

쌀의 항변이원성 물질 검색

강 미 영

경북대학교 사범대학 가정교육과

Screening of Antimutagenic Substances in Rice

Mi-Young Kang

Dept. of Home Economics Education, Kyungpook National University

서 론

최근에 이루어지고 있는 식품성분에 대한 새로운 관점에서의 연구동향에 의하면 식품을 경유하여 인체내로 들어오는 외래성 인자(식품기원의 생체조절 기능성인자)가 생체의 생리기능조절계(신경계, 순환계, 분비계, 소화계, 세포분화증식계, 생체방어계 등)로서 작용하고 있는 내재성 인자에 대해서 상호작용 또는 자극작용을 하면서 직접, 간접적으로 생체조절에 어떠한 기능을 하는가에 대한 관심이 고조 되고 있다. 즉, 산업화와 더불어 변이원성 물질과 인체가 접촉할 가능성이 증가 되었을 뿐 아니라 식생활 환경이 복잡하고 다양해짐에 따라 암을 위시한 성인병의 발병율이 높아지고 있기 때문에 각종 식품들이 가지는 생리적 활성에 대한 관심이 점차 높아지면서, 약용식품^{1,3)}이나 식품의 가공과정 중 생성되는 갈변반응 생성물들^{4,6)}의 변이원성 및 항변이원성에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있는 것이다.

한편, 우리나라 농업의 기간 작목 역할을 하면서 주식으로 이용되고 있는 쌀의 육종 및 이용에 관한 연구는 다수화 품종의 개발 및 취반적 합성에 관해서 주로 이루어졌다. 그러나 최근에는 식생활 양상의 변화에 따른 쌀소비 감

소현상이 두드러지게 나타나고 있으며, 국제적으로 쌀시장 개방압력이 심화되고 있으므로 이에 대처하기 위한 쌀품종 육종 방안이 절실이 요구되는 시점이라 하겠다. 그러므로 쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질에 대한 검색을 실시하여, 주식으로 매일 섭취하고 있는 쌀의 생리활성기능에 대한 새로운 인식으로부터 쌀소비를 유도 할 뿐만 아니라, 지질과 산화 억제에 의한 변이원성 억제효과에 대해서 널리 알려진 poly-phenol화합물⁷⁾이 많으리라 예상되는 변이종 쌀 중에서 항암 및 항바이러스 생리활성 물질을 생산하기 위한 고부가가치성 농업 신소재로써의 개발가능성을 타진하여 지금까지의 육종목표와는 다른 새로운 방향의 쌀품종 육종노력이 필요한 것이다. 여러 품종의 쌀종에서 취반에는 부적합하지만 현미의 색깔이 옅은 갈색으로부터 흑자색에 이르기 까지 다양한 품종이 있는 유색미(紫稻)는 흰색 쌀의 선조 이리라 추정되고 있으며, 유색미로부터 황백색의 돌연변이가 생겨나 여러 종류의 재배벼(흰쌀)로 개량 발전된 것이다⁸⁾. 이러한 유색미의 미질이나 식미는 개량품종들에 비해서 뒤떨어지지만 생육이 왕성하고 다수화성이며 여러 종류의 재배벼(일반적인 취반용 쌀)보다 종자의 발아능력이 뛰어나다. 이것은 아마도 종자내의 발아능력을 유지시켜

주는 생리활성 물질이 타 품종에 비하여 다량 포함되어 있음을 의미 한다고 하겠다. 이러한 맥락에서, 취반에는 부적합 하지만 종자의 발아 능력이 뛰어나며 항암효과가 보고된 탄닌계 및 안토시아닌계 색소를 함유하는 유색미의 경우, 그 이용 방법의 개발여하에 따라 생리활성물질(항변이원성 및 항암성)이 풍부한 식품의 원료로서 개발이 기대되는 벼 품종이라 할 수 있겠다. 이에, 쌀 3품종(추청, 香稻, 紫稻)의 품종별 부위별 항변이원성을 측정비교 하였으며 유색미로부터 항변이원성을 나타내는 성분을 분리하여 그 물질의 구조적인 특성 및 작용기전을 고찰하였다.

1. 쌀의 항변이원성 측정

쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질의 측정을 위하여 SOS chromotest를 이용하였다. SOS chromotest란 미생물을 이용하여 변이원성을 측정하는 방법으로서 반응이 유도되는 즉시 비색측정법을 이용하여 정량적으로 단시간에 변이원성 유발여부를 검색할 수 있다는 점 및 Ames test와 비교하여 식품과 같은 혼합물의 변이원성 여부 측정에 따른 실험방법상의 번잡성이 적다는 이점이 있다. 즉, 미생물인 *E. coli* PQ37 변이원성 유발물질(자외선, Mitomycin C, Aflatoxin B₁)에 의해서 DNA상에 손상을 입었을 때 손상을 수복하기 위한 일련의 반응이 유도되는 현상을 SOS response(SOS 반응)라 하며⁹⁾, SOS chromotest에 사용하는 균주는 *E. coli* PQ37 균주로서 *E. coli* PQ37 균주의 SOS 유전자들사이에 sulA : lacZ 용합유전자 (lacZ유전자의 앞부분에 위치한 조절부분을 떼어내고 sulA유전자를 용합시킨 것)를 삽입시킨 것을 사용한다. 이렇게 함으로서 lacZ유전자는 sulA유전자 발현에 따라 발현하게 되는 것이다. 한편, sulA유전자는 SOS유전자 중의 하나이므로 *E. coli* PQ37 균주가 변이원성 물질에 노출되었을 경우 SOS반응이 유도되어 sulA 유전자가 발현되고 결과적으로 lacZ 유전자가 발현하게 되는 것이다. 그리고 lacZ 유전자는 β-galactosidase를 생성하게 하는 유전자이

므로 β-galactosidase의 활성을 측정함으로서 lacZ 유전자의 발현도를 알 수 있게 되며 이는 바로 sulA 유전자의 발현에 의하여 이루어진 것이므로 SOS반응 정도를 나타낸 것이라고 할 수 있게 된다. 이러한 SOS chromotest를 이용하여 장차 항변이원성 시료로써 이용할 쌀 시료들은 70% 에탄올 추출물을 염어서 일정량의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여서 사용하였다. 우선 각 종변이원들의 *E. coli* PQ37 균주에 대한 변이활성(β-galactosidase 유도 활성)을 측정해 보면 Table 1과 같았으며, 이를 변이활성에 대한 쌀시료(추청 겨층 CHCl₃ 분획)의 항변이원성을 Table 1과 같았다.

Table 1. Desmutagenic effects by using SOS chromotest of rice extract on various mutagens

| Mutagen | Concentration (μg/tube) | β-Galactosidase activity(units) | | |
|--|----------------------------|---------------------------------|------------------|--------------|
| | | Negative control | Positive control | Rice extract |
| Mitomycin C | 1 | 32.1 | 290 | 172 |
| N-Nitromethyl urea | 10 | 56.6 | 206 | 125 |
| 4-Nitroquinoline oxide | 3 | 39.1 | 113 | 87 |
| 2,4,7-Trinitro-9-fluorene | 0.03 | 41.0 | 225 | 84 |
| Trp-1 (+S9 mixture) | 3 | 29.9 | 232 | 165 |
| Aflatoxin B ₁ (-S9 mixture) | 3 | 36.0 | 394 | 148 |

Negative control : Added DMSO.
Rice extract (100 mg/ml DMSO).

쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질의 단리 및 정제를 실시하여 이를 항변이원성 물질의 항변이 작용기전을 밝히는데 본 연구의 목적으로 삼고자 하므로 여러 변이원 중에서 DNA의 손상기작이 상세히 알려져 있는 Mitomycin C를 선택하여 실험을 진행시키고자 한다. SOS chromotest 측정계에 mitomycin C의 양을 점진적으로 증가시키면 Fig. 1과 같이 변이활성이 증가하고 있음을 알 수 있다. 본 실험에서는 쌀추출 시료에 의한 항변이원성 측정에 적당한 mitomycin C의 양으로서 변이활성 50% 포화의 상태를 나타내는 0.3μg/tube의 양으로 결정하였다. 그리고 쌀추출 시료의 mitomycin C(0.3μg/tube)에 대한 항변이

원성 측정용 적정농도 설정을 위해서 시료의 양을 점차로 증가 시켰을 때의 변이원성 억제 정도를 측정하였더니 Fig. 2와 같았다. 쌀추출시료의 양을 증가 시킬수록 유도되는 β -galactosidase의 활성은 낮아짐을 알 수 있다. 이에 쌀 추출시료에 의한 변이원성 억제정도가 거의 직선 영역을 나타내는 일정 지점인 2mg/tube의 양으로서 결정하였다.

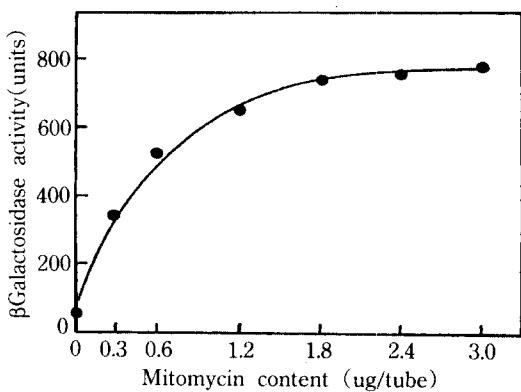


Fig. 1. Mutagenic activity of mitomycin concentration.

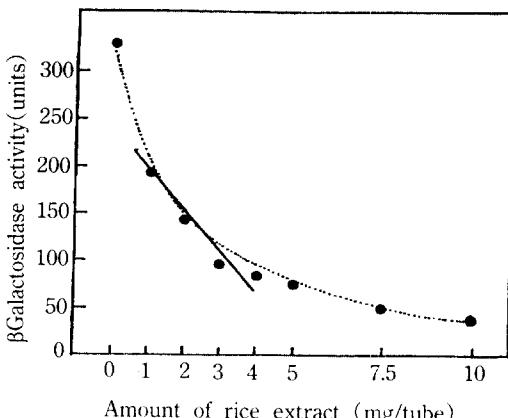


Fig. 2. Mutagenic activity of the rice extract on mitomycin C.

2. 항변이 활성단위 측정법의 개발

쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질을 분리 농축하고 항변이활성을 지금까지 조사된 약용 식물이나 건강식품 유래의 항변이원성 물질이 보유하는 항변이활성과 비교하기 위해서는 항변이 활성단위 측정법 설정이 선행되어져야 한다고 생각되어 진다. 한편, 본실험에서 변이원 활성 측정법으로서 사용하고 있는 SOS chromotest는 변이원 활성의 정도를 측정하기에 간편하므로, 항변이원 활성단위를 설정하고자 다음과 같은 방법을 고안 하였다.

변이원성 물질로서 mitomycin C를 쌀 추출물(항변이원성 물질)과 반응시켰을 때 mitomycin C에 기인하는 변이원성 유도값에 대한, 시료의 억제정도를 수치화하여 항변이 활성단위로써 나타내기로 한 것이다. 우선 쌀 추출물의 mitomycin C에 기인하는 변이원성의 억제정도인 항변이 활성은 다음의 수식에 의해서 구한다.

항변이 활성 (%)

$$= \frac{[변이원 + 시료(쌀시료)]첨가시의 \beta\text{-galactosidase 활성}}{\text{변이원 첨가시의 } \beta\text{-galactosidase 활성}} \times 100$$

이러한 항변이 활성을 첨가하는 쌀 추출물의 양을 달리하면서 측정하여 log plot 하면 Fig. 3과같이 거의 직선에 가까운 그래프를 얻는다.

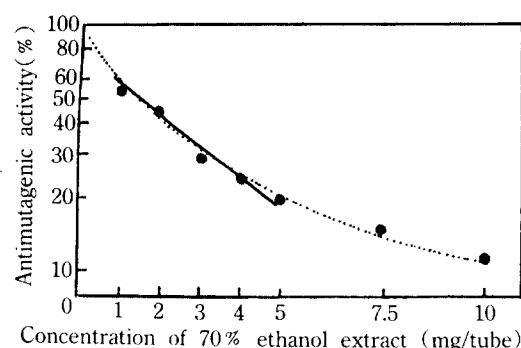


Fig. 3. Dose-response of 70% ethanol extract from rice bran in antimutagenic effects on the mutagenicity of mitomycin C(O. 3 μ g/tube) by *E. coli* PQ 37.

이에, 항변이 활성을 50%를 나타내는 시료의 양을 1Unit라 정의한다면, 측정하고자 하는 시료의 항변이 활성단위(unit)를 <식 1>에 의해서 계산할 수 있다.

$$\text{시료의 항변이원성 활성단위(units)} = 6.645 - \frac{\log \text{항변이 활성}}{0.3010} \quad <\text{식 } 1>$$

3. 쌀의 품종별 항변이활성 비교

SOS chromotest를 이용하여 개발한 항변이 활성 단위측정법을 이용하여 취반용인 쌀인 추청과 취반에 부적합한 변이종 쌀인 향도(香稻)와 자도(紫稻) 등 3품종의 쌀을 격층부위와 백미부위로 나누어서 각각 70%에탄올 추출물을 얻은 후 그 회수량과 항변이 활성을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. The comparison of antimutagenic activities among rice varieties

| Varieties | | Recovery | Antimutagenic activity | |
|-------------------|------------|----------|------------------------|-------------------------|
| | | (%) | Units/mg | Total activities(units) |
| Chu-chung | Rice bran | 8.9 | 0.118 | 1050 |
| | White rice | 0.53 | 0.233 | 124 |
| (Smelled rice) | Rice bran | 4.4 | 0.210 | 922 |
| | White rice | 0.73 | 0.485 | 354 |
| (Colored rice) | Rice bran | 7.7 | 0.206 | 1590 |
| | White rice | 0.67 | 0.429 | 287 |
| (100g dry weight) | | | | |

Table 2에 나타내는 바와 같이 쌀 추출물 mg당 항변이활성은 어느 품종에서나 격층이 백미층에 비해서 약 2배 가량 높았다. 그러나, 백미층은 격층에 비해 70%에탄올 추출물의 회수량이 너무 적으므로 total activity는 낮다. 그리고 쌀 품종 중에서는 자도의 항변이활성이 높은 것을 알 수 있다. 한편, 쌀과 그 밖의 곡류 및 두류 몇몇 식품에 대해서 항변이 활성을 측정, 비교하여 보면 Table 3에 나타내는 바와 같이 다른 곡류 및 두류에 비해서 쌀(백미)의 항변이 활성이 낮은 것을 알 수 있다.

Table 3. The comparison of antimutagenic activities among 70% ethanol extract from cereals and beans

| Varieties | Recovery (%) | Antimutagenic activity(units) | |
|------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|
| | | Units/mg | Total activities(units) |
| White rice | 1.18 | 0.36 | 131.8 |
| Brown rice | 2.36 | 0.64 | 300.4 |
| Sorghum | 6.56 | 0.07 | 87.12 |
| Job's tear | 7.88 | 0.18 | 290.7 |
| Buckwheat | 3.77 | 0.63 | 475.0 |
| Millet | 6.37 | 0.18 | 227.9 |
| Small red bean | 5.45 | 0.60 | 659.5 |
| Black bean | 10.68 | 0.36 | 773.6 |
| Soybean | 5.71 | 0.18 | 203.5 |
| (20g dry weight) | | | |

4. 쌀의 항변이원성 작용기전

항변이원성이라는 어휘는 매우 포괄적인 의미를 내포하므로, 변이원 활성을 억제하는 효과에 대한 각 대사단계의 특징을 고려하여 desmutagen(세포밖에서 억제작용: 변이원성 물질의 불활성화, 전구물질이 변이원성 물질로 바뀌는 과정의 억제, 변이원성 물질의 흡수를 억제)과 antimutagen(세포안에서의 억제 작용: 목표물인 유전자에 도달하는 것을 억제, 변이원성 물질을 제거, 손상받은 DNA를 수복시키는 작용, 일단 DNA 손상을 입은 즉시 더 이상의 손상을 억제하는 작용)으로 구분할 수 있다¹⁰⁾. 한편, SOS chromotest방법을 이용한 항변이원성의 검색은 변이원성 물질(예를 들어 자외선조사, Aflatoxin B₁, Mitomycin C, 4-Nitroquinolin 1-oxide)과 시료를 반응시켜, 변이원성 물질이 나타내는 유도값과의 비교로써 항변이원성의 정도를 측정하게 되는 것이다. 그러므로 본 연구에 사용되었던 쌀 추출물 시료의 항변이원성 작용은 위에서 언급한 어느 단계를 억제하는지 정확히 알 수는 없으나 실험조건의 설정에 따라 작용기전을 유추하는 정도는 가능하리라 생각되어 진다. 따라서 쌀 추출물이 나타내는 항변이원성이 위에서 설명한 desmutagen으로서의 효과에 기인한 것인지, 또는 antimutagen의 효과에 의한 것인지를 알아보기 위하여 다음과 같은 2가지 실험을 실

시하였다. 첫째, 변이원과 추출물로 동시에 지시세포를 처리한 다음 재차 배양하여서 경시적으로 세포의 생장과 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4에 보여지는 바와 같이 β -galactosidase의 활성 증가보다 세포의 생장 증가 속도가 빠른 것을 알 수 있다. 이것은 변이원에 의해서 DNA의 손상을 받은 세포의 증가율은 완만한데에 반하여 변이원의 영향을 받지 않은 세포가 급격히 성장함으로써 나타나는 현상으로 생각되며, 쌀 추출물의 항변이원성은 아마도 세포밖에서 변이원성 물질과의 상호작용으로 변이원을 blocking하던지 또는 세포의 막에 작용하여 변이원의 세포내 유입을 방해한 결과 나타나는 현상이라고 추정 가능하다. 이와 같은 가정을 뒷받침 하기 위해서 두번째의 실험을 다음과 같이 행하였다. 지시세포를 변이원으로 처리하여 DNA 손상을 유도시킨 다음 쌀 추출물을 경시적으로 투여하여 세포생장과 β -galactosidase의 활성을 측정하면 Fig. 5에서 보여지는 바와 같이 세포의 생장은 정지되어 있는 반면 β -galactosidase의 활성은 시간이 지나감에 따라 급격히 저하하는 현상이 관찰되는데 이것은 세포의 생장저지 및 사멸기에 β -galactosidase가 불안정화된 결과로 보여진다. 따라서 일단 DNA가 손상된 다음은 쌀 추출물에 의한 항변이원 활성이 관찰되지 않는 것으로 보아 쌀 추출물에는 DNA를 수복시키는 작용이나 더 이상의 손상을 억제하는 등의 세포내에서의 억제작용은 없다고 생각되며 이 결과는 첫번째의 실험과 일치한다. 이상의 두가지 실험에 의하여 얻어진 결과들을 종합 해석해보면 쌀에 의한 항변이원성은 아마도 지시세포 밖에서 desmutagen의 성격을 가진 작용기전을 통하여 나타나는 현상이라고 결론 지을수 있을것이다. 그러나 이 결과도 아직 쌀 추출물의 항변이원성 기전에 대한 초보적인 결론에 불과하다. 왜냐하면 *E.coli*의 β -galactosidase는 상당히 안정한 단백질이므로 β -galactosidase의 turn over율을 감안하지 않으면 효소의 경시적 *E.coli* 활성변화를 정확히 측정할 수 없기 때문이다. 원핵세포인 *E.coli*에서는 유전자에서 mRNA의 전사 및 단백질의 해독단계가

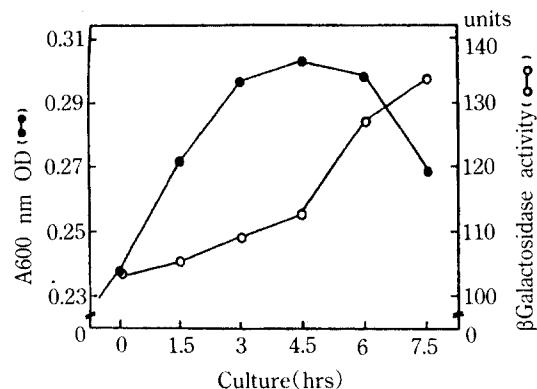


Fig. 4. The relationship between β -galactosidase activity and growth curve of *E. coli* PQ 37.

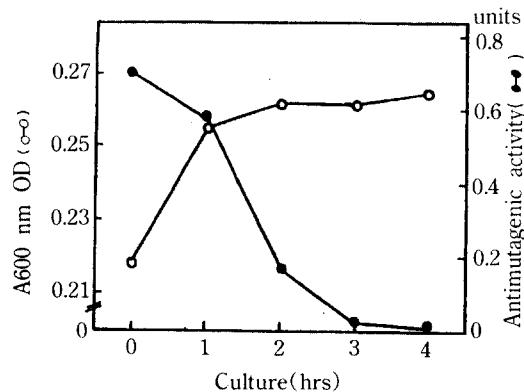


Fig. 5. The relationship between antimutagenic activity and growth curve of *E. coli* PQ 37.

공조적으로 이루어 지고 있으므로 단백질의 합성량으로 mRNA의 전사량을 추정할수 있지만 Fig. 5에서 보는바와 같이 세포가 사멸기로 들어가 지속적으로 세포의 파열이 일어나는 조건 하에서는 β -galactosidase의 활성이 증가하는 현상을 감안할때 유전자에서의 전사활성도와 결과적으로 나타난 효소활성도는 일치하지 않는 것을 알수 있다. 이것은 세포의 파열에 의하여 이미 생합성된 효소가 배지로 방출되는 현상이 외에도 효소분자의 turn over율이 크게 영향을 미치기 때문이라 생각되어 진다. 특히 Mitomycin C와 같은 변이원은 DNA에 직접 작용하여

DNA손상을 유발하는 화합물임을 생각할때 쌀 추출물이 나타내는 항변이원성의 작용기전이 desmutagen적 성격을 갖는지 또는 antimutagen으로서의 성격을 갖는지의 여부는 유전자 수준에서 직접 조사해야 할 필요가 있으나 다수의 시료를 동시에 처리하기에는 실험적으로 많은 재한을 받고 있는것이 사실이다. 따라서 이미 설명한 SOS반응에서도 기술한 바와 같이 변이원 투여에 의하여 지시세포의 β -galactosidase 유전자의 발현이 유도되는 것은 SulA promoter에 결합되어 있는 lexA repressor가 SOS반응으로 분해되는데 기인한 것으로 이때 lexA repressor의 turn over는 β -galactosidase와는 다르게 매우 빠르다는 것을 생각한다면 SulA promoter의 mRNA 전사량을 측정하는것이 실험의 성격상 합리적이라고 생각한다. 실험적으로는 각 생장 시점 별로 *E.coli*에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR(reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction)로 SulA에서 발현된 β -galactosidase를 코드하는 mRNA의 양을 간단히 측정함으로써 보다 직접적인 결론을 유도 할수 있을 것이다. 따라서 앞으로 이와 같은 문자생물학적 기법을 이용하여 쌀 추출물 항변이원성의 작용기전을 규명해 나아갈 실험을 설계하고 있다.

5. 쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질의 바이러스 DNA손상수복 기작에 대한 검토

화학적 돌연변이에 노출된 DNA염기가 수식 되든지 또는 그 결과 수복반응에 의하여 nucleotide의 부분적 결손이 유도되어 정상적인 유전자가 보유하는 유전정보가 변조됨으로서 정상 세포가 암으로 발전된다는 것은 이미 알려져 있다. 따라서 쌀에 함유되어 있는 항변이원성 물질에 의한 DNA의 손상을 저해시킬수 있는지의 여부를 결정하는 일은 중요한 일로서 만약 이와같은 활성이 있다면 보다 적극적으로 변이원 활성을 저해하는 antimutagen으로서의 작용도 보유함을 밝힐수 있게 되는 것이다.

본 실험에서 사용한 chemical mutagen인 Mitomycin C는 세포의 DNA에 strand cross link를

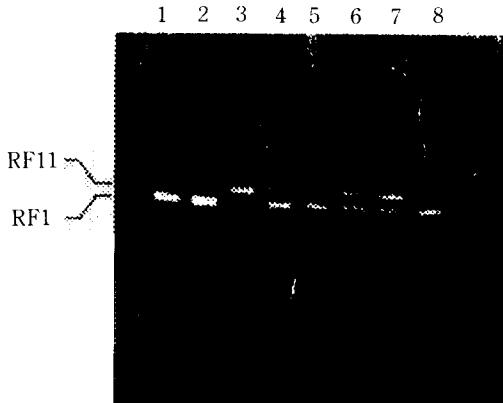


Fig. 6. Agarose gel electrophoretic analysis of the effect of added rice extracts on DNA cleavage by mitomycin C.

형성할 수 있을뿐 아니라 DNA염기중 guanine이나 adenine 잔기의 amino group에 결합하는 것이 알려져 있다. 또한 mitomycin C의 quinone 부위는 공기나 기타 화학적 환원에 의하여 superoxide anion이나 hydrogen peroxide를 형성하게 하여 strand scission에 의한 DNA손상을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구에서는 Mitomycin C에 의한 DNA strand scission의 유도현상에 주목하여 이와 같은 DNA의 손상을 역제시킬수 있는 물질이 쌀 분획속에 포함되어 있는가를 검정하기로 하였다. 즉, ds DNA phase인 ϕ x174의 double strand super coil DNA(RF 1)가 strand scission에 의해서 double strand open circle DNA(RF 1)로 전환되는 것을 쌀의 변이원성 물질이 저해하는 정도로서 측정하였다. 0.2 μ g의 ϕ x174 RF I DNA와 100mM의 Mitomycin C, 0.5 mM의 sodium borohydrate, 그리고 0.1mM의 CuCl₂를 50mM Tris buffer(pH7.0)조건하에서 반응시키면서 적당량의 쌀 추출분획을 첨가 하였다. 반응후, 전체 반응액을 1%의 agarose gel로 분획화하고 UV로 照射하여 DNA의 상태를 관찰하여 Fig. 6에 나타내었다. Lane 1과 2는 Mitomycin C의 활성이 일어나지 않는 조건으로서 RF1의 위치를 나타내며 Lane 3과 10은 산화 활성의 결과 RF I에서 RF II로 완전히 전환된

상태를 보여주고 있다. Lane 4와 7은 추청 겨총 70% EtOH추출분획을 4 μ g첨가했을때의 전기영동 패턴이며 Lane 5와 8은 상해향혈 겨총 70% EtOH추출분획을 동량 첨가 했을때의 실험결과이다. Lane 6과 9는 추청 및 상해향혈겨총의 70% EtOH추출분획을 가용화할때 사용한 DMSO가 전제반응에 미치는 영향을 조사한 것이다.

Lane 4, 5, 6은 37°C에서 4시간 반응한 것이고, Lane 7, 8, 9는 9시간 반응한 결과이다. 실험결과가 나타내는 것처럼 추청에서 추출한 분획은 DNA strand scission을 저해하는 효과가 약간 있었으나 그 효과는 DMSO자체의 영향과 비교해 볼 때 DNA손상을 저해하는 효과는 미약한 것을 알수 있다. 그러나 상해향혈에서 추출한 분획은 RF I에서 RF II로의 strand scission을 강력하게 저해하고 있음을 알수 있었다. 이상의 결과를 볼 때, 자도의 겨총에 존재하는 세포내에서 흔히 발생하는 free radical에 의한 DNA손상을 저해 시킬수 있는 물질이 존재함을 알수 있었고 이 항변이원성 물질이 각종 chemical mutagen에 의한 antimutagen으로 작용할 가능성이 있음을 시사하고 있다.

6. 쌀(紫稻 : 유색미)함유 항변이원성 물질의 단리 및 동정

쌀의 품종별, 부위별 항변이활성을 비교한 결과 쥐반에 부적합 하지만 polyphenol화합물이 많으리라 예상되는 자도 겨총이 제일 많았으므로 (Table 2), 자도(수원415) 겨총으로부터 항변이원성의 단리 및 단리된 물질의 화학적 구조에 대한 동정을 실시하였다.

수원415(287g)의 겨총으로부터 70% 에탄올 추출물을 얻은 후 클로로포름, 에칠아세테이트, 물에 의한 순차적인 유기용매 분획을 실시하여, 각 분획의 항변이원활성을 Table 4에 나타내었다.

유기용매 분획의 출발물질인 70% 에탄올 추출물도 높은 항변이활성을 나타내고 있었으며 분획에 따라서 항변이활성의 증감이 관찰되고 있다. 이는 총체적인 항변이 활성발현에 참여하

는 인자들이 분획에 사용된 유기용매에 의해서 분획화하는 현상에 기인하는 결과라 생각되어 진다. 즉, 클로로포름 분획의 경우와 같이 70% 에탄올 추출물보다 오히려 항변이 활성이 높게 측정된 것은 항변이원 활성의 발현에 장해적인 역할을 하던 물질이 클로로포름에 의한 분획과정에서 소실된 결과라고도 할 수 있겠다. 이들 유기용매 분획 중 클로로포름 분획은 회수량이 많았으므로 정제도를 높일 목적으로 silicagel column chromatography를 실시 하여 thin layer chromatography상의 spot pattern이 유사한 것끼리 모아서 감압농축 후 다시 thin layer chromatography에 의해 재분획하여 동일 부분의 굽어 모았으며(Table 5 의 A-I, A-II, B-I, B-II, B-III), 에칠아세테이트 추출 분획은 회수되는 시료의 양이 적었기 때문에 thin layer chromatography 만을 실시하였다(Table 6 의 I, II, III). 이렇게 회수한 물질들의 기기분석을 실시하여 Table 5, 6에 각각 나타내었다.

Table 4. Antimutagenic activities of solvent extracts from colored rice(Suwon 415) bran

| Solvent extracts | Recovery(%) | Antimutagenic activities | |
|---------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|
| | | Units/2mg | Total activity(units) |
| 70% Ethanol extract | 20.6 | 1.57 | 46300 |
| Chloroform | 5.77 | 1.96 | 16300 |
| Ethylacetate | 2.08 | 1.01 | 3020 |
| Water | 1.26 | 1.19 | 16900 |

Table 5. FTIR and ¹H NMR spectral data for chloroform fractions(A-I, A-II, and B-I, B-II, B-III) isolated from colored rice(Suwon 415) bran

| | FTIR Vmax (cm ⁻¹) | H ¹ NMR (δ) |
|-------|---|---|
| A-I | 1464, 1713, 2926, 3480 | 1.2, 3.9, 5.4 |
| A-II | 723, 970, 1466, 1712, 2357, 2851, 3450 | 1.2, 3.9-4.3, 5.3-5.7 |
| B-I | 1080, 1466, 1717, 2361, 2853, 2924, 3580 | 1.2, 4.08-4.16 |
| B-II | 1464, 1709, 1924, 2344 2851, 2920, 3580 | 0.86-0.9, 1.25-1.3, 1.63, 4.08, 5.4 |
| B-III | 1170, 1277, 1466, 1713 2855, 2926, 3500 | 0.83-1.0, 1.29-1.3-2, 3.67-3.75, 4.1-4.2, 5.35 |

Table 5에 제시하고 있는 화합물들은 기본적으로 클로로포름 분획에 의해서 단리되는 화합물이므로 소수성이 큰 특징이 있는 것들이며, IR spectrum의 흡수파장이나 흡수 peak의 모양 및 크기등의 특징에 의하면 단리된 각각의 화합물들이 서로 유사한 분자구조를 가지고 있음을 알 수 있다. 즉, 기본적으로 aliphatic 화합물이며 각 구조물들의 IR spectrum의 흡수파장대가 의미하는 작용기의 특징을 각각 가지는 화합물이다.

Table 6. FTIR and ^1H NMR spectral data for ethylacetate fractions(I, II, III) isolated from colored rice(Suwon 415) bran

| | FTIR Vmax (cm^{-1}) | ^1H NMR (δ) |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|
| I | 638, 764, 1024, 1294, 1370, | 0.2-1.0, 1.2-1.56, 2.04-2.35 |
| | 1518, 1689, 2855, 2926, | 3.9-4.0, 4.4, 5.6, 6.89-6.92 |
| | 3276, 3501 | 7.57-7.49 |
| II | 804, 1028, 1282, 1435, | 0.2-1.0, 1.2-1.56, 2.04-2.35 |
| | 1524, 1599, 1690, 2926, | 3.9-4.0, 4.4, 5.6, 6.89-6.92 |
| | 3400, 3486 | 7.57-7.49 |
| III | 802, 1098, 1290, 1452, | 0.2-1.0, 1.2-1.56, 2.04-2.35 |
| | 1709, 2855, 2925, | 3.9-4.0, 4.4, 5.6, 6.89-6.92 |
| | 3500 | 7.57-7.49 |

Table 6에 제시하고 있는 것은, 겨총의 70% 에탄올 추출물로 부터 $\text{CHCl}_3 : \text{H}_2\text{O}$ (1:1)의 용매계에 의해서 클로로포름 분획을 회수하고 남은 물층에 동량의 에틸아세테이트를 넣어 2시간 교반하고 정 치 후 에틸아세테이트층을 분획하여 감압농축후 TLC에 의해서 재분획한 물질들의 기기분석 결과이다. 이것들도 클로로포름의 화합물(Table 5)과 거의 동일한 형태의 흡수 peak를 보이며 탄화수소가 분자골격을 이루고 있는 aliphatic 화합물들이다. 그러나 클로로포름 분획과는 달리 3500cm^{-1} 부근의 peak가 2, 3으로 나뉘는 것이 있어 이는 분자간의 -OH 결합상태가 서로 다르다는 것을 유추할 수 있는 자료인데 실제로, ^1H NMR자료에서 확인되는 바와 같이 5-6 ppm의 broad한 peak가 의미하듯이 polyphe-nol의 구조를 하고 있어 분자간 또는 분자내 수소결합이 약화된 분자구조이리라 예측할 수

있겠다. 또한 클로로포름 분획과 에틸아세테이트 분획의 차이점이라 할 수 있는 사항으로서 H^1 NMR자료에서 클로로포름분획에서는 7.0-7.5 ppm 근처의 peak가 없었는데 에틸아세테이트 분획의 화합물들에는 이를 peak가 있었다.

참 고 문 헌

- Chang, I. M., Guest, I. C., Chang, J. L., Paik, N. W. and Pyun, R. Y.: Assay of potential mutagenicity and antimutagenicity of chinese herbal drugs by using SOS chromotest and SOSumu test., Proceedings of the 1st Korean-Japan toxicology symposium safety assessment of chemicals in vitro., *The Korean Soc. of Toxicology*, 236-248 1987.
- Chang, I. M., Oh, K. B. and Suh, N. J.: Study on mutagenicity of pinellia tuber., A possible model for the understanding wisdom in the use of traditional chinese herbal medicine., Proc. 2nd Int. Sym. on recent Advances in Natural Products Res., 402-415 1989.
- Seo, J. S., Lee, Y. W., Suh, N. J. and Chang, I. M.: Assay of antimutagenic activities of vegetable plant., *Kor. J. Phamacogn.*, 21, 88 1990.
- Ham, S. S., Kim, S. W. and Kim, Y. M., : Studies on antimutagenic effects and gene repair of enzymatic browning reaction products., *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 22, 632 1990.
- Oh, H. S. and Ham, S. S.: Antimutagenic effects of enzymatic browning reaction products of polyphenol compound by polyphenol oxidase derived from Mushroom., *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 24, 341 1992.
- Kim, S. B., Yeom, D. M., Do, J. R., Yeom, H. S., Byun, S .H., Kim, I. S. and Park, Y. H.: Mutagenetics of carbonyl compound derived from maillard reaction and their desmutagenicity machanisms., *Korea. J. Food Sci. Technol.*, 21, 435 1989.

7. 名和義彦, 大谷敏郎. 有色素米の 色素特性, 食品工業, 11月號, 28-33 1991.
8. 千葉英雄. 食品の生體調節機能, 學會出版セレクション, 79-89 1982.
9. Radman, M.: SOS repair hypothesis : Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis in 『Molecular Mechanism for Repair of DNA』, Ed. by P.C. Hanawalt and R.B. Setlow, New York, 1985, vol. 5, pp.355-367.
10. Ramel, C., Alekperov, U.B., Ames, B.N., Kada, T. and Wattenberg, W. *Mutation res.*, 168, 47 1986.