NS</sup>	2.40±1.05 <sup>a</sup>	2.90±1.15 <sup>NS</sup>	2.60±1.22 <sup>NS</sup>
G5	2.60±0.82 <sup>a</sup>	2.50±0.84	3.40±1.90 <sup>b</sup>	3.50±1.04	3.10±1.16
G10	2.80±0.73 <sup>ab</sup>	2.20±0.64	3.00±0.65 <sup>ab</sup>	3.50±1.05	3.00±1.00
G15	2.50±0.61 <sup>a</sup>	2.70±0.75	2.70±0.80 <sup>ab</sup>	3.50±1.17	2.40±0.72
G20	3.50±1.07 <sup>b</sup>	2.60±0.72	3.20±1.00 <sup>ab</sup>	3.40±1.07	2.80±0.65

\*G0 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin

G5 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 5% Rice embryo

G10 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 10% Rice embryo

G15 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 15% Rice embryo

G20 : 1% Chinese herbal extract + Gelatin + 20% Rice embryo

Mean±SD

Means with different superscript within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test

Table 133. Sensory evaluation of Jelly with Agar, Chinese herbal extracts and Rice embryo

Sample*	Color	Flavor	Taste	Toughness	Overall preference
A0	2.50±0.99 <sup>NS</sup>	2.30±0.81 <sup>NS</sup>	2.90±1.07 <sup>NS</sup>	2.30±0.91 <sup>NS</sup>	2.50±1.22 <sup>NS</sup>
A5	3.20±0.83	2.70±0.50	3.40±1.17	2.30±1.05	3.30±1.09
A10	3.20±0.54	2.60±0.72	3.70±0.82	2.80±0.91	3.30±0.78
A15	3.40±1.05	2.60±0.69	3.60±1.17	2.30±1.17	2.90±0.96
A20	3.10±1.16	2.50±0.94	3.50±1.03	2.60±0.78	3.10±1.22

\*A0 : 1% Chinese herbal extract + Agar

A5 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 5% Rice embryo

A10 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 10% Rice embryo

A15 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 15% Rice embryo

A20 : 1% Chinese herbal extract + Agar + 20% Rice embryo

Mean±SD

Means with different superscript within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple-range test

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 목표달성도

미강을 활용한 건강기능성 식품을 개발하고자 미강의 유용성분을 효율적으로 추출 및 분리할 수 있는 공정을 확립하고 추출물의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능을 검증하여 기능성을 확인 및 쌀가공 식품을 개발하여 미강의 고부가가치화를 실현할 수 있는 기술 및 제품을 개발하고자 하였다.

미강의 식이섬유인 헤미셀룰로오스 및  $\beta$ -glucan과 미강함유 지용성성분인 octacosanol,  $\gamma$ -oryzanol 및 ferulic acid의 함량 분석을 실시하였으며, 추출공정에 따른 추출물의 특성 및 함량 분석을 한 결과, 미강의 유용성분을 효율적으로 추출할 수 있는 공정을 확립할 수 있었다. 아울러 최적 추출조건에서 추출된 미강추출물을 효과적으로 섭취하기 위하여 과립, 타블렛 제품을 제조한 후 품질 특성을 조사하였다.

산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발의 일환으로 목재인자별 기능성 성분의 효율적인 추출조건 탐색하고 물리적/화학적 성분 분석을 수행하였다. 그리고 원료물질의 효율적인 전처리기술 도출 및 추출기술 확립으로서 세부적으로는, 식약청 허가가 있는 식품사용 가능한 생약소재의 선발, 수증기처리에 의한 목재추출물의 성분분석, 효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출이다. 본 연구내용은 전부 실행 완성하였다. 여기에 추가적으로 목재추출물의 생약기능을 검증하기 위해 생활대사성 질환과 관련한 동물실험을 통하여, 심혈관계 질환예방에 효과가 좋고 면역활성기능이 뛰어나다는 중요한 결과를 얻었다는 점에서 본 연구결과물은 매우 의미 깊다고 하겠다. 따라서 기능성 식품첨가물 생약소재 및 의약품 원료로서의 개발이 추가적으로 기대된다는 점에서 연구내용면에서의 목표 달성도는 충분하다고 판단된다.

미강 추출물 및 한약재 추출물의 기능성을 확인한 결과  $\gamma$ -oryzanol은 생체발생 종양을 억제하는데 효과가 있는 반면, phytic acid 피부부종의 억제에 효과적이었다. 또한 왕겨 탄화물도 피부부종을 억제하는 강한 활성을 보유하고 있었다. 조사한 한약재 중 광향은 세균 내독소인 LPS 수준으로 대식세포의 NO발생을 유도하였다. 또한 광향의 열수추출물은 생쥐의 Salmonellosis 실험계에서 세균감염으로 인한 치사율을 획기적으로 저하시켰다.

흑미 색소 추출물의 기능성을 확인하고 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 흑미 색소 추출물과 배아를 떡 및 한과에 적용하여 쌀가공품을 제조하였다. 또한 한약재 열수추출물들의 혼합사용에 의한 떡 및 한과 제조 시 기본반죽에의 활용 및 부산물(고물소 등)로서의 활용화 방법 개발하였다.



1차년도(2007)

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
제1세부	미강함유 식이섬유인 헤미셀룰로오스 및 $\beta$ -glucan의 함량 분석 및 최적추출조건 확립	일반성분 및 유리아미노산 함량 측정 분석	100%
		헤미셀룰로오스 최적추출공정 수립	100%
		수율, Xy/Ara ratio, 우론산, $\beta$ -glucan 및 총당 함량 분석	100%
제2세부	목재성분의 효율적인 추출조건 탐색	가능성 물질추출을 위한 전처리조건을 수증기압력과 처리온도별로 목재를 처리실험	100%
제3세부	대식세포에 대한 활성화 (활성산소종, NO생성 및 포식작용) 조절능력의 평가	미강 및 목재추출물에 의하여 대식세포의 활성 산소종 및 NO발생의 감소 및 포식작용의 증가가 유의한 수준인지의 여부	100%
	비만세포의 탈과립 억제활성 평가	탈과립의 지표로서 히스타민과 $\beta$ -hexosaminidase 어느 한편의 방출도가 미강 및 목재추출물에 의하여 대조구에 비하여 유의하게 감소하는지 여부	100%
	암세포 살해능 평가	미강 및 목재추출물 처리가 돌연변이 및 종양축진단계에 대한 억제활성을 측정하고 암세포를 유의하게 살해하는지 여부	100%
	세포독성의 측정	미강 및 목재추출물의 지시세포에 세포독성이 있는지 여부	100%
제4세부	미강과 유색미 색소추출분획의 혼합사용에 의한 떡 및 한과 제조시 기본 반죽에의 활용화 방법 개발	흑미 탈지 미강으로부터 색소분획의 추출	100%
		흑미 색소분획 첨가에 의한 도병 제조시 가공적성 검정	100%
	미강과 유색미 색소추출 분획 혼합 사용에 의한 떡 및 한과 제조시 부재료(고물, 소)로서의 활용법 개발 및 가공적성 검정	미강으로부터 배아의 분리	100%
		흑미 색소분획 및 배아의 떡 및 한과 제조시 부재료(고물, 소)로서의 가공적성 검정	100%

2차년도(2008)

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
제1세부	미강함유 지용성성분인 octacosanol, $\gamma$ -oryzanol 및 ferulic acid의 함량 조성 분석	지용성 성분 최적추출공정 수립	100%
		Ferulic acid, $\gamma$ -oryzanol, 및 octacosanol 함량 분석	100%
		지용성 분획물의 전처리	100%
제2세부	전처리 소재물질의 물리적, 화학적 성분분석	베이스 화합물의 화학적 조성분석	100%
		탄수화물 조성분석	100%
		휘발성 성분 분석	100%
제3세부	미강 기능성분획별 대식세포 활성화 조절능의 평가	미강 추출물중 기능성분획이 대식세포주 및 복강대식세포의 기능(항산화, 포식작용, cytokine 분비)를 유의하게 향진시키는지 여부	100%
	미강 기능성분획별 비만세포 활성화 조절능의 평가	미강 추출물중 기능성분획이 비만세포주 및 복강비만세포의 기능(히스타민 및 $\beta$ -hexosa minidase 탈과립, 염증cytokine분비)를 유의하게 억제시키는지 여부	100%
	목재추출물 및 왕겨추출물의 대식세포 NO생성 및 비만세포 탈과립 억제활성 평가	목재추출물 및 왕겨추출물이 대식세포의 NO 생성 및 비만세포의 탈과립을 억제하는지 여부	100%
	목재추출물 및 왕겨추출물에 의한 생체 내 피부부종 억제 효과의 평가	실험동물계에서 기능성 소재의 식이가 피부부종 및 생체 대식세포, 비만세포의 활성화를 유의하게 억제하는지 여부	100%
제4세부	떡 및 한과 제조시 부재료(고물, 소)의 동물실험에 의한 지	미강과 유색미 색소추출 분획혼합 사용에 의해 제	100%

	질 및 당질대사 개선효능 검정	조되는 떡고물 및 소의 동물식이로의 급여에 의한 지질 및 당질대사 개선효능 여부를 검정하였음	
	헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실 동규자 열수 추출물의 동물 실험에 의한 간장 및 신장 조직 개선 효능 검정	사염화 탄소 처리에 의해서 손상된 실험동물의 간장 및 신장 조직이 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실 동규자등의 열수 추출물의 급여에 의한 실험동물의 간장 및 신장 조직 개선 효능 여부를 검증하였음	100%

3차년도(2009)

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
제1세부	추출물을 이용한 다양한 형태의 제품개발	가공제품(초미립 분말, 과립형, 타블렛)의 제조	80%
		가공제품의 품질 특성 측정	100%
제2세부	식품사용 가능한 생약소재의 선발	연구계획의 성취도	100%
	수증기처리에 의한 추출물의 성분분석	연구결과의 명확성	
	효율적인 추출을 위한 수증기처리 공정의 도출	개발 제품의 실용성 예산집행의 정확성	
제3세부	미강 기능성분획별 생체내 이식 종양에 대한 억제활성의 평가	미강 기능성분획의 식이가 종양이식 생쥐에서 형성된 종양이 유의하게 퇴행시키고 종양관련된 세포 및 종양조직의 생화학적 변화가 유의하게 발생하는가 여부	100%
	한약재의 대식세포 NO 활성 조절효과의 측정	대식세포의 NO 생성을 억제하거나 또는 증진시키는 한약재의 선발여부	100%
	한약재 추출물의 세균감염에 대한 억제활성 평가	Salmonellosis 모델의 실험 동물에서 한약재 추출물의	100%

		투여가 내재면역계의 활성화를 통하여 개체의 치사율을 저하시키는지의 여부	
제4세부	한약재 열수추출물 혼합 사용에 의한 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품제조 및 가공적성 검정	질환별 맞춤형 쌀가공 식품 제조 여부	100 %
	만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 건강기능성 식품 및 쌀가공 기능성 식품의 상품화		

## 제2절 관련분야에의 기여도

점차 각종 첨가물에 대한 국제적인 규제가 엄격해지면서 식품이나 의약품에 천연물 이외에는 첨가 허용이 더욱 제한될 것으로 전망되며 식품 또는 의약품의 식품첨가물로서 천연물의 이용가치는 더욱 높아질 것이다.

미강은 미곡 정제과정에서 발생하는 것으로 생리활성성분이 풍부함에도 불구하고 사료 및 비료로 이용되거나 대부분은 폐기되고 있는 실정이다. 하지만 미강의 만성대사성 및 염증성 질환에 대한 효능이 구명됨으로써 의약산업의 소재로 자리매김하게 될 것이며, 아울러 주곡작물인 쌀의 새로운 부가가치 창출 및 국민보건 증진을 기대할 수 있다.

미강의 생리활성성분의 기능성을 확인하고 성분의 추출공정을 확립함으로써 식품산업 및 의약산업등의 관련산업의 부가가치 창출에 기여할 수 있다. 또한 폐자원에서 건강기능성 소재의 발굴, 기능성 성분의 효과적 추출방법의 확립, 그리고 기호성이 높은 식품의 개발과 더불어 생리활성에 대한 적절한 평가법을 적용한 기능성 및 안전성의 표준화에 기여할 수 있다.

국산목재를 재료로 하여 추출물로서 생활대사성 질환예방용으로 생약제제화 할 수 있는 것이라면 임산업분야뿐만 아니라 식품관련분야에도 매우 유익한 연구결과가 될 것으로 판단된다. 지금까지 목재는 건축용, 토목용, 조경용, 가구용 소재로 주로 이용되어 왔고, 고부가가치화할 수 있는 식품가공분야쪽으로는 거의 연구가 되지 못한 것이 사실이다. 이에 국산 활엽수 참나무를 이용하여 수분과 열을 이용한 고도 추출기술에 의해, 그 유효성분을 사람들의 신체 대사에서 생기는 질병 예방용 건강 식품원료로 이용될 수 있다면 그 가치는 매우 클 것이다. 본 연구에서는 고분자 리그노셀룰로오스 물질의 저분자 분해에 의해 사람이 먹을 수 있는 식품첨가물로 개발한 것이 주 요점이다. 또한 동맥경화 및 암전이, 면역활성 증가, 항당뇨 효과 등, 그 성능을 동물실험으로 명확하게 밝혔으며, 프랑스 식품회사의 자료들을 인용하여 국산 참나무 추출물을 식품 첨가물로서 활용가능하도록 식품의약품안전청의 허가를 취득한 것은 매우 뜻깊은 일이 아닐 수 없다. 위스키나 와인, 브랜드의

향과 맛은 참나무 추출물에 의한 것이고 수백년간 사람들이 애용해 온 식품이다. 외국산 참나무나 국산 참나무의 근본 성분에 차이가 없으며, 용매추출에 의한 성분의 이용은 안전성에 있어서 문제시될 것이 없기에 국산 참나무 6수종 중 3수종(졸참, 상수리, 신갈나무)에 대해 식품첨가물로서 식용허가를 얻을 수 있었다. 앞으로 본 추출기술을 이용하건, 추출물을 이용하여 식품이외의 화학공정에 적용하거나 식품첨가물 산업에 응용하여 적용한다면 고부가 소재로서의 활용도 가능할 것으로 판단되어지기에 관련분야의 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되어진다. 특히 기능성 식품원료 등의 고부가 생약소재로서의 활용을 도모함과 동시에, 목재추출물이 항동맥경화 등 심혈관질환 예방물질 및 항당뇨와 관련한 면역활성에 기여하는 점을 확인한 바, 항산화 식품첨가물 원료 및 의약품소재로서의 적용은 장래 그 가치가 충분하다고 판단된다.

미강을 활용한 쌀가공 제품을 제조하여 성대사성/염증증식성 질환에 대한 효능을 확인하여 쌀의 적극적인 이용의 일환으로 질환 맞춤형 쌀가공 식품을 개발하였다는 데 의의가 있으며 식품산업에서 효용가치를 극대화시켜 가치 창출에 기여할 것으로 사료된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 미강의 식이섬유 헤미셀룰로오스와 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol 및 octacosanol과 같은 지용성 생리활성 물질의 추출공정을 확립함으로써, 다른 식품첨가물 및 의약품소재를 개발하기 위한 선행 자료로서의 활용 및 응용 제품도 개발 할 수 있리라 생각되며 폐자원이었던 미강소재가 고부가가치화할 수 있게 되리라 사료된다.
- 참나무의 페놀성 화합물의 분해 및 고분자 물질의 저분자화 추출기술에 의한 목재추출물의 대량생산 방법 및 기능식품의 첨가물로서의 체제를 개발하고 항동맥경화 등 심혈관질환 예방물질 및 항당뇨와 관련한 면역활성에 기여하는 항산화 식품첨가물 원료 및 의약품소재를 개발하였다. 본 연구에 의한 새로운 심혈관질환 예방물질은, 의약품 수입원료의 20%를 대체한다고 가정할 경우, 100억원 이상의 수입 대체효과가 기대된다. 특히 생약제재 물질의 작용기작에 대한 과학적 입증이 뒷받침되면, 동양 의학에 대한 관심이 고조되고 있는 미국을 비롯한 해외시장으로의 수출도 가능하리라 보며, 이들 시장이 증가할수록 이들 산업체의 소득증대도 기대된다. 이 기술을 토대로 다른 의약품 및 건강기능성식품 개발에도 응용하여 고부가가치를 가지는 상품을 개발할 수 있는 기틀을 마련할 수 있을 것이다. 목재원료는 식품원료로의 식약청허가의 어려움으로 인해 동의보감에 나와있는 식용가능 생약재에 대해 저분자화에 의한 고부가 식품원료로서의 연구를 해 볼 가치가 있을 것으로 판단된다. 아울러 앞으로 내용을 정리하여 논문을 더 투고할 예정이며, 특허는 면역활성에 대한 유사특허의 공개로 기각된 상태이나 산업재산권을 확보할 수 있는 방법을 모색 중이다.
- 쌀도정 부산물인 미강의 주요 조성분인 ferulic acid,  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol과 phytic acid 중,  $\gamma$ -oryzanol은 생체발생 종양을 억제하는데 효과가 있는 반면, phytic acid 피부부종의 억제에 효과적이었다. 또한 왕겨 탄화물도 피부부종을 억제하는 강한 활성을 보유하고 있었다. 조사한 한약재 중 광향은 세균 내독소인 LPS 수준으로 대식세포의 NO발생을 유도하였다. 광향의 열수추출물은 생쥐의 Salmonellosis 실험계에서 세균감염으로 인한 치사율을 획기적으로 저하시켰다. 이 결과는  $\gamma$ -oryzanol과 같은 미강 생리활성성분이나 광향 열수추출물이 항암 또는 항세균감염증과 같은 건강기능성을 식품에 부여하는 첨가물로 활용될 수 있음을 나타낸다.
- 헛개열매, 택사, 감잎, 상지, 영실, 동규자등 한약재 열수추출물들의 혼합사용에

의한 떡 및 한과 제조 시 기본반죽에의 활용 및 부산물(고물소 등)로서의 활용  
화 방법 개발하였다. 산업화에 성공할 경우 손상장기 회복효과가 우수한 건강  
기능성 쌀가공 식품으로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

- 추출공정 및 가공식품 제조와 관련된 특허 출원 및 논문게재로 국내 기술 보호  
와 기타 가공식품으로의 적용이 가능할 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가까운 일본을 비롯한 선진국에서 참나무 추출물의 성분, 수종별 차이점 등에 대한 연구 등을 해 왔으며, 참나무의 페놀성 화합물, VOC에 대한 연구들도 많이 있다. 보고된 연구에 의하면 참나무의 성분에 대해서는 지역별 차이가 없다고 한다(예시논문참조)

### 1. Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian [oak chips](#).

E. Guchu, M.C. Di'az-Maroto \*, M.S. Pe'rez-Coello, M.A. Gonza'lez-Vin'as, M.D. Cabezudo Iba'n'z

Toasted or non-toasted chips of oak woods of different geographical provenances were macerated in Chardonnay wines (4 g/l) during a period of 25 days. Toasting of the oaks increased the quantities of the compounds derived from the thermal degradation of lignin: vanillin, eugenol, guaiacol and its derivatives and the pyrolysis of cellulose and hemicellulose: furfural and 5-methyl furfural, and decreased the concentrations of the two isomers of oak lactones.

**Keywords:** Oak chips; Volatile compounds; Sensory analysis

### 2. Analysis for low molecular weight [phenolic compounds](#) in a red wine aged in oak chips

M. del Alamo Sanza a,\*, I. Nevares Dom'inguez b, L.M. C'rcel C'rcel b, L. Navas Gracia b

The evolution of low molecular weight polyphenols in a red wine aging in different systems (barrels, oak chips and oak staves) made of different oak species was studied. The discriminant analysis showed that samples of the same source wine aged in barrels, oak chips and oak staves tended to group together according to the aging system when wood from different botanical species is used (American, French or Hungarian).

**Keywords:** Aging system; Barrel; Chips; Low molecular weight polyphenol; Red wines; Staves

### 3. Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods Anthocyanin composition

M. Del Alamo Sanza a,\*D, I. Nevares Dom'inguez b

A red wine evolution, Cigales appellation of origin, was studied during its storage in bottle after have been aged with three different systems (barrels, chips and staves) made of different kinds of oak wood (American, French and Hungarian). During the aging in bottle the wine previously treated in contact with oak chips and staves underwent a quicker aging, their loss of [anthocyanins](#) was also quick



ker and they suffered a higher number of polymerisations than the wine aged in barrels.

**Keywords:** Aging; Anthocyanin; Barrels; Bottle; Chips; Red wine; Staves

#### **4. Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by Accelerated Solvent Extraction (ASE) coupled to gas chromatography - mass spectrometry (GC - S)**

Stefania Vichi a,\*, Cecilia Santini b, Nadia Natali b, Claudio Riponi b, Elvira Lo'pez-Tamames a, Susana Buxaderas a Solvent Extractor (ASE) and analysed by gas chromatography - mass spectrometry. More than 90 compounds were isolated, characterised and quantified after being separated on two chromatographic columns with distinct polarity. The main oak wood components were quantitatively determined by using standard reference compounds. In addition, a number of compounds, mainly [guaiacol and syringol derivatives](#), were detected and characterised. In particular, 10 compounds were tentatively identified as lignin dimers derivatives, whose presence in oak wood chips or barrels for wine and spirits ageing had not been previously described. Several of the characterised compounds enabled a distinction to be drawn between medium and high toasted wood chips, independently of their geographical origin.

**Keywords:** Oak wood chips; Toasting; Volatile; Semi-volatile; Lignin dimers; Accelerated Solvent Extraction; ASE; Mass spectrometry

#### **5. Fast Screening Method for Volatile Compounds of Oak Wood Used for Aging Wines by Headspace SPME-GC-MS (SIM)**

M. CONSUELO DIÁZ-MAROTO,\* EVA SANCHEZ-PALOMO, AND M. SOLEDAD PEÑERAZ-COELLO

A headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method is proposed for analyzing the main [volatile components](#) from a sensory standpoint (furfural, oak lactones, eugenol, vanillin, and syringaldehyde) present in nontasted and tasted oak wood of different origins. To maximize the yield of compounds extracted from wood chips and to obtain a good precision of the method, the most important variables affecting HS-SPME have been studied. The best results were obtained when the sample was heated at 70 °C and the headspace extracted for 40 min with a DVB/CAR/PDMS fiber, which gave the overall best recovery. The values for the repeatability ranged from 6.4 to 7.8%, and those for the reproducibility from 5.4 to 8.7%. The precision of the results obtained makes the proposed technique appropriate for its use in characterizing oak wood samples of different origins and in the selection of the most suitable oak wood to age wines and spirits, on the basis of the chemical composition of the wood samples.

**KEYWORDS:** Oak wood; wine; volatile compounds; SPME

## 6. Characterization of Volatiles in Extracts from Oak Chips Obtained by Accelerated Solvent Extraction (ASE)

NADIA NATALI, FABIO CHINNICI,\* AND CLAUDIO RIPONI

Department of Food Science, University of Bologna, Viale Fanin 40, 40127 Bologna, Italy Sixteen commercially available oak chips, differing in origin (French or American) and toasting level, were extracted by an accelerated solvent extraction method and characterized by their [volatile composition](#). About 80 compounds were identified and quantified, a great part of them from the thermodegradation of lignin and cellulose. One furanone (solerone) and two C-13 norisoprenoids (3-oxo- $\beta$ -ionol and a 3-oxoretro- $\beta$ -ionol isomer) were also tentatively identified and reported for the first time in toasted wood. The same data suggest that toasting level had the strongest influence on the volatile composition of chip samples. Phenyl ketones, volatile phenols, and some furanic compounds were the most influenced. On the other hand, [the influence of wood origin was found to be weaker](#).

**KEYWORDS:** Oak chips; GC-MS; ASE; wine; wood aging; volatile compounds

## 7. Effects of Manufactured Soluble Dietary Fiber from *Quercus mongolica* on Hepatic HMG-CoA Reductase and Lipoprotein Lipase Activities in Epididymal Adipose Tissue of Rats Fed High Cholesterol Diets

Young-Mi Chai,<sup>1</sup> Bu-Kug Lim,<sup>2</sup> Jong-Yoon Lee,<sup>2</sup> Mu-Nam Kim,<sup>3</sup> Mo-Ra Park,<sup>4</sup> and Soon-Jae Rhee<sup>1</sup>

This study investigated the effect of a manufactured soluble [dietary fiber on lipid metabolism](#) in rats fed high cholesterol diets. Soluble dietary fiber was prepared from wood chips of oak (*Quercus mongolica*). Male Sprague-Dawley rats weighing 100–110 g were randomly assigned to either a normal diet or five high cholesterol diets containing 1% cholesterol and different fiber supplements. The high-density lipoprotein-cholesterol concentration in the FF group was significantly lower, compared with the normal group, but was increased in groups supplemented with soluble dietary fiber.

**KEY WORDS:** *high cholesterol diet . HMG-CoA reductase . lipoprotein lipase . manufactured soluble dietary fiber*

## 8. Analysis of French and American oak chips with different toasting degrees by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry

Ruth Bozalongo, José David Carrillo, Miguel Ángel Fernández Torroba, María Teresa Tena

This paper describes the optimisation of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) conditions for the analysis of [volatile compounds](#) in oak chips used to accelerate wine aging as an alternative to traditional aging in oak barrels.

The direct extraction of ground wood samples and the extraction of sample aqueous slurries using a divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) fibre were studied and compared. Principal component analysis (PCA) of the results showed that the first principal component was correlated with the toasting degree whereas the second, which was strongly influenced by whisky lactones and eugenol, allowed us to differentiate between American and French oak chips.

**Keywords:** Oak chips; Solid-phase microextraction; Volatile compounds; SPME; GC - S

## 제 7 장 참고문헌

### 제1절 미강의 건강 기능성식품 소재화 기술개발

- (1) A.O.A.C. Official method of analysis 15th Ed. Association of official Analytical Chemists, Washington D.C. (1990)
- (2) Morrison IM. Changes in the hemicellulosic polysaccharides of ryegrass with increasing maturity. *Carbohydrate Research*. 36:45-51 (1974)
- (3) Morrison IM. Changes in the lignin and hemicellulose concentration of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass and Forage Science* 35:287-293 (1980)
- (4) Juliano BO. Rice bran. In *Rice. Chemistry and technology*. 2nd ed. Julian BO, ed. American Association of Cereal Chemist, Inc., St. Paul MN. p 647. (1985)
- (5) Xu F, Sun JX, Geng ZC, Liu CF, Ren JL, Sun RC, Fowler P, Baird MS. Comparative study of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). *Carbohydrate polymers*. 67:56-65 (2007)
- (6) 박성현, 최병철 : SPSS와 SAS분석을 통한 실험계획법의 이해. 민영사 (2005)
- (7) SAS. SAS/STAT. 1995. User's Guide version 6, 4th de., *SAS Institute Inc.* Cary, NC, USA Ch. 37 (vol. 2). Pp. 14-5
- (8) Kim EH, Kim JY, Park CK, Maeng YS. Determination of Dietary Contents in Dodok(*Codonopsis lanceolata* traut (Beneth et Hook)) and Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korea J. Soc. Food Sci.* 8(3):247-253 (1992)
- (9) Englyst H, Wiggins HS, Cummings JH. Determination of the nonstarch polysaccharide in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 107:307 (1982)
- (10) Filistti-Cozzi, T.M.C.C. and Carpita, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197:157-162 (1991)
- (11) AACC (American Association of Cereal Chemists). 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Method 32-23: Measurement of  $\beta$ -glucan in Barley and Oats Rapid Enzymatic Procedure. AACC. St. Paul, Minn
- (12) AOAC Int. (Association of Official Analytical Chemists International). 2000. AOAC Official Method 995.16:  $\beta$ -D-glucan in Barely and Oats. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- (13) McCleary BV, Codd R. Measurement of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan in barely

- and oats: A streamlined enzymic procedure. *J. Sci. Food Agric.* 55:303-312 (1991)
- (14) Dubios MKA, Hamilton TK, Rebers PA and Sonisth F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- (15) Kim SR, AhnJY, Lee HY, Ha TY. Various propertied and phenolics acid contents of rice and rice bran with different milling fractions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(6):930-936 (2004)
- (16) Lee MY, Kim MK, Shin JG, Kim SD. Dietary effects of hemicellulose from soy fiber on blood glucose and cholesterol content in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33(7):1119-1125 (2004)
- (17) Izydorczyk MS, Maric LJ, Macgergor AW. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides- I. Water-extractable  $\beta$ -glucans and arabinoxylans. *Carbohyr. Polym.* 35:249-258 (1998)
- (18) Izydorczyk MS, Maric LJ, Macgergor AW. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides- I. Alkali-extractable  $\beta$ -glucans and arabinoxylans. *Carbohyr. Polym.* 35:259-269 (1998)
- (19) Vinkx CJA, Reynaert HR, Grobet PJ, Delcour JA. Physicochemical and functional properties of rye non starch polysaccharides. V. Variability in the structure of water-soluble arabinoxylans. *Cereal Chem.* 70:311-317 (1993)
- (20) Vinkx CJA, Stevens I, Gruppen H, Grobet PJ, Delcour JA. Physicochemical and functional properties of rye non starch polysaccharides. VI. Variability in the structure of water-insoluble arabinoxylans. *Cereal Chem.* 72:411-418 (1995)
- (21) Roubroeks JP, Andersson R, Ama P. Structural features of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers* 42:3-1 (2000)
- (22) Kim EH, Maeng YS, Woo SJ. Analysis of nonstarch-polysaccharides in some Korean foods. *Korea J. Food Sci. Technol.* 25(4):299-306 (1993)
- (23) Han JY. Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt and beer. *Food Chemistry* 70:131-138 (2000)
- (24) Hwang JK, Kim CT, Cho SJ, Kim CJ. Characteristics of water soluble fractions of wheat bran treated with various thermal processes. *Korea J. Food Sci. Technol.* 27(6):934-938 (1995)
- (25) Lee HS, Kweon MH, Lim WJ, Sung HC, Yang HC. An anticoagulant polysaccharide isolated from the alkali extracts of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29(2):369-375 (1997)

- (26) Whistler RL. Solubility of polysaccharides and their behavior in solution. *Advances in Chemistry Series*, 117:242-255 (1973)
- (27) Cordenusi BR, Shiga TM, Lajolon F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicao). *Carbohydrate Polymers* 71:26-31 (2008)
- (28) Ren JL, Sun RC, Liu CF, Chao ZY, Luo W. Two-step preparation and thermal characterization of cationic 2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride hemicellulose polymers from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability* 91:2579-2587 (2006)
- (29) Lloyd, B. J. Sievenmorgen, T. J., Beers, K. W. (2000) Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.*, 77, 551-555
- (30) Kim, Y. S., Park, S. R., Lee, Y. S., Jung, H., Koh, K. H., Kim, H. S. (2005) Determination of tocopherol and tocotrienol contents in rice cooked with various cereals. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 1289-1292
- (31) Renuka, D. and Arumughan, C. (2007) Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour. Technol.*, 98, 3037 - 043
- (32) Xu, Z., Hua, N. and Godber, J.S. (2000) Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 547-551
- (33) Britz, S. J., Prasad, P. V. V., Moreau, R. A., Allen, L. H., Kremer, D. F., & Boote, K. J. (2007). Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol in brown rice. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7559 - 7565
- (34) Lilitchan, S., Tangprawwat, C., Aryasuk, K., Krisnangkura, S., Chokmoh, S., Krisnangkura, K. (2008) Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and  $\gamma$ -oryzanol contents in rice bran. *Food Chem.*, 106, 752 - 59
- (35) Park, K.Y., Kang, C.S., Cho, Y.C., Lee, Y.S., Lee, Y.H., Lee, Y.S. (2003) Genotypic Difference in Tocopherol and Tocotrienol Contents of Rice Bran. *Korean J. Crop Sci.*, 48, 469-472
- (36) Irmak, S., Jonnala, R. S., MacRitchie, F. (2008) Effect of genetic variation on phenolic acid and policosanols contents of Pegaso wheat lines. *J Cereal Sci.*, 48, 20 - 26
- (37) Park, S.J., Hong, J.H., Youn, K.S., Choi, Y.H. (2006) Form Manufacturing and Quality Characteristics using Extracts from *Hericium erinaceus*. *Korean J. Food Preserv.* 13:569-573
- (38) Saha, S.K. and Brewer, C.F. (1994) Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.*, 254, 157-167.

## 제2절 산림자원을 이용한 기능성 식품첨가물 소재화 기술개발

- (39) Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D., Beliveau, R. 2000. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1478, 51-60.
- (40) Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., Kim, C.H., 2004b. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB Journal* 18(14), 1670-1681.
- (41) Ha, K.T., Kim, J.K., Lee, Y.C., Kim, C.H., 2004a. Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200(1), 1-6.
- (42) Ross R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N. Engl. J. Med.* 314, 488-500.
- (43) Chamley-Campbell J., Campbell G. R., Ross R. (1979) The smooth muscle cells in culture. *Physiol. Rev.* 59, 1-61.
- (44) Schwartz R. S., Holmes D. R., Topol E. J. (1992) The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 1284-1293.
- (45) Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- (46) Matrisian L. M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends. Genet.* 6, 121-125.
- (47) Sasaguri Y., Murahashi N., Sugama K., Kato S., Hiraoka K., Satoh T., Isomoto H., and Morimatsu M (1994) Development-related changes in matrix metalloproteinase expression in human aortic smooth muscle cells. *Lab. Invest.* 71, 261-269.
- (48) Galis Z. S., Muszynski M., Sukhova G. K., Simon-Morrissey E., Unemori E. N., Lark M. W., Amento E., and Libby P. (1994) Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* 75, 181-189.
- (49) Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW (1994) Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ. Res.* 75, 650-658.
- (50) Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G. 1999. Matrix metalloproteinases and

- metastasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 43, 42–51.
- (51) Woessner J. F. Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145–2154.
- (52) Chung, T.W., Lee, Y.C., Kim, C.H., 2004a. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB Journal* 18(10), 1123–1125.
- (53) Newby A. C., and Zaltsman A. B., (2000) Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J. Pathol.* 190, 300–309.
- (54) Galis, Z. S., Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J. M., Senior, R. M., and Ivan, E., (2002) Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ. Res.* 91, 852–859.
- (55) Moon, S. K., Cha, B. Y., and Kim, C. H., (2003a). ERK1/2 mediates TNF-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- $\kappa$ B and AP-1: involvement of the Ras dependent pathway. *J. Cell. Physiol.* In press.
- (56) Cho, A., Graves, J., and Reidy, M. A., (2000) Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2527–2532.
- (57) Moon, S. K., Cho, G. O., Jung, S. Y., Gal, S. W., Kwon, T. K., Lee, Y. C., Madamanchi, N. R., and Kim, C. H., (2003b). Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cellcycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1069–1078.
- (58) Moon S. K., Cha B. Y., and Kim C. H. (2003c) In vitro cellular aging is associated with enhanced proliferative capacity, G1 cell cycle modulation, and matrix metalloproteinase-9 regulation in mouse aortic smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 39–48.
- (59) Brew K., Dinakarpandian D., and Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477, 267–283.
- (60) Mandal M., Mandal A., Das S., Chakraborti T., and Sajal C. (2003) Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell. Biochem.* 252, 305–329.
- (61) Zempo N., Koyama N., Kenagy R. D., Lea H. J., and Clowes A. W. (1996) Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor.



- Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16, 28-33.
- (62) Bendeck M. P., Irvin C., Reidy M. A. (1996) Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ. Res.* 78,38-43.
- (63) Kenagy R. D., Vergel S., Mattsson E., Bendeck M., Reidy M. A., and Clowes A. W. (1996) The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1373-1382.
- (64) Fitzgerald M., Hayward I. P., Thomas A. C., Campbell G. R., and Campbell J. H. (1999) Matrix metalloproteinases can facilitate the heparanase-induced promotion of phenotypic change in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 145, 97-106.
- (65) Heber D. (2001) Herbs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 3, 93-96.
- (66) Kaegi, E. 1998. Unconventional therapies for cancer: 2. Green tea. The Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative. *Canadian Medical Association Journal* 158, 1033-1035.
- (67) Ha, K.T., Kim, J.K., Kang, S.K., Kim, D.W., Lee, Y.C., Kim, H.M., Kim, C.H., 2004c. Inhibitory effect of Sihoga-Yonggol-Moryo-Tang on matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and invasiveness potential of hepatocellular carcinoma. *Pharmacological Research* 50(3), 279-285.
- (68) Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., Kim, C.H., 2004b. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB Journal* 18(14), 1670-1681.
- (69) Kim, S-Y., Kang S-K, Lee D-G, Park Y-G, Lee Y-C, Chung, J-C., Kim, C. H. : Effect of Jindangwon on streptozotocin-induced diabetes, *Life Sciences*, 67:1251-1263, 2000.
- (70) Stanley, J. C., Dohm, G. L., McManus, B. S., Newsholm, E. A. : *Biochem. J.* 224:667-671, 1984.
- (71) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- (72) 杜鎬京 : 東醫腎系學(下), 東洋醫學研究院, pp.1142,1158, 1993.
- (73) Lenzen, S., Penten, U. : Glucokinase in pancreatic  $\beta$ -cell and its inhibition by alloxan, *Acta. Endocrinol.*, 115:21-29, 1987.
- (74) Lenzen, S., Tiedge, M., Penten, U. : Glibenclamide induced glucokinase in

rat pancreatic islets and liver, *Biol. Pharmacol.*, 35(16):2841-2843, 1986.

- (75) Meglasson, M. D., Burch, P. T., Bemer, P. K., Najafh, H., Marchisky, F. M. : Identification of glucokinase as the alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic  $\beta$ -cell, *Diabetes*, 35:1163-1173, 1986.

### 제3절 미강 활용 건강 기능성식품의 만성대사성/만성염증증식성 질환 억제효능 검증

- (76) Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6170-6182.
- (77) Albina JE, Henry Jr. WL. 1991. Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway. *J. Surg. Res.* **50**, 403-409.
- (78) Bogdan C. 2001. Nitric oxide and immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907-916.
- (79) Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H.J., Nam, S.H., Friedman, M., 2007. Antiallergenic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. *J. Food Sci.* **72**, 719-726.
- (80) Clancy R.M., Amin A.R., Abramsin S.B. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum.* **41**, 1141-1151
- (81) Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- (82) Flint, M.S., Tinkle, S.S., 2001. C57BL/6 mice are resistant to acute restraint modulation of cutaneous hypersensitivity. *Toxicol. Sci.* **62**, 250-256.
- (83) Fröde, T.S., Souza, G.E., Calixto, J.B., 2001. The modulatory role played by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the inflammatory responses induced by carraeenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine* **13**, 162-168.
- (84) Ghosh S. 1999. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Immunol. Res.* **19**, 183-189.
- (85) Ha, H.Y., Kim, Y., Ryoo, Z.Y., Kim, T.Y., 2006. Inhibition of the TPA-induced cutaneous inflammation and hyperplasia by EC-SOD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 450-458.
- (86) Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Kozukue, N., Friedman, M., 2005. Antioxidative, antimutagenic and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 816-822.
- (87) Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H.J., Kozukue, N., Friedman, M., 2006. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chem.* **94**, 613-620.

- (88) Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Marquez, J.C., 2003. Prevention of brain protein and lipid peroxidation elicited by water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. *European J. Nutr.* **42**, 307-314.
- (89) Wulkzyn F.G., Krappmann D., Scheidereit C. 1996. The NF- $\kappa$ B/Rel and IB gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* **74**, 749-769.
- (90) Zhang G.L., Wang Y.E., Teng H.L., Lin Z.B. 2001. Effects of aminoguanidine on nitric oxide production induced by inflammatory cytokines and endotoxin in cultured rat hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* **7**, 331-334.

#### 제4절 만성대사성/염증증식성 질환별 맞춤형 쌀가공 식품의 상품화

##### 1. 흑미미강 색소추출물 활용에 의한 미강의 산패억제 효과

AOAC (1990) Official Methods Analysis 15th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington DC USA.

Choi SW, Kang WW, Osawa T (1994) Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Food Biotechnol* 3: 131-135.

Choi SW, Nam SH, Choi HC (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotechnol* 5: 305-309.

Chung OK, Lorenz KJ, Kulp K (1991) Cereal lipids. In: *Handbook of cereal science and technology*. Marcel Dekker, New York. pp 497-553.

Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

Francis FJ (1992) A new group of food colorants. *Trends in Food Sci Tech* 3: 27.

Kang MY, Choi YH, Nam SH (1996) Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen mitomycin C. *Agri Chem Biotechnol* 39: 424-429.

Kim YB, Han WN, Yoo TJ (1985) Effect of rice weevil and mold on quality of stored rice. *Korean J Food Sci Technol* 17: 399-402.

- Kim JH, Kim MH, Kang MY (2006) Processibility aptitude of Dobyong with pigmented rice bran extract. Korean J Food Cookery Sci 22(6): 898-904.
- Kim JH, Nam SH, Kim MH, Sohn JK, Kang MY (2007) Cooking properties of Rice with black riceBran Extract Korean J Crop Sci 52(1): 60-68.
- Kim SR, Ahn JY, Lee HY, Ha TY (2004) Various properties and phenolic acid contents of rices and rice brans with different milling fractions. Korean J Food Sci Technol 36(6): 930-936.
- Luh BS, Barber B, Bendito BC (1991) Rice bran: chemistry and technology, in Rice Production 2nd ed. AVI, New York. pp 313.
- Moritaka S, Yasumatsu K. Studies on cereals. X (1972) The effect of sulfhydryl groups on storage deterioration of milled rice. Elyo To Shokuryo 25: 59-62.
- Muramoto G, Kawamura S (1991) Rice protein and antihypertensive peptide(angiotensin conversion enzyme inhibitor) from rice. Nippon Shokuhin Kogyo 34: 18-26.
- Nam SH, Kang MY(1997) In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. Agri Chem Biotechnol 40: 307-312.
- Nam SH, Kang MY (1998) Comparison of effect of rice bran extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. Agri Chem Biotechnol 41: 78-83.
- Nam SH, Cho SP, Kang MY, Koh HJ, Kozukue N, Friedman M(2006) Antioxidant activities of bran extracts from twenty one black ricecultivars. Food Chem 94: 613-620.
- Nike L, Adrien D, Dominique LD, Eric M, Yvan L, Marc M (2004) The oleate/palmitate ratio allows the distinction between whole meals of spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*T. aestivum* L.). J Cereal Sci 39: 413-415.
- Okada T, Yamaguchi N (1983) Antioxidant effect and pharmacology of oryzanol. Yukagaku 32 : 305.

Park KY, Kang CS, Cho YC, Lee YS, Lee YH, Lee YS (2003) Genotypic difference in tocopherol and tocotrienol contents of rice bran. Korean J Crop Sci 48(6): 469-472.

Serbinova EA, Packer L (1994) Antioxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol. Methods Enzymol 234 : 354-366.

Shin DH, Chung CK (1998) Chemical Composition of the Rice Germ from Rice Milling and its Oil Stability during Storage. Korean J Sci Technol 30: 241-243.

Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Kawakishi S, Choi SW, Osawa T (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. J Agric Food Chem 42: 2407-2411.

Yoon JM, Cho MH, Hahn TR, Paik YS, Yoon HH (1997) Physicochemical stability of anthocyanins from a Korean black rice variety as natural food colorants. Korean J Food Sci Technol 29(2): 211-217.

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Woo KJ (2006) Study on preparation and quality of jelly using mulberry leaf powder. Korean J Food Cookery Sci 22(1): 56-61.

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS (2007) A qualitative investigation of *Dongchunghacho* jelly with assorted increments of *Paecilomyces japonica* powder. Korean J Food Nutr 20(1): 40-46

## 2. 쌀가공 식품 제조용 부소재로써 미강의 활용

Choi SW, Kang WW, Osawa T (1994) Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. Food Biotechnol 3:131-135.

Choi SW, Nam SH, Choi HC (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. Food Biotechnol 5: 305-309.

Kang MY, Choi YH, Nam SH (1996) Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen mitomycin C. Agri Chem Biotechnol 39: 424-429.

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Woo KJ (2006) Study on preparation and quality of jelly using mulberry leaf powder. Korean J Food Cookery Sci 22(1): 56-61.

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS (2007) A qualitative investigation of *Dongchunghacho*

- jelly with assorted increments of *Paecilomyces japonica* powder. Korean J Food Nutr 20(1): 40-46
- Kim JM, Suh DS, Kim YS, Kim KO (2004) Physical and sensory properties of rice gruels and cakes containing different levels of ginkgo nut powder. Korean J Food Sci Technol 36(3): 410-415.
- Kim SR, Ahn JY, Lee HY, Ha TY (2004) Various properties and phenolic acid contents of rices and rice brans with different milling fractions. Korean J Food Sci Technol 36(6): 930-936.
- Nam SH, Kang MY (1997) In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. Agri Chem Biotechnol 40: 307-312.
- Nam SH, Kang MY (1998) Comparison of effect of rice bran extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. Agri Chem Biotechnol 41: 78-83.
- Nam SH, Cho SP, Kang MY, Koh HJ, Kozukue N, Friedman M (2006) Antioxidant activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. Food Chem 94: 613-620.
- Okada T, Yamaguchi N (1983) Antioxidant effect and pharmacology of *oryzanol*. Yukagaku 32: 305.
- Park KY, Kang CS, Cho YC, Lee YS, Lee YH, Lee YS (2003) Genotypic difference in tocopherol and tocotrienol contents of rice bran. Korean J Crop Sci 48(6): 469-472.
- Park GS, Cho JW (1998) The effects of addition of agar on the texture characteristics of peach jelly. Korean J Food Nutr 11(1): 61-67.
- Ramarathnam N, Osawa T, Namiki M, Kawakishi S (1998) Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation and partial characterization. J Agric Food Chem 36: 732-737.
- Serbinova EA, Packer L (1994) Antioxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol. Methods Enzymol 234: 354-366.
- Shin SY (2001) Screening of Antioxidative and Antimutagenic Activities of Organic Solvent Extract Fraction from the Colored Rice Hulls. MS Thesis Kyungpook National University, Daegu. p 18-19.
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Kawakishi S, Choi SW, Osawa T(1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. J Argric Food Chem 42: 2407-2411.

### 3. 쌀 배아젤리 급여 동물의 만성대사성질환 억제효능 검증

1. Chisolm, G. M. and Steinberg, D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biol. Med.* **28**, 1815-1826.

2. Hodis, H. N., Mack, W. J., Labree, L., Cashin, H. L., Sevanian, A., Johnson, R. and Azen, S. P. (1995) Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduce progression of coronary artery atherosclerosis. *J. Am. Med. Assoc.* **273**, 1849-1854.
3. Balkan, J., Kanbagli, O., Hatipoglu, A., Kucuk, M., Cevikbas, U., Aykac-Toker, G. and Uysal, M. (2002) Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1755-1758.
4. Thurnham, D. I. (1994) Carotenoids: functions and fallacies. The Proceedings of the Nutrition Society **53**, 77-87.
5. Mantha, S. V., Kalra, J. and Prasad, K. (1996) Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. *Life Sci.* **58**, 503-509.
6. Del Boccio, G., Lapenna, D., Porreca, E., Pennelli, A., Savini, F., Feliciani, P., Ricci, G. and Cuccurullo, F. (1990) Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **81**, 127-135.
7. Jeon, S. M., Bok, S. H., Jang, M. K., Lee, M. K., Nam, K. T., Park, Y. B., Rhee, S. J. and Choi, M. S. (2001) Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* **69**, 2855-2866.
8. Lee, J. J., Park, S. Y. and Lee, M. Y. (2006) Effect of lotus root (*Nelumbo nucifera* G.) on lipid metabolism in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Korean J. Food Preserv.* **13**, 634-642.
9. Serbinova, E. A. and Packer, L. (1994) Antioxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol. *Methods Enzymol.* **234**, 354-366.
10. Muramoto, G. and Kawamura, S. (1991) Rice protein and antihypertensive peptide(angiotensin conversion enzyme inhibitor) from rice. *Nippon Shokuhin Kogyo* **34**, 18-26.
11. Nam, S. H., Cho, S. P., Kang, M. Y., Koh, H. J., Kozukue, N. and Friedman, M. (2006) Antioxidant activities of bran extracts from twenty one black rice cultivars. *Food Chem.* **94**, 613-620.
12. Choi, S. W., Nam, S. H. and Choi, H. C. (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Biotechnol.* **5**, 305-309.
13. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Kawakishi, S., Choi, S. W. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2411.

14. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1997) In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agri. Chem. Biotechnol.* **40**, 307-312.
15. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1998) Comparison of effect of rice bran extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**, 78-83.
16. Choi, J. H. (1987) A study on fatty acid pattern in brain and liver tissues of developing chicken embryos, MS Thesis, Korea University, Korea.
17. Friedewald, W. T. and Levey, R. I. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.
18. Lauer, R. M., Clarke, W. P. and Lee, J. (1988) Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels. The Muscatine study. *Pediatrics* **82**, 309-318.
19. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 197-509.
20. Sale, F. O., Marchesini, S, Fishman, P. H. and Berra, B. (1984) A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal. Biochem.* **142**, 347-350.
21. Retiman, S. and Frankel, S. (1975) In *Method of enzymatic analysis* Academic Press, New York.
22. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yake, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem.* **95**, 351-358.
23. Hulcher, F. H. and Oleson W. H. (1973) Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxyl-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J. Lipid Res.* **14**, 625-637.
24. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
25. Aebi, H. (1974) Catalase. In *Method of Enzymatic Analysis*, pp. 673-684, Academic Press, New York.
26. Paglia, P. E. and Valentine, W. N. (1967) Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158-169.



27. Kim, Y. E., Oh, S. W., Kwon, E. K., Han, D. S., Kim, I. H. and Lee, C. H. (2004) Effects of green tea, buckwheat and grape leaves extracts on lipid metabolism antioxidative capacity, and antithrombotic activity in rats fed high cholesterol diets. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 979–985.
28. Kahlon, T. S., Saunders, R. M., Chow, F. I., Chiu, M. C. and Betschar, A. A. (1989) Effect of rice bran and oat bran on plasma cholesterol in hamsters. *Cereal Food World* **34**, 768–774.
29. Gerhardt, A. L. and Gallo, N. B. (1989) Effect of a processed medium grain rice bran and germ product on hypercholesterolemia. Am. Assoc. Cereal Chemists Annual Meeting, Washington DC.
30. Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W. F., Abbott, R. D., Kalousdian, S. and Kannel, W. B. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels, the Framingham study. *JAMA* **256**, 2835–2838.
31. Razdan, A. and Pettersson, D. (1994) Effect of chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentration in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* **72**, 277–288.
32. Sharrett, A. R., Ballantyne, C. M., Coady, S. A., Heiss, G., Sorlie, P. D. and Catellier, D. (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities(ARIC) study. *Circulation* **104**, 1108–1113.
33. Minhajuddin M, Beg ZH, Iqbal J. (2005) Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 747–753.
34. Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Woolfrey, B. and Kritchevsky, D. (2007) Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 105–112.
35. Lee, W. C., Kim, A. J. and Kim, S. Y. (2003) The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci. Ind.* **36**, 2–14.
36. Addis, P. B. and Waener, G. J. (1991) Free radicals and Food additives (O.I. Aruoma and B. Halliwell, Eds.), Taylor and Francis, England.
37. Lee, J. M., Choi, S. W., Cho, S. H. and Rhee, S. J. (2003) Effect of seeds extract of *Paeonia Lactiflora* on antioxidative system and lipid peroxidation of liver in rats fed high-cholesterol diet. *Kor. J. Nutr.* **36**, 793–800.

38. Britton, C., Helmut, S. and Alberto, B. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organ. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.

39. Igarashi, K. and Ohmuma, M. (1995) Effects of isorhamnetin, rhamnetin and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities or rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 595-601.

40. Rana, P., Vadhera, S. AND Soni G. (2004) In vivo antioxidant potential of rice bran oil(RBO) in albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **48**, 428-436.

41. Noaman, E., El-Din, N., Bibars, M. A., Mossallam, A. and Ghoneum, M. (2008) Antioxidant potential by arabinoxylan rice bran, MGN-3/biobran, represents a mechanism for its oncostatic effect against murine solid Ehrlich carcinoma. *Cancer Lett.* (2008), doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.012.

#### 4. 간장 및 신장손상 회복 효능이 검증된 한약재 열수추출물 활용

1. Bruke M, Bridges JW. The influence of tween-80 on the metabolism of biphenyl microsomal oxygenase. *Biochem J* 1972; 130: 70-71.

2. Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith D. Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome p-450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1998;26: 1-4.

3. Dogukan A, Akpolat N, Celiker H, Ilhan N, Halil Bahcecioglu I, Gunal AI. Protective effect of interferon-alpha on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. *J Nephrol* 2003; 16: 4-81.

4. Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, Namba T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull.*1997.

5. Hichman D, Wang J, Wang Y, Unadkat JD. Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P-450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* 1998; 6-26:207-215.

6. Kim HJ, Brukner JV, Dallas CE, Gallo JM. Effect of dosing vehicles on the pharmacokinetics of orally administered carbon tetrachloride in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 102: 50-60.

7. Kim OK. Protective effects of extracts of *Diospyros kaki* Folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001a; 30:97-101.

8. Kim OK. Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001b; 30: 1260-1265.
9. Kim OK. Protective effects of extracts of *Diospyrus kaki* Folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001a;30:97-101.
10. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Hsiao C, Stapleton SR, Ward PA. Exogenous nitric oxide downregulates MIP-2 and MIP-1 alpha chemokines and MAPK p44/42 after ischemia and reperfusion of the rat kidney. *J Invest Surg* 2002; 15: 96-287.
11. Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology* 2003; 62: 6-353.
12. Reitman S, Flankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pthol* 1992; 40: 2287-2291.
13. Reitman S, Flank S.A. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pthol* 1957; 28: 56.
14. Shukla S, Bhadauria M, Jadon A. Effect of propolis Extract on acute carbon tetrachloride induced hepatic toxicity. *Indian J Exp Biol* 2004; 42: 7-993.
15. Sung JK, Yoon JH, Lee YW, Chang DW, Lee HC. Ultrasonographic findings of carbon tetrachloride induced hepatic disease in dog a Korean. *J vet Clin Med* 1995; 12: 242-247.
16. Salminen WF Jr, Voellmy R, Roberts SM. Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction. *Toxicol appl Pharmacol* 1997; 147: 247-258.
17. Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2004a; 56: 195-201.
18. 권진욱, 이규승. 흰쥐에서 사염화탄소로 유도된 간독성에 미치는 더위지기 추출물의 영향-II. *대한약학회지* 2002; 17: 181-182
19. 윤종국. 흰쥐의 사염화탄소에 간손상시 actinomycin D 및 predisolone이 혈청

xanthin oxidase 활성에 미치는 영향. 연구논집. 계명대학교 기초과학연구소. 1988; 7: 113.

20. 윤미영. Dimethyl sulfoxide가 마우스에서 간독성 물질들의 체내대사 및 독성발현에 미치는 영향. 서울대학교 대학원: 약학박사학위논문. 1999: 71-72

21. 김건희, 한혜경. 버섯 추출물이 사염화탄소 유발 간손상에 미치는 영향. 한국식품영양과 학회지 1998; 27: 326-332.

22. 이상일, 박용수, 조수열. 미나리추출물이 사염화탄소에 의한 마우스 간손상에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 1993; 22: 392-397.

23. 전정례, 박정룡. 두충잎 물추출물이 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 2002; 31: 124-130.

Cho MK. 2008. Study on the application of by-product from rice polishing process to the source of functional foods. Master thesis. The Kyungpook National University of Korea

Choi EJ, Lee GE, Oh MS. 2007. The quality characteristics of grape jelly made with various gelling agents for consumption by elderly women. Korean J Food cookery Sci 23(6) 891-898

Chun HS, You JE, Kim IH, Cho JS. 1999. Comparative antimutagenic and antioxidative of rice with different milling fractions. Korean J Food Sci Technol 31(5) 1371-1377

Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Woo KJ. 2006a. Study on preparation and quality using mulberry leaf powder. Korean J food cookery Sci 22(1) 56-61

Kim AJ, Yuh JS, Bang IS, Park HY, Lee GS. 2007. An investigation the preparation and physicochemical properties of *Oddi* jelly using mulberry fruit powder. Korean J Food & Nutr 20(1) 27-33

Kim AJ, Yuh JS, Bang IS, Park SH. 2006b. The properties and sensory evaluation of jelly with silkworm powder. J East Asian Soc Dietary Life 16(3) 308-314

Kim JH, Kim JK. 2005. Quality of persimmon jelly by various ratio of dried persimmon extract. J Korean Soc Food Sci Nutri 34(7)

Kim JH, Kim MH, Kang MY. 2006. Processibility aptitude of Dobyeng with pigmented rice bran extract. Korean J Food cookery Sci 22(6) 898-904

Kim JM, Suh DS, Kim YS, Kim KO. 2004. Physical and sensory properties of rice gruel and cakes containing different level of ginko nut powder. Korea J food Sci Technol 36(3) 410-415

Lee JA, Park GS. 2007. Quality characteristics of jelly made with yam. Korean J Food Cookery Sci 23(6) 884-89

Lee YL 2000. Screening of the physiological activity of giant embryonic rice for health and its application to the functional foods. Master thesis. The Kyungpook Natinal University of Korea.

Lee YR, Kim CE, Nam SH, Kang MY. 2006a. Supplementary effect of the giant embryonic rice on serum and hepatic lipid levels of streptozotocin-induced diabetics rats. Korean J Food Sci Technol. 38(4) 562-566

Lee YR, Nam SH, Kang MY. 2006b. Hypoglycemic effect of the giant embryo rice supplementation on streptozotocin-induced diabetics rats. Korean J Food Sci Technol 38(3) 427-431

Lim MK, Kim JW, Kim HT, Lee BJ, Ku SK, Kang MY, Lee GW. 2007a. Therapeutic effect of *Hovenia dulcis* Thunberg extracts and 6 types herbal extracts on CCl<sub>4</sub>-induced chronic organ damages in the rats-liver and kidney. J Vet Clin 24(3) 384-391

Lim MK, Kim JW, Kim JE, Kim HT, Jung SJ, Kang MY, Lee GW. 2007b. The therapeutic effect of *Hovenia dulcis* Thunberg extracts and 6 types of herbal extracts on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver and kidney damages in rats. J vet Clin 24(3) 400-405

Mo EK, Kim HH, Kim SM, Cho HH, Sung CS. 2007. Production of *Sedum* extract adding jelly and assessment of its physicochemical properties. Korean J food Sci Technol 39(6) 619-624

Sikura T, Horino T, Mori Y. 1994. Distribution of free amino acids in rice kernal fractions and the effect of water soaking on the distribution. J Agri Food Chem 42 : 1122-1125

Yoo KA. 2003. The feasibility of the food processing using functional rice and the development of the functional cookies using rice bran. Mater thesis. The Kyungpook Natinal University of Korea.