

## E. coli와 V79 배양세포계에서 발아특수미의 항돌연변이 활성

강미영<sup>1</sup> · 남석현\*

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

### Antimutagenic Activities of the Germinated Specialty Rices in E. coli and V79 Cultured Cell Assay Systems

Mi Young Kang<sup>1</sup> and Seok Hyun Nam\*

Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received May 9, 2005; Accepted June 24, 2005

To evaluate the antimutagenic activity of the specialty rices, a giant embryonic rice and a pigmented rice, we measured the inhibitory effect on the chemically induced mutagenesis in *E. coli* and V79 cultured cell system, as well as on DNA strand scission induced by oxidative damages *in vitro*. When the inhibitory activity to mitomycin C-induced mutagenesis using SOS chromotest in *E. coli* cell was measured, the activities decreased in the following order: germinated pigmented rice (40.4%) > germinated giant embryonic rice (37.1%) > pigmented rice (35.5%) > germinated brown rice (15.7%) > giant embryonic rice (14.0%) > brown rice (0.8%). The activities for inhibiting mitomycin C-induced DNA strand scission decreased in the order of pigmented rice > giant embryonic rice > germinated pigmented rice > germinated brown rice > brown rice > germinated giant embryonic rice. We also determined antimutagenic activities of the specialty rices using the suppressing effect on 6-TG resistant colony formation by 4-NQO in V79 cells as a mutagenicity index. The order of antimutagenicity was germinated giant embryonic rice (53.2%) > pigmented rice (40.0%) > brown rice (21.2%) > germinated brown rice (14.4%) > giant embryonic rice (0.23%); in contrast, germinated pigmented rice showed promoting effect on 4-NQO-induced mutagenesis.

**Key words:** specialty rices, mitomycin C, SOS chromotest, 4-NQO, V79 cells

### 서 론

우리나라의 미작은 에너지 공급을 위한 곡물의 단순 증산보다 미질의 개선이나 건강기능성 특수미의 개발과 보급으로 향후 그 방향을 전환해야 할 필요성이 이미 대두되었다. 특히 건강기능성 특수미는 고령화된 산업화사회에서 빈발하는 만성질병의 발병률을 식생활을 통하여 감소시킴으로써, 우리사회의 경제인구가 부담해야 할 복지 분야의 사회적 비용을 줄이는데 가장 효율적으로 기여할 것이 기대되기 때문에 다양한 건강기능성 특수미의 개발 및 이를 이용한 가공방법의 확립은 우리나라 농업의 입지를 결정하는데 중요하게 작용할 것으로 보인다. 본 연구에서 선정한 특수미는 거대배아미와 흑자색 색소를 가진 유색미로서, 거대배아미는 일반미보다 월등히 큰 배아 때문에 단백질, 비타민, 필수지방산 등 영양소와  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -

oryzanol, 피틴산 등의 생리활성물질에 의한 생물활성이 클 것으로 예상되는 쌀이다.<sup>1)</sup> 또한 흑자색의 유색미는 겨층에 색소를 가진 쌀로서, 겨층에서 대표적인 색소성분인 cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside와 peonidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside가 분리·동정되었고 이들 분자들이 ROS(reactive oxygen species) 및 RNS(reactive nitrogen species)를 강력히 소거한다는 사실도 이미 증명되어 있다.<sup>2,3)</sup> 그러나 특수미의 식미가 그다지 우수하지 못하기 때문에 특수미를 건강식품이나 그 첨가물 제조용으로 사용하는 것이 일차적으로 고려되지만, 쌀이 주식이라는 사실을 고려하면 취반용으로 소비될 수 있도록 건강기능성과 식미를 동시에 높이는 가공처리가 필요하다. 발아된 현미는 식미가 우수할 뿐 아니라, GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid)와 같은 생리활성물질의 함량이 증가하고, 발아미의 식이가 체지방의 저하 등 생체에 대한 유익한 효과를 나타낸다는 사실이 알려져 이미 있다.<sup>6,7)</sup> 따라서 단순 발아처리와 같은 특수미의 가공방법을 연구함으로써 취반용 쌀로서 일상적 대량 소비가 가능하게 하여 특수미의 시장을 대폭적으로 확대시킬 수 있는 방법을 모색할 필요성이 있기 때문에, 발아에 의한 특수미의 생리활성 변화를 우선적으로 조사

\*Corresponding author

Phone: +82-31-219-2619; Fax: +82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

해야 한다. 이와 같은 실험의 필요성에 따라 본 연구에서는 발아된 거대배아미 및 유색미의 건강기능성 중에서 돌연변이 및 암발생에 대한 억제활성을 평가하고자, 특수미의 에탄올 추출물이 가지는 돌연변이 억제활성을 *in vitro*에서 DNA의 산화적 손상에 대한 억제효과를 측정하고 *E. coli* 및 배양동물세포주를 지시세포로 사용하여 화학적 돌연변이원이 일으키는 DNA변이에 대한 억제효과를 조사함으로써 중앙개시단계에 대한 특수미 추출물의 제어효과를 평가하였다.

## 재료 및 방법

**실험 재료.** SOS chromotest의 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37[plasmid pKM 101, *sfii::Mud(AP lac)cts*, *lacΔU169*, *mal<sup>+</sup>*, *urvA*, *galE*, *galY*, *Pho<sup>c</sup>*, *rfa/F-*, *thr*, *leu*, *his*, *pyrD*, *thi*, *trp::Muc<sup>+</sup>*, sr1300::Tn10]은 서울대학교 천연물화학 연구소에서 분양받았으며, 특수미인 거대배아미와 유색미인 흑미, 그리고 대조구로 사용한 취반용 현미 종자는 (주)신지에서 제공받았다. 벤레이트 수화제로 소독한 종자는 15°C 증류수에 48시간 침지시킨 다음, 27°C에서 3일간 발아시켰으며, 왕겨 껍질을 제거한 종자는 분쇄 후, 5배량의 70% EtOH로 80°C에서 3시간 동안 reflux하면서 함유된 생리활성 물질들을 추출하였다. 필터(Whatman paper no. 2, Whatman International Ltd. Maidstone, UK)로 여과시킨 추출액은 rotary evaporator로 감압·건조하여 고형물질을 얻었고 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 100 mg/ml의 농도로 만들어 -20°C에 냉동 보관하면서 사용하였다. 2-amino-6-mercaptopurine을 포함한 실험에 사용된 화학시약은 모두 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

**세포 배양.** 세포 배양에 사용된 배지인 Eagle's minimum essential medium(Eagle's MEM)과 FBS(fetal bovine serum)는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, Hank's balanced salt solution(HBSS)는 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 지시세포인 Chinese hamster lung cell line인 V79 세포주는 American type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS와 100 unit의 penicillin과 streptomycin이 함유된 Eagle's MEM을 사용하여 5%의 CO<sub>2</sub>를 포함한 37°C의 포화습도 공기조건 하에서 배양하였다.

**DNA strand scission의 측정.** 시료가 가지는 DNA strand scission의 유도, 또는 억제활성은 Nam 등의 방법<sup>8)</sup>에 따라 시료의 첨가로 유도되는 ΦX 174 RF I DNA(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)의 물리적 형태의 변환정도로 측정하였다. DNA strand scission에 대한 시료의 효과를 측정하기 위하여 0.2 μg의 ΦX 174 RF I DNA를 함유하는 100 mM mitomycin C, 0.5 mM sodium borohydride, 0.05 mM CuCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액에 시료 2 μl를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응종료 후, stop buffer(50% glycerol, 0.1 M EDTA, 0.1% bromophenol blue)를 1/10 용량 첨가하여 Cu<sup>2+</sup>의 chelation으로 반응을 종료시킨 다음, 1×TAE에 완충된

1% agarose gel에서 전기영동을 수행하였으며, 시료가 DNA의 전기영동을 방해할 경우에는 시료와의 반응 후 이온교환수지로 DNA를 정제하였다. UV transilluminator로 나타난 supercoil DNA(RF I), open circle DNA(RF II), linear double strand DNA(RF III) band의 intensity를 Gel Documentation System (Bio-ID, Vilber Lourmat, France)로 측정함으로써 서로 다른 물성을 가진 DNA의 상대적 잔존량을 계산하였다.

**SOS chromotest.** *E. coli* PQ 37을 지시세포로 SOS chromotest 기법을 이용한 항돌연변이 활성의 측정방법<sup>9,10)</sup>을 간단히 설명하면 다음과 같다. 37°C에서 LB배지에 하룻밤 진탕배양한 배양액을 동일한 액체배지로 10배수 희석하여, 37°C에서 2시간 진탕 배양하였다. 배양 후 액체 배지로 다시 4배수 희석한 배양액을 0.4 ml 취한 다음, 2 mg의 시료와 6 ng/ml가 되도록 변이원인 mitomycin C를 첨가한 다음, 최종 반응용량을 액체배지로 4 ml가 되도록 조정하여 37°C에서 2시간 재차 진탕배양하였다. 배양이 끝난 배양액 0.2 ml에 1.8 ml의 B buffer(60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)와 섞고, 여기에 1.6 mg의 ONPG(2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside)를 첨가하여, 37°C에서 30분간 반응시켰다. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 반응을 정지시킨 후, 420 nm에서 발색하는 반응액의 흡광도를 측정하여 시료의 첨가로 유도된 β-galactosidase의 활성을 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성은 최종 배양액 0.2 ml에 1.8 ml의 P buffer(1 M Tris, 1% SDS)와 1.6 mg의 pNPP(p-nitrophenyl phosphate)를 첨가한 다음, 37°C에서 30분간 반응시키고 0.6 N이 되도록 염산을 첨가하여 5분간 정지시킨 뒤, 0.8 ml의 2 M Tris를 넣고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 효소활성 unit는 [1,000×A<sub>420</sub>/t, t: 반응시간(분)]으로 계산하였고, 유도값(R)은 alkaline phosphatase의 활성에 대한 β-galactosidase 활성으로 정의하였다.

**세포독성의 측정.** 시료의 세포독성은 Kuroda의 방법<sup>11)</sup>에 의거, 접종된 세포가 형성하는 세포 colony의 수로 계산하였으며 실험과정은 다음과 같다. GHAT 배지(1.6×10<sup>-6</sup> M glycine, 1×10<sup>-4</sup> M hypoxanthine, 4×10<sup>-7</sup> M amethopterin, 1.6×10<sup>-5</sup> M thymine, 10% FBS, 100 unit의 penicillin 및 streptomycin)로 24시간 배양하여 자연돌연변이 세포를 미리 제거한 지수성장기의 V79 세포 3×10<sup>2</sup>개를 Φ 100 mm의 culture dish에 24시간 동안 부착시킨 다음, 적당량의 돌연변이원인 4-NQO나 시료를 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 다시 10% FBS가 함유된 Eagle's MEM으로 7일간 배양한 다음, methyl alcohol로 고정하고 Giemsa staining solution (Sigma Chemical Co.)로 세포를 염색하여 생성된 세포 colony를 계수하였다. 세포 독성은 최초로 접종된 3×10<sup>2</sup>개의 세포가 Eagle's MEM만의 배양조건에서 형성한 세포 colony 수에 대하여 시료를 처리한 배양조건에서 형성된 colony수의 상대적 비율을 survival 값(%)로 표시한 것으로서, 시료가 가지는 지시세포에 대한 세포 독성의 지표로 사용하였다. 형성된 세포 colony에 돌연변이가 일어나지 않았음을 다음의 돌연변이 활성측정법에 의거 확인하였다.

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\text{Number of colonies from cells treated with rice extracts or mutagen}}{\text{Number of colonies from initially inoculated } 3 \times 10^2 \text{ cells}} \times 100$$

**배양세포주에서 돌연변이 억제활성의 측정.** V79 세포주에서 시료의 항돌연변이 활성의 측정에 Kuroda의 방법이 이용되었다.<sup>11)</sup> 간단히 설명하면, GHAT 배지에서 미리 배양하여 6-TG 저항성 세포를 제거한 지수성장기에 있는  $5 \times 10^4$  cell의 V79 세포를 24시간 배양하였다. 배양 후, 측정하고자 하는 농도의 시료나 돌연변이원으로  $1.5 \times 10^{-7}$  M의 4-NQO(4-nitroquinolin 1-oxide)을 포함한 FBS가 없는 Eagle's MEM에 다시 3시간 배양한 다음, 배지를 제거하고 FBS를 포함한 정상 배지에서 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 trypsin 처리로 회수하여 시료 당 각각 3개의 culture dish에  $3 \times 10^2$  세포를 접종하여 동일한 media에서 7일간의 배양을 통하여 세포 colony를 형성시켰다. 형성된 colony를 이미 설명한 Giemsa염색으로 염색한 다음

계수하였고, 이를 바탕으로 아래의 공식에 colony 형성능 (CFA; Colony Forming Ability)을 아래의 공식에 의거 계산하였다. 한편, CFA값의 측정방법과 동일하게 시료나 돌연변이원을 첨가하여 3시간 처리한 다음, 다시 정상배지에서 5일간 배양한 세포를 시료 당 5개의 dish에 각각  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 접종한 후, 5 µg/ml의 2-amino-6-mercaptapurine이 함유된 6-TG 배지에서 7일간 배양하여 6-TG 저항성을 가진 세포 colony를 형성시켰고 역시 Giemsa 염색으로 형성된 colony의 수를 계수함으로써, 화학적 돌연변이원에 의하여 돌연변이가 성립된 세포의 빈도인  $10^5$  세포 당 IMF값(Induced Mutation Frequency)을 계산하였다. CFA와 IMF값의 정의는 다음과 같다.

$$\text{CFA} = \frac{\text{Number of colonies from cells treated with bran extracts and/or mutagen}}{\text{Initially inoculated cell number } (3 \times 10^2 \text{ cells})}$$

$$\text{IMF} = \frac{\text{Number of 6-TG resistant colonies from } 1 \times 10^5 \text{ cells treated with bran extracts and/or mutagen}}{\text{CFA value}}$$

**통계 분석.** 3회 이상 반복실험에서 얻어진 실험결과들은 Statistical Analysis System software package를 이용하여 분석하였다. 실험의 평균값은 mean±SD로 나타내었으며 실험군과 대조군 사이에 있어서 평균값의 유의적 차이는 Anova Procedure test로 검정하였고,  $p < 0.05$  수준 이상에서 통계적 유의성을 인정하였다.

**결과 및 고찰**

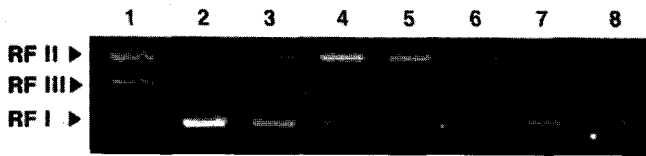
**특수미 에탄올 추출물의 항돌연변이성.** 특수미로서 거대배아미와 유색미인 흑미를 취반용 쌀인 일반미를 대조군으로 사용하여 각 품종별 발아미와 무발아미의 70% 에탄올 추출물이 직접변이원인 mitomycin C가 유도하는 돌연변이를 억제하는 효과를 SOS chromotest법으로 측정하여 비교하였다(Table 1). 본 실험에서 발아미에 대한 실험 내 대조로 사용된 무발아미는 각 품종의 종자를 48시간 침지(imbibition)처리만 한 것으로 정하고

실험을 진행하였다. 각 시료가 보이는 항돌연변이성은 발아유색미가 가장 높았으며(40.4% 억제), 발아거대배아미(37.1% 억제) > 무발아유색미(35.5% 억제) > 발아현미(15.7% 억제) > 무발아거대배아미(14.0% 억제)의 순서로 활성이 나타났고 무발아현미의 억제활성은 0.8%로서 가장 낮았다. 각각의 특수미 품종별로 보면, 항산화성 색소가 풍부한 유색미가 발아처리 여부에 관계없이 항돌연변이 활성이 높은 반면, 배아가 크기 때문에 배아에 함유된 다량의 생리활성물질들에 의하여 돌연변이 억제활성이 높게 나타날 것으로 예상되었던 거대배아미의 경우, 일반현미 보다는 억제활성이 높았지만 흑자색 색소를 가진 유색미에 비해서는 그 활성도가 낮았다. 그러나 유색미는 발아처리에 의하여 mitomycin C 유도성 돌연변이에 대한 억제활성이 크게 증가하지 않았는데, 이것은 아마도 발아과정의 생화학적 변화에 의하여 항산화성물질을 포함한 돌연변이 억제성 물질이 불활성화 되었기 때문이 아닌가 생각된다. 반면, 거대배아미나 일반현미는 발아에 의하여 각각 2.7배 및 20배 정도로 활성이 획기적

**Table 1. Inhibitory activity of the rice extracts to mitomycin C-induced mutagenesis in *E. coli* PQ 37 cells**

Experiments		β-galactosidase activity (unit)	Alkaline phosphatase activity (unit)	R factor	Anti-mutagenicity (%)
Negative control		6.71±0.57	40.37±0.97	0.17	100
Positive control		19.19±1.24	14.69±1.07	1.31	0
Brown rice	Not-germinatd	15.48±1.35	11.94±2.01	1.30	0.8
	Germinated	12.26±0.88	11.14±1.04	1.10	15.7
Giant embryonic rice	Not-germinated	15.10±1.46	13.45±0.99	1.12	14.0
	Germinated	10.70±0.99	13.02±1.03	0.82	37.1
Pigmented rice	Not-germinated	12.06±2.11	14.30±2.37	0.84	35.5
	Germinated	11.44±1.57	14.68±1.58	0.78	40.4

Values obtained through triplicate experiments are expressed as means±SD.



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoretogram used for analysis of inhibitory action of the rice extracts toward mitomycin C-induced DNA strand scission. The lanes indicate treatment of the samples prepared from the followings: lane 1, positive control (with Cu<sup>2+</sup>); lane 2, negative control (without Cu<sup>2+</sup>); lane 3, germinated brown rice; lane 4, brown rice; lane 5, germinated giant embryonic rice; lane 6, giant embryonic rice; lane 7, germinated pigmented rice; lane 8, pigmented rice.

으로 증가하는 현상이 발견되었다. 따라서 거대배아미와 일반현미는 발아에 의하여 이미 보고된 항산화활성의 증가가 일어날 뿐 아니라,<sup>12)</sup> 항돌연변이 활성도 대폭적으로 증가하는 것으로 나타나, 단순한 발아처리로 생리활성의 증강을 유도할 수 있는 쌀 품종임을 보여주고 있다. 반면, 유색미는 발아처리가 활성의 증가를 유도하였지만, 무발아 쌀 자체도 돌연변이 억제활성이 높은 것으로 나타났다.

**발아특수미 에탄올 추출물의 산화적 DNA 손상에 대한 억제활성.** 세포 DNA의 지속적인 손상으로 유전물질의 변성이 일어나 정상세포가 transformed cell로 전환되는 것이 암발생의 개시점이 된다는 점을 고려하면, 발아처리한 각 특수미 추출물이 *in vitro*에서 DNA에 유발된 산화적 손상을 항산화작용 등의 기작을 통하여 억제할 수 있는지 여부를 조사할 필요가 있다.<sup>13)</sup> DNA의 산화적 손상이 쌀 추출물의 첨가에 의하여 억제되었는지 여부는 mitomycin C가 일으킨 DNA strand scission에 의하여 ΦX174 RF DNA가 agarose gel에서 전기영동도가 변화하는 정도로 판단하였다.<sup>14)</sup> Fig. 1에 나타난 것처럼 DNA strand가 절단되는 산화적 손상이 증가됨에 따라 supercoil 상태의 DNA(RF I)에서 RF II, RF III로 상변화를 일으키게 되는데 (lane 1), 시료의 첨가는 이와 같은 DNA의 상변화에 변화를 일으켰다. 각 DNA band의 intensity를 측정하여 Table 2에 정리한 바와 같이, 무발아유색미 추출물이 약 78%로 가장 높은 억제활성을 보였고 다음으로 무발아거대배아미 > 발아유색미 > 발아현미 > 무발아현미 > 발아거대배아미의 순서로 억제활성이 낮게 나타났다. 거대배아미의 경우, 무발아처리군은 발아처리군에 비하여 DNA strand scission에 대한 억제활성이 5.6배 정도로

월등히 높게 나타난 반면, 유색미에서는 무발아군의 억제활성이 발아군에 비하여 11% 정도 높게 측정되었다. 반면, 대조군으로 사용된 일반현미에서는 발아현미의 DNA strand scission에 대한 억제활성이 무발아현미에 비하여 2.4배 정도 높게 나타났다. 발아처리가 특수미 추출물이 가지는 DNA의 산화적 손상에 대한 억제활성과 항돌연변이 활성에 미치는 효과는 정확히 일치하지 않았는데, 이 현상은 본 연구에서 사용한 조추출물 상태의 시료에 항산화물질을 포함하여 서로 다른 돌연변이 억제기작을 가진 desmutagen 및 bio-antimutagen성 인자들이 혼합되어 있기 때문으로 생각된다.<sup>15)</sup>

**배양세포주를 사용한 세포독성의 측정.** *E. coli* PQ 37 세포계와 *in vitro*계에서 측정된 항변이원성 및 DNA strand scission에 대한 억제활성은 시료의 항변이원성을 간편하게 측정할 수 있다는 장점이 있지만, 인간과 같은 고등동물에서 일어나는 섭취 물질에 대한 체내 대사 작용이 무시된 결과이기 때문에 *in vivo*의 돌연변이 발생에 대한 제어기작을 정확히 반영한다고 볼 수 없다. 따라서 본 실험에서는 chinese hamster lung cell인 V79 세포주를 지시세포로 사용하여 단일세포가 50개 이상의 세포를 가진 colony로 성장할 수 있는지를 기준으로 특수미 추출물의 항변이원성을 검토·확인하였다. 우선, 항변이원성 측정에 있어서 지시세포에 독성을 부여하지 않는 각 시료의 최고 농도를 결정하였다. Table 3에 정리된 결과와 같이, 특수미 추출물은 품종에 따라 차이는 있지만 5~40µg/ml의 농도범위에서 V79 cell에 전혀 독성을 나타내지 않았으며, 대체로 발아쌀 추출물이 무발아군에 비하여 상대적으로 독성이 낮은 경향을 보였다. 이 실험에 의거, 다음의 항변이원성 검정에 사용할 무발아현미, 발아현미, 무발아거대배아미, 발아거대배아미, 무발아유색미 및 발아유색미의 추출물 농도를 각각 20, 40, 5, 20, 10 및 40 µg/ml로 결정하였다. 또한 결정된 각 시료 농도조건에서 시료가 지시세포의 돌연변이를 유발시키지 않는다는 것을 별도의 실험에서 확인하였다.

**배양세포주를 이용한 발아특수미 추출물의 항변이원성.** 돌연변이원으로는 DNA에 직접 결합하여 DNA 복제의 부정확성을 유도하여 돌연변이를 유발하는 4-NQO를 선택하였다. 추출물의 항변이원성 측정에 앞서, 실험에 사용할 4-NQO의 농도를 결정하였다. 5×10<sup>-8</sup> M, 1×10<sup>-7</sup> M 및 1.5×10<sup>-7</sup> M의 돌연변이원을 농도별로 지시세포에 처리했을 때 CFA(colony forming

**Table 2.** Effects of the rice extracts on mitomycin C-induced strand scission in ΦX174 RF I DNA

Experiments	Relative amount (%)			
	RF I	RF II	RF III	
Negative control (-Cu <sup>2+</sup> )	84.5	13.9	1.6	
Positive control (+Cu <sup>2+</sup> )	0	63.7	36.3	
Brown rice	Not-germinated	22.1	72.2	5.7
	Germinated	53.1	44.5	2.4
Giant embryonic rice	Not-germinated	64.3	33.8	1.9
	Germinated	11.4	78.2	10.4
Pigmented rice	Not-germinated	65.7	33.5	0.8
	Germinated	58.3	39.7	2.0

Values were calculated from the representative of three separated experiments.

Table 3. Cytotoxicity tests for the rice extracts in V79 cells

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Surviving fraction of cells					
	Brown rice		Giant embryonic rice		Pigmented rice	
	Not-germinated	Germinated	Not-germinated	Germinated	Not-germinated	Germinated
5	95.32 $\pm$ 0.43	97.16 $\pm$ 5.90	117.16 $\pm$ 7.50 <sup>a</sup>	97.16 $\pm$ 1.30	96.21 $\pm$ 4.52	100.00 $\pm$ 3.69
10	105.82 $\pm$ 1.61	104.82 $\pm$ 3.19	97.73 $\pm$ 5.79	98.87 $\pm$ 2.18	100.00 $\pm$ 4.82 <sup>a</sup>	99.16 $\pm$ 3.36
20	98.58 $\pm$ 5.55 <sup>a</sup>	101.84 $\pm$ 2.34	93.19 $\pm$ 2.21	100.99 $\pm$ 6.46 <sup>a</sup>	96.44 $\pm$ 12.67	97.16 $\pm$ 1.77
40	99.43 $\pm$ 11.55	100.00 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>	96.31 $\pm$ 8.61	99.15 $\pm$ 9.33	93.79 $\pm$ 4.13	101.42 $\pm$ 5.29 <sup>a</sup>
60	98.72 $\pm$ 12.98	110.92 $\pm$ 16.48	93.62 $\pm$ 6.85	92.34 $\pm$ 9.33	91.38 $\pm$ 2.41	93.76 $\pm$ 8.10
80	93.62 $\pm$ 7.38	91.21 $\pm$ 9.71	89.36 $\pm$ 5.96	88.79 $\pm$ 4.55	92.30 $\pm$ 8.08	97.73 $\pm$ 11.93
120	96.17 $\pm$ 4.83	69.50 $\pm$ 7.87	4.68 $\pm$ 1.13	74.89 $\pm$ 13.51	84.83 $\pm$ 6.45	91.30 $\pm$ 8.08

<sup>a</sup>Induced mutation frequency per  $3 \times 10^2$  surviving cells was 0.00. Values obtained through triplicate experiments.

Table 4. Effects of the rice extracts on colony forming ability of V79 cells pre-treated with chemical carcinogen 4-NQO

Experiments		Sample concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Colony number	Colony forming ability (CFA)
Control <sup>a</sup>		-	109 $\pm$ 1.00	0.38
Brown rice	Not-germinated	20	167 $\pm$ 22.59	0.56
	Germinated	40	141 $\pm$ 10.79	0.47
Giant embryonic rice	Not-germinated	5	138 $\pm$ 9.54	0.46
	Germinated	20	147 $\pm$ 11.79	0.49
Pigmented rice	Not-germinated	10	153 $\pm$ 7.55	0.51
	Germinated	40	125 $\pm$ 2.52	0.42

Values obtained through triplicate experiments are expressed as means  $\pm$  SD.

<sup>a</sup>Cells were treated only with  $1.5 \times 10^{-7}$  M 4-NQO.

Table 5. Effects of the rice extracts on 4-NQO-triggered IMF (induced mutation frequency) in V79 cells

Experiments		Sample concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	6-TG resistant colony number	Induced Mutation Frequency (IMF)	Inhibition (%)
Control <sup>a</sup>		-	13.24 $\pm$ 3.17	34.86	0
Brown rice	Not-germinated	20	15.39 $\pm$ 3.81	27.49	21.15
	Germinated	40	14.03 $\pm$ 3.28	29.86	14.36
Giant embryonic rice	Not-germinated	5	16.00 $\pm$ 5.36	34.78	0.23
	Germinated	20	8.00 $\pm$ 2.04	16.32	53.17
Pigmented rice	Not-germinated	10	10.66 $\pm$ 2.52	20.91	40.01
	Germinated	40	24.79 $\pm$ 3.04	59.04	-69.36

Values obtained through at least quintuplicate experiments are expressed as means  $\pm$  SD.

<sup>a</sup>Cells were treated only with  $1 \times 10^{-7}$  M 4-NQO.

ability)값은 각각 0.53, 0.36 및 0.38이었고, 6-TG 저항성 colony의 수는 dish 당 평균 3.4, 3.8, 13.2개로서, IMF(induced mutation frequency)값은 6.44, 10.46 및 34.86으로 계산되었다. 정확한 억제활성을 측정하기 위해서는 시료에 의한 돌연변이의 억제도를 신뢰성을 가지고 계산할 수 있는 6-TG 저항성 colony의 출현이 요구되므로, 본 실험에서는 culture dish 당 평균 13.2개의 돌연변이 세포 colony의 형성이 유발되는 4-NQO 농도인  $1.5 \times 10^{-7}$  M을 선택하여 실험을 진행하였다. 우선, 시료 및 돌연변이원에 의한 CFA값을 구하였고(Table 4), 이를 바탕으로 4-NQO가 유발한 돌연변이를 특수미 추출물의 억제 효과를 정리하여 Table 5에 제시하였다. 항돌연변이 활성은 발아기 대배아미가 53.2%의 억제값을 보이며 가장 높았고, 뒤를 이어 무발아유색미(40.0% 억제) > 무발아현미(21.2% 억제) > 발아현

미(14.4% 억제) > 무발아현미(0.2% 억제) > 발아유색미의 순서를 보였는데, 발아유색미는 오히려 돌연변이를 유발하는 것으로 나타났다(-69% 억제). 이상의 배양동물세포주에서 측정된 항돌연변이 활성은 원핵세포인 *E. coli*에서 측정된 결과와 다소 일치하지 않는 점이 있다. 본 실험에 사용한 두 가지 검정시스템에서 얻어진 결과의 차이는 사용한 돌연변이원이 다르다는 점과 더불어 진핵세포와 원핵세포 사이에 화합물에 대한 세포의 대사작용이 다르다는 데 있다고 보여진다. 그러나 거대배아미의 경우 발아에 의하여 돌연변이 억제활성이 획기적으로 증가하는 점이나, 발아처리하지 않은 유색미의 억제활성도 우수하게 나타나는 현상이 두 가지 검정시스템에서 공통적으로 관찰되었다.

이상에 기술한 일련의 실험을 통하여 발아처리에 의한 특수

미의 생리활성, 특히 항돌연변이 활성에 초점을 두고 조사하였다. 실험 결과, 특수미 중 흑색색소가 풍부한 유색미는 종자 자체의 돌연변이 억제활성이 높은 반면, 거대배아미는 발아에 의하여 항돌연변이 활성이 대폭적으로 증가하는 것으로 보아, 발아처리가 건강기능식품소재로서 거대배아미의 부가가치를 높일 수 있는 매우 적절한 가공방법이라는 점이 시사되었다. 또한 원핵세포 검정시스템에서 발아유색미의 돌연변이 억제활성은 우수한 것으로 나타났으나, 동물세포 검정시스템에서는 오히려 돌연변이를 촉진하는 결과가 얻어졌는데, Ames test로 대표되는 원핵세포를 이용한 돌연변이원/항돌연변이원 검정시스템의 한계가 세포 내 대사에 의한 화학물의 활성변화를 반영하지 못한다는 점을 고려한다면,<sup>16)</sup> V79 세포주를 이용한 특수미 추출물의 돌연변이 억제활성 결과는 매우 신뢰성이 있는 실험결과라고 하겠다.

**초 록**

특수미인 거대배아미와 유색미의 발아처리에 의한 항돌연변이 활성의 변화를 평가하고자, 70% 에탄올 추출물이 *in vitro*에서 산화적 손상에 의한 DNA strand scission을 억제하는 효과와 함께 *E. coli* 및 V79 배양세포에 화학적으로 유발된 돌연변이에 대한 억제효과를 측정하였다. Mitomycin C로 유발된 돌연변이에 대한 억제활성을 *E. coli*에서 SOS chromotest로 조사한 결과, 활성은 발아유색미(40.4%) > 발아거대배아미(37.1%) > 무발아유색미(35.5%) > 발아현미(15.7%) > 무발아거대배아미(14.0%) > 무발아현미(0.8%)의 순서였다. Mitomycin C가 유도한 DNA strand scission에 대한 억제 효과는 무발아유색미 > 무발아거대배아미 > 발아유색미 > 발아현미 > 무발아현미 > 발아거대배아미로 나타났다. V79 세포주에서 4-NQO로 유도된 6-TG 저항성 colony의 형성을 저해하는 활성을 지표로 항돌연변이 활성을 조사한 결과, 발아거대배아미(53.2%) > 무발아유색미(40.0%) > 무발아현미(21.2%) > 발아현미(14.4%) > 무발아거대배아미(0.23%)의 순서로 돌연변이를 저해하였는데, 발아유색미는 돌연변이를 촉진하는 것으로 나타났다(-69%).

**Key words:** 특수미, mitomycin C, SOS chromotest, 4-NQO, V79 cells

**감사의 글**

본 연구는 농림특정연구과제의 연구비 지원(과제번호: 201030-03-2-HD120)에 의한 것으로 김 설이양의 기술지원에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Juliano, B O. (1985) In *Rice-Chemistry and Technology*, AACC Monograph Series. pp. 295-311.  
 2. Choi, S. W., Kang, W. W. and Osawa, T. (1994) Isolation and

identification of anthocyanin pigments in black rice. *Food and Biotechnol.* **3**, 131-135.  
 3. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Kawakishi, S., Choi, S. W. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2411.  
 4. Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. and Kitts, D. D. (2003) Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5271-5277.  
 5. Toyokuni, S., Itani, T., Morimitsu, Y., Okada, K., Ozeki, M., Kondo, S., Uchida, K., Osawa, T., Hiai, H. and Tashiro, T. (2002) Protective effect of colored rice over white rice on Fenton reaction-based renal lipid peroxidation in rats. *Free Radical Res.* **36**, 583-592.  
 6. Zsoldos, F. (1959) Quantitative changes in induced by low temperature in rice plants. *Nature* **25**, 280.  
 7. Morita, H., Uno, Y., Umemoto, T., Sugiyama, C., Matsumoto, M., Wada, Y. and Ishizuka, T. (2004) Effect of γ-aminobutyric acid-rich germinated brown rice on indexes of life-style related diseases. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* **41**, 211-216.  
 8. Nam, S. H., Chon, D. J. and Kang, M. Y. (2000) Induction of DNA breakage by the hot-water extracts of *Frutus Chaenomeles* (*Chaenomeles sinensis* Koehne). *Agric. Biochem. Biotechnol.* **43**, 156-160.  
 9. Quiladet, P., Huisaman, O. D. and Hofnung, M. (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5971-5980.  
 10. Chang, I. M., Chang, I. C., Park, N. W. and Pyun, R. Y. (1987) Assay of potential mutagenicity and antimutagenicity of chinese herbal drugs using SOS chromotest and SOS umu test. Proceedings of the 1st Korea-Japan toxicology symposium safety assessment of chemicals *in vitro*. *J. Toxicol. Pub. Health* 236-248.  
 11. Kuroda, Y. (1996) Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* **361**, 179-186.  
 12. Kang, M. Y., Kim, S., Koh, H. J. and Nam, S. H. (2004) Antioxidant activity of ethanolic extract from germinated giant embryonic rices. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 293-299.  
 13. Vuillaume, M. (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.* **186**, 43-72.  
 14. Ueda, K., Morita, J. and Komano, T. (1982) Action of mitomycin C reduced with sodium borohydride on bacteriophage X174 and its single and double stranded DNAs. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1695-1677.  
 15. Kada, T. and Shimoi, K. (1983) Desmutagens and bio-antimutagens: their mode of action. *Bioassays* **7**, 113-116.  
 16. Chesis, P. L., Levin, D. E., Smith, M. T., Ernster, L. and Ames, B. N. (1984) Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1696-1700.