

최 종  
연구보고서

고 항산화활성 · 활성물질 함유 쌀 생산기술 개발  
Development of Rice Production Technique with  
High Antioxdative Activity and Bioactive  
Compounds

연구 기관  
건 국 대 학 교

농 립 부



# 요 약 문

## I. 제 목

고항산화활성·활성물질 함유 쌀 생산기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목 적

항산화활성과 같은 생리적 기능성이 강화된 쌀의 생산 유통은 WTO 개방체제 하에서 우리 농업의 발전에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되므로 이에 대한 연구가 시급히 이루어질 필요가 있다. 즉 우리의 농업은 농지가격이 비싸고 농촌의 노임이 높으며 경작지가 협소하여 고소득 작물만이 재배에 적합한 구조를 가지고 있다. 따라서 그 동안의 일반 영양소 소재를 생산하는 농업으로는 수지를 맞출 수 없으므로 사회적으로 수요가 높은 생리적 기능성을 함유한 기능성 식품소재의 생산은 고소득 농업에 아주 적합한 분야이다. 특히 인간의 건강을 증진시키는 기능성 성분이 밝혀지면 이 성분을 다량 함유한 작물의 재배에 주력함은 물론 나아가서 이 성분을 다량 함유하도록 작물을 육종하는 소위 “고기능성 품종 육종(기능성 강화 품종)” 등의 노력 및 천연 기능성 물질을 개발할 수도 있을 것이다. 따라서 쌀에도 항산화물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으므로 1) 벼 재배조건에 따른 항산화 물질을 조사 분석하여 최적 재배환경 및 생산기술 구명, 2) 쌀 천연항산화활성물질 분석 및 분리·동정으로 천연항산화 물질개발, 3) 고항산화활성 벼 품종 육성을 위한 계통 육성, 4) 고항산화활성·활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발 등에 대한 실질적인 연구를 할 필요가 있다.

### 2. 필요성

가. 쌀은 우리 나라 국민의 주요 식량으로 경제·사회적인 가치가 국내 농업분야에서는 가장 크지만 장기적으로 그 재배면적이 점차 감소될 것으로 전망된다. 그러나 일정면적 이상의 벼를 재배하는 일은 식량 안보적 차원에서 쌀의 안정적 자급형태유지에 절대적으로 필요하며, 쌀의 안정적인 공급은 채소, 육류 등 부식농산물의 안정적인 수요 창출을 유도함으

로써 농가경제는 물론 국가경제의 안정화에 크게 기여할 수 있을 것이다.

나. 최근 쌀의 항산화능력을 비롯하여 항암성·항변이원성 등의 생리활성을 갖는 물질들이 함유되어 있는 것이 밝혀져 주목을 받고 있다. 쌀의 항산화능력에 관여하는 isovitexin, chrysanthemin(cyanidin-3-glucoside: C-3-G), oryzanol 등에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 작물을 직접 개량 재배 생산하는 농학적인 측면에서의 체계적인 분석법이나 실용적 연구가 국내외적으로 극히 부진하여 이에 대한 연구의 필요성이 크게 부각되고 있는 실정이다.

다. 생리적 기능성이 강화된 쌀 생산에 의한 쌀의 신수요 창출과 가공산업의 활성화는 식량산업의 국제경쟁력에 절대적으로 필요한 정책과제이다.

라. 쌀의 자급생산 기반을 지키는 것은 국민정서에 부합될 뿐 아니라, 몬순 기후대에 위치한 우리 나라 자연환경에 가장 적합한 국토이용 및 보존방법이 되므로 이를 위한 첨단 연구가 필요하다.

마. 국민건강 유지 및 품질이 우수한 전통가공 식품의 생산에 기여함으로써 소비자에게 우리 쌀의 우수성을 인식시킬 필요가 있다.

바. 고생리활성 쌀 생산 기술 개발에 의한 우리 쌀의 우수성을 널리 알림으로써 쌀 재배 농가의 생산의욕 고취 및 외국산 쌀 수입억제와 식량생산 기반 붕괴를 방지 할 수 있다.

사. 사회적으로 편의성이 강조되어 간편식품과 가공식품의 수요량이 증가하고 건강에 대한 관심이 커져 각종 건강증진 기능성 식품의 수요도 늘어나고 있다. 그 동안 밥 짓는데 주로 이용해 왔던 쌀을 가공식품 또는 건강증진 기능성 식품의 소재로 이용해야 할 필요성이 증대되고 있으므로 미래의 수요 변화에 대응한 생산기술 개발이 필요하다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 고허산화물질 함유 쌀 생산 기술 개발연구

##### 가. 고허산화성분 관련 시비조건 구명

- 1) 질소수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향
- 2) 퇴비수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

##### 나. 고허산화성분 관련 재배조건 구명

- 1) 이앙시기가 항산화성분에 미치는 영향
- 2) 재배지역이 항산화성분에 미치는 영향

##### 다. 고허산화성분 관련 생산환경조건 구명

- 1) 등숙온도가 항산화성분에 미치는 영향
- 2) Ethephon처리가 항산화성분에 미치는 영향

## 2. 벼 항산화활성 물질 탐색 및 항산화활성물질 분리 및 동정

### 가. 항산화활성 물질 탐색 및 항산화활성 검정(*in vitro*)

- 1) HPLC에 의한 항산화물질(ferulic acid, chlorogenic acid, isovitexin) 탐색
- 2) ESR, SOD, POD, DPPH, TBA법에 의한 항산화 활성검정

### 나. 항산화활성 물질 추출 및 분리

- 1) Open column chromatography
- 2) Flash column chromatography
- 3) TLC, UV, HPLC, MS

### 다. 분리·정제된 활성물질의 항산화활성 비교

- 1) SOD 및 DPPH 활성 검정
- 2) ESR을 이용한 SOD 활성 비교
- 3) 라디칼 소거(RC<sub>50</sub>)능 활성측정
- 4) Cell culture에 의한 세포독성 검정

### 라. *In vivo*에서 항산화 활성 검정

- 1) 실험동물의 체중변화
- 2) 실험동물의 혈액 생화학적 지표
- 3) 실험동물의 혈중 항산화효소 측정법
- 4) 실험동물의 조직 지질과산화 수준 측정
- 5) 실험동물 조직 중의 항산화 효소 활성도 측정

## 3. 고허산화활성 벼 계통 육성

### 가. 고허산화 활성 계통육성

- 1) 잡종집단 및 계통육성
- 2) 고세대계통의 생산력검정예비시험
- 3) 잡종집단에서 현미의 색도와 C3G함량의 유전분리

### 나. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율

- 1) C3G함량의 선발효율

2) 항산화 활성에 대한 선발효과

**다. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발**

- 1) 항산화 활성 선발지표 개발
- 2) 항산화 활성 분자표지 개발

**4. 고허산화활성 · 활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발**

**가. 재래종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험**

- 1) 작물학적 특성 연구
- 2) 항산화 활성 유전자원 평가
  - NBT법 (SOD활성), DPPH, TBA법에 의한 항산화 활성검정

**나. 외국종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석(총 phenolic acids 함량) 시험**

- 1) 항산화활성 유전자원 평가 및 선발
- 2) 선발된 품종에 대한 항산화 활성 검정 및 활성물질 분석
  - NBT법(SOD활성), DPPH, TBA법에 의한 항산화 활성검정
  - 항산화물질(총 phenol 함량) 분석

**다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험**

- 1) 유전자원 재배 및 선발
- 2) 재배된 품종에 대한 항산화 활성 검정 및 유전자원 평가
  - NBT법(SOD 활성), DPPH법에 의한 항산화 활성검정

**IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의**

**1. 고허산화물질 함유 쌀 생산 기술 개발 연구**

**가. 고허산화성분 관련 질소 및 퇴비 시용 효과 구명**

1) 질소 시용량이 증가함에 따라 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼 현미의 C3G와 P3G의 함량 및 C3G와 P3G의 생산량은 유의하게 증가하였다. 그러나  $\gamma$ -oryzanol 함량, Isovitexin 함량, DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성은 질소시비량 처리 간에 유의한 차이가 없었다.

2) 퇴비시용량이 증가함에 따라 흑진주벼, 흑남벼 현미의 C3G와 P3G 함량 및 C3G와

P3G 생산량이 증가하는 경향을 보이거나 질소시비 처럼 현저한 차이는 아니었다.  $\gamma$ -oryzanol 함량, Isovitexin 함량, DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성과 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성도 퇴비 시용량 간에 뚜렷한 차이가 없었다.

3) 유색미 현미의 C3G 함량은 등숙기간이 출수후 40일 이후 80일까지 길어질수록 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다. 따라서 유색미 품종의 항산화성분 생산량을 증가시키려면 출수후 40~50일에 수확하여야 할 것으로 판단되었다.

4) 흑진주벼와 흑남벼는 자연조건에서 재배될 때 C3G 함량 범위가 각각 182~839mg/현미100g, 1.5~284mg/현미100g 이었으며 DPPH 억제율과 TBA 억제율에 의한 항산화 활성 범위는 각각 69.1~82.5%, 61.3~82.3%이었다.

5) 일품벼에서는 C3G, P3G 및 Isovitexin이 검출되지 않았으나  $\gamma$ -oryzanol의 함량은 2.6~3.0%로 흑진주벼와 흑남벼보다 높았다. DPPH 억제율과 TBA 억제율에 의한 항산화 활성도는 유색미 품종인 흑진주벼 및 흑남벼보다 유의하게 낮은 수준이었다.

#### 나. 고허산화성분 관련 이앙시기 및 재배지역 영향 구명

1) 흑진주벼와 흑남벼 현미의 C3G 함량 및 생산량은 보통기재배에서 유의하게 높았고 조기 및 만기재배에서 유의하게 낮았다.

2) Oryzanol 함량은 흑진주벼는 만기재배에서, 흑남벼는 조기 및 만기재배에서, 일품벼는 만기재배에서 유의하게 높았다. Oryzanol 생산량은 흑진주벼와 일품벼는 이앙시기간 차이가 없었고 흑남벼는 조기재배에서 가장 높았다.

3) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼 모두 보통기재배에서 유의하게 가장 높았고 일품벼는 이앙시기간 차이가 없었다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 세 품종 모두 이앙시기간 차이가 없었다.

4) 유색미의 C3G 함량 및 생산량, Oryzanol 함량 등 항산화성분은 재배지역 및 품종에 따라 다르게 나타났다. C3G 함량 및 생산량은 흑진주벼는 상주, 흑남벼는 익산에서 유의하게 가장 높았다. 상주지역의 흑진주벼 C3G 함량은 다른 지역에 비하여 3배나 높았다.

5) 흑진주벼는 상주지역에서 재배될때 다른지역 재배보다 C3G 함량 및 생산량, Oryzanol 함량, DPPH 억제율, TBA 억제율에 의한 항산화활성이 유의하게 높았다.

6) 흑남벼는 익산에서 재배될때 C3G 함량 및 생산량이 높았고 상주에서 재배하면 Oryzanol 함량과 생산량, TBA 억제율에 의한 항산화활성이 다른지역보다 유의하게 높았다.

7) 일품벼는 어느 지역에 재배하던 Oryzanol 함량과 생산량, DPPH 억제율, TBA 억제율에 의한 항산화활성이 큰 차이가 없었다.

#### 다. 고허산화성분에 영향하는 등숙온도 및 Ethephon 처리의 효과

1) 흑진주벼와 흑남벼의 C3G 함량 및 C3G 생산량, 그리고 DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성과 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 등숙온도 24℃에서 유의하게 가장 높았고 그 다음이 21℃, 27℃, 18℃ 순이었다.

2) Oryzanol 함량은 흑진주벼는 등숙온도 18℃, 흑남벼는 27℃에서 유의하게 가장 높았고, 일품벼는 21~27℃ 처리구간에는 유의한 차이가 없었다.

3) Ethephon 100~1000ppm처리는 흑진주벼와 흑남벼의 C3G 농도를 유의하게 증가시키나 단위면적당 C3G 생산량에는 차이가 없었다. Ethephon 2000ppm 처리는 항산화성분 생산을 유의하게 감소시켰다. Ethephon 처리는 Oryzanol 함량에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

4) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 흑진주벼는 Ethephon 처리간 유의한 차이가 없었고 흑남벼는 Ethephon농도가 높을수록, 일품벼는 Ethephon농도가 낮을수록 항산화활성이 유의하게 높아지는 경향이 있었다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 Ethephon의 처리 농도에 따른 일정한 경향이 없었다.

## 2. 항산화활성 평가 및 활성물질 분석

가. 항산화활성 물질 탐색 및 분석연구에서는 ESR (Electron spin resonance)을 이용하여 항산화활성 물질 탐색결과 chlorogenic acid와 ferulic acid가 다른 물질보다 높은 SOD 활성을 보였고 HPLC를 이용한 벼 품종간 항산화물질 분석에 chlorogenic acid, ferulic acid 및 isovitexin 의 함량을 비교한 결과 활성이 높았던 품종에서 이들 물질의 함량이 높은 경향을 나타냈다.

나. *In vitro*에서 항산화활성검정을 위하여 SOD와 POD 검정과 DPPH법에 의한 전자공여능과 TBA법에 의한 지질과산화 검정에서는 방법간에 활성의 차이를 보였다. SOD 활성은 Tono Brea 439(16.0%), Hwei Ju(12.5%)가 높은 활성을 보였고, POD 활성은 AUS 196(96.4%), AC 1423 (95.3%)가, DPPH에 의한 전자공여소거능에 있어서 Philippine (84.5%), Hwei Ju (81.7%)등이, TBA법에 의한 지질과산화 검정 결과 Seungsiljo (45.6%), Hwei Ju (42.1%) 등이 높은 억제율을 보였다.



다. 항산화활성 물질분리 및 동정에서 현미 추출물 활성검정 비교시험에서 더 높은 항산화활성을 보였으며 80% MeOH 추출물질의 이화학적 특성은 pH와 열에대한 안전성 및 EtOAc, BuOH 등의 추출물에서는 활성을 보였다.

라. 추출물을 open column chromatography, flash column chromatography, TLC, UV spectrometer를 이용하여 ferulic acid 물질을 추출, 분리한 후 EI/MS로 확인한 결과 분자량 194, 분자식  $C_{10}H_{10}O_4$ 인 물질로서 동정되었고 HPLC분석결과 99.7% 순도를 보였으며, 표준 검량선 방정식은  $y = 1.77588x + 0.034198$ 의 검량선을 얻었다.

마. 순수분리 정제된 ferulic acid을 이용하여 ESR에 의한 SOD활성은 17%, DPPH법을 이용한 전자 공여소거능은 67%의 활성을 보였으며, 라디칼소거능 검정( $RC_{50}$ )에서는 36ug/ml으로서 대조구로 사용된 BHT에 비하여 높은 억제력을 보였고 PC12 세포를 이용한 cytotoxicity assay에서는 ferulic acid는  $H_2O_2$ 와 dopamine에 의해 야기되는 세포 치사에 대한 방어적 효과를 보였다.

바. *In vivo* 항산화활성검정에서 Flavonoid 함유 자광찰벼 추출물 혹은 일품벼 추출물 에탄올과 병용 투여한 실험 I 과, 자광찰벼 추출물과 에탄올을 병용 투여한 실험II와, 자광찰벼 추출물, 찰벼 추출물 혹은 일품벼 추출물을 에탄올과 병용 투여한 실험III에서 쌀 추출물의 성장 촉진 혹은 성장 저해 작용을 평가하기 위하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였다. Glucose 투여군과 생리식염수 투여군에 비해 EtOH 투여군과 시료 투여군은 현저하게 낮은 체중 증가를 보였다. 그러나 실험 I 과 II에서는 시료투여군과 EtOH 투여군과는 유의적인 차이가 없었다. 실험 III에서는 EtOH 투여군에 비해 자광찰벼 추출물 투여군에서 현저한 체중증가가 관찰되었다. 따라서 본 실험에 사용된 쌀 추출물 투여는 에탄올로 인한 실험동물의 성장억제를 다소 반전시키는 경향이 있는 것으로 사료된다.

사. 간 손상을 예측하는 지표로 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 등의 효소들이 이용되고 있다. 이 효소들은 손상된 간 조직으로부터 혈액 중으로 방출되므로 혈액 중에서의 활성이 높게 측정된다. 실험 I, II 및 III에서 GOT, GPT, Total cholesterol, HDL 및 LDL은 EtOH 투여군과 시료 추출물 투여군 간에 유의적인 차이는 없었으나 본 실험에 사용한 시료 추출물 용량은 에탄올에 의한 간 손상을 보호함에 있어서 효과가 있는 것으로 사료된다.

아. 간, 뇌 및 이자 조직에서 EtOH 투여군에 비해 쌀 추출물 투여군이 MDA 함량을 다소 감소시키는 경향을 보였다. LOOH 함량의 경우에도 실험 I 및 III에서 유의적인 차이는 없었지만 쌀 추출물이 EtOH 투여군에 비해 농도를 낮추는 경향을 보였다. 따라서 시료 쌀

추출물은 일부 조직에서 지질과산화물 어느 정도 억제시키는 경향이 있다고 생각된다.

자. 간, 뇌 및 이자 조직에서 쌀 추출물은 에탄올에 의해 감소된 GST 활성도를 상당 수준 정상화 시켰다. 또한 본 실험에서 사용한 자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 추출물은 에탄올 투여에 의해 감소한 GSH 함량을 약간 증가시키는 경향이 관찰되므로 산화스트레스에 의해 감소한 GSH 함량의 정상화에 어느 정도 효과적일 것으로 기대된다.

### 3. 고향산화활성 벼 계통 육성

가. 본 연구에서 향산화 활성이 높은 품종을 육성하기 위한 계통이 다수 선발되었다. F<sub>5</sub> 세대이후의 계통 중에 향산화 물질인 Cyanidine-3-Glucoside (C-3-G)를 다량 함유하는 계통이 흑진주벼/밀양153호 조합에서 50계통, 흑진주벼/수원425호 조합에서 50계통 및 흑진주벼/진부찰벼 조합에서 18계통 등, 총 118계통이 선발되었으며, 이들 중 국내에서 재배되는 어떠한 품종보다 C3G 함량이 20~30% 더 높은 계통이 다수 포함되었다. 향산화 활성도를 측정하는 SOD 및 ESR과장강도를 이용하여 안산벼/가위찰 조합에서 42계통, 흑남벼/가위찰 조합 36계통 등, 총 78개의 고향산화 활성 계통을 선발하였다. 또한 거대배(giant embryo) 이면서 C3G함량이 높은 계통으로 흑진주벼/거대배 조합에서 30계통과 흑남벼/거대배 조합에서 81계통을 선발하여 총 111계통이 선발되었다. 선발된 이들 계통들중에 7계통에 대해 생산력 검정 예비시험이 이루어지고 있으며, 2~3년내에 실용화 품종이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

나. 흑자색 종피 품종간 교배조합의 F<sub>2</sub>에서 C3G 함량의 분리양상을 살펴본 결과 C3G함량이 다수의 유전자가 관여하는 양적형질임을 알 수 있었다.

다. 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호 및 흑미H31와 흑진주벼 교배 조합에서는 초월분리 개체가 출현하여 이들 교배친이 흑진주벼가 가진 C3G관련유전자와 상가적으로 작용하는 다수의 복수유전자를 가진 것으로 추정된 반면, HeiBao/흑진주벼 조합에서는 초월분리개체가 출현하지 않아 HeiBao는 흑진주벼 유전자와 상가적으로 작용하는 복수유전자를 적게 가진 것으로 추정되었다. 또한 적색종피를 가진 교배친과 담황색 종피를 가진 아랑향찰은 C3G관련 복수유전자를 가지고 있는 것으로 추정되었다.

라. 흑진주벼와 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호, 흑미H31, HeiBao는 동일한 종피색 관련유전자를 가지고 있었다. 흑자색/적색 종피 조합의 F<sub>2</sub> 집단에서 L값과 b값이 넓게 분포하여 흑자색과 적색 관련 유전자가 비대립관계를 보여주었다. 흑자색/담황색 종피조합에서 L값과 b값이 모두 3정분포를 보여 색도값이 소수의 주동유전자에 의해 유전되고 있음을 보

여주었다.

마. 흑진주벼/진부찰벼 조합과 흑진주벼/거대배 조합의 F<sub>3</sub>세대에서 C3G함량에 따라 선발하고 F<sub>4</sub>세대에서 C3G함량의 분포를 살펴본 결과, 집단간 C3G함량 분포에 확실한 차이를 보여, 잡종초기세대인 F<sub>3</sub>에서 C3G함량에 대한 개체선발은 효과가 큰 것으로 나타났다. 안산벼/가위찰 조합과 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>3</sub>와 F<sub>4</sub> 2세대에 걸쳐 SOD와 ESR 과장강도에 근거하여 선발하고 후대검정을 실시한 결과, 두 교배 조합 모두에서 개체선발의 효과가 인정되었다.

바. 색도값의 b값은 C3G함량과 높은 부의 상관관을 보여 b값은 C3G함량의 높고 낮음을 추정할 수 있는 지표로 이용 가능할 것으로 생각되었고, 항산화 활성지수와의 관계에서도 고도의 부의 상관관계가 인정되어 유색미의 경우에는 색도계로 조사한 b값을 항산화활성 선발지표로 이용할 수 있다고 판단하였다.

사. 유색미 계통의 항산화 활성을 검토하기 위해서 ESR 과장강도를 사용할 때 추출용액의 20배 이상 희석액을 이용하는 것이 고 항산화활성 계통선발에 효과적이었다.

아. 항산화 활성 분자표지 개발을 위해 101개의 RM primer를 이용하여 SSR분석을 한 결과, 종피색 유무와 C3G 함량 차이에 따라 일정하게 서로 다른 band type을 보인 primer는 RM469, RM204, RM217, RM317의 4개 primer였으며, RM469, RM204, RM217은 6번 염색체에 RM317은 4번 염색체에 위치한 marker였다. 이중 RM317은 C3G가 축적되는 흑자색 또는 적자색 종피계통을 구별할 수 있는 분자마커였다.

#### 4. 고허산화활성 · 활성물질함유 유전자원평가 및 선발연구

가. 재래종벼의 품종군으로 구분한 결과 일본형이 96품종(94%), 자바형이 5품종(5%), 인도형이 1품종(1%)이었다. 간장은 69.2~122.4cm 범위로 분포하였고, 수장은 16.5~30.4cm 범위로 분포하였으며, 수수는 7.7~21.0개 범위에 있었다. 또한 친립중은 56품종이 20~25g 범위로 분포하고 있으며, 종피색은 백색(93품종)이 대부분을 차지하고 있었다. SOD 활성에서는 아국도가 30.2%로 가장 높은 활성을 보였고, DPPH 활성에서는 적도가 90.7%로 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 추출수율은 가위찰(5.2%)과 화성발찰(5.2%)이 제일 많았다.

나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 시비수준에 따른 억제율은 50% 감비구(41.8%) > 50% 증비구(41.7%) > 무비구(39.4%) > 표준시비구(39.1%) 순으로 나타났다. 또한 시비수준에 따른 품종별 항산화능력은 Siga-Chata Mochi(49.5%)에서 가장 높았고, 높은 억제율을 보인 상위 5품종(Siga-Chata Mochi, Hwei Ju, AUS 196, Noindari, Jeongdaldo)을 선발하였

다. 총페놀함량을 측정한 결과 표준시비를 하는 것보다 감비처리나 무비 재배하는 시비법이 총페놀의 함량을 증가하게 하는 경향을 보였고, 유색미(Hwei Ju, AUS 196, Siga-Chata Mochi)가 일반미에 비해서 총페놀 함량이 높은 경향을 나타내고 있다.

다. 재배종벼에 대한 SOD 효소 활성검정에서는 진미벼, 장안벼에서 각각 34.6%, 17.6%로 높은 SOD 효소 활성 능력을 나타냈다. DPPH에 의한 라디칼소거능은 흑향벼가 81.4%로 높은 항산화활성을 나타냈으며, 추출수율조사에서는 진부올벼와 흑진주벼가 각각 5.5%와 5.2%로 가장 많은 추출율을 보였다.

## SUMMARY

It is expected that the production and distribution of rice whose physiological functionality is reinforced such as the anti-oxidative activity of rice will be able to make a great contribution to Korean agricultural development under the WTO regime. Thus, it is necessary to conduct a research on this issue. That is, our agriculture has the characteristics that our agricultural land price is very high, the agricultural wages are high and the arable land has the structure appropriate to the cultivation of high-income crops alone. Accordingly, the production of functional food materials containing the physiological function of socially high demand is the field very appropriate to the agriculture generating high income since our agriculture can not meet both end meet with the agriculture aimed at producing general nutrient crops. Especially, the disclosure of the functional ingredient increasing the human health would enable people to devote themselves to cultivating the crops containing a large quantity of this ingredient as well as develop the so-called "highly functional plants"(functionally reinforced food) for cultivating the crop to contain the large quantity of this ingredient and naturally functional materials. Accordingly, rice has been found to contain the anti-oxidative substance. It is necessary to conduct the followings: (1) to investigate and analyze the anti-oxidative substance according to the condition of rice cultivation and identify the optimal cultivation environment and production technology; (2) to develop the natural anti-oxidative substance through the analysis, separation and identification of natural anti-oxidative active substances in rice; (3) to cultivate the system for cultivation of high anti-oxidative active rice plants; and (4) to conduct a real research on the evaluation and selection of the high anti-oxidative activity/gene sources containing activity substances.

**1. Study on the development of rice producing technology contained high antioxidants**

## **1) The effect of nitrogen and compost application on high antioxidative component**

(1) The production and content of C3G and P3G in the colored rice varieties, Heugjinjubyeo and Heugnambyeo, increased significantly with the increase of nitrogen application level. However, the content of  $\gamma$ -oryzanol and Isovitexin and antioxidative activity which was measured by DPPH radical scavenging effect and TBA method did not show the difference among nitrogen application level.

(2) The production and the content of C3G and P3G in the colored rice varieties showed increasing tendency with the increase of compost application level, but the difference was not remarkable compared to the results of nitrogen application level. Besides, the content of  $\gamma$ -oryzanol and Isovitexin and antioxidative activity which was measured by DPPH radical scavenging and TBA method were not significantly different among compost application level.

(3) The C3G content of colored rice varieties decreased significantly as ripening time was prolonged from 40 to 80 days after heading. Besides, this tendency was more remarkable in Heugnambyeo than Heugjinjubyeo. Therefore, it was thought that the colored rice varieties should be harvested during 40~50 days after heading to increase the production of high antioxidative component.

(4) In Heugnambyeo and Heugjinjubyeo cultivated under the natural condition, the C3G content was in the range of 182~839mg/brown rice 100g and 1.5~284mg/brown rice 100g. Besides, antioxidative activity which was indicated by DPPH and TBA inhibition rate was in the range of 69.1~82.5%, 61.3~82.3%.

(5) The content of C3G, P3G and Isovitexin was not detected in Ilpumbyeo. However,  $\gamma$ -oryzanol content, 2.6~3.0%, was higher than the colored rice varieties. Moreover, antioxidative activity which was indicated by DPPH and TBA inhibition rate was significantly lower than the colored rice varieties.

## **2) Effect of transplanting time and cultivation area on High antioxidative component.**

(1) In the colored rice varieties, the production and content of C3G were

significantly high in the common season cultivation, but those were considerably low in the early season cultivation and late season cultivation.

(2) Each rice variety showed significantly higher Oryzanol content in the different transplanting time that Heugjinjubyeo was in the late season cultivation, Heugginjubyeo in the early and late season cultivation and Ilpumbyeo in the late season cultivation. However, Oryzanol production affected by different transplanting time was not different between Heugjinjubyeo and Ilpumbyeo, and the Oryzanol production of Heugnambyeo was the highest in the early cultivation season.

(3) Heugjinjubyeo and Heugnambyeo in the common season cultivation showed the most significant antioxidative activity measured by DPPH radical scavenging effect. The antioxidative activity of Ilpumbyeo was not affected by the different transplanting time. Besides, all the varieties did not show the difference of antioxidative activity measured by TBA methods in any transplanting time.

(4) The colored rice varieties cultivated at each cultivation area showed the difference of C3G and Oryzanol content and the amount of C3G production that Heugjinjubyeo and Heugnambyeo were the highest at Sangju and Iksan area, respectively. In particular, the C3G content of Heugjinjubyeo At Sanju area was three times higher than other cultivation area.

(5) Heugjinjubyeo cultivated at Sangju area showed significantly higher value in C3G content and the amount of production, Oryzanol content, and antioxidative activity indicated by DPPH and TBA inhibition rate

(6) Heugnambyeo cultivated at Iksan area showed higher production and content of C3G. Besides, the same variety cultivated at Sangju area showed significantly higher production and content of Oryzanol and antioxidative activity indicated by TBA inhibition rate.

(7) Regardless of cultivation area, Ilpumbyeo did not show the considerable difference of Oryzanol content and production and antioxidative activity indicated by DPPH and TBA inhibition rate.

### **3) Effect of ripening temperature and Ethephon treatment**

(1) In Heugjinjubyeo and Heugnambyeo, C3G content and production and antioxidative activity measured by DPPH radical scavenging effect and TBA method were the highest at 24°C of ripening temperature and it was followed by 21°C, 27°C, 18°C.

(2) Oryzanol content was the highest in Heugjinjubyeo at 18°C and in Heugnambyeo at 27°C. However, the Oryzanol content of Ilpumbyeo did not showed significant difference in the range of 21~27°C.

(3) C3G content of Heugjinjubyeo and Heugnambyeo was increased significantly by Ethephon treatment at 100~1000ppm. However, the amount of C3G production was not affected by the treatment. Moreover, Ethephon treatment at 2000ppm reduced significantly the amount of antioxidative component production. Futhermore, Oryzanol content was not affected by Ethephon treatment at any concentration.

(4) Antioxidative activity measured by DPPH radical scavenging effect was not affected by Ethephon treatment in Heugjinjubyeo. The activity increased at higher Ethephon concentration in Heugnambyeo, but it decreased at lower Ethephon concentration in Ilpumbyeo. Besides, antioxidative activity measured by TBA method was not affected by Ethephon treatment.

## **2. Screening of antioxidative subsatnces and identification of antioxidative substances on rice varieties**

1) For assesment of Anti-oxidative Activity in vitro and Analysis of Active Substance, in the exploratory and analytic study of anti-oxidative active substances, an attempt was made to explore the anti-oxidative active substances using the ESR(Electron Spin resonance). As a result, chlorogenic acid and ferulic acid showed the higher level of SOD activity than any other substance. In analyzing anti-oxidative substances between rice plants using HPLC, an attempt was made to compare the content of chlorogenic acid, ferulic acid and isovitexin. As a result, the rice plants of high activity showed the tendency to have the high content of these substances.

2) In the SOD and POD tests and the test of electron donation power in the DPPH



method lipid peroxide in the TBA method to test anti-oxidative activity in vitro, there was a difference in activity between testing methods. But Tono Brea 439(16.0%) and Hwei Ju(12.5%) showed the high level of SOD activity, and AUS 196(96.4%) and AC 1423 (95.3%) showed the high level of POD activity. In electron donation and elimination power using the DPPH, Philippine 2(84.5%) and Hwei Ju(81.7%) showed the high rate of inhibition. And in the lipid peroxide test using the TBA method, Seungsiljo(45.6%), Hwei Ju(42.1%) showed the high rate of inhibition.

3) The separation and combination of anti-oxidative substances, the experiment of comparing and testing brown rice extract activity, it showed the high level of anti-oxidative activity.

4) The physio-chemical properties of 80% MeOH extracts included stability to pH and heat and high activity of extracts such as EtOAc and BuOH and the like. An attempt was made to extract the substances of ferulic acid using open column chromatography, flash column chromatography, TLC and UV and check them using EI/MS. As a result, it was identified as the substance with the molecular weight of 194 and the molecular formula of  $C_{10}H_{10}O_4$ . The result of HPL analysis showed the purity of 99.7% and the standard measurement line equation  $y = 1.77588x + 0.034198$ .

5) In the test of activity using the identified substances, when purely separated and refined ferulic acid was used, it showed SOD activity(17% and 67%) in ESR and DPPH methods, respectively. In the test of the radical elimination power( $RC_{50}$ ), it showed the high level of inhibition compared to ferulic acid and BHT used as the control group in 36ug/ml. An attempt was made to treat PC12 cells in  $H_2O_2$  for 30 minutes and in dopamine for 24 hours. In the cytotoxicity assay using PC12, the ferulic acid showed the effect of defense from cell death caused by  $H_2O_2$  and dopamine. As a result, it was found that the survival rate of cell reduced as the concentration increased.

6) In the assesment of anti-oxidative activity in vivo the results were as follows; in experiment I, II and III, weight gain decreased significantly in the ethanol-treated group as compared with saline solution-treated group and glucose-treated group. But there was no significant difference in weight gain in the rice extract-treated group as compare with the ethanol-treated group in experiment I and II. In experiment III,

weight gain increased significantly in Jakwangchalbyeo extract-treated group as compared with the ethanol-treated group.

7) In experiment I, II and III, serum GOT, GPT, Total cholesterol, HDL and LDL were not affected by the doses of rice extract and ethanol used in this study. In experiment I and III, serum GPx, and blood GSH/GSSG were not affected by the doses of rice extract and ethanol used in this study.

8) The MDA levels in liver, brain and pancreas tissue were decreased to a certain extents in the rice extract-treated group as compared with ethanol-treated group. The LOOH level was somehow decreased in the rice extract-treated group as compared with ethanol-treated control group.

9) The decreased liver, brain and pancreas GST activities induced by ethanol treatment were somehow restored by administration of rice extracts. The ethanol-induced decrement in liver, brain and pancreas GSH level was slightly recovered by rice extracts.

10) The Jakwangchalbyeo extract in experiment I, II and III, the Chalbyeo extract in experiment III and the Ilpumbyeo extract in experiment I and III are supposed to partially prevent ethanol-induced oxidative stress. However, to characterize the biological activities of rice extracts more clearly, further studies should be performed with various experimental designs, such as changes in the route of administration and dosages.

### **3. Crossing and line selection for development of antioxidative activity rice varieties**

1) Lines to breed varieties with high antioxidative activity were selected in this study. 118 lines were selected as high Cyanidin-3-Glucoside(C3G) content line in Heugjinjubyeo/Milyang153, Heugjinjubyeo/Suweon425 and Heugjinjubyeo/Jinbuchalbyeo cross were studied. Out of them, a lot of lines were 20~30% higher than cultivated varieties in C3G content. Using SOD and ESR peak, 78 lines were selected as high antioxidative activity line in Ansanbyeo/Gawichal and Heugnambyeo/Gawichal cross. And 111 lines were selected as lines had simultaneous giant embryo and high C3G content in Heugjinjubyeo/Geodaebae and Heugjinjubyeo/Geodaebae cross.

2) C3G content had a quantitative character which is controlled by a lot of genes. Milyang153, Suweon425, Yeonnonngheung1 and HeungmiH31 were estimated that they had many multiple gene which act additively with C3G related gene of Heungjinjubyeo, while HeiBao not had. Jajinbyeo and Juksaekchal with red pericarp, and Aranghyangchal with light-yellow pericarp were estimated with multiple gene.

3) Heungjinjubyeo, Milyang153, Suweon425, Yeonnonngheung1, HeungmiH31 and HeiBao had same gene to control pericarp color gene. Nonallerism exist between genes related to black purple and red pericarp color, and Chroma value controled a few major genes.

4) Individual selection efficiency for C3G content and antioxidative acitivity in F<sub>3</sub> was recognized.

5) b-value showed high negative relationship with C3G content and andioxidative activity index. This indicate that b-value can used as selection index of C3G content and antioxidative activity of individuals.

6) When ESR peak were used to test antioxidative activity in colored rice lines, diluted solution was over 20 times more effective to select high antioxdative activity lines.

7) RM469, RM204, RM217 and RM317 were selected as primer that showed difference in band by presence of pericarp color of rice grain and C3G content of rice. Among them, RM469, RM204, RM217 were located on chromosome 6, and RM317 was located on chromosome 4. RM317 was marker that classify black-purple or red-purple pericarp color line.

#### **4. Evaluation and selection of rice germplasm containing high antioxidative activity and substance**

This study was undertaken to evaluate and select rice varieties containing high antioxidative substances. Antioxidative activity was measured by values of SOD, POD, DPPH, TBA, ESR, and total phenolic compound.

1) In local and ecological type, varieties used in this study were one indica variety (1%), 96 japonica varieties (94%), 5 javanica varieties (5%). The 102 rice varieties

ranged from 69.2cm to 122.4cm in culm length, from 16.5cm to 30.4cm in ear length and from 7.7 to 21.0 in panicle number. Also, the color of seed coat showed 93 white (91.1%), 5 red (4.9%), 2 light brown (2%), and 2 brown (2%) on rice varieties.

2) Agudo (30.2%) had the highest SOD activity, followed by Jaeraeryukdo (27.7%), Bandalbyeo (27.4%). The Jeokdo (90.7%) and Noindari (90.4%) showed the highest DPPH inhibitory rate and the extract exhibited highest in Gawichal (5.2%) and Hwasungbatchal (5.2%).

3) The Jangsamdo (32.8%) was the highest activity in SOD activity, Sancheongdo (45.2%) had the highest POD activity, also in DPPH, IARI 10560 (90.1%) showed the highest inhibition.

4) In this study, the results was showed that low fertilizer group (50%) was higher inhibition (41.8%) than other groups. Also, high (150%), normal (100%), and none (0%) fertilizer groups were showed 41.7%, 39.1%, and 39.4% inhibition, respectively. In fertilizer application level, antioxidant activity of Siga-Chata Mochi (49.5%) was the highest. The content of total phenolic acid was increased in normal (100%) and none (0%) in fertilizer group. The colored rice (Hwei Ju, AUS 196, Siga-Chata Mochi) was higher than common rice in content of total phenolic acids.

5) The Jinnibyeyo was the highest SOD activity (34.6%), In free radical scavenging by DPPH method, heughyangbyeyo had higer activity than other varities. jinbuolbyeyo was showd 55.5% extact rate.

# CONTENTS

Summary .....	2
Contents .....	24
Chapter 1. Outline of the report on development of research .....	28
Section 1. Objectives and necessities of the development of research .....	28
1. Objectives of research .....	28
2. Necessities of the development of research .....	28
1) Technical scope .....	28
2) Economical scope .....	29
3) Social scope .....	30
Section 2. Scope of research .....	30
Chapter 2. Status of research in Korea and other countries .....	32
Section 1. Status of the development of related techniques in Korea and other countries .....	32
1. Recent research trend in Korea .....	32
2. Recent research trend in other countries .....	33
Section 2. Position of the outcome of the research at the present status of progress .....	34
Chapter 3. Contents and products of the development of research .....	35
Section 1. Study on the development of rice producing technology contained high antioxidants .....	35
1. Introduction .....	35
2. Materials and methods .....	36
1) Study of fertilizer application levels involved with high antioxidants .....	36
2) Study of cultivation condition involved with high antioxidants .....	39
3) Study of production environment condition involved with high antioxidants .....	42

3. Results and discussion .....	44
1) Study of different fertilization involved with high antioxidants .....	44
2) Study of cultivation condition involved with high antioxidants .....	56
3) Study of production environment condition involved with high antioxidants .....	65
4. Conclusion .....	73
5. References .....	77
Section 2. Screening of antioxidative subsatnces and identification of antioxidative substances on rice varieties .....	81
1. Introduction .....	81
2. Materials and methods .....	84
1) Screening of antioxidative subsatnces and antioxidative activity test <i>in vitro</i> on rice varieties .....	84
2) Separation and identification of antioxidative substances on rice varieties .....	90
3) Comparition of antioxidative activity on identified antioxidative compound from rice grain .....	103
4) Antioxidative activity test <i>in vivo</i> .....	105
3. Results and discussion .....	116
1) Screening of antioxidative subsatnces and antioxidative activity test <i>in vitro</i> on rice varieties .....	116
2) Separation and identification of antioxidative substances on rice varieties .....	125
3) Comparition of antioxidative activity on identified antioxidative compound from rice grain .....	134
4) Antioxidative activity test <i>in vivo</i> .....	139
4. Conclusion .....	153
5. References .....	156
Section 3. Crossing and line selection for development of antioxidative activity rice varieties .....	159

1. Introduction .....	159
2. Materials and methods .....	160
1) Rice breeding of high antioxidative activity lines .....	160
2) Genetic segregation of chroma value and C3G content of rice grain in segregating population .....	162
3) Selection efficiency for C3G content and antioxidative activity .....	163
4) Development of selection index and molecular marker for antioxidative activity .....	164
3. Results and discussion .....	165
1) Breeding of antioxidative activity lines .....	165
2) Genetic segregation of chroma value and C3G content of rice grain in segregating population .....	170
3) Selection efficiency for C3G content and antioxidative activity .....	178
4) Development of selection index and molecular marker for antioxidative activity .....	181
4. Conclusion .....	187
5. References .....	189
Section 4. Evaluation and selection of rice germplasm containing high antioxidative activity and substance .....	191
1. Introduction .....	191
2. Materials and methods .....	192
1) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on local rice variety .....	192
2) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on local, exotic, and colored rice variety and test of antioxidative activity and analysis of antioxidative substances (total phenolic acid contents) as fertilizer application level on selected varieties .....	196
3) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on cultivated rice variety .....	202
3. Results and discussion .....	204

1) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on local rice variety .....	204
2) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on local, exotic, and colored rice variety and test of antioxidative activity and analysis of antioxidative substances (total phenolic acid contents) as fertilizer application level on selected varieties .....	209
3) Test of antioxidative activity and selection of high antioxidative variety on cultivated rice variety .....	219
4. Conclusion .....	224
5. References .....	225
Chapter 4. Achievements and contributions of the studies to the related fields .....	230
Section 1. 1st year of the research .....	230
1. Objectives of the research .....	230
2. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research .....	232
3. Contributions to technical development in related areas .....	232
Section 2. 2nd year of the research .....	233
1. Objectives of the research .....	233
2. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research .....	234
3. Contributions to technical development in related areas .....	235
Section 3. 3th year of the research .....	236
1. Objectives of the research .....	236
2. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research .....	237
3. Contributions to technical development in related areas .....	238
Section 4. Scientific contribution of the research .....	239
Chapter 5. Plans for the applications of the research .....	240
Section 1. Necessities for further research .....	240
Section 2. Applications to other studies .....	241
Section 3. Plans for industrialization .....	241
Chapter 6. Informations on scientific techniques at other countries .....	242



## 목 차

요약문 .....	2
목 차 .....	24
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>28</b>
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	28
1. 연구의 목적 .....	28
2. 연구개발의 필요성 .....	28
가. 기술적 측면 .....	28
나. 경제·산업적 측면 .....	29
다. 사회·문화적 측면 .....	30
제 2 절. 연구개발 범위 .....	30
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>32</b>
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황 .....	32
1. 국내연구동향 .....	32
2. 국외연구동향 .....	33
제 2 절. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 .....	34
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>35</b>
<b>제 1 절 고탄산화물질 함유 쌀 생산 기술 개발연구</b> .....	<b>35</b>
1. 서언 .....	35
2. 연구방법 및 내용 .....	36
가. 고탄산화성분 관련 시비조건 구명 .....	36
나. 고탄산화성분 관련 재배조건 구명 .....	39
다. 고탄산화성분 관련 생산환경조건 구명 .....	42
3. 연구결과 .....	44
가. 고탄산화성분 관련 시비조건 구명 .....	44

나. 고허산화성분 관련 재배조건 구명 .....	56
다. 고허산화성분 관련 생산환경조건 구명 .....	65
4. 결과요약 .....	73
5. 참고문헌 .....	77
<b>제 2 절 벼 항산화물질 탐색 및 항산화물질 분리 및 동정 .....</b>	<b>81</b>
1. 서언 .....	81
2. 연구방법 및 내용 .....	84
가. 벼 항산화 활성물질 탐색 및 <i>in vitro</i> 항산화 활성 검정 .....	84
나. 벼 항산화 활성관련 물질의 분리 및 동정 .....	90
다. 분리 동정된 항산화물질의 항산화 활성비교 .....	103
라. <i>In vivo</i> 에서의 항산화 활성 검정 .....	105
3. 연구결과 .....	116
가. 벼 항산화 활성물질 탐색 및 <i>in vitro</i> 항산화 활성 검정 .....	116
나. 벼 항산화 활성관련 물질의 분리 및 동정 .....	125
다. 분리 동정된 항산화물질의 항산화 활성비교 .....	134
라. <i>In vivo</i> 에서의 항산화 활성 검정 .....	139
4. 결과요약 .....	153
5. 참고문헌 .....	156
<b>제 3 절 고허산화활성 품종육성을 위한 벼 계통육성 연구 .....</b>	<b>159</b>
1. 서언 .....	159
2. 연구방법 및 내용 .....	160
가. 고허산화 활성 계통육성 .....	160
나. 잡종집단에서 현미의 색도와 C3G함량의 유전분리 .....	162
다. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율 .....	163
라. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발 .....	164
3. 연구결과 .....	165
가. 고허산화 활성 계통육성 .....	165
나. 잡종집단에서 현미의 색도와 C3G함량의 유전분리 .....	170

다. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율 .....	178
라. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발 .....	181
4. 결과요약 .....	187
5. 참고문헌 .....	189
<b>제 4 절 고향산화활성·활성물질함유 유전자원평가 및 선발연구 .....</b>	<b>191</b>
1. 서언 .....	191
2. 연구방법 및 내용 .....	192
가. 재래종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발 시험 .....	192
나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석 (총 phenolic acids 함량)시험 .....	196
다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발 시험 .....	202
3. 연구결과 .....	204
가. 재래종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발 시험 .....	204
나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석 (총 phenolic acids 함량)시험 .....	209
다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발 시험 .....	219
4. 결과요약 .....	224
5. 참고문헌 .....	225
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>230</b>
<b>제 1 절 1차년도 .....</b>	<b>230</b>
1. 연구개발 목표 .....	230
2. 연구 평가의 착안점 및 달성도 .....	232
3. 관련분야 기술 발전에의 기여도 .....	232
<b>제 2 절 2차년도 .....</b>	<b>233</b>
1. 연구개발 목표 .....	233
2. 연구 평가의 착안점 및 달성도 .....	234

3. 관련분야 기술 발전에의 기여도 .....	235
제 3 절 3차년도 .....	236
1. 연구개발 목표 .....	236
2. 연구 평가의 착안점 및 달성도 .....	237
3. 관련분야 기술 발전에의 기여도 .....	238
제 4 절 학문 발전에의 기여도 .....	239
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>240</b>
제 1 절 추가 연구의 필요성 .....	240
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	241
제 3 절 기업화 추진 방향 .....	241
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>242</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구의 목적

항산화활성과 같은 생리적 기능성이 강화된 쌀의 생산 유통은 WTO 개방체제 하에서 우리 농업의 발전에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되므로 이에 대한 연구가 시급히 이루어질 필요가 있다. 즉 우리의 농업은 농지가격이 비싸고 농촌의 노임이 높으며 경작지가 협소하여 고소득 작물만이 재배에 적합한 구조를 가지고 있다. 따라서 그 동안의 일반 영양소 소재를 생산하는 농업으로는 수지를 맞출 수 없으므로 사회적으로 수요가 높은 생리적 기능성을 함유한 기능성 식품소재의 생산은 고소득 농업에 아주 적합한 분야이다. 특히 인간의 건강을 증진시키는 기능성 성분이 밝혀지면 이 성분을 다량 함유한 작물의 재배에 주력함은 물론 나아가서 이 성분을 다량 함유하도록 작물을 육종하는 소위 “고기능성 품종 육종(기능성 강화 품종)” 등의 노력 및 천연 기능성 물질을 개발할 수도 있을 것이다. 따라서 쌀에도 항산화물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으므로 1) 벼 재배조건에 따른 항산화 물질을 조사 분석하여 최적 재배환경 및 생산기술 구명, 2) 쌀 천연항산화활성물질 분석 및 분리·동정으로 천연항산화 물질개발, 3) 고향산화활성 벼 품종 육성을 위한 계통 육성, 4) 고향산화활성·활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발 등을 연구 목적으로 하였다. 이러한 연구를 통하여 쌀을 이용한 가공식품의 고급화가 이루어져 국내 생산 쌀의 부가가치를 높이는 것이 본 연구의 최종적인 목표이다.

#### 2. 연구개발의 필요성

##### 가. 기술적 측면

1) 우리나라의 벼의 수량성, 재배안정성 및 식미특성 등의 품종개발능력은 세계 제1의 선진국 수준을 유지하고 있으나 특이한 기능을 가진 또는 기능성이 강화된 벼 품종개발 노력은 미약한 실정이다.

2) 최근 쌀에 항산화능력을 비롯하여 항암성·항변이원성 등의 생리활성을 갖는 물질들이 함유되어 있는 것이 밝혀져 주목을 받고 있다. 쌀의 항산화능력에 관여하는 isovitexin, chrysanthemine(cyanidin-3-glucoside: C-3-G), oryzanol 등에 대한 연구가 활발하게 진행되고

있으나 작물을 직접 개량 재배 생산하는 농학적인 측면에서의 체계적인 분석법이나 실용적 연구가 국내외적으로 극히 부진하여 이에 대한 연구의 필요성이 크게 부각되고 있다.

3) 쌀의 기능성물질, isovitexin, chrysanthem(C-3-G), oryzanol 함량은 품종 및 재배환경에 따라 다양한 변이를 보일 것으로 추측된다. 본 연구팀이 최근 쌀의 항산화활성 및 isovitexin 함량을 조사한 결과 품종 및 연차간 변이가 크다는 것을 알 수 있었다. 따라서 항산화활성 및 isovitexin 등 생리활성물질 함량이 높은 계통을 선발하여 생리활성이 높은 품종을 육성하고 이러한 품종들이 일정수준 이상의 수량성을 유지하면서도 높은 생리활성을 유지 할 수 있는 재배기술을 확립하는 것이 중요한 신기술이 될 것이라는 것을 확신한다. 한편 이제까지 알려진 isovitexin, chrysanthem(C-3-G), oryzanol 등 활성물질 이외도 더욱 강력한 항산화물질이 존재 할 것으로 생각되므로 이에 대한 연구가 필요하다.

4) 항산화물질의 생물검정 특히 쌀에 함유된 물질의 정확한 기능평가가 필요하다. 동물실험의 결과가 인체에서 발현되지 않은 경우가 많아 특히 기능성 식품들은 그 효능이 의약품처럼 직접적이고 강력하지 못한 경우가 많고 장기간 섭취해야 효과가 나타나는 예가 많으므로 동물실험에서 믿을 수 있는 결과를 충분히 얻기 위해서는 과학적인 실험설계가 필수적이겠다.

#### 나. 경제·산업적 측면

1) 쌀은 우리나라 국민의 주요 식량으로 경제·사회적인 가치가 국내 농업분야에서는 가장 크지만 장기적으로 그 재배면적이 점차 감소될 것으로 전망된다. 그러나 일정면적 이상의 벼를 재배하는 일은 식량 안보적 차원에서 쌀의 안정적 자급형태유지에 절대적으로 필요하며, 쌀의 안정적인 공급은 채소, 육류 등 부식농산물의 안정적인 수요 창출을 유도함으로써 농가경제는 물론 국가경제의 안정화에 크게 기여할 것이다.

2) 농업신소재개발 등의 기술은 최근 세계 각국의 기술보호정책에 따라 그 도입이나 이용이 매우 어려우므로 우리나라 환경에 가장 적합한 용도 적응성을 가진 벼 신소재를 개발 육성하는 것이 국제경쟁력을 갖추는 첩경이 될 것이다.

3) 생리적 기능성이 강화된 쌀 생산에 의한 쌀의 신수요 창출과 가공산업의 활성화는 식량산업의 국제경쟁력에 절대적으로 필요한 정책과제이다.

4) 고향산화생리활성 쌀 생산기술을 개발함으로써 농가 소득증대에 기여하며 그런 쌀을 이용함으로써 활성산소(active oxygen) 관련 질환의 예방 및 개선법의 개발로 직·간접적인 의료비를 절감 할 수 있으며 새로운 기능성 항산화제의 개발로 대부분 수입에 의존하

고 있는 항산화제에 대한 수입대체 효과가 클 뿐만 아니라 수출상품으로서도 매우 크게 기여 할 수 있을 것이다.

5) 생리활성물질의 함량이 높은 계통을 선발할 때 HPLC·GC 등 고가장비 및 고급시약이 필요하며, 특성조사과정이 복잡하여 많은 노력과 시간이 요구되므로, DNA 표지인자를 이용하여 그 노력 및 비용을 절감 할 필요가 있다.

#### **다. 사회·문화적 측면**

1) 쌀의 자급생산 기반을 지키는 것은 국민정서에 부합될 뿐 아니라, 문순 기후대에 위치한 우리나라 자연환경에 가장 적합한 국토이용 및 보존방법이 되므로 이를 위한 첨단 연구가 필요하다.

2) 논이 가지고 있는 홍수조절, 지하수의 공급, 환경정화 등의 공익적인 기능을 유지하면서 수천년간 이어 내려온 한국의 쌀 전통문화를 이어 가기 위하여 벼농사의 유지·발전이 절대적으로 필요하며 이를 위하여 벼에 대한 부단한 연구가 필요하다.

3) 국민건강 유지 및 품질이 우수한 전통가공 식품의 생산에 기여함으로써 소비자에게 우리 쌀의 우수성을 인식시킬 필요가 있다..

4) 고생리활성 쌀 생산 기술 개발에 의한 우리 쌀의 우수성을 널리 알림으로써 쌀 재배농가의 생산의욕 고취 및 외국산 쌀 수입억제와 식량생산 기반 붕괴를 방지 할 수 있을 것이다.

5) 사회적으로 편의성이 강조되어 간편식품과 가공식품의 수요량이 증가하고 건강에 대한 관심이 커져 각종 건강증진 기능성 식품의 수요도 늘어나고 있는 추세다. 그 동안 밥 짓는데 주로 이용해 왔던 쌀을 가공식품 또는 건강증진 기능성 식품의 소재로 이용해야 할 필요성이 증대되고 있으므로 미래의 수요 변화에 대응한 생산기술 개발이 필요한 시점이다.

## **제 2 절. 연구개발 범위**

### **1. 고허산화물질 함유 쌀 생산 기술 개발연구**

가. 고허산화성분 관련 시비조건 구명

나. 고허산화성분 관련 재배조건 구명

다. 고허산화성분 관련 생산환경조건 구명

## 2. 벼 항산화활성 물질 탐색 및 항산화활성물질 분리 및 동정

- 가. 항산화활성 물질 탐색 및 *in vitro* 항산화활성 검정
- 나. 항산화활성 물질 추출 및 분리
- 다. 분리·정제된 활성물질의 항산화활성 비교
- 라. *In vivo* 항산화활성 검정

## 3. 고허산화활성 벼 계통 육성

- 가. 고허산화 활성 계통육성
- 나. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율
- 다. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발

## 4. 고허산화활성·활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발

- 가. 재래종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험
- 나. 외국종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석(총 phenolic acids 함량 시험)
- 다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 국내연구동향

가. 그간 우리나라에는 수많은 벼 장려품종이 육성 보급되어 주로 벼 품종간 전분의 이화학적 특성 차이가 연구되었는데 메벼 종실의 배유 및 배 돌연변이체 중 dull 계통의 쌀은 아밀로스 함량이 아주 낮아 전분의 점성이 강하고 팽화성이 크므로 제과용이나 스낵 식품의 원료가 될 수 있고, 분상질 변이 계통의 쌀은 수분흡수율이 높고 호화특성이 달라 증편제조 시 부품성이 크고 알콜 발효시 당도저하가 빠르며 알콜 생산량도 많아 그 이용성이 크다고 알려져 있다. 이 밖에도 sugary 유전자를 가진 고당미 계통 쌀은 sucrose, glucose, fructose 함량이 많고, 거대배(giant embryo) 변이계통 쌀은 지방함량, 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및  $\alpha$ -tocopherol 생산량이 많아 건강식품의 재료로 유망하다는 것이 밝혀졌으나 고기능성함유 품종육성으로까지는 아직 연결시키지 못하고 있는 실정이다.

나. 유색미의 재배 및 생산과 관련된 연구로 유색미의 이앙시기·질소시비량·재식밀도에 따른 생육과 수량, 이앙시기 및 질소시비량이 유색미 품종의 건물생산에 미치는 영향 등이 있으나 항산화성분에 미치는 영향은 연구가 미비한 실정이다.

다. 튀김성이 좋고 튀김정립율이 높은 대립벼 1호는 유과 및 강정재료로 좋고, 향미벼 1호와 같이 구수한 향이 나는 품종의 쌀은 식혜제조에 유리하며, 현미 과피가 자색 또는 적색으로 착색되는 유색미(black rice)품종은 항산화활성(antioxidative activity)물질, 항변이원성(antimutagenetic activity)물질을 함유하고 있는 것으로 밝혀지는 등 가공적성 다양화를 위한 많은 기초연구가 부분적으로 발표되었으나 이를 고생리활성 함유 쌀 생산으로 연결시키지 못했다.

라. 국내에서 본 연구와 관련된 연구를 지난 몇 년간 수행된 농림수산기술개발과제를 중심으로 살펴보면 주로 자원식물, 고유식품을 대상으로 기능성 인자의 탐색과 평가가 이루어져 있을 뿐 우리의 주식인 식량작물 특히 벼에 대한 기능성 즉 고허산화활성·활성물질 함유 쌀 생산에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

## 2. 국외연구동향

가. 우리와 같은 특성의 쌀을 좋아하는 일본에서는 멥쌀을 포함한 미립의 특성과 가공적 성과의 관계에 많은 기초연구가 이루어져, 이미 술쌀 또는 떡살용 품종이 육성되고 있다.

나. 주로 가공용 수요에 부응하기 위하여 수요확대를 위한 신형질 쌀의 개발 계획하에 초저아밀로스, 고아밀로스, 초다수쌀, 거대립쌀, 향미, 당질미, 거대배, 유색미, 분질미, 고단백미, 저단백미 품종을 개발 중에 있고 일부는 품종으로 명명되어 농가에 보급되고 있다.

다. 쌀 생리활성물질의 유효성분에 대한 연구는 일본을 중심으로 이루어져 왔는데 최근에는 low allergy 쌀(AFT-14), 혈당을 저하시키는 쌀 등 기능성 품종을 육성하고 있다.

표 1-1. 고허산화활성과 관련된 국내·외 기술수준 비교표

연 구 기 술 분 야	국 외(일본)	국 내
고항산화활성 · 활성물질 함유 벼 품종 유전자원 탐색 및 보관	전세계 벼품종의 수집 및 보관체계 수립	체계 확립된 것이 거의 전무함
검정방법 개발	각종 선택적인 screening 방법의 개발 이용	부분적으로 선택적인 screening 방법을 이용함
고항산화활성 쌀 생산기술	아주 미흡	아주 미흡
고항산화활성품종 육성	일본에서 연구중(초보적)	극히 부진함
항산화활성물질의 분리 · 정제	각종 생리활성물질의 분리 정제 방법의 개발 및 이용	각종 분리 · 정제 방법의 이용은 초보적 단계
구조 분석	소량의 시료를 사용하여 구조 분석 가능  새로운 물질의 구조해석 경험이 많음	각종 분석기기 도입중  새로운 물질의 구조해석 경험이 적음

## 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

### 1. 농가소득 증대와 쌀 산업 활성화에 기여

가. 고향산화활성 쌀이 생산되어 가공산업체와 농가간의 계약 재배면적이 증가하여 농가의 안정적 소득이 보장될 것이다.

나. 지금까지 우리 나라 벼 재배는 상업적이라고 보기 어려웠으나 앞으로는 상업성이 추가된 쌀 산업으로 변화할 것인데 고향산화활성 벼 재배는 그 높은 부가가치성 때문에 쌀 산업의 활성화를 촉진할 것이다.

다. 본 연구결과는 새로운 형태의 기능성 식품 및 천연화합물 개발에 직접 활용 될 수 있다.

라. 다양한 천연물로부터 향산화활성물질의 screening법의 개발은 다른 생리 활성 물질의 검색에도 활용할 수 있다.

마. 생체내에서 극미량으로 존재하는 과산화물질을 정량적으로 분석하는 기법을 활용하여 free radical 관련 각종 질병의 발병 mechanism을 규명할 수 있다.

바. 생체내 미량성분을 정량적으로 분석할 수 있는 기초 자료에 활용할 수 있다.

사. 순수분리 정제된 향산화물질을 식품에 첨가함으로써 식품의 산화 안정성을 높여 식품의 품질향상에 기여할 수 있다.

### 2. 쌀 가공식품의 고급화 및 다양화를 유도

가. 현재까지는 각종 기능성 건강식품의 원료가 되는 쌀은 그 특성을 거의 고려하지 않았으나 앞으로는 용도별로 가장 알맞은 기능성을 가진 원료 쌀을 이용한 고급 가공식품이 생산될 수 있다.

나. 특수한 건강 기능성 물질을 다량 함유하고 있는 벼 신소재를 이용하여 각종 건강식품 또는 건강증진제품이 만들어 질 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 고향산화물질 함유 쌀 생산 기술 개발연구

#### 1. 서언

근래 소비자들의 쌀 소비 성향이 품질의 다양화와 고급화를 추구함에 따라 입맛의 다양한 변화에 따른 시각, 미각, 영양학적 품질이 요구되고 있다. 또한 식품에 있어서 다양성 및 기능성에 대한 관심이 증가함에 따라 쌀에 있어서도 다양한 특수미가 개발되고 있다. 특히, 일본의 경우에는 이미 거대배아미, 고아밀로오스미, 저아밀로오스미, 저단백질미, 저알러지미, 향미, 흑미 등 다양한 특수미가 개발되어 상품화 되었다. 미국에서도 “듀크대학의 쌀 다이어트 프로그램”, “쌀밥을 이용한 알레르기 치료효과” 등 의학적으로도 쌀의 우수성이 입증되면서 앞으로 쌀은 주식용뿐만 아니라 다양한 가공식품 및 의약품으로의 활용도가 높아질 것으로 기대되고 있다.

이와 관련하여 최근 우리나라에서는 유색미에 대한 관심이 높아지고 있다. 우리나라에서 유통되고 있는 유색미는 흑미, 적미, 그리고 적미와 색이 유사하나 향이 강한 홍향미 등 3종류로 분류되며 대부분 취반시 백미와 혼용하는 일종의 잡곡의 형태로 이용되고 있다. 그러나 최근 기능성 쌀에 대한 관심이 높아지면서 유색미와 쌀가공식품 제조를 위한 가공적성 검정에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다.

유색미는 적갈색, 흑자색에 이르는 다양한 천연색소를 함유하고 있는데, 일반적으로 흑자색계 쌀에는 안토시아닌계 색소가 다량 함유되어 있으며, 적갈색계 쌀에는 탄닌계 색소가 포함되어 있는 것으로 알려지고 있다(최 등, 1996; 오 등, 1996). 안토시아닌계 색소는 항산화 기능(남 등, 2002; 류 등, 2000; Jung et al, 2000), 항암억제 기능(남 등, 1997; 남 등, 1998), 돌연변이억제(강 등, 2002) 등 기능성이 높아 인체의 면역기능을 강화시켜 노화방지, 질병예방 등에 효과가 높아 식품학적으로 이용 가치가 높은 것으로 보고되어 있다. 탄닌계 색소도 금속이온 및 염기성 화합물과의 결합에 의하여 유해성 중금속의 제거하고 변이원 물질 생성을 억제시키는 등의 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(남 등, 2002). 또한 대부분의 유색미는 현미상태로 식이섬유를 다량 함유하고 있으며 각종 단백질, 불포화지방산 및 미네랄과 비타민 등이 풍부하여 영양학적으로도 우수하다(이 등, 2002; 김 등, 1998; 고 등,

1996).

최근 유색미의 일반성분과 화학구조에 관한 연구, 색소 추출법, 색소의 기능성, 색소의 특성 및 항산화 활성 분석에 관한 연구 등은 이루어져 있으나 재배조건에 관한 연구는 취약하다. 본 연구팀은 예비실험을 통해 대부분의 유색미 품종들이 이앙시기, 수확시기, 기상조건 등 재배여건에 따라 수확량 뿐만 아니라 색소함량, 항산화활성도에 큰 차이가 있는 것을 확인하였다. 그러나 최근에 육성되기 시작한 유색미 품종들은 아직 재배법이 명확히 확립되지 않아 각각의 품종들이 지니고 있는 고유의 특성이 제대로 발휘되지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 유색미 품종을 포함한 벼 품종의 고향산화성분과 관련 시비조건, 재배조건, 생산환경조건 등을 검토하여 유색미가 식용뿐 아니라 기능성 신소재로서 산업화 할 수 있는 기초 자료를 제시하고자 하였다.

## 2. 연구방법 및 내용

### 가. 고향산화성분 관련 시비조건 구명

#### 1) 질소수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

##### 가) 실험처리

질소수준에 따른 벼의 항산화성분의 변이를 구명하고자 유색미 품종으로 흑진주벼와 흑남벼를, 일반 자포니카 품종으로 일품벼를 공시하여 실험을 수행하였다. 질소 수준은 0.5배비구(0.5N), 표준비구(1N), 1.5배비구(1.5N)의 3처리로 하였다. 그리고 항산화성분이 수확시기에 따라 달라질 것으로 예상하여 수확시기를 40일, 50일, 60일, 70일, 80일로 하였다. 질소수준을 주구, 수확시기를 세구로 하는 포장시험 분할구 배치 3반복으로 수행하였다. 2000년 충청남도 천안시에 위치한 단국대학교 생명자원과학대학 수도포장에서 실시하였다.

##### 나) 재배방법

2000년 4월30일 육묘상자당 130g을 파종하여 30일간 육묘 후 5월30일에 재식거리 30×15cm로 1주 3본씩 손이앙하였다. 시비량은 질소, 인산 및 가리를 요소, 용성인비 및 염화가리로 11-7-8kg/10a을 사용하였다. 질소는 기비 : 분얼비 : 수비를 50 : 30 : 20%로 분시하였고, 가리는 기비 : 수비를 70 : 30%로 분시하였으며 인산은 전량 기비로 사용하였다. 물관리는 5~10cm의 담수심을 유지하였고, 7월2일부터 10일간 중간낙수를 실시하였으며 10월3일 완전낙수하였다. 제초와 병충해방제 및 기타 재배관리는 단국대학교 표준경종법에 준하였다.

#### 다) 생육 및 수량 조사

벼의 생육은 유효분얼기와 유수형성기에 초장 및 분얼수를 조사하였다. 벼 수량은 출수후 50일에 각 처리당 10주를 수확하여 3반복으로 조사하였고, 수량구성요소는 10주를 대상으로 단위면적당 수수, 수당립수, 천립중 및 등숙율을 조사하였다.

#### 라) 항산화성분 분석

항산화성분 분석은 분석의 정확을 기하기 위하여 벼 출수 직후에 매 이삭 마다 출수기를 표시한 후 정확하게 출수 후 40, 50, 60, 70, 80일이 되도록 이삭별로 분석시료를 채취하였다. 분석항목은 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside(C3G)와 Peonidin-3-glucoside(P3G), Oryzanol, Isovitexin, DPPH법에 의한 항산화활성 검정, TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 검정의 6항목이었다.

(1) 안토시아닌 분석 : 곱게 분쇄한 현미가루 2g을 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) - 95% Ethanol 용매 20ml로 4시간씩 3회에 걸쳐 상온에서 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 회전감압농축기로 농축하였으며, 최종 25ml로 정량하여 분석하였다. C3G와 P3G의 표준물질은 미국 Indo Fine Chemical Company Co.로부터 구입하여 검량선을 작성하여 계산하였다. 종피에 함유된 안토시아닌 색소 가운데 C3G와 P3G의 함량은 HPLC(Waters 501 pump, millipore gradient Controller, waters 480 UV-Vis detector)로 분석하였다. HPLC 분석에서 컬럼은 ODS-5(4.6mm X 250mm, Nomura Chemical Co., Japan)를 사용하였고, 검량과장은 530nm이었으며, 이동상으로는 0.1% TFA in water ; lineas gradient, 0.1% in Acetonitrile를 사용하였고, 유속은 1.0ml/min이었다. 실험의 모든 시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다.

(2)  $\gamma$ -Oryzanol 분석 : 15ml test tube에 5ml EtOH과 0.1g ascorbic acid를 넣고 여기에 rice bran oil sample 0.1g을 넣어 80℃에서 10분간 80% KOH 0.15ml로 비누화시켰다. 비누화된 시료를 ice bath에 방치하면서 5ml water와 5ml Hexane을 첨가하고 120×g 로 1분간 원심 분리하였다. 상층은 125ml 분별깔대기에 옮겨 5ml hexane으로 2번씩 추출하였으며 hexane 층은 5ml water로 3번씩 세척하였다. 이 액을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 통과시켜 여과한 후 질소를 이용하여 증발시키고 oil sample을 1ml isooctane으로 희석하여 HPLC 시료로 이용하였다.  $\gamma$ -oryzanol의 정량분석은 HPLC (Waters 501 system)를 이용하였으며, UV-Vis(Waters 480 detectors) 330nm에서 Lichrospher Si-60 (250mm×4.6mm, 10 $\mu$ m, Alltech. Co., Ltd.)을 이용하였다. 이동상으로 A 용매는 Chloroform / Tert-butyl methyl ether(=75:15, v/v), B 용매

는 Methanol / Ammonium hydroxide / Chloroform(= 92:7:1, v/v/v)을 이용하여 linear gradient로 분석하였으며 flow rate는 0.5ml/min로 하였다.  $\gamma$ -oryzanol의 표준물질은 일본의 TCI로부터 구입하여 사용하였다.

(3) **Isovitexin 분석** : Isovitexin 분석은 처리별로 벼 10g을 MeOH 50ml로 6시간씩 3반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 회전감압농축기로 농축하였으며, 최종 25ml로 정량하여 분석하였다. Isovitexin의 표준물질은 프랑스 Extrasynthese Co.로부터 구입하여 검량선을 작성하였다. 정량은 HPLC(Waters 501 pump, millipore gradient Controller, waters 480 UV-Vis detector)를 이용하였다. HPLC Column은 Novapak C 18, red pak (10cm X 8mm, 4 $\mu$ m), 용매는 Methanol / water + 5% acetic acid (35/65, v/v), 유속은 1.5ml/min, Detector는 UV-Vis detector이었다.

(4) **항산화활성도 측정** : DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성 측정은 쌀 5g을 분쇄하여 MeOH 50ml를 가하여 24시간 3반복 추출하고 이것을 농축하여 MeOH exto를 얻었다. 추출물을 1ml의 MeOH에 녹여 1.5 X 10<sup>-4</sup>M DPPH MeOH용액 4ml를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치 후, 517nm에서 optical density를 측정하였다. 항산화효과는 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도 IC<sub>50</sub>으로 표시하였다.

TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 검사는 Mouse 간 1g에 saline 5ml를 가하여 빙냉하에서 마쇄한 다음 간 마쇄액에 saline을 가하여 10ml가 되게 하고 간 마쇄액 0.3ml에 검액 또는 증류수 0.1ml를 가한 후 TBA reagent [0.3%-2-thiobarbityric acid + 0.4% sod. dodecyl sulfate in 7.5% acetate buffer(pH 4)]를 3.7ml를 가해 잘 혼합하고 90℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 실온에 방냉시켰다. 이 반응 혼합물에 n-BuOH 4ml를 가해 추출하고 n-BuOH 층을 532nm에서 60 $\mu$ g/ml 농도로 optical density를 측정하였다. TBA 값은 생쥐 간 1g의 532nm에서의 흡광도가 0.1일 때를 1unit로 하였다.

## 2) 퇴비수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

### 가) 실험처리

퇴비수준에 따른 벼의 항산화성분의 변이를 구명하고자 유색미 품종으로 흑진주벼와 흑남벼를, 일반 자포니카 품종으로 일품벼를 공시하여 실험을 수행하였다. 퇴비수준은 일반 시비구(대조구), 500kg/10a시용구, 1000kg/10a시용구의 3처리로 하였다. 그리고 항산화성분이 수확시기에 따라 달라질 것으로 예상하여 수확시기를 40일, 50일, 60일, 70일, 80일로 하였다. 단 대조구의 시비량은 N-P-K = 12-6-7kg/10a이었고, 시용한 퇴비는 돈분 50%(N-P-K

= 0.6-0.3-0.5%), 계분 45%(N-P-K = 1.6-1.7-1.0%), 생석회 5%를 함유하는 조성이었다. 퇴비수준을 주구, 수확시기를 세구로 하는 포장시험 분할구 배치 3반복으로 수행하였다. 2000년 충청남도 천안시에 위치한 단국대학교 생명자원과학대학 수도포장에서 실시하였다.

나) 기타 : 재배방법, 생육 및 수량조사, 항산화성분 분석방법은 앞에서 언급한 바와 같이 동일하게 실시하였다.

#### 나. 고향산화성분 관련 재배조건 구명

##### 1) 이양시기가 항산화성분에 미치는 영향

###### 가) 실험처리

이양시기에 따른 벼의 항산화성분의 변이를 구명하고자 유색미 품종으로 흑진주벼와 흑남벼를, 일반 자포니카 품종으로 일품벼를 공시하여 실험을 수행하였다. 이양시기 시기는 조기재배(5월5일), 보통기재배(5월25일), 만기재배(6월15일)의 3처리로 난괴법 3반복으로 수행하였다. 2001년 충청남도 천안시에 위치한 단국대학교 생명자원과학대학 수도포장에서 실시하였다.

###### 나) 재배방법

벼 육묘는 2001년 4월28일 육묘 상자당 130g을 파종하여 30일간 육묘 후 5월28일에 재식거리 30×15cm로 1주 3본씩 손이양하였다. 시비량은 질소, 인산 및 가리를 요소, 용성인비 및 염화가리로 11-7-8kg/10a을 사용하였다. 질소는 기비 : 분얼비 : 수비를 50 : 30 : 20%로 분시하였고, 가리는 기비 : 수비를 70 : 30%로 분시하였으며 인산은 전량 기비로 사용하였다. 물관리는 5~10cm의 답수심을 유지하였고 10월1일 완전낙수하였다. 제초와 병충해방제 및 기타 재배관리는 단국대학교 표준경종법에 준하였다.

###### 다) 생육 및 수량 조사

벼의 생육은 유효분얼기와 유수형성기에 초장 및 분얼수를 조사하였고, 벼 수량조사는 출수 후 45일에 각 처리당 10주를 수확하여 3반복으로 조사하였다. 수량구성요소는 10주의 벼를 대상으로 단위면적당 수수, 수당립수, 천립중 및 등숙율을 조사하였다.

###### 라) 항산화성분 분석



항산화성분 분석은 분석의 정확을 기하기 위하여 벼 출수직후 매 이삭마다 출수기를 표시한 후 출수후 45일에 이삭별로 채취하여 분석시료로 하였다. 분석항목은 C3G, Oryzanol, 항산화활성 검정(DPPH), TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 검색의 4항목이었다.

각 항목의 분석방법은 앞에서 언급한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

## 2) 재배지역이 항산화성분에 미치는 영향

### 가) 실험처리

재배지역에 따른 벼 품종의 항산화성분 변이를 구명하고자 2001년 실시하였다. 흑진주벼, 흑남벼 및 일품벼를 공시하였으며, 기상여건이 다를 것으로 기대되는 연천(경기), 수원(경기), 상주(경북), 익산(전북), 밀양(경남) 등 5개 지역에서 난괴법 3반복으로 수행하였다. 각 지역별, 품종별 최적재배조건에서 생육되도록 하였다.

나) 재배방법 : 각 지역별 재배관리 내용은 아래와 같다.

#### (1) 연천

- 시험장소 : 경기도 연천군 신서면 도신리, 경기도농업기술원 북부농업시험장
- 과종기 : 일품벼(4월20일), 흑남벼(4월20일), 흑진주벼(5월9일)
- 이앙기 : 일품벼(5월22일), 흑남벼(5월22일), 흑진주벼(6월8일)
- 재식거리 : 30×15cm
- 시비량 : N-P-K=11-4.5-5.7kg/10a을 요소, 용성인비, 염화가리로 시비. 질소는 50 : 30 : 20%, 가리는 70 : 30%로 분시하고 인산은 전량 기비로 시비
- 기타 : 이앙직후 후라단을 살포하여 물바구미를 방제하고, 도열병 방제를 위하여 7월6일, 빔 수화제 살포. 기타 재배관리는 연천지역 표준재배에 의함

#### (2) 수원

- 시험장소 : 경기도 화성시 태안읍 기산리, 경기도농업기술원 포장
- 과종기 : 일품벼(4월20일), 흑남벼(4월20일), 흑진주벼(5월9일)
- 이앙기 : 일품벼(5월28일), 흑남벼(5월28일), 흑진주벼(6월5일)
- 재식거리 : 30×14cm
- 시비량 : N-P-K=11-4.5-5.7kg/10a을 요소, 용성인비, 염화가리로 시비. 질소는

- 50 : 30 : 20%, 가리는 70 : 30%로 분시하고 인산은 전량 기비로 시비
- 기타 : 물바구미 방제를 위하여 이앙직후 후라단을 살포하고, 도열병 방제를 위하여 7월2일, 에이스 입제 살포. 기타 재배관리는 수원지역 표준재배에 의함

### (3) 상주

- 시험장소 : 경북 상주군 화서면 달천리, 영남농업시험장 상주출장소
- 파종기 : 2001년 4월 25일
- 이앙기 : 2001년 5월 22일
- 재식거리 : 30×12cm
- 시비량 : N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-6.4-7.8kg/10a을 요소, 용성인비, 염화가리로 시비.  
질소는 50 : 30 : 20%, 가리는 70 : 30%로 분시하고 인산은 전량 기비로 시비. 기타 재배관리는 상주지역 표준재배에 의함

### (4) 익산

- 시험장소 : 전북 익산시 송학동 381번지, 호남농업시험장
- 파종기 : 2001년 4월 25일
- 이앙기 : 2001년 5월 25일
- 재식거리 : 30×15cm
- 시비량 : N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-4.5-5.7kg/10a을 요소, 용성인비, 염화가리로 시비.  
질소는 50 : 30 : 20%, 가리는 70 : 30%로 분시하고 인산은 전량 기비로 시비. 기타 재배관리는 익산지역 표준재배에 의함

### (5) 밀양

- 시험장소 : 경남 밀양시 내이동, 영남농업시험장
- 파종기 : 2001년 4월 25일
- 이앙기 : 2001년 5월 24일
- 재식거리 : 30×12cm
- 시비량 : N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-6.4-7.8kg/10a을 요소, 용성인비, 염화가리로 시비.  
질소는 50 : 30 : 20%, 가리는 70 : 30%로 분시하고 인산은 전량 기비로 시비. 기타 재배관리는 밀양지역 표준재배에 의함

#### 다) 생육 및 수량 조사

각 지역별 벼의 생육은 유효분얼기와 유수형성기에 초장 및 분얼수를 조사하였고, 벼 수량조사는 출수 후 50일에 각 처리당 10주를 수확하여 3반복으로 조사하였다. 수량구성요소는 10주의 벼를 대상으로 단위면적당 수수, 수당립수, 천립중 및 등숙율을 조사하였다.

#### 라) 항산화성분 분석

분석항목은 C3G, Oryzanol, 항산화활성 검정(DPPH), TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성 검색의 4항목이었으며 각 항목의 분석방법은 앞에서 언급한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

#### 다. 고향산화성분 생산환경조건 구명

##### 1) 등숙온도가 항산화성분에 미치는 영향

##### 가) 실험처리

등숙온도에 따른 유색미 품종의 항산화성분의 변이를 구명하고자 2002년도에 실시하였다. 흑진주벼, 흑남벼 및 일품벼를 공시하여 1/5000a 크기의 포트에서 실험을 수행하였다. 등숙온도 및 기온교차 처리는 18℃(주야 21/15℃), 21℃(주야 24/18℃), 24℃(주야 27/21℃), 27℃(주야 30/24℃)의 4처리로 완전임의배치 5반복으로 수행하였다. 시험장소는 출수 전까지는 충청남도 천안시에 위치한 단국대학교 생명자원과학대학 수도포장에서 재배한 후, 매 품종마다 출수 후 바로 경기도 수원시에 위치한 작물시험장 인공기상실로 옮겨 45일간 등숙온도를 처리하였다.

##### 나) 재배방법

벼 육묘는 2002년 5월1일 육묘 상자당 130g을 파종하여 30일간 육묘하였다. 이앙은 6월1일에 포트당 4주를 이앙하고, 이앙 후 10일에 포트당 2주가 되도록 솟아주었다. 시비량은 질소, 인산 및 가리를 요소, 용성인비 및 염화가리로 11-7-8kg/10a을 시용하였다. 질소는 기비 : 분얼비 : 수비를 50 : 30 : 20%로 분시하였고, 가리는 기비 : 수비를 70 : 30%로 분시하였으며 인산은 전량 기비로 시용하였다. 물관리는 5cm의 담수심을 수확기까지 유지하였고 기타 재배관리는 단국대학교 표준경종법에 준하였다.

#### 다) 생육 및 수량 조사

벼의 생육은 유효분얼기와 유수형성기에 초장 및 분얼수를 조사하였고, 벼 수량조사는

출수 후 45일에 각 처리당 10주를 수확하여 3반복으로 조사하였다. 수량구성요소는 10주의 벼를 대상으로 단위면적당 수수, 수당립수, 친립중 및 등숙율을 조사하였다.

#### 라) 항산화성분 분석

분석항목은 C3G, Oryzanol, 항산화활성 검정(DPPH), TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성 검색의 4항목이었으며 각 항목의 분석방법은 앞에서 언급한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

### 2) Ethephon처리가 항산화성분에 미치는 영향

#### 가) 실험처리

Ethephon 처리에 따른 유색미 품종의 항산화성분의 변이를 구명고자 실시하였다. 흑진주벼, 흑남벼 및 일품벼를 공시하였고 1/5000a 크기의 포트에서 실험을 수행하였다. Ethephon처리농도는 무처리(일반재배구)를 대조구로하고 100, 500, 1000, 2000ppm의 5처리이었으며 완전임의배치 5반복으로 수행하였다. Ethephon처리는 출수전·후 10일 간격으로 2번 엽면살포하여 주었다. 2002년 충청남도 천안시에 위치한 단국대학교 생명자원과학대학 수도포장에서 실시하였다.

#### 나) 재배방법

벼 육묘는 2002년 5월1일 육묘 상자당 130g을 파종하여 30일간 육묘하였다. 이앙은 6월1일에 포트당 4주를 이앙하고, 이앙 후 10일에 포트당 2주가 되도록 솟아주었다. 시비량은 질소, 인산 및 가리를 요소, 용성인비 및 염화가리로 11-7-8kg/10a을 사용하였다. 질소는 기비 : 분얼비 : 수비를 50 : 30 : 20%로 분시하였고, 가리는 기비 : 수비를 70 : 30%로 분시하였으며 인산은 전량 기비로 사용하였다. 물관리는 5cm의 답수심을 수확기까지 유지하였고 기타 재배관리는 단국대학교 표준경종법에 준하였다.

#### 다) 생육 및 수량 조사

벼의 생육은 유효분얼기와 유수형성기에 초장 및 분얼수를 조사하였고, 벼 수량조사는 출수 후 45일에 각 처리당 10주를 수확하여 3반복으로 조사하였다. 수량구성요소는 10주의 벼를 대상으로 단위면적당 수수, 수당립수, 친립중 및 등숙율을 조사하였다.

## 라) 항산화성분 분석

분석항목은 C3G, Oryzanol, 항산화활성 검정(DPPH), TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성 검색의 4항목이었으며 각 항목의 분석방법은 앞에서 언급한 바와 같이 동일하게 수행하였다.

## 3. 연구결과

### 가. 고허산화성분 관련 시비조건 구명

#### 1) 질소수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

질소시비가 벼 품종의 생육에 미친 영향은 표 1-1과 같고 수확에 미친 영향은 표 1-2와 같다.

질소시비는 흑남벼와 일품벼의 수량을 유의하게 증가시켰으나 흑진주벼만은 질소 1.5N 구에서 감수하였다. 이 결과는 질소 시비량이 증가하면 흑진주벼의 등숙비율 및 현미천립중이 현저히 저하되어 감수한다는 김 등(1998)의 보고와 같았다. 흑진주벼는 출수가 빠르나 초장이 크고 도복이 심하여 보통기 재배에서는 상당한 주의를 기울여야 경제적 재배가 가능할 것으로 보였다. 흑진주벼, 흑남벼 등 유색미의 수량은 382~497kg/10a 범위이었다. 일품벼에 비하여 흑진주벼는 1수영화수가 적고 등숙율과 현미천립중이 낮아 감수하였고 흑남벼는 1주수수와 1수영화수가 낮아 감수하였다.

질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 C3G(Cyanidin-3-glucoside) 함량에 미친 영향은 표 1-3과 같다. 질소 시비량이 증가함에 따라 흑진주벼, 흑남벼 모두 C3G 함량이 증가하는 경향이였다. 흑진주벼와 흑남벼의 등숙기간별 C3G 함량은 출수 후 40일에 가장 높았고, 등숙기간이 경과함에 따라 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다. 그러나 흑진주벼에서는 출수 70일 이후 C3G 함량이 다소 증가하는 경향을 나타내었다.

표 1-1. 질소시비가 벼 품종의 생육에 미치는 영향

질소수준(A)	품종(B)	초 장 (cm)		분 얼 (개)	
		유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
0.5N	흑진주벼	59.8	88.6	16.8	14.8
	흑남벼	50.5	69.9	18.5	16.4
	일품벼	50.9	72.0	18.9	16.0
1N	흑진주벼	62.9	94.7	19.9	17.2
	흑남벼	55.7	78.9	20.9	19.1
	일품벼	51.6	79.8	20.4	17.1
1.5N	흑진주벼	63.7	95.0	19.4	17.5
	흑남벼	54.0	76.9	20.7	18.9
	일품벼	50.8	78.2	21.0	18.3
F-value	A	NS	**	NS	NS
	B	**	**	NS	NS
	(A)×(B)	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	3.10	-	-
	B	3.53	3.93	-	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-2. 질소시비가 벼 품종의 수량 및 수량구성요소에 미치는 영향

처 리 (A)	품종 (B)	출수기	도복지수 (0~9)	1주수수 (개)	1수영화수 (개)	현미친립중 (g)	등숙률 (%)	현미수량 (kg/10a)
0.5N	흑진주벼	7.23	4	13.3	85.7	19.2	78.7	381.5
	흑남벼	8.17	0	11.2	88.3	23.6	84.8	438.4
	일품벼	8.20	0	10.9	119.3	22.5	83.3	534.3
1N	흑진주벼	7.25	5	16.1	91.8	18.5	71.9	437.4
	흑남벼	8.19	0	13.0	95.0	22.6	78.0	482.2
	일품벼	8.22	0	13.2	114.1	21.6	81.4	587.7
1.5N	흑진주벼	7.25	6	17.1	80.7	19.2	70.3	413.3
	흑남벼	8.19	0	13.9	94.9	22.5	75.7	496.8
	일품벼	8.22	0	13.5	126.1	20.6	77.9	608.5
F-value	A			**	NS	**	**	**
	B			**	**	**	**	**
	(A)×(B)			NS	NS	**	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A			0.67	-	0.41	1.54	19.16
	B			0.64	6.39	0.39	1.54	23.16

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-3. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
----- mg/100g brown rice -----						
0.5N	흑진주벼	286.6	262.9	184.7	223.0	237.1
	흑남벼	209.2	88.0	68.0	59.9	47.4
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1N	흑진주벼	407.8	294.4	253.3	224.7	271.4
	흑남벼	230.8	106.4	98.9	74.8	65.9
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5N	흑진주벼	385.5	306.8	257.9	256.7	287.2
	흑남벼	268.7	137.2	111.3	88.4	87.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-value	A	*	*	*	NS	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	41.8	20.4	30.9	-	-
	B	41.8	20.4	30.9	27.7	28.4

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 C3G 생산량에 미친 영향은 표 1-4와 같다. 10a당 현미 수량에 C3G 함량을 곱한 C3G 수량은 질소가 증가함에 따라 다소 증가하는 경향이든 뚜렷하지는 않았다. 그러나 등숙기간이 40일 이후 80일까지 늦어질수록

10a당 C3G 수량은 매우 유의하게 감소하였으며 그 경향은 함량에서와 마찬가지로 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다.

질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 P3G 함량에 미친 영향은 표 1-5와 같다. 흑진주벼와 흑남벼는 질소 시비량이 증가함에 따라 출수 후 60일까지는 유의하게 증가하였으나 1N 시용과 1.5N 시용간에는 큰 차이가 없었다. 일품벼는 P3G 함량이 전무하였다.

흑진주벼와 흑남벼의 등숙기간별 P3G 함량은 출수 후 40일에 가장 높았고, 등숙기간이 경과함에 따라 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다. 그러나 흑진주벼에서는 출수 70일 이후 C3G 함량과 마찬가지로 다소 증가하는 경향을 나타내었는데 이의 원인에 대하여서도 추후 분석을 요한다.

표 1-4. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Cyanidin-3-glucoside 생산량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
----- g/10a brown rice -----						
0.5N	흑진주벼	1094	1003	705	851	905
	흑남벼	917	386	298	263	208
	일품벼	0	0	0	0	0
1N	흑진주벼	1784	1288	1108	983	1187
	흑남벼	1113	513	477	361	318
	일품벼	0	0	0	0	0
1.5N	흑진주벼	1593	1268	1066	1061	1187
	흑남벼	1335	682	553	439	432
	일품벼	0	0	0	0	0
F-value	A	**	**	**	NS	*
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	*	*	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	177	87	123	-	117
	B	156	87	111	117	117

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively



표 1-5. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Peonidin-3-glucoside 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- g/100a brown rice -----				
0.5N	흑진주벼	13.3	12.7	7.2	10.1	11.2
	흑남벼	13.5	1.6	1.1	0.0	0.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1N	흑진주벼	23.9	16.1	12.2	11.6	14.0
	흑남벼	14.7	5.4	2.9	0.0	0.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.5N	흑진주벼	21.9	17.0	13.4	12.3	15.6
	흑남벼	17.0	9.8	4.6	1.0	0.9
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-value	A	*	*	*	NS	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	3.28	2.82	2.67	-	-
	B	3.27	2.82	2.66	2.50	2.21

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소  $\nu$ -oryzanol 함량에 미치는 영향은 표 1-6과 같다.  $\nu$ -oryzanol 의 함량은 질소시비량 및 출수 후 등숙기간 간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 품종간에는 유의한 차이를 보여서 유색미인 흑진주벼와 흑남벼의  $\nu$ -oryzanol 의 함량이 1.9~2.8%인데 비하여 일품벼는 2.6~3.0% 로 유색미보다 높았다.

질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Isovitexin 함량에 미치는 영향은 표 1-7과 같다. 흑진주벼와 흑남벼 등 유색미에서는 미세한 양 만이 검출되어 질소시비량과 등숙기간에 따른 차이를 알 수 없었으며, 일품벼에서는 전혀 검출되지 않았다. 이들 미량성분에 대하여는 지속적인 연구 검토가 필요하다고 사료되었다.

질소시비가 벼 품종의 DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성에 미치는 영향은 표 1-8과 같다. 질소 시비량에 따른 차이는 등숙기간 70일 이후에 유의한 차이를 보였고, 흑진주벼가 강한 항산화 활성을 나타내었다. 흑진주벼와 흑남벼의 DPPH 억제율은 59.1~81.7%, 일품벼의 DPPH 억제율은 35.1~55.8%로서 품종간에 뚜렷한 차이가 있고 일품벼보다 유색미의 DPPH 억제율이 높았다. 이러한 결과는 유색미의 DPPH 억제율이 59.3%, 일반벼 품종은 48.5%라는 Jung 등(2000)의 보고와 비교해 볼 때 다소 높은 수치이었다.

질소시비가 벼 품종의 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성에 미치는 영향은 표 1-9와 같다. 질소시비량에 따른 항산화 활성은 출수 후 50일을 제외한 나머지 등숙기간에서는 유

의한 차이가 없었다. 그러나 품종간에는 흑진주벼가 다소 강한 항산화 활성을 보였고, 흑남벼, 일품벼 순으로 유색미가 일품벼보다 강한 항산화 활성을 나타내었다.

표 1-6. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별  $\gamma$ -oryzanol 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
----- %, 100g oil -----						
0.5N	흑진주벼	2.1	2.2	2.5	2.4	2.4
	흑남벼	2.4	2.8	2.7	2.6	2.5
	일품벼	2.9	3.0	2.8	3.0	2.8
1N	흑진주벼	1.9	2.2	2.3	2.4	2.3
	흑남벼	2.4	2.6	2.5	2.7	2.5
	일품벼	2.8	2.9	2.7	2.9	2.6
1.5N	흑진주벼	1.9	2.1	2.3	2.3	2.3
	흑남벼	2.3	2.6	2.5	2.7	2.5
	일품벼	2.8	2.9	2.6	2.7	2.6
F-value	A	NS	NS	**	NS	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	NS	NS	*	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	-	0.11	-	-
	B	0.13	0.14	0.11	0.09	0.12

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-7. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 Isovitexin 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
0.5N	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-
1N	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-
1.5N	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-

표 1-8. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성(%)에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- DPPH [Inhibition (%)] -----				
0.5N	흑진주벼	80.4	80.3	79.5	76.6	75.7
	흑남벼	79.2	75.3	59.1	59.5	62.3
	일품벼	54.1	38.3	42.5	44.6	46.7
1N	흑진주벼	75.8	81.7	81.3	81.6	76.7
	흑남벼	79.8	74.3	60.4	60.6	63.7
	일품벼	54.3	35.1	42.9	46.5	47.7
1.5N	흑진주벼	77.4	81.7	80.6	77.8	78.5
	흑남벼	81.0	76.2	64.1	64.5	66.3
	일품벼	55.8	39.3	40.0	47.3	48.2
F-value	A	NS	NS	NS	*	*
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	-	-	2.5	1.8
	B	2.1	3.9	2.6	2.5	1.8

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-9. 질소시비가 벼 품종의 등숙기간별 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- Inhibition (%) -----				
0.5N	흑진주벼	20.3	20.7	22.0	21.3	20.7
	흑남벼	21.0	24.0	24.0	24.3	25.0
	일품벼	28.0	29.0	29.0	29.0	29.0
1N	흑진주벼	16.3	19.3	20.7	21.7	20.3
	흑남벼	22.0	23.3	23.3	24.0	25.0
	일품벼	28.0	29.0	29.0	29.0	29.0
1.5N	흑진주벼	17.0	19.3	20.3	20.7	20.3
	흑남벼	20.7	22.3	23.0	23.3	24.0
	일품벼	28.0	29.0	29.0	29.0	29.0
F-value	A	NS	**	NS	NS	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	*	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	0.54	-	-	-
	B	1.24	0.54	0.87	0.79	0.93

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

## 2) 퇴비수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

퇴비사용이 벼 품종의 생육에 미친 영향은 표 1-10과 같고 수량에 미친 영향은 표 1-11과 같다. 퇴비사용이 수량에 미치는 영향은 유의하나 처리간 일관 경향을 보이지 않았

는데 이는 퇴비효과 이외에 투입된 N-P-K의 총량에 차이가 있어서 나타난 결과로 생각되었다. 흑진주벼는 출수가 빠르나 초장이 크고 도복이 심하였다. 흑남벼는 퇴비 시용시 1수영 화수와 등숙율이 증가하였다. 흑진주벼와 흑남벼의 수량은 394~520kg/10a 범위이었다.

퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 C3G 함량에 미친 영향은 표 1-12와 같다. 퇴비시용량이 증가함에 따라 흑진주벼, 흑남벼 모두 C3G 함량이 증가하는 경향이 나 일관된 현저한 차이는 아니었다. 그러나 C3G 함량은 등숙기간이 40일 이후 80일까지 길어질수록 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다. 흑진주벼, 흑남벼 모두 퇴비 1000kg/10a처리에서 C3G 함량이 가장 높았으며 일품벼는 C3G 함량이 전무하였다.

퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 C3G 생산량에 미친 영향은 표 1-13과 같다. C3G 수량은 퇴비 시용량이 증가함에 따라 다소 증가하는 경향이나 뚜렷하지는 않았다. 등숙기간이 40일 이후 80일까지 길어질수록 C3G 수량은 매우 유의하게 감소하였으며 그 경향은 함량에서와 마찬가지로 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다.

퇴비시용과 벼 품종이 등숙기간별 안토시아닌 색소 P3G 함량에 미친 영향은 표 1-14와 같다. 흑진주벼는 퇴비시용량이 증가함에 따라 출수 후 50~70일까지 등숙기간이 길어질수록 P3G 함량이 유의하게 증가하였으며, 흑남벼는 퇴비시용량이 증가함에 따라 다소 증가하는 경향이였다. 일품벼는 P3G가 전무하였다. 흑진주벼와 흑남벼의 등숙기간별 P3G 함량은 출수 후 40~50일에 가장 높았고, 등숙기간이 경과함에 따라 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다. 그러나 흑진주벼에서는 출수후 70일 이후 C3G 함량과 마찬가지로 다소 증가하는 경향이였다.

표 1-10. 퇴비 시용이 벼 품종의 생육에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품 종(B)	초 장 (cm)		분 얼 (개)	
		유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
퇴비 0	흑진주벼	57.2	84.1	16.5	14.1
	흑남벼	48.8	67.0	13.2	13.8
	일품벼	48.3	72.5	13.4	14.0
퇴비 500	흑진주벼	47.8	79.7	10.4	13.7
	흑남벼	43.7	66.3	12.4	15.6
	일품벼	43.2	73.6	12.4	16.1
퇴비1000	흑진주벼	45.2	85.1	10.2	18.4
	흑남벼	42.2	73.9	13.7	19.1
	일품벼	42.6	77.0	11.6	17.2
F-value	A	**	**	NS	**
	B	**	**	NS	NS
	(A)×(B)	NS	*	NS	NS
LSD. <sub>05</sub>	A	2.48	1.81	-	1.74
	B	2.48	1.81	-	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-11. 퇴비시용이 벼 품종의 수량 및 수량구성요소에 미치는 영향

처리(A)	품종	출수기	도복지수	1주수수	1수영화수	현미천립	등숙률	현미수량
(kg/10a)	(B)		(0~9)	(개)	(개)	중	(%)	(kg/10a)
퇴비 0	흑진주벼	8.6	5	15.6	92.5	18.6	71.2	422.0
	흑남벼	8.18	0	14.5	91.3	22.6	78.5	519.7
	일품벼	8.24	0	14.1	112.5	21.3	78.4	588.6
퇴비 500	흑진주벼	7.29	3	12.7	92.7	19.2	78.7	394.3
	흑남벼	8.19	0	10.3	89.3	24.6	85.8	426.8
	일품벼	8.22	0	10.4	118.1	22.8	85.1	528.5
퇴비1000	흑진주벼	8.3	5	15.7	96.1	18.6	71.3	443.6
	흑남벼	8.19	0	13.1	89.6	23.2	83.1	502.7
	일품벼	8.24	0	13.4	121.6	21.1	79.1	602.9
F-value	A			**	NS	**	**	**
	B			**	**	**	**	**
	(A)×(B)			NS	NS	NS	NS	NS
LSD <sub>.05</sub>	A			0.78	-	0.75	1.49	20.90
	B			0.79	4.54	0.75	1.49	30.50

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-12. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량에 미치는 영향

처리(A)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- mg/100g brown rice -----				
퇴비 0	흑진주벼	348.7	326.3	217.7	182.0	283.3
	흑남벼	259.3	119.0	88.4	74.9	66.4
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
퇴비 500	흑진주벼	354.1	321.1	295.0	302.2	260.5
	흑남벼	247.2	109.6	84.0	75.3	45.5
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
퇴비1000	흑진주벼	421.3	453.8	386.2	373.7	386.0
	흑남벼	284.2	182.9	142.8	69.9	75.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-value	A	NS	**	**	**	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	**	**	**	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	36.6	20.6	27.6	-
	B	58.4	36.6	20.6	27.6	53.6

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-13. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Cyanidin-3-glucoside 생산량에

미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- g/10a brown rice -----				
퇴비 0	흑진주벼	1472	1377	919	768	1196
	흑남벼	1347	619	460	389	345
	일품벼	0	0	0	0	0
퇴비 500	흑진주벼	1396	1266	1163	1191	1027
	흑남벼	1055	468	359	321	194
	일품벼	0	0	0	0	0
퇴비1000	흑진주벼	1869	2013	1713	1658	1712
	흑남벼	1429	919	718	352	377
	일품벼	0	0	0	0	0
F-value	A	NS	**	**	**	*
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	*	**	**	NS
LSD. <sub>.05</sub>	A	-	165	91	118	230
	B	261	163	91	107	230

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-14. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Peonidin-3-glucoside

함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- mg/100g brown rice -----				
퇴비 0	흑진주벼	19.5	17.3	10.7	6.7	17.3
	흑남벼	17.1	6.0	3.3	0.0	0.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
퇴비 500	흑진주벼	20.6	16.7	14.8	15.8	12.5
	흑남벼	16.2	5.8	2.3	0.0	0.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
퇴비1000	흑진주벼	26.6	29.5	23.1	22.0	23.6
	흑남벼	18.4	11.2	4.9	1.9	0.0
	일품벼	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F-value	A	NS	**	**	**	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	**	**	**	NS
LSD. <sub>.05</sub>	A	-	2.66	2.37	1.91	-
	B	4.98	2.65	2.38	1.91	4.29

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 v-oryzanol 함량에 미친 영향은 표

1-15와 같다. 출수후 60일에만 유의한 차이를 보였을 뿐, 질소시비량과 기타 출수후 등숙기간 간에는 뚜렷한 경향이 없었다. 그러나 품종간에는 유의한 차이를 보여서 유색미의  $\gamma$ -oryzanol의 함량이 1.8~2.9%인데 비하여 일품벼는 2.6~3.0% 범위이었다.

퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 Isovitexin 함량에 미치는 영향은 표 1-16과 같다. 질소시비 처리에서와 마찬가지로 유색미에서는 미세한 양 만이 검출되어 퇴비시비량과 등숙기간에 따른 차이를 알 수 없었으며, 일품벼에서는 전혀 검출되지 않았다.

퇴비시용이 벼 품종의 DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성에 미치는 영향은 표 1-17과 같다. 퇴비시용에 따른 차이는 등숙기간 70일에서만 유의한 차이를 보였으며, 질소시비량 처리와 마찬가지로 흑진주벼가 다소 강한 항산화 활성을 나타냈다. DPPH 억제율은 흑진주벼와 흑남벼가 57.2~82.5%, 일품벼는 42.5~67.9%로 유색미가 일품벼보다 항산화 활성이 높게 나타났다.

퇴비시용이 벼 품종의 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성에 미치는 영향은 표 1-18과 같다. 퇴비시용량이 증가함에 따라 흑진주벼는 다소 강한 항산화 활성을 보였고, 흑남벼와 일품벼는 다소 미흡하였다. TBA 비색정량법에 의한 활성 검색 결과는 DPPH radical 소거 효과에 의한 항산화 활성 검색과 같은 경향인 것으로 나타났다.

표 1-15. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별  $\gamma$ -oryzanol 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
----- %, 100g oil -----						
퇴비 0	흑진주벼	2.0	2.0	2.2	2.5	2.1
	흑남벼	2.3	2.6	2.7	2.7	2.8
	일품벼	3.0	2.7	2.9	2.8	3.0
퇴비 500	흑진주벼	2.0	2.0	2.0	2.1	2.3
	흑남벼	2.4	2.6	2.6	2.9	2.7
	일품벼	2.9	2.7	2.6	2.9	3.0
퇴비1000	흑진주벼	2.0	1.8	2.0	1.9	2.0
	흑남벼	2.2	2.5	2.6	2.8	2.8
	일품벼	3.0	2.7	2.8	2.9	3.0
F-value	A	NS	NS	**	NS	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	NS	NS	**	NS
LSD <sub>.05</sub>	A	-	-	0.10	-	-
	B	0.16	0.12	0.10	0.12	0.18

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively



표 1-16. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 Isovitexin 함량에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
퇴비 0	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-
퇴비 500	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-
퇴비1000	흑진주벼	trace	trace	trace	trace	trace
	흑남벼	trace	trace	trace	trace	trace
	일품벼	-	-	-	-	-

표 1-17. 퇴비시용이 벼품종의 등숙기간별 DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
----- DPPH [Inhibition (%)] -----						
퇴비 0	흑진주벼	79.0	80.5	80.7	81.7	81.1
	흑남벼	82.0	80.2	74.9	75.5	63.0
	일품벼	64.5	42.5	58.1	60.3	51.5
퇴비 500	흑진주벼	82.5	81.8	74.0	80.7	81.2
	흑남벼	82.3	57.2	75.3	75.0	64.3
	일품벼	59.3	57.5	59.9	49.4	52.1
퇴비1000	흑진주벼	76.9	74.2	74.7	79.6	78.3
	흑남벼	80.2	76.2	78.2	73.4	66.6
	일품벼	67.9	57.9	60.2	45.0	52.2
F-value	A	NS	NS	NS	**	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	**	NS	*	NS
LSD. <sub>05</sub>	A	-	-	-	3.4	-
	B	6.6	7.5	4.6	3.4	2.2

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-18. 퇴비시용이 벼 품종의 등숙기간별 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성에 미치는 영향

처리(A) (kg/10a)	품종(B)	Days after heading				
		40	50	60	70	80
		----- Inhibition (%) -----				
퇴비 0	흑진주벼	18.0	18.7	21.3	22.0	19.7
	흑남벼	21.3	23.0	24.0	23.3	24.3
	일품벼	26.0	27.3	28.0	26.0	28.3
퇴비 500	흑진주벼	17.3	18.7	19.3	20.0	20.3
	흑남벼	20.0	23.3	24.3	27.7	25.0
	일품벼	27.7	27.3	26.0	27.3	28.3
퇴비1000	흑진주벼	14.7	13.7	18.3	17.0	15.7
	흑남벼	19.7	22.3	22.0	24.3	24.3
	일품벼	27.7	28.3	26.3	27.3	29.0
F-value	A	NS	**	**	**	NS
	B	**	**	**	**	**
	(A)×(B)	NS	**	NS	**	NS
LSD. <sub>05</sub>	A	-	1.13	0.91	1.22	-
	B	2.04	1.12	0.91	1.22	1.99

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

#### 나. 고허산화성분 관련 재배조건 구명

##### 1) 이앙시기가 항산화성분에 미치는 영향

이앙시기에 따른 벼 품종의 생육 반응은 표 1-19와 같다. 초장은 흑진주벼, 흑남벼 및 일품벼의 3품종 모두 유효분얼기 및 유수형성기에는 조기, 보통기, 만기의 이앙시기 간에 유의한 차이가 있었다. 분얼은 세 품종 모두 유효분얼기에는 유의차가 있었으나 유수형성기에는 이앙시기간 차이가 없었다.

이앙시기에 따른 벼 품종의 현미수량은 표 1-20과 같다. 흑진주벼와 일품벼는 조기, 보통기, 만기의 이앙시기간 수량 차이가 없었으나 흑남벼는 보통기재배에서 유의하게 가장 많았고 만기재배에서 유의하게 가장 적었다.

이앙시기에 따른 유색미벼 품종의 안토시아닌계 색소 C3G 및 Oryzanol 함량 변이는 표 1-21과 같다. C3G함량은 이앙시기간 고도의 유의한 차이가 나타났다. 유색미인 흑진주벼와 흑남벼의 C3G함량은 각각 447~534mg/100g, 33~177mg/100g 범위로 보통기재배에서 유의하게 가장 높았고 조기 및 만기재배에서 유의하게 낮았다. 자포니카 품종인 일품벼는 C3G함량이 전무하였다. Oryzanol 함량도 이앙시기간 유의한 차이가 있었다. 흑진주벼는 만기재배에서 유의하게 가장 높고 조기재배에서 가장 낮았고 흑남벼는 조기 및 만기재배에서 유의하게 높고 보통기재배에서 낮았다.

한편 일품벼는 만기재배에서 유의하게 가장 높고 보통기재배에서 가장 낮았다. 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼의 Oryzanol함량은 24~35mg/100g 범위였고 일반품종인 일품벼는 23~26mg/100g 범위이었다.

표 1-19. 이앙시기에 따른 유색미 벼 품종의 생육

품종	이앙시기	초 장 (cm)		분 얼 (개)	
		유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
흑진주벼	조기재배	80.8	106.2	17.8	17.2
	보통기재배	73.7	89.3	14.9	16.3
	만기재배	39.8	64.8	14.7	16.2
	F-value	**	**	*	NS
	LSD. <sub>05</sub>	3.74	3.47	2.58	-
흑남벼	조기재배	66.5	79.9	21.2	19.0
	보통기재배	63.1	69.8	17.6	17.0
	만기재배	37.2	60.3	13.4	20.3
	F-value	**	**	**	NS
	LSD. <sub>05</sub>	2.45	3.81	3.18	-
일품벼	조기재배	68.2	82.4	21.0	19.0
	보통기재배	41.4	64.4	13.8	19.1
	만기재배	36.8	59.9	14.0	20.2
	F-value	**	**	*	NS
	LSD. <sub>05</sub>	2.96	3.31	4.35	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-20. 이앙시기에 따른 유색미 벼 품종의 수량 및 수량구성요소

품종	이앙시기	출수기	도복지수 (0~9)	1주수수 (개)	1수영화수 (개)	현미천립중 (g)	등숙률 (%)	현미수량 (kg/10a)
흑진주벼	조기재배	7.10	1	16.1	91.8	18.34 a	71.9 b	433.6
	보통기재배	7.26	1	15.6	92.5	17.57 b	71.2 b	400.8
	만기재배	8.13	1	12.9	89.3	18.62 a	78.1 a	371.3
	F-value			NS	NS	*	**	NS
	LSD.05			-	-	0.67	1.43	-
흑남벼	조기재배	8.13	0	13.0	95.0	20.46 b	78.0 b	437.8 b
	보통기재배	8.22	0	14.5	91.3	21.31 a	78.5 b	490.7 a
	만기재배	8.31	0	11.2	88.3	20.30 b	84.8 a	378.0 c
	F-value			NS	NS	**	**	**
	LSD.05			-	-	0.50	2.25	13.37
일품벼	조기재배	8.13	0	12.7	114.1	21.59 b	81.4	567.2
	보통기재배	8.24	0	14.1	112.5	21.29 b	78.4	589.0
	만기재배	9. 1	0	10.9	119.3	22.46 a	83.3	538.5
	F-value			NS	NS	**	NS	NS
	LSD.05			-	-	0.55	-	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-21. 이앙시기에 따른 유색미벼 품종의 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 함량 변이

품종	이앙시기	Cyanidin-3-glucoside ----- mg/100g brown rice -----	Oryzanol
흑진주벼	조기재배	473.0 b	29.1 b
	보통기재배	534.0 a	33.4ab
	만기재배	447.4 b	34.8 a
	F-value	**	*
	LSD.05	22.59	2.98
흑남벼	조기재배	33.1 b	30.1 a
	보통기재배	176.7 a	24.2 b
	만기재배	37.6 b	29.0 a
	F-value	**	**
	LSD.05	4.10	1.82
일품벼	조기재배	0.0	25.2ab
	보통기재배	0.0	23.4 b
	만기재배	0.0	25.6 a
	F-value	-	*
	LSD.05	-	1.23

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

이앙시기에 따른 유색미 품종의 안토시아닌계 색소 변이를, 농도에 현미수량을 곱한 생산량으로 보면 표 1-22와 같다. C3G 및 Oryzanol의 생산량은 품종간에 유의한 차이가 있

었다. 흑진주벼는 조기 및 보통기재배에서 유의하게 높았고 만기재배에서 유의하게 낮았다. 흑남벼는 보통기재배에서 가장 높고 조기 및 만기재배에서 유의하게 낮았다.

Oryzanol 생산량은 흑진주벼와 일품벼는 이앙시기간 차이가 없었으나 흑남벼는 고도로 유의한 차이를 보여서 조기재배에서 가장 높고 만기재배에서 가장 낮았다.

한편 이앙시기에 따른 유색미 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이는 표 1-23과 같다. DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼에서 이앙시기간 유의한 차이를 보였으며 일품벼는 차이가 없었다. 흑진주벼는 보통기재배에서 유의하게 가장 높고 조기 및 만기재배에서 유의하게 가장 낮았다. 흑남벼는 보통기재배에서 가장 높고 조기재배에서 가장 낮았다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 세 품종 모두 이앙시기간 차이가 없었다.

표 1-22. 이앙시기에 따른 유색미벼 품종의 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 생산량 변이

품종	이앙시기	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
----- g/10a brown rice -----			
흑진주벼	조기재배	2050 a	126 a
	보통기재배	2134 a	133 a
	만기재배	1655 b	129 a
	F-value	*	NS
	LSD <sub>.05</sub>	241.1	-
흑남벼	조기재배	145 b	132 a
	보통기재배	867 a	119ab
	만기재배	142 b	109 b
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	21.6	9.88
일품벼	조기재배	0	143 a
	보통기재배	0	138 a
	만기재배	0	138 a
	F-value	-	NS
	LSD <sub>.05</sub>	-	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-23. 이앙시기에 따른 유색미벼 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA  
비색정량법에 의한 항산화활성 변이

품종	이앙시기	DPPH	TBA
		----- %, Inhibition -----	
흑진주벼	조기재배	74.4 b	17.7 a
	보통기재배	77.0 a	18.5 a
	만기재배	73.7 b	17.8 a
	F-value	*	NS
	LSD <sub>.05</sub>	1.78	-
흑남벼	조기재배	63.5 c	25.3 a
	보통기재배	66.2 a	26.5 a
	만기재배	64.6 b	26.2 a
	F-value	**	NS
	LSD <sub>.05</sub>	0.18	-
일품벼	조기재배	62.0 a	26.2 a
	보통기재배	59.9 a	26.9 a
	만기재배	61.3 a	26.2 a
	F-value	NS	NS
	LSD <sub>.05</sub>	-	-

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

## 2) 재배지역이 항산화성분에 미치는 영향

재배지역에 따른 유색미 벼 품종의 생육은 표 1-24와 같다. 흑진주벼와 흑남벼의 초장과 분얼은 재배지역간에 유의한 차이가 있었으나 일품벼는 유효분얼기까지는 재배지역간에 유의한 차이가 있었으나 유수형성기에는 차이가 없었다.

재배지역에 따른 벼 품종의 현미수량은 표 1-25와 같다. 공시품종의 수량은 재배지역간 유의한 차이가 나타났다. 흑진주벼의 현미수량은 재배지역간 379~471kg/10a 범위로 익산에서 유의하게 가장 높았고 상주에서 유의하게 가장 적었다. 흑남벼 수량은 265~481kg/10a 범위로 수원과 익산이 유의하게 가장 높았고 밀양에서 유의하게 가장 적었다. 일품벼 수량은 507~604kg/10a 범위로 상주, 수원 및 익산이 유의하게 높았고 연천과 밀양에서 적었다.

재배지역에 따른 유색미 품종의 C3G 및 Oryzanol 함량 변이는 표 1-26과 같다. 흑진주벼와 흑남벼의 C3G함량은 재배지역간에 고도로 유의한 차이가 나타났다. 흑진주벼의 C3G함량은 상주에서 839mg/100g로 유의하게 가장 높았고 익산에서 281mg/100g로 가장 낮았다. 흑남벼는 익산에서 52mg/100g로 유의하게 가장 높았고 밀양에서는 1.5mg/100g로 유의하게 가장 낮았다. 상주지역의 흑진주벼 C3G함량은 다른 지역에 비하여 3배나 높았다. 밀

양지역의 흑남벼 C3G함량은 다른 지역에 비해 현저히 낮은 수준이었다.



표 1-24. 재배지역에 따른 유색미 벼 품종의 생육

품 종	지 역	초 장 (cm)		분 얼 (개)	
		유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
흑진주벼	연 천	68.8	106.3	10.9	15.0
	수 원	54.1	105.3	12.4	17.6
	상 주	71.3	109.3	20.5	17.2
	익 산	59.2	99.6	18.2	15.7
	밀 양	63.0	104.8	15.1	13.3
	F-value	**	*	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	5.73	5.11	2.80	2.21
흑남벼	연 천	72.9	82.6	14.7	18.8
	수 원	61.0	84.8	16.1	20.3
	상 주	61.6	83.8	24.6	20.7
	익 산	49.6	84.6	19.4	19.3
	밀 양	49.1	70.3	18.3	17.4
	F-value	**	**	**	NS
	LSD <sub>.05</sub>	4.65	6.98	3.49	-
일품벼	연 천	66.6	85.3	14.8	16.6
	수 원	58.0	89.7	17.5	17.7
	상 주	59.1	85.8	27.7	17.7
	익 산	50.3	85.0	22.3	17.3
	밀 양	58.4	86.1	20.6	17.1
	F-value	**	NS	**	NS

표 1-25. 재배지역에 따른 유색미 벼 품종의 수량 및 수량구성요소

품종	지역	출수기	도복지수 (0~9)	1주수수 (개)	1수영화수 (개)	현미천립중 (g)	등숙률 (%)	현미수량 (kg/10a)
흑진주벼	연천	8.8	0	13.3 b	85.7	19.43 b	78.7 a	385.6 bc
	수원	8.10	0	15.6 a	92.5	19.34 b	71.2 b	441.3 ab
	상주	7.20	0	15.3 a	94.9	16.36 c	72.0 b	378.9 c
	익산	8.1	2	16.1 a	91.8	19.91 a	71.9 b	470.6 a
	밀양	7.20	3	12.7 b	92.7	19.29 b	78.7 a	395.7 bc
	F-value			**	NS	**	**	*
LSD <sub>.05</sub>			1.56	-	0.46	1.57	58.53	
흑남벼	연천	8.27	0	11.2 c	88.3	21.23 b	84.8 a	395.3 b
	수원	8.22	0	14.5 a	91.3	20.89 b	78.5 b	481.1 a
	상주	8.17	0	12.9 b	95.1	19.87 c	79.2 b	427.4 ab
	익산	8.18	0	13.0 ab	95.0	21.63 b	78.0 b	462.9 a
	밀양	8.17	0	6.7 d	89.3	23.13 a	85.8 a	264.8 c
	F-value			**	NS	**	**	**
LSD <sub>.05</sub>			1.58	-	0.81	2.02	65.42	
일품벼	연천	8.27	0	10.9 b	119.3	21.13 bc	83.3	506.5 b
	수원	8.22	0	14.1 a	112.5	21.29 bc	78.4 c	589.0 a
	상주	8.17	0	13.7 a	117.7	20.80 c	80.9	603.5 a
	익산	8.18	0	13.2 a	114.1	21.59 b	81.4	588.0 a
	밀양	8.17	0	10.4 b	118.1	22.81 a	85.1 a	529.3 b
	F-value			**	NS	**	**	**
LSD <sub>.05</sub>			1.27	-	0.66	3.11	34.26	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

재배지역에 따라 C3G 함량의 차이가 큰 원인은 기온과 일사에너지가 가장 크게 관여할 것으로 생각되는데 이에 대하여서는 추후 정밀하게 분석할 예정이다. Oryzanol 함량도 재배지역 간 고도로 유의한 차이가 있었다. 흑진주벼는 상주와 밀양에서 유의하게 가장 높았고 익산에서 가장 낮았으며, 흑남벼는 상주에서 유의하게 가장 높고 익산에서 가장 낮았다. 일품벼는 연천, 수원, 상주, 밀양에서 유의하게 높았고 익산은 가장 낮았다. 흑진주벼의 Oryzanol 함량은 33~39mg/100g, 흑남벼는 21~31mg/100g, 일품벼는 21~25mg/100g 범위로 흑진주벼의 함량이 가장 높았다.

재배지역에 따른 벼 품종의 안토시아닌계 색소 변이를 수량에 농도를 곱한 생산량으로 보면 표 1-27과 같다. C3G 생산량은 유색미 품종간 고도로 유의한 차이가 있었다. 흑진주벼는 1,208~3,180g/10a 범위로 상주에서 유의하게 가장 높았고 흑남벼는 4~238g/10a 범위로

익산에서 유의하게 가장 높았다. Oryzanol 생산수량은 흑진주벼는 지역간 차이가 없었으나 흑남벼와 일품벼는 지역간 고도로 유의한 차이가 있었다.

재배지역에 따른 유색미 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이는 표 1-28과 같다. 항산화활성은 세품종 모두 재배지역간 고도로 유의한 차이를 보였다. DPPH 억제율은 흑진주벼는 69~80% 범위로 상주에서 유의하게 가장 높았고 흑남벼는 61~64% 범위로 연천, 수원, 상주, 익산에서 높고 밀양에서 유의하게 가장 작았다. 또한 일품벼는 60~64% 범위로 상주에서 유의하게 가장 높았다. TBA 억제율은 흑진주벼는 16~23%, 흑남벼는 21~25%, 일품벼는 25~27% 범위이었다.

표 1-26. 재배지역에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 함량 변이 (mg/100g brown rice)

품종	지역	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주	연천	313.0cd	35.3ab
	수원	441.2 b	35.4ab
	상주	839.4 a	38.0 a
	익산	280.9 d	32.9 b
	밀양	341.9 c	38.9 a
	F-value	**	**
LSD.05	29.19	2.78	
흑남벼	연천	46.4 b	25.6 b
	수원	29.8 c	23.7bc
	상주	27.1 c	30.8 a
	익산	51.6 a	20.7 d
	밀양	1.5 d	22.6cd
	F-value	**	**
LSD.05	2.85	1.69	
일품벼	연천	0.0	23.7 a
	수원	0.0	24.4 a
	상주	0.0	24.5 a
	익산	0.0	21.0 b
	밀양	0.0	24.6 a
	F-value	-	**
LSD.05	-	1.66	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-27. 재배지역에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 생산량 (g/10a brown rice)

품종	지역	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주	연천	1208 c	136 a
	수원	1941 b	156 a
	상주	3180 a	144 a
	익산	1322 c	155 a
	밀양	1356 c	154 a
	F-value	**	NS
	LSD <sub>.05</sub>	251.3	-
흑남벼	연천	183 b	101 b
	수원	144 c	114ab
	상주	116 d	131 a
	익산	238 a	96 b
	밀양	4 e	60 c
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	15.1	15.8
일품벼	연천	0.0	119 b
	수원	0.0	144 a
	상주	0.0	147 a
	익산	0.0	124 b
	밀양	0.0	130 b
	F-value	-	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	8.0

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-28. 재배지역에 따른 유색미벼 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이 (% Inhibition)

품종	지역	DPPH	TBA
흑진주	연천	69.8 c	16.2 d
	수원	73.4 b	17.2bc
	상주	79.7 a	23.2 a
	익산	69.1 c	16.9cd
	밀양	70.4 c	17.7 b
	F-value	**	**
LSD <sub>.05</sub>	1.73	0.46	
흑남벼	연천	64.1 a	21.0 b
	수원	63.3 a	21.5 b
	상주	63.6 a	25.0 a
	익산	64.5 a	21.2 b
	밀양	61.3 b	21.4 b
	F-value	**	**
LSD <sub>.05</sub>	0.83	1.25	
일품벼	연천	60.7 b	25.2 b
	수원	60.2 b	26.3 a
	상주	63.6 a	25.2 b
	익산	59.6 b	26.8 a
	밀양	60.2 b	26.2 a
	F-value	**	**
LSD <sub>.05</sub>	1.43	0.61	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

#### 다. 고허산화성분 관련 생산환경조건 구명

##### 1) 등숙온도가 항산화성분에 미치는 영향

등숙온도가 항산화성분 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 벼는 출수 전까지는 포장에서 쪼트상태로 재배하였고, 벼 출수 후 작물시험장 인공기상실로 옮겨 등숙온도를 처리하여 재배하였다. 등숙기 온도 처리전 벼 품종의 유효분얼기와 유수형성기 생육은 표 1-29와 같이 정상적인 생육을 보이고 있었다.

표 1-29. 등숙온도 처리전 벼 품종의 생육

품종	초장 (cm)		분얼 (개)	
	유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
흑진주벼	51.3	82.8	13.3	11.3
흑남벼	45.5	71.5	15.3	14.8
일품벼	44.0	71.3	15.8	15.5

등숙온도 처리에 따른 벼 품종의 현미수량은 표 1-30과 같다. 흑진주벼의 현미수량은 18℃ 처리구에서만 유의하게 가장 적었고 등숙온도 21, 24, 27℃ 처리구에서는 처리간 차이가 없었다. 흑남벼와 일품벼의 현미수량은 21, 24℃ 처리구에서 유의하게 가장 많았고, 18℃ 처리구에서는 낮은 온도로 인해 정상적인 등숙이 이루어지지 않아 수량이 전무하였다.

등숙온도에 따른 벼 품종의 안토시아닌계 색소 C3G 및 Oryzanol 함량 변이는 표 1-31과 같다. C3G함량은 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼에서 등숙온도 처리간 고도의 유의한 차이가 나타났고 일반품종인 일품벼는 C3G 함량이 전무하였다. 유색미인 흑진주벼와 흑남벼의 C3G 함량은 각각 776~1,837mg/100g, 0~361mg/100g 범위였으며 두 품종 모두 24℃ 처리구에서 유의하게 가장 높았다. Oryzanol 함량은 세 품종 모두 등숙온도 처리간 유의한 차이가 있는 것으로 조사되었다. 흑진주벼는 18℃ 처리구, 흑남벼는 27℃에서 유의하게 가장 높았고, 일품벼는 21~27℃ 처리구간에는 유의한 차이가 없었고 18℃ 처리구에서는 수량이 전무하여 조사를 할 수 없었다. 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼의 Oryzanol함량은 0~29mg/100g 범위였고 일반품종인 일품벼는 0~15mg/100g 범위이었다.

등숙온도에 따른 유색미 품종의 안토시아닌계 색소 변이를 농도에 현미수량을 곱한 생산량으로 보면 표 1-32와 같다. C3G 및 Oryzanol의 생산량은 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼는 등숙온도 처리간 고도의 유의한 차이가 나타났고 일반품종인 일품벼는 C3G함량이 전무하였다. 유색미인 흑진주벼와 흑남벼의 C3G생산량은 각각 141~ 591mg/pot, 0~177mg/pot 범위였으며 두 품종 모두 24℃ 처리구에서 유의하게 가장 높았다. Oryzanol생산량은 세 품종 모두 등숙온도 처리간 유의한 차이가 있는 것으로 조사되었다. 흑진주벼와 일품벼는 21, 24℃ 처리구, 흑남벼는 24℃에서 유의하게 가장 높았고, 흑남벼와 일품벼의 18℃ 처리구에서는 수량이 전무하여 조사를 할 수 없었다. 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼의

Oryzanol함량은 0~13.4mg/100g 범위였고 일반품종인 일품벼는 0~15.3mg/100g 범위이었다.

표 1-30. 등숙온도 및 기온교차에 따른 유색미 벼 품종의 수량 및 수량구성요소

품종	처리	1주수수 (개)	1수영화수 (개)	현미천립중 (g)	등숙률 (%)	현미수량 (g/pot)
흑진주벼	18°C(주야 21/15°C)	11.3	85.3	16.9b	56.3c	18.2b
	21°C(주야 24/18°C)	11.8	85.5	18.7a	80.0a	30.1a
	24°C(주야 27/21°C)	11.3	89.5	19.1a	83.8a	32.2a
	27°C(주야 30/24°C)	11.3	84.3	18.8a	74.5b	26.5a
	F-value	NS	NS	**	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	-	0.5	3.8	5.0
흑남벼	18°C(주야 21/15°C)	14.8	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c
	21°C(주야 24/18°C)	14.0	94.3a	20.8ab	81.0a	44.4a
	24°C(주야 27/21°C)	14.3	97.8a	21.2a	82.8a	48.9a
	27°C(주야 30/24°C)	14.3	87.0b	20.2b	72.5b	36.2b
	F-value	NS	**	**	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	3.3	0.5	2.1	5.0
일품벼	18°C(주야 21/15°C)	15.5	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c
	21°C(주야 24/18°C)	15.5	95.8ab	20.6a	83.0a	50.8a
	24°C(주야 27/21°C)	16.0	98.5a	20.4a	83.8a	53.9a
	27°C(주야 30/24°C)	15.3	93.3b	17.4b	74.0b	36.5b
	F-value	NS	**	**	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	3.3	0.2	2.1	4.1

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-31. 등숙온도 및 기온교차에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소

Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 함량 변이 (mg/100g brown rice)			
품 종	등숙온도	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주벼	18℃(주야 21/15℃)	775.7c	25.0a
	21℃(주야 24/18℃)	1363.9b	22.2b
	24℃(주야 27/21℃)	1836.5a	21.2b
	27℃(주야 30/24℃)	1435.7b	23.0ab
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	46.6	1.3
흑남벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0d	0.0d
	21℃(주야 24/18℃)	238.7b	26.5c
	24℃(주야 27/21℃)	361.0a	27.3b
	27℃(주야 30/24℃)	60.1c	28.5a
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	7.5	0.4
일품벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0	0.0b
	21℃(주야 24/18℃)	0.0	28.2a
	24℃(주야 27/21℃)	0.0	28.5a
	27℃(주야 30/24℃)	0.0	28.3a
	F-value	-	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	0.7

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-32. 등숙온도 및 기온교차에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소

Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 생산량 (mg/pot brown rice)			
품 종	등숙온도	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주벼	18℃(주야 21/15℃)	141.0c	4.5b
	21℃(주야 24/18℃)	409.9b	6.7a
	24℃(주야 27/21℃)	590.7a	6.8a
	27℃(주야 30/24℃)	379.8b	6.1ab
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	76.7	1.8
흑남벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0c	0.0c
	21℃(주야 24/18℃)	105.9b	11.8ab
	24℃(주야 27/21℃)	176.5a	13.4a
	27℃(주야 30/24℃)	21.8c	10.3b
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	25.0	2.0
일품벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0	0.0c
	21℃(주야 24/18℃)	0.0	14.3a
	24℃(주야 27/21℃)	0.0	15.3a
	27℃(주야 30/24℃)	0.0	10.3b
	F-value	-	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	1.3

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively



한편 등숙온도 처리에 따른 유색미 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이는 표 1-33과 같다. DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 세 품종 모두 등숙온도 처리간 고도로 유의한 차이가 나타났다. 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼는 24℃ 처리구에서 항산화활성도가 유의하게 가장 높고 18℃ 처리구에서 유의하게 가장 낮았다. 일반품종인 일품벼는 21℃ 처리구에서 유의하게 가장 높고 18℃ 처리구에서 가장 낮았다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 세 품종 모두 등숙온도 처리간 고도로 유의한 차이가 나타났다. 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼는 24℃ 처리구에서 제거율이 유의하게 낮아 항산화활성도가 가장 높았고, 일반품종인 일품벼는 수확량이 없어 조사를 할 수 없었던 18℃ 처리구를 제외한다면 27℃ 처리구에서 제거율이 유의하게 가장 낮아 항산화활성도가 가장 높았다.

표 1-33. 등숙온도 및 기온교차에 따른 유색미벼 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이 (% Inhibition)

품종	등숙온도	DPPH	TBA
흑진주벼	18℃(주야 21/15℃)	76.1c	17.2a
	21℃(주야 24/18℃)	80.3b	15.5b
	24℃(주야 27/21℃)	83.0a	14.4c
	27℃(주야 30/24℃)	80.0b	15.5b
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	1.2	0.3
흑남벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0d	0.0d
	21℃(주야 24/18℃)	67.3b	24.4b
	24℃(주야 27/21℃)	68.3a	23.3c
	27℃(주야 30/24℃)	64.4c	26.2a
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	0.2	0.4
일품벼	18℃(주야 21/15℃)	0.0d	0.0d
	21℃(주야 24/18℃)	63.2a	28.1a
	24℃(주야 27/21℃)	61.3b	27.3b
	27℃(주야 30/24℃)	59.6c	26.6c
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	0.3	0.1

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

## 2) Ethephon 처리가 항산화성분에 미치는 영향

Ethephon 처리가 항산화성분 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 처리 전 벼 품종의 유효분얼기와 유수형성기 생육은 표 1-34와 같이 정상적인 생육을 보이고 있었다.

표 1-34. Ethephon 처리전까지의 벼 품종의 생육

품 종	초 장 (cm)		분 얼 (개)	
	유효분얼기	유수형성기	유효분얼기	유수형성기
흑진주벼	51.3	83.8	13.3	10.8
흑남벼	44.5	73.5	15.3	13.8
일품벼	44.3	71.3	15.5	15.0

Ethephon 처리에 따른 벼 품종의 현미수량은 표 1-35와 같다. 현미수량은 세 품종 모두 대조구와 비교하여 Ethephon처리 농도가 높을수록 유의하게 감소하는 경향이였다. 특히 2000ppm 처리구의 수확량은 무처리 대조구와 비교하여 흑진주벼는 32.6%, 흑남벼는 35.3%, 일품벼는 23.9%가 감소하는 것으로 조사되었다.

Ethephon처리에 따른 유색미벼 품종의 안토시아닌계 색소 C3G 및 Oryzanol 함량 변이는 표 1-36과 같다. C3G 함량은 Ethephon처리간 고도의 유의한 차이가 있었다. 전체적으로 흑진주벼의 2000ppm처리구를 제외하면 Ethephon처리구가 대조구에 비하여 유의하게 높은 경향이였다. 특히 흑남벼는 Ethephon 처리 농도가 높을수록 C3G함량이 유의하게 증가하는 경향이였다. 자포니카 품종인 일품벼는 C3G함량이 전무하였다. Oryzanol 함량은 세 품종 중 흑남벼에서만 Ethephon처리에 의한 유의한 차이가 있었고 흑진주벼와 일품벼는 처리간 차이가 없었다. 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼의 Oryzanol함량은 26~27mg/100g 범위였고 자포니카 품종인 일품벼는 29~30mg/100g 범위로 품종간에도 큰 차이는 없었다.

Ethephon처리에 따른 유색미 품종의 안토시아닌계 색소 C3G 및 Oryzanol 변이를, 농도에 현미수량을 곱한 생산량으로 보면 표 1-37과 같다.

C3G 생산량과 Oryzanol 생산량은 Ethephon 처리간 고도로 유의한 차이가 있었다. 그러나 흑남벼의 100ppm처리구에서 대조구와 비교하여 C3G생산량이 21.7%, Oryzanol 생산량이 5.9% 증가하였을 뿐 전체적으로 Ethephon 처리는 C3G 생산량과 Oryzanol 생산량을 감소시키는 것으로 조사되었다.

표 1-35. Ethephon처리에 따른 유색미 벼 품종의 수량 및 수량구성요소

품 종	Ethephon 농도(ppm)	1주수수 (개)	1수영화수 (개)	현미천립중 (g)	등숙률 (%)	현미수량 (g/pot)
흑진주벼	100	11.5	83.5	19.2a	79.8a	29.4a
	500	11.3	85.5	18.7b	79.5a	28.7a
	1,000	11.0	86.3	17.9c	75.3b	25.5ab
	2,000	11.3	86.0	15.7d	62.5c	19.0b
	대조구	10.8	87.5	18.9ab	79.5a	28.2a
	F-value	NS	NS	**	**	**
LSD <sub>.05</sub>	-	-	0.31	1.9	6.1	
흑남벼	100	14.5	101.5	20.7a	78.8a	47.8a
	500	14.0	94.5	20.1b	77.5a	41.1ab
	1,000	14.3	94.0	19.2c	70.8b	36.3bc
	2,000	14.3	93.3	17.0d	63.8c	28.9c
	대조구	13.8	101.8	20.5ab	77.8a	44.7ab
	F-value	NS	NS	**	**	**
LSD <sub>.05</sub>	-	-	0.29	2.2	7.5	
일품벼	100	14.8	104.0	20.6a	82.8a	52.2a
	500	15.0	100.5	19.9b	80.0ab	48.1ab
	1,000	14.5	105.8	19.1c	77.3b	45.3ab
	2,000	15.0	103.0	17.8d	72.8c	39.9b
	대조구	15.0	105.5	20.1ab	82.5a	52.4a
	F-value	NS	NS	**	**	**
LSD <sub>.05</sub>	-	-	0.40	3.2	7.1	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-36. Ethephon처리에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소

Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 함량 변이 (mg/100g brown rice)			
품 종	Ethephon농도(ppm)	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주벼	100	829.8a	25.9
	500	816.6a	26.7
	1,000	812.0a	26.6
	2,000	695.8b	25.7
	대조구	722.4b	26.1
	F-value	**	NS
LSD. <sub>.05</sub>	33.3	-	
흑남벼	100	224.6c	26.1b
	500	216.0c	26.5ab
	1,000	276.1b	27.1ab
	2,000	291.5a	27.4a
	대조구	197.6d	26.4ab
	F-value	**	**
LSD. <sub>.05</sub>	10.2	0.94	
일품벼	100	0.0	29.8
	500	0.0	29.1
	1,000	0.0	29.7
	2,000	0.0	30.1
	대조구	0.0	29.6
	F-value	-	NS
LSD. <sub>.05</sub>	-	-	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

Ethephon처리에 따른 벼 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이는 표 1-38과 같다. DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성을 조사한 결과 흑진주벼는 처리간 유의한 차이가 없었고 흑남벼, 일품벼는 처리간 고도의 유의한 차이가 인정되었다. 흑남벼는 대조구에 비하여 Ethephon농도가 높을수록 항산화활성도가 유의하게 높아지는 경향이었고 일품벼는 낮아지는 경향이였다.

TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 세품종 모두 Ethephon처리간 유의한 차이가 있었다. 그러나 Ethephon의 농도증가에 따른 일정한 경향은 없었고, 대조구와 비교하여 흑진주벼는 100, 500, 2000ppm 처리구, 일품벼는 500, 2000ppm 처리구에서 항산화활성도가 유의하게 높은 것으로 조사되었다. 흑남벼는 100ppm처리까지는 대조구와 항산화활성도가 같았으나 200ppm처리 이상부터는 항산화활성도가 낮아지는 것으로 나타났다.

표 1-37. Ethephon처리에 따른 유색미 벼 품종의 안토시아닌계 색소

Cyanidin-3-glucoside 및 Oryzanol 생산량 (mg/pot brown rice)			
품종	Ethephon(ppm)	Cyanidin-3-glucoside	Oryzanol
흑진주벼	100	244.1a	7.6a
	500	234.0a	7.6a
	1,000	207.3a	6.8a
	2,000	132.0b	4.9b
	대조구	204.0a	7.4a
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	47.4	1.2
흑남벼	100	107.5a	12.5a
	500	88.9ab	10.9ab
	1,000	100.3ab	9.8bc
	2,000	84.3b	7.9c
	대조구	88.3ab	11.8ab
	F-value	**	**
	LSD <sub>.05</sub>	13.1	1.4
일품벼	100	0.0	15.5a
	500	0.0	14.0ab
	1,000	0.0	13.4ab
	2,000	0.0	12.0b
	대조구	0.0	15.5a
	F-value	-	**
	LSD <sub>.05</sub>	-	1.6

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

표 1-38. Ethephon처리에 따른 벼 품종의 DPPH radical 소거효과 및 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성 변이 (% Inhibition)

품종	Ethephon(ppm)	DPPH	TBA
흑진주벼	100	77.4	16.4b
	500	77.8	16.5b
	1,000	76.5	17.4a
	2,000	77.3	16.6b
	대조구	77.0	17.1a
	F-value	NS	**
LSD <sub>.05</sub>	-	0.30	
흑남벼	100	62.6b	25.4b
	500	62.5bc	25.7a
	1,000	63.0ab	25.7a
	2,000	63.5a	25.7a
	대조구	61.9c	25.2b
	F-value	**	**
LSD <sub>.05</sub>	0.38	0.17	
일품벼	100	59.9a	27.3ab
	500	59.2b	27.1b
	1,000	58.9b	28.2a
	2,000	58.6b	27.0b
	대조구	60.2a	27.4ab
	F-value	**	*
LSD <sub>.05</sub>	0.43	0.77	

\*,\*\* : Significant at 5% and 1% level, respectively

#### 4. 결과요약

이 연구는 유색미 품종의 고허산화성분과 관련된 시비조건, 재배조건 및 생산환경조건 등을 구명하기 위하여 수행되었다. 유색미 품종으로 흑진주벼와 흑남벼를 공시하고 대비품종으로 자포니카 품종인 일품벼를 공시하였다. 질소수준과 수확시기, 퇴비수준과 수확시기, 이앙시기, 재배지역, 등숙온도, Ethephon처리가 항산화성분 생산에 미치는 영향을 분석한 결과는 다음과 같다.

##### 가. 고허산화성분 관련 시비조건 구명

###### 1) 질소수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

가) 질소 시용량이 증가함에 따라 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼의 C3G, P3G함량 및 생산량은 유의하게 증가하였다. 그러나 C3G 함량은 등숙기간이 40일 이후 80일까지

길어질수록 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다.

- 나) *v-oryzanol*의 함량은 질소시비량 및 출수 후 등숙기간 간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 품종간에는 유의한 차이를 보여서 흑진주벼와 흑남벼의 *v-oryzanol*의 함량이 1.9~2.8%인데 비하여 일품벼는 2.6~3.0%로 유색미보다 오히려 높았다.
- 다) Isovitexin 함량은 흑진주벼와 흑남벼 등 유색미에서는 미세한 양만이 검출되어 질소시비량과 등숙기간에 따른 차이를 알 수 없었다.
- 라) 일품벼에는 C3G와 P3G 및 Isovitexin이 전혀 함유되어 있지 않았다.
- 마) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성과 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성은 질소시비량에 따른 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았지만 품종간 차이는 뚜렷하여 유색미 품종이 자포니카인 일품벼보다 강한 항산화 활성을 나타내었다.

## 2) 퇴비수준 및 수확시기가 항산화성분에 미치는 영향

- 가) 퇴비사용량이 증가함에 따라 흑진주벼, 흑남벼 모두 C3G, P3G함량 및 생산량이 증가하는 경향이나 일관된 현저한 차이는 아니었다. C3G 함량은 등숙기간이 40일 이후 80일까지 길어질수록 매우 유의하게 감소하였으며, 그 경향은 흑진주벼에서 보다 흑남벼에서 더욱 뚜렷하였다.
- 나) *v-oryzanol*의 함량은 퇴비사용량 및 출수 후 등숙기간 간에 뚜렷한 차이가 없었다. 그러나 품종간에는 유의한 차이를 보여서 흑진주벼와 흑남벼의 *v-oryzanol*의 함량이 1.9~2.8%인데 비하여 일품벼는 2.6~3.0%로 유색미보다 오히려 높았다.
- 다) Isovitexin 함량은 질소처리에서와 마찬가지로 흑진주벼와 흑남벼 등 유색미에서는 미세한 양만이 검출되어 퇴비사용량 및 등숙기간에 따른 차이를 알 수 없었고 일품벼에서는 전혀 검출되지 않았다.
- 라) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화 활성과 TBA 비색정량법에 의한 항산화 활성은 퇴비사용량에 따른 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았지만 품종간 차이는 뚜렷하여 유색미 품종이 자포니카인 일품벼보다 강한 항산화 활성을 나타내었다.

## 나. 고향산화성분 관련 재배조건 구명

### 1) 이양시기가 항산화성분에 미치는 영향

- 가) 현미수량을 조사한 결과 흑진주벼와 일품벼는 조기, 보통기 및 만기의 이양시기간

수량 차이가 없었고 흑남벼는 보통기재배에서 유의하게 가장 많았다.

- 나) 이앙시기에 따른 C3G 함량 및 생산량은 보통기재배에서 유의하게 가장 높았고 조기 및 만기재배에서 유의하게 낮았다.
- 다) 이앙시기에 따른 Oryzanol 함량은 흑진주벼는 만기재배, 흑남벼는 조기 및 만기재배, 일품벼는 만기재배에서 유의하게 가장 높았다. Oryzanol 생산량은 흑진주벼와 일품벼는 이앙시기간 차이가 없었고 흑남벼는 조기재배에서 가장 높았다.
- 라) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 유색미품종인 흑진주벼와 흑남벼 두 보통기재배에서 유의하게 가장 높았고 일품벼는 차이가 없었다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 세품종 모두 이앙시기간 차이가 없었다.

## 2) 재배지역이 항산화성분에 미치는 영향

- 가) 재배지역에 따른 벼 품종의 항산화성분 변이를 구명고자 연천(경기), 수원(경기), 상주(경북), 익산(전북), 밀양(경남) 등 5개 지역에서 실험을 수행하였다. 현미수량은 흑진주벼는 익산, 흑남벼는 수원과 익산, 일품벼는 상주, 수원 및 익산이 유의하게 높았다.
- 나) C3G 함량 및 생산량은 흑진주벼는 상주, 흑남벼는 익산에서 유의하게 가장 높았다. 상주지역의 흑진주벼 C3G함량은 다른 지역에 비하여 3배나 높았고, 밀양지역의 흑남벼 C3G함량은 다른 지역에 비해 매우 낮은 수준이었다.
- 다) Oryzanol 함량은 흑진주벼는 상주와 밀양, 흑남벼는 상주지역에서 높았다 그러나 일품벼는 연천, 수원, 상주, 밀양 등 여러지역에서 Oryzanol 함량 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았다.
- 라) DPPH 억제율은 흑진주벼는 상주, 흑남벼는 연천, 수원, 상주, 익산에서 유의하게 높았고 일품벼는 상주에서 유의하게 가장 높았다. TBA 억제율은 흑진주벼는 연천, 흑남벼는 연천, 수원, 익산, 밀양에서 유의하게 가장 높았고 일품벼는 연천, 상주가 유의하게 가장 높았다.

## 다. 고향산화성분 생산환경조건 구명

### 1) 등숙온도가 항산화성분에 미치는 영향

- 가) 온도처리 후 현미수량은 흑진주벼는 18℃ 처리구만 유의하게 가장 적었고 등숙온도 21, 24, 27℃ 처리구에서는 처리간 수량 차이가 없었다. 흑남벼와 일품벼의 현미수량



은 21, 24℃ 처리구에서 유의하게 가장 많았고, 18℃ 처리구에서는 낮은 온도로 인해 정상적인 등숙이 이루어지지 않아 수량이 전무하였다.

- 나) 등숙온도에 따른 C3G함량 및 C3G생산량은 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼 모두 24℃ 처리구에서 유의하게 가장 높았고 21℃, 27℃ 순으로 낮아졌다.
- 다) 등숙온도에 따른 Oryzanol 함량은 흑진주벼는 등숙온도 18℃, 흑남벼는 27℃에서 유의하게 가장 높았고, 일품벼는 21~27℃ 처리구간에는 유의한 차이가 없었고 18℃ 처리구에서는 수량이 전무하여 조사를 할 수 없었다.
- 라) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성과 TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 등숙온도 별로 조사한 결과 유색미 품종인 흑진주벼와 흑남벼는 24℃처리구에서 항산화활성이 유의하게 가장 높았다.

## 2) Ethephon처리가 항산화성분에 미치는 영향

- 가) Ethephon처리에 따른 유색미 품종의 항산화성분 변이를 알고자 Ethephon처리농도를 무처리구, 100, 500, 1000, 2000ppm의 5처리로 하여 실험을 수행하였다. 현미수량은 세 품종 모두 대조구와 비교하여 Ethephon처리 농도가 높을수록 유의하게 감소하였다.
- 나) Ethephon 처리는 대조구에 비하여 C3G 함량을 유의하게 높이는 경향이였다. 특히 흑남벼는 Ethephon 농도가 높을수록 C3G함량도 유의하게 증가하는 경향이였다. 그러나 C3G 농도에 현미 수량을 곱한 C3G 생산량으로 보면 Ethephon 처리효과는 뚜렷하지 않았다. Ethephon 2000ppm처리는 C3G 생산량과 Oryzanol 생산량을 오히려 감소시키는 것으로 나타났다.
- 다) Oryzanol 함량은 흑진주벼와 일품벼는 처리간 차이가 없었고 흑남벼는 2000ppm처리구에서만 대조구 대비 다소 함량이 증가하였을 뿐 기타 처리구에서는 대조구와 비교하여 함량이 낮아지는 것으로 조사되었다.
- 라) DPPH radical 소거효과에 의한 항산화활성은 흑진주벼는 처리간 유의한 차이가 없었고 흑남벼는 Ethephon 농도가 높을수록, 일품벼는 Ethephon농도가 낮을수록 항산화활성이 유의하게 높아지는 경향이였다. TBA 비색정량법에 의한 항산화활성은 Ethephon의 농도증가에 따른 일정한 경향이 나타나지 않았다.

## 5. 참고문헌

1. Chung, Ill Min, Kwang Ho Kim, Joung Kuk Ahn, and Jin Ohk Lee. 2000. Varietal variation in antioxidative activity of rice grain by DPPH and TBA methods. Korean J. Crop science Vol.45(4): 261-266.
2. Kinoshita T. 1984. Gene analysis and linkage map. In Biology of Rice. JSSP/Elsevier Tokyo: 187-274.
3. Nobuji Nakatani. 1995. Recent Advances in the Study on Natural Antioxidants. J. Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi Vol.37(7):569-576.
4. Owata T. 1995. Antioxidative defense systems present in higher plants and chemistry and function of antioxidative components. Food & Food Ingredients J. of Jpn. 163: 19-29.
5. Peddy VS, Goud KV, Sharma R, Reddy AR. 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonialyase biosynthesis. Plant Physiol. 105: 1059-1066.
6. Tomio Ktani, Hideki Tatemoto, Mitsuyoshi Okamoto, Kazunori Fujii and Norio Muto. 2002. A Comparative Study on Antioxidative Activity and Polyphenol Content of Colored Kernel Rice. J. of Jpn. Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi Vol.49(8):540-543.
7. Wang H, Gao G, Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanin. J. Agric. Food Chem. 45: 304-309.
8. 강미영, 최영희, 남석현. 1996. 유색미 쌀겨 추출물의 화학적 변이원 mitomycin C에 대한 변이원성 억제기작. 한국농화학회지 제39권 6호: 424-429.
9. 강삼식, 박순직. 2002. 농작물함유 천연항산화색소의 기능평가 및 생산기술연구. 농촌진흥청대형공동연구사업 결과요약집: 549-551.
10. 경북대학교 농과대학. 1996. 쌀함유 생리활성물질의 검색 및 기능평가에 관한 연구. 농촌진흥청 농업특정연구개발사업 연구보고서.
11. 고희중, 원용재, 차건완, 허문희. 1996. 유색미 색도 및 영양특성의 품종간 변이. 한국작물학회지 제41권 5호: 600-607.
12. 광태순, 박희준, 정원대, 최종원. 1999. 특수 유색미, 향류미 및 한국 재래종 벼 종자의 층위별 항산화 및 간보호 활성. 한국식품영양과학회지 제28권 1호: 191-198.

13. 김광호, 김연식, 서경인. 2001. 흑자색 종피 벼 품종의 파종기 및 출수후 일수에 따른 종실의 Cyanidine 3-Glucoside(C3G)함량 변이. 한국작물학회지 제46권 별호: 264-265.
14. 김두운, 은종방, 이종욱. 1998. 흑미 혼용밥의 취반조건과 텍스처의 변화. 한국식품과학회지 제30권 3호: 562-568.
15. 김미숙, 한태룡, 윤혜현. 1999. 유색미 식혜의 당화 및 관능적 특성. 한국식품과학회지 제31권 3호: 672-677.
16. 김석신, 김상용, 이원중. 1998. 잠재적 식혜원료로서 발아유색미의 특성. 한국식품과학회지 제30권 5호: 1092-1096.
17. 김선림, 황종진, 송진, 송정춘, 정국현. 2000. 유색미 · 검정콩 · 검정 찰옥수수 Anthocyanin 색소의 추출, 정제 및 정량. 작물시험연구논총 제1권: 395-402.
18. 김영두, 하기용, 이경보, 신현탁, 조수. 1998. 유색미 품종의 안토시아닌함량 및 이화학적 특성변이. 한국육종학회지 제30권 3호: 305-308.
19. 김영두, 하기용, 이재길, 신현탁, 조수연. 1998. 유색미 품종의 안토시아닌, 화학성 및 취반특성. 한국작물학회지 제43권 별호: 173-174.
20. 김정근, 김창영, 이정일, 신진철, 이문희. 1998. 이앙시기 및 질소시비량이 유색미 흑진주벼의 건물생산 및 수량에 미치는 영향. 농업환경연구논문집 제40권 2호: 48-55.
21. 김창영. 1998. 유색미와 향미의 생육특성 및 주요 성분에 관한 연구. 충남대학교 박사학위논문.
22. 김홍열, 박순직, 한상준, 류수노. 2000. 흑자색미 F<sub>2</sub> 집단의 Cyanidin 3-glucoside 함량변이. 한국육종학회지 제32권 4호: 333-337.
23. 남석현, 강미영. 1997. 유색미 쌀겨추출물의 in vitro의 발암 억제효과. 한국농화학회지 제40권 4호: 307-312.
24. 남석현, 강미영. 1998. 유색미 겨 추출물의 품종간 발암과정 억제효과의 비교. 한국농화학회지 제41권 1호: 78-83.
25. 남석현, 장수민, 강미영. 2002. 유색미 에탄올 추출물의 변이원성 및 화학적 직접변이원에 대한 항변이원 활성 검정. 한국농화학회지 제45권 4호: 195-202.
26. 남석현, 장수민, 강미영. 2002. 유색미 에탄올 추출물의 품종간 항산화 활성 변이. 한국농화학회지 제46권 1호: 16-22.
27. 남석현, 장수민, 강미영. 2002. 유색미 에탄올 추출물의 품종간 항산화 활성 변이. 한국농화학회지 제46권 1호: 16-22.

28. 농촌진흥청 작물시험장. 1996. 유색미 이용 천연색소 개발 및 산업적 활용. 과학기술처 특정연구개발 연구보고서.
29. 류수노, 박순직, 강삼식, 이은방, 한상준. 2000. 흑진주벼로부터 색소추출물의 안전성. 한국작물학회지 제45권 6호: 370-373.
30. 류수노, 이봉호. 1998. 식물함유 항산화성분에 대한 일본·미국의 연구동향. 한국국제농업개발학회지 제10권 2호: 13-23.
31. 박순직, 김홍열, 원용재, 한상준. 2000. 시비조건이 흑진주벼의 안토시아닌 색소 C3G와 P3G 함량에 미치는 영향. 한국작물학회지 제32권 별호: 326-327.
32. 박순직, 김홍열, 한상준, 류수노. 2000. 유색미 흑진주벼 조합 잡종세대에서 Cyanidin 3-glucoside 함량변이. 한국육종학회지 제32권 3호: 285-290.
33. 박순직, 류수노, 김홍열, 원용재, 한상준. 2001. 에세폰 처리에 따른 유색미의 안토시아닌 색소 함량변이. 한국작물학회지 제46권 별호: 148-149.
34. 박순직, 이종훈, 한상준, 김홍열, 류수노. 1998. 유색미에 함유된 항산화성분 Cyanidin 3-glucoside의 HPLC 분석 및 품종간 차이. 한국작물학회지 제43권 별호: 55-56.
35. 손태호, 김경민, 이종준, 손재근. 1999. 벼에서 현미과피색과 식물체 착색의 유전. 한국육종학회지 제31권 4호: 373-377.
36. 송선주, 이유석, 이종욱. 2000. 취반된 흑미의 휘발성 향기 성분. 한국식품과학회지 제32권 5호: 1015-1021.
37. 신해룡, 김석언, 권오도, 박홍규, 이인, 박태동, 김용재. 1998. 이앙시기, 질소시비량, 재식밀도가 유색미의 생육 및 수량에 미치는 영향. 농업환경연구논문집 제40권 2호: 56-62.
38. 오세관, 최해춘, 조미영, 김수언. 1996. 유색미 안토시아닌계 및 탄닌계색소의 추출법. 한국농화학회지 제39권 4호: 327-331.
39. 윤주미, 조만호, 한태룡, 백영숙, 윤혜현. 1997. 천연색소로서 한국산 유색미 안토시아닌의 안정성 연구. 한국식품과학회지 제29권 2호: 211-217.
40. 이유석, 조지미, 이종욱. 2002. 수원415호 유색미의 이화학적 특성. 한국식품과학회지 제34권 5호: 842-845.
41. 장수민, 김광호, 강미영. 2001. 쌀 미숫가루 특성의 품종간 차이. 한국육종학회지 제33권 2호: 73-79.
42. 조만호, 백영숙, 윤혜현, 한태룡. 1996. 한국산 유색미에서 분리한 안토시아닌의 화학

- 구조. 한국농화학회지 제39권 4호: 304-308.
43. 최영희, 김광호, 강미영. 2001. 쌀 식혜 가공성 및 관능적 특성의 품종간 차이. 한국육종학회지 제33권 2호: 65-72.
44. 최해춘, 오세관. 1996. 유색미 색표의 종류와 기능. 한국작물학회지 제41권 별호: 1-9.
45. 하태열, 박성희, 이상효, 김동철. 1999. 유색미의 품종별 호화 특성. 한국식품과학회지 제31권 2호: 564-567
46. 하태열, 박성희, 이창호, 이상효. 1999. 유색미 품종별 화학성분의 조성. 한국식품과학회지 제31권 2호: 336-341.

## 제 2 절 벼 항산화물질 탐색 및 항산화물질 분리 및 동정

### 1. 서언

최근 들어 인간은 free radicals로 야기되는 암과 노화에 대한 대책방안을 마련하기 위해 생리활성물질인 천연 항산화 물질의 개발에 많은 관심을 보이고 있다 (Cutler, 1984). 노약자, 환자, 음주자, 흡연자 또는 정상인이더라도 오염물질이나 유해환경에 노출이 되면 인체 방어 능력이 약화된 경우 활성산소와의 균형이 깨져서 인체가 손상을 입게 된다. 따라서 최근의 연구는 superoxide radicals에 의해 유도된 질병 치료와 항암제로 인한 정상 세포를 보호하는 것으로서, 주로 식품과 의약품에 천연 항산화 물질을 적용하는데 주안점을 두고 있다.

Free radicals은 짝 짓지 않은 전자를 가진 어떤 원자 또는 분자로서 정의 되어진다 (Punchard와 Kelly, 1996). 생물학 또는 이와 관련된 분야에서 중요한 free radical species는 산소이며, 이는 oxygen free radicals (OFRs)로써 언급되어진다. OFRs는 반응적인 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이라고 주로 불리는 거대한 분자들의 그룹 중 일부이다. 이들은 모두 산소분자(O<sub>2</sub>)보다도 더 강하게 산화되며, 여기에는 superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·), 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 hydroxy radical (·OH) 등이 포함된다 (Sies, 1993). 저온과 고온 및 오염물질들과 같은 환경스트레스에 의해 발생하는 ROS는 식물체 내에서 생리적 장애에 많이 관여한다. 항산화물은 방어체계의 메카니즘에 따라 물질을 생산하는 일반적 성질이 있는데, 식물체들은 ROS에 의한 산화적 스트레스를 피하기 위해 넓은 범위의 효소적인 항산화 물질이나 비효소적 항산화 물질을 가지고 진화해왔다.

McCord와 Fridovich (1969)에 의해 발견된 SOD (superoxide dismutase, EC 1.15.1.1)는 superoxide free radical이 분자상의 산소와 과산화수소 (2O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>)로 변환되는 것을 촉매하면서 활성 자리에 산화환원 금속을 가지는 금속단백질이다. 따라서 이 효소의 활성은 O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 의해 결정되어지므로 특이하다고 할 수 있다. superoxide radical은 박테리아에서부터 인간에 이르기까지 모든 호흡하는 세포에서 발생되고 많은 세포내 물질과 반응할 수 있다. 이것은 주로 식품의 품질 저하와 영양소 파괴를 일으키는데, SOD는 superoxide 손상에 대한 신체의 첫 번째 방어적인 효소로서 매우 중요하므로 가공전의 식품에 대해 항산화제로서 인정받고 있다. 그 활성 자리에는 촉매적 보결 금속 (catalytic prosthetic metal)으로서 다른 3종류의 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, 그리고 Fe-SOD의 metalloenzymes이 존재하고 이들은 식물조직에서 양적으로 다양하게 분포되어

있으며, 각각의 효소들의 활성은 cyanide와  $H_2O_2$ 의 저해정도에 따라서 구별된다. 특히, 고등 식물에서 Cu/Zn-SOD는 cyanide와  $H_2O_2$ 에 의해 저해됨으로써 가장 뛰어난 활성을 보이며, 세포질과 색소체에서 발견되었다 (Bannister 등, 1987; Sakamoto 등, 1992). 식물의 SOD 활성은 다양한 환경적, 화학적 자극에 의해 반응이 증가한다고 알려져 있다 (Fridovich, 1986; Peri-Treves와 Galun, 1988). 더구나, SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase (EC 1.11.1.6)와 peroxidases (POD, EC 1.11.1.7)에 의해 물과 산소로 분해된다. Catalase는 식물체가 광호흡을 하는 동안 형성된  $H_2O_2$ 를 제거하는 역할을 하고, 주로 peroxysome에서 발견된다 (Tolbert, 1981; Lazarow와 Fujiki, 1985). 즉, 이들은 superoxide free radical의 파괴를 촉매하여 해로운 영향에 대해 oxygen-metabolizing cell을 보호하는 역할을 하는 것으로 없어서는 안 될 중요한 효소들이다.

반면에, TBA (thiobarbituric acid)가는 지질과산화의 정도를 측정하기 위하여 가장 보편적으로 이용하는 방법이다. 이 방법은 간단하고 섬세하며, 다른 방법에 비하여 볼 때, 지각적 평가와 함께 높은 상관을 보인다 (Park, 1995). 그것은 2차적인 지질과산화 생성물인 malonaldehyde (MA)를 측정하는 것인데, malonaldehyde는 산의 열처리 과정에서 TBA와 함께 복합체를 형성한다. Malonaldehyde는 제일 먼저 TBA와 반응을 하고, 최대 흡광도 532 nm에서 붉은 색원체를 형성한다.

벼 (*Oryza sativa* L.)는 우리나라에서 가장 중요한 식량작물 중 하나로서 식량난 해결을 위한 쌀의 생산성과 이용성을 증진시키기 위하여 벼 품종의 육종 및 육성 프로그램을 수립해야 한다. 양질의 벼 종자는 저장기간 동안 곡물의 산화와 영양상태의 감소가 적은 것으로서 농업적으로 매우 중요성을 띄고 있다. 벼 종자는 flavonoids, isovitexin, cyanidin, oryzanol,  $\alpha$ -tocopherol, 그리고 phytic acid와 같이 강한 천연 항산화성을 지니고 있는 phenolic 화합물들을 함유하고 있다 (Ramarathnam 등, 1986과 1989; Wu 등, 1994; Choi와 Oh, 1996; Osawa 등, 1985). 이들 화합물들 중에서 벼의 왕겨로부터 분리된 isovitexin과 phytic acid는 지질 과산화를 억제하는 매우 강한 항산화 물질임이 밝혀졌다 (Ramarathnam 등, 1989). 벼의 왕겨에는 이런 항산화 물질이 많아 경제적으로 천연 항산화 물질의 원천이 되기 때문에 많은 주목을 받게되었다. 벼는 수확 후 성숙 혹은 노화하기 시작하는데, 저장양분이나 항산화 물질을 소모하기 전에 관리를 필요로 한다. 노화속도는 부분적으로 수분함량도 영향을 미치지만, 대체로 온도에 매우 큰 영향을 받는다 (Barber, 1972). 또한 저장조건 중 기간은 벼 종자의 휴먼타파에 영향을 미친다 (Navasero 등, 1975). 따라서 항산화 활성력이 강한 품종일수록 벼의 저장기간도 길어질 수 있다고 생각되어진다. 따라서 고향산화 물

질을 많이 포함하고 있는 벼 품종을 육성하기 위하여 구체적인 스크린 방법이 수립되어야 할 것이다. 왕겨의 항산화능력은 triterpene alcohol의 ferulate ester 혼합물인 *r*-oryzanol에 있으며, 흑미의 항산화능력은 cyanidin-3-glucoside라고 믿어지고 있다.(Mandac 와 Juliano, 1978), 또한 유색미에 함유된 cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucosides 산화적 스트레스에 대한 방어적 작용을 한다고 알려져 있으며, pelargonidin-3-*O*- $\beta$ -K-glucoside, delphinidin-3- $\beta$ -D-glucoside 등의 성분들도 동정 되어졌다 (大澤, 1993). 그러나 벼가 가지는 항산화 능력을 단일 화학물질에 의한 것이라고 받아들이기는 어렵다. 또한, 적미의 항산화능력에서, catechin 과 tannin이 존재한다는 것이 보고되었다 (Nawa 와 Ohtani, 1992).

호기적 생물은 산화적 대사과정 중에 생체내에서 항상 free radical이 생성되고 있으며 대부분은 항산화 효소 및 항산화 물질에 의하여 소거가 되지만 항산화 방어체계에 문제가 생겼을 경우 free radical에 의한 세포구성성분의 변성, 기능장애 등 여러 가지 질병이 발생된다. 따라서 항산화 물질의 함량과 항산화 활성과는 상관이 있는 것으로 알려져 있으나 항산화 물질은 그 종류와 구조가 매우 다양하며 체내의 과산화반응도 매우 복잡하므로 항산화 활성과 항산화 물질을 단일반응기구로 설명하는 데는 어려움이 있다. 항산화 활성 (antioxidative activity)은 체내의 과산화반응을 억제하는 성질로서 과산화는 크게 ①free radical chain reaction 반응에 의한 자동산화 ②비(非) radical 반응에 의한 과산화지질의 형성 ③효소(lipoxygenase)에 의한 과산화반응으로 구분 할 수 있으며, 항산화물질 (antioxidative substances)은 이들 산화기작을 여러 경로를 통하여 차단하거나 지연시키는 작용을 하는 것으로 산화촉진작용을 효과적으로 제거함으로써 항산화 활성을 높이는 역할을 하는 물질을 일컫는다. 항산화 활성물질은 free radical 생성을 미연에 방지하는 예방적 항산화제(과산화억제물질)와 이미 생성된 radical을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제로 구분된다.

본 연구는 건강기능성 특히 항산화 활성관련 물질을 탐색하기 위하여 수행하였으며, 항산화활성 검정을 위하여 산화반응에 있어서 매우 중요한 free radical에 관련된 활성 산소 소거능(지질과산화)은 DPPH, TBA, ESR법을 이용하여 측정하였고, 활성산소소거에 관련된 효소계의 반응은 SOD와 POD활성 검정을 *in vitro* 상태에서, 생물학적 활성검정은 *in vivo* 상태에서 검정 하였고, 항산화활성 물질분석은 과산화억제물질과 free radical scavenger로 작용하는 물질로 널리 알려진 phenolic acids 중 ferulic acid을 중심으로 물질 추출, 분리를 하였고 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교시험을 수행하였다.



## 2. 연구방법 및 내용

### 가. 벼 항산화 활성 물질 탐색 및 *in vitro* 항산화 활성 검정

#### 1) 항산화활성 물질 탐색 및 분석

##### 가) 항산화활성 물질 탐색

#### (1) ESR (Electron Spin Resonance spectrometer; 전자스핀공명분광기)에 의한 항산화물질의 SOD 활성 측정

벼 항산화물질로 널리 알려진 isovitexin, oryzanol을 비롯하여 caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid, gallic acid에 대한 SOD활성을 ESR을 이용하여 항산화활성법과 같은 방법으로 측정하였다.

##### 나) HPLC에 의한 항산화물질 분석

#### (1) 실험재료

공시재료는 1999년 건국대학교에서 재배·수확한 114 품종 중 항산화활성이 높은 AC 1423등 17품종을 분석시료로 이용하였다.

#### (2) 시약제조

HPLC에 사용된 용매는 모두 HPLC용 등급을 사용하였고, 증류수는 탈이온 처리하였으며 사용 전에 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하여 사용하였다. 그 외 추출 및 조제용은 일급 시약을 사용하였다.(그림 2-1)

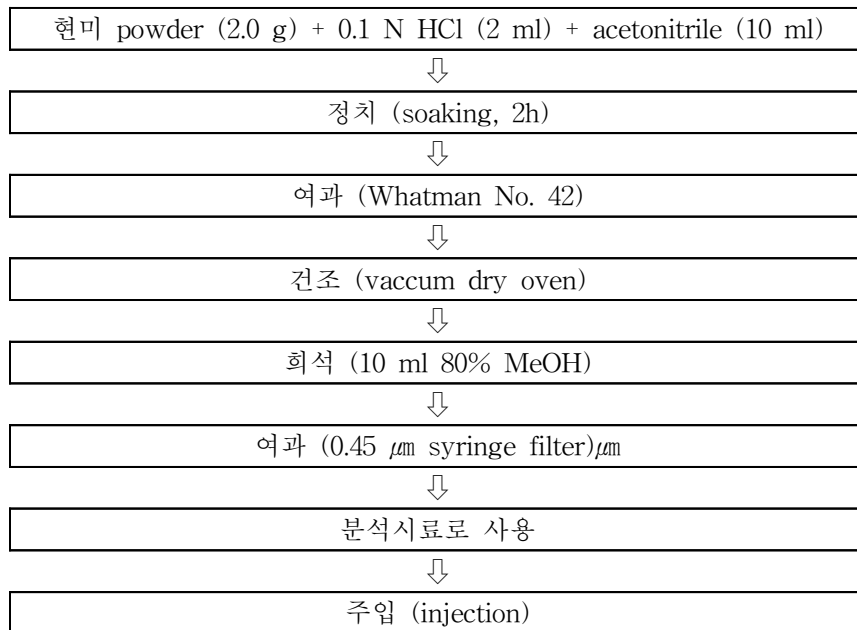


그림 2-1. HPLC분석 시료액 조제과정.

### (3) 분리조건

- stationary phase : YMC AM303 (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase : Distilled water(H<sub>2</sub>O)→0.1% acetic acid 함유  
Acetonitrile(ACN) → 0.1% acetic acid 함유
- Injection volume : 20  $\mu\text{l}$
- Flow rate : 1.0 ml min<sup>-1</sup>
- UV : 280 nm

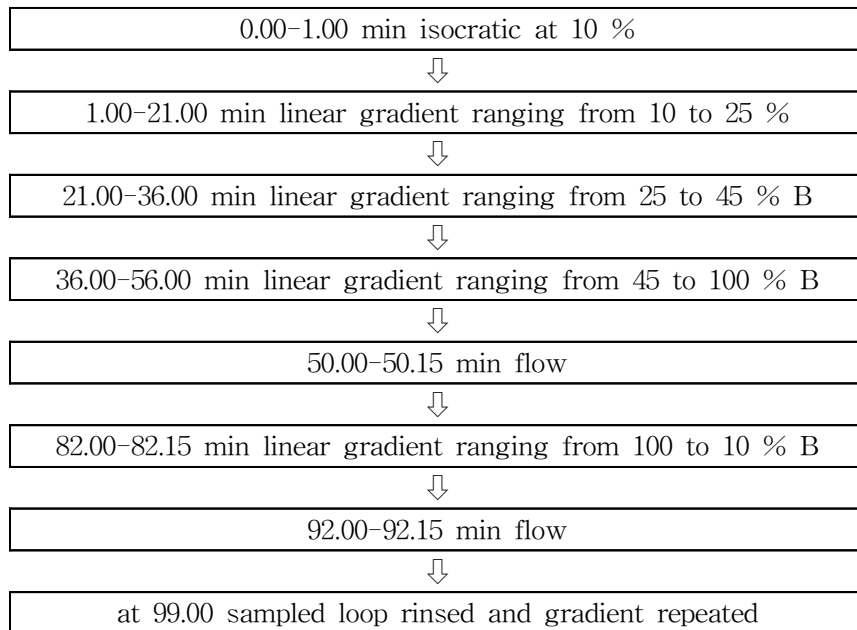


그림 2-2. 물질 분석을 위한 HPLC 프로그램

#### (4) 분석대상 항산화물질

HPLC를 이용하여 탐색된 물질중 활성이 높은 chlorogenic acid, ferulic acid, isovitexin에 대한 쌀 함유량을 분석하기 위하여 검량선을 작성 하였다 (그림 2-3).

◦ 검량선 작성 : chlorogenic acid, ferulic acid, isovitexin

(standard) 0.5 mg + 80% MeOH 5 ml

→ 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l 40  $\mu$ l, 50  $\mu$ l injection

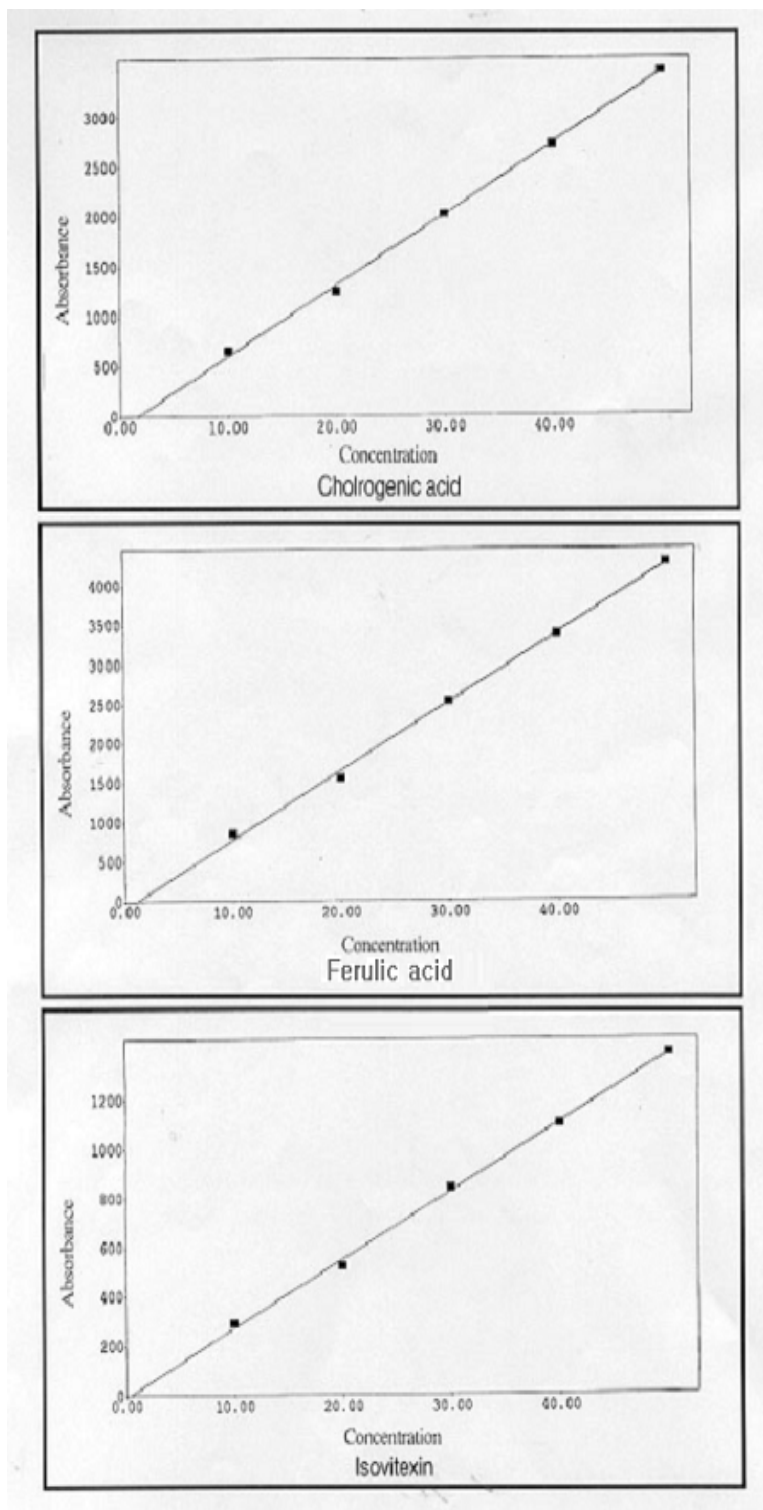


그림 2-3. 분석대상 항산화물질의 standard curves.

## 2) 항산화활성검정

### 가) *In vitro*에서 항산화활성검정

#### (1) SOD와 POD 항산화 활성 검정

##### (가) SOD와 POD 활성검정을 위한 조효소 추출

그림 2-4에서와 같이 SOD의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온진공 냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh)한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다.

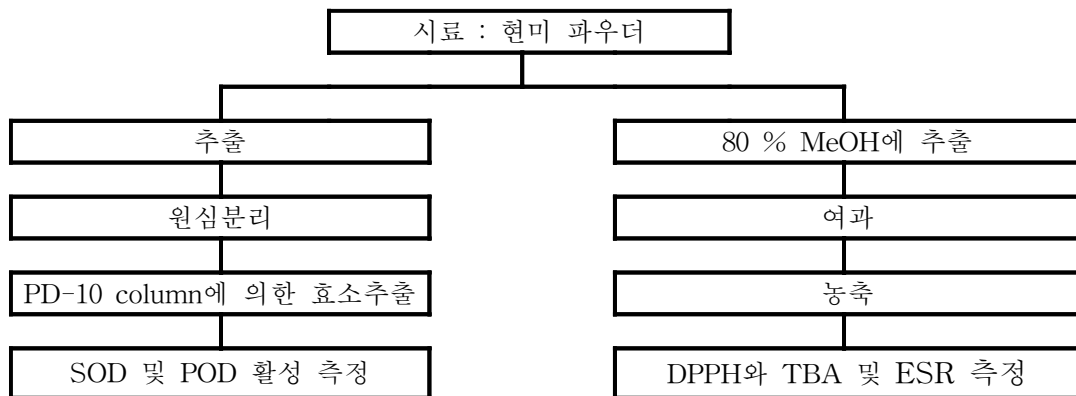


그림 2-4. SOD, POD, DPPH와 TBA 및 ESR법을 이용한 항산화 활성 검정 모식도.

##### (나) Superoxide dismutase (SOD) 활성검정

위에서 추출한 조효소 60 $\mu$ l와 assay buffer 3.0ml 및 riboflavin 30 $\mu$ l을 혼합하여 25 $^{\circ}$ C의 온도 및 광 조절 식물생장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원 저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (다) Peroxidase(POD) 활성검정

POD의 활성은 Raa (1971)의 방법에 의하여 측정하였다. Sodium phosphate buffer (pH 7.0) 7.9 ml, 0.3% 과산화수소수 0.5 ml 및 1% *o*-phenylenediamine 0.5 ml와 위에서 준비한 조효소 0.1 ml를 혼합하여 반응액을 9 ml가 되도록 하였다. 조효소의 첨가에 의하여 반응이 개시되었으며, 이를 5분간 반응시킨 다음 반응정지액 (NaH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에 30분간 방치 후, 430 nm에서 UV로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (2) DPPH와 TBA 활성 검정

#### (가) 벼 추출물의 DPPH에 대한 전자공여능 측정

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여능을 Yoshida 등 (1989)의 방법을 이용하여 측정하였다. DPPH 용액 2.5 ml (DPPH 30 mg을 ethanol 200 ml에 용해시킨 후, 증류수 200 ml를 첨가한 용액)와 80% methanol에 용해한 1% 시료용액 0.5 ml를 혼합하여 1분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 검정하였다. 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

#### (나) TBA 지질과산화 억제 측정

##### ① 기질용액과 반응액의 조제

Lipid에 대한 malondialdehyde 생성 억제효과는 linoleic acid 기질에 대한 산패 억제 효과로 조사하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 0.03 M이 되도록 linoleic acid를 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 20 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 19.2 ml와 1%의 각 시료액 0.8 ml를 첨가한 후, 40°C 항온수조에서 100 rpm으로 24시간 동안 진탕하여 다음과 같이 TBA가를 측정하였다.

## ② Thiobarbituric acid (TBA)가 측정

TBA는 thiobarbituric acid를 이용한 Wong 등(1981)의 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다. 경시적 반응액 2.0 ml씩을 시험관에 취하고 여기에 35% trichloroacetic acid (TCA) 1.0 ml와 0.75% TBA 시약 2.0 ml를 가한 다음 시험관 진탕기로 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후, 95°C 항온수조에서 40분 동안 반응·발색시켰다. 반응이 끝난 후, 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1.0 ml, chloroform 2.0 ml를 가하고, 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였고, 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 이를 TBA가로 하였으며, 대조군의 TBA가와 비교하여 유지에 대한 산화 억제효과를 측정하였다.

지질과산화 억제율 (%) =  $(1 - A / B) \times 100$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

## (3) ESR을 이용한 SOD 활성의 측정

SOD 활성은 JES\_RE1X ESR spectrometer (JEOL Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. Hypoxanthine-xanthine oxidase system으로부터 발생된  $O_2^{\cdot -}$  radical은 DMPO에 의해서 포집하였고, hypoxanthine (2 mM) 50 $\mu$ l와 DMPO (9.2 M) 20 $\mu$ l 그리고 소거제 또는 SOD 50  $\mu$ l로 혼합하였다. 그 다음 반응 혼합물을 균등하여 cell에 옮기고, ESR signal을 45초 후부터 측정하였다. ESR signal의 intensity는 국제 표준으로 이용되는  $Mn^{2+}$ 의 intensity 비율로 조정하였다.

## (4) 통계처리

위의 모든 활성검정은 3반복으로 수행하였으며 통계분석은 모든 데이터를 SAS (Statistical Analysis System; SAS, 1986) 프로그램으로 최소유의차 (Least significant difference, LSD)를 검정하였다.

### 나. 벼 향산화 활성관련 물질의 분리 및 동정

#### 1) 향산화활성 물질 분리

##### 가) 공시재료

높은 향산화 활성을 가지고 있는 것으로 알려진 적색찰을 현미상태에서 80%

MeOH을 이용하여 24 시간 동안 추출하였고, 추출액은 Whatman filter paper No. 42을 사용하여 filtering을 하였다. 이 조추출물을 이용하여 항산화활성물질을 분리 동정 하였다.

#### 나) 적색찰 추출물질에 대한 이화학적특성 연구

물질을 분리하기에 앞서 우선 농축된 조시료액을 이용하여 pH 및 열에 대한 안정성 조사, 유기용매로의 이행특성 조사, resin에 대한 활성물질의 흡착성 조사 및 물질의 이화학적 특성을 조사 하였다.

#### 다) 분리대상물질

ESR을 이용한 벼 항산화 물질 탐색결과 높은 항산화활성을 보인 ferulic acid를 flash column chromatography, TLC, UV, MS, 과 HPLC을 이용하여 분리 동정하였다(그림 2-5, 2-6, 2-7).

#### 라) 물질의 분리 방법

##### (1) 1단계

##### (가) 시료 전처리 과정

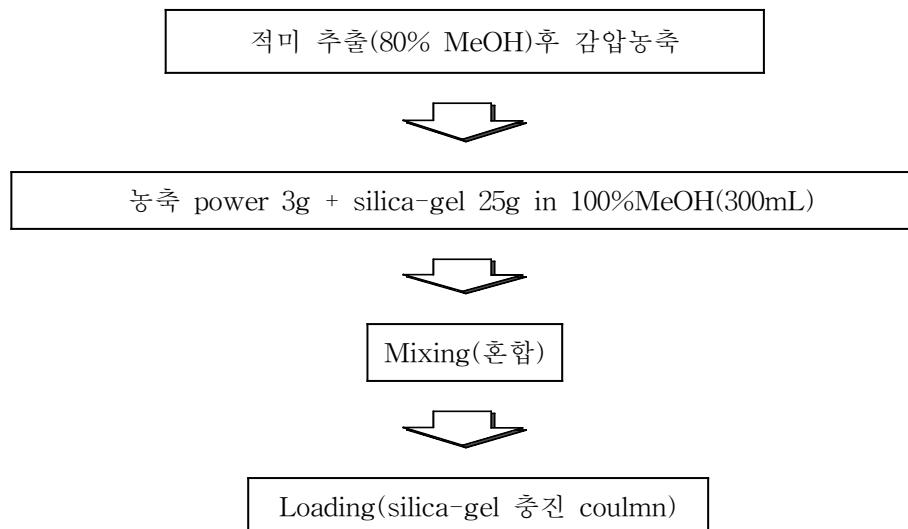


그림 2-5. 시료의 전처리 과정





그림 2-6. 80% MeOH를 이용한 적색찰 추출물

(나) Open column 용매 전개 변화.

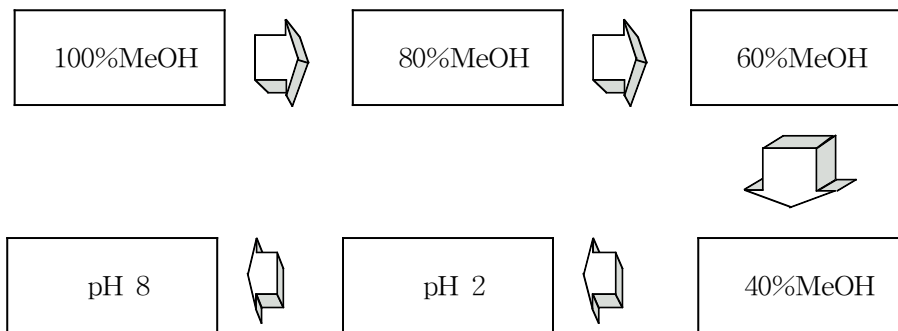


그림 2-7. Open column의 용매 전개 변화 단계

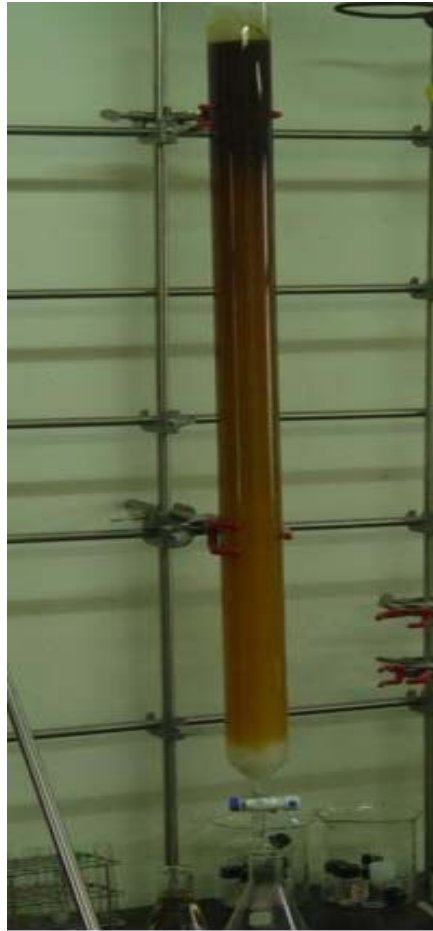


그림 2-8. Open column chromatography를 이용한 물질의 분리

## (2) 2단계

1단계에서 얻어진 각 fractions을 UV 흡광도 값을 측정 후 같은 흡광도 값을 보이는 fraction을 선발 하였다.

100% MeOH 용매조건에서는 총 220개의 fractions중 같은 흡광도값을 보이는 fraction 9개를 선발(그림2-9)한 후 용매조건을 달리한, 80% MeOH 용매조건에서는 총 230개의 fractions 중 8개의 fractions를 선발 (그림2-10), 60% MeOH 용매조건에서는 총 230개의 fractions중 13개의 fractions를 선발(그림2-11), 40% MeOH 용매조건에서는 총 200개의 fractions중 9개의 fractions를 선발 (그림2-12), 용매조건이 pH 2인 추출물에서는 총 330개의 fractions중 12개의 fractions를 선발 (그림2-13), 용매의 pH를 8로 조절한 추출물에서는 총 230개의 fractions중 4개의 fractions를 선발하였다(그림2-14).

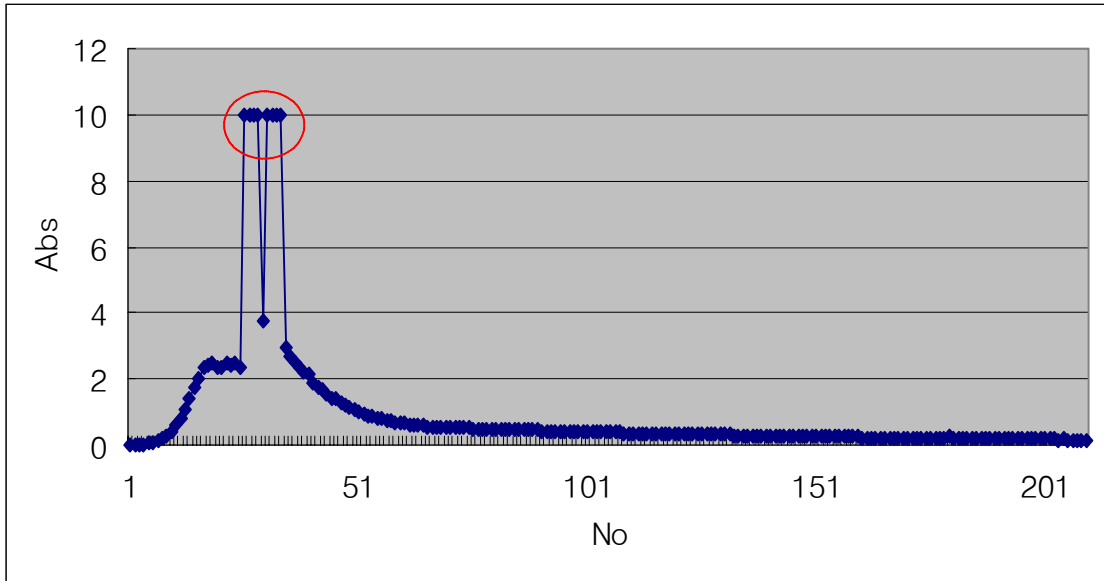


그림 2-9. Open column chromatography를 통한 100% MeOH 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

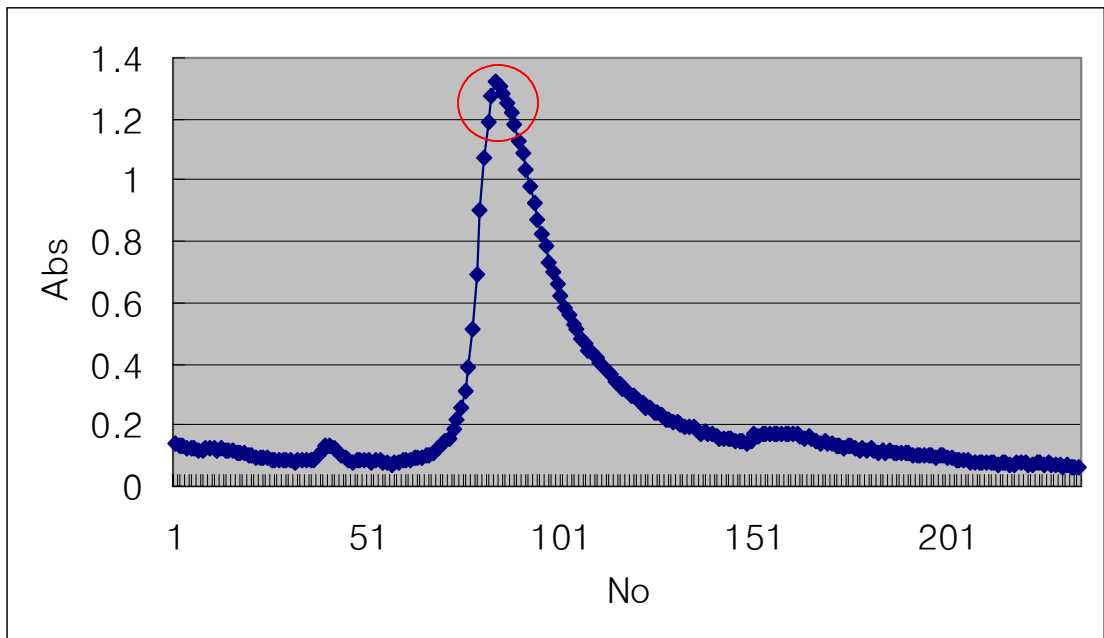


그림 2-10. Open column chromatography를 통한 80% MeOH 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

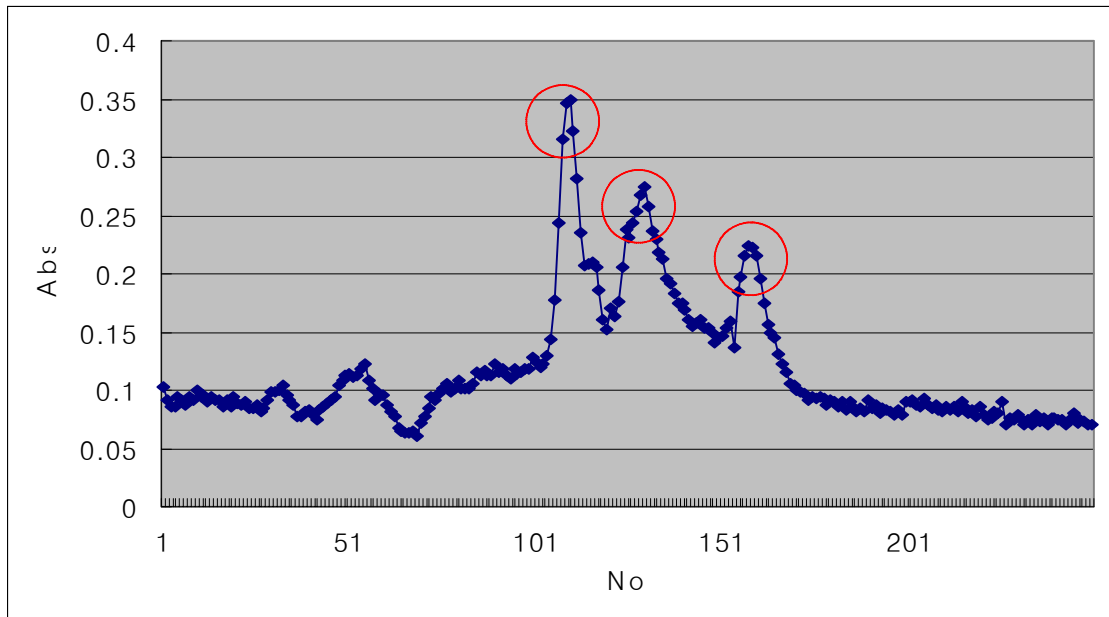


그림 2-11. Open column chromatography를 통한 60% MeOH 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

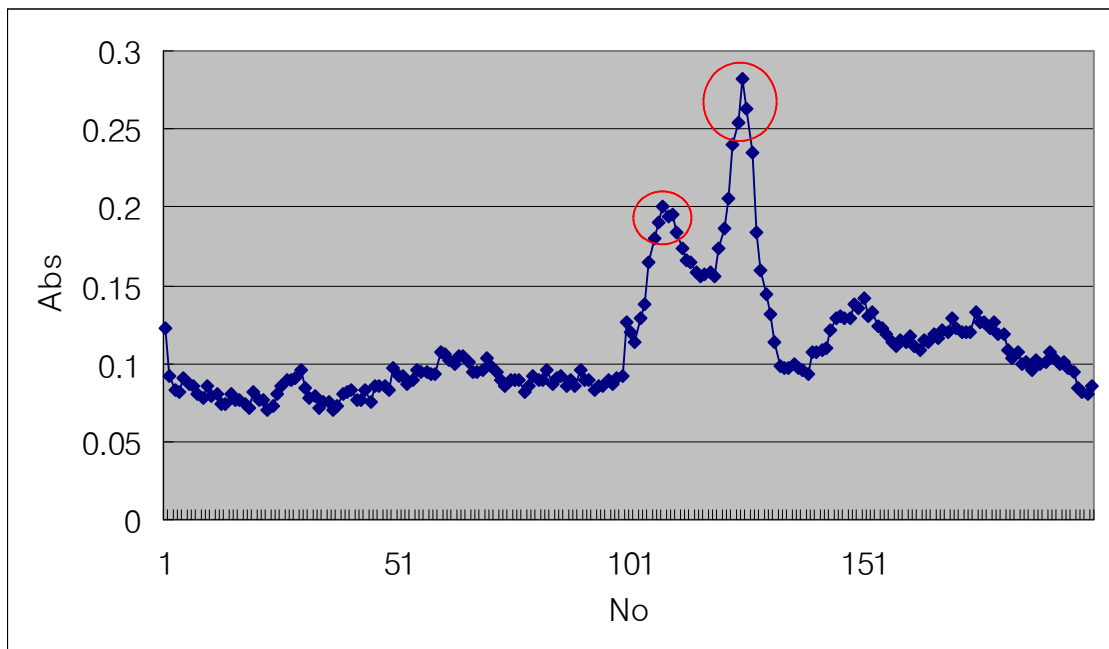


그림 2-12. Open column chromatography를 통한 40% MeOH 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

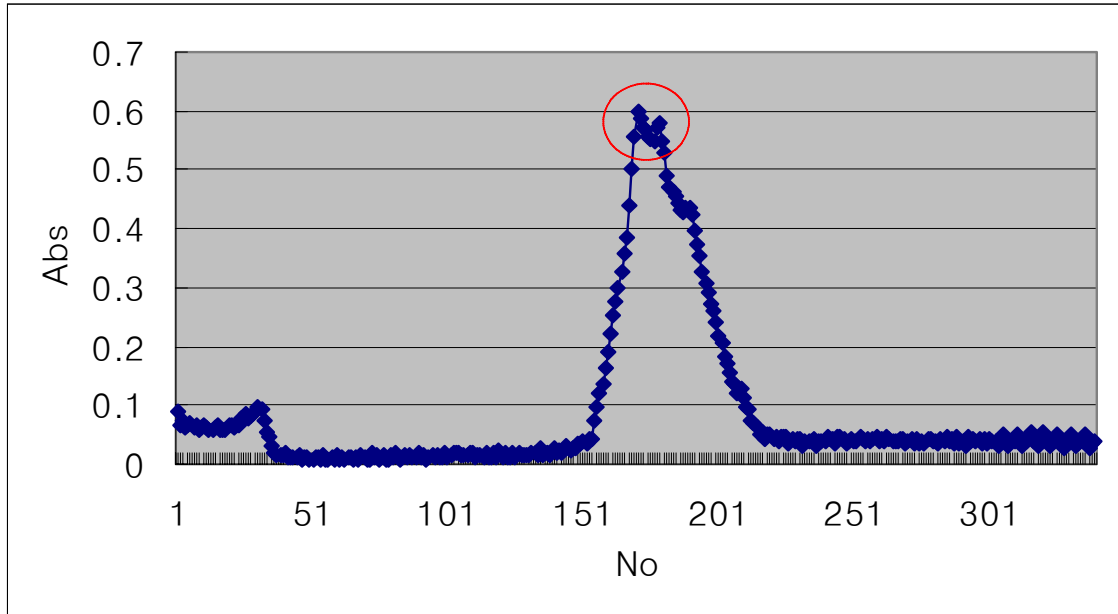


그림 2-13. Open column chromatography를 통한 pH 2 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

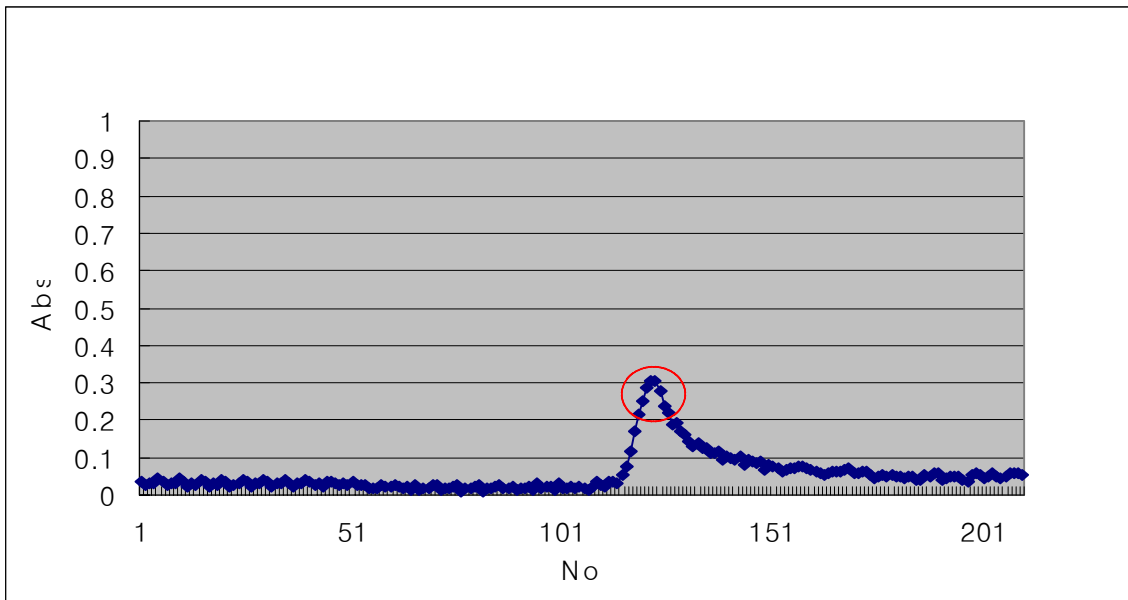


그림 2-14. Open column chromatography를 통한 pH 8 용매조건에서 각각의 fractions에 대한 UV 흡광도 값의 변화.

### (3) 3단계

2단계에서 선별된 각각의 fractions을 용매 조건을 달리하여 TLC (Silica Gel F254, 20 × 20cm) 전개를 통해 분리된 물질의 단일성 여부를 확인하였다.

표 2-1. TLC 전개용매 및 검출 방법.

	용매 조건	Detect method
1st 용매조건	BuOH : HOAc : H <sub>2</sub> O = 4 : 1 : 5	Colour in UV
2nd 용매조건	HOAc : CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> = 1 : 9	Folin 시약 반응
3th 용매조건	BuOH : HOAc : H <sub>2</sub> O = 5 : 4 : 1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 시약 반응
4th 용매조건	BuOH : HOAc : H <sub>2</sub> O = 4 : 1 : 5	Colour in UV

### (4) 4단계

3단계에서 선별된 각각 fractions을 Flash column chromatography(Biotage, inc., A Dyax Company)의 column에 분리대상 액체시료를 충전한 후 표 2-2과 같은 용매 조건에 따라 12mL씩 분취한 후, 각각의 fraction을 용매 100% MeOH로 TLC에 전개 시켜 동일한 Rf값을 보이는 fractions 끼리 혼합, 농축 후 동결건조기에서 건조시켰다.

표 2-2. Flash column chromatography 분리시 사용된 용매조성

No. of fraction	Hexane : EtOAc	No. of fraction	EtOAc : MeOH
1	10 : 0	12	10 : 0
2	9 : 1	13	9 : 1
3	8 : 2	14	8 : 2
4	7 : 3	15	7 : 3
5	6 : 4	16	6 : 4
6	5 : 5	17	5 : 5
7	4 : 6	18	4 : 6
8	3 : 7	19	3 : 7
9	2 : 8	20	2 : 8
10	1 : 9	21	1 : 9
11	0 : 10	22	0 : 10



그림 2-15. Flash chromatography를 이용한 물질의 분리



그림 2-16. 시료충진 flash chromatography column  
(A: 시료가 충전된 samplet, B: 분리용 column)



그림 2-17. Flash column chromatography를 이용한 물질분리된 fractions.

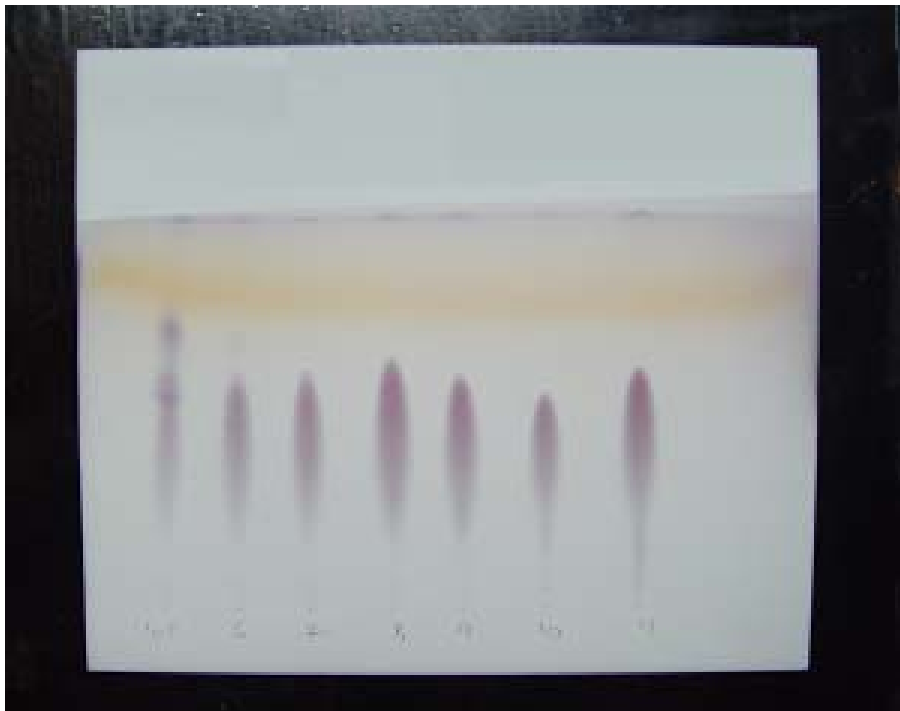


그림 2-18. 각 분리된 fractions들의 TLC 분석결과(Hexane:EtOAc=7:3)





그림 2-19. TLC 분석결과 농축된 fractions

#### (5) 5단계

위의 1, 2, 3, 4단계를 통해서 분석된 결과를 바탕으로 하여 UV, HPLC, 및 Mass spectrum(그림2-31, 33, 35)과 같은 분석기기를 이용하여 동정하였다.

#### 마) 분리된 물질의 UV 및 TLC분석

80% MeOH용매 조건에서 분리해낸 sample을 100% MeOH에 1%가 되게 녹이고 표준 물질과 함께 UV spectrophotometer를 이용하여 280nm 범위에서 흡광도를 측정하였고 이 물질을 TLC상에 전개하여 표 2-3의 표준물질과 동일성을 확인 하였다.

표 2-3. TLC 분석에 사용된 25개의 표준 물질

No.	종류	No.	종류	No.	종류	No.	종류
1	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	8	caffeic acid	15	<i>m</i> -coumaric acid	22	vanillin
2	vanillic acid	9	sinapinic acid	16	<i>p</i> -coumaric acid	23	rutin
3	<i>o</i> -hydroxyphenylacetic acid	10	gallic acid	17	chlorogenic acid	24	quercetin
4	benzoic acid	11	ferulic acid	18	<i>p</i> -anisic acid	25	morin
5	salicylic acid	12	gentisic acid	19	2-chlorbenzoic acid		
6	procatechuic acid	13	syringic acid	20	catechin		
7	$\beta$ -resorcylic acid	14	<i>o</i> -coumaric acid	21	catechol		

#### 바) HPLC 분석

TLC를 통해 screening한 물질의 진위를 정확하게 알아보기 위해 TLC와 HPLC를 이용하여 표준물질과 column을 통해 분리해낸 샘플의 retention time의 비교를 통해 확인하였다.

##### (1) 분석용매 제조

HPLC에 사용된 용매는 모두 HPLC용 등급을 사용하였고, 증류수는 탈이온 처리하였으며 사용 전에 0.45 $\mu$ l syringe filter로 여과하여 사용하였으며, 그 외 추출 및 조제용은 일급시약을 사용하였다.

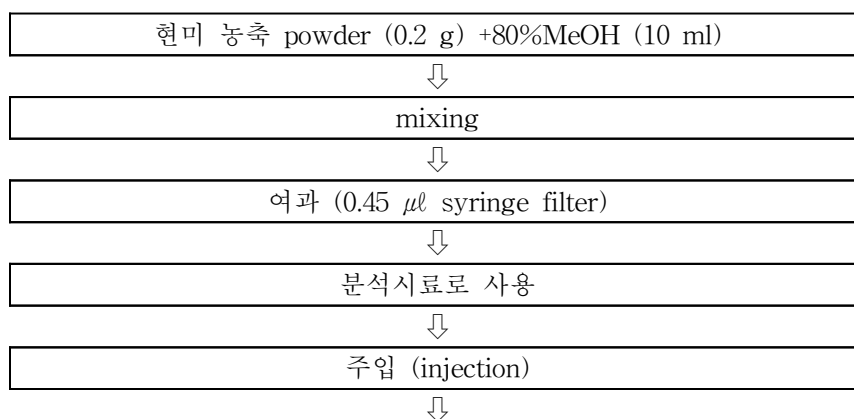


그림 2-20. HPLC분석 시료액 조제과정.

## (2) 분리조건

- stationary phase : YMC AM303 (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase : H<sub>2</sub>O, Acetonitrile (각각의 0.1% acetic acid 함유)
- Injection volume : 20  $\mu\text{l}$
- Flow rate : 1.0 ml min<sup>-1</sup>
- UV : 280 nm

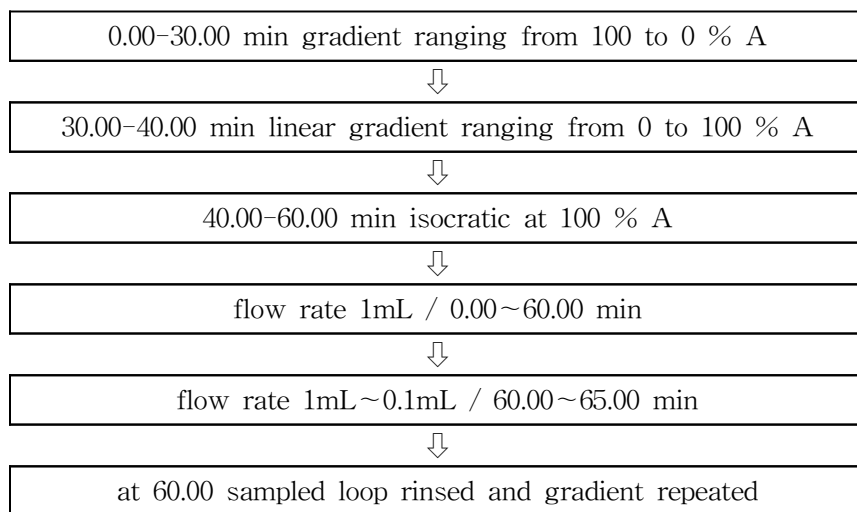


그림 2-21. 물질 동정을 위한 HPLC 프로그램

## (3) 검량선작성

쌀 추출물에서 분리 동정된 ferulic acid를 아래와 같은 조건으로 검량선을 작성 하였다.

- 검량선 작성 : ferulic acid  
(standard) 0.5 mg + 80% MeOH 5 mL  
→ 10 $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$  injection



그림 2-22. 분리 정제된 compound

#### 사) Mass Spectrometry

분리 동정된 ferulic acid의 정확성을 확인하기 위하여 EI-MS의 분석을 통하여 물질의 분자량과 fragmentation을 조사 하였다.

#### 다. 분리 동정된 항산화 물질의 항산화 활성비교

##### 1) SOD 및 DPPH 활성 검정

##### 가) SOD 활성 검정

SOD(Superoxide dismutase)의 활성을 측정하기 위해 분리동정된 물질과 항산화 물질로 알려진 표준 phenolic acid 17개  $60\mu\text{l}$ 과 assay buffer 3.0ml 및 riboflavin  $30\mu\text{l}$ 을 혼합하여  $25^{\circ}\text{C}$ 의 온도 및 광조절 식물성장상의 광원(20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도를 560nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### 나) DPPH 활성 검정

DPPH 용액 2.5ml (DPPH 30mg을 ethanol 200ml에 용해시킨 후, 증류수 200ml를 첨가한 용액)와 80% methanol에 분리동정한 1%용액 0.5ml을 혼합하여 1분간 반응시킨 후, 517nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 검정하였다. 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### 2) ESR을 이용한 SOD 활성 비교

SOD 활성은 JES\_RE1X ESR spectrometer (JEOL Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. Hypoxanthine-xanthine oxidase system으로부터 발생된  $O_2^{\cdot -}$  radical은 DMPO에 의해서 포집하였고, hypoxanthine (2mM) 50 $\mu$ l와 DMPO (9.2M) 20 $\mu$ l 그리고 소거제 또는 SOD 50 $\mu$ l로 혼합하였다. 그 다음 반응 혼합물을 균등하여 cell에 옮기고, ESR signal을 45초 후부터 측정하였다. ESR signal의 intensity는 국제 표준으로 이용되는  $Mn^{2+}$ 의 intensity 비율로 조정하였다.

### 3) 라디칼 소거능(RC<sub>50</sub>) 활성 측정

분석된 물질의 radical 소거효과를 측정하기 위하여 Blois 법(1951)을 적용하여 적색찰벽 80%, 100% MeOH 추출물, 기존의 항산화제로 알려진 BHT 및 분리 정제된 ferulic acid 과 비교하였다.  $1.5 \times 10^{-4}$ M DPPH(Sigma Aldrich) 메탄올 용액 5mL에 여러 농도의 시료 메탄올 용액 1mL에 첨가하고 섞은 다음 30분간 실온에서 방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(scavenging activity, RC<sub>50</sub>)으로 표시 하며, RC<sub>50</sub>은 DPPH의 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양( $\mu$ g)으로 나타내었다.

### 4) Cell culture에 의한 세포독성 검정

쥐의 PC12 세포를 poly-D-lysine으로 덮여있는 배양접시에 배양하였다(0.1mg/ml, overnight). 세포들은 10%의 fetal bovine serum(FBS)가 공급되는 RPMI 1640 배지에서 배양되었고, 배지는 온도가 37°C이고 공기 중의 CO<sub>2</sub>농도가 5%인 incubator에 놓여졌다. cytotoxicity의 정량은 색채실험(colorimetric assay)에 의해 결정되었다. colorimetric assay는 세포의 수를 결정하기 위해서 lysosomal enzyme acid phosphatase를 측정하였다

(Connolly, et al., 1986). 간단히 말해서, 배양된 세포는 96-well plate에서 배양 하였고, 각 well에는 세포의 농도가  $8 \times 10^3$ 에서  $12 \times 10^3$ 이 되게 하여 하루 밤 동안 배양하였다. 다양한 처리 후에, 배지를 서서히 제거하였고, well들은  $200 \mu\text{l}$ 의 PBS로 세척하였으며, 0.1M sodium acetate, pH 5.5, 0.1% Triton X-100, 10mM p-nitrophenyl phosphate(sigma 104 phosphatase substrate)가 포함된  $100 \mu\text{l}$  buffer를 각 well에 첨가하였다. plate들은  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건의 incubator에서 2시간동안 배양되었다. 반응은 1N sodium hydroxide이 각 well에  $10 \mu\text{l}$ 씩 첨가되면서 끝났고, 발색은 microplate reader를 사용하여 205 nm에서 측정하였다. 이에 대한 통계분석은 다른 그룹들 사이의 차이는 Sigma software를 사용하여 분산 분석 또는 분산분석의 한 방법인 Kruskal-Wallis 로 비교하였다. 유의수준은  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  이었다.

#### 라. *In vivo*에서의 항산화활성검정

##### 1) *In vivo*에서 항산화활성검정(제 1차년도)

###### 가) 재료 및 방법

쌀 추출물이 알콜에 의하여 유도된 간의 산화적 손상에 미치는 영향을 규명하기 위하여 다음과 같이 설계하였다. ICR계통의 4 주령된 웅성 생쥐를 3가지 실험군으로 나누어 각 군에 쌀 추출물 등의 해당 시료를 7주간 경구 투여하였다. 최종 투여 후 심장으로부터 혈액을 채취하여 치사시킨 후 간을 적출하였다. 혈액 중의 간 기능 지표 효소 활성화도 및 지질성분과 간 조직의 과산화지질 함량 및 항산화 지표를 측정하였다.

###### 나) 실험동물 및 시료투여

실험동물은 삼육 동물센터에서 사육한 생후 4주령된 ICR계통의 웅성 생쥐를 사용하였다. 실험에 사용하기 전까지 명암주기는 자연채광으로, 온도가  $25^\circ\text{C}$ 로 유지된 사육장에서 약 1주일간 적응시켰다. 사육기간 동안 물과 사료(고형배합사료, 삼양사료)는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 1주간 기본 식이로 사육한 실험동물을 12마리씩 3군으로 나누어 다음과 같이 처치하였다. 대조군 (Control)은 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 체중 20g당 0.5 ml의 용량을, 쌀 추출물 투여군 (Extract)은 20% 알콜 용액에 녹인 쌀 추출물을 체중 20g당 2.22 mg의 용량으로, 알콜 투여군 (EtOH)은 20% 알콜을 체중 20 g당 0.5 ml.의 용량으로 경구투여용 주사기를 이용하여 7주일간 매일 일정한 시간에 투여하였다.

## 다) 시료수집

### (1) 혈액채취

시료를 최종 투여 한 후 5 ml 주사기를 사용하여 심장을 직접 관통하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 3,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 분석을 위해 4°C로 보관하였다.

### (2) 간적출

혈액을 채취하고 처사시킨 후 해부하여, 차가운 PBS를 심장에 직접 주입하여 간으로 관류시켜 혈액을 제거한 후 간을 적출 하였다. 적출된 간은 여과지로 잔여 혈액과 수분을 제거한 후 일정 크기로 나누어 분석 전 까지 -70°C에 보관하였다.

## 라) 시료분석

### (1) 혈중 지질농도 및 혈액 생화학적 지표 분석

혈청 중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지질의 농도는 아산셋트 혈액 측정용 시약을 사용하여 측정하였다.

### (2) 간 조직의 과산화지질 수준 측정

간 조직의 과산화지질을 thiobarbituric acid를 이용한 Buege와 Aust의 방법(1977)을 응용하여 간 조직의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 측정하였다. TBARS는 조직이나 세포 내 소기관 부유액의 malondialdehyde (MDA)와의 반응물로 추정되며 지질과산화 수준을 평가하는데 사용된다. 일정량의 간 조직을 평량하여 PB (phosphate buffer, pH 7.4)를 4배(w/v)가하여 균질화 한 후 초음파 조직 분쇄기로 조직을 파괴하였다. 이 용액을 100 $\mu$ l 취하여 17.5% trichloroacetic acid (TCA, Sigma)와 0.65% thiobarbituric acid (TBA, Sigma)용액을 각각 500 $\mu$ l씩 가하여 잘 혼합하고 100°C에서 15분간 반응시키고, 상온에 방치하여 냉각시켰다. 냉각시킨 시료에 70% TCA 용액 500 $\mu$ l 첨가하여 20분간 상온에서 방치시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상정액을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중의 MDA함량은 1,1,3,3-tetramethoxy propane (Sigma)을 표준품으로 사용하여 산출한 직선 회귀 방정식에 대입하여 구하였으며, 시료의 단백질 함량은 Bradford 법(1976)을 사용하여 측정하였다. 즉, 시료 10  $\mu$ l, 증류수 800  $\mu$ l 및 Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) 200  $\mu$ l를 혼합하여 15분간 반응시킨 후 595nm에서 흡광

도를 측정하고, bovine serum albumin 표준품을 사용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 단백질함량을 계산하였다.

### (3) 간 조직의 GST(Glutathione S-transferase) 활성도 측정

GST활성은 Warholm 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 일정량의 간 조직에 PB (pH 7.4)를 4배(w/v) 가하여 균질화 시킨 후 150 $\mu$ l의 균질액을 취하여 다시 PB (pH 7.4)로 10배(v/v) 희석한 다음 9,000 $\times$ g에서 20분간 원심 분리한 상정액을 105,000 $\times$ g에서 다시 1시간 동안 원심 분리하여 얻은 상정액을 GST 효소원으로 사용하였다. 0.1M PB (pH 6.5) 880  $\mu$ l, 20mM GSH 50 $\mu$ l, 에탄올에 녹인 20mM CDNB 50 $\mu$ l 등으로 구성된 혼합액에 20 $\mu$ l의 효소원을 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 반응을 시작한 후, 매 30초 간격으로 3분간 340nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 분자흡광계수 (9.6 mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ) 환산하여 계산하였으며 시료의 단백질 함량은 Bradford법을 이용하여 정량 하였다. 즉, 시료 10  $\mu$ l, 증류수 800  $\mu$ l 및 Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) 200  $\mu$ l를 혼합하여 15분간 반응시킨 후 595nm에서 흡광도를 측정하고, bovine serum albumin 표준품을 사용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 단백질함량을 계산하였다.

### (4) 간 조직의 GSH (Glutathione) 함량 측정

간 조직을 0.9% NaCl 용액으로 씻어낸 후 차갑게 식힌 MPA (Metaphosphoric acid) 용액을 넣고 균질화 시킨다. 이 균질액을 3,000g에서 10분간 원심분리 시킨 후 상정액 중의 GSH 함량을 측정하였다. 이를 위하여, 0.2N HCl 용액에 녹인 1.2 X 10 $^{-2}$  chromogenic reagent 50 $\mu$ l와 30% NaOH 용액 50 $\mu$ l의 혼합액에 시료 상정액 100  $\mu$ l을 넣은 후 0.2mM DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid)와 0.025% lubrol이 함유된 200mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)를 넣어 총량이 900  $\mu$ l가 되도록 한 후 27 $^{\circ}$ C의 암소에 10분간 두었다가, 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 GSH의 함량은 GSH를 표준품으로 사용하여 산출한 직선 회귀 방정식에 대입하여 구하였다.

### 마) 통계처리

모든 실험 결과치는 평균치(Mean) $\pm$ 표준오차(S.E)로 표기하였고, One-way ANOVA를 사용하여 통계적 차이를 검증하였다.



## 2) *In vivo*에서 항산화활성검정(제 2차년도)

### 가) 재료 및 방법

#### (1) 실험 재료 추출

실험 I 은 건국대 식량자원학과 실습포에서 2001년도에 재배한 자광찰벼, 일품벼를, 실험 II는 2001년도에 재배한 자광찰벼를 실험재료로 하여 시료를 각각 1kg씩 benzene을 이용하여 탈지한 후, 80% 에탄올로 2일간 추출한 후 냉장고에서 2~3일간 보관하여 non-flavonoids 물질을 침전시킨다. 이것을 여과하여 맑은 여액을 감압 농축한 후, 농축된 물질을 다시 에탄올 300mL로 6회 반복 여과하여 감압 농축하여 freeze drier로 건조시킨 것을 시료로 사용하였다.

#### (2) 실험동물의 사육 및 처리

실험에 사용된 동물은 생후 약 10주령 된 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐(삼육실험동물 연구소, 오산)이며, 실험에 사용하기 전까지 명암주기가 자연채광인 사육장에서 사육하였다. 사육기간 동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험 I 은 1주일간 사육장에서 기본식으로 적응시킨 실험동물을 각각 10마리씩 5군으로 나누었다. 제1군(생리식염수 투여군-C)은 체중 200g당 3.2ml의 생리식염수를, 제2군(Glucose 투여군-G)은 체중 200g당 3.2ml의 55%의 glucose를, 제3군(EtOH 투여군-E)은 체중 200g당 3.2ml의 40% 에탄올을, 제4군(자광찰벼 추출물 투여군-JE)은 체중 200g당 8mg(2.4g 쌀 추출물/ 600g 쌀/ 60kg 사람 기준)의 자광찰벼(*Oryza sativa* L.) 추출물(40% 에탄올에 용해)을, 제5군(일품벼 추출물 투여군-IE)은 체중 200g당 8mg의 일품벼(*Oryza sativa* L.) 추출물(40% 에탄올에 용해)을 각각 7주간 매일 일정한 시각에 경구투여용 주사기(존대)를 사용하여 경구 투여하고, 일정한 기간마다 몸무게를 조사하였다.

실험 II는 실험동물을 10마리씩 3군으로 나누어, 제1군(G)은 Glucose를, 제2군(E)은 EtOH를, 제3군(JE)는 자광찰벼 추출물을 실험 I에서 사용한 것과 동일한 용량으로 각각 2주간 매일 일정한 시각에 존대를 이용하여 투여하고 몸무게를 조사하였다.



그림 2-23. 실험 동물 무게 측정하는 모습



그림 2-24. 경구투여용 주사기(존대)로 시료 투입하는 모습



그림 2-25. 실험 동물 사육장 모습



그림 2-26. 케이지에서 실험 동물 사육하는 모습

### (3) 시료수집

#### (가) 혈액

실험동물을 25% urethan(2ml/400g rat weight)으로 복강 주사하여 마취시킨 후, 주사기를 이용하여 심장 천자하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액 일부를 상온에 15분 정도 방치한 후 13,000rpm에서 30초간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70℃에서 보관하였다. 전혈(whole blood)로 사용할 혈액은 7.5% EDTA(0.072ml/3ml blood)가 들어있는 tube에 넣어 -70℃에서 보관하였다.

#### (나) 조직

조직은 50ml 용 주사기로 차가운 phosphate buffered-saline(PBS, pH 7.4)을 간문맥을 통하여 주입함으로써 간 조직 내의 혈액을 제거한 후, 간 조직과 이자를 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 제거하였다. 간과 이자를 적출 한 후 실험동물을 단두 처리하여 뇌를 적출하였다. 적출한 간, 이자, 뇌에 50mM sodium phosphate buffer 용액(PB, pH 7.4)을 10배(w/v) 가하고 균질화 한 후 초음파 세포막 분쇄기로 세포막을 파괴하였다. 이 균질액을 일정량씩 분주하여 실험에 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

### (4) 시료 분석

#### (가) 혈액 생화학적 지표

Serum(혈청)의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성도는 Reitman-Frankel법을 이용한 kit(아산제약)로, serum(혈청)의 총콜레스테롤, high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein (LDL) 등의 지질 성분 분석은 효소법을 이용한 kit(아산제약)을 이용하여 측정하였다.

#### (나) 혈중 항산화 효소 측정법

Serum(혈청)의 glutathione peroxidase(GPx) 활성도는 plasma GPx Enzyme Immunoassay 법을 이용한 kit(OxisResearch, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

전혈 중의 GSSG(산화형 glutathione)의 생성은 GSH/GSSG-412 kit(OxisResearch, U.S.A.)로 측정하였다.

#### (다) 조직의 지질과산화 수준 측정

간, 뇌, 이자 조직 중의 지질과산화물 수준은 thiobarbituric acid를 이용한 Buege와 Aust의 방법(1977)을 응용하여 측정된 malondialdehyde(MDA) 함량 측정으로 산출하였다. 간단히 기술하면, 시료 100 $\mu$ l에 17.5% trichloroacetic acid(TCA)와 0.65% thiobarbituric

acid(TBA)용액을 각각 300 $\mu$ l씩 첨가하여 잘 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 냉각시킨다. 냉각시킨 시료에 70% TCA 용액 300 $\mu$ l 첨가하여 20분간 상온에 방치시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 표준 곡선을 이용하여 MDA함량을 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다. 즉, 시료 10 $\mu$ l를 취해 증류수 790 $\mu$ l와 bradford reagent 200 $\mu$ l를 가하고 15분간 반응시킨 후, 595nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin을 이용하여 구한 standard curve에 대입하여 단백질 함량을 산출하였다.

Lipid hydroperoxide(LOOH) 함량의 측정은 LPO-560 kit(OxisResearch, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

#### (라) 조직 중의 항산화 효소 활성도 측정

Glutathione S-transferase(GST)의 활성은 Warholm등(1984)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 일정량의 조직 분쇄액을 9,000 $\times$ g에서 15분간 원심 분리하고 상층액을 100,000 $\times$ g에서 다시 1시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 GST 분석을 위한 효소원으로 사용하였다. 반응 조성액은 다음과 같다. 0.1M sodium phosphate buffer (1mM EDTA 함유, pH 6.5) 850 $\mu$ l, 20mM GSH(증류수에 용해) 50 $\mu$ l, 20mM CDNB(95% ethanol에 용해) 50 $\mu$ l에 효소원 50 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 반응을 시작한 후 340nm파장에서 30초 간격으로 3분간 흡광도를 측정하고 분자흡광계수를 9.6mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다. 이 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다.

Glutathione(GSH) 함량의 측정은 GSH-400 kit(OxisResearch, U.S.A.)로 측정하였다.

#### (5) 통계처리

모든 실험 결과들은 SAS(Statistical Analysis System, version 6, SAS Institute Inc., Cary, NC) 프로그램을 이용하여 계산하였으며, 모든 실험군의 결과치는 평균치(mean) $\pm$ 표준오차(S.E)로 표기하였다. 각 군간의 평균치 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 LSD(Least Significant Difference)에 의해 검정하였다.

### 3) *In vivo*에서 항산화활성검정(제 3차년도)

#### 가) 재료 및 방법

##### (1) 실험 재료 추출

실험은 2002년도에 건국대학교 실험실습포에서 재배한 자광찰벼, 찰벼, 일품벼를 사용

하였다. 시료를 각각 1kg씩 benzene을 이용하여 탈지한 후, 80% 에탄올로 2일간 추출한 후 냉장고에서 2~3일간 보관하여 non-flavonoids 물질을 침전시킨다. 이것을 여과하여 맑은 여액을 감압 농축한 후, 농축된 물질을 다시 에탄올 300mL로 6회 반복 여과하여 감압 농축하여 freeze drier로 건조시킨 것을 그림 2-27과 같은 과정으로 분리하여 분석시료로 사용하였다.

## (2) 실험동물의 사육 및 처리

실험에 사용된 동물은 생후 약 10주령 된 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐(삼육실험동물 연구소, 오산)이며, 실험에 사용하기 전까지 명암주기가 자연채광인 사육장에서 사육하였다. 사육기간 동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험은 1주일간 사육장에서 기본식으로 적응시킨 실험동물을 각각 12마리씩 6군으로 나누었다. 제1군(생리식염수 투여군-C)은 체중 200g당 3.2ml의 생리식염수를, 제2군(Glucose 투여군-G)은 체중 200g당 3.2ml의 55%의 glucose를, 제3군(EtOH 투여군-E)은 체중 200g당 3.2ml의 40% 에탄올을, 제4군(자광찰벼 추출물 투여군-JE)은 체중 200g당 8mg(2.4g 쌀 추출물/ 600g 쌀/ 60kg 사람 기준)의 자광찰벼(*Oryza sativa* L.) 추출물(40% 에탄올에 용해)을, 제 5군(찰벼 추출물 투여군-IE)은 체중 200g당 8mg의 찰벼 추출물(40% 에탄올에 용해)을, 제6군(일품벼 추출물 투여군-IE)은 체중 200g당 8mg의 일품벼 추출물(40% 에탄올에 용해)을 각각 2주간 매일 일정한 시각에 경구투여용 주사기(존대)를 사용하여 매일 경구 투여하고, 몸무게를 조사하였다.

## (3) 시료수집

### (가) 혈액

실험동물을 25% urethan(2ml/400g rat weight)으로 복강 주사하여 마취시킨 후, 주사기를 이용하여 심장 천자하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액 일부를 상온에 15분 정도 방치한 후 13,000rpm에서 30초간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70℃에서 보관하였다. 전혈(whole blood)로 사용할 혈액은 7.5% EDTA(0.072ml/3ml blood)가 들어있는 tube에 넣어 -70℃에서 보관하였다.

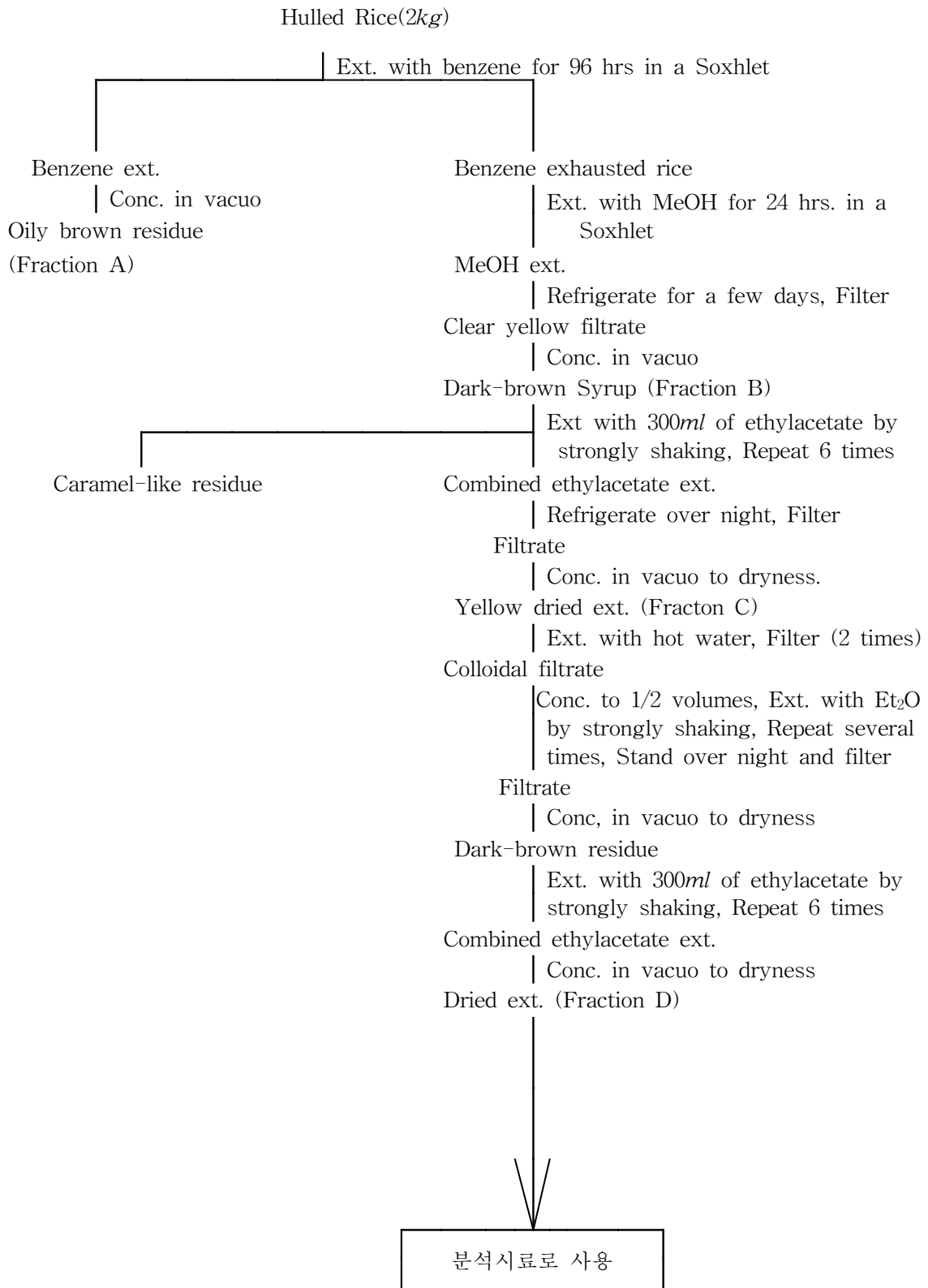


그림 2-27. Flavonoids 물질 추출과정



#### (나) 조직

조직은 50ml 용 주사기로 차가운 phosphate buffered-saline(PBS, pH 7.4)을 간문맥을 통하여 주입함으로써 간 조직 내의 혈액을 제거한 후, 간 조직과 이자를 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 제거하였다. 간과 이자를 적출 한 후 실험동물을 단두 처리하여 뇌를 적출하였다. 적출한 간, 이자, 뇌에 50mM sodium phosphate buffer 용액(PB, pH 7.4)을 10배(w/v) 가하고 균질화 한 후 초음파 세포막 분쇄기로 세포막을 파괴하였다. 이 균질액을 일정량씩 분주하여 실험에 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### (4) 시료 분석

##### (가) 혈액 생화학적 지표

Serum(혈청)의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성도는 Reitman-Frankel법을 이용한 kit(아산제약)로, serum(혈청)의 총콜레스테롤, high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein (LDL) 등의 지질 성분 분석은 효소법을 이용한 kit(아산제약)을 이용하여 측정하였다.

##### (나) 혈중 항산화 효소 측정법

Serum(혈청)의 glutathione peroxidase(GPx) 활성도는 plasma GPx Enzyme Immunoassay 법을 이용한 kit(OxisResearch, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

전혈 중의 GSSG(산화형 glutathione)의 생성은 GSH/GSSG-412 kit(OxisResearch, U.S.A.)로 측정하였다.

##### (다) 조직의 지질과산화 수준 측정

간, 뇌, 이자 조직 중의 지질과산화물 수준은 thiobarbituric acid를 이용한 Buege와 Aust의 방법(1977)을 응용하여 측정한 malondialdehyde(MDA) 함량 측정으로 산출하였다. 간단히 기술하면, 시료  $100\mu\text{l}$ 에 17.5% trichloroacetic acid(TCA)와 0.65% thiobarbituric acid(TBA)용액을 각각  $300\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 잘 혼합하고  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 냉각시킨다. 냉각시킨 시료에 70% TCA 용액  $300\mu\text{l}$  첨가하여 20분간 상온에 방치시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 표준 곡선을 이용하여 MDA함량을 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다. 즉, 시료  $10\mu\text{l}$ 를 취해 증류수  $790\mu\text{l}$ 와 bradford reagent  $200\mu\text{l}$ 를 가하고 15분간 반응시킨 후, 595nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin을 이용하여 구한 standard curve에 대입하여 단백질 함량을 산출하였다.

Lipid hydroperoxide(LOOH) 함량의 측정은 LPO-560 kit(OxisResearch, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

#### (라) 조직 중의 항산화 효소 활성화 측정

Glutathione S-transferase(GST)의 활성화는 Warholm등(1984)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 일정량의 조직 분쇄액을 9,000×g에서 15분간 원심 분리하고 상층액을 100,000×g에서 다시 1시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 GST 분석을 위한 효소원으로 사용하였다. 반응 조성액은 다음과 같다. 0.1M sodium phosphate buffer (1mM EDTA 함유, pH 6.5) 850 $\mu$ l, 20mM GSH(증류수에 용해) 50 $\mu$ l, 20mM CDNB(95% ethanol에 용해) 50 $\mu$ l에 효소원 50 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 반응을 시작한 후 340nm파장에서 30초 간격으로 3분간 흡광도를 측정하고 분자흡광계수를 9.6mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 환산하여 계산하였다. 이 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다.

Glutathione(GSH) 함량의 측정은 GSH-400 kit(OxisResearch, U.S.A.)로 측정하였다. Glutathione peroxidase(GPx) 활성도는 GPx-340 kit(OxisResearch, U.S.A.)로 측정하였다.

#### (5) 통계처리

모든 실험 결과들은 SAS(Statistical Analysis System, version 6, SAS Institute Inc., Cary, NC) 프로그램을 이용하여 계산하였으며, 모든 실험군의 결과치는 평균치(mean)±표준오차(S.E)로 표기하였다. 각 군간의 평균치 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 LSD(Least Significant Difference)에 의해 검정하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 벼 항산화 활성 물질 탐색 및 항산화 활성 검정

##### 1) 항산화활성 물질 탐색 및 분석

##### 가) 항산화활성 물질 탐색

##### (1) ESR (Electron Spin Resonance spectrometer; 전자스핀공명분광기)에 의한 항산화물질의 SOD 활성 측정

표 2-4는 항산화 물질로 알려진 caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, isovitexin, oryzanol을 ESR을 이용하여 측정한 SOD 활성을 수치화 하여 나타낸 것이다. 또한 그림 2-28은 chlorogenic acid와 coumaric acid 및 ferulic acid acid의

signal peak을 ESR 크로마토그램으로 나타낸 것이다. Chlorogenic acid와 ferulic acid의 signal peak가 다른 물질보다 작게 나타나 이들 물질이 높은 SOD 활성을 보이고 있음을 보여주고 있다. 또한 벼 항산화물질로 널리 알려진 flavonoids 물질중 isovitexin도 비교적 높은 SOD 활성을 나타내고 있으나, coumaric acid가 가장 낮은 SOD 활성을 보이고 있다.

표 2-4. ESR에 의한 항산화 물질의 SOD활성 측정

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4
DMPO	32.1	34.5	36.9	31.9
Caffeic acid	17.4	16.7	21.4	16.8
Chlorogenic acid	6.6	6.9	8.0	8.0
Coumaric acid	28.5	23.6	29.0	24.2
Ferulic acid	6.3	0.56	7.2	6.0
Gallic acid	18.9	19.6	22.8	19.2
Isovitexin	19.3	19.7	22.2	18.8
Oryzanol	18.5	17.2	23.0	16.0

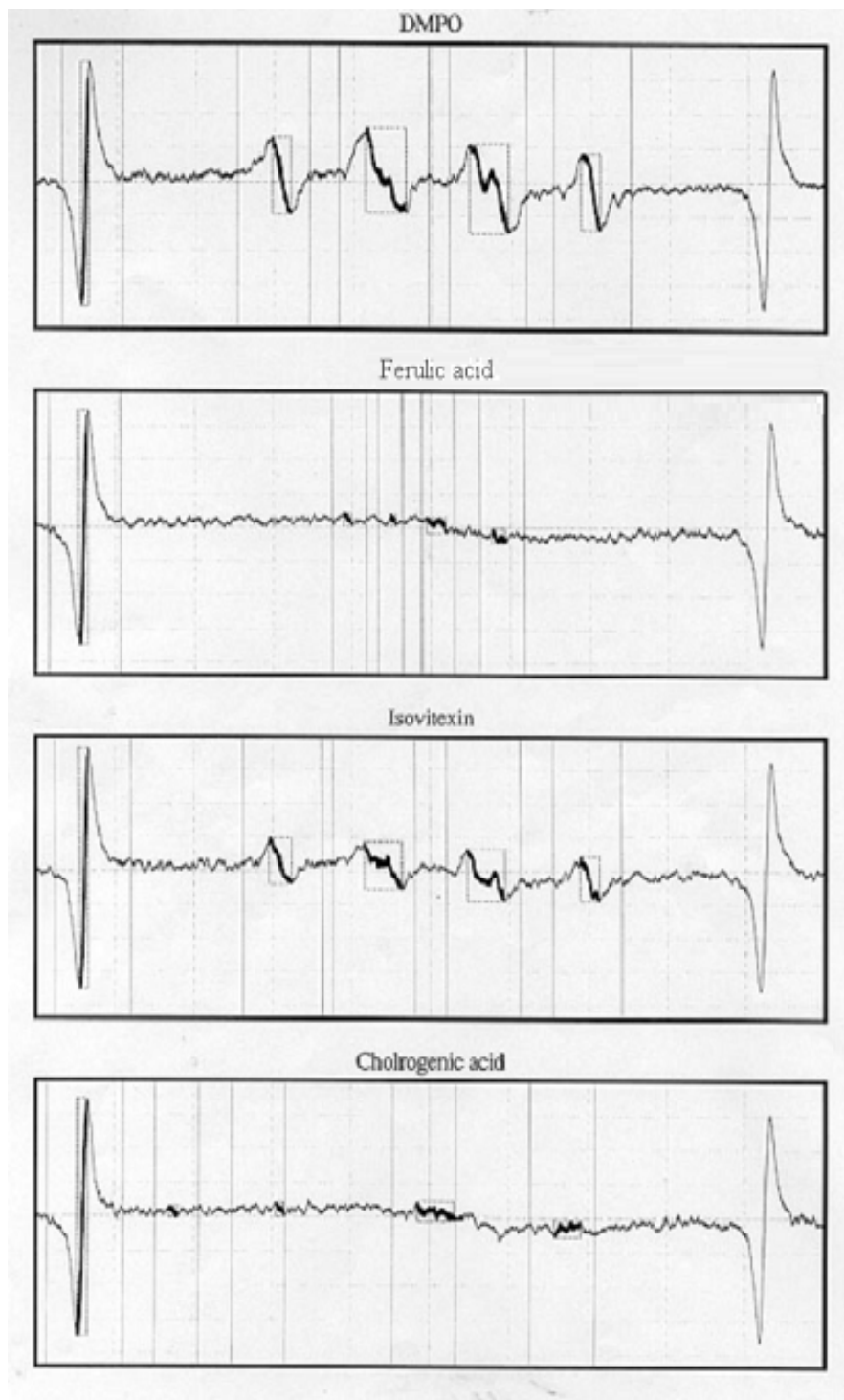


그림 2-28. ESR에 의한 항산화 물질의 SOD활성 chromatogram.

나) HPLC에 의한 항산화물질 분석

ESR (Electron spin resonance)에 의한 항산화물질의 SOD 활성 측정결과를 토대로 HPLC를 이용하여 17품종에 대한 항산화물질을 분석하였다(표 2-5). Chlorogenic acid, isovitexin 및 ferulic acid를 이용하여 그 함량을 분석한 결과 모든 품종에서 Chlorogenic acid, isovitexin 및 ferulic acid가 검출되었으나 그 함량은 품종간에 현저한 유의차를 보였으며 그 함량은 ferulic acid > chlorogenic acid > isovitexin의 순이었다. Ferulic acid는 Tono Brea 439(4.63  $\mu\text{g g}^{-1}$ )와 Hwei Ju (4.07  $\mu\text{g g}^{-1}$ )가 높은 함유량을 보이고 있다(그림 2-29). Chlorogenic acid 함량이 가장 높았던 품종은 Tono Brea 439가 3.86  $\mu\text{g g}^{-1}$ 를 함유하였고, 또한 Hwei Ju와 Baramdungkuri도 각각 3.21  $\mu\text{g g}^{-1}$ 와 2.96  $\mu\text{g g}^{-1}$ 로 높은 함량을 나타냈다. Isovitexin은 Pungujo와 Baramdungkuri가 각각 0.97  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 0.83  $\mu\text{g g}^{-1}$ 로 비교적 높은 함량을 나타내고 있고, 그 다음 AC 1423이 0.73  $\mu\text{g g}^{-1}$ , Woo Co Chin Yu가 0.71  $\mu\text{g g}^{-1}$ 의 함량을 보이고 있다.

표 2-5. HPLC를 이용한 17품종의 항산화물질 분석

품종	Chlorogenic acid	Isovitexin	ferulic acid
	$\mu\text{g g}^{-1}$		
AC 1423	1.89	0.73	3.45
Agukdo	2.07	0.59	3.39
AUS 196	2.02	0.64	2.31
Baramdungkuri	2.96	0.83	3.73
Dongobyeo	2.28	0.66	2.27
Hongcheongdo	2.77	0.54	3.31
Hwei Ju	3.21	0.62	4.07
Joseokjo	2.67	0.48	2.97
Mamoriaka	2.70	0.38	2.64
Mon Z Wuan	2.73	0.38	3.32
Philippine 2	1.95	0.69	3.73
Pungujo	2.21	0.97	2.52
Seungsiljo	2.14	0.47	2.82
Siga Chata Mochi	2.26	0.67	3.54
Tono Brea 439	3.86	0.59	4.63
Woo Co Chin Yu	2.66	0.71	3.98
Yuan Hsing I	1.97	0.47	3.19
CV (%)	2.4	6.0	0.5
LSD (0.05)	0.10	0.08	0.03

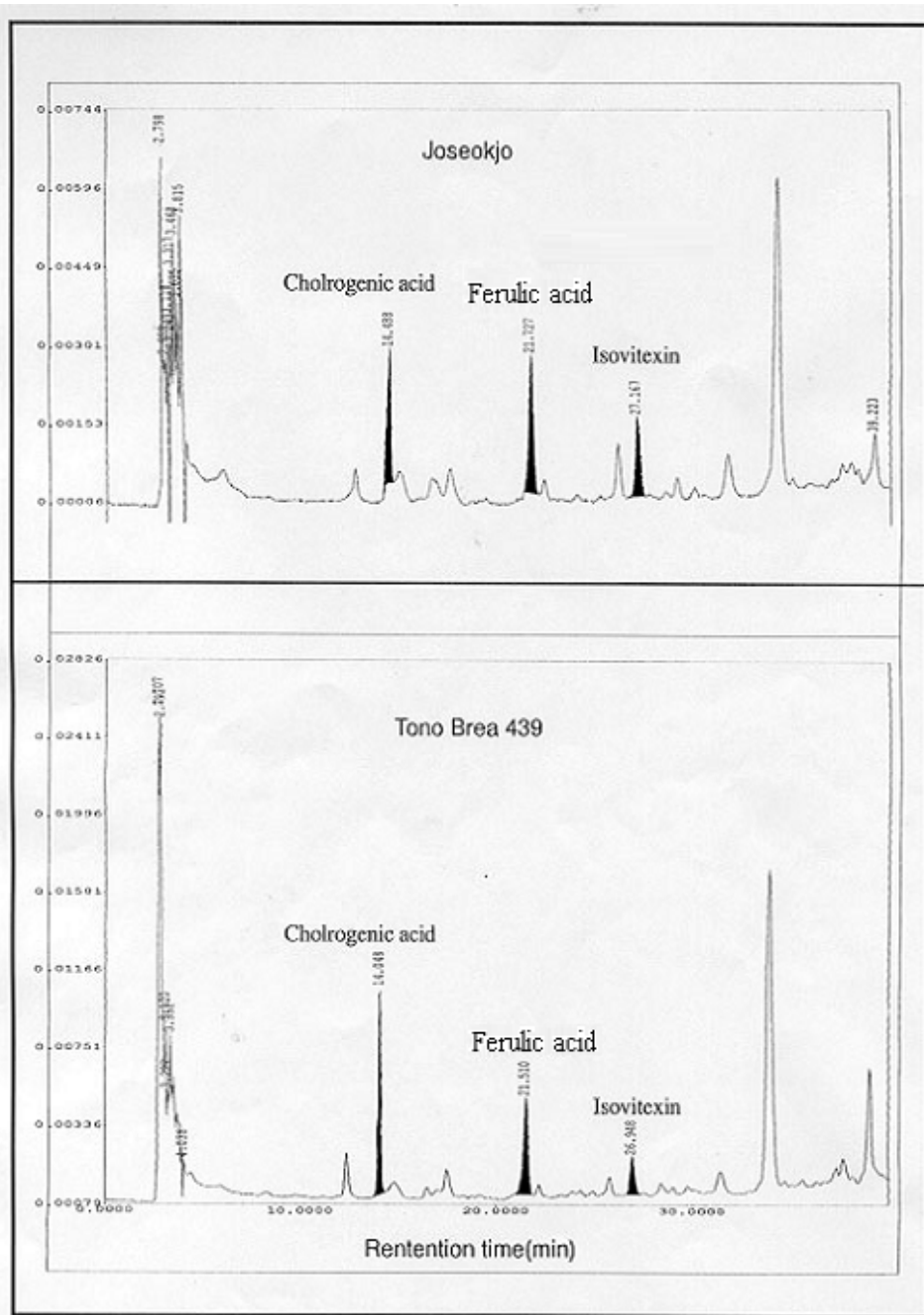


그림 2-29. Joseokjo 와 Tono Brea 439 추출물의 HPLC chromatogram.

2) 항산화활성검정

가) *In vitro*에서 항산화활성검정

(1) SOD와 POD 항산화 활성 검정

표 2-6은 고향산화 벼 17품종의 SOD와 POD 활성을 나타낸 것이다. SOD 활성 (CV=45.2%)은 Tono Brea 439가 16.0%로 현저히 높은 활성을 보였고, Agukdo가 12.2%, Baramdungkuri가 12.3%, Hwei Ju가 12.5%로 비교적 높은 라디칼 소거능을 보였다. POD 활성 (CV=14.0%)은 AUS 196이 96.4%로 가장 높았고, AC 1423 (95.3%)와 Dongobyeo (91.8%)도 90% 이상의 높은 POD 활성을 나타냈다.

표 2-6. 벼 17품종의 SOD와 POD 활성검정

품 종	SOD	POD
	----- Activity (%) -----	
AC 1423	5.5	95.3
AUS 196	6.9	96.4
Hwei Ju	12.5	77.7
Philippine 2	8.3	68.1
Siga-chata mochi	4.9	65.8
Agukdo	12.2	86.6
Baramdungkuri	12.3	84.6
Dongobyeo	7.1	91.8
Hongcheongdo	8.5	87.1
Joseokjo	3.5	74.9
Mamoriaka	6.1	57.5
Mon-Z-Wuan	10.1	64.5
Pungujo	9.4	61.0
Seungsiljo	11.0	39.1
Tono Brea 439	16.0	17.1
Woo Co Chin Yu	10.2	4.1
Yuan Hsing I	10.9	16.0
CV (%)	45.2	14.0
LSD (0.05)	4.8	14.3

## (2) DPPH와 TBA활성 검정

표 2-7은 고향산화 벼17품종의 전자공여능 (CV=8.2%)과 지질과산화 (CV=30.5%) 정도를 나타낸 것이다. DPPH법에 의한 전자공여능을 살펴보면, 전체적으로 49.4% 이상의 DPPH 억제율을 보였고, 80% 이상의 높은 전자공여소거능을 보이는 품종은 Philippine 2 (84.5%), AUS 196 (83.7%), AC 1423 (87.6%), Siga-chata mochi (87.7%)였고, Hwei Ju (81.7%) 또한 높은 억제율을 나타내고 있다. 색도를 측정하였을 때, 적색값이 높게 나타났던 품종들이 80% 이상이라는 높은 전자공여능을 보였다.

표 2-7. 벼 17품종의 DPPH 및 TBA에 의한 활성검정

품 종	DPPH	TBA
	----- Inhibition (%) -----	
AC 1423	87.6	29.2
Agukdo	49.4	40.8
AUS 196	83.7	42.3
Baramdungkuri	62.3	36.2
Dongobyeo	54.7	26.8
Hongcheongdo	54.7	37.9
Hwei Ju	81.7	42.1
Joseokjo	51.5	16.8
Mamoriaka	52.1	35.3
Mon-Z-Wuan	50.3	38.5
Philippine 2	84.5	41.5
Pungujo	56.0	38.3
Seungsiljo	57.4	45.6
Siga-chata mochi	87.7	35.6
Tono Brea 439	52.0	29.4
Woo Co Chin Yu	56.9	39.9
Yuan Hsing I	55.9	45.4
CV (%)	8.2	30.5
LSD (0.05)	6.0	12.8

TBA법에 의해 측정된 지질과산화 정도를 검정한 결과, Seungsiljo (45.6%)와 Yuan Hsing I (45.4%)를 비롯하여 AUS 196 (42.3%), Hwei Ju (42.1%), Philippine 2 (41.5%), Agukdo (40.8%)가 40% 이상의 높은 억제율을 보였고, Joseokjo가 16.8%로 가장 낮은 항산화 활성을 나타내고 있다.

한편 TBA법과 DPPH법에 있어서 활성값에 차이가 있었는데 이는 본 실험에 사용된 활



성 검정 시료가 순수하게 정제되지 않은 조추출물이므로 여기에 존재하는 여러 가지 활성 물질들에 의한 영향과 TBA법 (Wong 등, 1981)과 DPPH법 (Yoshida 등, 1989)의 측정 방법에 따른 차이라고 생각된다. TBA법 반응의 발색 본체는 과산화지질에서 자동적으로, 또는 산에서 가열함으로써 생성된 수용성 malonidialdehyde (MDA)이며 MDA 한 분자와 TBA 2분자가 축합되어 생기는 적색은 532 nm에서 흡광도가 크고 수 시간 동안 안정을 유지하였다. 한편 생체조직 내에는 과산화 초기에 생성된 free radical과 반응하는 thiol기 (SH group) 화합물 등과 같은 많은 nucleophile이 존재하는데, DPPH법은 그 총량이 갖는 항산화력이며 그것을 측정하여 항산화의 진행도를 추정하는 것이다. 또한 일반적으로 DPPH는 항산화제의 측정에 이용되는 화합물인데 수소기가 붙으면 517 nm에서 특이 색조가 감소되는 특성을 이용한 방법이다.

### (3) ESR을 이용한 SOD 활성 검정

NBT 환원법에 의해 측정된 벼 품종의 SOD 활성이 높은 품종과 낮은 품종에 대한 ESR에 의한 SOD 활성의 차이를 조사 하였다 (표 2-8). ESR법은 라디칼 소거능을 측정하는 세밀한 방법 중 하나로 알려져 있다. Mitsuta 등 (1990)은 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 분자가 DMPO 스핀 트랩에 의해 DMPO-O<sub>2</sub><sup>-</sup> 형태로 변환된다고 보고하였다. 벼 종실 추출물은 phytochemicals을 함유하고 있는데, 식물의 페놀물질과 flavonoids는 지질과산화물 억제하기 위하여 superoxide anion radicals 혹은 hydroxy radicals과 반응을 하여 활성산소 라디칼을 소거한다. NBT 환원법에서 SOD 활성이 높았던 Tono Brea 439 (16.0%)와 Woo Co Chin Yu (10.2%), 그리고 가장 낮았던 품종인 Joseokjo (3.5%)가 ESR을 이용한 방법에서도 유사한 결과를 나타냈다 (그림 2-30).

표 2-8. ESR에 의한 고향산화 벼 품종의 SOD활성 측정

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4
	----Activity(%)----			
DMPO	32.1	34.5	36.9	31.9
Tono Brea 439	8.4	6.2	13.9	6.8
Woo Co Chin Yu	7.1	6.6	8.5	8.7
Joseokjo	13.0	11.0	16.2	12.9

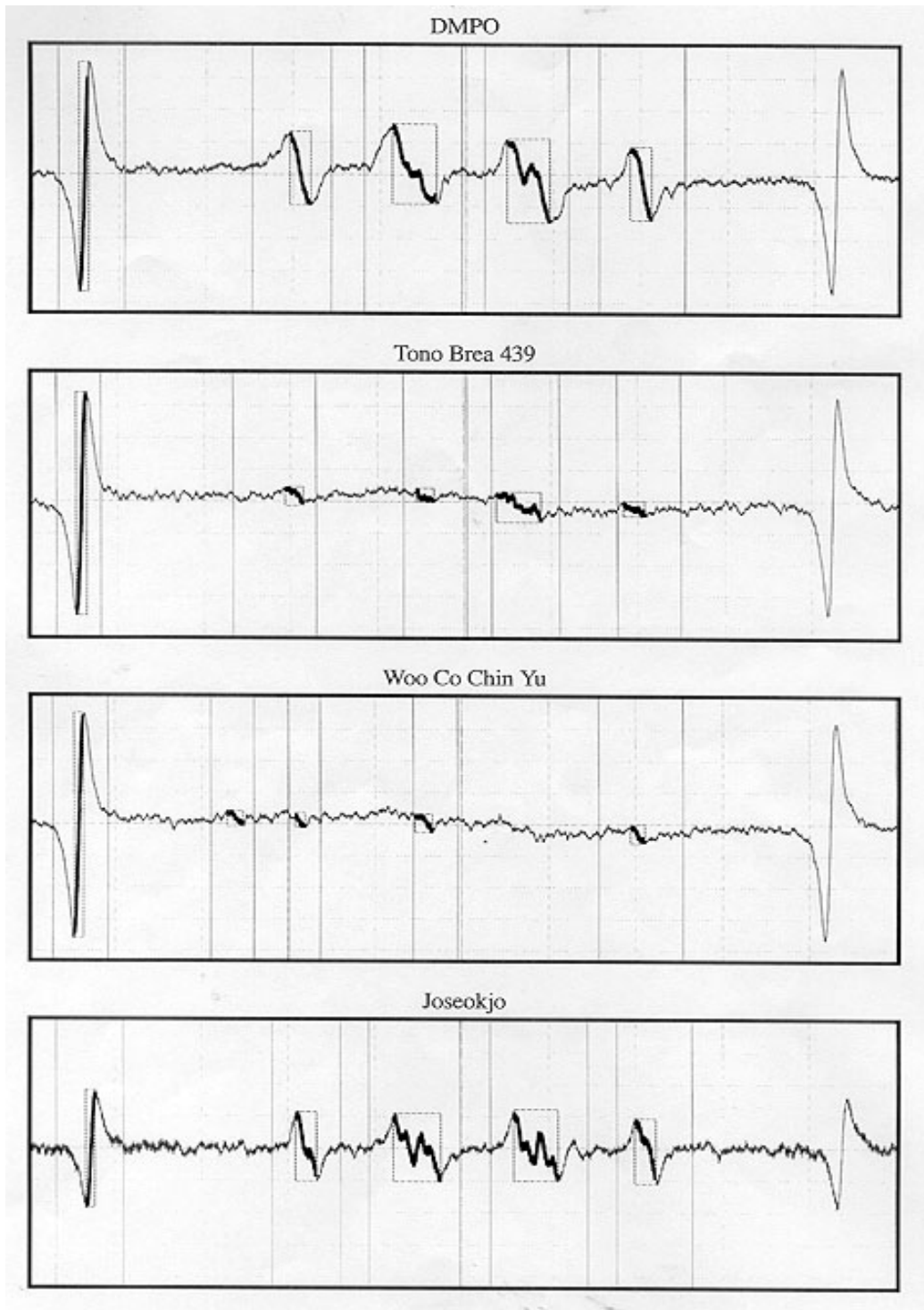


그림 2-30. 항산화 비 품종의 ESR chromatogram.

나. 벼 항산화 활성관련 물질의 분리 및 동정

1) 항산화 활성 물질의 분리

가) 적색찰 추출물질에 대한 이화학적특성연구

현미와 백미 추출물의 활성검정 비교시험에서 현미 추출물이 더 높은 활성을 보였으므로(표 2-9, 표 2-10)항산화 활성 물질의 분리를 위한 예비적 실험으로 pH와 열 안정성, 각종 용매에 대한 추출성, HP-20 resin에 대한 흡착성을 조사한 결과 80% MeOH 추출물질은 pH와 열에 대해서 안전한 것으로 판단되었으며 활성물질의 각종용매에 대한 추출성 여부에 있어 EtOAc, BuOH 등의 추출물에서는 활성을 보였으나 CHCl<sub>3</sub>에는 활성을 보이지 않아 활성물질이 추출되지 않는 것으로 생각되었다. HP-20에 대한 흡착성 실험결과 20% MeOH ~ 80% MeOH 분획에서 활성을 보여 활성물질이 resin에 흡착됨을 알 수 있었다.

표 2-9. 현미 추출물의 화학적 특성

Solvent			Stability					CHCl <sub>3</sub> Extract		EtOAc Extract		BuOH Extract	
			pH			Temp(°C)							
MeOH	Hexane	H <sub>2</sub> O	2	4	6	25	40	S	A	S	A	S	A
83%	62%	27%	67%	71%	80%	79%	42%	75%	24%	70%	20%	72%	20%

S; solvent layer, A; aqueous layer

표 2-10. HP-20 resin에 의한 현미 추출물의 화학적 특성.

HP-20					
20% MeOH	40% MeOH	60% MeOH	80% MeOH	80% Me <sub>2</sub> CO	100% Me <sub>2</sub> CO
68%	71%	74%	83%	72%	37%

나) 항산화활성물질의 분리

(1) Open Column chromatography 및 TLC 분석결과

6개의 용매별로 얻어진 각각 fractions들을 TLC를 전개한 결과 280nm에서 100% MeOH과 80% MeOH 용매 조건에서 추출된 fractions들은 1st 전개용매 조건에서 단일의 spot를 보였으나 60% MeOH 이후의 용매조건에서 얻은 fractions들은 spot를 보이지 않아서 이러한 추출조건과 3th, 4th TLC 전개용매 조건은 phenolic compounds 검출에 적합하지

않고 1st, 2nd 전개용매 조건이 적합한 것으로 본 연구결과 나타났다. (그림2-31, 그림2-32)

100%MeOH 과 80%MeOH에서 취한 fractions들을 25개의 표준물질과 더불어 folin 시약을 이용한 물질 검출에서도 단일의 spot의 형성을 보여 단일물질로 추정되었고(그림2-33), 100% MeOH 용매조건에서 분리해낸 fractions의 spot이 표준물질 중 ferulic acid, sinapic acid, syringic acid의 spot과 비슷한 위치에서 나타났으므로 이들 표준물질과 100 % MeOH fractions들의 추출물을 HPLC, UV 및 EI/MS로 분석한 결과 ferulic acid로 동정되었다.

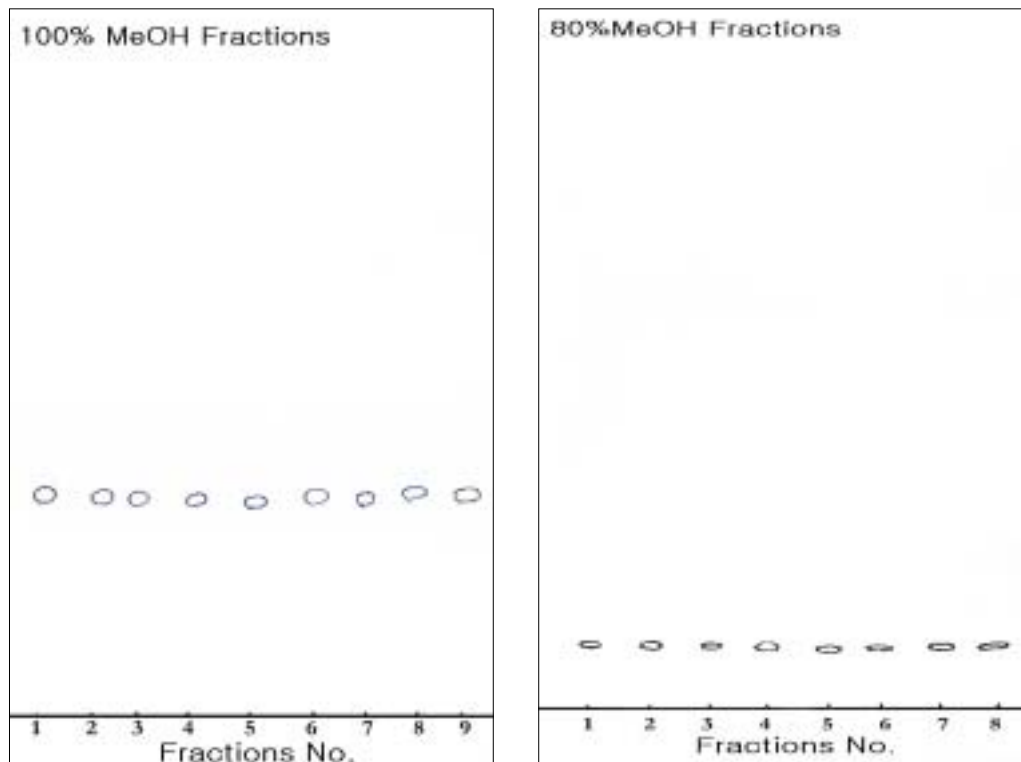
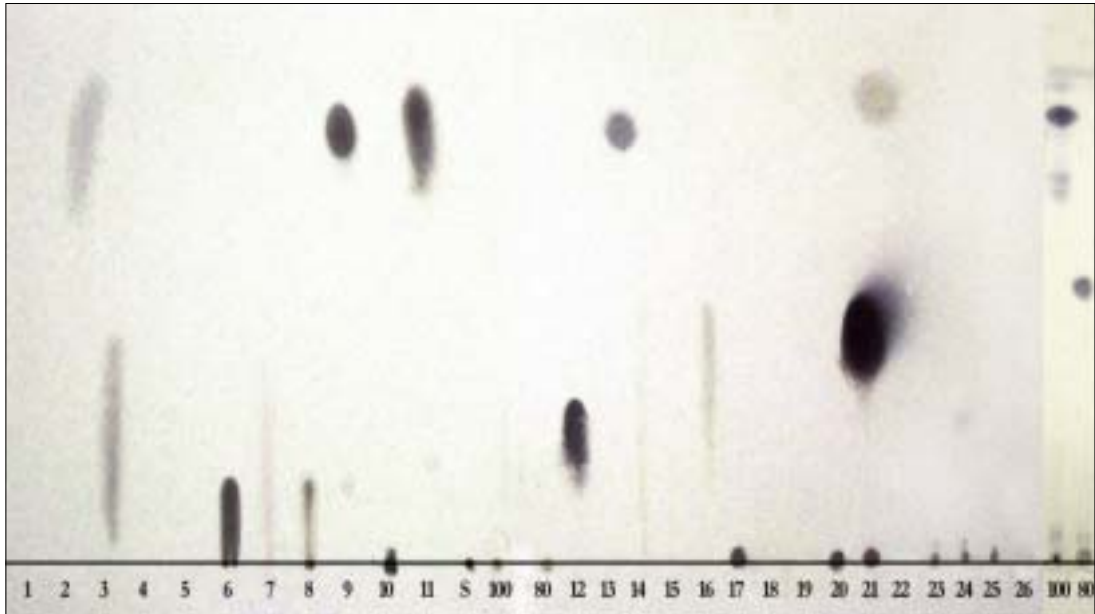
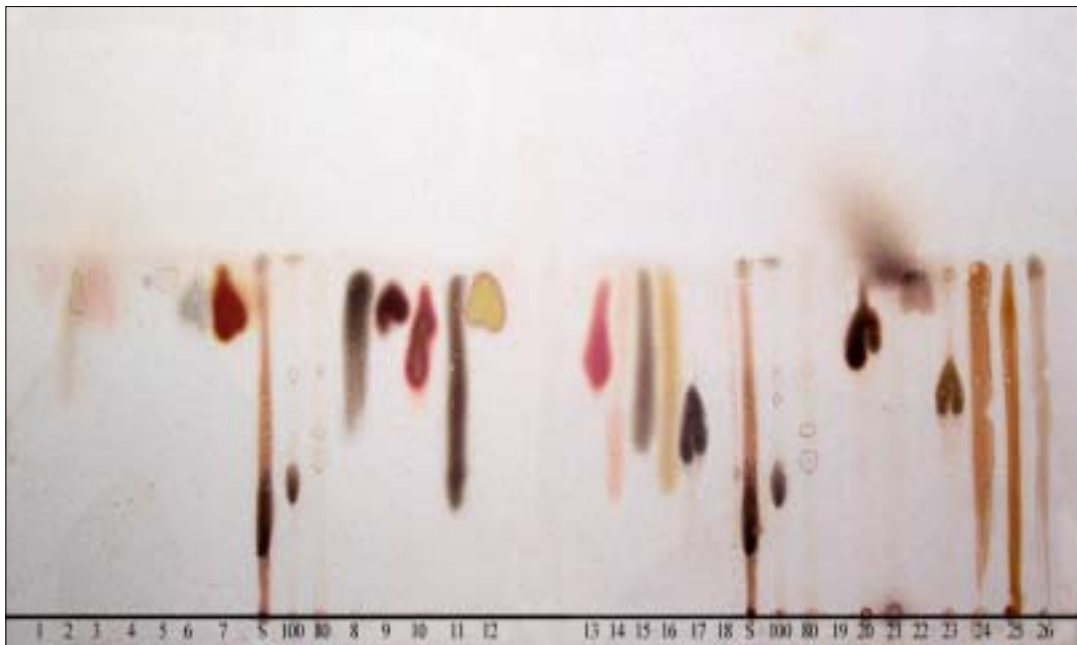


그림 2-31. 100% MeOH과 80% MeOH 용매조건에서 분리해낸 fractions들의 TLC 분석 결과(UV detector)



TLC 전개용매 (BuOH : HOAc : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 5)

그림 2-32. 표준물질과 100%, 80%MeOH 용매조건에서 분리추출된 물질의 TLC 비교 결과 (Folin detector)



TLC 전개용매 (BuOH : HOAc : H<sub>2</sub>O = 5 : 4 : 1)

그림 2-33. 표준물질과 100%, 80%MeOH 용매조건에서 분리된 물질의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색 후 TLC분석결과.

## (2) Flash Column chromatography를 이용한 분리

Flash Column chromatography를 이용한 분리물질들의 TLC 분석결과에서 동일한 Rf값을 보이는 fractions들을 포함, 농축 후 순수 분리된 물질을 얻었다(그림 2-34).



그림 2-34. Flash chromatography를 이용한 각 fraction들의 TLC  
(용매전개 조건: 100% MeOH)

## (3) 분리된 물질의 UV 및 TLC분석

Flash column chromatography을 통해 분리해낸 물질을 TLC와 UV를 통해 분석된 물질을 여러 가지 표준물질과 비교분석한 결과 ferulic acid와 흡광 파장 영역이 가장 유사함을 확인할 수 있었다(그림 2-35, 그림 2-36). 또한 분리한 물질과 ferulic acid를 TLC 분석한 결과 동일 물질임을 확인할 수 있었다(그림 2-37).

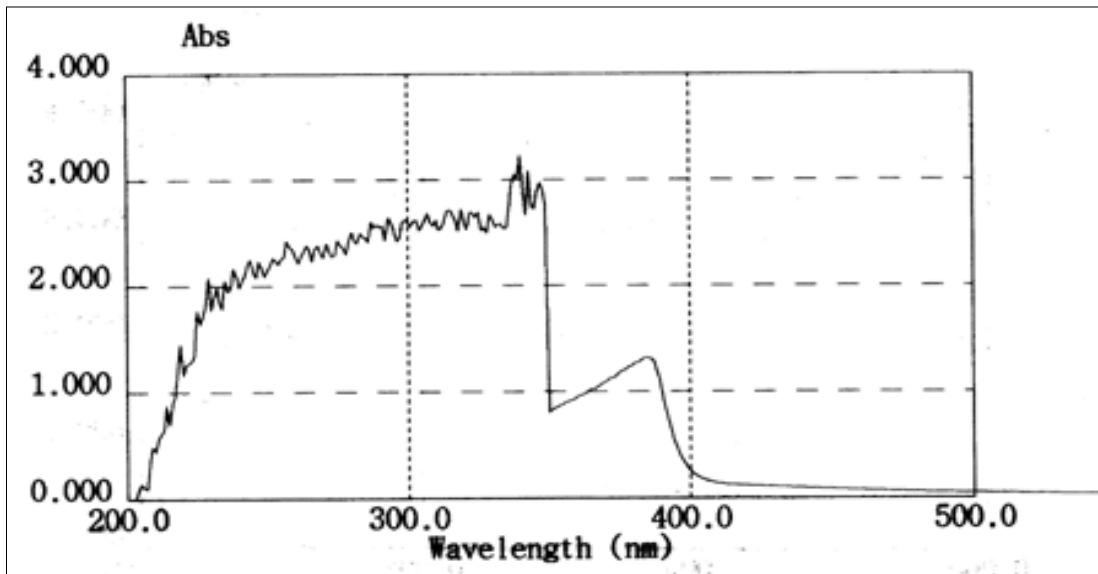


그림 2-35. standard Ferulic acid의 UV spectrum.

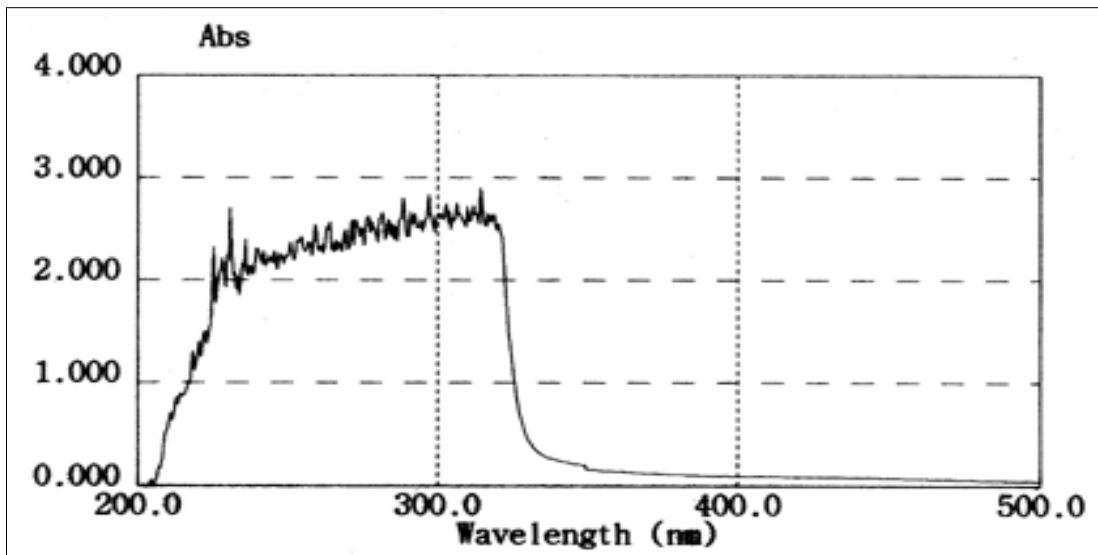


그림 2-36. Flash column chromatography에 의해 분리동정된 물질의 UV spectrum



그림 2-37. 분리정제된 ferulic acid(A)와 표준품(B)의 TLC비교  
(용매조건: 100% EtOAc)

#### (4) HPLC분석결과

TLC와 UV로 동정된 물질을 HPLC로 분석결과 ferulic acid는 retention time 15.955 min을 보이는 단일의 peak를 보이는 순수물질로 확인되었으며(그림 2-38), 이물질을 HPLC 분석한 결과 99.7% 순도를 보였으며, 농도를 조절하여 조사한 표준검량선은  $y = 1.77588x + 0.034198$  이었다 (그림 2-39). 또한 100% MeOH 쌀 추출물도 이러한 물질을 함유하고 있는 것으로 확인 되었고,(그림2-40), 이 물질의 함유정도를 일품 벼와 적색 찰 추출물을 비교하였더니 일품 벼에 비해서 적색찰벼에 더 많은 양의 ferulic acid가 함유되어 있는 것을 알 수 있었다 (그림 2-41, 그림 2-42).



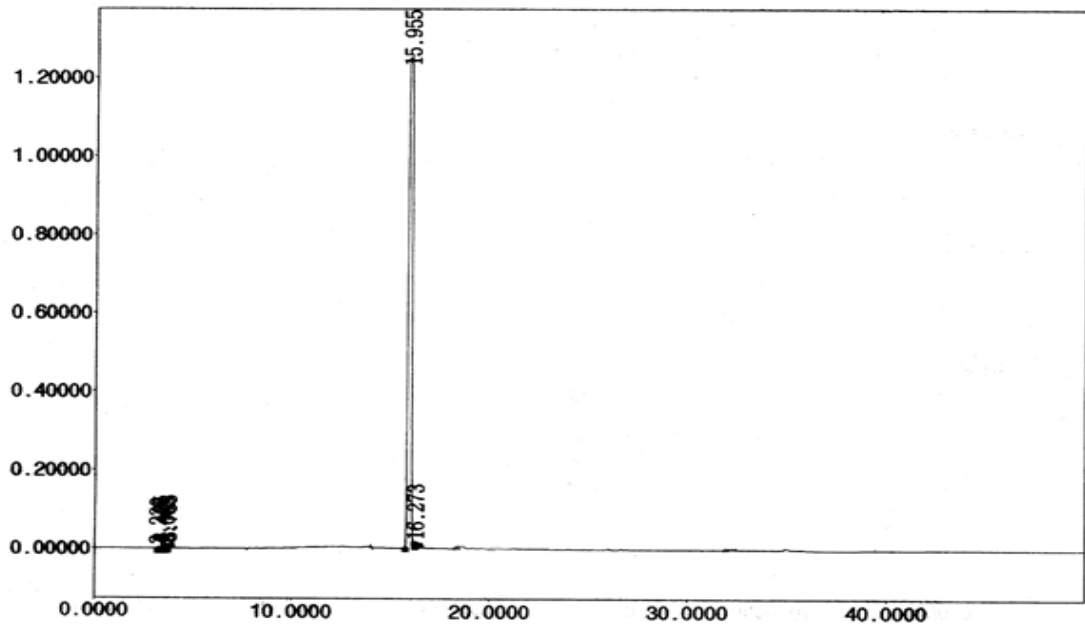


그림 2-38. Ferulic acid 의 HPLC 분석결과

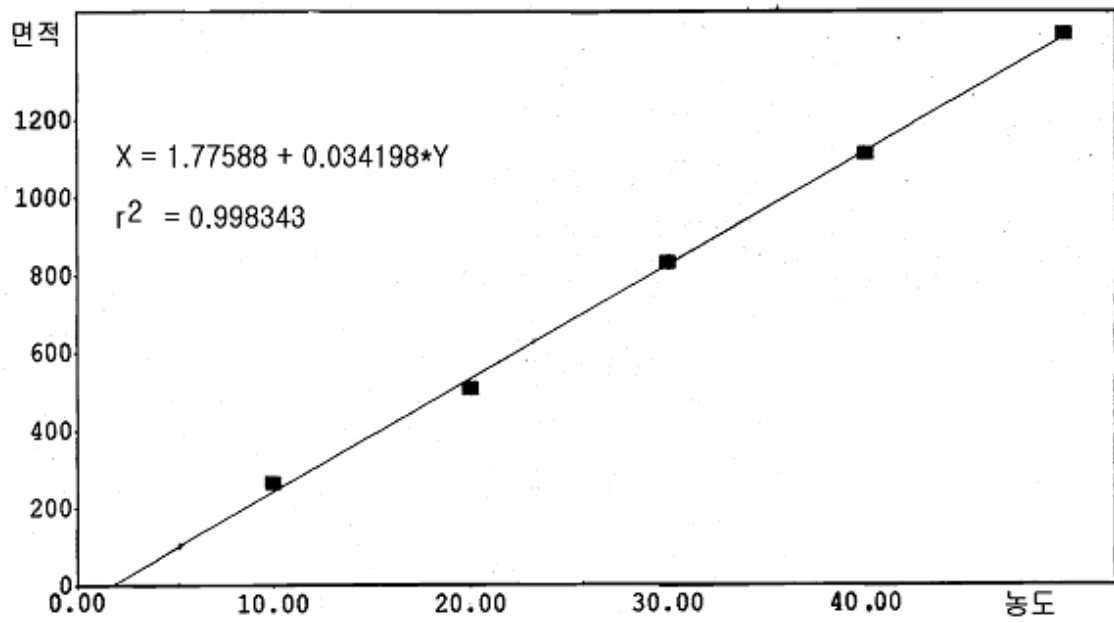


그림 2-39. 분리된 Ferulic acid 의 Calibration curve

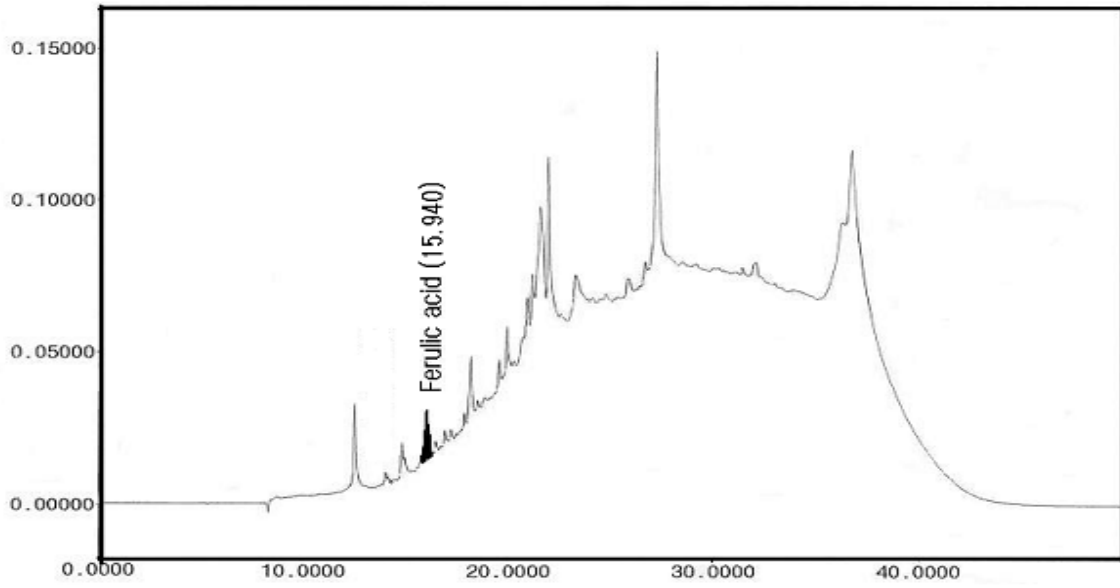


그림 2-40. 100% MeOH 용매조건에서 column을 통해 분리된 쌀 추출물의 HPLC 분석결과

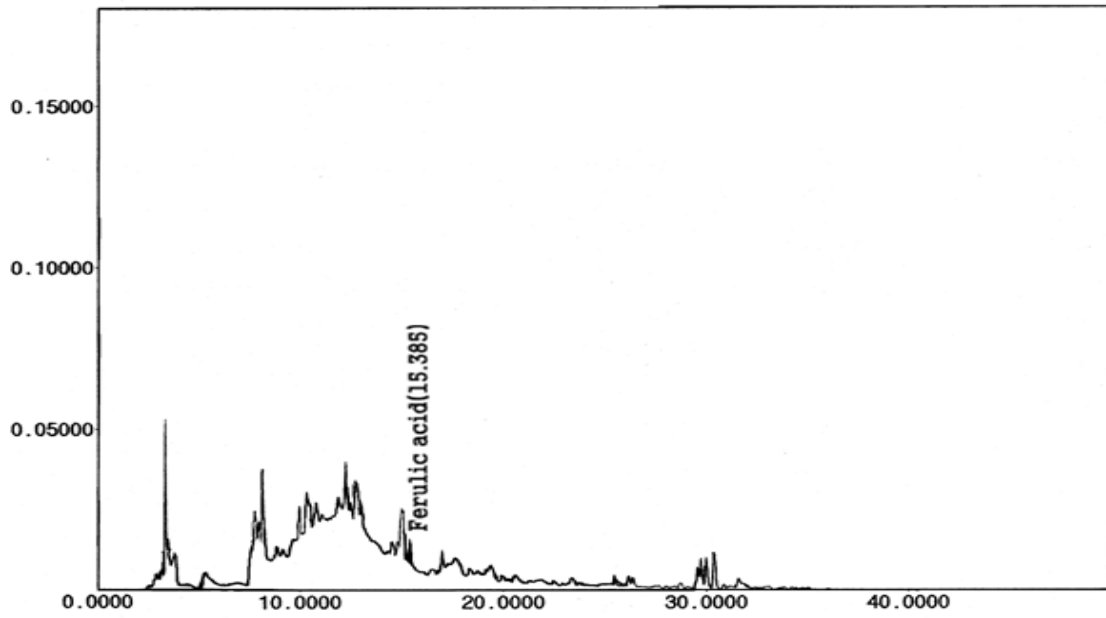


그림 2-41. 일품 추출물의 HPLC 분석결과

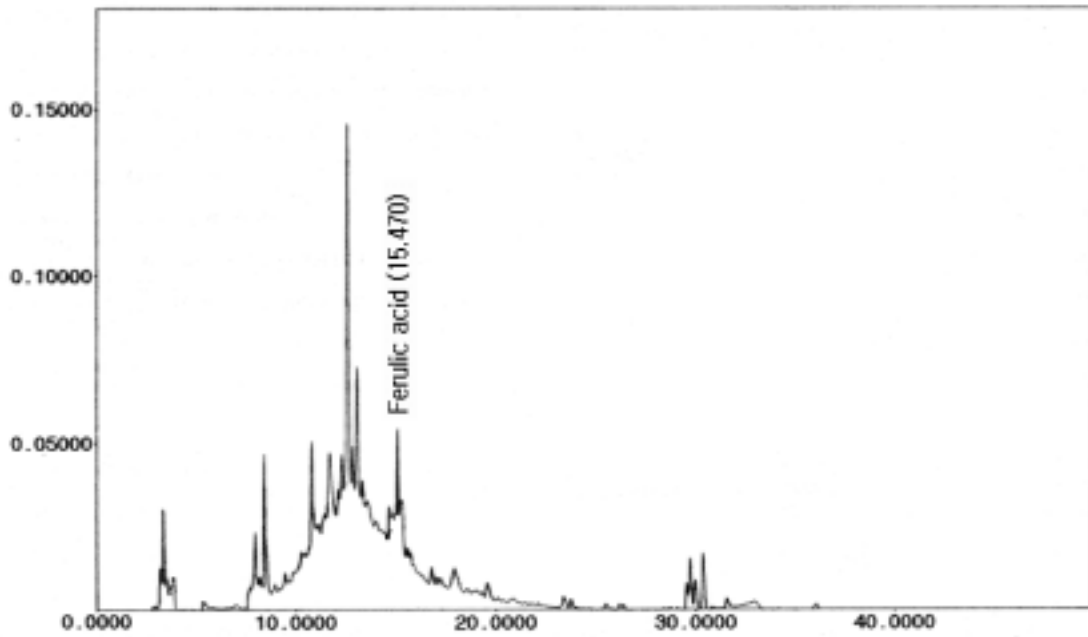


그림 2-42. 적색찰 추출물의 HPLC 분석결과

(5) MASS 측정결과

분리·동정된 물질의 MS분석결과 ferulic acid는 179에서 major fragmentation ions를 보이며 분자량 194로 동정되었다(그림2-43).

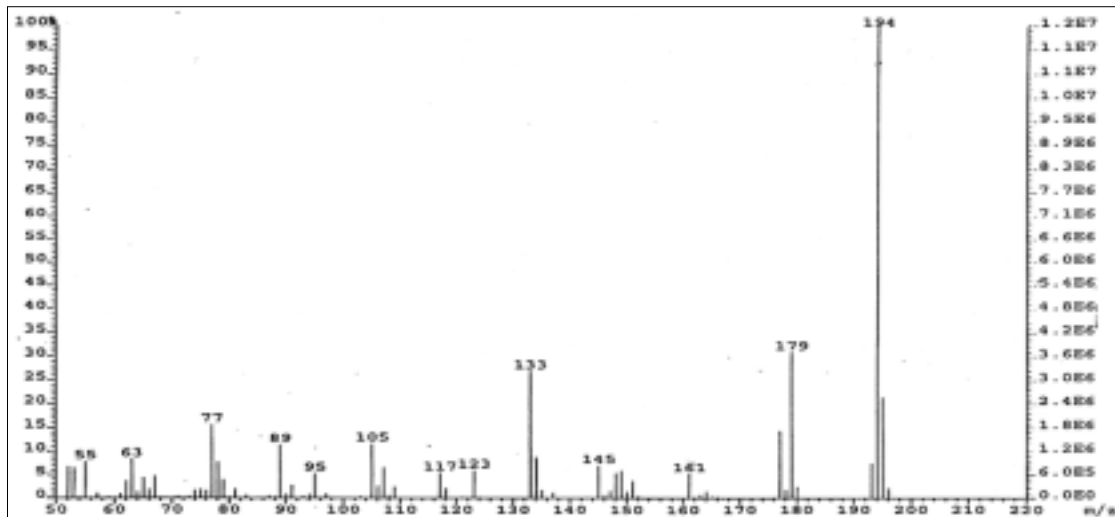


그림 2-43. 분리 동정된 Ferulic acid 의 Mass 측정결과

종합적으로 쌀 함유 항산화관련 물질을 분석하기 위하여 쌀 추출물의 이화학적특성을 조사하였고 80% MeOH 추출물을 농축 후 여러 가지 용매조건을 달리하여 open column chromatography, flash column chromatography, TLC, UV, HPLC 및 EI-MS를 이용하여 분석 동정한 결과 80% MeOH fractions에서 항산화활성 물질로 알려진 ferulic acid로 추정되는 물질이 검출되었고, 이 물질의 확인하기 위하여 EI/MS로 확인한 결과 분자량 194, 분자식  $C_{10}H_{10}O_4$ 인 물질로서 동정되었다. 그리고, 이 물질은 HPLC분석결과 99.7% 순도를 보였으며, 표준 검량선 방정식은  $y = 1.77588x + 0.034198$  이었다. 쌀 함유 항산화관련물질의 분석결과에는 Torel 등(1986)이 보고한 바와 같이 지질과산화를 억제하는 중요한 물질중의 하나가 phenolics 및 flavonoids라고 보고하였다. 본 연구의 결과도 지질과산화에 관여하는 물질이 ferulic, chlorogenic acid와 flavonoids의 일종인 isovitexin이라는 가능성을 제시하고 있어 앞으로 광범위한 연구가 필요하다.

#### 다. 분리 동정된 항산화 물질의 항산화 활성 비교

##### 1) SOD 및 DPPH 활성 검정

분리·동정된 ferulic acid와 기존의 항산화물질로 알려진 phenolic acids와 flavonoids 표준품들의 NBT환원법을 이용한 SOD활성 검정에서 ferulic acid는 17%의 활성을 보였고, DPPH법을 이용한 항산화활성 검정에서도 67%를 보여 상당한 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다(표2-11).

##### 2) ESR (Electron spin resonance)에 의한 항산화물질의 SOD 활성 측정

분리동정된 ferulic acid를 DMPO와 비교하여 ESR을 이용하여 측정한 SOD 활성을 나타낸 것이다. DMPO에 비하여 peak가 작게 나타나 동정된 물질이 높은 SOD 활성을 보이고 있다는 것을 알 수 있다(그림 2-44, 그림 2-45).

##### 3) 라디칼 소거능(RC<sub>50</sub>)활성 측정

50%의 억제력을 나타내는 ferulic acid의 농도(RC<sub>50</sub>)를 살펴보면 36ug/ml으로서 대조구로 사용된 BHT에 비하여 매우 높은 억제력을 보였다(그림 2-46).

표 2-11. Ferulic acid와 다른 물질과의 SOD와 DPPH 활성 비교.

Chemicals	SOD	DPPH
	-----Inhibition(%)-----	
Ferulic acid	17.0	67.8
Catechin	18.5	15.1
Coumarin	17.6	73.2
Quercetin	12.1	24.0
Naringin	14.2	17.4
Myricetin	14.5	18.0
Naringein	13.0	29.0
Salicylic acid	19.7	77.0
Kaempferol	13.5	21.7
Hesperidin	15.9	9.9
Unknown compound-a	18.3	44.0
Unknown compound-b	13.4	24.0
Unknown compound-c	15.9	19.1
Daidzein	14.0	30.6
Genistin	17.0	10.8
Glycitein	16.3	5.0
Genistein	16.3	15.7
CV(%)	27.4	20.9
LSD(0.05)	7.1	9.0

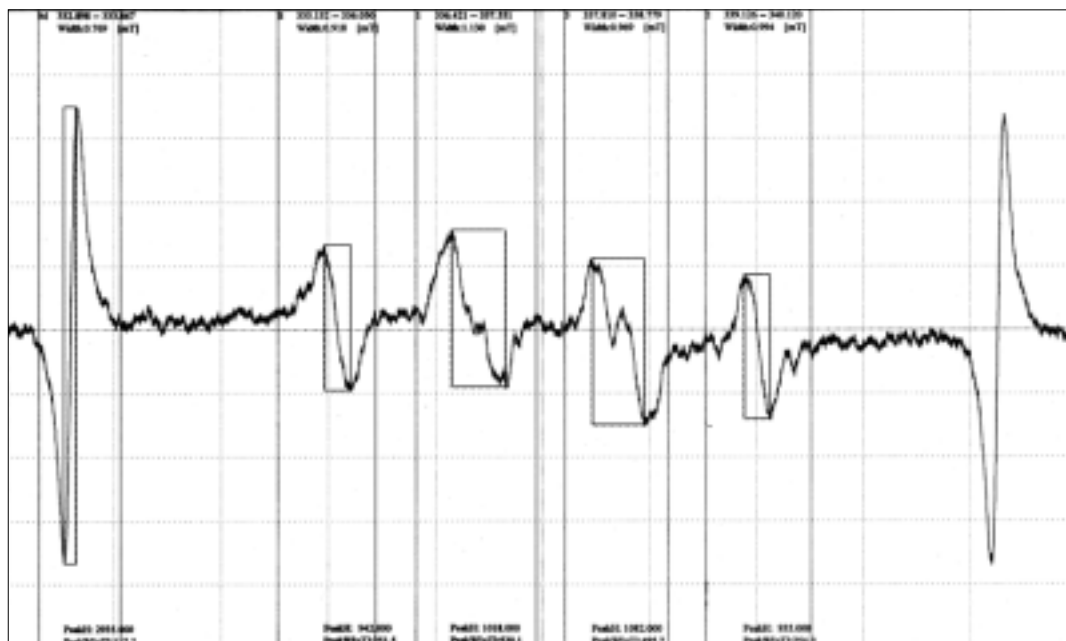


그림 2-44. DMPO 에 의한 ESR 측정결과

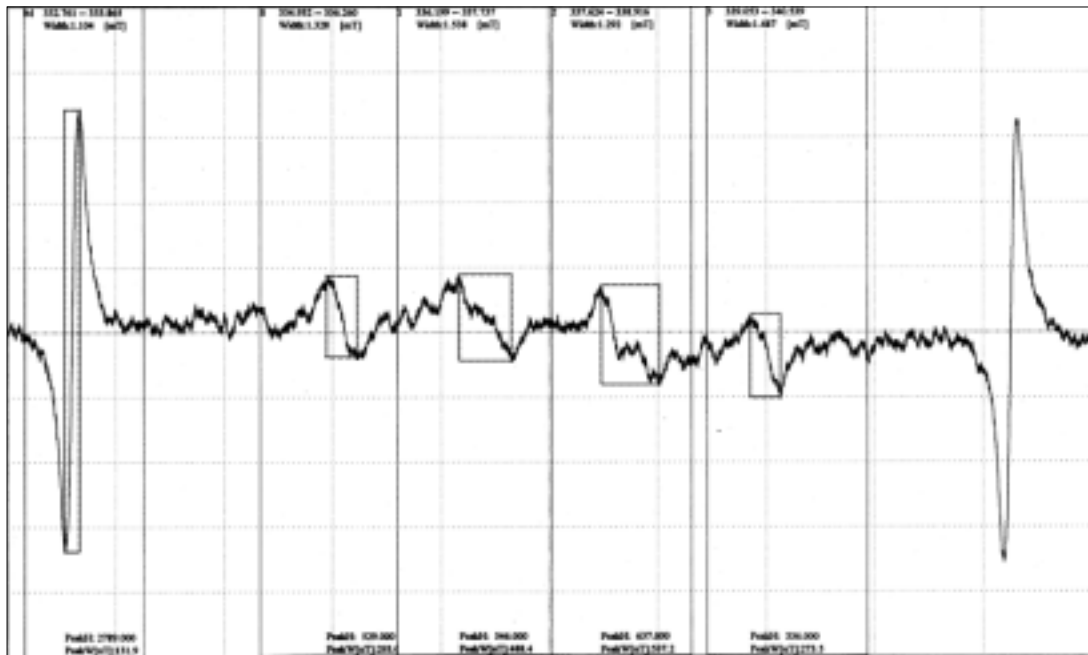


그림 2-45. Ferulic acid에 의한 ESR 측정결과

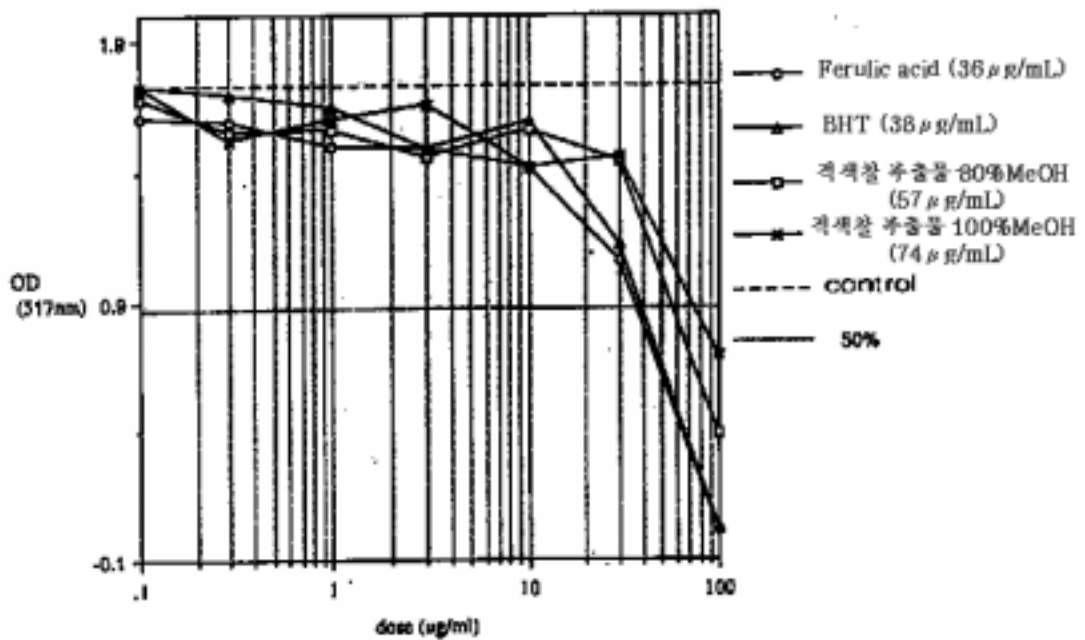


그림 2-46. ferulic acid와 BHT 및 적색찰 추출물의 라디칼 소거능 활성(RC<sub>50</sub>)

#### 4) Cell culture에 의한 세포독성 검정

PC12 세포를  $H_2O_2$ 에 30분간 노출시킨 결과 세포의 생존율은 감소하였다. PC12 세포를 dopamine에 24시간 노출 시켰을 때 역시 세포의 수는 감소하였다(그림 2-47). Ferulic acid가 세포를 죽게 하는 산화적 스트레스에 대하여 억제 효과가 있는지 알아 보기 위하여  $H_2O_2$  나 dopamine에 PC12세포를 노출시키기 전 1시간 동안 Ferulic acid를 처리하였다. 그림 2-48에서 보여지는 것처럼, ferulic acid가 처리된 된 세포들은 같은 시간동안  $H_2O_2$ 이나 dopamine에 노출 되었을 때 1mM에 이르는 농도까지 처리하였으나 어느 농도에서도 cytotoxicity는 나타나지 않았다. 그러나, ferulic acid는  $H_2O_2$ 와 dopamine에 의해 야기되는 세포 치사에 대한 방어적 효과를 보였다(그림 2-49).  $H_2O_2$  혹은 dopamine은 산화적 스트레스를 일으킨 다음 PC12세포를 포함한 몇 종류의 같은 세포 계통을 죽게 하는 것으로 보고되었다(Satoh 등., 1996; Whittemore 등., 1995). 따라서 ferulic acid를 이용한 산화적 스트레스에 의한 세포 치사에 대한 방어적 효과연구는 좀 더 광범위하게 수행되어야 할 것으로 생각된다.

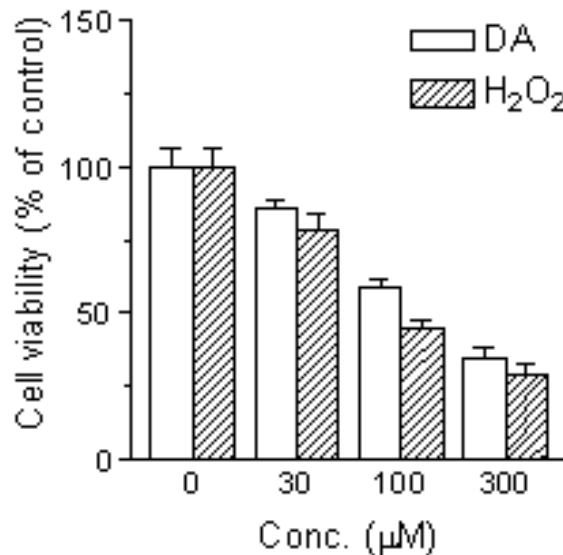


그림 2-47. Dopamine(DA)과 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )에 의한 PC12 세포의 생존율

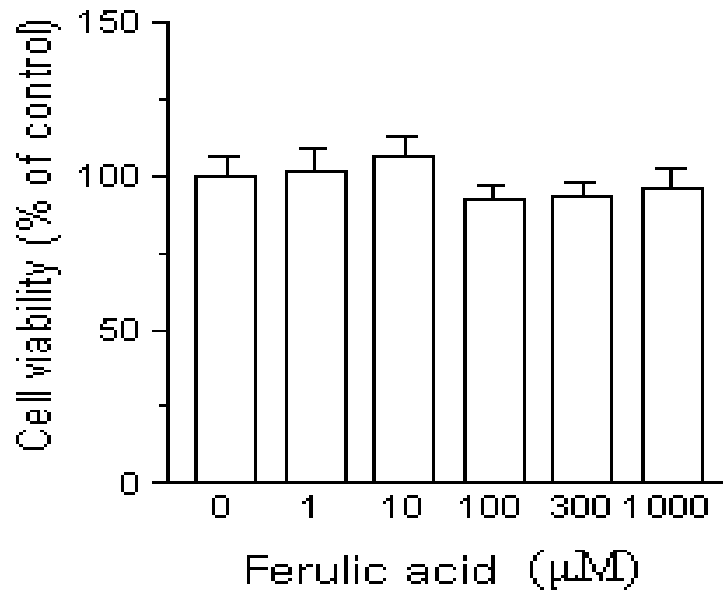


그림 2-48. Ferulic acid에 의한 PC12 세포의 생존률

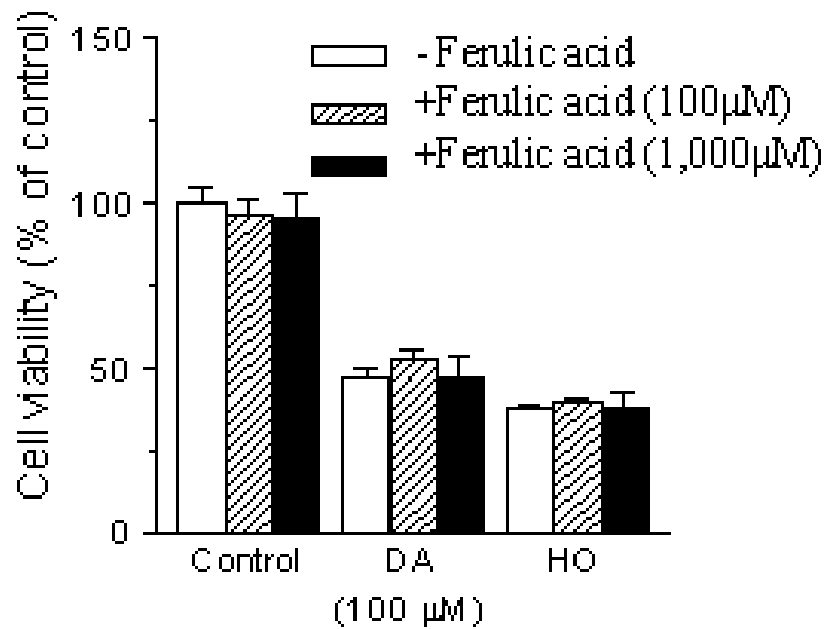


그림 2-49. Dopamine(DA) 과 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의한 PC12 세포 죽음에 미치는 ferulic acid의 효과



라. *In vivo*에서의 항산화활성검정

1) *In vivo*에서 항산화활성검정(제 1차년도)

가) 혈중 지질농도 및 혈액 생화학적 지표 분석

표2-12. 혈청  $\gamma$ GTP, 총콜레스테롤, TG, LDH, HDL, ALP, GOT, GPT변화

	Control	EtOH	Extract
$\gamma$ GTP(mUnit/ml)	291.2 $\pm$ 46 (n=9)	598.7* $\pm$ 136 (n=8)	443.3 $\pm$ 88 (n=9)
Total Cholesterol (mg/dl)	270.1 $\pm$ 45 (n=11)	230 $\pm$ 42 (n=10)	174 $\pm$ 40 (n=11)
TG (mg/dl)	188 $\pm$ 13 (n=11)	125.8* $\pm$ 13 (n=10)	145.4 $\pm$ 17 (n=11)
LDH(W-unit)	1179.6 $\pm$ 139 (n=11)	946.5 $\pm$ 14 (n=10)	961.5 $\pm$ 135 (n=11)
HDL (mg/dl)	102.2 $\pm$ 9 (n=11)	104.5 $\pm$ 9 (n=10)	101 $\pm$ 10 (n=11)
ALP (K-A unit)	11.2 $\pm$ 1.6 (n=11)	7.6 $\pm$ 1.8 (n=10)	9.1 $\pm$ 1.7 (n=10)
GOT (Karamen unit)	0.27 $\pm$ 0.04 (n=10)	0.22 $\pm$ 0.04 (n=8)	0.26 $\pm$ 0.02 (n=11)
GPT (Karamen unit)	0.13 $\pm$ 0.02 (n=11)	0.14 $\pm$ 0.02 (n=8)	0.1 $\pm$ 0.02 (n=6)

Data represent mean  $\pm$  standard error of the mean.

\* denotes  $p < 0.05$  as compared with control.

$\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

TG: triglycerides,

LDH: lactate dehydrogenase

HDL: high density lipoprotein

ALP: alkaline phosphatase

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase

GPT: glutamic pyruvic transaminase

표 2-12는 혈중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방에 대한 영향은 각 처치군의 혈중 총 콜레스테롤과 중성지방의 경우, 혈중 총 콜레스테롤농도는 phosphate buffered saline 용액을 투여한 대조군의 경우 270.1 $\pm$ 45mg/dl이며, 알콜 투여군은 230 $\pm$ 42mg/dl으로 대조군과 비슷하였다. 반면에, 쌀 추출물과 알콜 혼합액을 투여한 경우 174 $\pm$ 40mg/dl의 값으로 대조군에 비하여 낮은 경향을 보이나, 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 혈중 중성지방의 경우, 대조군에 비하여 알콜 투여군에서는 현저하게 저하되었으나( $p < 0.05$ ), 쌀 추출물을 투여한 경우에는 대조군에 비하여 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 혈중 HDL-콜레스테롤치의 경우, 대조군, 알콜투여군, 및 쌀추출물 투여군 모두에서 별 차이가 없었다. 혈중

간기능 지표 효소 활성도에 검정하기 위한 여러 가지 혈중 간기능 지표 효소 활성도를 측정 한 결과(표 2-12) 만성 알콜섭취에 기인한 알콜성 간 장애의 민감한 지표로 알려진  $\gamma$ -GTP 의 경우, 알콜 투여군의 값은  $598.7 \pm 136$ 으로 대조군  $291.2 \pm 46$ 에 비하여 현저히 높았다 ( $p < 0.05$ ). 쌀 추출물 투여군의 경우,  $443.3 \pm 88$ 로 알콜투여군에 비하여 약간 낮은 값을 보여 주나 통계적으로 유의적인 차이로는 생각되지 않는다. 그 외의 여러 가지 간기능 지표의 경우, 알콜 및 쌀 추출물 투여군 모두에서 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

#### 나) 간조직의 지질과산화 수준, GST 활성도 및 GSH 함량 측정

표 2-13은 간 조직 중의 산화적 스트레스의 지표이며, 지질과산화 반응 산물인 malondi- aldehehyde(MDA)를 측정한 결과이다. 대조군, 알콜 투여군, 및 쌀 추출물 투여군 에서 각각,  $2.53 \pm 0.1$ ,  $2.07 \pm 0.2$ , 및  $2.24 \pm 0.3$  (nmole/mg protein)으로 비슷하였다. 간 조직의 glutathione S-transferase (GST)의 활성도 측정은 GST 활성은 알콜 투여군의 경우, 대조 군과 비슷한 활성을 보이나, 쌀추출물 투여 시에는 대조군에 비하여 효소의 활성을 보다 현저하게 감소시켰다 ( $1.01 \pm 0.06$  vs  $1.83 \pm 0.13$   $p < 0.05$ ). 간 조직 중의 glutathione (GSH)의 함량 측정한 결과 대조군에 비하여 에탄올 및 쌀 추출물 투여군 모두에서 GSH의 함량이 감소되었다.

표 2-13. 지질과산화 수준, GST 활성도 및 GSH 함량

	MDA (nmole/mg portein)	GST (umole/min/ug protein)	GSH (nM/mg/protein)
Control	$2.53 \pm 0.1$ (n=11)	$1.83 \pm 0.13$ (n=11)	$72.18 \pm 7.1$ (n=11)
EtOH	$2.07 \pm 0.2$ (n=10)	$1.41 \pm 0.19$ (n=9)	$43.1 \pm 6.5$ (n=10)
Extract	$2.24 \pm 0.3$ (n=11)	$1.01 \pm 0.06$ (n=11)	$52.9 \pm 8.6$ (n=11)

Data represent mean  $\pm$  standard error of the mean.

\* denotes  $p < 0.05$  as compared with control. GST refers to GSH S-transferase.

MDA : Malondialdehyde

GST : Glutathione S-transferase

GSH : Glutathione

## 2) *In vivo*에서 항산화활성검정(제 2차년도)

### 가) 실험 I (2001년 시료로 7주 처리 실험)

(1) 체중변화

7주간의 사육기간 동안 각 실험군 간의 체중변화는 그림 2-50 및 표 2-14과 같다.

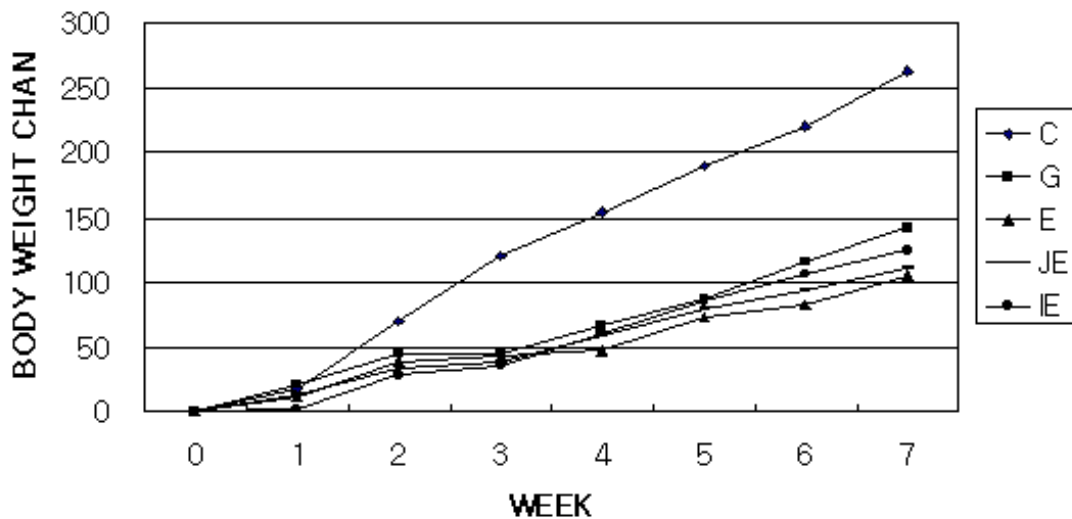


그림 2-50. 체중 변화

표 2-14. 일일 체중 변화

Group	Body Weight Change ( g/day )
C	3.00±0.20 <sup>a</sup>
G	2.90±0.07 <sup>ab</sup>
E	2.15±0.10 <sup>c</sup>
JE	2.27±0.15 <sup>c</sup>
IE	2.53±0.19 <sup>bc</sup>
LSD	0.44

C : 생리식염수 투여군  
 G : Glucose 투여군  
 E : EtOH 투여군  
 JE : 자광찰벼 추출물 투여군  
 IE : 일품벼 추출물 투여군

각 실험군 간의 체중은 일일 체중 변화(g/day)로 표시하였다. 체중 변화에 있어서

EtOH 투여군(2.15±0.1g/day)은 생리식염수 투여군(3±0.2g/day)에 비하여 유의적으로 감소하였다. 자광찰벼 추출물 투여군(2.27±0.15g/day)과 일품벼 추출물 투여군(2.53±0.19 g/day)의 체중 변화는 생리식염수 투여군 보다 유의적으로 감소하였고, EtOH 투여군에 비해 증가했으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. Glucose 투여군(2.9±0.07 g/day)은 EtOH 투여군과 자광찰벼 추출물 투여군보다 체중 변화량이 유의적으로 증가하였다.

### (2) 혈액의 생화학적 지표

자광찰벼와 일품벼 flavonoid 함유 추출물(8mg/200g body weight)을 7주간 경구 투여한 흰쥐의 혈액중의 GOT와 GPT를 측정된 결과는 표 2-15과 같다.

GOT 활성도의 경우, 일품벼 추출물 투여군에서 가장 낮은 활성도를 보였다. 각 실험군들은 대조군에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보였다. GPT 활성도의 경우, Glucose 투여군에서 가장 낮은 활성도를 보였다. 각 실험군들은 Glucose 투여군에 비하여 유의적으로 높은 활성도를 보였다.

표 2-15. 혈중 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 측정

Group	GOT (Karmen)	GPT (Karmen)
C	195.89±35.55 <sup>a</sup>	37.00±8.97 <sup>a</sup>
G	122.13±5.21 <sup>b</sup>	15.82±2.4 <sup>b</sup>
E	138.93±4.49 <sup>b</sup>	40.65±3.96 <sup>a</sup>
JE	138.49±6.99 <sup>b</sup>	47.70±5.11 <sup>a</sup>
IE	112.30±6.5 <sup>b</sup>	42.40±6.34 <sup>a</sup>
LSD	33.58	12.95

### (3) 혈중 항산화 효소 활성도

자광찰벼와 일품벼 flavonoid 함유 추출물(8mg/200g body weight)을 7주간 경구 투여한 흰쥐의 혈액중의 glutathione peroxidase(GPx) 활성도, GSSG(산화형 glutathione)의 생성을 측정된 결과 표 2-16과 같다. GPx 활성도의 경우, 각 실험군들간에 유의적인 차이를 보

이지 않았다. GSH/GSSG 비율은 일품벼 추출물 투여군에서 가장 낮은 값을 보였다. Glucose 투여군은 다른 실험군들에 비하여 유의적으로 높은 값을 보였다.

표 2-16. 혈중 GPx(glutathione peroxidase) 및 GSH/GSSG(reduced glutathione/oxidized glutathione) 측정

Group	GPx (ng/ml)	GSH/GSSG ( $\mu$ mol)
C	102.17 $\pm$ 8.58 <sup>a</sup>	5.17 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>
G	102.37 $\pm$ 6.82 <sup>a</sup>	5.69 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
E	105.91 $\pm$ 7.31 <sup>a</sup>	5.01 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>
JE	112.81 $\pm$ 7.31 <sup>a</sup>	4.40 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
IE	104.66 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	3.99 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>
LSD	20.65	1.22

#### (4) 조직의 지질과산화물 농도

자광찰벼와 일품벼 flavonoid 함유 추출물(8mg/200g body weight)을 7주간 경구 투여한 흰쥐의 조직에서 malondialdehyde(MDA)와 lipid hydroperoxide(LOOH) 함량을 측정한 결과는 표 2-17과 표 2-19와 같다. 간 및 뇌 조직의 경우, 각 실험군간의 MDA 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이자 조직의 경우, EtOH 투여군(0.24 $\pm$ 0.04 $\mu$ mol/mg protein), 자광찰벼 추출물 투여군(0.33 $\pm$ 0.03 $\mu$ mol/mg protein), 일품벼 추출물 투여군(0.23 $\pm$ 0.02 $\mu$ mol/mg protein)은 생리식염수 투여군(0.28 $\pm$ 0.01 $\mu$ mol/mg protein) 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. Glucose 투여군(0.20 $\pm$ 0.02 $\mu$ mol/mg protein)은 생리식염수 투여군 비하여 유의적으로 낮은 MDA 함량을 보였다.

간 조직의 경우, 일품벼 추출물 투여군(3.03 $\pm$ 0.80 $\mu$ mol)이 가장 낮은 LOOH 함량을 보였고, Glucose 투여군(5.46 $\pm$ 0.92 $\mu$ mol)에 비하여 유의적으로 낮은 함량을 나타내었다. EtOH 투여군(4.32 $\pm$ 0.27 $\mu$ mol)과 자광찰벼 추출물 투여군(4.76 $\pm$ 0.90 $\mu$ mol)은 대조군(4.01 $\pm$ 1.17 $\mu$ mol)에 비하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

표 2-17. 조직(간, 뇌, 이자)에서 MDA(Malondialdehyde) 함량 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
	----- $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ -----		
C	0.60±0.10 <sup>a</sup>	2.85±0.36 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>ab</sup>
G	0.58±0.08 <sup>a</sup>	2.77±0.24 <sup>a</sup>	0.20±0.02 <sup>c</sup>
E	0.58±0.13 <sup>a</sup>	2.91±0.37 <sup>a</sup>	0.24±0.04 <sup>bc</sup>
JE	0.45±0.07 <sup>a</sup>	2.84±0.23 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>
IE	0.57±0.07 <sup>a</sup>	2.96±0.31 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>
LSD	0.22	0.79	0.06

#### (5) 조직의 항산화 효소 활성화도 변화

자광찰벼와 일품벼 flavonoid 함유 추출물(8mg/200g body weight)을 7주간 경구 투여한 흰쥐의 조직에서 GST 활성도를 측정한 결과는 표 2-18와 같다. 간 조직의 경우, GST 활성도는 Glucose 투여군(773.57±53.52 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 가장 높은 활성을 나타내었다. EtOH 투여군(507.2±36.82 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )과 자광찰벼 추출물 투여군(478.39±18.94 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군(611.83±55.23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 낮은 활성도를 보였다. 일품벼 추출물 투여군(575.52±27.39 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 EtOH 투여군에 비하여 높은 활성을 나타내었으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 뇌 조직의 경우, EtOH 투여군(148.03±7.48 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )과 일품벼 추출물 투여군(146.64±4.43 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군(170.15±6.31 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보였다. 자광찰벼 추출물 투여군(135.33±4.58 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군과 Glucose 투여군(162.1±7.32 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보였다. 이자 조직의 경우, GST 활성도는 일품벼 추출물 투여군(85.02±8.82 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 가장 높은 활성을 보였다. EtOH 투여군(80.76±9.94 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군(60.08±5.71 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 높은 활성을 보였다. 자광찰벼 추출물 투여군(63.11±3.69 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군과는 별 차이가 없었으나 EtOH 투여군에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다. 일품벼 추출물 투여군은 생리식염수 투여군과 Glucose 투여군(64.75±1.24 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 높은 활성을 보였다.

표 2-18. 조직에서 GST(Glutathione S-transferase) 활성도 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
	----- $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ -----		
C	611.83±55.23 <sup>b</sup>	170.15±6.31 <sup>a</sup>	60.08±5.71 <sup>b</sup>
G	773.57±53.52 <sup>a</sup>	162.10±7.32 <sup>ab</sup>	64.75±1.24 <sup>b</sup>
E	507.20±36.82 <sup>c</sup>	148.03±7.48 <sup>bc</sup>	80.76±9.94 <sup>a</sup>
JE	478.39±18.94 <sup>c</sup>	135.33±4.58 <sup>c</sup>	63.11±3.69 <sup>b</sup>
IE	575.52±27.39 <sup>bc</sup>	146.64±4.43 <sup>bc</sup>	85.02±1.24 <sup>b</sup>
LSD	101.2	15.89	15.88

표 2-19. 간 조직에서 LOOH(Lipid hydroperoxide) 측정 및 간과 뇌 조직에서 GSH(Glutathione) 측정

Group	Liver		Brain
	LOOH	GSH	GSH
	-- $\mu\text{mol}$ --	----- $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ -----	
C	4.01±1.17 <sup>ab</sup>	17.58±2.20 <sup>a</sup>	4.44±0.47 <sup>a</sup>
G	5.46±0.92 <sup>a</sup>	16.96±2.22 <sup>a</sup>	4.63±0.63 <sup>a</sup>
E	4.32±0.27 <sup>ab</sup>	14.18±1.58 <sup>a</sup>	2.63±0.38 <sup>b</sup>
JE	4.76±0.90 <sup>ab</sup>	16.36±2.04 <sup>a</sup>	3.24±0.53 <sup>b</sup>
IE	3.03±0.92 <sup>b</sup>	17.34±1.54 <sup>a</sup>	2.51±0.32 <sup>b</sup>
LSD	2.02	4.67	1.03

자광찰벼와 일품벼 flavonoid 함유 추출물(8mg/200g body weight)을 7주간 경구 투여한 흰쥐의 조직에서 GSH 함량을 측정한 결과는 표 2-19와 같다. 간 조직의 경우, 각 실험군 간에 GSH 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뇌 조직의 경우, EtOH 투여군(2.63±0.38 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ), 자광찰벼 추출물 투여군(3.24±0.53 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ), 일품벼 추출물 투여군(2.51±0.32 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )은 생리식염수 투여군(4.44±0.47 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )과 Glucose 투여군(4.63±0.63 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )에 비하여 유의적으로 낮은 GSH 함량을 보였다.

자광찰벼 추출물 투여군은 EtOH 투여군보다 높은 GSH 함량을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

나) 실험 II (2001년 시료로 2주 처리 실험)

(1) 체중변화

2주간의 걸친 사육기간동안 각 실험군 간의 체중변화는 그림 2-51 및 표 2-20과 같다. 자광찰벼 추출물 투여군(2.16±0.46g/day)과 EtOH 투여군(2.50±0.85g/day)은 Glucose 투여군(4.62±0.49g/day)에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 자광찰벼 추출물 투여군과 EtOH 투여군은 통계적으로 유의적인 차이가 없었다.

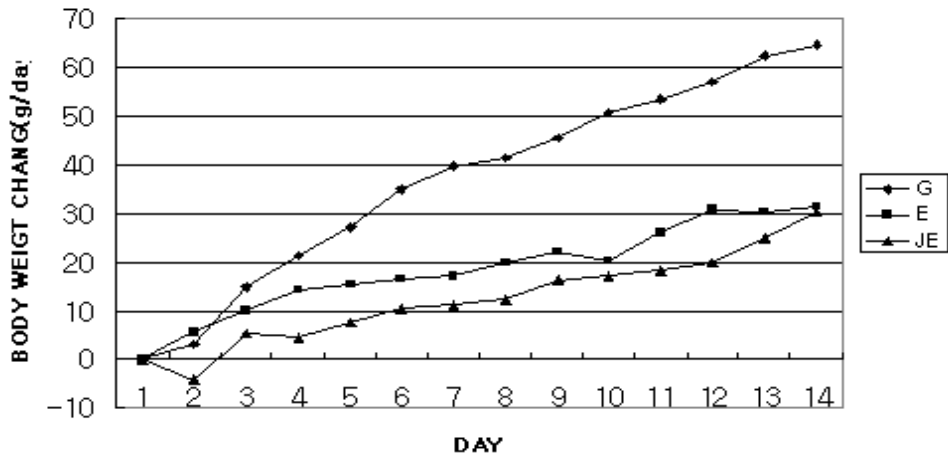


그림 2-51. 체중 변화

표 2-20. 일일 체중 변화

Group	Body Weight Change (g/day)
G	4.62±0.49 <sup>a</sup>
E	2.50±0.85 <sup>b</sup>
JE	2.16±0.46 <sup>b</sup>
LSD	1.77

G : Glucose 투여군  
 E : EtOH 투여군  
 JE : 자광찰벼 추출물 투여군



### (2) 혈액의 생화학적 지표

자광찰벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 혈액중의 GOT, GPT, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 측정된 결과는 표 2-21과 같다. GOT, GPT 활성도 모두에서 EtOH 투여군에 비해 자광찰벼 추출물 투여군이 가장 낮은 활성도를 보였고 유의적인 차이가 있었다. 총 콜레스테롤에서는 세 투여군 간에 유의적인 차이가 없었다. HDL 콜레스테롤 수준의 경우 EtOH 투여군이 가장 높은 수치를 나타냈으며, LDL 콜레스테롤 수준의 경우는 자광찰벼 추출물 투여군이 가장 높은 수치를 나타냈다.

표 2-21. 혈중 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase), TC(Total cholesterol), HDL(High density lipoprotein) 및 LDL(low density lipoprotein) 측정

Group	GOT (Karmen unit)	GPT (Karmen unit)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
G	112.21±12.31 <sup>b</sup>	22.24±3.56 <sup>b</sup>	44.89±4.63 <sup>a</sup>	21.12±2.11 <sup>b</sup>	23.77±4.45 <sup>b</sup>
E	247.63±34.28 <sup>a</sup>	57.81±9.11 <sup>a</sup>	54.58±7.52 <sup>a</sup>	43.26±1.43 <sup>a</sup>	20.02±3.65 <sup>b</sup>
JE	116.97±15.09 <sup>b</sup>	29.56±5.03 <sup>b</sup>	62.21±5.51 <sup>a</sup>	20.35±4.72 <sup>b</sup>	41.86±5.09 <sup>a</sup>
LSD	66.05	18.43	17.44	11.08	12.87

### (3) 조직의 지질과산화물 농도

표 2-22. 조직에서 MDA(malondialdehyde) 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
----- μmol/mg protein -----			
G	1.01±0.22 <sup>b</sup>	5.40±1.46 <sup>b</sup>	1.18±1.18 <sup>b</sup>
E	1.48±0.36 <sup>b</sup>	7.64±1.78 <sup>ab</sup>	3.06±0.64 <sup>a</sup>
JE	2.46±0.36 <sup>a</sup>	12.91±3.29 <sup>a</sup>	2.83±0.83 <sup>ab</sup>
LSD	0.90	6.72	1.79

자광찰벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 조직에서 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정된 결과는 표 2-22와 같다. 간(2.46±0.36 μmol/mg

protein) 및 뇌(12.91±3.29 $\mu$ mol/mg protein)에서 자광찰벼 추출물 투여군이 가장 높은 수치를 보였다. 이자에서는 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 추출물 투여군에 비교하여 별 차이가 없었다.

#### (4) 조직의 항산화 효소 활성화도 변화

자광찰벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 조직에서 GST 활성도를 측정한 결과는 표 2-23과 같다. 간 조직에서는 자광찰벼 추출물 투여군(422.42±71.21 $\mu$ mol/min/mg protein)이 Glucose 투여군(242.82±23.88 $\mu$ mol/min/mg protein)과 EtOH 투여군(178.27±66.62 $\mu$ mol/min/mg protein)에 비해 현저히 높은 활성을 보였다. 뇌에서는 자광찰벼 추출물 투여군(217.62±32.12 $\mu$ mol/min/mg protein)이 유의적인 차이는 없었지만 EtOH 투여군(163.75±10.96 $\mu$ mol/min/mg protein) 비해 높은 수치를 나타냈다. 이자에서는 세 투여군 간에 유의적인 차이가 없었다.

표 2-23. 조직에서 GST(Glutathione S-transferase) 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
	----- $\mu$ mol/min/ mg protein -----		
G	242.82±23.88 <sup>b</sup>	125.16±11.55 <sup>b</sup>	151.22±16.34 <sup>a</sup>
E	178.27±66.62 <sup>b</sup>	163.75±10.96 <sup>ab</sup>	199.50±14.98 <sup>a</sup>
JE	422.42±71.21 <sup>a</sup>	217.62±32.12 <sup>a</sup>	192.59±32.60 <sup>a</sup>
LSD	158.13	57.48	64.16

### 3) *In vivo*에서 항산화활성검정(제3차년도)

#### 가) 실험 III(2002년 시료로 2주 처리 실험)

##### (1) 체중변화

2주간의 걸친 사육기간 동안 각 실험군 간의 체중변화는 그림 2-52 및 표 2-24과 같다. Glucose 투여군(7.81±0.30g/day)은 몸무게가 현저하게 증가하였으며, 모든 그룹에 비해 유의적인 차이가 있었다. 그 외 자광찰벼 추출물 투여군(6.65±0.38g/day), 생리식염수 투여군(5.83±0.27g/day), 찰벼 추출물 투여군(4.15±0.44g/day), EtOH 투여군(3.62±0.23g/day), 일품벼 추출물 투여군(3.13±0.47g/day) 순으로 체중증가가 관찰되었다. 2002년에 재배된 자광찰

비 추출물 투여군은 생리식염수 투여군에 비하여 체중이 증가하는 경향을 보이고, 찰벼추출물 투여군, EtOH 투여군 및 일품벼 추출물 투여군은 생리식염수에 비해 체중이 감소하는 경향을 보였다.

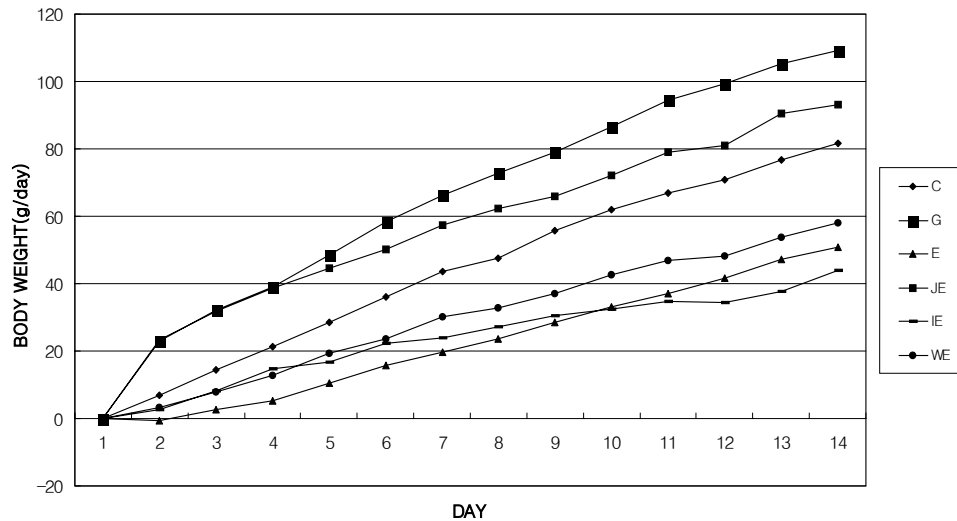


그림 2-52. 체중 변화

표 2-24. 일일 체중 변화

Group	Body Weight Change (g/day)
C	5.83±0.27 <sup>b</sup>
G	7.81±0.30 <sup>a</sup>
E	3.62±0.23 <sup>cd</sup>
JE	6.65±0.38 <sup>b</sup>
WE	4.15±0.44 <sup>c</sup>
IE	3.13±0.47 <sup>d</sup>
LSD	1.02

C : 생리식염수 투여군  
 G : Glucose 투여군  
 E : EtOH 투여군  
 JE : 자광찰벼 추출물 투여군  
 WE : 찰벼 추출물 투여군  
 IE : 일품벼 추출물 투여군

### (2) 혈액의 생화학적 지표

자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 혈액중의 GOT, GPT, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 측정 한 결과는 표 2-25과 같다.

GOT 활성도의 경우, 일품벼 추출물 투여군에서 가장 낮은 활성도를 보였다. 그러나 EtOH 투여군과는 유의적인 차이는 없었다. GPT 활성도는 생리식염수 투여군, EtOH 투여군 및 일품벼 추출물 투여군이 가장 낮은 활성도를 보였다. 총콜레스테롤은 각 군간에 그다지 유의적인 차이를 나타내지 않았다. HDL 콜레스테롤에서도 각 군간에 그다지 유의적인 차이를 나타내지 않았다. LDL 콜레스테롤에서는 자광찰벼 추출물 투여군에서 가장 낮은 수치를 나타내었다.

표 2-25. 혈중 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase), TC(Total cholesterol), HDL(High density lipoprotein) 및 LDL(low density lipoprotein) 측정

Group	GOT (Karmen unit)	GPT (Karmen unit)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
C	190.37±4.98 <sup>a</sup>	24.04±2.23 <sup>cd</sup>	44.55±2.32 <sup>ab</sup>	18.97±1.33 <sup>b</sup>	26.58±2.06 <sup>ab</sup>
G	156.05±7.70 <sup>b</sup>	19.21±2.73 <sup>d</sup>	43.72±3.78 <sup>ab</sup>	24.93±1.59 <sup>a</sup>	18.79±2.79 <sup>c</sup>
E	148.96±8.20 <sup>bc</sup>	30.55±1.59 <sup>bc</sup>	47.50±3.12 <sup>ab</sup>	22.60±1.43 <sup>ab</sup>	24.90±2.70 <sup>abc</sup>
JE	185.25±9.78 <sup>a</sup>	43.63±5.47 <sup>a</sup>	45.07±3.19 <sup>ab</sup>	26.52±2.36 <sup>a</sup>	18.55±1.51 <sup>c</sup>
WE	181.87±8.17 <sup>a</sup>	38.84±2.55 <sup>ab</sup>	42.37±3.82 <sup>b</sup>	22.00±1.97 <sup>ab</sup>	20.36±2.51 <sup>bc</sup>
IE	131.29±9.71 <sup>c</sup>	31.52±3.36 <sup>bc</sup>	52.45±3.75 <sup>a</sup>	22.80±1.50 <sup>ab</sup>	29.66±3.47 <sup>a</sup>
LSD	23.28	9.13	9.44	4.92	7.20

### (3) 혈중 항산화 효소 활성도

자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐 혈액중의 glutathione peroxidase(GPx) 활성도, GSSG(산화형 glutathione)의 생성을 측정 한 결과 표 2-26과 같다.

GPx 활성도의 경우, 각 실험군들간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

GSH/GSSG 비율은 생리식염수와 일품벼 추출물 투여군에서 낮은 값을 보였다. Glucose 투여군과 EtOH 투여군에서는 높은 값이 관찰되었다.

표 2-26. 혈중 GPx(glutathione peroxidase) 및 SH/GSSG(reduced glutathione/oxidized glutathione) 측정

Group	GPx (ng/ml)	GSH/GSSG ( $\mu$ mol)
C	33.53 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	9.66 $\pm$ 1.50 <sup>c</sup>
G	35.72 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>	22.09 $\pm$ 7.18 <sup>ab</sup>
E	34.18 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	24.32 $\pm$ 4.91 <sup>a</sup>
JE	34.35 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	13.90 $\pm$ 3.03 <sup>abc</sup>
WE	32.40 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>	15.95 $\pm$ 1.65 <sup>abc</sup>
IE	31.06 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	11.59 $\pm$ 3.05 <sup>bc</sup>
LSD	6.73	10.94

#### (4) 조직의 지질과산화물 농도

자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐 조직에서 malondialdehyde(MDA)와 lipid hydroperoxide(LOOH) 함량을 측정한 결과 표 2-27과 표 2-29와 같다.

MDA 수준의 경우 간에서는 EtOH 투여군과 시료 투여군 간에 유의적인 차이가 없었다. 이자에서는 자광찰벼 추출물 투여군(2.86 $\pm$ 1.41 $\mu$ mol/mg protein)이 EtOH 투여군(0.95 $\pm$ 0.10 $\mu$ mol/mg protein)에 비해 현저하게 높았으며, EtOH 투여군, 찰벼 추출물 투여군 및 일품벼 추출물 투여군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 뇌에서는 찰벼 추출물 투여군(2.30 $\pm$ 0.17 $\mu$ mol/mg protein)이 EtOH 투여군(3.14 $\pm$ 0.13 $\mu$ mol/mg protein)에 비해 에탄올에 의해 유도된 MDA 함량을 현저하게 감소시켰다.

LOOH는 일품벼 추출물 투여군(1.82 $\pm$ 0.55 $\mu$ mol)에서 가장 낮은 함량이 관찰되었다. 자광찰벼 추출물 투여군(2.79 $\pm$ 0.64 $\mu$ mol)과 찰벼 추출물 투여군(2.34 $\pm$ 0.65 $\mu$ mol)도 EtOH 투여군(3.15 $\pm$ 0.78 $\mu$ mol)에 비해 유의적인 차이는 없었지만 낮은 함량을 나타내었다.

표 2-27. 조직(간, 뇌, 이자)에서 MDA(malondialdehyde) 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
----- $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ -----			
C	1.99±0.18 <sup>a</sup>	2.82±0.20 <sup>ab</sup>	0.85±0.12 <sup>b</sup>
G	1.16±0.09 <sup>c</sup>	3.10±0.19 <sup>a</sup>	1.58±0.22 <sup>ab</sup>
E	1.51±0.20 <sup>bc</sup>	3.14±0.13 <sup>a</sup>	0.95±0.10 <sup>b</sup>
JE	1.68±0.16 <sup>ab</sup>	2.83±0.36 <sup>ab</sup>	2.86±1.41 <sup>a</sup>
WE	1.30±0.08 <sup>bc</sup>	2.30±0.17 <sup>b</sup>	0.84±0.06 <sup>b</sup>
IE	1.41±0.16 <sup>bc</sup>	2.95±0.25 <sup>a</sup>	0.85±0.04 <sup>b</sup>
LSD	0.43	0.63	1.35

#### (5) 조직의 항산화 효소 활성도 변화

자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐 조직에서 GST 활성도를 측정한 결과는 표 2-28와 같다. 간에서는 찰벼 추출물 투여군(357.44±12.24 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 가장 높은 활성을 보였으며, 찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군(394.28±16.73 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 EtOH 투여군(330.25±10.72 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다. 뇌에서는 일품벼 추출물 투여군(282.62±23.53 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 가장 높은 활성을 보였으며, 마찬가지로 EtOH 투여군(229.39±4.85 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다. 이자에서는 자광찰벼 추출물 투여군(268.99±31.03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )이 가장 높은 활성을 보였으며, EtOH 투여군(194.36±1.20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다.

간에서 GSH 함량을 측정한 결과는 표 2-29와 같다. GSH 함량은 자광찰벼 추출물 투여군(19.54±1.28 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )과 일품벼 추출물 투여군(21.69±1.63 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )이 EtOH 투여군(18.85±1.84 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았지만 약간 높은 수치를 나타내었다.

자광찰벼, 찰벼 및 일품벼 flavonoid 함유 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 간 조직에서 GPx 함량을 측정한 결과는 표 2-29와 같다. 찰벼 추출물 투여군이 현저하게 높은 수치를 나타냈으며 다른 투여군에 비해 유의적인 차이를 나타냈다.

표 2-28. 조직에서 GST(Glutathione S-transferase) 측정

Group	Liver	Brain	Pancreas
$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$			
C	373.52±14.47 <sup>ab</sup>	237.62±10.58 <sup>b</sup>	193.09±1.59 <sup>b</sup>
G	313.15±9.94 <sup>d</sup>	216.56±2.21 <sup>b</sup>	245.39±20.43 <sup>a</sup>
E	330.25±10.72 <sup>cd</sup>	229.39±4.85 <sup>b</sup>	194.36±1.20 <sup>b</sup>
JE	317.00±7.29 <sup>d</sup>	230.21±6.32 <sup>b</sup>	268.99±31.03 <sup>a</sup>
WE	394.28±16.73 <sup>a</sup>	214.33±4.54 <sup>b</sup>	195.30±1.78 <sup>b</sup>
IE	357.44±12.24 <sup>bc</sup>	282.62±23.53 <sup>a</sup>	196.59±1.70 <sup>b</sup>
LSD	34.69	31.67	43.64

표 2-29. 간 조직에서 LOOH(Lipid hydroperoxide), GPx(glutathione peroxidase) 및 GSH(Glutathione) 측정

Group	LOOH ( $\mu\text{mol}$ )	GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ )	GPx (mU/ml)
C	3.92±0.72 <sup>a</sup>	18.40±1.14 <sup>a</sup>	330.40±23.68 <sup>b</sup>
G	3.09±0.65 <sup>ab</sup>	11.83±0.92 <sup>b</sup>	297.82±10.33 <sup>b</sup>
E	3.15±0.78 <sup>ab</sup>	18.85±1.84 <sup>a</sup>	340.53±23.68 <sup>b</sup>
JE	2.79±0.64 <sup>ab</sup>	19.54±1.28 <sup>a</sup>	346.34±32.13 <sup>b</sup>
WE	2.34±0.65 <sup>ab</sup>	18.72±1.16 <sup>a</sup>	411.90±22.24 <sup>a</sup>
IE	1.82±0.55 <sup>b</sup>	21.69±1.63 <sup>a</sup>	352.81±17.03 <sup>ab</sup>
LSD	1.96	3.85	64.42

#### 4. 결과 요약

##### 가. 항산화활성 물질 탐색 및 분석

1) ESR (Electron spin resonance)을 이용하여 항산화활성 물질 탐색결과 chlorogenic

acid와 ferulic acid가 다른 물질보다 높은 SOD 활성을 보였다.

- 2) HPLC를 이용한 벼 품종간 항산화물질을 비교한 결과 chlorogenic acid > ferulic acid > isovitexin 순을 나타냈다.
- 3) SOD와 POD 활성검정결과 SOD 활성은 Tono Brea 439(16.0%), Hwei Ju(12.5%)가 높은 활성을 보였고, POD 활성은 AUS 196( 96.4%), AC 1423 (95.3%)가 높은 활성을 보였다.
- 4) DPPH에 의한 전자공여소거능에 있어서 Philippine 2 (84.5%), Hwei Ju (81.7%)등이, TBA법에 의한 지질과산화 검정 결과 Seungsiljo (45.6%), Hwei Ju (42.1%) 등이 높은 억제율을 보였다.

#### 나. 항산화활성 물질분리 및 동정

- 1) 현미와 백미 추출물의 활성검정 비교시험에서 현미 추출물이 더 높은 활성을 보였다. 추출물질의 이화학적 특성은 pH와 열에 대한 안정도에 있어서는 80%MeOH가 높았으며, EtOAc, BuOH 등의 추출물에서는 활성을 보이나 CHCl<sub>3</sub>에는 활성을 보이지 않았다.
- 2) 80% MeOH 추출물을 open column chromatography, flash column chromatography, TLC, UV을 이용하여 ferulic acid의 물질을 추출, EI/MS로 확인한 결과 분자량 194, 분자식 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>인 물질로서 동정되었고 HPLC분석결과 99.7% 순도를 보였으며, 표준 검량선 방정식은  $y = 1.77588X + 0.034198$ 의 검량선을 얻었다.

#### 다. 동정된 물질을 이용한 활성 검정

- 1) 순수분리 정제된 ferulic acid을 이용하여 ESR에 의한 SOD활성 (17%), DPPH법 (67%)를 보였다.
- 2) 라디칼소거능 검정(RC<sub>50</sub>)에서는 ferulic acid가 36 $\mu$ g/ml를 나타내어 대조구로 사용된 BHT에 비하여 더 높은 억제력을 보였다.
- 3) PC12 세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 30분간 처리한, dopamine에 24시간 처리한 결과 결과 세포의 생존율은 농도가 증대함에 따라 감소하였다.
- 4) PC12를 이용한 cytotoxicity assay에서는 ferulic acid는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 dopamine에 의해 야기되는 세포 치사에 대한 방어적 효과를 보였다.



#### 라. *In vivo* 항산화활성검정

- 1) 체중변화에 있어서, Glucose 투여군과 생리식염수 투여군에 비해 EtOH 투여군과 시료 투여군은 현저하게 낮은 체중 증가를 보였다. 이것은 에탄올 투여시 체중 증가가 억제된다는 보고와 일치한다. 실험 I에서는 자광찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 체중이 좀 더 증가하는 경향을 보였다. 실험 III에서는 EtOH 투여군에 비해 자광찰벼 추출물 투여군에서 현저한 체중증가가 관찰되었다.
- 2) 간 손상을 예측하는 지표로 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), Glutamic pyruvic transaminase(GPT) 등의 효소들이 이용되고 있다. 이 효소들은 손상된 간 조직으로부터 혈액 중으로 방출되므로 혈액 중에서의 활성이 높게 측정된다. 실험 I에서는 EtOH 투여군에 비해서 일품벼 추출물 투여군이, 실험 II에서는 EtOH 투여군에 비해 자광찰벼 추출물 투여군이, 실험 III에서는 EtOH 투여군에 비해 일품벼 추출물 투여군이 유의적인 차이는 없었지만 낮은 활성을 보이는 경향이 있었다. GPT 활성은 실험 I 과 III에서는 별다른 차이를 보이지 않았다.
- 3) 혈중 항산화 효소 활성도는 실험 I 과 실험 III에서, flavonoid 함유 자광찰벼, 일품벼 및 찰벼 추출물을 처치한 흰쥐 실험에서 사용한 에탄올 용량은 혈청 내 GPx 활성도에 영향을 미치지 못하였지만, 실험 I 에서 자광찰벼 추출물 투여군은 EtOH 투여군에 비하여 혈청 내 GPx 활성도를 약간 증가시키는 경향을 보였고, 실험 III에서도 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 아주 약간 증가시키는 경향을 보였다.
- 4) 조직의 지질과산화물 농도는 실험 I에서는 간과 뇌에서 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 약간 MDA 생성을 감소시키는 경향을 보였다. 실험 II에서는 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 오히려 MDA 함량을 증가시키는 경향을 보였다. 실험 III에서는 간 조직의 경우 찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 MDA 함량을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 뇌에서도 자광찰벼 추출물 투여군, 찰벼 추출물 투여군 및 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 MDA 함량을 다소 감소시키는 경향이 관찰되었다. 이차에서도 찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 감소되어 있음이 관찰되었다.
- 5) 조직의 항산화 효소 활성도변화는 실험 I에서 간 조직에서는 일품벼 추출물 투여군

이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 높은 활성을 나타냈고, 이자에서는 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 실험 II에서 간에서는 자광찰벼 추출물 투여군이 Glucose 투여군과 EtOH 투여군에 비해 현저히 높은 활성을 보였고, 뇌에서는 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이가 없었지만 높은 수치를 나타냈다. 실험 III에서 간에서는 찰벼 추출물 투여군이 가장 높은 활성을 보였으며, 찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다. 뇌에서는 일품벼 추출물 투여군에서 가장 높은 활성을 보였으며, 마찬가지로 EtOH 투여군에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다. 이자에서는 자광찰벼 추출물 투여군이 가장 높은 활성을 보였으며, EtOH 투여군에 비해 GST 활성도를 유의적으로 증가시켰다.

- 6) 실험 I에서 간 조직의 경우, 각 실험 군들 사이에 GSH 함량은 자광찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군은 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았지만 높은 수치를 나타냈다. 뇌 조직의 경우도 자광찰벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 높은 수치를 나타내었다. 실험 III에서 GSH 함량은 자광찰벼 추출물 투여군과 일품벼 추출물 투여군이 EtOH 투여군에 비해 유의적인 차이는 없었지만 약간 높은 수치를 나타내었다.

## 5. 참고문헌

1. Asada, K., M. Takahashi and M. Nagate. 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric. Biol. Chem.* 38:471-473.
2. Baber, S. 1972. *In* D. F. Houston (ed.) Rice chemistry and technology. Amer. Assoc. Cereal Chemists. p. 237.
3. Bannister, J.V., W. Bannister, and H.G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:111-180.
4. Beyer, W.F. Jr., and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.

5. Blois M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
6. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
7. Buege J.A., Aust S.D. 1977. Microsomal lipid peroxidation. *Method in Enzymol.* 10(281).
8. Choi, H.C., and S.K. Oh. 1996. Diversity and function of pigments in colored rice. *K. J. Crop Sci.* 41:1-9.
9. Cutler, R.G. 1984. Antioxidants, aging, and longevity. 6:371-423. *In* W. A. Pryor (ed.) *Free Radicals in Biology*. Academic Press, Orlando, FL.
10. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol* 58:61-97.
11. Lazarow, P.B., and, Y. Fujiki. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:489-530.
12. MaCord, J.M., and, I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
13. Mandac, B. E and Juliano, B.O. 1978. Properties of prolamin in mature and developing rice grain. *Phytochemistry*. 17: 611-614.
14. Navasero, E.P., L.C. Baun, and B.O. Juliano. 1975. Grain dormancy, peroxidase activity and oxygen uptake in *Oryza sativa*. *Phytochem.* 14:1899-1902.
15. Nawa, Y., Ohtani, T., 1992. Property of pigments in rice hull of various colors, *Food Industry (Tokyo)* 11, 28-33(in Japanese).
16. Osawa, T., 1999. Protective role of rice polyphenols in oxidative stress. *Anticancer Research* 19, 3645-3650 (in Japanese)
17. Park, P.W. 1995. Toxic compounds derived from lipids. p. 363. *In* I.J. Jeon, and W.G. Ikins (eds) *Analyzing food for nutrition labelling and hazardous contaminants*. Marcel Dekker, Inc., New York.
18. Peri-Treves, R., and E. Galun. 1988. The Cu/Zn-superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17:745-760.

19. Punchard, N.A. and F.J. Kelly. 1996. Free Radicals: A practical approach. IRL Press. p. 1-6.
20. Raa. J. 1971. Indole-3-Acetic acid levels and the role of indole-3- acetic acid oxidase in normal root and club-root of cabbage. *Plant Physiology*. 25:130-134.
21. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M and Kawakishi. S., 1989. Chemical studies on Novel Rice Hull Antioxidants.2., Identification of Isovitexin, A C-glycoyl Flavonid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 37:316-319
22. Ramarathnam, N., T. Osawa, M. Namiki, and T. Tashiro. 1986. Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seeds. *J. Sci. Food Agric*. 37:719-726.
23. Sakamoto, A., H. Ohsuga, and K. Tanaka. 1992. Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed. *Plant Mol. Biol*. 19:323-327.
24. SAS Institute. 1986. SAS User's Guide; Basic. 5th ed. SAS Institute, Cary, NC.
25. Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*. 2: 213-215.
26. Tolbert, N.E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem*. 50:133-157.
27. Warholm M., Guthenberg C., Bahr C.V., Mannervik B. 1984. Glutathione transferase from human liver. *Method in Enzymol*. 113, 499-504.
28. Wong, S.F., B. Holliwell, R. Richmond, and W.R. Skowroneck. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem*. 14:127-134.
29. Wu, K., W. Zhang, P.B. Addis, R.J. Epley A.M. Salih, and J. Lehrfeld. 1994. Antioxidant properties of wild rice. *J. Agric. Food Chem*. 42:34-37.
30. Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, I. Ushara, K. Komagoe, Y. Fujita, and T. Okuda. 1989. Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull*. 37(7):1919-1923.
31. 大澤俊彦. 1993. 黒光色素의 抗酸化性에 關하여, 日本食品工業學會 1993年度大會(西宮)

### 제 3 절 고향산화활성 품종육성을 위한 벼 계통육성 연구

#### 1. 서 언

우리 국민의 주식량인 쌀은 인간이 활동하는데 필요한 에너지를 주로 공급하고 있기 때문에 쌀을 밥 지어 먹는 용도로 제한하여 왔다. 쌀을 식량으로 이용하고 있는 세계의 모든 나라에서 자국의 늘어나는 인구를 부양하기 위해서 단위면적당 칼로리 생산량이 높고 영양분의 소화흡수율이 높은 쌀의 생산력을 높이기 위한 육종이 이루어져 왔다. 세계적으로 보면 아직도 벼의 수량성을 높이기 위한 육종이 가장 중요한 위치를 차지하고 있지만, 우리나라에서는 1990년대 중반부터 고품질 쌀 생산을 위한 육종이 벼 육종목표 중 첫 번째 우선 순위를 차지하게 되었다.

이어서 건강증진에 대한 국민의 관심이 크게 높아짐과 동시에 에너지원으로 이용하고 있는 쌀이 함유하고 있는 건강기능성 물질에 대한 육종가들의 관심도 점점 커지고 있다. 건강기능성 쌀로서 육종의 소재가 되고 있거나 품종개발이 성공적으로 이루어진 내용을 보면, 아토피성 피부염의 원인 단백질이 제거된 저 알러진 쌀, 황(S) 함유 필수아미노산 함량이나 라이신 함량이 높아진 쌀, 신장병 환자에게 적당한 저 단백 쌀, 비타민이나 생리활성물질이 풍부한 거대배아미, 식이섬유함량이 높은 다이어트용 쌀, 그리고 항산화물질이 풍부한 유색미 등이 있다.

항산화 물질은 그 종류와 구조가 매우 다양하며 인체내의 과산화반응도 매우 복잡하므로 항산화 활성과 항산화 물질을 단일반응기구로 설명하는 데는 어려움이 있지만 두 요소 간에 상관관계가 성립된다고 알려져 있다. 항산화 물질은 인체 내에서 일어나는 과산화반응을 억제 또는 지연시키는 기능을 하는데, free radical 생성을 미연에 방지하는 과산화 억제 물질과 이미 생성된 radical을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제로 구분된다.

쌀의 항산화 활성을 다양한 방법으로 측정해 본 결과 품종간 차이가 크게 나타나고 있어(정 등 2000a, 2000b, 2001) 이 특성이 유전자의 지배를 크게 받고 있음이 밝혀졌고, 따라서 육종적인 방법으로 항산화 활성이 높은 품종을 개발할 수 있는 것이다. 이와 같은 배경 하에서 본 연구에서는 건국대학교 작물육종학 실험실에서 건강기능성 또는 항산화활성 증진을 목적으로 교배하여 세대를 진전시키고 있는 육종재료를 이용하여 교배조합별로 현미의 Cyanidin-3-Glucoside(C3G) 함량이 특별히 높은 계통, C3G함량과 거대배가 조합된 계통, Superoxide Dismutase(SOD)활성 또는 Electron Spin Resonance(ESR)기기로 파장강도를

측정하여 추정된 향산화 활성이 높은 계통 등을 각각 선발코자 하였다. 따라서 이 연구는 고 향산화활성을 목적으로 최신 분석법을 적용하여 시도한 구체적이고 특화된 육종연구로서 개발된 계통 중 일부는 곧 실용화할 수 있을 것이며, 아직도 육성단계에 있는 많은 잡종재료는 실용화를 위해서 앞으로 계속 발전시킬 예정이다.

## 2. 연구내용 및 방법

### 가. 고 향산화 활성 계통육성

#### 1) 실험재료

향산화 활성이 높고 다른 농업형질도 우수한 벼를 개발하기 위하여 매년 인공교배를 실시하였고, 표 3-1에 제시한 것과 같은 잡종집단 및 계통을 매년 육종포장에 재배하여 포장선발을 거쳐 수확·탈곡 후 실내에서 향산화활성에 관련된 특성을 조사하였다. 본 연구의 연구기간은 3년이었지만 육종재료가 포장에서 한창 생육하고 있을 때 연구가 시작되고, 종료되기 때문에 4년간 재배된 육종재료를 표에 나타냈다. 인공교배는 선발된 교배모본 간 절영법에 의해서 실시하여, 일부 교배조합의 F<sub>1</sub>은 겨울철에 세대단축온실에서 재배하여 세대축진을 시켰다. 포장에서 선발된 개체와 계통은 실내에서 향산화 활성과 관련된 특성을 조사하여 선발한 후 다음해 포장에 재배하는 선발과 후대검정과정을 반복하였다.

#### 2) 재배법

매년 육종포장에 재배하는 실험재료는 해에 따라 4월 25일~5월 1일 사이에 파종하고, 5월 말에서 6월 5일 사이에 경기도 여주군 가남면 소재 건국대학교 실습농장에 30×15cm의 재식거리, 주당1본식으로 이앙하였다. 육종포장의 시비량은 10a당 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-7-8 kg 수준이었고 시비법 및 기타 재배관리는 중부지방의 관행방법에 따라 시행하였다.

#### 3) 조사방법

현미의 C3G함량을 간접적으로 추정할 수 있는 현미 종피의 색도는 색도계(Chromameter, 미놀타)로 조사했으며, 현미의 C3G함량은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 즉 현미시료 1g에 추출용매(95% 메탄올과 0.1% HCl을 85:15의 비율로 혼합) 5ml를 넣은 후 4℃에 24시간 보관하면서 C3G를 추출한다. 추출액 중 1ml를 취하여 추출용매 9ml와 잘 섞은 후 528nm에서 흡광도를 측정한다. C3G함량은 미리 확립한 표준곡선에 의하여  $\langle(\text{흡광도} - 0.0018)/4.68557\rangle \times 50$ 으로 계산한다.

표 3-1. 연구기간 중 포장에 재배한 육종재료

재배년도	세대	교배조합	재 배		포장선발 개체수	특성
			집단수	계통수		
2000	F <sub>1</sub>	상남발벼/거대배 등 6조합	6			
	F <sub>2</sub>	흑진주벼/거대배	1		10	거대배, C3G
		흑진주벼/밀양153호	1		34	C3G
		흑진주벼/수원425호	1		44	C3G
		아랑향찰/흑진주벼	1		24	C3G, 방향성
	F <sub>3</sub>	안산벼/가위찰	3		17	ESR
	F <sub>4</sub>	흑남벼/가위찰	2	52	38	SOD활성
		흑남벼/거대배	5	33	33	C3G, 거대배
		진미벼/흑진주벼	1	25	0	
		흑진주벼/진부찰벼	2	27	33	C3G, 찰벼
2001	F <sub>1</sub>	상남발벼/흑미H31//향미찰 등 7조합	7			항산화성
	F <sub>2</sub>	상남발벼/거대배 등 9조합	9			항산화성
	F <sub>3</sub>	흑진주벼/밀양153호	1		78	C3G
		흑진주벼/수원425호	1		78	C3G
		흑진주벼/거대배	1		112	거대배, C3G
		아랑향찰/흑진주벼	1		96	방향성, C3G
		향미찰/충북흑미	1		54	" , C3G
		아랑향찰/충북흑미	1		124	" , C3G
	F <sub>4</sub>	안산벼/가위찰		17	7계통(25개체)	ESR
	F <sub>5</sub>	흑남벼/가위찰		38	9계통(33개체)	ESR
흑남벼/거대배			34	17계통(425개체)	C3G, 거대배	
흑진주벼/진부찰벼			35	33계통(165개체)	C3G	
2002	F <sub>1</sub>	Philippine2/진미//진미 등 3조합	3			항산화성
	F <sub>2</sub>	상남발벼/수원432//향미찰 등 4조합	4			항산화성
	F <sub>3</sub>	상남발벼/흑미H31//향미찰	1		194	C3G
		KR92021/KR92009//KR92021	1		245	C3G
		흑미H31/KR92009//KR92021	1		246	C3G
		수원432호/흑진주벼	1		32	C3G
		흑진주벼/밀양153호	1		50	C3G
	F <sub>4</sub>	흑진주벼/수원425호	1		60	C3G
		흑진주벼/거대배	1		120	거대배, C3G
		아랑향찰/흑진주벼	1		250	방향성, C3G
		향미찰/충북흑미	1		94	" , C3G
		아랑향찰/충북흑미	1		71	" , C3G
	F <sub>5</sub>	안산벼/가위찰		9	9계통(64개체)	ESR
F <sub>6</sub>	흑남벼/가위찰		14	12계통(65개체)	ESR	
	흑남벼/거대배		118	71계통(450개체)	C3G, 거대배	
	흑진주벼/진부찰벼		45	8계통(51개체)	C3G	
2003	F <sub>2</sub>	Sigachatamochi/진미//진미	1			항산화성
	F <sub>3</sub>	상남발벼/수원432//향미찰 등 2조합	4			C3G
	F <sub>4</sub>	흑미H31/KR92009//KR92021 등 2조합	2			C3G
	F <sub>5</sub>	아랑향찰/흑진주벼 등 3조합	3			C3G
		흑진주벼/밀양153호		50		C3G
		흑진주벼/수원425호		50		C3G
		흑진주벼/거대배		30		거대배, C3G
	F <sub>6</sub>	안산벼/가위찰		42		ESR
	F <sub>7</sub>	흑남벼/가위찰		36		ESR
		흑남벼/거대배		81		C3G, 거대배
흑진주벼/진부찰벼			18		C3G	

실험재료의 항산화활성 중 활성산소 소거능 관련효소인 SOD(Superoxide Dis mutase) 활성 평가는 다음의 방법을 따랐다. 현미가루 0.2g과 PVP 0.4g을 효소추출 완충용액(pH 7.0, 100mM phosphate, 10mM ascorbate, 5mM EDTA)에 넣어 추출한 뒤 원심분리하고 PD-10 column분획물을 얻어 검정용액으로 사용하였다. 검정용액을 20W 광원에서 7분간 반응시킨 다음 spectrophotometer 560nm에서 흡광도를 조사하는 NBT(Nitro Blue Tetrazolium)환원법을 사용하여 SOD활성을 측정하였다.

육성 중인 계통 또는 잡종개체 쌀의 항산화활성 평가를 위한 방법의 하나로 Electron spin resonance(ESR)기기를 사용한 과장강도(signal intensity)를 측정하였다. 현미가루 0.2g과 PVP 0.4g을 효소추출 완충용액(PH7.0, 100mM phosphate, 10mM ascorbate, 5mM EDTA)에 넣어 추출한 용액 50 $\mu$ l, 2mM hypoxanthine 50 $\mu$ l, 0.4u/ml의 xanthine oxidase 50 $\mu$ l, 2.67M DMPO 20 $\mu$ l를 혼합하여 반응시킨 다음 ESR spectrometer(JEOL Co., Japan)에 주입하여 1분 동안 과장강도를 측정하였다.

#### 4) 고세대계통의 생산력검정예비시험

육성 중인 KR93007(Sakita/진부찰벼) 조합은 고 항산화 활성을 목적으로 선발해온 것은 아니지만 일부 계통이 특이한 왕겨 및 종피색 (gold hull and pericarp)을 보여 2계통을 2002년도에 생산력검정 예비시험에 공시하였다. 2003년에는 고 항산화 활성을 목적으로 육성해 온 3조합 7계통을 gold hull계통과 함께 생산력검정포장에 재배 중에 있다.

생산력검정시험에 공시될 계통들은 종자소독 후 해마다 4월 30일에 파종하고 5월 30일에 포장에 이양하였다. 재식거리는 30x15cm, 주당재식묘수는 3본으로 하여 계통당 5열씩, 난괴법 2반복으로 포장배치하여 이양하였다. 시비량은 10a당 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-7-8 kg 수준이었고, 시비방법, 물관리, 잡초 및 병해충 방제는 중부지방 관행을 따랐다.

#### 나. 잡종집단에서 현미의 색도와 C3G함량의 유전분리

##### 1) 실험재료

벼 종실의 흑자색 종피에 축적되어 있는 항산화물질 C3G함량과 색도의 F<sub>2</sub>에서의 분리 양상을 밝히기 위해서 흑자색/흑자색 종피 5조합(흑진주벼/밀양153호, 흑진주벼/수원425호, 흑진주벼/연농흑1호, 흑미H31/흑진주벼, HeiBao/흑진주벼), 흑자색/적색 종피 2조합(흑진주벼/자진), 흑진주벼/적색찰), 그리고 흑자색/담황색 종피 2조합(흑진주벼/거대배, 아랑향찰/흑진주벼)에 대한 F<sub>2</sub> 개체별 C3G함량과 현미색도를 조사하였다.



현미색도와 C3G함량의 F<sub>3</sub>에서의 유전분리를 보기 위해서는 흑자색/흑자색 종피 2조합(흑진주벼/수원425호, 흑진주벼/밀양153호)과 흑자색/담황색 종피 4조합(흑진주벼/거대배, 아랑향찰/흑진주벼, 향미찰/충북흑미, 아랑향찰/충북흑미)의 F<sub>3</sub>집단을 실험재료로 이용하였다. 실험재료로 사용한 F<sub>3</sub> 집단은 F<sub>2</sub>에서 집단채종하여 세대를 진전시킨 것이다.

## 2) 재배법 및 조사방법

실험재료인 잡종집단은 2000년과 2001년도 포장에 나누어 재배되었다. 2000년에는 9교배조합의 F<sub>2</sub> 집단을 4월 29일에 파종하고, 6월 3일 포장에 30x15cm 간격, 1주1본식으로 이양하였다. 2001년에는 6교배조합의 F<sub>3</sub> 집단을 5월 1일에 파종하고, 6월 3일 포장에 F<sub>2</sub>와 같은 재식거리로 이양하였다. 2000년과 2001년 모두 실험포장의 시비량은 질소, 인산, 칼리를 10a당 성분량으로 각각 11kg, 7kg, 8kg로 하였고, 질소비료는 기비와 2회의 추비, 인산비료는 전량기비, 그리고 칼리비료는 기비와 1회추비로 나누어 사용하였다. 물관리, 잡초방제 및 병해충방제는 중부지방 관행방법을 따라 수행하였다.

잡종개체별 현미 종피의 색도는 색도계(Chroma meter, 미놀타)를 이용하여 L, a, b값을 조사했으며, 현미의 C3G함량은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 즉 현미시료 1g에 추출용매(95% 메탄올과 0.1% HCl을 85:15의 비율로 혼합) 5ml를 넣은 후 4℃에 24시간 보관하면서 C3G를 추출하였다. 추출액 중 1ml를 취하여 추출용매 9ml와 잘 섞은 후 528nm에서 흡광도를 측정하였다. C3G함량은 미리 확립한 표준곡선에 의하여  $\langle(\text{흡광도} - 0.0018)/4.68557\rangle \times 50$ 으로 계산하였다.

## 다. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율

### 1) 실험재료

잡종집단에서 현미의 C3G함량을 대상으로 선발했을 때의 선발효과를 조사하기 위해서 2 교배조합의 잡종집단을 실험재료로 사용하였다. 첫 번째 재료집단은 흑진주벼/진부찰 조합의 F<sub>3</sub>와 F<sub>4</sub> 집단인데, F<sub>3</sub> 개체별로 조사한 C3G함량이 10mg/g 이상인 개체군과 3~9.9mg/g인 개체군을 구분하여 F<sub>4</sub> 집단을 조성하여 재배한 후 두 집단의 C3G함량 분포를 비교하였다.

두 번째 재료집단은 흑남벼/거대배 조합의 F<sub>3</sub>와 F<sub>4</sub> 집단으로, F<sub>3</sub>에서 종피에 색이 있고 거대배가 분리되는 개체군, C3G함량이 낮고 배가 정상인 개체군, C3G함량이 낮고 거대배가 분리되는 개체군, C3G함량이 높고 배가 정상인 개체군, C3G함량이 높고 거대배가

분리되는 개체군 등 5집단을 만들어 F<sub>4</sub>에서 각각 집단재배한 후 개체별 C3G함량 분포를 비교토록 하였다.

또 항산화 활성에 대한 개체선발 효율을 검증하기 위해서 안산벼/가위찰 조합의 F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> 집단과 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> 집단 또는 계통을 대상으로 SOD 및 ESR 파장강도에 근거한 개체선발과 후대검정을 수행하였다.

2) **재배법 및 조사방법** : 실험재료의 재배방법, C3G함량분석, SOD활성검정 및 ESR 파장강도 측정방법은 앞의 계통육성에서 사용한 방법과 같았다.

#### 라. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발

1) **실험재료** : 현미의 C3G함량에 대한 선발지표로서 색도계로 조사한 L, a, b값의 유용성을 알기 위해서 계통육성에 사용된 교배조합의 F<sub>3</sub> 이후 집단 대부분을 재료로 사용하였고, ESR파장강도에 의한 항산화 활성의 선발지표와 분자표지를 개발하는 데에는 안산벼/가위찰 조합의 F<sub>5</sub> 계통과 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>6</sub> 계통을 실험재료로 사용하였다.

2) **재배법 및 조사방법** : 실험재료의 재배방법, C3G함량분석, 현미색도측정 및 ESR 파장강도 측정방법은 앞의 계통육성에서 사용한 방법과 같았다.

가) **DNA추출** : 분자표지개발을 위한 DNA 추출은 Tai 등(1990)의 방법을 일부 변경한 20% SDS(sodium dodecyl sulfate)법을 이용하였다. 실험재료 계통의 잎을 분얼최성기에 채취한 후 생엽 5g을 막자사발에 넣고 조직이 녹지 않도록 액체질소를 공급하면서 곱게 갈아 15ml cap tube에 넣은 다음 DNA extraction buffer (5M NaCl 100ml, 1M Tris-HCl(pH8.0) 100ml, 0.25M EDTA 200ml, 20% SDS 62.5ml, Sodium bisulfite 0.38g/buffer 100ml) 6ml를 첨가한 뒤 65°C water bath에 20분간 넣어 두었다. 여기에 동량의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)액을 넣고 20분 정도 흔들어 준 뒤 4°C 원심분리기에서 3,000rpm으로 30분간 원심분리시켰다.

새 tube에 상등액만 따라낸 후 2배의 에탄올이나 2/3 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA가 엉기게 하였다. 엉긴 DNA를 파스퇴르 피펫으로 건져내어 냉동 보관한 70% 에탄올에 세척하여 1.5ml tube로 옮긴 뒤 air dry 시켰다. DNA가 건조되면 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.4) 300 $\mu$ l에 DNA를 녹이고 50~60°C 항온기에 넣어 DNase를 제거시키고 RNase(1mg/ml) 4 $\mu$ l를 넣어 잘 흔들어 준 후 37°C에 1시간 정도 보관하여

RNAse를 제거하였다.

위와 같은 방법으로 추출한 DNA는 농도를 알고 있는  $\lambda$ DNA를 대비시켜 농도를 측정하였으며, 농도를 측정한 원액DNA는  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하고, 실험을 위해 원액DNA를 일정 농도로 희석한 다음 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**나) SSR 분석** : 벼의 12개 염색체 각각에 고르게 분포하고 있는 총 101개의 RM primer를 선발하여 마커로 사용하였다. PCR mixture는 40ng genomic DNA, 10mM Tris-HCl(pH9.0), 40mM KCl, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 250 $\mu\text{M}$  dNTP, 4pmole each primer, 1unit Taq DNA polymerase가 포함되었으며, 총 반응용액은 20 $\mu\text{l}$ 로 하였다. PCR 조건은 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems사)을 이용하여 초기 DNA변성은  $95^{\circ}\text{C}$  5분, DNA변성  $95^{\circ}\text{C}$  1분, annealing  $55^{\circ}\text{C}$  1분, DNA extension  $72^{\circ}\text{C}$  2분으로 36 cycle을 실행했으며, 최종 DNA extension은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 실행하였다. SSR product는  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 denaturation한 후에 7M urea를 포함한 4.0% denature polyacrylamide gel로 전기영동한 후 silver staining하여 band를 확인하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 고 항산화 활성 계통육성

##### 1) 잡종집단 및 계통육성

본 연구과제가 수행된 지난 3년간(2000. 7~2003. 7) 고 항산화 활성 벼 계통육성을 위해서 12조합의 인공교배를 수행하고, 16교배조합의  $F_1$ 을 양성하여 앞으로 사용할 고 항산화 활성 육종재료를 꾸준히 육성하였다. 그러나 본 연구의 주 대상이 된 잡종집단은 연구가 시작된 2000년의 육종포장에 재배되고 있던  $F_2$  이후의 잡종집단 및 계통이었다. 2000년에 육종포장에 재배되었던  $F_2$  집단은 그 동안 포장 및 실내선발과정을 거쳐 2003년 현재  $F_5$  집단 또는 계통으로, 그리고 2000년에  $F_3$  및  $F_4$  집단 또는 계통으로 재배되었던 육종재료는 2003년 에  $F_6$  및  $F_7$  계통으로 재배되고 있다.

결국 2003년 육종포장에 재배되고 있는  $F_5$  이후의 고 항산화 활성 집단과 계통이 본 연구기간 중 포장재배, 포장선발 및 실내선발과정을 거쳐 육성·개발한 육종소재인 셈이다. 그동안 개발한 육종소재는 항산화 물질인 Cyanidine-3-Glucoside (C3G)를 다량 함유하고

집단과 계통, SOD 및 ESR과장강도로 선발한 고 향산화 활성 계통, 거대배(giant embryo) 이면서 C3G함량이 높은 계통, 그리고 종피색과 방향성을 결합한 집단 및 계통으로 구분할 수 있다. 2003년 육종포장에 재배되고 있는 F<sub>4</sub> 이후 육종소재의 주요 특성을 보면 표 3-2와 같다.

표 3-2. 연구기간 중 육성·개발된 F<sub>4</sub> 이후 고 향산화 활성 집단과 계통

세대	교배조합	2003포장재배		주요특성	이용 방향	교배 년도
		집단수	계통수			
F <sub>4</sub>	흑미H31/KR92009//KR92021	1		C3G, 방향성	중간모본	2000
	상남밭벼/거대배	1		거대배, ESR	중간모본	1999
F <sub>5</sub>	아랑향찰/흑진주벼	1		C3G, 방향성	실용화*	1999
	향미찰/충북흑미	1		방향성, C3G	실용화	1999
	아랑향찰/충북흑미	1		방향성, C3G	실용화	1999
	흑진주벼/밀양153호		50	고 C3G함량	실용화	1999
	흑진주벼/수원425호		50	고 C3G함량	실용화	1999
	흑진주벼/거대배		30	거대배, C3G	실용화	1999
	F <sub>6</sub>	안산벼/가위찰		42	ESR과장강도	중간모본
F <sub>7</sub>	흑남벼/가위찰		36	ESR과장, C3G	중간모본	1997
	흑남벼/거대배		81	C3G, 거대배	실용화	1997
	흑진주벼/진부찰벼		18	고 C3G함량	실용화	1996

\* 실용화 및 중간모본이용 가능 교배조합

표 3-3. 현미의 C3G함량이 특별히 높은 F<sub>5</sub>계통

2002 no.	계통명	C3G함량,mg/g		2002 no.	계통명	C3G함량,mg/g	
		2001	2002			2001	2002
7201	흑진주벼	18.8	35.8	7204	흑진주벼	18.6	31.4
7202	밀양153호	6.3	14.4	7205	수원425호	3.4	4.2
7236	KR99002-B-49-3	47.6	43.3	7206-5	KR99003-B-B-5	>20	40.0
7237	KR99002-B-66-3	41.8	47.3	7206-9	KR99003-B-B-9	>20	41.5
7238	KR99002-B-69-3	41.8	39.0	7206-10	KR99003-B-B-10	>20	39.4
7203-19	KR99002-B-B-19	>30	38.9	7206-23	KR99003-B-B-23	>20	42.3
7203-23	KR99002-B-B-23	>30	37.0	7206-39	KR99003-B-B-39	>20	39.7
7203-28	KR99002-B-B-28	>30	37.6	7206-43	KR99003-B-B-43	>20	48.8
7203-33	KR99002-B-B-33	>30	36.3	7206-45	KR99003-B-B-45	>20	39.7
7203-48	KR99002-B-B-48	>30	35.9	7206-46	KR99003-B-B-46	>20	40.8
7203-51	KR99002-B-B-51	>30	38.3	7206-48	KR99003-B-B-48	>20	41.3
7203-58	KR99002-B-B-58	>30	39.4	7206-49	KR99003-B-B-39	>20	41.9

현미의 C3G함량이 지금까지 국내에서 재배되고 있는 그 어떤 품종보다 특별히 높아 항산화 활성이 뛰어날 것이 예상되는 계통이 흑진주벼/밀양153호 조합과 흑진주벼/수원425호 조합에서 발견되어(표 3-3), 이 F<sub>5</sub> 계통들에 대해서는 앞으로 계속 검토하여 실용품종으로 육성할 예정이다. 이 계통들의 교배친인 흑진주벼는 지금까지 국내에서 재배된 품종 중에서 C3G함량이 가장 높은 품종으로 알려져 있었는데, 이 품종보다 C3G함량이 20~30% 더 많은 계통이 다수 선발되었음은 본 연구의 커다란 성과로 볼 수 있다.

흑자색 종피를 가진 현미에 다량 함유되어 있는 안토시아닌 구성물질 C3G가 항산화 활성을 가지고 있음은 이미 잘 알려져 있는데 표 3-4에서도 흑자색 종피를 가진 계통 중에 ESR과장강도로 측정된 항산화 활성지수가 높은 것으로 보아 고 항산화 활성 쌀을 개발코자할 때 C3G함량이 높은 계통을 선발할 필요가 있다고 본다. 개발된 고 C3G함량 계통 중 일부는 2003년도 생산력검정예비시험 포장에 재배 중에 있으며 2~3년 내에 실용화 품종으로 등록할 수 있을 것으로 전망된다.

또 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>7</sub> 계통 중에는 ESR과장강도로 조사한 항산화 활성이 특별히 높았던 계통이 발견되어(표 3-4, 그림 3-1) 이들을 중간모본으로 이용하거나 실용품종으로 육성시킬 수 있다고 판단하였다. 이 결과는 육성 중인 계통에 대하여 항산화 활성을 조사하고 그 것이 높은 계통을 선발한 최초의 기록이 될 것으로 생각한다. 표 3-4에 제시한 계통들은 흑남벼/가위찰 교배조합의 후대 계통으로 모두 종피색이 흑자색이며 C3G함량도 높은 편이다.

표 3-4. ESR과장강도로 측정된 고 항산화 활성 F<sub>7</sub>계통

2002 no.	교배조합	항산화활성지수			C3G mg/g	2002 no.	교배조합	항산화활성지수			C3G mg/g
		원액*	20x	40x				원액	20x	40x	
8701	흑남벼	85.7	39.3	13.2	7.2	8710-3	KR97004	91.4	75.6	71.4	28.0
8702	가위찰	33.5	-	-	0.3	8712-1	KR97004	86.3	80.1	71.7	34.5
8706-4	KR97004	90.5	74.7	65.3	26.6	8713-5	KR97004	86.3	81.9	66.2	40.0
8707-1	KR97004	90.6	68.2	61.5	24.2	8714-1	KR97004	90.4	82.9	72.4	36.0
8708-3	KR97004	86.3	79.4	70.8	29.8	8714-2	KR97004	86.8	84.3	77.3	36.1

\* : 현미추출원액, 20배 희석액 및 40배 희석액

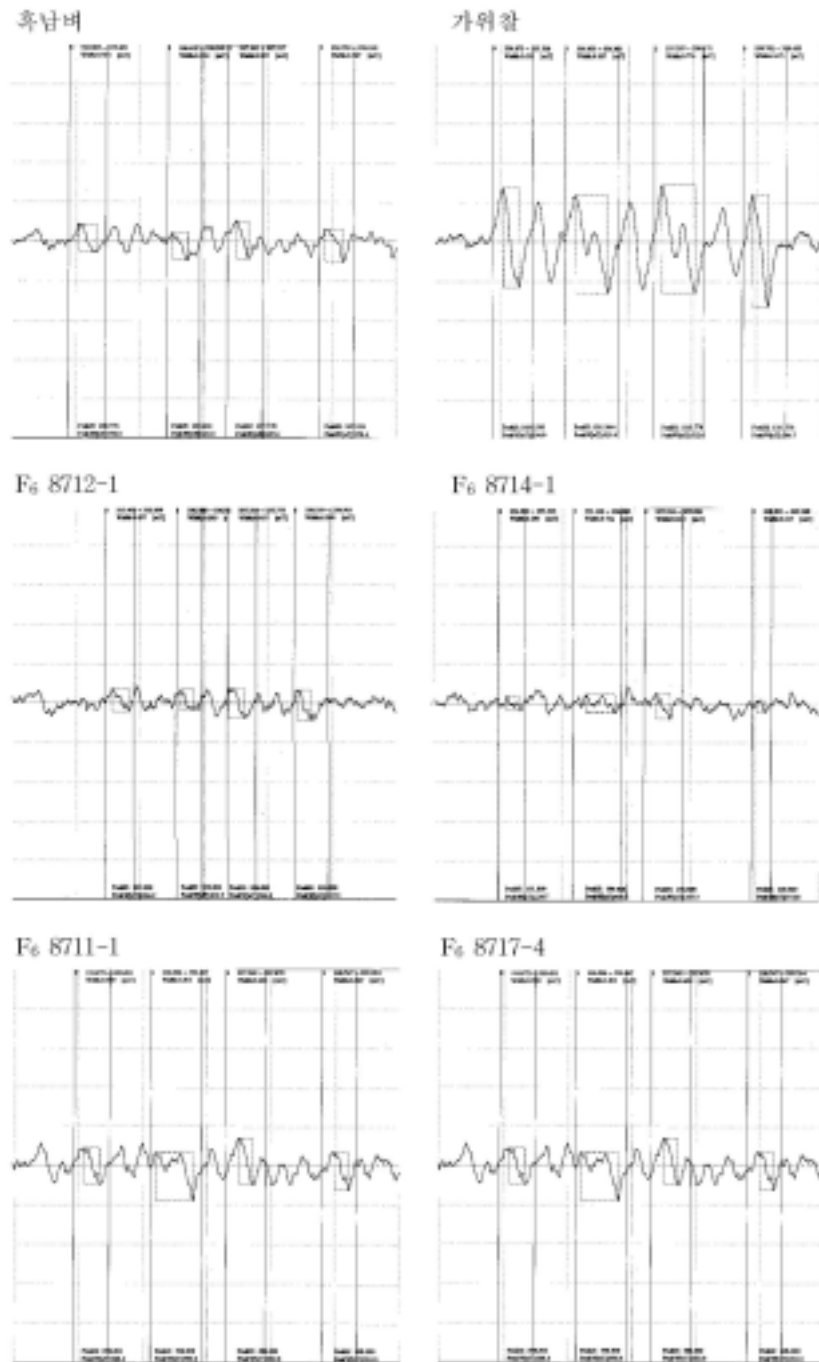


그림 3-1. 흑남벼/가위찰 조합의 교배친과 F6 개체간 ESR 파장강도의 차이

- 파장의 높낮이가 적을수록 항산화 활성이 높은 것으로 평가함.

이들 계통의 현미가루를 PVP가 첨가된 효소추출 완충용액에서 추출한 원액과 이 원

액을 증류수로 20배, 40배로 희석한 용액을 시료로 각각 ESR과장강도를 측정하고 항산화 활성지수를 계산하여 교배친과 비교한 결과 원액으로 ESR과장강도를 조사한 경우에는 교배친 중 흑남벼도 높은 항산화 활성지수를 보여 육성중인 계통과 큰 차이가 없었지만 20배 또는 40배로 희석하여 조사한 경우에는 흑남벼보다 항산화 활성지수가 훨씬 높은 계통들을 선발할 수 있었다. 이렇게 선발된 계통 중 3계통은 2003년도 생산력검정예비시험 포장에 공시되어 생산력과 수확물의 항산화 활성에 대한 세밀한 검토가 이루어지고 있다.

한편 현미의 C3G함량도 높고 거대배인 계통선발을 목적으로 한 교배조합이 흑진주벼/거대배 조합과 흑남벼/거대배 조합이다. 2003년 포장에 흑진주벼/거대배 조합의 F<sub>5</sub> 계통과 흑남벼/거대배 조합의 F<sub>7</sub> 계통이 재배되고 있다. 거대배와 종피색이 동시에 분리하고 있는 잡종집단에서 거대배 개체 또는 계통은 정상적인 것에 비해서 C3G함량이 낮은 것이 일반적인 현상이다. 그러나 2002년도 포장에서 수확한 잡종개체 또는 계통 중에는 거대배이면서도 C3G함량이 높은 것들이 발견되었고, 이 들 중 2개의 F<sub>7</sub> 계통은 2003년도 생산력검정포장에 재배하고 있어 실용화 가능성이 높은 것으로 예측된다(표 3-5). 특히 선발된 개체들의 C3G함량이 각 교배조합의 고C3G함량 교배친인 흑진주벼 또는 흑남벼보다 월등히 높아 이들에 대해서는 큰 기대를 걸고 있다. 그러나 거대배 계통은 모판에서의 발아율 및 성묘율이 낮고 이앙 후 활착율이 떨어지는 문제점을 보이고 있어 이를 개선할 방법이 별도로 모색되어야 할 것으로 판단하였다.

표 3-5. 현미 C3G함량이 높고 거대배인 유망 계통

2002 no.	교배조합	세대	C3G mg/g	거대배 여부	비고	2002 no.	교배조합	세대	C3G mg/g	거대배 여부	비고
7207	흑진주벼		28.0	-		8766	흑남벼		13.4	-	
7208	거대배		0.4	+		8820	거대배		0.3	+	
7209-24	KR99004	F <sub>5</sub>	26.4	+	유망	8805	KR97008	F <sub>7</sub>	25.6	+	생검
7209-47	KR99004	F <sub>5</sub>	36.9	+	"	8829	KR97008	F <sub>7</sub>	22.7	+	유망
7209-49	KR99004	F <sub>5</sub>	37.0	+	"	8833	KR97008	F <sub>7</sub>	21.0	+	"
7209-53	KR99004	F <sub>5</sub>	29.5	+	"	8834	KR97008	F <sub>7</sub>	26.3	+	"
7209-76	KR99004	F <sub>5</sub>	32.3	+	"	8835	KR97008	F <sub>7</sub>	27.2	+	"
7209-77	KR99004	F <sub>5</sub>	29.4	+	"	8836	KR97008	F <sub>7</sub>	22.9	+	"
7209-86	KR99004	F <sub>5</sub>	24.0	+	"	8872	KR97008	F <sub>7</sub>	23.6	+	"
7209-90	KR99004	F <sub>5</sub>	35.3	+	"	8874	KR97008	F <sub>7</sub>	27.6	+	"
7209-95	KR99004	F <sub>5</sub>	21.7	+	"	8875	KR97008	F <sub>7</sub>	27.9	+	"
7209-110	KR99004	F <sub>5</sub>	28.6	+	"	8877	KR97008	F <sub>7</sub>	37.1	+	"

## 2) 고세대계통의 생산력검정예비시험

육성 중인 KR93007(Sakita/진부찰벼) 조합은 고 향산화 활성을 목적으로 선발해 온 것은 아니지만 일부 계통이 특이한 왕겨 및 종피색 (gold hull and pericarp)을 보여 2계통을 2002년도에 생산력검정 예비시험에 공시하였다. 성숙기에 수확하여 정조수량을 조사한 결과 2계통 중 1계통은 대비품종인 화선찰(407kg/10a)이나 진부찰(360kg/10a)보다 더 높은 433kg/10a의 생산성을 보여 더 정밀한 검토를 할 필요가 있다고 판단하였다.

2003년에는 고 향산화 활성을 목적으로 육성해 온 3조합 7계통을 gold hull계통과 함께 생산력검정포장에 재배 중에 있다(표 3-6). 이들의 특성을 보면 향산화 물질 C3G함량이 아주 높은 2계통, ESR과장강도로 평가한 향산화 활성이 아주 높은 3계통, 거대배이면서 C3G함량이 높은 2계통, 그리고 gold hull 2계통이다. 이 계통의 포장에서의 생산성과 생산물의 기능성을 앞으로 2년 이상 정밀하게 평가해야 이들의 실용화 여부를 판단할 수 있을 것이다.

표 3-6. 2003년 생산력검정예비시험 중에 있는 계통의 주요 특성

교배조합	세대	계통수	주요 특성
흑진주벼/밀양153호	F <sub>5</sub>	2	양친보다 C3G함량이 더 많음, 출수기 및 초형양호
흑남벼/가위찰	F <sub>7</sub>	3	ESR과장강도로 평가한 향산화활성 지수가 높음
흑남벼/거대배	F <sub>7</sub>	2	거대배이면서 C3G함량이 높음
Sakita/진부찰벼	F <sub>10</sub>	2	Gold hull & pericarp, Gold hull & red pericarp

### 나. 잡종집단에서 현미의 색도와 C3G함량의 유전분리

벼 종실의 흑자색 종피에 축적되어 있는 향산화물질 C3G함량과 색도의 F<sub>2</sub> 및 F<sub>3</sub>에서의 분리양상을 밝히기 위해서 흑자색/흑자색 종피 5조합, 흑자색/적색 종피 2조합, 흑자색/담황색 종피 2조합에 대한 개체별 C3G함량과 현미색도를 조사하였다. 흑자색 종피 품종간 교배조합의 F<sub>2</sub>에서의 C3G함량 분리양상을 보면 집단의 평균치를 중심으로 한 정규분포를 보여 C3G함량도 많은 유전자가 관여하는 양적형질임을 확인할 수 있었다.

교배조합별 분포의 특징을 보면 흑진주벼/밀양153호 조합과 흑진주벼/수원153호 조합에서는 양친보다 C3G함량이 월등히 많은 초월분리개체가 조사개체의 20% 이상 분리되었다. 흑진주벼/연농흑1호 조합 및 흑미H31/흑진주벼 조합에서도 양친보다 C3G함량이 많은 F<sub>2</sub>개체가 조사개체의 10%이상 출현하였다. 그러나 HeiBao/흑진주벼 조합에서는 초월분리개체가 출현하지 않아 교배조합간 분리양상에 차이가 컸다(표 3-7).



표 3-7. 현미 C3G함량의 잡종제2세대에서의 유전분리양상

교배조합	C3G함량									조사 개체 수	평균	CV (%)
	<1	1.01 ~10	10.01 ~20	20.01 ~30	30.01~ 40	40.01 ~50	50.01 ~60	60.01 ~70	70 <			
- 흑자색/흑자색 종피 -												
흑진주벼			30	19	1					50	19.55	24.14
밀양153호		6	4							10	8.67	35.89
수원425호		8	2							10	7.07	53.01
연농흑1호	1	9								10	2.35	35.10
흑미H31			8	1						9	16.80	22.19
HeiBao	1	9								10	1.31	34.36
흑진주/밀양153	1	13	31	61	47	33	8	4	1	199	29.79	45.69
흑진주/수원425	1	3	15	25	17	8	7	4	6	86	33.62	55.04
흑진주/연농흑1		40	74	74	45	11	2			246	21.68	49.77
흑미H31/흑진주		5	32	89	91	25	6			248	30.03	31.80
HeiBao/흑진주	2	54	23	11						90	9.96	71.13
- 흑자색/적색 종피 -												
흑진주벼		2	12	6						20	18.01	30.14
자진	10									10	0.08	48.42
적색찰벼	8									8	0.16	17.18
흑진주/자진	82	99	36	11	7	1				236	6.37	134.18
흑진주/적색찰	145	84	10	6	1					246	2.95	186.57
- 흑자색/담황색 종피 -												
흑진주벼		3	8	8						19	17.83	33.10
거대배	10									10	0.04	70.79
아랑향찰	10									10	0.05	109.19
흑진주/거대배	73	36	12	3						124	3.54	164.88
아랑향찰/흑진주	59	20	17	11	2		2	1		112	7.07	220.72

이와 같은 현상은 본 연구에서 사용한 교배친 중 C3G함량이 가장 높은 품종은 흑진주

벼였는데 이 품종과 교배된 흑자색 종피 교배친의 유전적 특성이 서로 달랐기 때문에 나타난 것으로 추정된다. 즉 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호 및 흑미H31는 흑진주벼가 가진 C3G관련 유전자와 상가적으로 작용하는 다수의 복수유전자를 가졌기 때문에 F<sub>2</sub>에서 다수의 초월분리개체가 출현하였고, 반면 HeiBao는 흑진주벼 유전자와 상가적으로 작용하는 복수유전자를 가지지 않았기 때문에 초월분리개체가 출현하지 않았다고 할 수 있다.

흑자색/적색 종피 교배조합의 F<sub>2</sub>에서는 C3G함량이 소수의 초월분리개체를 제외하고는 양친의 범위내에 분포하였다. 적색 종피 교배친들은 현미의 C3G함량이 아주 낮거나 검출이 되지 않았기 때문에 유전적으로 보면 흑자색 교배친과 공유할 수 있는 유전자가 없다고 볼 수 있다. 그러나 흑자색/적색 종피 교배조합에서 소수이지만 초월분리개체가 출현하였음은 적색종피 교배친도 흑진주벼가 가진 C3G관련 유전자와 함께 작용할 수 있는 복수유전자를 가지고 있음을 시사하고 있다.

또 흑자색/담황색 종피 교배조합 중 아랑향찰/흑진주벼 조합에서 C3G함량이 월등히 높은 소수의 개체가 출현하였음은 기대하지 않았던 결과이다. 이는 담황색 종피 교배친인 아랑향찰이 C3G관련 복수유전자를 가지고 있음을 뜻한다. 그러나 다른 하나의 담황색 종피 교배친인 거대배와의 조합에서는 초월분리개체가 출현하지 않아 거대배에는 C3G관련 복수유전자가 없음을 알 수 있었다.

F<sub>2</sub>에서의 현미색도의 유전분리양상을 보면 흑자색 종피를 가진 품종간 교배조합에서는 모든 잡종개체의 현미가 흑자색을 띄어 본 연구에서 교배친으로 사용한 흑진주벼와 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호, 흑미H31, HeiBao가 동일한 종피색 관련 유전자를 가졌음을 알았다. 현미색을 색도기의 L, a, b값으로 나타냈을 때에도 흑자색/흑자색 종피 교배조합의 F<sub>2</sub>에서는 모두 양친과 비슷한 색도값을 보여 육안으로 현미색을 조사한 결과와 일치하였다(표 3-8, 3-9).

한편 흑자색/적색 종피 조합과 흑자색/담황색 종피 조합의 F<sub>2</sub>에서는 육안으로 조사한 종피색이나 색도계로 조사한 L, a, b값 모두 다양한 변이를 나타냈다. 이들 조합의 F<sub>2</sub>에서는 흑자색 종피, 적색 종피, 담황색 종피 개체가 모두 출현하였고, 같은 종피색으로 구분되었더라도 개체간 색의 농담차이가 심하였다. 이와 같은 종피색의 농담차이가 색도계의 L, a, b값으로 나타나는데 흑자색/적색 종피의 2조합에서는 이들 색도를 나타내는 수치가 2정분포를 보였고 적색 또는 흑자색을 가르키는 색도가 상당히 많은 비율로 출현하였다.

표 3-8. 현미색도 L값의 잡종제2세대에서의 유전분리양상

교배조합	L값										조사 개체 수	평균	CV (%)	
	< 25	25.1~ 27	27.1~ 29	29.1~ 31	31.1~ 33	33.1~ 35	35.1 ~37	37.1~ 39	39.1 ~41	41.1 <				
- 흑자색/흑자색 중피 -														
흑진주벼	30	20									50	25.1	1.74	
밀양153호	2	8									10	25.1	0.92	
수원425호		9	1								10	26.4	1.81	
연농흑1호		10									10	26.0	1.72	
흑미H31	2	7									9	25.0	0.56	
HeiBao		9									9	25.4	0.38	
흑진주/밀양153	104	95									199	25.0	0.70	
흑진주/수원425		86									86	25.9	0.64	
흑진주/연농흑1	172	74									246	24.9	1.04	
흑미H31/흑진주	128	120									248	25.0	0.60	
HeiBao/흑진주	31	59									90	25.1	1.14	
- 흑자색/적색 중피 -														
흑진주벼	8	12									20	25.1	0.58	
자진			2	8							10	30.0	2.19	
적색찰벼					3	4	1				8	33.5	2.53	
흑진주/자진	26	119	34	28	8	3	2		2	14	236	28.0	16.2	
흑진주/적색찰		123	43	19	29	20					12	246	28.9	15.7
- 흑자색/담황색 중피 -														
흑진주벼		19									19	25.6	1.56	
거대배										10	10	42.7	1.44	
아량향찰										10	10	44.2	1.36	
흑진주/거대배	45	14	7	16	10	2	2	6	22	124	124	32.0	19.6	
아량향찰/흑진주	53	4	13	8		1				33	112	32.4	25.1	

표 3-9. 현미색도 b값의 잡종제2세대에서의 유전분리양상

교배조합	b값							조사 개체수	평균
	< 0	0.01 ~2.0	2.01 ~4.0	4.01 ~6.0	6.01~ 8.0	8.01~ 10	10.01 <		
-흑자색/흑자색 종피-								50	-0.73
흑진주벼	50								
밀양153호	9	1					10	-0.38	
수원425호	6	4					10	-0.03	
연농흑1호		10					10	0.64	
흑미H31	9						9	-0.63	
HeiBao	2	7					9	0.09	
흑진주/밀양153	197	2					199	-0.76	
흑진주/수원425	86						86	-0.85	
흑진주/연농흑1	236	10					246	-0.61	
흑미H31/흑진주	248						248	-0.78	
HeiBao/흑진주	85	5					90	-0.51	
- 흑자색/적색 종피 -									
흑진주벼	20						20	-0.68	
자진			2	8			10	4.83	
적색찰벼						7	1	8	8.92
흑진주/자진	91	63	29	30	8	15		236	1.84
흑진주/적색찰	37	85	37	26	35	19	10	246	3.28
- 흑자색/담황색 종피 -									
흑진주벼	19							19	-0.79
거대배						9	1	10	9.62
아량향찰							10	10	11.22
흑진주/거대배	38	21	2	10	16	25	12	124	4.23
아량향찰/흑진주	46	8	4	7	12	3	32	112	4.37

흑자색/적색 종피 조합의 F2집단에서 L값과 b값이 넓게 분포하여 담황색 현미와 비슷한 개체가 출현한 것은 흑자색과 적색 관련 유전자가 비대립관계를 보여준 결과이다. 현미의 종피가 적색으로 착색되는 것은 안토시아닌 생성유전자가 관여하는 경우와 비안토시아닌 관련 유전자가 관여하는 두 가지 경우가 있다. 본 연구에서 적색 교배친으로 사용한 품

종이 안토시아닌 생성 유전자를 가지고 있다면 흑자색 교배친과 한두쌍의 대립유전자를 가진 셈이 되어 담황색 현미와 비슷한 L값과 b값을 가진 후손이 출현하지 않을 것이다. 그러나 F<sub>2</sub>에서 담황색 종피 개체가 출현한 것으로 보아 자진벼와 적색찰은 서로 다른 종류의 종피색 관련 주동유전자를 가진 것으로 판단하였다. 또 흑자색/담황색 종피 2조합에서는 F<sub>2</sub> 개체별 L값(표 3-8)과 b값(표 3-9) 모두 3정분포를 보여 색도값이 소수의 주동유전자에 의해서 유전되고 있다고 볼 수 있었다. 그러나 a값은 L 및 b값과는 달리 2정분포를 보여 분리양상이 다르게 나타났는데 이는 교배친간 a값의 차이가 L 및 b값의 차이처럼 뚜렷하지 않았기 때문에 나타난 결과로 생각된다.

흑자색/흑자색 종피 2조합과 흑자색/담황색 종피 4조합의 F<sub>3</sub>에서 종피의 색도 및 C3G 함량을 조사한 결과는 표 3-10, 11, 12, 13에 정리되어 있다. 표 3-10, 11, 12에서 흑진주벼/수원425호 및 흑진주벼/밀양153호 조합은 양친의 현미가 모두 흑자색이므로 모든 F<sub>3</sub>개체의 현미 종피는 흑자색이었고, 색도계로 조사한 L값, a값, b값이 모두 낮은 쪽에 분포하고 있어 F<sub>2</sub>에서와 마찬가지로 이들 교배친의 종피색도에 관련된 유전자가 완전히 동일함을 확인시켜 주었다.

흑진주벼/거대배 및 아랑향찰/흑진주벼 조합은 양친의 현미가 흑자색과 담황색이었기 때문에 F<sub>3</sub>개체별 현미색은 흑자색과 담황색이 분리하였고 L값과 b값은 2정분포를 보였으나 a값은 단정분포를 보여 F<sub>2</sub>에서의 3정분포 및 2정분포와는 다른 양상을 보였다. 이는 F<sub>3</sub>에서 색도관련 유전자의 이형접합체의 비율이 줄어들기 때문에 표현형으로 나타난 색도의 분포비율이 달라진 것으로 추론된다.

흑자색 종피를 가진 충북흑미와 담황색 종피 품종 향미찰 및 아랑향찰과의 교배조합의 F<sub>3</sub>에서도 종피색은 분리하고 있었고, 색도계로 조사한 L값 및 b값이 분리되고 있었으나 흑진주벼 조합처럼 분리양상이 분명하지는 않았다. 이는 흑자색 종피 교배친으로 사용한 흑진주벼와 충북흑미의 색도(L, a, b값)차이 때문이며, 흑진주벼는 육안으로 보아도 충북흑미보다 훨씬 더 진한 흑자색을 보이고 있기 때문에 잡종후대에서 나타나는 종피색의 농담에 영향을 준 것으로 생각한다. 이는 유색미라 할지라도 현미 종피색의 농담차이가 있으며, 이것은 많은 연구자들이 보고한 색소관련 복수유전자의 성격과 수에 의한 것으로 해석된다. 결과적으로 흑자색 종피 품종의 색의 농담차이도 유전자에 의해서 지배되는 유전형질임을 보여준 결과이다.

표 3-10. 유색미 교배조합의 잡종제3세대집단에서 현미 색도의 분포 - L값

교배조합	L값										조사 개체수	평균	CV (%)
	> 25.0	25.1-27	27.1-29	29.1-31	31.1-33	33.1-35	35.1-37	37.1-39	39.1-41	41.1 <			
흑진주벼/수원425호	70	7	0	0	0	0	0	0	0	0	77	24.7	1.0
흑진주벼/밀양153호	73	5	0	0	0	0	0	0	0	0	78	24.7	0.9
흑진주벼/거대배	36	29	17	8	5	0	0	0	0	13	108	28.4	20.1
아랑향찰/흑진주벼	36	19	7	8	6	3	2	0	0	15	96	29.5	27.4
향미찰/충북흑미	0	0	0	0	2	1	0	4	4	38	49	43.6	42.7
아랑향찰/충북흑미	0	10	20	12	19	6	3	4	5	45	124	36.5	21.9

표 3-11. 유색미 교배조합의 잡종제3세대집단에서 현미 색도의 분포 - a값

교배조합	a값								조사 개체수	평균	CV (%)
	<0	0.01-1.00	1.01-2.00	2.01-3.00	3.01-4.00	4.01-5.00	5.01-6.00	6.01-7.00			
흑진주벼/수원425호	0	47	29	1	0	0	0	0	77	0.91	45.03
흑진주벼/밀양153호	0	45	30	3	0	0	0	0	78	0.97	43.50
흑진주벼/거대배	0	20	50	26	12	0	0	0	108	1.83	48.30
아랑향찰/흑진주벼	0	15	41	16	18	6	0	0	96	2.09	54.77
향미찰/충북흑미	0	9	29	7	3	1	0	0	49	1.51	51.50
아랑향찰/충북흑미	0	9	33	27	33	21	1	0	124	1.27	48.00

표 3-12. 유색미 교배조합의 잡종제3세대집단에서 현미 색도의 분포 - b값

교배조합	b값								조사 개체수	평균	CV (%)
	-1.00 ~ -1.00	1.01 ~ 3.00	3.01 ~ 5.00	5.01 ~ 7.00	7.01 ~ 9.00	9.01 ~ 11.0	11.01 ~ 13.0	11.0 ~ 13.0			
흑진주벼/수원425호	77	0	0	0	0	0	0	0	77	-0.55	64.31
흑진주벼/밀양153호	78	0	0	0	0	0	0	0	78	-0.60	44.86
흑진주벼/거대배	57	10	18	8	5	10	0	0	108	2.40	140.5
아랑향찰/흑진주벼	48	7	8	9	7	14	3	0	96	3.40	176.4
향미찰/충북흑미	0	1	0	0	1	21	26	0	49	10.87	10.68
아랑향찰/충북흑미	2	14	13	14	27	13	41	0	124	8.06	43.06

향산화기능을 가지고 있는 C3G함량을 개체별로 조사하여 정리한 것이 표 3-13에 제시

되어 있다. 표 3-13에서 사용한 교배친 중에서 C3G함량이 가장 높은 품종이 종피가 진한 흑자색인 흑진주벼이고, 흑자색 종피를 가진 밀양153호와 수원425호도 비교적 높은 C3G함량을 보였으나, 충북흑미는 종피가 흑자색이지만 C3G함량은 낮은 편이었다. 종피가 담황색인 거대배, 아랑향찰 및 향미찰은 C3G함량이 0에 가까운 특성을 보였다.

표 3-13. 유색미 교배조합의 잡종제3세대집단에서 현미 C3G함량의 분포

교배조합	C3G함량										조사 개체 수	평균	CV (%)
	<1	1.0 ~5	5.1 ~10	10.1 ~15	15.1 ~20	20.1 ~25	25.1 ~30	30.1 ~35	35.1 ~40	40.1 <			
흑진주벼/수원425호	0	14	19	20	14	7	3	0	0	0	77	11.91	57.85
흑진주벼/밀양153호	0	2	9	14	11	13	11	7	5	6	78	23.30	50.78
흑진주벼/거대배	48	29	17	4	1	0	0	0	0	0	99	2.33	131.6
아랑향찰/흑진주벼	39	26	14	6	6	2	0	0	0	0	93	4.68	127.6
향미찰/충북흑미	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	0.15	0.17
아랑향찰/충북흑미	121	3	0	0	0	0	0	0	0	0	124	0.25	213.0

C3G함량이 높은 품종간에 교배시킨 흑진주벼/수원425호 및 흑진주벼/밀양153호 조합의 F<sub>3</sub> 개체들은 C3G함량이 넓게 분포하여 평균적으로도 높은 C3G함량을 보였으며, 흑진주벼보다도 그 함량이 높은 초월분리개체도 상당수 출현하였다. 이는 F<sub>2</sub>에서와 같은 결과로서 두 교배친의 안토시아닌 생성관련 다수의 유전자가 상가적으로 작용하여 나타난 결과로 해석된다. 특히 흑진주벼/밀양153호 조합에서는 C3G함량이 아주 높은 개체가 많이 출현하여 이 조합은 항산화기능이 높은 계통육성이 기대되는 교배조합이라 할 수 있다.

한편 C3G함량이 높고 동시에 씨눈이 매우 큰 계통육성을 기대하고 있는 흑진주벼/거대배 조합의 F<sub>3</sub>에서는 대부분의 개체가 C3G함량이 흑진주벼보다 낮은 결과를 보였다. 이는 거대배 유전자를 가진 개체에서 수확한 현미에 안토시아닌이 축적되지 않는 씨눈의 비율이 상대적으로 증가했기 때문에 나타난 결과이다. 그러나 이 교배조합에서도 후대검정을 계속 하면서 원래의 육종목표에 부합하는 계통을 계속 찾을 수 있을 것으로 기대하고 있다. 또 충북흑미는 종피가 흑자색이지만 C3G함량이 낮은 편이었는데 이 품종을 교배친으로 사용한 교배조합의 F<sub>3</sub>집단에서 C3G함량이 높은 개체가 하나도 출현하지 않은 것으로 보아 충북흑미는 항산화기능 개량을 위한 유전자원으로 사용할 가치가 낮은 것으로 판단되었다.

## 다. C3G함량과 항산화 활성에 대한 선발효율

### 1) C3G함량의 선발효율

흑진주벼/진부찰벼 조합의 F<sub>3</sub>에서 C3G함량이 높았던 개체와 중간 정도였던 개체를 각각 분리하여 선발하여 조성한 F<sub>4</sub> 집단을 비교한 결과 표 3-14와 같이 두 집단의 C3G함량 분포에 큰 차이가 있음을 발견하였다. F<sub>3</sub>에서 C3G함량이 높았던 개체만을 선발하여 조성한 F<sub>4</sub> 집단에서는 전 개체의 85% 정도가 14mg/g이상의 C3G함량을 보였고 집단평균치도 23.7 mg/g이었으나, C3G함량이 중간 정도였던 개체들의 후대인 F<sub>4</sub> 집단에서는 평균치가 9.2mg/g 이었고 모든 계급에 걸쳐 고루 분포하는 양상을 보였다.

표 3-14. F<sub>3</sub>에서 C3G함량으로 선발한 F<sub>4</sub>집단의 C3G함량 분포

집단내용 (선발내용)	C3G함량, mg/g								총 조사 개체수	평균 mg/g	CV %
	0.01 -2	2.01 -4	4.01 -6	6.01 -8	8.01 -10	10.01 -12	12.01 -14	14.01 <			
C3G 높음(F <sub>3</sub> )	14	1	2	2	3	6	9	206	243	23.7	64.5
C3G 중간(F <sub>3</sub> )	66	17	10	21	19	20	25	67	245	9.2	82.1

이처럼 두 집단 C3G함량 분포에 확실한 차이가 있는 것은 현미의 C3G함량이 소수의 주동유전자와 다수의 복수유전자에 의해서 결정되기 때문이라 볼 수 있다. 즉 F<sub>3</sub>에서 C3G함량이 높은 개체를 선발하여 조성한 F<sub>4</sub>에서는 대부분 C3G함량이 높았지만 hetero형에서 분리된 6% 정도의 개체는 C3G함량이 0에 가까운 것이 출현하였고, F<sub>3</sub>에서 유전적으로 hetero 이었기 때문에 C3G함량이 중간계급이었던 집단은 유전자형 분리가 심하게 나타났기 때문에 최저치와 최고치 계급을 제외하고는 비교적 많은 개체들이 골고루 분포하였다고 볼 수 있다. C3G함량에 대한 유전적인 해석의 합리성 여부를 떠나서 F<sub>3</sub>에서 C3G함량에 대한 개체선발의 효과가 크게 나타났음은 육종적으로는 꼭 다행스러운 일이다.

표 3-15의 결과는 흑남벼/거대배 조합의 F<sub>3</sub>에서 C3G함량과 씨눈의 크기에 따라 5종류로 선발하여 조성한 F<sub>4</sub> 집단의 C3G함량 분포이다. 즉 F<sub>3</sub>에서 무선발(3363), C3G함량이 낮은 개체군(3364-보통배, 3365-거대배), C3G함량이 높은 개체군(3366-보통배, 3367-거대배)로 구분하여 형성한 F<sub>4</sub> 집단의 C3G함량을 조사한 것이다. F<sub>3</sub>에서 선발하지 않고 집단 채종하여 조성한 F<sub>4</sub> 집단에 비하여 C3G함량이 높거나 낮은 쪽으로 선발한 집단의 분포가 크게 다른 것으로 보아 C3G함량에 대한 선발의 효과는 크다고 볼 수 있다.



즉 집단번호 3364와 3365의 C3G함량은 대부분 2mg/g 이하였고 집단평균치도 0.10 및 0.19mg/g이었지만, 집단번호 3366과 3367에 속한 F<sub>4</sub> 개체들의 C3G함량은 20mg/g이 넘는 개체를 포함하여 여러 계급에 걸쳐 분포하였고 집단평균치도 4.61 및 3.35mg/g으로 선발의 효과가 컸다고 할 수 있다. 따라서 잡종초기세대인 F<sub>3</sub>에서 C3G함량에 대한 개체선발은 효과가 있는 것으로 결론지을 수 있었다. 한편 거대배와 보통의 씨눈을 가진 집단을 비교하면 C3G함량이 낮았던 3364와 3365 집단간에는 차이가 없었으나, C3G함량이 높았던 3366과 3367 집단간에는 분포와 평균치간에 차이가 있어 거대배 집단의 C3G함량이 평균적으로 낮았다. 배 즉, 씨눈에는 안토시아닌이 축적되지 않기 때문에 현미에서 차지하는 씨눈의 비중이 커지면 C3G함량이 낮아지는 것은 당연한 현상이다. 그래도 거대배인 3367 집단에 C3G함량이 14mg/g 이상인 개체가 출현하고 있어 육종에서 기대하고 있는 거대배와 고C3G함량의 조합은 가능할 것으로 기대하고 있다.

표 3-15. F<sub>3</sub>에서 거대배 유무와 C3G함량으로 선발한 F<sub>4</sub>집단의 C3G함량 분포

집단 내용	C3G함량, mg/g									총 조사 개체수	평균	CV (%)
	<0	0.01 -2	2.01 -4	4.01 -6	6.01 -8	8.01 -10	10.01 -12	12.01 -14	14.01 <			
3363: 무선발	0	128	42	18	3	4	3	1	3	202	2.16	136.63
3364: 낮음, 보통배	1	134	1	0	0	0	0	0	0	136	0.10	299.57
3365: 낮음, 거대배	3	78	0	0	0	0	0	0	0	81	0.19	174.84
3366: 높음, 보통배	0	65	28	16	6	12	10	6	10	153	4.61	110.82
3367: 높음, 거대배	0	54	22	14	7	3	3	2	2	107	3.35	102.03

## 2) 항산화 활성에 대한 선발효과

F<sub>3</sub>에서 항산화 활성의 하나의 지표인 ESR 과장강도 및 SOD활성의 선발효과를 검증하기 위하여 안산벼/가위찰 조합의 F<sub>3</sub>와 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>4</sub>에서 선발한 개체별로 ESR 및 SOD활성을 조사하였다. 안산벼/가위찰 조합의 F<sub>3</sub> 집단에서는 ESR과장강도가 안정적이어서 항산화 활성이 높을 것으로 기대한 17개체를 선발하여 F<sub>4</sub> 계통으로 재배하고, 포장에서 생육상태와 초형에 근거하여 7계통 25개체를 선발하였다. 선발된 개체별 ESR과장강도를 조사한 결과 각 계통에서 1~2개씩 총 9개체의 항산화 활성이 높았다.

이 9개체의 후대인 F<sub>5</sub> 계통을 재배하고, 계통별로 3~10개체씩 선발하여 이들의 ESR

과장강도를 조사하였다. 이들의 ESR 과장강도를 조사하여 항산화 활성지수를 비교한 결과 고 항산화 활성 교배친인 안산벼와 비슷하거나 더 높은 지수를 보인 계통이 발견되었다(표 3-16). 결국 F<sub>3</sub>와 F<sub>4</sub> 2세대에 걸쳐 SOD활성 또는 ESR 과장강도에 의한 개체선발의 효과는 나타난 셈이다.

표 3-16. SOD활성과 ESR과장강도로 선발한 잡종후대의 항산화 활성지수

2002 no.	교배조합	세대	개체 수	항산화 활성지수	2002 no.	교배조합	세대	개체 수	항산화 활성지수
8546	안산벼		3	43.7-49.7	8701	흑남벼		4	4.4-29.7
8547	가위찰		3	0.7-70.2	8706	KR97004	F <sub>6</sub>	5	46.6-65.3
8548	KR97005	F <sub>5</sub>	5	22.0-42.8	8707	KR97004	F <sub>6</sub>	5	37.6-61.5
8549	KR97005	F <sub>5</sub>	4	36.3-49.8	8708	KR97004	F <sub>6</sub>	3	46.5-70.8
8550	KR97005	F <sub>5</sub>	10	28.7-90.9	8709	KR97004	F <sub>6</sub>	3	37.8-53.6
8551	KR97005	F <sub>5</sub>	10	7.9-56.4	8710	KR97004	F <sub>6</sub>	3	71.4-76.5
8552	KR97005	F <sub>5</sub>	5	41.4-59.2	8711	KR97004	F <sub>6</sub>	5	20.5-57.9
8553	KR97005	F <sub>5</sub>	7	26.6-73.2	8712	KR97004	F <sub>6</sub>	3	22.6-71.7
8554	KR97005	F <sub>5</sub>	3	37.5-54.3	8714	KR97004	F <sub>6</sub>	2	72.4-77.3
8555	KR97005	F <sub>5</sub>	10	0.0-60.1	8715	KR97004	F <sub>6</sub>	10	18.4-62.4
8556	KR97005	F <sub>5</sub>	10	27.8-55.3	8716	KR97004	F <sub>6</sub>	9	15.8-59.4

\* 추출액을 40배로 희석하여 측정된 결과임.

또 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>4</sub>에서도 SOD활성이 높은 38개체를 선발하여 F<sub>5</sub> 계통으로 재배하였고, 포장에서의 생육상태와 초형에 근거하여 8계통 28개체를 선발하였다. 선발된 개체별 ESR 과장강도를 조사한 결과 6계통 13개체가 항산화활성이 높은 것으로 나타났다. 이들의 후대인 F<sub>6</sub> 계통을 재배하고 계통별로 3~10개체를 선발하여 ESR과장강도를 조사하여 항산화 활성지수를 계산 것이 표 3-16에 정리되어 있다. 이 조합에서 항산화 활성이 높은 개체로 선발되어 온 것들은 모두 흑자색 종피를 나타냈으며, 이 경우 추출원액을 이용하여 ESR 과장강도를 측정하면 계통간 차이가 잘 나타나지 않기 때문에(그림 3-2) 표 3-16에는 추출원액을 40배로 희석하여 측정된 결과이다. 계통내 개체변이가 심한 경우도 있지만 대부분의 계통이 흑자색 종피 교배친인 흑남벼보다 항산화 활성지수가 높아서 F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>에서 계속 선발해 온 효과가 나타난 것으로 해석할 수 있다.

이상에서 두 교배조합의 잡종개체를 대상으로 SOD활성 또는 ESR과장강도에 근거하여 선발하고 후대검정을 실시한 결과 두 교배조합 모두에서 선발효과를 인정할 수 있었다.

이는 고 항산화 활성 벼 품종개량을 촉진시키는 중요한 연구결과로 평가할 수 있는 업적이다.

## 라. 항산화 활성 선발지표 및 분자표지 개발

### 1) 항산화 활성 선발지표 개발

현미 종피에 축적되어 있는 안토시아닌 색소 중 Cyanidine-3-Glucoside 함량은 표 3-17에서 보는 바와 같이 색도계로 측정한 잡종개체별 현미의 L, a, b 값과 각각 부의 상관관계를 보인 경우가 많았다. 표에 제시한 잡종집단 중에서 흑진주벼/수원425호 및 흑진주벼/밀양153호 조합은 조사한 전 개체의 현미가 농담의 차이는 있었지만 모두 적색~흑자색을 보이고 있었는데, 따라서 이 조합에서는 C3G함량과 색도계의 L값 간에 상관관계가 성립되지 않았다. 즉 잡종개체간에 현미 종피색의 농담차이만 인정되는 경우라면 색도계의 a값과 b값으로 C3G함량의 많고 적음을 추정할 수 있다고 판단하였다. 특히 색도계의 b값은 조사한 6교배조합 중 향미찰/충북흑미 조합을 제외하면 C3G함량과 높은 부의 상관을 보여 C3G함량의 높고 낮음을 추정할 수 있는 지표로 이용가능 할 것으로 생각하였다.

표 3-17. 현미 C3G함량과 종피 색도와의 상관관계

교배조합	세대	개체수	현미의 종피색도		
			L	a	b
흑진주벼/수원425호	F3	77	-0.211	-0.383**	-0.435**
흑진주벼/밀양153호	F3	78	-0.201	-0.453**	-0.442**
흑진주벼/거대배	F3	99	-0.503**	-0.673**	-0.634**
아랑향찰/흑진주벼	F3	93	-0.502**	-0.571**	-0.664**
향미찰/충북흑미	F3	49	0.117	-0.131	0.049
아랑향찰/충북흑미	F3	124	-0.271**	-0.032	-0.397**

2002년도에 수확한 흑남벼/가위찰벼 조합의 F<sub>6</sub> 개체별 ESR 파장강도, 현미의 색도 및 C3G함량을 조사하여 이들 간의 상관관계를 본 것이 표 3-18이다. 표에서 항산화 활성지수는 ESR 파장강도로 계산한 수치인데 추출원액, 20배 및 40배 희석액으로 각각 ESR파장강도를 조사하여 희석배수별로 항산화 활성지수를 구하였다. 표에 제시한 상관계수는 현미추출원액으로 조사한 항산화 활성지수와 관계로서 색도 a값을 제외하고는 모두 상관관계가 인정되었다. 즉 현미의 항산화 활성지수는 색도 L값 및 b값과는 고도의 부의 상관관계, 그

리고 C3G 함량과는 정의 상관관계가 인정되었다. 이 결과로부터 현미 종피에 안토시아닌 물질이 축적되어 착색이 되는 유색미의 경우에는 색도계로 조사한 b값을 항산화 활성 선발 지표로 이용할 수 있다고 판단하였다.

표 3-18. F<sub>6</sub> 개체별 현미 추출원액의 항산화 활성지수와 색도 값 및 C3G함량간의 상관계수

추출원액	항산화 활성지수		현미의 색도			C3G함량
	20x	40x	L값	a값	b값	
1	0.60**	0.60**	-0.93**	-0.15	-0.93**	0.32*

한편 C3G함량이 높은 계통 또는 잡종개체 현미의 항산화 활성평가를 위해서 ESR 과장강도를 조사할 때 추출원액만을 이용할 경우에는 계통 간 차이를 발견할 수 없는 경우가 많다. 현미 종피에 안토시아닌계열 물질인 C3G가 축적된 유색미 계통과 축적되지 않은 담황색 현미 계통 간에는 현미추출원액을 이용하여 ESR 과장강도를 측정하면 C3G가 축적되어 있는 유색미계통의 항산화 활성이 확실히 높게 나타난다. 그러나 종피에 C3G가 축적되어 있는 유색미 계통 간에는 항산화 활성 차이를 발견하기 어려워 유색미 중 고 항산화 활성 계통선발이 곤란하게 된다.

C3G함량이 높은 흑자색 종피 계통간 항산화 활성차이를 밝히기 위해서 현미추출액을 20배 및 40배로 희석하여 ESR 과장강도를 측정된 결과 (그림 3-2) 추출원액을 이용했을 때는 교배친인 흑남벼와 F6계통인 계통번호 8706, 8708, 8712, 8715의 과장강도가 비슷했는데 20배 희석액에서는 계통번호 8706과 8708만이 안정된 과장강도를 보여 항산화 활성이 흑남벼, 8712 및 8715보다 높다는 것을 밝힐 수 있었다. 따라서 유색미 계통의 항산화 활성을 검토코자 ESR기를 사용할 때는 추출액의 20배 이상 희석액을 이용해야 한다는 것을 알게 되었다.

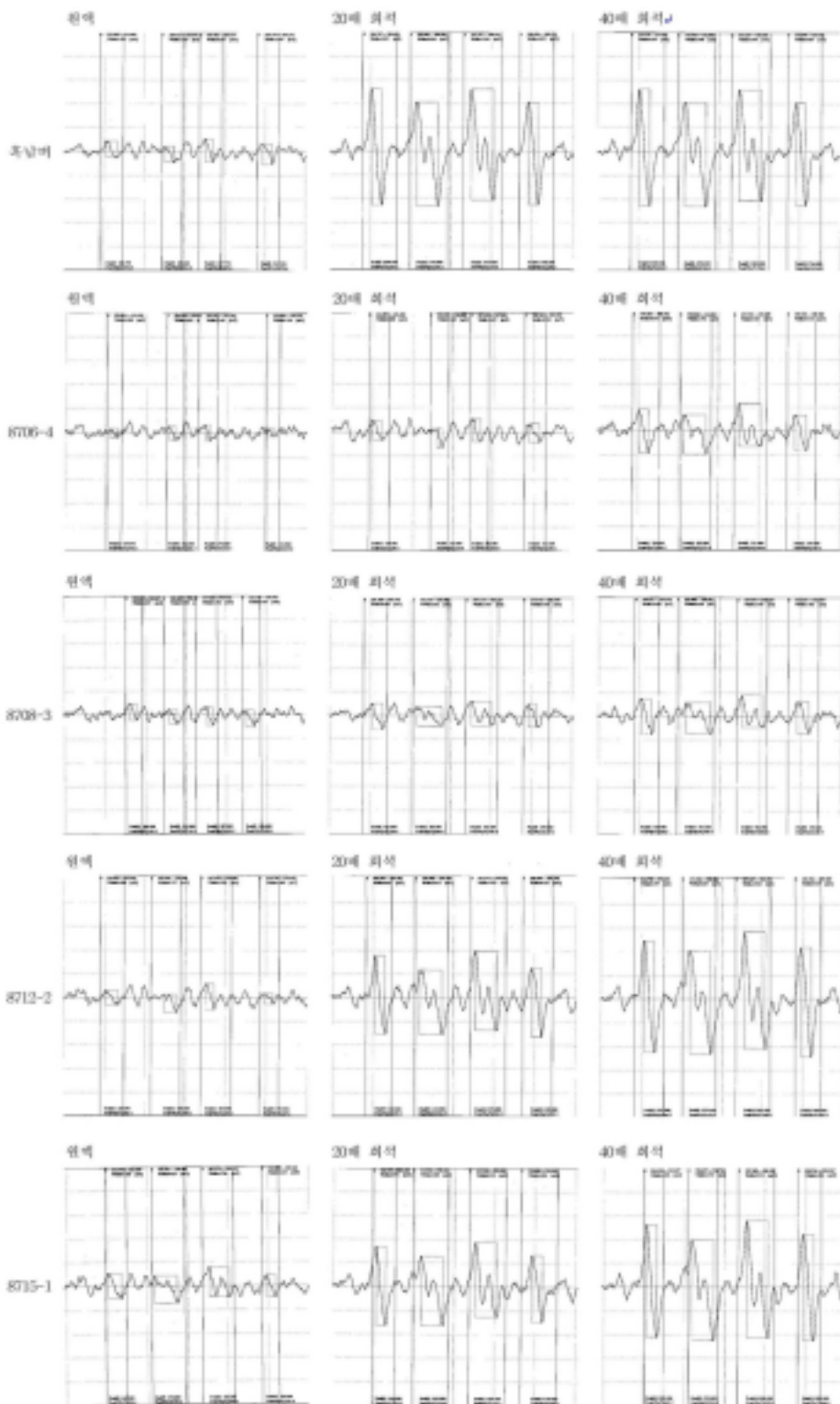


그림 3-2. 흑납벼/가위찰 조합의 F6개체간 현미 추출액의 희석배수에 따른 ESR 파장강도의 변화 - 원액에서는 계통간 차이가 없으나 20배, 40배 희석시 차이가 남.

## 2) 향산화 활성 분자표지 개발

현미의 향산화활성을 보다 쉽고 정밀하게 측정할 수 있는 방법으로 분자마커를 개발하기 위해서 안산/가위찰 조합의 F<sub>5</sub> 23계통과 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>6</sub> 25계통의 DNA를 추출한 후 101종의 RM primer를 이용하여 SSR분석을 실시하였다. 이 계통들의 ESR 과장강도와 흑남벼/가위찰 조합의 계통들은 C3G함량도 조사하였다. 그 결과 안산벼/가위찰 조합에서는 다형성을 보이는 band pattern과 ESR 과장강도 간에 일정한 관계를 발견할 수 없었고, 흑남벼/가위찰 조합의 25계통에서는 SSR 분석에서 나타난 band pattern과 종피색, C3G함량 및 ESR 과장강도로 계산한 향산화 활성지수 간에 관계가 성립되고 있음을 발견하였다.

분석에 사용한 SSR primer 수는 1번에서 12번 염색체 각각에 위치한 5~11 종으로 총 101종 이었는데 SSR 분석에 의해서 계통 간 다형성을 보인 primer수는 총 32종으로 32%에 가까운 primer에서 다형성을 보였다(표 3-19). 다형성을 보인 primer는 모든 염색체에서 발견되었는데 6번 염색체에 위치한 것이 6종으로 가장 많았으나 비율로 보면 10번 염색체에 위치한 primer 중 80%가 다형성을 보여 가장 높은 비율이었다. 다형성 primer의 비율이 50% 이상으로 비교적 그 비율이 높은 것은 6번, 10번 및 11번 염색체에 위치한 primer였으며, 다형성 비율이 10% 내외로 비교적 낮은 것은 2번, 3번 및 5번 염색체에 분포하고 있는 primer였다.

표 3-19. 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>6</sub>계통을 재료로 한 SSR분석에 사용한 primer 수와 다형성을 보인 primer의 비율

염색체 번호	사용한 Primer 수	다형성을 보인 primer 수	다형성 primer 비율	염색체 번호	사용한 primer 수	다형성을 보인 primer 수	다형성 primer 비율
1	11	2	18.2	7	8	2	25.0
2	10	1	10.0	8	8	3	37.5
3	11	1	9.1	9	7	2	28.6
4	8	3	37.5	10	5	4	80.0
5	7	1	14.3	11	8	4	50.0
6	10	6	60.0	12	8	3	37.5
				합계	101	32	31.7

다형성을 보인 primer 중 F<sub>6</sub>계통의 종피색 유무 및 C3G함량의 차이에 따라 일정하게

서로 다른 band type을 보인 primer는 RM469, RM204, RM217 및 RM317의 4종이었다(그림 3-3, 표 3-21). 이 중 RM469, RM204 및 RM217은 6번 염색체에 위치한 marker이고, RM317은 4번 염색체에 위치한 marker이다. 그런데 RM469, RM204 및 RM217을 primer로 사용했을 때 F<sub>6</sub> 계통 중 보통의 담황색 종피를 가진 8계통이 모두 흑자색 종피를 가진 교배친인 흑남벼와 동일한 band를 형성하였고, 흑자색 종피를 가진 계통의 대부분이 담황색 종피 교배친인 가위찰과 동일한 band를 형성하였다(표 3-20). 이처럼 담황색 종피 계통 모두가 일정한 위치에 형성한 band가 흑자색 종피 교배친의 band와 동일하고, 흑자색 종피 계통이 형성한 band가 담황색 종피 교배친의 band와 동일하다는 것은 분석에 사용한 RM469, RM204 및 RM217이 종피색과는 관계가 없는 marker임을 보여준 결과이다.

그런데 RM317을 primer로 사용했을 때는 담황색 종피를 가진 F<sub>6</sub> 8계통이 담황색 종피 교배친인 가위찰과 동일한 위치에서 band를 형성하였고, 흑자색 또는 적자색 종피를 가진 F<sub>6</sub> 17계통이 모두 흑자색 종피 교배친인 흑남벼와 동일한 위치에 band를 형성하였다(표 3-20, 21, 그림 3-3). 결국 4번 염색체에 위치한 RM317이 종피에 C3G가 축적되는 흑자색 또는 적자색 종피 계통의 분자 marker로 선발된 셈이다. 표 3-20에서 보는 바와 같이 종피가 담황색인 8계통은 모두 C3G함량이 매우 낮은 반면 흑자색 종피 12계통은 C3G함량도 높고 ESR로 측정된 파장강도가 매우 안정적이어서 항산화 활성이 높음을 볼 수 있다.

표 3-20. 흑남벼/가위찰 F6 계통의 종피색, C3G함량 항산화 활성지수 및 SSR 분석에서 나타난 band type

계통 번호	종피 색	C3G 함량	ESR 지수	Band type				계통 번호	종피 색	C3G 함량	ESR 지수	Band type			
				RM 469	RM 204	RM 217	RM 317					RM 469	RM 204	RM 217	RM 317
P1	BP	2.47	1.2	P1	P1	P1	P1	13	BP	-	0.6	H	H	H	P1
P2	YB	0.29	1.7	P2	P2	P2	P2	14	BP	19.80	0.6	P2	P2	P2	P1
1	YB	0.09	0.7	P1	P1	P1	P2	15	BP	16.43	0.5	P2	P2	P2	P1
2	YB	0.12	0.8	P1	P1	P1	P2	16	BP	21.85	0.5	P2	P2	P2	P1
3	YB	0.06	1.1	P1	P1	P1	P2	17	BP	11.84	0.6	P2	P2	P2	P1
4	YB	0.06	1.0	P1	P1	P1	P2	18	BP	27.25	0.5	P2	P2	P2	P1
5	YB	0.23	1.0	P1	P1	P1	P2	19	BP	10.65	0.5	P2	P2	P2	P1
6	YB	0.06	1.1	P1	P1	P1	P2	20	BP	33.79	0.9	P2	P2	P2	P1
7	YB	0.30	0.9	P1	P1	P1	P2	21	BP	35.11	0.5	P2	P2	P2	P1
8	YB	0.22	0.9	P1	P1	P1	P2	22	BP	36.08	0.9	P2	P2	P2	P1
9	RP	0.20	0.8	P2	P2	P2	P1	23	RP	4.00	1.3	P2	P2	P2	P1
10	RP	0.52	0.7	P2	P2	P2	P1	24	RP	6.36	1.4	P2	P2	P2	P1
11	BP	-	0.8	P1	P1	P1	P1	25	RP	5.98	0.6	P2	P2	P2	P1
12	BP	-	0.8	H	P1	P1	P1								

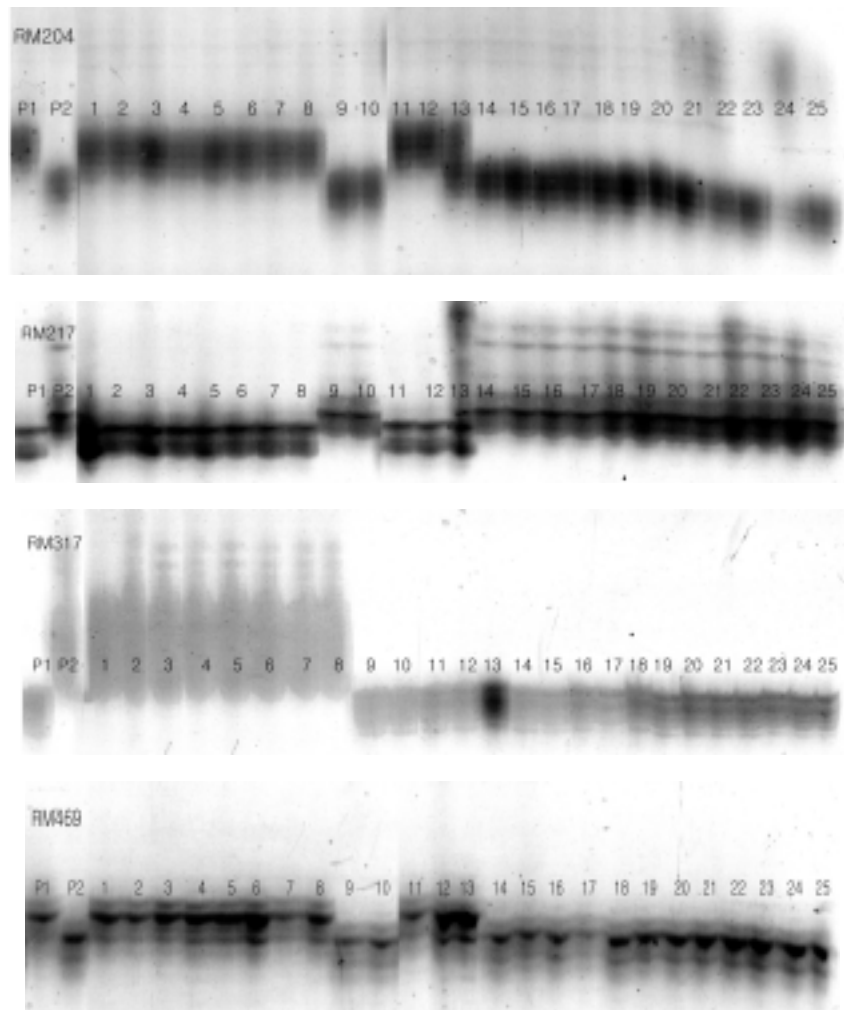


그림 3-3. 흑남벼/가위찰 조합의 F6계통 간 RM469, RM204, RM217 및 RM317에 의해서 형성된 다형성 밴드

종피색의 유무가 C3G함량 또는 항산화 활성의 지표가 될 수 있음은 잘 알려진 사실이며, 육안으로 쉽게 종피색 유무를 판단할 수 있기 때문에 RM317과 같은 분자마커의 효용성은 높지 않다. 그러나 이렇게 개발된 분자마커는 종피에 C3G가 축적되지 않는 전혀 다른 교배조합의 계통 간 항산화 활성차이를 구별하는 분자마커를 찾을 때 1차적으로 사용할 수 있으리라고 생각한다.



표 3-21. F<sub>6</sub> 계통의 종피색 유무와 관련지어 선발된 4종의 primer가 형성한 band type

Primer band	F <sub>6</sub> 계통															
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	담황색 종피 F <sub>6</sub> 계통								흑자색 종피 계통					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
RM469	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	
	2		1										1	1		1
RM204	1															
	2	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1
	3		1										1	1		
RM217	1		1										1	1		
	2	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1
RM317	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
	2	1											1	1	1	1

Primer band	F <sub>6</sub> 계통															
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	흑자색 종피 F <sub>6</sub> 계통													
			13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
RM469	1	1	1													
	2		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM204	1											1		1		
	2	1		1												
	3		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM217	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1		1												
RM317	1		1													
	2	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

#### 4. 결과 요약

- 가. 본 연구에서 항산화 활성이 높은 품종을 육성하기 위한 계통이 다수 선발되었다. F<sub>5</sub> 세대이후의 계통 중에 항산화 물질인 Cyanidine-3-Glucoside (C3G)를 다량 함유하는 계통이 흑진주벼/밀양153호 조합에서 50계통, 흑진주벼/수원425호 조합에서 50계통 및 흑진주벼/진부찰벼 조합에서 18계통 등, 총 118계통이 선발되었으며, 이들 중 국내에서 재배되는 어떠한 품종보다 C3G 함량이 20~30% 더 높은 계통이 다수 포함되었다. 항산화 활성도를 측정하는 SOD 및 ESR과장강도를 이용하여 안산벼/가위찰 조합에서 42계통, 흑남벼/가위찰 조합 36계통 등, 총 78개의 고 항산화 활성 계통을 선발하였다. 또한 거대배(giant embryo)이면서 C3G함량이 높은 계통으로 흑진주벼/거대배 조합에서 30계통과 흑남벼/거대배 조합에서 81계통을 선발하여 총 111계통이 선발되었다. 선발된 이들 계통들중에 7계통에 대해 생산력 검정 예비시험이 이루어지고 있으며, 2~3년내에 실용화 품종이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.
- 나. 흑자색 종피 품종간 교배조합의 F<sub>2</sub>에서 C3G 함량의 분리양상을 살펴본 결과 C3G 함량이 다수의 유전자가 관여하는 양적형질임을 알 수 있었다.
- 다. 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호 및 흑미H31와 흑진주벼 교배 조합에서는 초월분리 개체가 출현하여 이들 교배친이 흑진주벼가 가진 C3G관련유전자와 상가적으로 작용하는 다수의 복수유전자를 가진 것으로 추정된 반면, HeiBao/흑진주벼 조합에서는 초월분리개체가 출현하지 않아 HeiBao는 흑진주벼 유전자와 상가적으로 작용하는 복수 유전자를 적게 가진 것으로 추정되었다. 또한 적색종피를 가진 교배친과 담황색 종피를 가진 아랑향찰은 C3G관련 복수유전자를 가지고 있는 것으로 추정되었다.
- 라. 흑진주벼와 밀양153호, 수원425호, 연농흑1호, 흑미H31, HeiBao는 동일한 종피색 관련유전자를 가지고 있었다. 흑자색/적색 종피 조합의 F<sub>2</sub> 집단에서 L값과 b값이 넓게 분포하여 흑자색과 적색 관련 유전자가 비대립관계임을 보여주었다. 흑자색/담황색 종피조합에서 L값과 b값이 모두 3정분포를 보여 색도값이 소수의 주동유전자에 의해 유전되고 있음을 보여주었다.
- 마. 흑진주벼/진부찰벼 조합과 흑진주벼/거대배 조합의 F<sub>3</sub>세대에서 C3G함량에 따라 선발하고 F<sub>4</sub>세대에서 C3G함량의 분포를 살펴본 결과, 집단간 C3G함량 분포에 확실한 차이를 보여, 잡종초기세대인 F<sub>3</sub>에서 C3G함량에 대한 개체선발은 효과가 큰 것으로 나타났다. 안산벼/가위찰 조합과 흑남벼/가위찰 조합의 F<sub>3</sub>와 F<sub>4</sub> 2세대에 걸쳐 SOD와 ESR 과장강도에 근거하여 선발하고 후대검정을 실시한 결과, 두 교배 조합 모두에서

개체선발의 효과가 인정되었다.

- 바. 색도값의 b값은 C3G함량과 높은 부의 상관을 보여 b값은 C3G함량의 높고 낮음을 추정할 수 있는 지표로 이용 가능할 것으로 생각되었고, 향산화 활성지수와 관계에서도 고도의 부의 상관관계가 인정되어 유색미의 경우에는 색도계로 조사한 b값을 향산화활성 선발지표로 이용할 수 있다고 판단하였다.
- 사. 유색미 계통의 향산화 활성을 검토하기 위해서 ESR 파장강도를 사용할 때 추출용액의 20배 이상 희석액을 이용하는 것이 고 향산화활성 계통선발에 효과적이었다.
- 아. 향산화 활성 분자표지 개발을 위해 101개의 RM primer를 이용하여 SSR분석을 한 결과, 종피색 유무와 C3G 함량 차이에 따라 일정하게 서로 다른 band type을 보인 primer는 RM469, RM204, RM217, RM317의 4개 primer였으며, RM469, RM204, RM217은 6번 염색체에 RM317은 4번 염색체에 위치한 marker였다. 이중 RM317은 C3G가 축적되는 흑자색 또는 적자색 종피계통을 구별할 수 있는 분자마커였다.

## 5. 참고문헌

1. 채제천. 2002. 고품질 및 기능성 증진을 위한 작물생산기술의 연구 현황과 전망. 한국작물학회지 47(별호), 품질연구 9호 : 1-14
2. 최해춘, 오세관. 1996. 유색미 색소의 종류와 기능. 한국작물학회지 41(별호), 품질연구 6호 : 1-9
3. 최해춘. 2002. 고품질 및 고부가가치 쌀 품종개발 현황과 전망. 한쌀회 총서 제12권, 한국쌀연구회 : 1-40
4. 최해춘, 손종록, 김연규. 2002. 일본의 고품질 쌀 생산 및 유통·이용 현황. 한쌀회 총서 제13권, 한국쌀연구회 : 80-117
5. 최해춘. 2002. 쌀 품질 고급화 및 고부가가치화를 위한 육종현황과 전망. 한국작물학회지 47(별호), 품질연구 9호 : 15-32
6. 손종록, 김재현, 이정일, 운영환, 김제규, 황흥구, 문헌팔. 2002. 쌀의 품질평가 현황과 금후 연구방향. 한국작물학회지 47(별호), 품질연구 9호 : 33-54
7. 김광호, 김석동, 박문웅, 문헌팔. 1999. 식량생산능력 향상을 위한 농작물 육종전략. 한국육종학회·작물학회·토양비료학회 공동심포지엄- 식량위기, 우리의 나아갈 길 : 80-101

8. 김광호, 안종국, 정일민, 강미영, 남백희, 양계진, 최진용, 최해춘, 고희종, 허문희. 2000. 가공적성용 찰벼 신소재 연구. 농림기술개발과제 최종보고서 p. 1-416
9. Ill Min Chung, Kwang Ho Kim, Joung Kuk Ahn and Jin Ohk Lee. 2000. Varietal Variation in Antioxidative Activity of Rice Grain by DPPH and TBA Methods. Korean J. Crop Sci. 45(4) : 261-266
10. Ill Min Chung, Kwang Ho Kim, Joung Kuk Ahn and Jin Ohk Lee. 2000. Comparison of Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities in Rice Varieties. Korean J. Crop Sci. 45(5) : 277-281
11. Ill Min Chung, Kwang Ho Kim, Joung Kuk Ahn, Si Kyung Lee and Jin Ohk Lee. 2001. Antioxidative Activity of Rice Grain using FI-CL and ESR Methods. Korean J. Crop Sci. 46(6) : 411-415
12. 문헌팔, 임용표. 2001. Genome 해석시대의 식물육종 방향. 2001년도 한국육종학회 춘계워크샵 자료집 : 3-11
13. 안상낙. 2001. 작물 육종에서 MAS의 이용. 2001년도 한국육종학회 춘계워크샵 자료집 : 22-27
14. 박순직, 김홍열, 한상준, 류수노. 2000. 유색미 흑진주벼 조합 잡종세대에서 Cyanidine-3-glucoside 함량변이. 한국육종학회지 32(3) : 285-290
15. 김홍열, 박순직, 한상준, 류수노. 2000. 흑자색미 F2집단의 Cyanidine-3-glucoside 함량변이. 한국육종학회지 32(4) : 333-337
16. Su Noh Ryu, Sang Jun Han, Sun Zik Park and Hong Yeol Kim. 2000. Antioxidative Activity and Varietal Difference of Cyanidine-3-glucoside and Peonidine-3-glucoside Contents in Pigmented Rice. Korean J. Crop Sci. 45(4) : 257-160
17. Su Noh Ryu, Sun Zik Park, Sam Sik Kang, Eun Bang Lee and Sang Jun Han. 2000. Food Safety of Pigment in Black Rice cv. Heugjinjubyeo. Korean J. Crop Sci. 45(6) : 370-373
18. Su Noh Ryu, Sun Zik Park and Hong Yeol Kim. 2002. Antioxidative Activity in Rice Cultivar, Wild Rice, and Barley. 2002. Korean J. Crop Sci. 47(1) : 54-61
19. 홍순관. 2002. 벼에서 배 크기 관련 유전자간 상호작용. 한국육종학회지 34(3) : 212-222

20. Minoru Nishimura. 2002. Now and Future of High Quality Rice Production in Japan - Mutation Breeding for the Improvement of Seed Ingredient. 경기 고품질쌀 생산을 위한 국제학술 심포지엄, 경기도농업기술원 : 9-52

## 제4절 고허산화활성 · 활성물질함유 유전자원평가 및 선발연구

### 1. 서언

우리나라에서 가장 중요한 식량작물인 벼의 생산은 그 간의 품종개량과 재배기술의 개선으로 양적, 질적인 발전을 해왔다. 벼 종자는 flavonoids, isovitexin, cyanidin, oryzanol,  $\alpha$ -tocopherol, 그리고 phytic acid와 같이 강한 천연 항산화성을 지니고 있는 phenolic 화합물들을 함유하고 있다 (Ramarathnam 등, 1986과 1989; Wu 등, 1994; Choi and Oh, 1996; Osawa 등, 1985). 그 중에서 벼의 겨로부터 분리된 isovitexin과 phytic acid는 지질 과산화를 억제하는 매우 강한 항산화 물질임이 밝혀졌다 (Ramarathnam 등, 1989). 벼의 왕겨에는 이런 항산화 물질이 많아 경제적으로 천연 항산화 물질의 원천이 되기 때문에 많은 주목을 받게 되었다 (Barber, 1972). 따라서 고허산화 물질을 많이 포함하고있는 벼 품종을 육성하기 위하여 구체적인 스크린 방법이 수립되어야 할 것이다.

산화작용은 생체 내에서 에너지 공급을 위한 생화학적 반응으로 끊임없이 계속 일어나며 이 과정에서 발생하는 활성산소 및 Free radical은 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만 그렇지 않은 활성산소 및 Free radical은 성인병으로 불리는 류마티스성 관절염, 심장병, 파킨슨씨병, 순환기장애, 암 등의 원인이 되고 있다 (Halliwell, 1991 ; Fukuzawa and Takaishi, 1990). Free radical은 짝 짓지 않은 전자를 가진 어떤 원자 또는 분자로써 정의 되는데 (Punchard와 Kelly, 1996). 생물학 분야와 이와 관련된 분야에서 주요한 free radical species를 oxygen free radicals (OFRs) 이라고 한다. OFRs는 반응산소종 (reactive oxygen species, ROS)이라고 주로 불리며, 이들은 모두 산소분자( $O_2$ )보다도 더 강하게 산화된다. 또한 OFRs는 superoxide anion free radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 및 hydroxy radical ( $HO^{\cdot}$ ) 등을 포함한다(Sies, 1993).

이들 활성산소에 의해 생성되는 지질과산화물과 여러 체내 과산화물은 세포에 대한 산화적 파괴로 노화와 질병의 원인이 되기도 한다. 정상적인 세포에서도 대사과정 중 어느 정도의 free radical과 기타 활성산소, 과산화물이 생성되지만 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase(POD) 등의 항산화효소와 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등의 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호한다.

McCord와 Fridovich (1969)에 의해 발견된 SOD (superoxide dismutase, EC 1.15.1.1)는 superoxide free radical이 분자상의 산소와 과산화수소 ( $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ = H_2O_2 + O_2$ )로 변환되는 것을 촉매하는 금속단백질이며, 그 활성은  $O_2^{\cdot -}$ 와  $H_2O_2$ 의 농도에 의해 결정되어지므

로 특이하다고 할 수 있다. Free radical은 주로 식품의 품질 저하와 영양소 파괴를 일으키는데, SOD는 superoxide 손상에 대한 신체의 첫 번째 방어적인 효소로서 매우 중요하므로 가공전의 식품에 대해 항산화제로서 인정받고 있다. 그 활성 자리에는 촉매적 보결 금속(catalytic prosthetic metal)으로서 다른 종류인 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, 그리고 Fe-SOD의 metalloenzymes이 존재하다. SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase (EC 1.11.1.6)와 peroxidases (POD, EC 1.11.1.7)에 의해 물과 산소로 분해된다. Catalase는 식물체가 광호흡을 하는 동안 형성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 역할을 하고, 주로 peroxysome에서 발견 된다 (Tolbert, 1981; Lazarow와 Fujiki, 1985).

지질산화는 식품에서 품질저하를 일으키는 주요한 기작의 하나이다. 따라서 TBA (thiobarbituric acid)가를 측정함으로써 지질과산화의 정도를 나타낼 수 있다. 2차적인 지질과산화 생성물인 malonaldehyde (MA)를 측정하는 이 방법에서 malonaldehyde는 산의 열처리 과정에서 TBA와 함께 복합체를 형성한다. Malonaldehyde는 제일 먼저 TBA와 반응을 하고, 최대 흡광도 532 nm에서 붉은 색원체를 형성한다. 항산화 활성은 TBA반응물질의 저해가로 표현된다.

본 연구는 고향산화 활성 베타카로틴과 항산화 활성 물질을 평가 및 선별하여 궁극적으로 고향산화 활성 베타카로틴 육종을 위한 기초자료로 이용하기 위하여 수행되었는데, 항산화활성 검정을 위하여 산화반응에 있어서 매우 중요한 free radical에 관련된 활성산소소거능(지질과산화)은 TBA, DPPH, ESR법을 이용하여 측정하였으며, 활성산소소거에 관련된 효소계의 반응은 SOD와 POD활성으로 검정하였고, 항산화활성 물질분석은 총페놀함량을 정량하여 실시하였다.

## 2. 연구방법 및 내용

### 가. 재래종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선별 시험

#### 1) 작물학적 특성 연구

가) 공시품종: 한국재래종 구중도 등 102품종

#### 나) 재배법

재래종 벼에 대한 항산화 활성 검정 및 고향산화품종 선별 시험을 위해 실시한 공시품종의 재배법은 표 4-1과 같다.

표 4-1. 공시품종의 재배법

파종기 (월.일)	이앙기 (월.일)	주당 본수	재식밀도 (cm)	시비량(kg/10a) N-P2O5-K2O
4. 30	5. 20	1주 1본식	30 × 15	11 - 7 - 8

다) 시험구 배치법: 난괴법 3 반복

## 2) 항산화 활성 유전자원 평가

가) 공시품종: 한국재래종 강원도 등 90품종

### 나) SOD활성 검정

#### (1) SOD 활성검정을 위한 조효소 추출

SOD (Superoxide dismutase)의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온진공냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh) 한 후, 시료 0.2 g과 효소추출완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다(그림 4-4).

#### (2) SOD 활성검정

위에서 추출한 조효소 60  $\mu$ l과 assay buffer 3.0 ml 및 riboflavin 30  $\mu$ l을 혼합하여 25°C의 온도와 광조절 식물생장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도



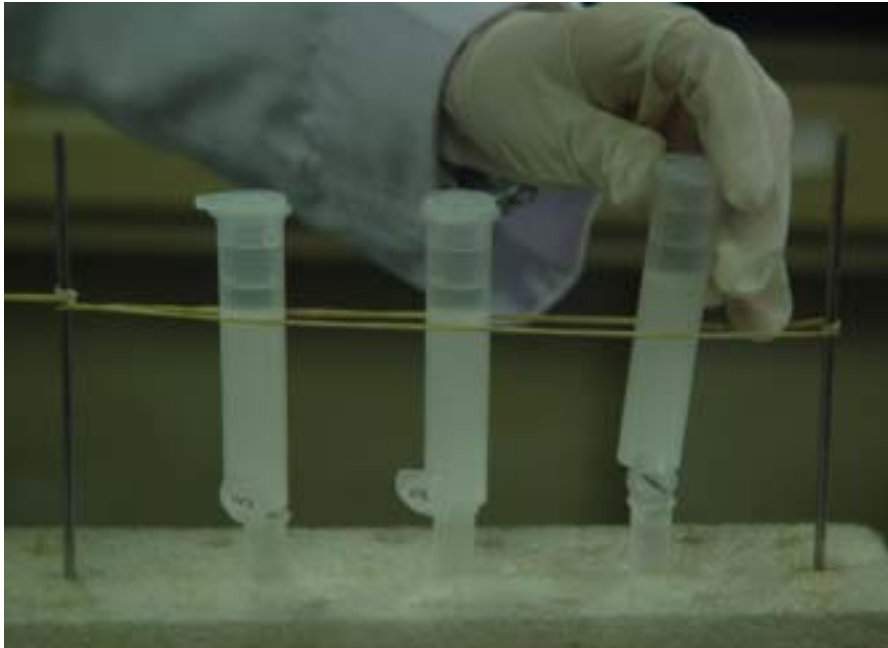


그림 4-1. PD-10 column을 이용한 조효 추출과정



그림 4-2. 20-W Sylvania Groiux 형광등에서 반응시키는 과정

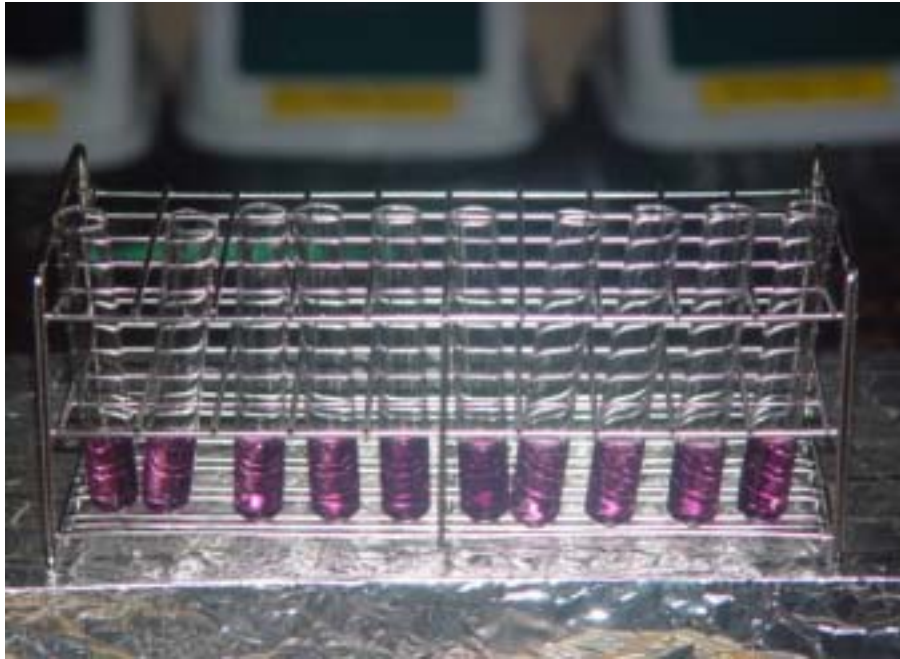


그림 4-3. 20-W Sylvania Groiux 형광등에서 반응시킨 시료

#### 다) DPPH를 이용한 전자공여능 검정

##### (1) 전자공여능측정을 위한 시료 전처리

현미상태의 쌀을 곱게 갈은 파우더를 5g 평량하여 80%메탄올 100ml로 24시간 실온에서 추출한다. 이 추출물을 Whatman 4번 여과지로 걸러낸 후 감압농축기로 농축하여 -40°C의 저온진공냉동건조기에서 완전히 건조시켰다. 건조된 추출물을 80%메탄올로 1%농도로 재용해시켜서 반응시료로 사용하였다(그림 4-4).

##### (2) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 라디칼소거능 검정

DPPH용액(50%의 에탄올과 50%증류수에 0.35mM DPPH를 포함한 반응용액)에 위에서 재용해시킨 시료 250 $\mu$ l를 잘 섞어서 1분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였고, 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. 항산화활성 정도는 다음의 계산식을 이용하였다. 위의 자유라디칼소거활성검정은 각 시료에 대하여 3회 분석을 하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

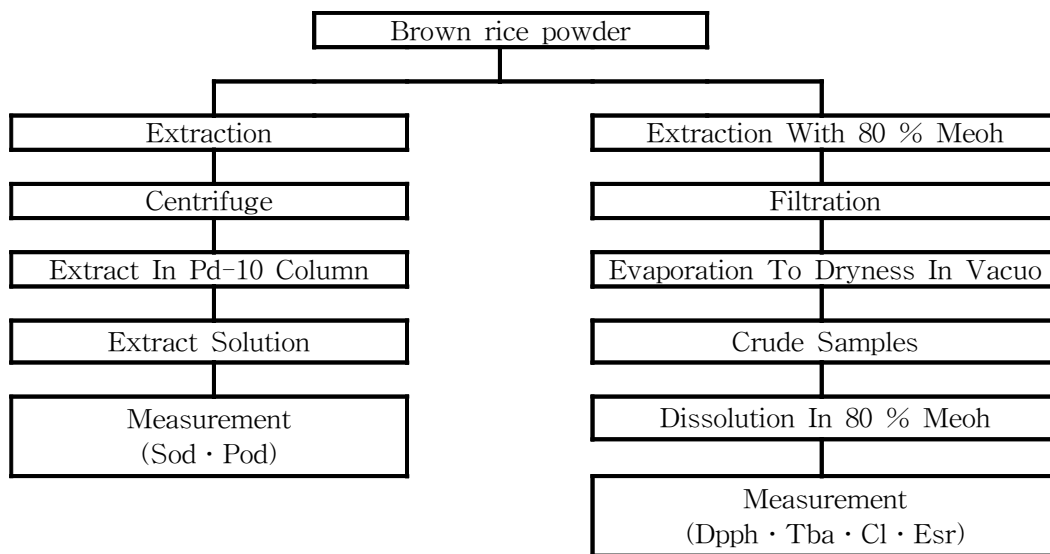


그림 4-4. 항산화 활성 검정 모식도.

#### 라) 추출수율

실험에 사용된 재료들의 추출수율의 측정은 80% MeOH을 이용하여 시료의 건물 2g에 대한 추출물의 총 soluble solid 함량의 백분비로 표시 하였다.

#### 마) 통계처리

위의 모든 활성검정은 3반복으로 수행하였으며 통계분석은 모든 데이터를 SAS (Statistical Analysis System; SAS, 1986) 프로그램으로 최소유의차 (Least significant difference, LSD) 검정을 한 후 선발 하였다.

나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석(총 phenolic acids 함량) 시험

#### 1) 항산화활성 유전자원 평가 및 선발

가) 공시재료 : 유전자원 선발 AC 1423외 115종(표 5,외래종, 재래종, 유색미)

나) 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재)

다) 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준)

라) 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주)

마) 시험구배치법 : 난괴법 3반복

바) 시비수준: 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-7-8 kg/10a)

사) 조사항목 : 항산화활성 검정(유전자원 선발): SOD, POD효소활성 검정법, DPPH  
법

### (1) NBT법을 이용한 SOD 효소활성 검정

#### (가) SOD 활성검정을 위한 조효소 추출

SOD (Superoxide dismutase)의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온건공냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh) 한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다 (그림 4-4).

#### (나) SOD 활성검정

위에서 추출한 조효소 60  $\mu$ l과 assay buffer 3.0 ml 및 riboflavin 30  $\mu$ l을 혼합하여 25°C의 온도와 광조절 식물생장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (2) POD 효소활성 검정

#### (가) POD 활성검정을 위한 조효소 추출

그림 4-1에서와 같이 POD의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온건공냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh)한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨

후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다.

#### (나) Peroxidase(POD) 활성검정

POD의 활성은 Raa (1971)의 방법에 의하여 측정하였다. Sodium phosphate buffer (pH 7.0) 7.9 ml, 0.3% 과산화수소수 0.5 ml 및 1% *o*-phenylenediamine 0.5 ml와 위에서 준비한 조효소 0.1 ml를 혼합하여 반응액을 9 ml가 되도록 하였다. 조효소의 첨가에 의하여 반응이 개시되었으며, 이를 5분간 반응시킨 다음 반응정지액 (NaH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에 30분간 방치 후, 430 nm에서 UV로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (3) DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성 검정

#### (가) 전자공여능측정을 위한 시료 전처리

현미상태의 쌀을 곱게 갈은 파우더를 5g 평량하여 80%메탄올 100ml로 24시간 실온에서 추출한다. 이 추출물을 Whatman 4번 여과지로 걸러낸 후 감압농축기로 농축하여 -4 0℃의 저온진공냉동건조기에서 완전히 건조시켰다. 건조된 추출물을 80%메탄올로 1%농도로 재용해시켜서 반응시료로 사용하였다

#### (나) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 라디칼소거능 검정

DPPH용액(50%의 에탄올과 50%증류수에 0.35mM DPPH를 포함한 반응용액)에 위에서 재용해시킨 시료 250ul를 잘 섞어서 1분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였고, 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. 항산화활성 정도는 다음의 계산식을 이용하였다. 위의 자유라디칼소거활성검정은 각 시료에 대하여 3회 분석을 하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### 2) 선발된 품종에 대한 항산화 활성 검정 및 활성물질 분석

가) 공시재료: 1차년도에 선발된 Tono Brea 외 8품종 이용

나) 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재)

다) 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준)

라) 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주)

마) 시험구배치법 : 난괴법 3반복

바) 시비수준: N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O=11-7-8 kg/10a(표준구, 대조구), 50% 증비, 50% 감비,  
무처리

사) 조사항목 : 항산화활성 검정 및 항산화물질 분석

### (1) NBT법을 이용한 SOD 효소활성 검정

#### (가) SOD 활성검정을 위한 조효소 추출

SOD (Superoxide dismutase)의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온건공냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh) 한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다 (그림 4-4).

#### (나) SOD 활성검정

위에서 추출한 조효소 60  $\mu$ l과 assay buffer 3.0 ml 및 riboflavin 30  $\mu$ l을 혼합하여 25°C의 온도와 광조절 식물생장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (2) DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성 검정

#### (가) 전자공여능측정을 위한 시료 전처리

현미상태의 쌀을 곱게 갈은 파우더를 5g 평량하여 80%메탄올 100ml로 24시간 실온에서 추출한다. 이 추출물을 Whatman 4번 여과지로 걸러낸 후 감압농축기로 농축하여 -40°C의 저온건공냉동건조기에서 완전히 건조시켰다. 건조된 추출물을 80%메탄올로 1%농도로 재용해시켜서 반응시료로 사용하였다

#### (나) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 라디칼소거능 검정

DPPH용액(50%의 에탄올과 50%증류수에 0.35mM DPPH를 포함한 반응용액)에 위에

서 재용해시킨 시료 250 $\mu$ l를 잘 섞어서 1분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였고, 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. 항산화 활성 정도는 다음의 계산식을 이용하였다. 위의 자유라디칼소거활성검정은 각 시료에 대하여 3회 분석을 하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (3) TBA법을 이용한 지질과산화 억제율 검정

#### (가) 기질용액과 반응액의 조제

Lipid에 대한 malondialdehyde 생성 억제효과는 linoleic acid 기질에 대한 산패 억제 효과로 조사하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 0.03 M이 되도록 linoleic acid를 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 20 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 19.2 ml와 1%의 각 시료액 0.8 ml를 첨가한 후, 40 $^{\circ}$ C 항온수조에서 100 rpm으로 24시간 동안 진탕하여 다음과 같이 TBA가를 측정하였다.

#### (나) Thiobarbituric acid (TBA)가 측정

TBA는 thiobarbituric acid를 이용한 Wong 등 (1981)의 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다. 경시적 반응액 2.0 ml씩을 시험관에 취하고 여기에 35% trichloroacetic acid (TCA) 1.0 ml와 0.75% TBA 시약 2.0 ml를 가한 다음 시험관 진탕기로 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 항온수조에서 40분 동안 반응·발색시켰다. 반응이 끝난 후, 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1.0 ml, chloroform 2.0 ml를 가하고, 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였고, 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 이를 TBA가로 하였으며, 대조군의 TBA가와 비교하여 유지에 대한 산화 억제효과를 측정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (4) ESR을 이용한 SOD 활성 비교

SOD 활성은 JES\_RE1X ESR spectrometer (JEOL Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. Hypoxanthine-xanthine oxidase system으로부터 발생된  $O_2^{\cdot -}$  radical은 DMPO에 의해

서 포집하였고, hypoxanthine (2mM) 50 $\mu$ l와 DMPO (9.2M) 20 $\mu$ l, 그리고 소거제 또는 SOD 50 $\mu$ l으로 혼합하였다. 그 다음 반응 혼합물을 균등하여 cell에 옮기고, ESR signal을 45초 후부터 측정하였다. ESR signal의 intensity는 국제 표준으로 이용되는 Mn<sup>2+</sup>의 intensity 비율로 조정하였다.

#### (5) 총 Phenolics 함량분석

항산화관련물질분석은 아래 그림과 같이 (그림 4-5, 4-6) Folin-Dennis법에 의해서 측정되었다.

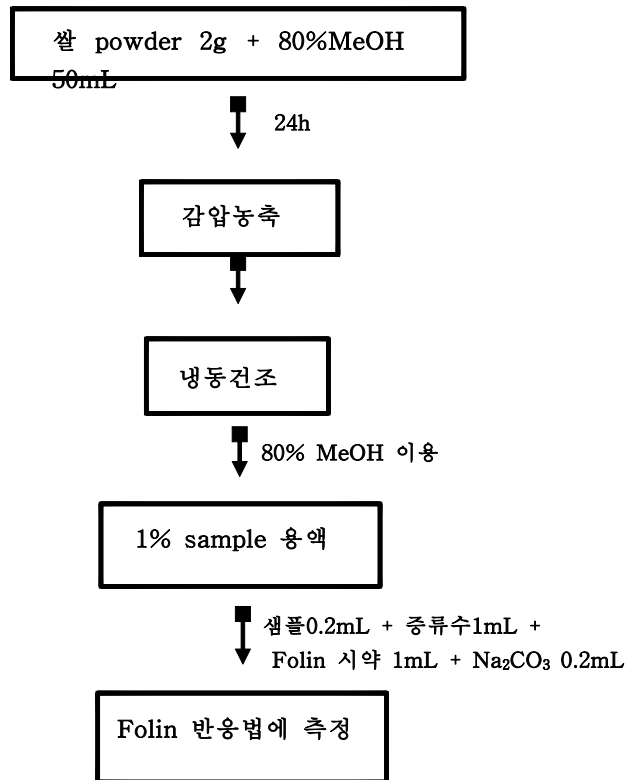


그림 4-5. 총 Phenolics 함량분석을 위한 모식도

#### (가) 표준곡선의 작성.

제1차년도 분석결과 여러 페놀물질 중에서 항산화활성이 높은 Gallic acid (10<sup>-2</sup>M, 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M)를 이용해서 작성하였다(그림 4-6).



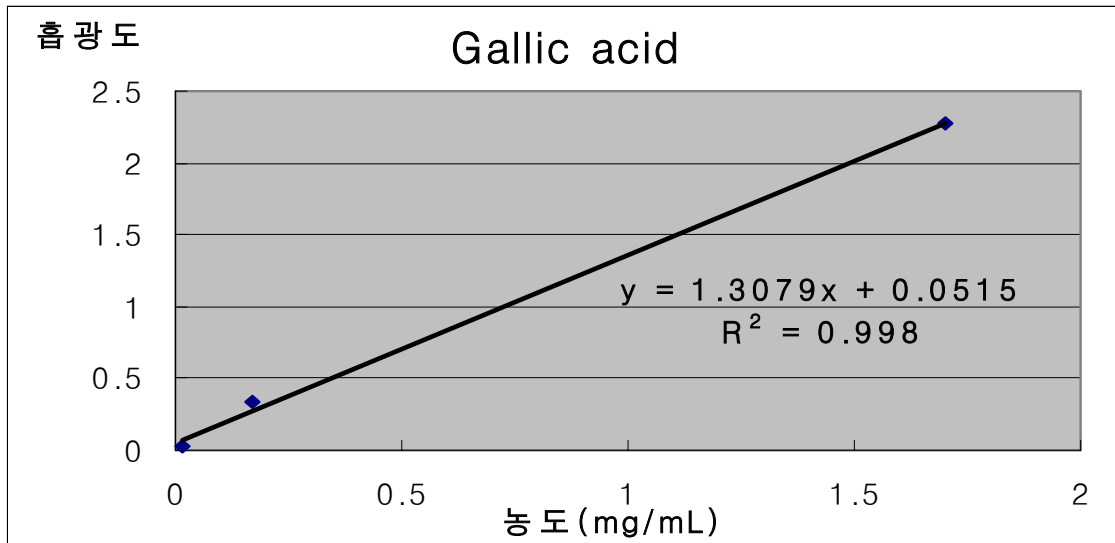


그림 4-6. 총 페놀 함량 측정을 위한 Gallic acid 표준 곡선

다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험

1) 유전자원 재배 및 선발

- 가) 공시재료: 2002년도에 재배·수확된 간척벼를 포함한 유전자원 122종
- 나) 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재)
- 다) 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준)
- 라) 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주)
- 마) 시험구배치법 : 난괴법 3반복
- 바) 시비수준: 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 11-7-8 kg/10a)

2) 재배된 품종에 대한 항산화 활성 검정 및 유전자원 평가

- 가) 공시재료: 2002년도에 재배·수확된 간척벼를 포함한 유전자원 122종
- 나) 조사항목 : 항산화활성 검정

(1) NBT환원법을 이용한 SOD효소 활성검정법

(가) SOD 활성검정을 위한 조효소 추출

SOD (Superoxide dismutase)의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 벼 종자를 저온건 공냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh) 한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣

은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심분리 하여 얻은 상층액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액으로 사용하였다(그림 4-4).

#### (나) SOD 활성검정

위에서 추출한 조효소 60  $\mu$ l과 assay buffer 3.0 ml 및 riboflavin 30  $\mu$ l을 혼합하여 25°C의 온도와 광조절 식물생장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{환원저해율 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (2) DPPH법을 이용한 자유라디칼소거(수소공여능) 활성검정법

#### (가) 전자공여능측정을 위한 시료 전처리

현미상태의 쌀을 곱게 갈은 파우더를 5g 평량하여 80%메탄올 100ml로 24시간 실온에서 추출한다. 이 추출물을 Whatman 4번 여과지로 걸러낸 후 감압농축기로 농축하여 -40°C의 저온진공냉동건조기에서 완전히 건조시켰다. 건조된 추출물을 80%메탄올로 1%농도로 재용해시켜서 반응시료로 사용하였다

#### (나) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 라디칼소거능 검정

DPPH용액(50%의 에탄올과 50%증류수에 0.35mM DPPH를 포함한 반응용액)에 위에 재용해시킨 시료 250 $\mu$ l를 잘 섞어서 1분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였고, 80% methanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. 항산화활성 정도는 다음의 계산식을 이용하였다. 위의 자유라디칼소거활성검정은 각 시료에 대하여 3회 분석을 하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

### (3) 추출수율

실험에 사용된 재료들의 추출수율의 측정은 80% MeOH을 이용하여 시료의 건물 2g에

대한 추출물의 총 soluble solid 함량의 백분비로 표시 하였다.

#### (4) 통계처리

위의 모든 활성검정은 3반복으로 수행하였으며 통계분석은 모든 데이터를 SAS (Statistical Analysis System; SAS, 1986) 프로그램으로 최소유의차 (Least significant difference, LSD)를 검정하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발 시험

##### 1) 작물학적특성연구

2000년도에 재배·수확한 구중도를 포함한 벼유전자원 102품종의 작물학적 특성은 표 4-2, 4-3, 4-4와 같다. 전세계적으로 가장 많이 재배되는 벼품종은 인도형, 일본형, 자바형의 세가지이다. 자바형은 인도네시아에서 재배되고 중립종이며, 인도형은 동남아시아와 중앙,남 아프리카에서 재배되며 장립종형태를 가진다. 또한 온대기후지역인 동아시아와 동북아시아, 북미지역에서는 일본형이 재배되며 단립종이다. 본 연구에서 사용한 이들 품종군에 의한 분류로는 인도형 1품종(1%), 일본형 96품종(94%), 자바형 5품종(5%)으로 일본형 품종이 주축을 이루고 있다. 공시품종의 생육특성으로는 간장, 수장, 수수로 나누어 조사를 하였다. 간장의 전체 범위는 69.2~122.4cm이며 81~100cm 사이가 50품종(49.0%)으로 가장 많이 분포하고 있으며, 수장의 전체범위는 16.5~30.4cm이고 20.1~25.0cm 사이가 67품종(65.7%)으로 높은 분포변이를 보였다. 또한 수수는 7.7~21.0개의 전체 범위를 가지고 있으며 10.1~15.0개가 63품종(61.8%)으로 가장 많이 분포하고 있다. 종실특성으로는 천립중과 종피색을 조사하였다. 천립중의 전체범위는 18.0~34.0g이며, 종피색은 백색, 담갈색, 갈색, 적색의 4그룹으로 나누어 분류한 결과 백색이 93품종, 적색이 5품종, 담갈색과 갈색이 각각 2품종씩의 경향을 보였다.

표 4-2. 공시품종의 품종군 구분

인도형	일본형	자바형	계
1(1)	96(94)	5(5)	102(100)

( ) = 비율(%)

표 4-3. 공시품종의 생육특성

형질	등급	품종수	비율	범위
간장(cm)	60~80	10	9.8	69.2~122.4
	81~100	50	49.0	
	101~120	40	39.2	
	121~140	2	2.0	
수장(cm)	15.1~20.0	19	18.6	16.5~30.4
	20.1~25.0	67	65.7	
	25.1~30.0	15	14.7	
	30.1~35.0	1	1.0	
수수(개)	10 이하	29	28.4	7.7~21.0
	10.1~15.0	63	61.8	
	15.1~20.0	8	7.8	
	20 이상	2	2.0	

표 4-4. 공시품종의 종실 특성

형질	등급	품종수	비율	범위
천립중	20.0 이하	9	8.8	18.0~34.0
	20.1~25.0	56	54.9	
	25.1~30.0	34	33.3	
	30.1 이상	3	2.9	
종피색	백색	93	91.1	
	담갈색	2	2.0	
	갈색	2	2.0	
	적색	5	4.9	

## 2) 고향산화 활성 유전자원 평가 및 선발

벼유전자원의 고향산화 품종의 평가 및 선발을 하기 위해서 항산화활성검정인 SOD활성검정과 DPPH활성억제검정을 실시한 결과, SOD활성검정에서는 아국도(30.2%)가 가장 높은 활성을 보였고 재래륙도(27.7%), 반달벼(27.4%), 정달도(27.0%), 한내도(26.9%), 흑피(26.9%) 순으로 높은 활성을 나타냈다. DPPH를 이용한 자유라디칼 소거 활성검정에서는 적도(90.7%)와 노인다리(90.4%)가 90%이상의 높은 소거능을 나타냈고, 자광도(89.5%)와 삼경조(87.4%) 순으로 높은 자유라디칼소거능을 나타냈다. SOD효소활성검정법과 DPPH활성억제능의 결과는 서로 일치하지 않는 경향을 보였는데 두방법에 사용된 반응시료가 모두 조추

출몰이기 때문에 좀더 정확한 자료를 얻기 위해서는 두가지 조추출물에 대한 순수 분리·동정이 필요하리라 생각된다. 하지만 평가 및 선발을 위해서 수행한 두가지 방법은 비교적 정확한 assay라 할 수 있다.

표 4-5. 벼유전자원의 SOD, DPPH활성 측정

품 종	SOD	DPPH	수율
	-- Activity (%) --	-- Inhibition (%) --	-%-
강원도	25.0	51.6	2.3
구중도	21.3	42.5	4.2
노인다리	21.5	90.4	4.2
육성재래	24.1	31.2	3.1
황해도	21.7	55.4	4.0
백천	17.0	34.0	2.6
최부지	18.1	55.3	2.6
나도	19.2	54.5	2.5
선달	11.7	52.8	3.2
반달벼	27.4	49.8	2.9
삼경조	23.4	87.4	2.4
아국도	30.2	36.2	2.9
장만재래	24.7	46.1	4.3
재래륙도	27.7	44.0	3.5
한내도	26.9	47.4	1.6
화성발찰	19.6	42.7	5.2
흑피	26.9	46.5	3.1
가위찰	22.5	38.5	5.2
백곡나	20.2	47.0	3.8
번곡	22.8	40.9	4.0
불간벼	22.0	60.1	3.4
대구	22.5	34.2	4.2
동산조	20.5	36.2	4.1
이천7일찰	20.0	36.6	4.7
저누	20.0	68.6	3.0
덕적조도	15.9	50.4	3.5

(continued)

품 종	SOD	DPPH	수율
	--- Activity (%) ---	--- Inhibition (%) ---	-%-
자광도	19.9	89.5	4.0
올벼	18.2	35.2	3.4
인부지나도	17.4	38.8	4.3
청군벼	17.1	50.1	3.2
포천유망찰	16.9	47.5	2.9
다마궁	17.1	64.1	2.3
도래	17.3	69.5	3.5
아가벼	19.4	47.2	2.9
열술벼	18.0	38.0	2.9
장조	21.5	36.9	4.2
각시점조	18.1	56.2	2.9
들렁치기벼	18.6	50.7	3.2
무다래기	21.0	40.5	3.9
범판화	14.8	48.7	2.9
술술조	17.5	61.5	3.7
애달	18.7	44.0	4.2
적도	22.8	90.7	3.8
정조	22.6	47.7	2.8
조나조	23.4	54.0	3.7
조동지	15.9	39.6	3.1
해조	17.8	64.7	3.1
강청도	19.8	48.5	3.5
경조백조	21.9	29.9	2.9
구안도	17.4	50.5	3.2
자광	18.4	48.6	3.0
치경도	15.4	53.3	4.0
해림	18.0	45.8	3.2
황주	16.0	56.1	3.2
금도	21.8	41.1	3.5
노인조	19.1	56.7	3.5
용천	18.7	54.3	2.8
유	15.4	65.4	2.8
군조	14.6	48.7	3.5

(continued)

품 종	SOD	DPPH	수율
	--- Activity (%) ---	--- Inhibition (%) ---	-%-
원길조	18.2	60.6	3.0
맥도	26.4	53.4	0.9
바람둥구리	25.0	64.8	3.1
반촌조	20.8	46.9	2.8
은조	21.6	54.6	3.4
재래조도	20.7	52.6	3.2
정달도	27.0	58.3	3.4
조정도	22.4	61.8	3.1
청송조	24.5	46.6	3.4
치마벼	21.1	57.8	2.9
평양	16.9	57.1	3.5
풍우조	14.2	54.6	2.9
황조	19.9	56.1	3.4
흑발	22.6	50.7	2.9
흑산조	25.4	52.9	3.0
깨벼	25.3	50.4	4.2
다백조	24.7	44.6	3.6
쇠머리지장	25.0	66.9	3.5
다다조	23.6	57.7	4.6
일품	26.3	64.2	2.7
모도	11.8	64.6	3.0
금창도	14.8	59.7	3.7
남강백조	16.1	48.5	3.8
홍도도	17.8	44.6	4.1
황조	16.9	66.4	3.0
오리도	19.5	66.7	3.5
올뭇계	18.3	56.7	3.2
백찰벼	19.4	43.7	3.4
석산조	19.8	64.0	3.2
야구도	18.2	60.9	3.2
여우쌀벼	20.9	45.0	3.6
CV (%)	8.0	4.3	
LSD (0.05)	2.63	3.63	

나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고향산화품종 선발, 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석(총 phenolic acids 함량) 시험

1) 고향산화 활성 유전자원 평가 및 선발

항산화활성검정과 고향산화 품종 선발을 위해 건대 실습농장에서 재배·수확한 AC 1423을 포함한 벼유전자원 116품종에 대한 목록은 표 4-5와 같다. 이들 유전자원에 대한 수율 측정과 SOD와 POD 효소의 활성검정, 또한 DPPH억제능은 표 4-7에 나타났다.

NBT 환원법에 의한 SOD활성검정에서는 Jangsamdo(32.8%)품종이 가장 높은 항산화 활성을 보였으며, Seungsiljo(14.3%), Jeokmosaek(13.1%)을 포함한 12품종에서 10%이상의 활성을 보였고, Kingmen Toumen Chiu Mu 품종을 포함한 21개 품종은 SOD활성효과가 없는 것으로 나타났다. POD측정실험에서는 Sancheongdo(45.2%)품종이 가장 높은 억제율을 보였고, Oegukbyeo(32.3%), IRI-301(Mangyung)(22.1%)을 포함한 6품종이 20%가 넘는 억제율을 보였으며, Bakkye 품종을 포함한 54개 품종에서는 억제효과가 없는 것으로 나타났다. DPPH법에 의한 자유라디칼소거활성(수소공여능) 실험에서는 IARI 10560(90.1%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, AC1423(89.9%), San-Chiaot-Swen(87.7%)을 포함한 20품종에서 70% 이상의 높은 억제율을 보였고, 유전자원 전 품종이 40%이상의 억제율을 보였다.



표 4-6. 항산화활성검정유전자원 LIST

구분	품종	구분	품종
kku-1	AC1423	kku-59	BAEKKYEONGJO(백경조)
kku-2	BASMATI	kku-60	BAEKGWANGOK(백광옥)
kku-3	B1293B-PN-24-2-1	kku-61	BAEKNA(백나)
kku-4	CICA 4	kku-62	BAEKMANGJO(백망조)
kku-5	CUBA 65-V-58	kku-63	BAEKJO(백조)
kku-6	DONDUNI KUNLUZ	kku-64	BAEKJICHEONGBYEO(백지청벼)
kku-7	DOU-U-LAN(REDF STEM)	kku-65	BAEKCHALBYEO(백찰벼)
kku-8	GIN SHUN	kku-66	BAEKHAEDAL(백해달)
kku-9	GPNO 3005	kku-67	BORIBYEO(보리벼)
kku-10	GPNO 12856	kku-68	BULDO(불도)
kku-11	IARI 10560	kku-69	SANJO(산조)
kku-12	IR 75-69-3	kku-70	SANCHEONGDO(산청도)
kku-13	IR 329-19-5-2-2	kku-71	SANGPUNG(상풍)
kku-14	IR 644-1-63-1-1	kku-72	SEOGANDODO(서간도도)
kku-15	IR 781-497-2-3	kku-73	SEUNGSILJO(승실조)
kku-16	IR 1044-56	kku-74	SINBAEGSEOG(신백석)
kku-17	KASARWALA MUNDARA	kku-75	AGUDO(아구도)
kku-18	KINGMEN TOUMEN CHIU MU	kku-76	ARONGBYEO(아롱벼)
kku-19	MAMORIAK	kku-77	OEGUKBYEO(외국벼)
kku-20	MON-Z-WUAN	kku-78	IRI 233(이리 233)
kku-21	UMTANT 12-42	kku-79	IRI 293(PALGEUM):이리 293(팔금)
kku-22	MATO SELECTION	kku-80	IRI 301(MANGYUNG):이리 301(만경)
kku-23	PALMYRA	kku-81	JANGWANG(자광)
kku-24	PHILIPPINE 2	kku-82	JANGSAMDO(장삼도)
kku-25	PI 389011 OR SD	kku-83	JANGJO(창조)
kku-26	P 1279	kku-84	JAERAEJONGNA(재래종나)
kku-27	RED KHOSHA CERMA	kku-85	JEONGDALDO(정달도)
kku-28	REXMONT	kku-86	JEONGJO(정조)
kku-29	RIKUU 132	kku-87	JINHWA(진화)
kku-30	SAN CHIAO TSWEN	kku-88	CHANARAK(차나락)
kku-31	SHALI I MAHIN	kku-89	CHEONGGUNBYEO(청군벼)
kku-32	SHUANG CHIANG -30-21	kku-90	CHEONGSANDO(청산도)
kku-33	TAICHUNG NATIVE 1	kku-91	CHINDADCHIKI(친다다치기)
kku-34	TSAI YUAN CHON	kku-92	PATBYEO(팻벼)
kku-35	WOO-CO-CHIN-YU	kku-93	PYEONGBUK 4(평북 4)
kku-36	CHE-SHAU-NAN-BIR	kku-94	PYEONGYANG(평양)
kku-37	BAKKYE	kku-95	HAMBURERBYEO 3(함부르벼 3)
kku-38	F3-220	kku-96	HOCHOKJINDO(호묘진도)
kku-39	GANGREUNGDO(강릉도)	kku-97	HONGDODO(홍도도)
kku-40	GANGCHEONGDO(강청도)	kku-98	HUADO(화도)
kku-41	GUANDO(구안도)	kku-99	HWANGJO(황조)
kku-42	GEUMJEOMDO(금점도)	kku-100	HWANGTODO(황토도)
kku-43	GEUMCHANGDO(금창도)	kku-101	HEUGBAL(흑밭)
kku-44	NAMSEON 1 (남선 1)	kku-102	HEUGSAEKDO(흑색도)
kku-45	NOINDARI(노인다리)	kku-103	HEUNBE(흰배)
kku-46	NOINDO(노인도)	kku-104	143(PI 274471)
kku-47	DADAJO(다다조)	kku-105	NAMKANGBAEKJO(남강백조)
kku-48	DAMANGUNG(다마궁)	kku-106	DANGANEUIBANGJU(단간은방주)
kku-49	DABAEGJO(다백조)	kku-107	DEOKJJEOKJODO(덕적조도)
kku-50	DAEGUDO(대구도)	kku-108	OLBYEO(올벼)
kku-51	DORAE(도래)	kku-109	EUNJO(은조)
kku-52	DONNA(돈나)	kku-110	EUMSEON(음선)
kku-53	DONGSANJO(동산조)	kku-111	IRI 268(NONGKWANG ):이리 268(농광)
kku-54	DONG O BYEO(동오벼)	kku-112	JEOKMOSAEEK(적모색)
kku-55	DUCHUNGJONG(두충중)	kku-113	HWANGJU(황주)
kku-56	BADOLBYEO(바돌벼)	kku-114	JEONA(저나)
kku-57	BANDALBYEO(반달벼)	kku-115	BARAMDUNGKURI(바람둥구리)
kku-58	BANCHONJO(반촌조)	kku-116	DAEGOLDO(대골도)

표 4-7. 유전자원 항산화 실험 결과 및 수율

	SOD	POD	DPPH	수율
	----Activity (%)----		-Inhibition (%)-	-%-
kku-1	0.00	0.00	89.96	1.01
kku-2	0.00	6.59	57.64	0.99
kku-3	0.05	12.41	58.80	0.85
kku-4	2.17	8.17	68.22	1.00
kku-5	7.41	1.5	41.72	1.27
kku-6	3.44	8.87	62.12	1.23
kku-7	5.28	7.89	62.17	0.94
kku-8	2.39	29.58	71.06	1.09
kku-9	4.92	4.31	68.85	1.06
kku-10	0.27	0.00	70.28	1.12
kku-11	0.54	2.61	90.11	1.69
kku-12	0.99	0.00	56.33	1.08
kku-13	0.00	0.00	52.84	1.35
kku-14	1.62	0.00	60.66	0.96
kku-15	1.71	0.00	67.54	1.01
kku-16	0.4	9.85	57.72	1.10
kku-17	4.59	7.29	41.83	1.06
kku-18	0.00	0.00	64.16	0.96
kku-19	5.45	4.62	58.58	1.15
kku-20	4.36	9.40	40.32	1.19
kku-21	0.00	0.00	63.28	1.12
kku-22	0.66	0.00	72.25	1.26
kku-23	0.00	0.00	60.46	1.31
kku-24	0.00	8.08	72.48	1.09
kku-25	0.00	0.00	56.67	0.92
kku-26	0.14	5.62	63.97	0.92
kku-27	0.00	0.00	62.33	1.31
kku-28	1.81	0.63	68.26	1.16
kku-29	2.38	0.00	72.08	1.15
kku-30	2.43	6.91	87.66	1.11
kku-31	0.00	2.17	60.32	1.06
kku-32	0.00	2.06	65.64	1.14
kku-33	0.00	9.63	69.38	1.24
kku-34	0.00	0.00	62.34	1.13
kku-35	0.23	5.65	56.36	1.23
kku-36	0.00	0.00	66.04	1.25
kku-37	1.19	0.00	61.40	1.07
kku-38	2.23	0.00	70.53	1.38
kku-39	4.51	0.00	75.82	1.31
kku-40	0.00	1.56	49.20	1.57
kku-41	5.64	0.00	46.57	1.60
kku-42	3.72	0.00	66.56	1.39
kku-43	1.58	2.64	66.38	1.37
kku-44	4.43	0.00	63.20	1.06

(continued)

	SOD	POD	DPPH	수율
	----Activity (%)----		-Inhibition (%)-	-%-
kku-45	2.81	0.00	53.51	0.82
kku-46	7.69	12.86	64.49	1.48
kku-47	3.59	9.76	49.01	1.15
kku-48	0.00	7.20	67.41	1.37
kku-49	1.24	0.00	64.02	1.43
kku-50	0.00	3.65	53.51	1.48
kku-51	0.15	0.00	77.86	1.51
kku-52	11.55	0.00	59.43	1.35
kku-53	7.72	0.00	65.81	1.81
kku-54	8.45	1.21	60.56	1.44
kku-55	5.5	0.00	68.36	1.55
kku-56	4.83	1.08	62.02	1.38
kku-57	0.54	11.74	56.96	1.74
kku-58	8.56	5.78	58.40	1.53
kku-59	11.67	4.85	57.88	1.49
kku-60	11.50	0.00	68.15	1.56
kku-61	5.22	0.00	40.66	1.80
kku-62	10.17	0.00	64.49	1.56
kku-63	2.01	0.00	58.81	1.38
kku-64	5.29	0.00	49.72	1.40
kku-65	6.09	0.00	54.93	1.62
kku-66	4.06	0.00	64.34	1.49
kku-67	0.64	6.76	57.80	1.43
kku-68	5.80	18.54	62.77	1.27
kku-69	0.93	1.49	75.65	1.62
kku-70	0.00	45.19	66.91	1.46
kku-71	0.00	0.00	74.66	1.39
kku-72	0.00	1.28	66.12	1.79
kku-73	14.33	0.00	66.31	1.22
kku-74	5.43	0.00	62.01	1.87
kku-75	1.34	5.40	58.05	1.77
kku-76	5.05	0.00	44.05	1.86
kku-77	7.79	32.31	63.88	1.33
kku-78	2.89	5.90	72.60	1.92
kku-79	4.47	0.00	70.07	1.53
kku-80	11.30	32.09	68.21	1.27
kku-81	9.19	6.57	54.06	1.60
kku-82	32.76	5.72	57.35	1.55
kku-83	10.45	0.00	66.98	1.76
kku-84	5.68	3.82	69.31	1.40
kku-85	11.87	6.41	60.60	1.29
kku-86	11.57	18.78	55.86	1.32
kku-87	7.28	28.95	70.46	1.34
kku-88	8.65	27.33	61.38	1.43
kku-89	6.14	25.47	47.71	1.48

(continued)

	SOD	POD	DPPH	수율
	----Activity (%)----		-Inhibition (%)-	-%-
kku-90	7.08	25.66	48.61	1.78
kku-91	8.15	15.16	67.14	1.38
kku-92	0.00	0.00	60.58	1.88
kku-93	8.88	0.00	62.17	1.85
kku-94	5.98	0.00	63.24	1.20
kku-95	8.88	0.00	60.66	1.39
kku-96	5.18	0.00	68.97	1.32
kku-97	6.71	0.00	65.46	1.42
kku-98	6.30	3.70	72.37	1.26
kku-99	0.85	2.51	73.64	1.47
kku-100	7.55	0.00	69.19	1.70
kku-101	10.69	0.00	70.59	1.96
kku-102	2.53	0.00	75.64	1.32
kku-103	5.91	0.00	69.92	1.71
kku-104	4.84	0.00	69.71	2.02
kku-105	4.07	0.00	69.90	1.87
kku-106	8.69	0.69	73.02	1.74
kku-107	5.32	1.72	77.83	1.74
kku-108	4.00	0.00	64.81	1.56
kku-109	8.11	10.57	73.08	1.24
kku-110	11.31	2.03	73.72	1.01
kku-111	13.05	3.58	75.33	1.48
kku-112	8.78	7.25	69.72	1.99
kku-113	9.77	1.69	72.48	1.55
kku-114	6.34	9.41	73.86	1.34
kku-115	7.61	4.97	75.81	1.53
kku-116	11.86	3.55	63.85	1.63
LSD(0.05)	9.01	23.80	4.15	0.32

## 2) 선발된 품종에 대한 항산화활성 검정 및 활성물질 분석

### 가) SOD활성 검정

표준시비, 50% 증비, 50% 감비, 무시비의 시비수준에 따른 고향산화 벼 9품종에 대한 SOD활성은 표 4-8과 같이 나타났다. 중부지방표준시비조건에서는 Tono Brea 439가 20.6%로 SOD활성이 가장 높게 나타났고, Bandalbyeo는 7.6%로 가장 낮은 SOD활성을 보였다. 표준시비에서 50% 증비한 조건에서도 Tono Brea 439가 19.2%로 가장 높은 SOD활성을 보였으며, 반면에 Hwei Ju는 6.3%로 가장 낮은 SOD활성을 나타냈다. 표준시비에서 50% 감비한 조건에서도 Tono Brea 439가 18.3%로 가장 높은 SOD활성 값을 보였고, Bandalbyeo는 표준시비 때와 마찬가지로 6.5%의 낮은 활성을 보였다. 무시비 조건에서는 Hwei Ju가

37.2%로 가장 높은 SOD활성을 보였고, Tono Brea 439가 2.2%로 가장 낮은 활성을 나타냈다. 시비조건에 따른 평균 SOD 활성능력을 살펴보면, 무처리구에서 13.4%로 가장 높은 활성을 보였으며, 표준시비구(12%), 50% 감비구(11.2%), 50% 증비구(10.9%) 순으로 활성을 나타냈다.

표 4-8. 시비수준에 따른 고허산화 벼 9품종의 SOD활성 측정

품 종	시비수준			
	표준	50%증비	50%감비	무처리
	-----Activity (%)-----			
Hwei Ju	14.4	6.3	6.9	37.2
Tono Brea 439	20.6	19.2	18.3	2.2
Woo Co Chin Yu	12.6	10.7	15.2	10.2
AUS 196	10.9	10.6	8.2	11.7
Siga-Chata Mochi	8.7	10.5	10.9	16.8
Bandalbyeo	7.6	8.7	6.5	9.8
Jeongdaldo	11.8	9.2	14.3	11.3
Noindari	12.6	9.7	11.8	8.0
Jangwangdo	9.1	12.7	8.3	13.6
CV (%)	18.3	14.8	7.5	14.5
LSD (0.05)	3.8	2.8	1.4	3.3

#### 나) DPPH법을 이용한 항산화활성 검정

시비수준에 따른 고허산화벼 9품종에 대한 DPPH 활성 억제율(수소공여능)은 표 4-9와 같다. 중부지방 표준시비조건에서는 Siga-Chata Mochi가 88.5%로 항산화 활성이 가장 높게 나타났고, Woo Co Chin Yu는 38.9%로 가장 낮은 항산화 활성을 보였다. 표준시비에서 50% 증비한 조건에서는 AUS 196이 88.0%로 가장 높은 항산화 활성을 보였으며, 반면에 Woo Co Chin Yu는 43.3%로 가장 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 표준시비에서 50% 감비한 조건에서는 Siga-Chata Mochi가 89.0%로 가장 높은 DPPH 활성억제 값을 보였고, Woo Co Chin Yu는 다른 시비조건에서와 마찬가지로 39.8%의 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 무시비 조건에서도 Siga-Chata Mochi가 88.4%로 가장 높은 항산화 활성을 보였고,

Woo Co Chin Yu가 41.5%로 가장 낮은 활성을 보였다. 시비조건에 따른 9개 품종의 평균 DPPH 활성억제능력을 살펴보면, 50% 증비구에서 62.6%로 가장 높은 억제율을 보였으며, 표준시비구(≒62.6%), 무처리구(61.4%), 50% 감비구(60.9%) 순으로 억제율을 보였다.

표 4-9. 시비수준에 따른 고향산화 벼 9품종의 DPPH활성 측정

품 종	시비수준			
	표준	50%증비	50%감비	무처리
	-----Inhibition (%)-----			
Hwei Ju	86.3	87.9	88.0	87.5
Tono Brea 439	48.4	45.9	48.3	49.9
Woo Co Chin Yu	38.9	43.3	39.8	41.5
AUS 196	88.4	88.0	86.8	88.1
Siga-Chata Mochi	88.5	85.9	89.0	88.4
Bandalbyeo	57.5	50.1	46.6	45.7
Jeongdaldo	55.5	57.2	54.9	55.4
Noindari	51.9	54.0	47.6	47.9
Jangwangdo	47.8	51.0	46.9	48.1
CV (%)	1.9	5.6	5.8	2.3
LSD (0.05)	2.0	6.0	6.1	2.4

#### 다) TBA 활성 측정

시비수준에 따른 고향산화벼 9품종의 TBA는 표 4-10과 같다. 중부지방 표준시비조건에서는 Bandalbyeo가 50.7%로 항산화 활성이 가장 높게 나타났고, HweiJu는 32.9%로 가장 낮은 항산화 활성을 보였다. 표준시비에서 50% 증비한 조건에서는 Noindari가 58%로 가장 높은 항산화 활성을 보였으며, 반면에 Hwei Ju는 43.8%로 가장 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 표준시비에서 50% 감비한 조건에서는 Siga-Chata Mochi가 57.7%로 가장 높은 지질과산화억제 활성 값을 보였고, Hwei Ju는 다른 시비조건에서와 마찬가지로 45.8%의 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 무시비 조건에서도 Noindari가 56.6%로 가장 높은 항산화 활성을 보였고, Woo Co Chin Yu가 32.4%로 가장 낮은 활성을 보였다. 시비조건에 따른 고향산화

벼 9개 품종의 TBA 활성능력을 살펴보면, 50% 감비구에서 54.1%로 가장 높은 억제율을 보였으며, 50% 증비구(51.8%), 무처리구(44%), 표준시비구(34.1%) 순으로 억제율을 보였다.

표 4-10. 시비수준에 따른 고향산화 벼 9품종의 TBA활성 측정

품 종	시비수준			
	표준	50%증비	50%감비	무처리
	-----Inhibition (%)-----			
Hwei Ju	32.89	43.76	45.80	40.88
Tono Brea 439	48.39	51.46	53.05	49.53
Woo Co Chin Yu	43.25	53.26	55.61	32.39
AUS 196	34.07	51.84	54.09	44.20
Siga-Chata Mochi	42.01	52.58	57.74	43.22
Bandalbyeo	50.66	51.24	53.47	41.22
Jeongdaldo	49.24	48.75	50.86	38.13
Noindari	49.70	57.97	57.37	56.55
Jangwangdo	34.00	54.43	52.16	45.19
CV (%)	25.00	17.02	22.40	44.85
LSD (0.05)	18.31	15.09	20.51	33.45

#### 라) ESR을 이용한 SOD 활성 비교

Hyperxanthine-xanthineoxidase system에서 발생한  $O_2^-$ 와 DMPO ESR spin trapping 은 그림 4-7에 나타냈으며, phenolic compounds의 하나인 gallic acid의 signal peak은 그림 4-8과 같이  $Mn^{2+}$ 에 비해 매우 작은 peak를 보였다. 또한, 표준 시비에 의한 Hweiju의 ESR signal은 그림 4-9와 같다.



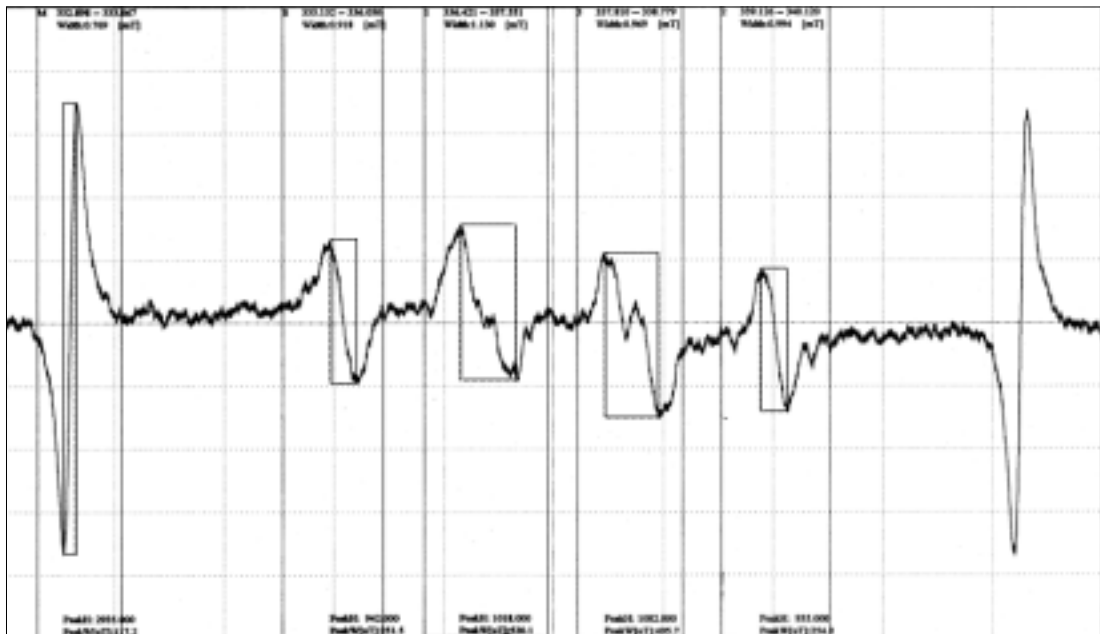


그림 4-7. DMPO 의 ESR 측정결과.

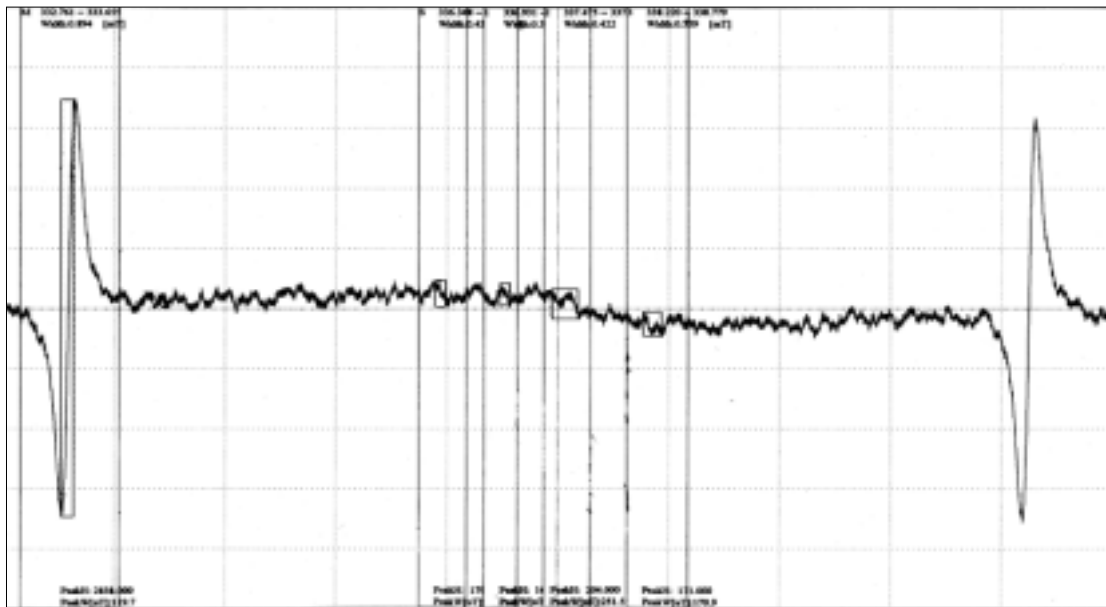


그림 4-8. Gallic acid 의 ESR측정결과.

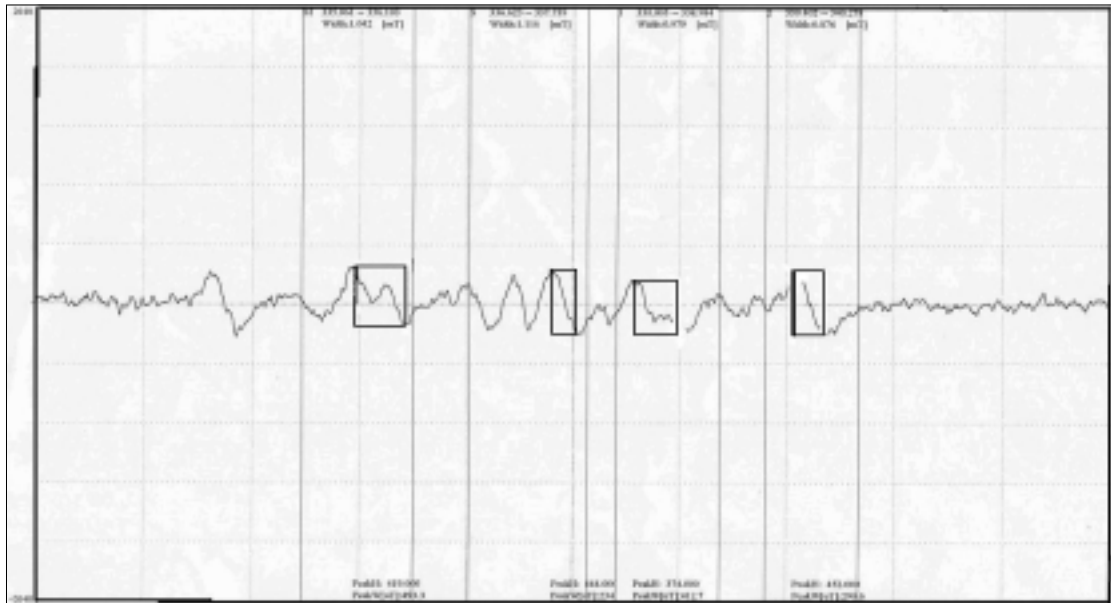


그림 4-9. 표준 시비에 의한 Hwei Ju의 ESR spectrum결과

#### 마) 활성물질분석(총 phenolic acids 함량)

시비수준에 따른 고향산화 품종의 총페놀 함량의 차이는 표 4-11과 같은 결과를 보였다. 비료를 전혀 주지 않은 무처리구에서는 Hwei Ju(0.6mg/g) 품종이 가장 많은 양의 페놀 물질을 함유하고 있었고, Tono Brea 439(0.28mg/g)는 가장 적은 양의 페놀 물질들을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 중부지방의 표준시비보다 50% 감비 처리한 실험구에서는 Hwei Ju(0.66mg/g)품종이 가장 많은 양의 페놀 물질을 함유하고 있었고, Woo Co Chin Yu(0.13 mg/g)는 가장 적은 양의 페놀 물질을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 중부지방을 기준으로 한 표준시비구 실험구에서는 Siga-Chata Mochi(0.66mg/g)품종이 가장 많은 양의 페놀 물질을 함유하고 있었으며, 반달벼(0.17mg/g)는 가장 적은 양의 페놀 물질을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 중부지방의 표준시비보다 50% 증비 처리한 실험구에서는 Hwei Ju(0.6mg/g)품종이 가장 많은 양의 페놀 물질을 함유하고 있었고, 자광도(0.19mg/g)는 가장 적은 양의 페놀 물질을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 시비수준에 따른 추출 수율은 무비구(1.65%) > 50% 감비구(1.4%) > 표준시비구(1.39%) > 50% 증비구(1.38%) 로 나타났고, 총페놀 함량도 수율과 같이 무비구(0.39mg/g) > 50% 감비구(0.34mg/g) > 표준시비구(0.33mg/g) > 50% 증비구(0.3mg/g) 순으로 나타났다.

표 4-11. 시비수준에 따른 품종간의 총 페놀 함량 및 추출 수율

	무처리		50%감비		표준시비		50%증비	
	총페놀함량 (mg/g)	수율 (%)	총페놀함량 (mg/g)	수율 (%)	총페놀함량 (mg/g)	수율 (%)	총페놀함량 (mg/g)	수율 (%)
HWEIJU	0.60	1.17	0.66	1.32	0.57	1.27	0.60	1.37
TONOBREA 439	0.28	1.40	0.33	1.56	0.23	1.21	0.28	1.31
WOO-CO CHIN-YU	0.31	1.87	0.13	0.99	0.22	1.37	0.24	1.50
AUS196	0.33	0.93	0.40	1.04	0.39	1.17	0.39	1.06
SIGA-CHATA MOCHI	0.52	1.81	0.60	1.69	0.67	1.82	0.56	1.67
반달벼	0.31	1.89	0.17	1.52	0.17	1.29	0.22	1.46
정달도	0.34	1.82	0.29	1.56	0.23	1.39	0.23	1.38
노인다리	0.39	2.07	0.27	1.69	0.22	1.38	0.23	1.42
자광도	0.41	1.93	0.19	1.22	0.31	1.66	0.19	1.27
<b>CV(%)</b>	13.57	10.23	17.01	13.03	17.83	10.71	11.91	9.69
<b>LSD(0.05)</b>	0.09	0.29	0.10	0.31	0.10	0.26	0.07	0.23

#### 다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험

##### 1) NBT환원법을 이용한 SOD효소 활성검정법

본 연구는 122개의 벼 유전자원에서 항산화활성 탐색을 위해 실시하였다. 표 4-12에 나타난 바에 의하면 활성산소소거에 관련된 효소계 반응을 위한 SOD 효소 활성검정도 종에 따라 많은 차이를 보였다. 진미벼, 장안벼, 상남발벼, 안산벼, 신동진벼에서 각각 34.6%, 17.6%, 17.3%, 17.2%, 17.2%로 다른 품종보다 비교적 높은 SOD 효소 활성 능력을 나타냈다. 반면, 양조벼, 수진벼, 흑향벼, 봉광벼에서는 각각 3.9%, 5.7%, 5.8%, 6.3%로 10%이하의 낮은 SOD 활성을 보였다. DPPH에 의한 항산화활성능력이 흑미에서는 현저하게 높게 나타났지만 SOD에 의한 항산화활성검정에서는 그다지 높게 나타나지 않았다.

##### 2) DPPH법을 이용한 자유라디칼소거(수소공여능) 활성검정법

DPPH는 수소공여능과 자유라디칼소거능 측정에 의해 항산화활성을 나타내는 검정법이다. 보라색인 불안정한 자유라디칼 DPPH는 항산화제나 라디칼감소시약에 의해 노란

색으로 변화한다. 표 4-12에 제시된 바와 같이 간척벼를 포함한 벼 장려품종 122종 DPPH에 의한 라디칼소거능은 벼품종에 따라 많은 차이를 보였다. 흑향벼, 흑남벼, 동안벼, 만금벼, 대청벼에서 각각 81.4%, 78.9%, 69.5%, 67.1%, 66.3%로 높은 항산화활성을 나타냈다. 반면, 아름벼, 팔공벼, 향미벼1호에서 각각 27.7%, 34.2%, 36.6%로 낮은 항산화활성을 나타냈다. 이는 흑미에 함유된 색소성분이 자유라디칼소거에 영향을 끼쳤을 것이라고 생각된다.

### 3) 추출수율

표 4-12에 나타난 바와 같이 벼 유전자원 122품종의 추출수율조사에서는 진부올벼와 흑진주벼가 각각 5.5%와 5.2%로 가장 많은 추출율을 보였고, 안산벼(4.9%), 아랑향찰벼(4.7%), 화산찰벼(4.7%), 설향찰벼(4.6%), 백진주벼(4.6%) 신선찰벼(4.4%), 대야벼(4.4%), 농립나1호(4.2%) 순으로 높은 수율을 보였다. 반면, 화명벼(1.7%)와 화삼벼(1.8%), 향미벼 1호(1.9%), 화진벼(2.0%)에서는 낮은 추출율을 나타냈다.

표 4-12. 벼유전자원 122종에 대한 DPPH에 의한 전자공여능과 SOD활성검정 및 추출수율

Cultivar	DPPH	SOD	수율
	-- Inhibition(%) --	-- Activity(%) --	---- % ----
간척벼	64.2	8.3	3.6
계화벼	64.0	12.9	3.7
고아미	63.2	17.1	3.2
광안벼	61.6	16.9	3.1
그루벼	62.1	13.8	3.2
금남벼	59.7	15.8	3.7
금오벼	58.7	10.7	3.7
금오벼1호	59.2	15.4	3.5
금오벼2호	38.7	13.1	3.9
낙동벼	63.7	8.0	3.3
남강벼	60.7	8.5	2.7
남원벼	57.7	11.3	3.7
남천벼	37.8	13.6	3.7
남평벼	65.0	12.2	3.7
내풍벼	56.2	14.7	3.6
농립나1호	40.7	14.4	4.2
농안벼	58.0	14.3	3.6
농호벼	61.7	14.5	2.7
다산벼	51.3	12.7	3.3
대립벼1호	59.8	12.1	3.8

(continued)

Cultivar	DPPH	SOD	수율
	-- Inhibition(%) --	-- Activity(%) --	--- % ---
삼백벼	49.7	10.1	5.2
삼천벼	50.0	15.3	3.7
상남밭벼	36.9	17.3	2.9
상미벼	59.5	13.7	3.9
상산벼	46.8	12.7	2.9
상주벼	52.3	12.5	4.1
상주찰벼	60.3	14.4	3.7
상평벼	54.1	16.4	4.1
새계화벼	59.5	15.4	3.8
새상주벼	45.0	11.3	3.4
새추청벼	56.5	12.6	3.3
서안벼	58.1	13.6	3.5
서진벼	57.6	10.7	3.8
석정벼	55.6	11.7	3.8
설갱벼	51.7	14.7	3.6
설향찰벼	45.0	11.7	4.4
소백벼	50.6	15.1	4.6
소비벼	55.6	8.3	4.2
수라벼	45.6	7.1	3.3
수진벼	57.1	5.7	3.5



(continued)

Cultivar	DPPH	SOD	수율
	-- Inhibition(%) --	-- Activity(%) --	--- % ---
일품벼	43.2	15.0	3.9
장안벼	44.3	17.6	3.9
조령벼	48.5	14.0	3.5
종남벼	54.0	16.3	2.6
주남벼	60.1	11.5	3.9
주안벼	49.1	12.0	3.1
중산벼	45.8	11.5	3.5
중안벼	48.8	13.1	3.7
중화벼	49.3	11.5	3.4
진미벼	43.6	34.6	3.7
진봉벼	51.8	8.3	3.8
진부벼	49.6	11.1	4.2
진부올벼	44.0	14.2	3.6
진부찰벼	49.6	10.9	4.0
진품벼	44.8	14.7	5.5
청명벼	51.8	12.4	4.2
추청벼	51.7	13.8	2.5
탐진벼	50.8	10.3	3.9
태봉벼	53.4	8.2	2.8
팔공벼	34.2	7.1	3.9

#### 4. 결과요약

##### 가. 야생종, 재래종에 대한 작물학적특성 조사 및 90종에 대한 고허산화활성 유전자 원평가 및 선발시험

- 1) 공시품종 중 품종군 별로 구분한 결과 일본형이 96품종(94%), 자바형이 5품종, 인도형이 1품종으로 일본형품종이 대부분을 차지하고 있었다.
- 2) 간장은 69.2~122.4cm 범위로 분포하였으며 50품종은 81~100cm 범위, 40품종은 101~120cm 범위에 있었다.
- 3) 수장은 16.5~30.4cm 범위로 분포하였고, 67품종이 20.1~25.0cm에 포함되어 있었다.
- 4) 수수는 7.7~21.0개 범위에 있었으며, 63품종이 10~15개 범위로 분포하고 있다.
- 5) 종실특성 중 천립중은 56품종이 20~25g 범위로 분포하고 있으며, 종피색은 백색이 대부분을 차지하고 있었고(93품종,) 담갈색과 갈색이 각각 2품종, 적색이 5품종인 것으로 나타났다.
- 6) SOD 활성에서는 아국도가 30.2%로 가장 높은 활성을 보였고, 재래륙도(27.7%), 반달벼 (27.4%) 순으로 높은 경향을 나타내며, DPPH 활성에서는 적도와 노인다리가 90.7%, 90.4%로 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.
- 7) 추출수율은 가위찰(5.2%)과 화성발찰(5.2%)이 제일 많았다.

##### 나. 외래종, 재래종, 유색미에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발, 1차년도에 선발된 품종에 대한 시비수준별 항산화활성 검정 및 관련물질 분석(총 phenolic acids 함량) 시험

- 1) 위 실험을 종합해보면 억제율은 50% 감비구(41.8%) > 50% 증비구(41.7%) > 무비구(39.4%) > 표준시비구(39.1%) 순으로 나타났으며, 표준시비보다 50% 감비 처리하는 것이 항산화능력이 높은 것으로 나타났다.
- 2) 시비수준에 따른 품종별 항산화능력은 Siga-Chata Mochi(49.5%)에서 가장 높았고, Jangwangdo(33.1%)에서 가장 낮은 억제율을 보였으며, 높은 억제율을 보인 상위 5품종(Siga-Chata Mochi, Hwei Ju, AUS 196, Noindari, Jeongdaldo)을 선발하였다.
- 3) 표준시비를 하는 것보다 감비처리나 무비 재배하는 시비법이 총페놀의 함량을 증가하게 하는 경향을 보였고, 수율과 총페놀함량은 정의 상관관계를 보여 수율이 높으면, 총페놀함량도 높은 경향으로 나타났으며, 유색미(Hwei Ju, AUS 196, Siga-Chata Mochi)가 일반미에 비해서 총페놀 함량이 높은 경향을 나타내고 있다.

#### 다. 재배종 벼에 대한 항산화활성 검정 및 고허산화품종 선발 시험

- 1) SOD 효소 활성검정에서는 진미벼, 장안벼, 상남발벼, 안산벼, 신동진벼에서 각각 34.6%, 17.6%, 17.3%, 17.2%, 17.2%로 높은 SOD 효소 활성 능력을 나타냈다.
- 2) DPPH에 의한 라디칼소거능은 흑향벼, 흑남벼, 동안벼, 만금벼, 대청벼에서 각각 81.4%, 78.9%, 69.5%, 67.1%, 66.3%로 높은 항산화활성을 나타냈다.
- 3) 추출수율조사에서는 진부올벼와 흑진주벼가 각각 5.5%와 5.2%로 가장 많은 추출율을 보였다.

#### 5. 참고문헌

1. Asada, K., Takahashi, M., and Nagate, M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agr. Biol. Chem.* 38: 471-473.
2. Baber, S. 1972. *In* D. F. Houston (ed.) Rice chemistry and technology. Amer. Assoc. Cereal Chemists. p. 237.
3. Beyer, W. F., Jr. and I. Fridovich. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some arge consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
4. Bridges, S. M. and Salin, M. L. (1981). Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* 68: 275-287.
5. Cho, M. H., H. H. Yoon, T. R. Hahn. (1996). Thermal stability of the major color component, cyanidin 3-glucoside, from a korean pigmented rice variety in aqueous solution. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.* 39(3): 245-248.
6. Choi H. Y., Jhun, E. J., Lim, B. O., Chung, I. M., Kyung, S. H. and Park D. K. Application of flow injection-chemiluminescence to the study of radical scavenging activity in plant. *Phytotherapy Research.* 14: 250-253.
7. Choi, H.C., and S.K. Oh. 1996. Diversity and function of pigments in colored rice. *K. J. Crop Sci.* 41:1-9.
8. Choi, S. W., S. H. Nam, and H. C. Choi. (1996). Antioxidatve activity of ethanolic extracts of rice brans. *Foods and Biothecnology.* 5(4): 305-309.
9. Choi, S. W., W. W. Kang, T. Osawa and S. Kawakushi. (1994). Antioxidatve activity of chryanthemin in black rice hulls. *Foods and Biothecnology.* 3(4):

233-237.

10. Chung I. M. and Kim, J. T. (1995). Screening of Biological active compounds and identification from major cultivated medicinal plant 1. the screening of bioactive substances from medicinal plant. RAD. Agri. Sci. J. 37, 161-168.
11. Chung, I. M., K. H. Kim, J. K. Ahn, and J. O. Lee (2000). Comparison of SOD and POD Activities in Rice Varieties. Korean J. of Crop Science. 45(5): 277-281.
12. Chung, I. M., K. H. Kim, J. K. Ahn, and J. O. Lee. (2000). Varietal Variation in Antioxidative Activity of Rice Grain by DPPH and TBA Methods. Korean J. of Crop Science. 45(4): 261-266.
13. Chung, I. M., Kim, K. H., and Ahn, J. K. (1998). Screening korean medicinal and food plants with antioxidant activity. Korean J. Medicinal Crop Sci. 6(4), 311-322
14. Chung, I. M., Yun, S. J., Kim, J. T., Gwag, J. G., Sung, J. D., and Suh, H. S. (1995). Test of superoxide dismutase characteristics and antioxidant activity in perilla leaves. Korean J. Crop Sci. 40(4), 504-511.
15. Cutler, R.G. (1984). In Free Radicals in Biology, Vol. 6, p. 371, Pryor, W.A. (ed.). Academic Press, Orlands
16. Droillard, M. J., Bureau, D., Paulin, A., and Daussant, J. (1989). Identification of different classes of superoxide dismutase in carnation petals. Electrophoresis 10: 46-48.
17. Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. Ann. Rev. Biochem. 44, 147-159.
18. Fukuzawa, K. and Y. Takaishi. 1990. Antioxidants. J. Act. Oxyg. Free Rad. 1: 55-70.
19. Halliwell, B. 1991. Drug antioxidant effects. Drugs. 42: 569-605.
20. Hiramatsu, M. and Kohno, M. (1987). Determination of superoxide dismutase activity by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. JEOL News. 23A. No 1. 7-9.
21. Kanematsu, S., and Asada, K. (1990). Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. Plant Cell Physiol. 31, 99-112.
22. Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. (1993). Possible mechanisms

- for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* 4, 85.
23. Lazarow, P.B., and, Y. Fujiki. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:489-530.
  24. Lin, D., Liu, X. and Li, W. (1989). Studies on pigments of red rice in China. *Shipin Yu Fajiao Gongye.* 4: 49.
  25. MaCord, J.M., and, I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
  26. Mitsuta, K., Mizuta Y., Kohno, M., Hiramatsu, M. and Mori, Akitane. (1990). application of ESR spin trapping technique to the evaluation of SOD like activity of biological substances. *Bull Chem. Soc. Jpn.* 63:187-191.
  27. Osawa, T., N. Ramarathnam, K. Shunro, N. Mitsuo, and T. Toru. 1985. Antioxidative defense system in rice hull against damage caused by oxygen radicals. *Agric. Biol. Chem.* 49(10): 3085-3087.
  28. Pan, S. M., and Yau, Y. Y. (1991). The isozymes of superoxide dismutase in rice. *Bot. Bull. Academia Sinica.* 32: 253-258.
  29. Punchard, N.A. and F.J. Kelly. 1996. *Free Radicals: A practical approach.* IRL Press. p. 1-6.
  30. Raa. J. 1971. Indole-3-Acetic acid levels and the role of indole-3- acetic acid oxidase in normal root and club-root of cabbage. *Plant Physiology.* 25:130-134.
  31. Ramarathnam, N., T. Osawa, M. Namiki, and T. Tashiro. 1986. Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seeds. *J. Sci. Food Agric.* 37:719-726.
  32. Ramarathnam, N., T. Osawa, M. Namiki, and T. Tashiro. 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a *c*-glycosyl flavonoid. *J. Agric. Food Chem.* 37: :316-319.
  33. Ramrathnam, N., Osawa, T., Kawakishi, S., Namiki, M. (1987). Effect of oxidative damage induced by r irradiation on germination potentials of rice seeds. *J. Agric. Food Chem.* 35: 8-1.
  34. Ramrathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakishi, S. (1988). Chemical

- studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation, and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* 36: 732-737.
35. Ramrathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakishi, S. (1989). Studies on changes in fatty acid composition and content of endogenous antioxidants during irradiation of rice seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 105-108.
36. Sakamoto, A., H. Ohsuga, and K. Tanaka. 1992. Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed. *Plant Mol. Biol.* 19:323-327.
37. SAS Institute. 1986. *SAS User's Guide; Basic.* 5th ed. SAS Institute, Cary, NC.
38. Seigler D.S. 1996. Chemistry and mechanism of allelopathic interactions. *Agric. J.* 88: 876-885.
39. Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 2: 213-215.
40. Takahashi, K. and Yakahashi, K. (1987). Red rice pigments and brewing of alcoholic beverages containing them. *J. Brew. Soc. Japan.* 82(10), 740.
41. Tolbert, N.E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50:133-157.
42. Wong, S.F., B. Holliwell, R. Richmond, and W.R. Skowronek. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem.* 14:127-134.
43. Wu, K., W. Zhang, P.B. Addis, R.J. Epley A.M. Salih, and J. Lehrfeld. 1994. Antioxidant properties of wild rice. *J. Agric. Food Chem.* 42:34-37.
44. Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, I. Ushara, K. Komagoe, Y. Fujita, and T. Okuda. 1989. Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37(7):1919-1923.
45. Yoshinaga, K., Yakahashi, K. and Yoshizawa, K. (1986). Liqueur with pigments of red rice. *J. Brew. Soc. Japan.* 81(5), 337.
46. 강미영, 최영희, 남석현. (1996). 유색미 쌀겨 추출물의 화학적 변이원 mitomycin C 에 대한 변이원성 억제기작. *한국농화학회지.* 39(6): 424-429.
47. 곽태순, 박희준. (1997). 미강의 약리성분 감마-오리자놀의 정량. *한국약용작물학회지.*

5(2):113-118.

48. 광태순, 박희준. (1998). 몇 가지 벼품종 현미층위별 향산화물질의 함량평가. 한국자원 식물학회지. 11(3):257-263.
49. 오세관, 최해춘, 조미영, 김수연. (1996). 유색미 안토시아닌계 및 탄닌계색소의 추출법. 한국농화학회지. 39(4): 327-331.
50. 윤혜현, 백영숙, 김준범, 한태룡. (1995). 한국산 유색미의 anthocyanin 색소동정. 한국 농화학회지. 38(6): 581-583.
51. 조수진, 백희준, 이상선, 정일민, 하지희, 강주섭, 고현철, 신인철, 이창호. (2000) 대두 (*Glycine max* (L.) Merrill.)에서 추출한 DDMP 사포닌의 활성산소종 제거작용. 한국 응용약물학회지. 12(1): 47-52.
52. 최해춘, 오세관. (1996). 유색미 색소의 종류와 기능. 한국작물학회지. 41권 (별호. 품질연구6호. p. 1-9.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 1차년도

#### 1. 연구개발 목표

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (2000)	<b>협동과제</b>  <b>(고 항 산 화 성 분 관련 시비조건 구명)</b>	<b>내용 : 질소 및 퇴비 시비수준에 따른 변이</b> - 질소수준에 따른 변이 구명 - 퇴비수준에 따른 변이 구명 - 공시재료 : 흑진주벼, 흑남벼, 일품벼 - 시험장소 : 단국대실습농장(충남 천안시 안서동 소재) - 시험방법 질소 사용량: 0.5N, 1N(표준비), 1.5N (표준시비량(N-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -K <sub>2</sub> O) : 11-6-7, kg/10a) 퇴비사용량: 0, 500, 1000kg/10a - 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주) - 시험구배치법 : 난괴법 3반복 - 기타 : 중부지방 벼 표준재배법에 준함 - 조사시기: 출수후 40, 50, 60, 70, 80일 - 조사항목 : · 항산화활성 검정: DPPH법, TBA법 · 항산화물질 분석: chrysanthemin(C-3-G) · 작물학적특성 조사
	<b>제 1 세부과제</b>  <b>(항산화활성 평가 및 활성물질 분석 방법 확립)</b>	<b>내용 : 각종 항산화활성 검정법과 활성물질분석법을 비교 검토하여 신속·정확한 검정기술 및 분석방법 확립</b> <b>항산화활성 검정방법(<i>in vitro</i>검정법)</b> - 공시재료 : AC 1423 외 17종(지난 2년간 시험선발된 품종) - 검정방법 : NBT법, DPPH법, TBA법, ESR법 이용 - 조사항목 : HPLC에 의한 항산화 물질 분석 항산화효과 측정 · 지질과산화억제활성 측정 · 지질과산화물 측정 · 활성산소소거능관련효소 측정(SOD활성 측정) · 단백질 정량 - 시험구배치법 : 난괴법 5반복  <b>생물학적 활성검정 (<i>in vivo</i>검정법)</b> - 공시재료 : 적색찰벼의 추출물 - 실험방법 : 실험동물 산화 모델 시스템을 이용(Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐) - 조사항목 : 조직의 병리학적분석 · 혈장 aminotransferase 활성측정 · 간조직중 cholesterol 및 triglyceride 측정 · Cytochrome P450에 미치는 영향 조사 · Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향 - 시험구배치법 : 난괴법 5반복

1차년도 (2000)	제 1 세부과제  (항산화활성 평가 및 활성물질 분석 방법 확립)	<b>활성물질 분석</b> - 분석시료 : 공시재료 추출물을 이용 - 검정방법 : · HPLC이용 - 대상물질 : isovitexin, chlorogenic acid, ferulic acid - 시험구배치법 : 난괴법 5반복
	제 2세부과제  (고항산화활성 벼 계통 육성)	<b>내용 : 고허산화활성 계통 육성 및 DNA marker 탐색</b>  <b>잡종집단, 계통재배 및 육성</b> - F <sub>1</sub> 상남발벼/거대배 등 10조합, F <sub>2</sub> 흑진주벼/거대배 등 5조합, F <sub>3</sub> 안산벼/가위찰 등 3조합, F <sub>4</sub> 흑남벼/가위찰 등 5조합의 집단(계통) 재배와 육성 - <b>항산화활성에 대한 선발효율</b> : F <sub>2</sub> 및 F <sub>3</sub> 에서의 개체선발효율을 후대검정법으로 검정 - 검정방법 : NBT법, DPPH법, TBA법, FI-CL법, ESR법 이용 - 조사항목 : 항산화효과 측정 · 지질과산화억제활성 측정 · 지질과산화물 측정 · 활성산소소거능관련효소 측정(SOD활성 측정) · 단백질 정량 - 시험구배치법 : 난괴법 5반복  <b>항산화활성 · 활성물질 선발지표 개발</b> - chrysanthem(C-3-G) 함량, SOD활성, DPPH활성 등에 대한 대량 검정용 지표 개발 : F <sub>2</sub> 및 F <sub>3</sub> 개체별 종피색도등과 항산화활성과의 관계구명 - <b>DNA marker 탐색</b> : 항산화활성에 큰 차이가 있는 유전자원 및 교배친을 이용한 PCR marker 탐색
	제 3세부과제  (고항산화활성 · 활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발)	<b>내용 : 고허산화활성 · 활성물질 유전자원평가 및 선발</b>  - 공시재료 : 100종(야생종, 재래종) - 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재) - 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준) - 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주) - 시험구배치법 : 난괴법 3반복 - 표준시비량(N-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -K <sub>2</sub> O) : 11-7-8(kg/10a) - 조사항목 : · 항산화활성 검정: NBT법(SOD활성), DPPH법 · 작물학적특성 조사

## 2. 연구 평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점, 척도 및 달성도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달 성 도 (%)
1차년도 (2000)	◎고항산화성분 관련 시비조건 구명 연구	20점	100
	◎항산화활성 평가방법 및 항산화물질 분석 방법확립	30점	100
	◎고항산화활성 벼 계통선발효과 및 선발지표효율성 연구	30점	100
	◎고항산화활성·활성물질함유 유전자원 평가 및 선발연구	20점	100

## 3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 국민의 주식량인 쌀의 품질 고급화와 다양화를 촉진시켜 소비자의 고급화, 다양화 요구를 충족시킬 수 있고, 쌀의 품질에 대한 국제경쟁력을 높일 수 있으며, 이를 통하여 쌀 자급기반이 유지될 수 있는 정보를 제공한다.

나. 항산화 성분 함량 및 항산화 성분 수량을 높이기 위한 수확시기의 중요성에 뿐 만 아니라 유색미의 항산화성분 함량을 높이려면 도복을 야기하지 않고 식미를 저하시키지 않는 범위 내에서 질소질 비료의 시비량 증가가 다소의 효과가 있음을 자료로 제공. 퇴비 시용의 효과가 뚜렷하지 않음도 자료로 활용 할 수 있다.

다. 쌀의 고부가치 상품화로 쌀 산업의 상업화 촉진으로 쌀 생산기반 붕괴방지 및 외국 쌀 도입억제 및 기능이 강화된 벼 재배를 통한 안정된 농가소득 보장함으로써 농촌사회의 안정화를 보장할 수 있다.

라. 쌀에 대한 항산화활성 평가방법 및 항산화물질 분석 방법확립 기초정보를 제공한다.

마. 쌀의 항산화 활성 증진을 목표로 한 육종연구로서는 국내 및 세계에서 가장 앞선 내용으로 평가되므로 본 연구를 거쳐 실용화가 가능한 품종이 개발되어 재배되는 시점이 되면 여러 가지 방법으로 쌀의 기능을 증진코자하는 육종연구가 활성화 되고 쌀의 이용분야도 훨씬 확대될 것이다.

바. 점차 확대되어가고 있는 선진국과의 종자산업 경쟁에서 쌀 품종에 대하여 우위를 점할 수 는 바탕이 마련되며 이미 선진국에서 시작되고 있는 고품질 쌀 품종개발에 능동적으로 대처 할 수 있는 기반을 조성할 수 있다.

사. 고항산화활성 쌀의 개발보급에 의하여 소비형태가 주식, 가공식품 및 건강식품용 등으로 다양화된 형태로 유도가 가능하다.



2차년도 (2001)	제 2세부과제 (고항산화활성 벼 계통 육성)	<p>내용 : 고항산화활성 계통 육성 및 DNA marker 탐색</p> <p>잡종집단(계통)재배 및 육성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- F<sub>1</sub> 10조합, F<sub>2</sub> 10조합, F<sub>3</sub> 5조합, F<sub>4</sub> 3조합, F<sub>5</sub> 5조합의 집단(계통) 재배와 육성</li> <li>- 항산화활성에 대한 선발효율 : 후대검정법으로 F<sub>3</sub> 및 F<sub>4</sub>에서의 개체선발 효율을 검정</li> <li>- 검정방법 : NBT법, ESR법 이용</li> <li>- 시험구배치법 : 난괴법 5반복</li> </ul> <p>항산화활성·활성물질 선발지표 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- chrysanthemin(C-3-G)의 항산화물질함량, DPPH, ESR등의 항산화활성 검정방법에 대한 대량검정용 지표 개발: F<sub>3</sub> 및 F<sub>4</sub> 개체별 종피색도, 배의 크기 등과 항산화 활성 및 활성물질과의 관계 구명</li> <li>- DNA marker 탐색 : 항산화 활성에 차이가 큰 F<sub>4</sub>-F<sub>5</sub> 계통을 이용한 PCR marker 탐색</li> </ul>
	제 3세부과제 (고항산화활성·활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발)	<p>내용 : 고항산화활성·활성물질 유전자원평가 및 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시재료 : 100종(유색미, 재배종)</li> <li>- 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재)</li> <li>- 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준)</li> <li>- 이앙시기 및 방법 : 5월 하순, 손이앙(1개체/주)</li> <li>- 시험구배치법 : 난괴법 3반복</li> <li>- 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) : 11-7-8(kg/10a)</li> <li>- 조사항목 : 항산화활성 검정: NBT법(SOD활성), DPPH법, TBA법 항산화물질 분석: 총 phenol 함량분석</li> </ul>

## 2. 연구 평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점 수)	달 성 도 (%)
2차년도 (2001)	◎고항산화성분 관련 재배조건 구명연구	20점	100
	◎천연항산화활성 물질 추출, 분리	30점	100
	◎고항산화활성 벼 계통 육성 효과 검정	30점	100
	◎고항산화활성·활성물질함유 유전자원 평가 및 선발연구	20점	100

### 3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 쌀의 건강 기능성 및 재배기술의 개발로 우리나라의 세계적 기술우위확보가 가능하다.

나. 고향산화활성 쌀의 특수기능 개발로 쌀을 원료로 한 고급가공식품을 생산하여 수출로 연결시킬 수 있는 가공산업의 획기적인 발달 가능성 제공 뿐만 아니라 급변하는 세계농업환경 및 쌀의 교역상황에 대하여 품질과 쌀 가공기술을 이용한 국제경쟁력 강화기능이 있다.

다. 식품 및 생체내에서 생성되는 극미량의 과산화물질 분리 및 정량법 확립, 신속, 정확, 특이적으로 분리, 정량하는 방법을 통해서 분리된 물질을 이용하여 식품의 초기 산화안정도의 검증 및 생체내에서 이 물질이 관련된 각종 질병의 발병 mechanism을 규명하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

라. 우리나라에서 제1의 식량작물인 쌀 함유 antioxidant activity를 갖는 항산화물질이 분리됨으로써,

- 1) 이를 이용한 식품의 제품 산화안정성 향상에 크게 기여할 뿐만 아니라
- 2) 과산화물로 야기되는 각종 질병을 예방하는데 일익을 담당할 것으로 기대된다.
- 3) 또한, 새로운 antioxidant의 screening법을 개발함으로써 천연에 존재하는 각 antioxidant의 검색에 기여할 것이다.

마. 쌀의 종피에 축적된 C3G함량이 크게 증진된 계통, C3G함량과 거대배가 조합된 계통, 그리고 ESR 과장강도로 측정된 항산화 활성이 높은 계통을 각각 개발함으로써 쌀의 기능성을 구체적인 육종목표로 하여 성과를 거둔 실례가 되었고, 이를 통해서 이분야 연구가 크게 발전할 것으로 생각된다.

바. 현재까지는 각종 기능성 건강식품의 원료가 되는 쌀은 그 특성을 거의 고려하지 않았으나 앞으로는 용도별로 가장 알맞은 기능성을 가진 원료 쌀을 이용한 고급 가공식품이 생산될 수 있다.

사. 특수한 건강 기능성 물질을 다량 함유하고 있는 벼 신소재를 이용하여 각종 건강식품 또는 건강증진제품이 만들어 질 수 있다.

### 제 3 절 3차년도

#### 1. 연구개발 목표

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
3차년도 (2002)	<p><b>협동과제</b></p> <p>(고항산화성분 생산환경조건 구명)</p>	<p><b>내용 : 등숙온도, 기온교차에 의한 변이구명 및 Ethephone처리에 따른 변이구명</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 등숙온도 및 기온교차에 따른 항산화성분 함량</li> <li>- 공시재료 : 흑진주벼, 흑남벼, 일품벼</li> <li>- 시험장소 : 단국대 실습농장(충남 천안시 안서동 소재)</li> <li>- 시험방법               <ul style="list-style-type: none"> <li>등숙온도처리: 15℃, 20℃, 25℃, 30℃</li> <li>기온교차처리: 33/17℃, 30/20℃, 27/22℃</li> </ul> </li> <li>- Ethephone처리에 따른 항산화성분 함량</li> <li>- 공시재료 : 흑진주벼, 흑남벼, 일품벼</li> <li>- 시험장소 : 단국대 실습농장(충남 천안시 안서동 소재)</li> <li>- 시험방법               <ul style="list-style-type: none"> <li>Ethephone처리시기: 출수전·후 10일 간격</li> <li>Ethephone처리농도: 무처리(대조구, 100, 500, 1000, 2000ppm)</li> </ul> </li> <li>- 시험구배치법 : 완전임의배치 4반복(1/5000a, Wagner pot시험)</li> <li>- 기타 : 중부지방 벼 표준재배법에 준함</li> <li>- 조사항목 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 항산화활성 측정: DPPH법, TBA법</li> <li>· 항산화물질 분석: isovitexin, chrysanthemin(C-3-G), oryzanol 등</li> <li>· 작물학적특성 조사</li> </ul> </li> </ul>
	<p><b>제 1세부과제</b></p> <p>(분리 동정된 된 활성물질 효과 비교)</p>	<p><b>내용 : 분리·동정된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험(In vitro, In vivo 측정법)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연항산화제로서의 도출을 위한 검사</li> <li>- 분리·정제된 물질과 기존 항산화제와의 활성 비교</li> <li>- 공시재료 : 분리·정제된 물질과 기존의 항산화제</li> <li>- 비교대상 항산화제 : BHT</li> <li>- 정제된 물질을 이용하여 항산화효과검정</li> <li>- 실험방법 : 실험동물 산화 모델 시스템을 이용(Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐)</li> <li>- 조사항목 : 조직의 병리학적분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 혈장 aminotransferase 활성측정</li> <li>· 간조직중 cholesterol 및 triglyceride 측정</li> <li>· Cytochrome P450에 미치는 영향 조사</li> <li>· Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향</li> </ul> </li> <li>- 시험구배치법 : 난괴법 5반복</li> </ul>

3차년도 (2002)	제 2세부과제  (고항산화활성 벼 계통 육성)	<p>내용: 고허산화활성 계통 육성 및 DNA marker 탐색</p> <p>잡종집단(계통재배) 및 육성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- F<sub>2</sub> 10조합, F<sub>3</sub> 10조합, F<sub>4</sub> 5조합, F<sub>5</sub> 3조합, F<sub>6</sub> 5조합의 집단 및 계통재배와 육성</li> <li>- 고허산화활성에 대한 선발효율 검정 : F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>, F<sub>3</sub>-F<sub>4</sub>, F<sub>4</sub>-F<sub>5</sub>간 관계를 고허산화활성 또는 활성물질별로 검토하여 유전분리세대에서 개체 또는 계통선발의 효과를 검정함</li> <li>- F<sub>1</sub> 10조합, F<sub>2</sub> 10조합, F<sub>3</sub> 5조합, F<sub>4</sub> 3조합, F<sub>5</sub> 5조합의 집단(계통) 재배와 육성</li> <li>- 고허산화활성에 대한 선발효율 : 후대검정법으로 F<sub>3</sub> 및 F<sub>4</sub>에서의 개체선발 효율을 검정</li> <li>- 검정방법 : ESR법 이용</li> <li>- 시험구배치법 : 난괴법 5반복</li> </ul> <p>항산화활성 · 활성물질 선발지표개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- chrysanthem(C-3-G) 함량에 대한 대량 검정용 지표개발 : 그 동안 개발한 지표를 이용하여 선발한 후대의 고허산화활성검정</li> <li>- DNA marker 탐색 : 그 동안 육성한 RI 계통을 이용하여 고허산화활성에 대한 PCR marker를 확정</li> </ul>
	제 3부과제  (고항산화활성 · 활성물질 함유 유전자원 평가 및 선발)	<p>내용 : 고허산화활성 · 활성물질 유전자원평가 및 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시재료 : 장려품종</li> <li>- 시험장소 : 건대실습농장(경기도 여주군 가남면 소재)</li> <li>- 시험방법 : 재배환경(중부지방 벼 표준재배법 기준)</li> <li>- 이양시기 및 방법 : 5월 하순, 손이양(1개체/주)</li> <li>- 시험구배치법 : 난괴법 3반복</li> <li>- 표준시비량(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) : 11-7-8(kg/10a)</li> <li>- 조사항목 : 고허산화활성 검정: NBT법(SOD활성), DPPH법</li> </ul>

## 2. 연구 평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점 수)	달성도 (%)
3차년도 (2002)	◎고항산화성분 생산환경조건 구명	20점	100
	◎천연항산화활성 물질 분리 동정 및 이용성 검정	20점	100
	◎고항산화활성 벼 계통 육성 효과 검정	20점	100
	◎고항산화활성 · 활성물질함유 유전자원 평가 및 선발연구	20점	100



### 3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 현재까지는 각종 기능성 건강식품의 원료가 되는 쌀은 그 특성을 거의 고려하지 않았으나 앞으로는 용도별로 가장 알맞은 기능성을 가진 원료 쌀을 이용한 고급 가공식품이 생산될 수 있을 것으로 생각된다.

나. 유색미의 생육과 수량 및 항산화성분 생산에 미치는 시비조건, 재배조건 및 일부 재배환경 조건을 종합적으로 검토한 이 연구는 실제 유색미의 재배와 생산 현장에서 크게 활용될 수 있는 실질적 연구 결과라 사료된다.

다. 유색미의 항산화성분 함량 및 생산량은 등숙온도 24℃에서 가장 높으며 이보다 고온이거나 저온이면 감소함을 지도사업 자료로 활용 할 수 있다.

라. 특수한 건강 기능성 물질을 다량 함유하고 있는 벼 신소재를 이용하여 각종 건강식품 또는 건강증진제품이 만들어 질 수 있는 가능성이 있다.

마. 고향산화활성 쌀이 생산되어 가공산업체와 농가간의 계약 재배면적이 증가하여 농가의 안정적 소득이 보장될 것으로 생각된다.

바. 지금까지 우리 나라 벼 재배는 상업적이라고 보기 어려웠으나 앞으로는 상업성이 추가된 쌀 산업으로 변화할 것인데 고향산화활성 벼 재배는 그 높은 부가가치성 때문에 쌀 산업의 활성화를 촉진할 것으로 생각된다..

사. 다양한 천연물로부터 항산화활성물질의 screening법의 개발은 다른 생리 활성 물질의 검색에도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

아. 쌀의 C3G함량의 선발지표, 유색미 계통의 ESR 과장강도 측정방법, 항산화 활성과 관련된 분자마커의 개발, C3G함량의 유전분리와 선발효과 등 이 분야 육종효율을 증진시킬 수 있는 기초기술도 개발하였기 때문에 항산화 활성 증진을 위한 육종은 더욱 활성화 될 것으로 생각된다.

자. 쌀의 기능성 및 기능성 물질에 대한 유전자원의 검토가 체계적으로 이루어져 앞으로 이러한 정보를 품종육종을 위한 소재로 이용 할 수 있다.

## 제 4 절 학문 발전에의 기여도

본 연구는 우리의 주식인 쌀에 대한 항산화활성에 대한 육종, 생리생태, 생산 및 활성 물질분석에 대한 연구이다. 따라서 본 연구는 작물학, 생리학, 육종학, 식품학 분야의 발전에 기여 했다고 생각한다. 본 연구의 결과는 아래와 같이 학술지, 학술대회에서 발표 되었다.

1. 정일민, 지희연, 김현정, 전지선, 이창호, 이선주. 2003. 알콜에 의하여 유도된 산화적 스트레스에 대한 플라보노이드 성분 함유 벼 추출물의 효과. **한국작물학회지 제48권 별호: p.65.**
2. Ateeque Ahmad, 김광호, 안종국, 한상준, 정일민. 2003. Chemical constituents of brown waxy rice grains *Oryza sativa*. **한국작물학회지 제48권 별호: p.66.**
3. 채제천, 이동진, 전대경, 류수노. 2003. 등숙온도에 따른 흑진주벼의 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 변이. **한국작물학회지 제48권 별호: p.313.**
4. 채제천, 이동진, 전대경, 류수노. 2002. 이앙시기 및 재배지역에 따른 흑진주벼의 안토시아닌계색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 변이. **한국작물학회지 제47권 별호: p.230.**
5. 채제천, 전대경, 류수노. 2001. 질소 및 퇴비 수준에 따른 벼 품종의 등숙기간별 안토시아닌 색소 C3G 함량. **한국작물학회지 제46권 별책1호: p.152-153.**
6. 채제천, 이동진, 전대경, 류수노. 2001. 질소수준에 따른 벼 품종의 등숙기간별 항산화 활성 변화. **한국작물학회지 제46권 별책2호: p.218-219.**
7. 정일민, 김광호, 안종국, 이진옥, 이선주, 김승현 .2001. Test of antioxidative activity on rice varieties by nitrogen and piggery manure appilcation level. **한국작물학회지 제46권 별책1호: p.74-75.**
8. 김광호, 안종국, 정일민, 이정희, 이선주, 김승현. 2001. Study of antioxidative substances screening and analysis on rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **한국식물조직배양학회 · 한국육종학회 공동 국제심포지움. p.136.**
9. 김광호, 정일민, 김연식, 서경인, 이정희. 2001. Distribution og cyanidin-3-glucoside (C3G) content of brown rice grain in F2 population of pigmented rice combination. **한국식물조직배양학회 · 한국육종학회 공동 국제심포지움. p.139.**
10. 정일민, 김광호, 안종국, 이시경, 이진옥. (2001. Test of antioxidative activity on rice Grain using FI-CL and ESResonance methods. **한국작물학회지. 46(5): 411-415.**

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

#### 1. 기능성물질적인 측면

가. 각종 천연물 특히 식물이나 한약재에서는 많은 종류의 항산화 효과가 있는 물질이 확인되었고 상당수의 식물재료들은 수천년 동안 우리 인간이 먹어 왔기 때문에 안전성 면에서도 문제가 없을 것으로 보이는데 천연 항산화제가 폭넓게 상품화되지 않은 이유도 대사연구가 미흡하기 때문이다. 따라서 본 연구도 지난 3년간의 연구를 통하여 쌀 함유 항산화활성물질 분석과 관련하여 *in vitro* 내에서의 항산화물질의 기능평가방법은 어느 정도 확립되었으나 *in vivo*를 통한 기능평가 확립과 false negative와 false positive 현상을 방지하기 위해서 실험동물에 직접 투여하여 항산화물질이 인체대사에 어떠한 영향을 줄 것인지에 대한 쌀의 기능성물질에 대한 생체내에서의 기능연구가 미흡하여 대사연구를 비롯한 기능평가부분에서 추가 연구가 반드시 이루어져야 할 것으로 생각된다.

나. 항산화물질 대부분이 우리가 오랫동안 식용해 왔던 식재료로부터 추출하였으나 정제된 순수 물질로 식품에 첨가하는 경우 원래 식재료의 양으로 환산하면 상당히 많은 양이므로 이에 대한 독성이 검토되어야 할 것이며, 아울러 농축된 형태로 첨가했을 때 첨가하는 식품 성분과의 상호 반응도 면밀히 연구되어 안전성등의 추가연구에서 반드시 검증되어야 할 것으로 생각된다.

#### 2. 품종육종적인 측면

가. 본 연구개발 중 “고 항산화활성 품종육성을 위한 벼 계통육성 연구”는 3년밖에 안되는 짧은 기간동안 F<sub>1</sub>에서 F<sub>7</sub>까지의 잡종집단 및 계통을 육성하는 큰 성과를 거두었다. 이는 본 연구가 시작되기 3-4년 전부터 이미 항산화활성과 관련된 육종재료를 작성하여 세대를 진전시켜왔기 때문에 가능한 일이다.

나. 그러나 본 연구개발을 통해서 육성한 계통 중 우수한 것을 선발하여 신품종으로 등록할 수 있는 생산력검정 및 지역적응성검정을 할 수는 없었다. 2003년 현재 고 항산화 활성 7계통의 생산력검정예비시험이 진행되고 있지만, 2003년 가을에 가야 그 결과를 알 수 있고, 거기서 선발된 것을 생산력검정 본시험과 지역적응성시험을 거쳐야 하기 때문에 최소

2004년 및 2005년까지 추가연구를 해야 신제품등록 요건을 갖추 수 있게 된다.

다. 본 연구개발을 통해서 육성한 계통들이 ① 항산화물질인 C3G함량이 특별히 높은 계통, ② SOD활성 및 ESR 파장강도로 선발한 고 항산화 활성 계통, 그리고 ③ C3G함량이 높으면서 거대배를 가진 계통이기 때문에 국내에서는 물론 국제적으로도 이와 같은 특성을 가진 계통육성에서 가장 앞선 결과라 생각한다. 따라서 이런 우수한 특성을 가진 육성계통을 실용화하기 위한 추가연구가 꼭 필요하다고 생각된다.

## 제 2 절 타 연구에의 응용

1. 본 연구개발을 통해서 육성된 고 항산화 활성 계통들은 쌀을 기능성 식품소재로 이용하여 부가가치를 높이려는 것이 목적이기 때문에 쌀을 이용한 기능성식품개발연구에 이용될 수 있다.

2. 미래에는 식품의 1차 기능 (기호성), 2차 기능 (영양성), 3차 기능 (생체리듬 조절기능)을 고루 갖춘 식자재가 요구된다. 즉 식품의 design 시대와 더불어 국민의 주 식량인 쌀도 공해물질로부터 안전하며 생리활성이 높을수록 높은 부가가치를 얻게 될 것이므로 식품산업에 응용 될 것이다.

3. 각종 기능성이 강화된 벼가 다양하게 개발되어 식용으로 직접 이용하거나 늘어나는 가공용 쌀의 수요를 안정되게 충족할 수 있으며 쌀 가공식품의 고급화가 이룩되고 수출산업으로 연결될 수도 있다.

4. 쌀의 이용분야를 확대하기 위한 다양한 특성을 가진 육종연구 소재로 이용될 수 있다.

## 제 3 절 기업화 추진방안

추가연구를 통해 고 항산화 활성 품종이 개발되면 지역농협이나 농업기술센터, 쌀 전문 생산단체 또는 쌀 전문 유통회사에게 종자를 공급하여 특산단지를 조성하여 계약재배토록 유도할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구와 관련하여 해외에서 수집한 직접적인 과학기술정보는 없으나 우리와 같은 특성의 쌀을 좋아하는 일본에서는 멥쌀을 포함한 미립의 특성과 가공적성과의 관계에 많은 기초연구가 이루어져, 이미 술쌀 또는 떡살용 품종이 육성되고 있다. 주로 가공용 수요에 부응하기 위하여 수요확대를 위한 신형질 쌀의 개발 계획하에 초저아밀로스, 고아밀로스, 초다수쌀, 거대립쌀, 향미, 당질미, 거대배, 유색미, 분질미, 고단백미, 저단백미 품종을 개발 중에 있고 일부는 품종으로 명명되어 농가에 보급되고 있으며 특히 low allergy 쌀(AFT-14), 혈당을 저하시키는 쌀, 최근에는 비타민 A가 함유된 golden rice 등 기능성 품종을 육성하였다.

## 주 의

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