

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 영양성분 및 면역 활성 변화

유아름 · 박호영 · 홍희도 · 민진영 · 최희돈*
한국식품연구원

Changes in the Nutritional Components and Immune-enhancing Effect of Glycoprotein Extract from Pre- and Post-germinated Barley Seeds

A-Reum Yu, Ho-Young Park, Hee-Do Hong, Jin-Young Min, and Hee-Don Choi*
Korea Food Research Institute

Abstract In the present study, we investigated changes in the nutritional components of pre- and post-germinated barley seeds and also investigated their immune-enhancing effects such as production of nitric oxide (NO), interleukin (IL)-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α on the RAW 264.7 macrophage cell line. Protein and total sugar contents increased slightly with increase in germination time. The major neutral sugars of germinated barley seeds were arabinose, glucose, and xylose. Glucose content decreased during germination, whereas arabinose and xylose contents increased during germination. Amino acid contents of barley germinated for 24 and 48 hours increased 1.03-fold and 1.24-fold, respectively, compared to that of pre-germinated barley. Moreover, RAW 264.7 macrophages stimulated with barley germinated for 24 and 48 hours showed higher production of NO, IL-6, and TNF- α compared to that observed in pre-germinated barley. The results of the present study indicate that germinated barley may have immune-enhancing effects derived from its ability to activate RAW 264.7 macrophages, which play a major role in innate immunity.

Keywords: barley, germination, immune-enhancing effect, glycoprotein, cytokine

서 론

면역계(immune system)는 생체가 질병 또는 질병과 유사한 증상으로부터 자기를 보호하는 생물학적 구조 또는 일련의 과정을 의미하며, 일반적으로 선천면역(innate immunity)과 후천면역(acquired immunity)으로 분류되며(1), 선천면역은 대식세포 및 백혈구 등으로 구성되어 있다. 이 중 대식세포는 면역 담당 세포 중 하나로 체내의 모든 조직에 분포하면서 자기 성분 이외의 물질에 대해 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 제거하는 방어 능력을 가지며, 활성화되면 산화질소 II (nitric oxide) 내지는 인터류킨(interleukin)-6, 종양괴사인자(tumor necrosis factor)- α 등의 다양한 사이토카인(cytokine)과 같은 생리조절 물질을 분비하여 체내 면역을 조절시키는 중요 매개체 역할을 한다(2).

최근 건강에 대한 인식이 높아짐에 따라 식사생활이 건강에 미치는 영향에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 여러 형태의 건강식품에 대한 수요가 증가하고, 특히 발아과정을 통하여 기능성이 확인된 쌀이나 보리, 밀과 같은 종자를 대체 건강식품으로 전환시키는 연구가 다수 진행되고 있다(3).

보리(*Hordeum vulgare*)는 세계적으로 소비가 많은 곡물 중 하나로서 단백질, 지방질 및 무기질 등의 영양성분을 고르게 함유

하여 영양학적으로 매우 우수하나 피트산(phytic acid)과 전분의 강한 결합구조로 인하여 식감이 떨어지는 단점이 있다. 보리를 발아시키면 피트산과 전분이 분해되어 식감과 소화성을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 아밀레이스(amylase), 프로테이스(protease), 피트산가수분해효소(phytase), 베타글루칸가수분해효소(β -glucanase) 등의 다양한 효소들에 의해서 감마아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid), 아미노산(amino acid), 아라비노자일란(arabinoxylan), 비타민(vitamin) E 등의 다양한 생리활성 물질들의 함량을 증가시킬 수 있어 발아는 보리의 기능성을 증가시키기 위한 가공처리 방법이라 할 수 있다(4). 또한, 발아 시작과 함께 종자 내부의 저장된 단백질이 프로테이스에 의해 분해되고 올리고당(oligosaccharide)이 저분자로 가수분해되면서 당과 단백질의 소화를 증대시켜 영양학적으로 영양소 이용률을 효과적으로 증가시킨다(5).

이에 따라, 본 연구에서는 보리 발아 후 추출한 당단백질 추출물을 이용하여 영양성분의 변화를 분석하고 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 산화질소 II와 사이토카인(인터류킨-6, 종양괴사인자- α)의 생성량을 측정하여 체내 면역 증진 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

보리 발아

도정하지 않은 2012년산 겉보리(hulled barley) 종자를 농협 하나로 마트로부터 구입하여 이물질과 손상된 곡립을 제거하기 위하여 체(2.0 mm)를 이용하여 정선한 후 흐르는 물로 세척하였다. 세척한 보리 종자는 4°C에서 48시간 동안 침지시킨 후 20°C 배양기(incubator)에서 24, 48시간 동안 발아시켰다. 발아된 보리는

*Corresponding author: Hee-Don Choi, Korea Food Research Institute, Seongnam Gyeonggi 13539, Korea
Tel: 82-31-780-9068
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: chdon@kfri.re.kr
Received April 30, 2015; revised July 24, 2015;
accepted July 28, 2015

흐르는 물에서 깨끗하게 세척한 후 40°C의 열풍건조기에서 건조시켜 분쇄하여 발아하지 않은 보리 종자와 비교하여 실험하였다.

발아 전후 보리의 당단백질 추출물

발아시킨 보리는 분쇄기를 이용하여 0.5 mm 이하의 고운 입자로 분쇄하고 노말헥세인(*n*-hexane)을 이용하여 탈지하여 지방질을 제거한 후 50 g을 20 mM 트리스완충용액(tris buffer solution) (pH 8.0) 1 L에 넣고 4°C에서 16시간 동안 진탕하면서 추출하였다. 추출 후 원심분리 하여 당단백질 추출물이 녹아 있는 상층액을 농축한 후에 투석막(Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 24시간 투석하였다. 투석 후 80% 황산암모늄(ammonium sulfate)을 첨가하여 4시간 동안 단백질을 침전시킨 후 원심분리하여 침전물을 증류수에 용해하여 다시 24시간 동안 투석하였다. 투석된 용액은 냉동건조 하였고, 얻어진 건조 분말은 발아 전 보리 당단백질 추출물(GEB, glycoprotein extracts from barley)과 24시간 발아 보리 당단백질 추출물(24-GEB, glycoprotein extracts from 24 h-germinated barley), 48시간 발아 보리 당단백질 추출물(48-GEB, glycoprotein extracts from 48 h-germinated barley)로 구분하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

단백질 함량 측정

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 단백질 함량은 비시초닌산(bicinchoninic acid) 단백질분석키트(protein assay kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 표준물질로 사용하여 시료 25 µL를 96 well plate에 분주하고 비시초닌산 분석시약(assay reagent) 200 µL를 가하여 37°C 배양기에서 30분간 반응시킨 후 판독기(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총당 함량 측정

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 총당 함량 분석은 페놀황산법(phenol-sulfuric acid)으로 실시하였다(6). 0.2 mL의 5% phenol과 1 mL의 황산을 시료 0.2 mL (1 mg/mL)과 혼합 후 실온에서 20분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당(glucose)을 표준당으로 하여 시료의 총당 함량을 계산하였다.

중성당 조성 및 아미노산 조성 측정

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 중성당 및 아미노산 조성은 Na 등(7)의 방법으로 분석하였다. 중성당은 각 시료 0.3 mg에 400 µL 2 M 트라이플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 가하고 100°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 감압증발기(vacuum evaporator)를 이용하여 용매를 제거하였다. 여기에 400 µL의 증류수를 가하고 감압증발기를 이용하여 세척하였다. 산 가수분해 과정을 거친 시료는 0.2 µm PVDF syringe filter로 여과한 후 BioLC (ICS-3000, DIONEX, Sunnyvale, CA, USA)에 CarboPac-PA10 컬럼을 연결하여 분석하였다. 20 mM 수산화나트륨(sodium hydroxide)을 이용하여 40분간 0.5 mL/min이 되도록 isocratic 조건으로 분석하였다. 검출은 AgCl을 작동 전극으로 하여 four-potential step (E=0.1V, E=-0.2V, E=0.6V, E=-0.1V)로 구성된 integrated amperometry quadruple mode로 측정하였다.

아미노산 조성은 시료를 완전히 건조시킨 후 110°C에서 24시간 동안 염화수소(HCl)로 가수분해하였다. 가수분해한 후 노루신(norleucine)을 첨가하여 가수분해된 아미노산을 페닐아미노산으로

사이아네이트(phenylisothiocyanate)로 유도체화 시켰다. 시료를 완전히 말린 후 A 용매 200 µL에 녹여 원심분리 후에 상층액을 따서 HPLC를 이용하여 아미노산을 분석하였다. HPLC 조건은 Waters Nova-Pak C₁₈ column (4 µm, 3.9×300 mm)을 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 하였으며, 오븐 온도는 46°C로 설정하였다. HP 1100 Series, 254 mm 검출기(detector)로 검출하였으며, 이동상은 140 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN가 포함된 A용액(pH 6.1)과 60% CH₃CN B용액에 대하여 A용액:B용액으로 초기 100:0에서 22.72분 부터는 0:100으로 기울기조건을 설정하였다.

분자량 측정

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 분자량을 확인하기 위해 Laemmli (8)의 방법에 따라 실시하였다. Stacking gel 5%, running gel 15%의 조성으로 이루어진 폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide gel)을 제작 후 전기이동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하고 쿠마시블루(Coomassie blue)로 염색하였다. 분자량 표준물질은 10-250 kDa 마커(marker)(Thermo, Rockford, IL, USA)를 이용하였다.

대식세포주 배양 및 독성 확인

실험에 사용한 세포는 면역세포 중 대식세포주인 RAW 264.7 (KTCC No.40071) 세포를 한국세포주은행(KTCC)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 배양하였다.

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 노란색 수용성 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 를 세포에 처리하여 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해 테트라졸륨(tetrazolium)의 링(ring)구조가 끊어진 비수용성의 자줏빛 포마잔(formazan)으로 환원되는 MTT assay의 원리를 이용하였다(9). RAW 264.7 세포를 2×10⁵ cell/well의 농도로 96 well plate에 분주 24시간 후 시료를 6, 25, 100 µg/mL의 농도로 처리하고, 비처리 대조군으로는 DMEM 배지를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 후 5 mg/mL 농도의 MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약 100 µL를 첨가하고 37°C 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상층액은 제거하고 100 µL의 다이메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)로 세포를 용해시켜 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소 II 생성량 측정

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 면역 증진능력을 확인하기 위하여 마이크로플레이트법으로 세포의 배양 상층액 중의 NO₂⁻의 생성농도를 정량함으로써 측정하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 2×10⁵ cell/well의 농도로 96 구멍플레이트에 분주 24시간 후 발아 보리 당단백질을 6, 25, 100 µg/mL의 농도로 처리하고, 비처리 대조군으로는 DMEM 배지를, 양성대조군으로는 1 µg/mL의 지방질 다당류(lipopolysaccharide)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액 100 µL와 동량의 Griess reagent (Sigma-Aldrich)를 혼합하여 상온에서 15분 반응시킨 후 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 아질산나트륨(sodium nitrite)을 이용하여 시료의 산화질소 II를 정량하였다.

사이토카인 생성량 측정

사이토카인인 인터류킨-6와 종양괴사인자-α의 생성량 측정은 RAW 264.7 세포를 96 구멍플레이트에 2×10⁵ cell/well의 농도로

분주 24시간 후 발아 보리 당단백질을 6, 25 µg/mL의 농도로 처리하고, 24시간 배양 후 세포의 상층액을 각각의 ELISA kit (Enzo Inc., Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다(10). 측정방법은 단일클론항체가 코팅된 미량정량플레이트(microtiter plate)에 시료를 넣은 다음 실온에서 반응시킨 후 제공된 세척용액(washing buffer) (0.05% Tween 20 in PBS (pH 7.2-7.4))으로 세척하였다. 이어 다중클론성 항체를 넣어 각각의 사이토카인을 96 well plate에 부착시킨 후 실온에서 반응시키고 세척 후 측정하고자 하는 사이토카인의 3 conjugate 용액을 넣고 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 세척용액으로 다시 세척하고 기질용액(substrate solution)으로 실온에서 발색시킨 다음 정지용매(stop solution)를 넣어 발색반응을 정지시키고 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 분석

본 실험에서 측정한 분석결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험군간의 통계학적 분석은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하였고, 그 결과에 따라 Duncan의 다중 범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다(α=0.05). 통계분석에는 Statistical analysis system 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

발아 시간 변화에 따른 보리 추출물의 수율, 단백질, 총당 및 지방질 함량 변화

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 추출 수율과 단백질, 총당 및 지방질 함량은 Table 1에 나타내었다. GEB (glycoprotein extracts from barely)의 추출 수율은 8.0%, 24-GEGB와 48-GEGB의 경우 각각 7.0, 9.2%로 발아 전 후에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. 지방질 함량은 GEB가 6.83%, 24-GEGB는 2.29%, 48-GEGB가 0.82%로 발아가 진행될수록 감소하였다. 이는 종자가 발아하면서 저장되어 있던 유지가 에너지원으로 이용되어지기 때문에 총 지질 함량이 감소하였다는 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(11). 단백질 함량은 GEB가 69.7%, 24-GEGB는 66.5%, 48-GEGB는 66.44%로 발아 후 약간의 감소를 보였지만 발아시간에 따라 유의적인 변화는 없었다. Vernaza 등(12)의 연구에서 발아한 콩 단백질 추출물의 수용성 단백질 함량을 분석한 결과 발아전 62.1%에서 18, 72시간 발아하였을 때 61.4, 65.3%으로 보고한 것과 비교해 볼 때 보리 당단백질 추출물의 단백질 함량과 비슷한 결과를 나타내었다. 총당 함량은 GEB의 경우 2.9%, 24-GEGB는 4.7%, 48-GEGB는 9.9%로, 발아 전에 비해 24시간 발아시 1.6배, 48시간 발아시 3.4배 증가하였다. 보리 종자는 수분을 흡수하여 발아를 시작하면 배아에서 지베렐린(gibberellin)이라는 식물 성장 호르몬이 호분층의 세포를 자극하여 α-아밀레이스, β-아밀레이스, 프로테이스 등의 다양한 가수분해 효소를 합성하고, 배유에 저장되어 있는 영양소를 분해해서 에너지원으로 사용한다(13,14). β-아밀레이스의 경우에는 발아하지 않은 보리에 단백질과 결합한 상태로 있지만 발아가 시작되는 동시에 유리되어 전분을 maltose 단위로 분해하고, α-아밀레이스의 경우 보리 배유에 있는 탄수화물에 무작위로 작용하여 저분자인 dextrin, 포도당 등으로 분해 후 발아시 필요한 에너지원으로 사용된다(15). 이와 같은 결과 보리가 발아하면서 아밀레이스의 활성이 증가하여 발아시간에 따른 보리 당단백질 추출물의 총당 함량이 증가된 것으로 보인다.

Table 1. Yield and contents of protein, total sugar in glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds

Composition	GEB	24-GEGB	48-GEGB
Extraction yield (%)	8.0±0.6	7.0±0.4	9.2±0.7
Protein (%)	69.7±0.71	66.5±0.84	66.44±0.46
Total sugar (mg%)	2.92±0.02	4.73±0.01	9.93±0.02
Lipid (%)	6.83±0.41	2.29±0.22	0.82±0.15

Table 2. Contents of neutral sugar in glycoprotein extracts from pre-and post-germinated barley seeds

Composition (pmol)	GEB	24-GEGB	48-GEGB
Fucose	15.4	16.1	18.6
Rhamnose	6.0	12.3	21.8
Galactosamine	n.d. ¹⁾	n.d.	n.d.
Arabinose	1909.5	1974.8	3326.6
Glucosamine	26.8	63.2	77.8
Galactose	266.4	233.9	191.7
Glucose	2831.7	638.3	1119.1
Mannose	n.d.	n.d.	n.d.
Xylose	2401.4	2576.5	4420.1
Total	7457.2	5515.1	9175.7

¹⁾n.d., not detected.

발아 시간 변화에 따른 보리 추출물의 중성당 함량의 변화

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 중성당 함량은 Table 2에 나타내었다. GEB의 주요 중성당은 아라비노스(arabinose), 포도당, 자일로스(xylose)로 전체 중성당 조성의 95.8%를 차지하고 있었으며, 그 외 중성당은 5% 미만으로 낮게 나타났고, 갈락토사민(galactosamine)과 만노스(mannose)는 확인되지 않았다. GEB의 경우 총 중성당 함량은 7457.2 pmol로 그 중 포도당이 38.0%로 가장 많이 함유되어 있었고, 자일로스(32.2%), 아라비노스(25.6%)의 순으로 나타났다. 24-GEGB의 총 중성당 함량은 5515.1 pmol로 자일로스가 46.7%로 가장 많이 함유되어 있었고, 아라비노스(35.8%), 포도당(11.6%)의 순으로 나타났으며, 48-GEGB의 총 중성당 함량은 9175.7 pmol로 자일로스가 48.2%로 가장 많이 함유되어 있었고, 아라비노스(36.3%), 포도당(12.2%)의 순으로 나타났다. 연구 결과 48-GEGB는 GEB에 비해 당의 함량이 1.2배 증가하였으며, GEB에는 6탄당인 포도당이 가장 많이 함유되어 있었으나 24, 48시간 발아함에 따라서 포도당의 함량은 감소하고 5탄당인 아라비노스와 자일로스의 함량이 증가하였다. 이와 같은 당 함량의 변화는 α-아밀레이스 활성과 밀접한 관계가 있는 것으로 Kim 등(16)의 연구에 따르면 발아 초기에는 종실에 함유되어 있던 sucrose나 포도당이 호흡의 기질로 이용되고, 발아가 진행되면서 α-아밀레이스 활성의 증가로 전분이 분해된다는 보고에 따라 발아시간에 따른 보리 당단백질 추출물의 경우 발아전에 비해 24시간 발아시 감소하였다가 48시간 발아하면서 중성당이 증가한 것으로 판단된다.

발아 시간 변화에 따른 보리 추출물의 아미노산 함량 변화

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 16종 아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. GEB의 주요 아미노산은 감칠맛을 내는 아미노산으로 알려진 글루탐산(glutamic acid) (31.9 mg/g)가 가장 많이 함유되어 있었으며, 아스파르트산(aspartic acid) (16.7 mg/g), 루신(leucine) (15.5 mg/g), 아르기닌(arginine) (11.9

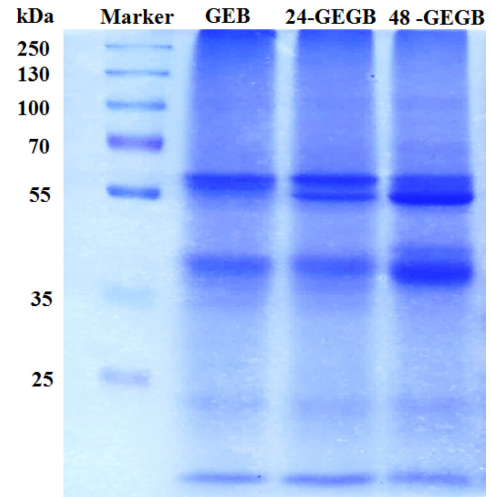
Table 3. Content of amino acid in glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds

Composition (mg/g)	GEB	24-GEGB	48-GEGB
Aspartic acid	16.7	17.3	20.9
Threonine	8.4	8.2	9.6
Serine	8.7	8.8	10.3
Glutamic acid	31.9	33.2	39.2
Proline	12.5	13.7	17.2
Glycine	10.4	10.0	11.2
Alanine	10.5	10.5	12.5
Valine	9.2	10.0	12.5
Methionine	3.4	3.6	4.2
Isoleucine	6.0	6.7	8.8
Leucine	15.5	16.3	20.3
Tyrosine	3.3	3.1	4.0
Phenylalanine	7.6	8.5	11.3
Lysine	8.7	9.2	10.6
Histidine	4.0	3.7	4.5
Arginine	11.9	11.2	12.0
Total	168.5	174.1	209.0

mg/g), 프롤린(proline) (12.5 mg/g)순으로 나타났으며, 전체 아미노산 중 52.5%를 차지하고 있었다. 발아에 따른 총 아미노산 함량은 GEB가 168.5 mg/g, 24-GEGB가 174.1 mg/g, 48-GEGB가 209.0 mg/g으로 GEB에 비해 각각 1.03, 1.24배 아미노산 함량이 증가하였다. Huh 등(17)의 연구에 따르면 발아시킨 콩의 아미노산 함량은 24, 48, 72시간 발아함에 따라 발아 전에 비해 각각 1.02, 1.17, 1.20배 증가하였다는 보고와, Kim 등(18)의 보고에서도 홍화씨가 발아 전에 비해 발아 후 총 아미노산 함량이 2.1배 증가하였다는 결과와 비슷하게 나타났다. 또한 호박 종자의 발아가 진행되면서 단백질이 에너지원으로 소모되어 감소하지만 반대로 아미노산 함량이 증가한다는 결과와도 같은 경향이 확인되었다(19). 이와 같이 발아 후 보리 당단백질 추출물의 총 아미노산 함량의 증가는 다른 식물 종자 발아와 유사한 경향을 나타내었으며, 증가 이유는 보리가 발아 하면서 호분층의 프로테이스의 활성이 증가하여 배유에 저장되어 있던 고분자 단백질이 저분자 아미노산으로 분해되어 쉽게 추출되었기 때문인 것으로 보인다.

발아 시간 변화에 따른 보리 추출물의 분자량 확인

발아 전후 보리 당단백질 추출물에 대한 분자량 확인 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 단백질 밴드 확인 결과 보리가 48시간 발아함에 따라 단백질 농도가 증가하였음을 확인할 수 있었고, 주요 밴드는 55 kDa의 크기에서 확인할 수 있었다. GEB의 분자량은 5, 20, 40, 60 kDa, 24-GEGB의 분자량은 5, 20, 40, 55, 60 kDa, 48-GEGB의 분자량은 5, 20, 40, 45, 55, 60 kDa 크기의 단백질로 나타났다. GEB의 경우 4개의 단백질 밴드가 확인되었으나 24시간 발아하면서 55 kDa 크기의 단백질이 추가로 확인되었고, 48시간 발아가 진행되면서 45 kDa 크기의 단백질이 생성되어 6개의 단백질 밴드가 확인되었다. 이와 같은 결과는 보리가 발아하면서 단백질 분해 효소에 의해 고분자 단백질이 저분자 단백질로 분해되어 단백질 밴드가 증가된 것으로 보인다. Sung 등(20)의 연구에 따르면 20°C에서 발아한 보리의 분자량을 확인한 결과 발아가 진행되면서 단백질 함량이 증가하고, 발아 전에는 없었던 단백질 밴드가 생성되었다고 보고하였고, 또한 Vernaza 등(12)의 연구에서 발아에 따른 콩 단백질 추출물의 분자량을 확인

**Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds.**

한 결과 종자가 발아하는 동안에 고분자 단백질이 우선적으로 대사되었다는 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

발아 시간 변화에 따른 보리 당단백질 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 확인

발아 전후 보리 당단백질 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 확인한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 시료를 6, 25, 100 µg/mL의 농도로 세포에 처리하여 세포의 생존율을 측정한 결과 100 µg/mL의 고농도에서는 6 µg/mL의 저농도보다 세포 생존율이 낮아졌지만 GEB, 24-GEGB, 48-GEGB 시료 모두 90%이상의 세포 생존율을 나타내어 대식세포 생장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

발아 시간 변화에 따른 보리 당단백질 추출물의 RAW 264.7 세포에서의 산화질소 II 생성능

인체내외의 외부로부터 항원이 침입하게 되면 자기 방어를 위해 대식세포가 즉각적으로 활성화되고, 활성화된 대식세포에서 생산되는 산화질소 II는 비특이적 숙주 방어 기작인 탐식작용(phagocytosis)을 증대시킴으로써, 세균 및 암세포의 증식 억제 등의 생체 방어 메커니즘의 중요한 역할을 한다(21). 발아시킨 보리 당단백질 추출물의 체내 면역 증강을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 대한 산화질소 II 생성을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 비처리 대조군의 경우 3.0 µM의 산화질소 II를 생성하였고, 양성대조군인 지방질다당류를 처리시 41.3 µM의 산화질소 II를 생성하였다. 시료를 6, 25, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 GEB의 경우 2.6, 3.8, 17.8 µM의 산화질소 II를 생성하였고, 24-GEGB의 경우 18.8, 29.2, 36.3 µM의 산화질소 II를, 48-GEGB의 경우 35.5, 38.8, 40.8 µM의 산화질소 II를 각각 생성하였다. GEB의 경우 6, 25 µg/mL의 농도에서는 비처리 대조군과 비슷한 산화질소 II를 생성하여 면역세포를 자극하지 않는 것으로 보이며, 24-GEGB와 48-GEGB의 경우 6 µg/mL의 낮은 농도에서 GEB보다 각각 7배, 13배 높은 산화질소 II를 생성하였다. 특히 48-GEGB의 경우 100 µg/mL의 농도에서 양성대조군인 지방질다당류와 비슷한 산화질소 II를 생성하여 발아가 진행 될수록 대식세포 활성화 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 생리활성을 갖는 추출물을

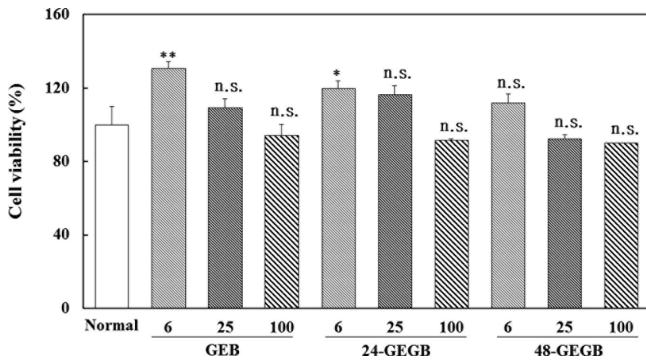


Fig. 2. Cell cytotoxicity of glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds on macrophage. Raw 264.7 cells were treated with 6, 25, and 100 µg/mL of GEB, 24-GEGB and 48-GEGB for 24 h. Bars represent the mean±SD values of three subject in each group. $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared to the control, n.s., not significant.

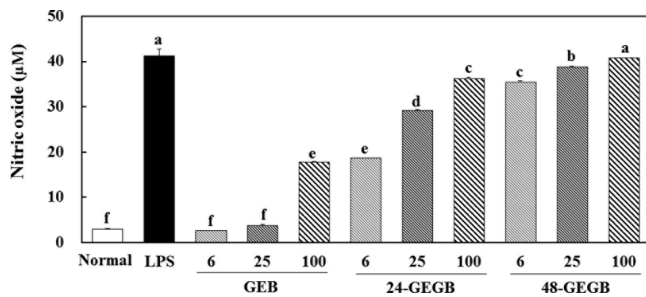


Fig. 3. Effects of glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds on the nitric oxide production of the RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 6, 25, and 100 µg/mL of GEB, 24-GEGB and 48-GEGB or LPS (1 µg/mL) for 24 h. Bars represent the mean±SD values of three subject in each group ($p < 0.05$).

RAW 264.7 세포에 처리했을 때 농도 의존적으로 산화질소 II와 인터류킨-6, 종양괴사인자- α 가 생성되어 생체 면역 기능을 증가시킨다고 보고되고 있으며(22,23), 발아시킨 보리 당단백질 추출물이 대식세포를 자극시켜 산화질소 II의 생성을 도와 외부 항원에 대한 1차 방어를 하여 면역반응이 일어나는 초기에 생체 방어 기전에 유리한 작용을 할 수 있을 것으로 예측된다.

발아 시간 변화에 따른 보리 당단백질 추출물의 RAW 264.7 세포에서의 사이토카인(인터류킨-6, 종양괴사인자- α) 생성능

발아 보리 당단백질 추출물의 또 다른 면역 증강 효과를 확인하기 위해 인터류킨-6, 종양괴사인자- α 의 사이토카인 생성을 확인하였다. 사이토카인은 면역세포에서 생성되는 당단백질로 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로 이들의 생성과 분비는 면역 반응 조절에 있어서 매우 중요하다. 대식세포가 분비하는 대표적인 면역 유도 사이토카인에는 인터류킨-6, 인터류킨-12, 종양괴사인자- α 등이 있다(21).

대식세포에서 분비된 인터류킨-6는 조절작용과 면역반응 등 중요한 기능을 하는 사이토카인으로 특히 B세포의 항체생성 세포인 형질세포(plasma cell)의 최종 분화를 활성화시키는 작용을 한다(23). 발아 전후 보리 당단백질 추출물에 의한 인터류킨-6 생성 결과는 Fig. 4A에 나타내었다. 시료를 대식세포에 각각 6, 25 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 GEB의 경우 각각 40.2, 212.6 pg/mL의 인터류킨-6를 생성하였고, 24-GEGB의 경우 1159.4, 1418.4 pg/

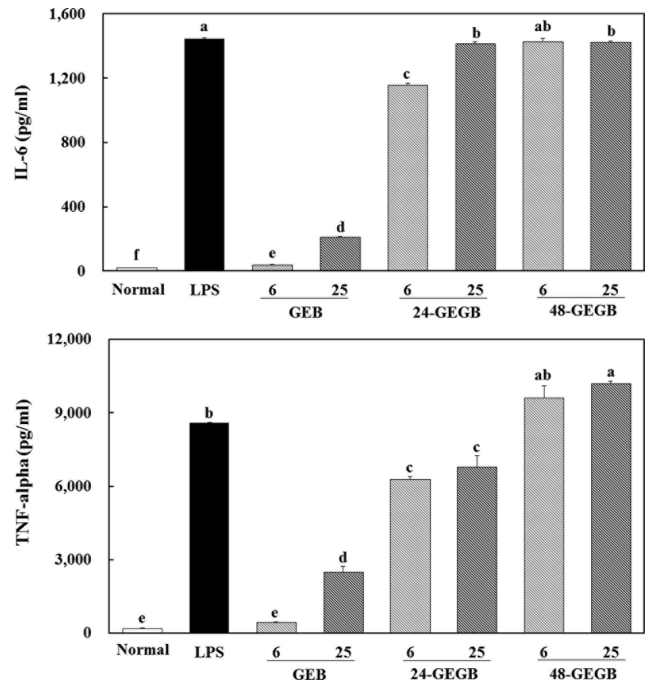


Fig. 4. Effects of glycoprotein extracts from pre- and post-germinated barley seeds on cytokines (IL-6 and TNF- α) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 6, 25 µg/mL of GEB, 24-GEGB and 48-GEGB or LPS (1 µg/mL) for 24 h. Bars represent the mean±SD values of three subject in each group ($p < 0.05$).

mL, 48-GEGB의 경우 1428.8, 1425.6 pg/mL의 인터류킨-6를 각각 생성하여 발아가 진행될수록 인터류킨-6의 생성이 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 비처리 대조군인 20 pg/mL보다 6 µg/mL의 낮은 농도에서 24-GEGB, 48-GEGB 모두 각각 28배, 35배가 넘는 인터류킨-6를 생성하였고, 48-GEGB의 경우 모든 농도에서 지방질다당류와 같은 수준의 인터류킨-6를 생성하였다.

종양괴사인자- α 는 T림프구와 상호 작용하여 T림프구의 활성화와 성장 등을 조절하며, 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 직접적으로 항암 작용을 나타내기도 한다(24). 발아 전후 보리 당단백질 추출물에 대한 종양괴사인자- α 생성에 대한 결과는 Fig. 4(B)에 나타내었다. 시료를 6, 25 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 GEB의 경우 448.3, 2498.3 pg/mL의 종양괴사인자- α 를 생성하였고, 24-GEGB의 경우 6294.2, 6802.5 pg/mL, 48-GEGB의 경우 9610.8, 10210.8 pg/mL의 종양괴사인자- α 를 각각 생성하였다. GEB의 경우 6 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 생성된 종양괴사인자- α 는 대조군(200 pg/mL)과 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 발아가 진행될수록 비처리 대조군에 비해 종양괴사인자- α 의 생성이 유의적으로 증가하였다. 특히 48-GEGB의 경우 지방질다당류 처리시 생성된 8606.7 pg/mL보다 1.1배 더 높은 종양괴사인자- α 를 생성하였다. Park 등(25)은 쌀겨에서 추출한 당단백질을 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 종양괴사인자- α 의 생성이 농도 의존적으로 나타났고, 양성대조군인 지방질다당류 보다 더 높은 종양괴사인자- α 를 생성하였다고 한 보고와 유사한 결과를 나타냈다.

보리가 발아함에 따라 단백질의 경우 45, 55 kDa 크기의 분자량을 가지는 단백질이 생성되었고, 당조성은 자일로스(48.2%)와 아라비노스(36.3%)의 조성으로 변화되는 것을 확인하였다. 미강 당단백질에 대한 선행연구에서는 당쇄(glycan)가 면역반응에 관여

한다는 결론을 얻었고(25) 다수의 연구에서 다당성분이 대식세포를 자극하여 면역반응에 관여한다는 보고(26,27)를 종합했을 때, 면역반응에 관여하는 발아보리 당단백질 중 당쇄 부분이 주요 활성부위로 추론된다.

따라서 발아한 보리 당단백질 추출물은 대식세포를 활성화시켜 인터류킨-6를 생성하여 B세포의 항체생성 작용을 활성화시키는 체액성 면역(humoral immunity)에 도움을 주고, 또한 종양괴사인자- α 를 생성하여 T림프구가 외부 항원을 인지하여 분비하는 생리활성 물질인 lymphokine을 분비하는데 도움을 주어 세포성 면역(cell-mediated immunity) 증강에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

발아 전후 보리 당단백질 추출물에 대한 영양성분 변화와 RAW 264.7 세포에 처리 후 생성하는 산화질소 II와 사이토카인(인터류킨-6, 종양괴사인자- α) 양을 측정하여 면역 증진 효능을 예측하였다. 보리의 발아가 진행됨에 따라 당단백질 추출물의 단백질과 지방질 함량은 감소하고 총당 함량은 증가하는 추세를 확인하였다. 주요 증성당은 아라비노스, 포도당, 자일로스와 자일로스는 증가하였다. 아미노산 함량은 GEB에 비해 24-GEB와 48-GEB에서 각각 1.03, 1.24배 증가하였다. 면역 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포에 24-GEB와 48-GEB를 처리한 결과 GEB에 비해 더 높은 산화질소 II와 사이토카인(인터류킨-6, 종양괴사인자- α)을 생성하였다. 결론적으로, 보리 종자가 발아하면 종자 내 단백질, 지방질 및 당질 등의 영양성분 조성이 변하고, 그 결과 발아보리 당단백질 추출물은 외부 침입에 대해 1차적으로 방어하는 대식세포를 자극하여 세포에 독성을 미치지 않는 범위의 면역매개물질 생성하여 면역 증진 효과를 기대할 수 있는 것으로 판단된다.

References

- Hibbs Jr JB, Taintor RR, Vavrin I, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 157: 87-94 (1998)
- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326 (1987)
- Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee JS, Jeong HS. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activity on different parts of germinated rough rice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 775-780 (2011)
- Cha MN, Jun HI, Song GS, Kim YS. The effects of germination conditions on GABA and the nutritional components of barley. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 41-47 (2012)
- Paucar-Menacho LM, Berhow MA, Gontijo Mandarino JM, Chang YK, Gon de Mejia EG. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Res. Int.* 43: 1856-1865 (2010)
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- Na KH, Park BT, Park JW, Han KJ, Park HJ, Kim HH. Neutral and amino sugars composition of a Lectin from *Maackia fauriei*. *Yakhak Hoeji* 53: 34-40 (2009)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
- Kim YH, Yoon HJ, Moon ME, Lee JH, Park HS, Kim JS. Production of NO, TNF- α and IL-6 by squalene, alkoxy glycerol, batyl and chimyl solutions in raw 264.7 macrophage cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1503-1508 (2005)
- Chung DS, Kim HK. Changes of protein and lipid composition during germination of *Perilla frutescens* seeds. *J. Life Sci.* 8: 318-325 (1998)
- Vernaza MG, Dia VP, de Mejia EG, Chang YK. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chem.* 134: 2217-2225 (2012)
- Kim YH, Cho JI. Kinetic studies on amylases from barley and wheat malt. *J. Fd Hyg. Safety* 6: 127-131 (1991)
- Gimbi DM, Kitabatake N. Changes in alpha-and beta-amylase activities during seed germination of African finger millet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53: 481-488 (2002)
- Kum JS, Choi BK, Lee HY, Park JD, Park HJ. Physicochemical properties of germinated brown rice. *Korean J. Food Preserv.* 11: 182-188 (2004)
- Kim SL, Son YK, Son JR, Hur HS. Effect of germination condition and drying methods on physicochemical properties of sprouted brown rice. *Korean J. Crop Sci.* 46: 221-228 (2001)
- Huh D, Bae MJ, Jo DJ, Kim JO, Lee KA, Lee GD. Physicochemical and functional properties of germinated *Glycine max* Merr soybeans. *J. Food Sci. Nutr.* 12: 209-216 (2007)
- Kim EO, Lee KT, Choi SW. Chemical comparison of germinated and ungerminated-safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1162-1167 (2008)
- Lee BJ, Jang HS, Lee GH, Oh MJ. Changes in chemical compositions of pumpkin (*Cucurbita moschata* DUCH.) seed sprouts. *Korean J. Food Preserv.* 10: 527-533 (2003)
- Sung HG, Shin HT, Ha JK, Lai HL, Cheng KJ, Lee JH. Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. *Bioresour. Technol.* 96: 1297-1303 (2005)
- Nam SH, Rhee YK, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Cho CW. Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean J. Food Nutr.* 25: 755-761 (2012)
- Kim JJ, Lee HJ, Yee ST. Effect of *Pueraria thunbergiana* extracts on the activation of immune cells. *J. Life Sci.* 22: 1107-1113 (2012)
- Jeon CB, Kim YH, Batsuren D, Tunsag J, Nho CW, Pan CH, Lee JK. Immune-stimulating effects of *Polygonum aviculare* L. extract on macrophages. *Yakhak Hoeji* 57: 394-399 (2013)
- Yoon TJ. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. *Korean J. Food Nutr.* 21: 275-282 (2008)
- Park HY, Yu AR, Choi IW, Hong HD, Lee KW, Choi HD. Immunostimulatory effects and characterization of a glycoprotein fraction from rice bran. *Int. Immunopharmacol.* 17: 191-197 (2013)
- Seo YS, Shin KS. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 95-102 (2012)
- Shin HJ, Park KM, Kim YS, Nam KY, Lee YH, Park JD. Isolation and characterization of immunomodulatory glycoprotein from the root of *Panax ginseng*. *J. Ginseng Res.* 24: 128-133 (2000)