

보리 잎과 옥수수 수염의 혼합과 유산균 발효를 이용한 γ -aminobutyric acid 생산 증진*

김형주** · 윤영걸***

Enhancement of γ -aminobutyric Acid Production by Combination of Barley Leaf and Corn Silk and Its Fermentation with Lactic Acid Bacteria

Kim, Hyung-Joo · Yoon, Young-Geol

γ -aminobutyric acid (GABA) is a non-proteinogenic amino acid biosynthesized through decarboxylation of L-glutamic acid by glutamic acid decarboxylase. GABA is believed to play a role in defense against stress in plants. In humans, it is known as one of the major inhibitory neurotransmitters in the central nervous system, exerting anti-hypertensive and anti-diabetic effects. In this report, we wanted to enhance the GABA production from the barley leaf and corn silk by culturing them with lactic acid bacteria (LAB). The barley leaf and corn silk were mixed with various weight combinations and were fermented with *Lactobacillus plantarum* in an incubator at 30°C for 48 h. After extracting the fermented mixture with hot water, we evaluated the GABA production by thin layer chromatography and GABase assay. We found that the fermented mixture of the barley leaf and corn silk in a nine to one ratio contained a higher level of GABA than other ratios, meaning that the intermixture and fermentation technique was effective in increasing the GABA content. We also tested several biological activities of the fermented extracts and found that the extracts of the fermented mixture showed improved antioxidant activities than the non-fermented extracts and no indication of cytotoxicity. These results suggest that our approach on combining the barley leaf and corn silk and its fermentation with LAB could lead to the possibility of the development of functional foods with high levels of GABA content and improved biological activities.

Key words : *barley leaf, corn silk, GABA, lactic acid bacteria, γ -aminobutyric acid*

* 본 연구는 산업통상자원부에서 지원한 지역특화산업육성(R&D)기술개발사업과 (재)지능형 바이오 시스템 설계 및 합성 연구단의 지원(NRF-2015M3A6A8066204)에 의하여 수행되었음.

** 중원대학교 의생명과학과

*** Corresponding author, 중원대학교 의생명과학과(ygyoon@jwu.ac.kr)

I. 서 론

γ -aminobutyric acid (GABA)는 자연계에 널리 분포되어 있는 비단백질 아미노산으로 glutamic acid가 glutamate decarboxylase에 의해 탈탄산화되어 생성된다(An et al., 2010). GABA는 인간과 동물의 중추신경계에서 억제성 신경전달물질로도 알려져 있으며 뇌 혈류를 개선하여 뇌기능을 촉진시키는 생리작용 및 혈압저하, 항 불안, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 증가 억제, 간 기능 대사 증진 등의 효능이 있다고 밝혀져 기능성 성분으로 각광받고 있다(Bae et al., 2009). 이러한 GABA를 고농도로 얻기 위해 화학적 합성 방법이 사용됐지만 식욕부진, 설사, 변비 등의 부작용을 일으킨다고 보고되었으며 또한 화학약품으로 분류되어 식품으로의 이용은 어려울 것으로 예상하고 있다(Kim et al., 2013; Hudec et al., 2015). GABA는 채소, 과일, 곡류 등 다양한 식물에도 존재하고 있다고 알려져 있으나 식물체 내의 함유량이 매우 낮아 생리활성 효능을 나타낼 수 있는 농도를 얻기 어려우므로 발아, 발효, 열 그리고 혐기적 처리 등 여러 변형 기술을 적용하여 GABA 생산량을 증진시키기 위한 연구가 진행되고 있다(Chang et al., 1992; An et al., 2010; Jeon et al., 2010; Lee et al., 2014).

현재 쌀, 현미, 보리 등의 곡류에 GABA가 다량 함유되어 있다는 것이 밝혀짐에 따라 GABA와 관련된 현미나 쌀에 대한 연구는 활발히 진행되는데 비해 보리와 관련된 연구는 아직 많이 부족한 실정이다. 보리(*Hordeum vulgare*)는 외떡잎 식물인 벼과에 속하는 작물로 우리나라 주요 재배 식물 중 하나이며, 단백질, 지방, 무기질 등의 영양성분을 다양하게 함유하고 있다. 특히 보리 잎에는 GABA를 비롯한 여러 비타민과 효소, 단백질, flavonoid 등의 인체 생리 활성 물질이 함유되어 있어 항산화 및 항염증 등의 다양한 효능을 나타낸다고 보고되었다(Kim et al., 2006). 옥수수(*Zea mays*)도 또한 보리와 같이 세계적으로 널리 재배되고 있는 식용 작물 중 하나로 열매는 식용 및 동물 사료로써 사용되고 있으며, 옥수수의 부산물 중 하나인 옥수수 수염은 한방에서 이뇨제로 사용되고 있다(Min et al., 2011). 옥수수 수염은 이뇨 작용뿐만 아니라 산화적 스트레스 억제 작용, 항산화 효능, 항피로 활성, 항균 효과 등의 다양한 작용을 하는 것으로 보고되어 있으며 flavonoid, allantoin, maysin 등의 기능성 물질을 함유한 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2014). 보리 잎과 옥수수 수염에는 GABA의 전구체로서 알려진 glutamic acid를 포함한 다량의 아미노산을 함유하고 있음이 알려져 있으며 특히 옥수수 수염은 맛과 향이 뛰어나기 때문에 향료 및 식품첨가물로 널리 사용되고 있다(Kim et al., 2000; Kim et al., 2006). 또한 보리 잎과 옥수수 수염에는 GABA뿐만 아니라 여러 기능성 생리활성 물질이 다량 함유되어 있다고 알려져 있으므로 현대인의 잘못된 식생활과 스트레스 그리고 환경오염 등으로 인해 발생할 수 있는 다양한 질환에 대한 예방식품으로서도 이용할 수 있을 것으로 기대되고 있다(Ku et al., 2009; Ohn and Kim, 2012).

본 연구에서 우리는 보리 잎과 옥수수 수염으로부터 GABA의 생산을 증진시키기 위하여

보리 잎과 옥수수 수염의 혼합기술 및 유산균을 이용한 발효기술을 적용하였다. 본 연구를 통해 보리 잎과 옥수수 수염의 최적 혼합 비율을 확립하였고 발효를 통해 GABA의 생산이 유의적으로 증진되는 지를 확인하였으며 또한 혼합발효추출물의 항산화 활성과 세포독성을 평가하여 보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물의 기능성 증진을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

보리 잎은 10월 경북 영양군 일월면 도계리에 파종하여 4월 중순에 채취한 보리 잎을 주 실험 대상으로 하였으며 수확한 보리 잎은 이물질을 제거한 후 흐르는 물에 세척한 후 간헐적으로 절단한 다음 헹기처리와 건조과정을 거쳐서 시료로 사용하였다. 헹기처리에 의해서 GABA 함량이 증진된 보고에 의거하여 보리 잎을 5 kg/m^3 로 비닐봉지에 넣고 여기에 N_2 기체를 주입한 후 밀봉한 다음 4°C 에서 24시간 동안 방치하여 수행하였다(Lee, 2015). 헹기 처리한 보리는 동결건조 후 고운 가루가 되도록 분말화 하였다. 분말화한 보리 잎은 고압 멸균기를 이용하여 121°C 에서 20분간 멸균한 후 사용하였다. 옥수수 수염은 피산균에서 유기농으로 재배한 원료를 깨끗이 씻어 말린 후 고운 가루가 될 때까지 분쇄한 다음, 옥수수 수염 분말을 고압멸균기를 이용하여 121°C 에서 20분간 멸균한 후 사용하였다.

2. 추출물의 제조

보리 잎과 옥수수 수염의 최적 혼합비를 결정하기 위해 최종 10 g의 무게 비율로 11 가지 조합(0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0 (w/w))으로 혼합하였고 혼합물에 멸균수를 3배수 넣은 후 유산균(*Lactobacillus plantarum* K-1BR)을 배합하였다. 발효를 위해 1×10^7 CFU/mL의 유산균을 혼합물에 넣고 30°C 인큐베이터에서 다양한 시간(12, 24, 48, 60, 72시간)동안 배양한 다음 열수 10배수를 첨가한 후 90°C 에서 2시간 동안 교반 추출하였다. 유산균 혼합물을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만을 모은 후 멸균된 3M paper (Whatman, UK)를 사용하여 감압 여과하였다. 추출물 여과액을 감압증발기(Eyera, Japan)를 이용하여 1 g/mL의 농도가 되도록 농축하였다. 최종 추출물은 4°C 에 보관하며 7~10일 이내에 사용하였다.

3. Thin layer chromatography (TLC)를 이용한 GABA의 정성분석

추출물을 TLC 판(10×10 cm) 하단의 10 mm 위치에 1 μ L씩 점적한 후 건조하였다. 표준 시약은 0.01 M GABA (Sigma-Aldrich, USA)를 구입하여 사용하였다. 점적 시 각 점적의 직경이 최소한으로 되도록 주의하고 각 시료 간의 거리는 전개 후 옆 시료와 섞이는 것을 방지하기 위해 1 cm 이상 차이가 나도록 하였다. 전개는 TLC chamber (14×12×8 cm)에서 수행하였으며 전개용매는 n-butanol, acetic acid 그리고 증류수를 9:3:3 (v/v/v) 비율로 혼합하여 사용하였다(Qiu et al., 2010). 전개가 끝난 TLC 판을 heat gun으로 건조한 후 acetic acid로 희석시킨 50% ninhydrin 용액을 분사하여 발색을 유도하여 확인하였다. 표준시약의 GABA 위치와 시료의 밴드를 비교하여 GABA의 위치를 확인하였다.

4. GABase를 이용한 GABA의 정량분석

GABA의 정량은 기존의 방법을 변형하여 측정하였다(Zhang and Bown, 1997; Tsukatani et al., 2005). 보리 잎과 옥수수 수염을 일정한 무게 비율로 혼합한 11개의 혼합추출물(1 g/mL)을 각각 1/10로 희석한 시료 2.5 μ L, 100 mM potassium pyrophosphate buffer 97.5 μ L, 10 mM β -NADP⁺ 17.5 μ L, 100 mM α -ketoglutarate 2.5 μ L를 96-well에 넣고 혼합한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 1 unit/ml GABase 5 μ L를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 암반응을 시킨 다음 340 nm에서 흡광도를 다시 측정하였다. GABA의 정량은 구매한 표준시약 GABA를 0, 10, 50, 100, 250, 500 ppm의 농도별로 희석한 후 흡광도를 측정하여 유도한 표준곡선을 이용해 산출하였다. GABA의 정량은 GABase 효소반응 전의 추출물 흡광도와 효소반응 후의 흡광도 차이를 표준곡선과 비교하여 추출물에 함유된 GABA의 농도를 계산하였다.

5. DPPH radical scavenging 활성

DPPH 라디칼 소거능은 기존의 방법을 변형하여 측정하였다(Bondet et al., 1997). Dimethylsulfoxide (DMSO) 용액으로 희석한 각각의 농도별 추출물(0.4, 2, 10 mg/mL) 40 μ L와 30 mM DPPH용액 760 μ L를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 항산화 활성을 결정하였다. 양성대조군으로 항산화제인 ascorbic acid (45 μ M)를 사용하였다.

6. 세포생존율 측정

마우스 뇌신경소교세포주 BV2와 대식세포주 Raw 264.7를 이용하여 세포생존율을 측정

하였다. 먼저 세포를 96-well plate에 5×10^3 cell/well로 분주하여 24시간 배양한 후 각각의 추출물을 첨가하였다. 그 후 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 첨가하고 3시간 다시 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100 μ L를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 microplate reader (Biorad, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

결과의 통계학적 분석은 graph pad prism 6.0 프로그램을 이용하여 수행하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고, 대조군과 실험군 간의 평균 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검증을 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 보리 잎과 옥수수 수염 혼합물에서의 유산균 변화

멸균된 보리 잎과 옥수수 수염 분말을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 (w/w)의 비율로 전체 질량이 10 g이 되도록 혼합하였다. 유산균은 액체 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 배지에서 12시간 동안 선 배양한 것을 사용하였다. 선 배양된 유산균(1×10^7 CFU/mL)을 보리 잎과 옥수수 수염 혼합물에 접종한 후 30°C에서 배양하였다. 12, 24, 36, 48, 60, 72시간 동안 배양 발효한 각 비율의 혼합물로부터 1 g을 취하여 증류수로 1×10^{-6} 까지 희석한 후 고체 MRS 배지에 도포하였다. 도포된 고체배지를 30°C 인큐베이터에서 배양하여 보리 잎과 옥수수 수염을 혼합한 혼합물의 발효시간에 따른 유산균의 증식 변화를 확인하였다(Table 1).

보리 잎과 옥수수 수염이 각각 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10의 비율로 혼합된 혼합물은 발효 72시간 동안 유산균 수는 거의 증가하지 않았고 시간에 따라 감소하였다. 반면 보리 잎이 많이 함유된 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 비율의 혼합물은 발효시간이 지남에 따라 유산균 수에 변화를 보였다. 10:0 비율의 혼합물은 발효시간에 따라 유산균수가 3배 이상 증가했으며, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 비율은 48시간 발효까지 유산균 수가 지속적으로 증가하다가 이 후에는 감소하였다. 특히 9:1 혼합물은 발효 48시간 동안 다른 혼합물과 비교하였을 때 초기 유산균 수보다 약 7배 정도 유산균 수의 증가를 보였다. 보리 잎과 옥수수 수염의 혼합비율에 따라 유산균의 증식이 변화한 이유는 각 소재가 함유한 유리당 함량이 영향을 미쳤을 가능

성이 있을 것으로 사료된다. 보리 잎의 경우 약 5.70~8.35%의 글루코스 함량을 보이고 있으나 옥수수 수염의 경우는 약 0.23% 정도만을 함유하고 있는 것으로 보고되었으며 따라서 보리 잎의 비율이 높을수록 유산균의 성장이 활발해진 것으로 판단된다(Kim et al., 1995; An, 2003). 10:0, 9:1, 8:2, 7:3 비율의 혼합물에서 48시간 동안 발효했을 때 유산균 수가 가장 많이 증가하는 것으로 보아 이 시간이 발효가 가장 활발히 되는 시간으로 판단하였고 따라서 보리 잎과 옥수수 수염 혼합물의 최적 발효 적합시간을 48시간으로 결정하였다.

Table 1. Viable cell numbers of lactic acid bacteria grown in the mixtures of various combination of barley leaf and corn silk in a different incubation time

Time (h)	Cell numbers of lactic acid bacteria ($\times 10^5$ CFU/mL) grown in the various mixtures of barley leaf and corn silk (gram : gram)*										
	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	103	112	122	124	113	98	89	94	89	81	98
24	144	149	179	151	145	94	99	73	69	84	82
36	165	325	272	195	153	75	83	65	68	75	70
48	362	692	324	250	185	85	90	60	71	61	42
60	217	418	175	142	116	70	61	51	57	54	40
72	95	201	159	76	64	57	69	47	46	44	33

* Values are mean of two independent experiments.

2. 보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물의 GABA 증진

11가지 비율(10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 (w/w))의 보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물에 포함되어 있는 GABA생성의 증진여부를 TLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 1). 혼합발효추출물의 보리 잎과 옥수수 수염의 비율이 10:0 으로부터 2:8 까지는 모두 대조군의 GABA와 같은 위치에 GABA 밴드가 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 1A, arrow). 옥수수 수염의 비율보다는 보리 잎의 비율이 높은 혼합발효추출물에서 GABA가 더 강하게 나타났으며 따라서 혼합발효추출물에서 보리 잎의 비율이 높을수록 GABA의 생산이 증가함을 알 수 있었다. 특히 보리 잎과 옥수수 수염의 9:1과 8:2 혼합물에서 유산균으로 발효한 혼합발효추출물(Fig. 1B, lanes 7 and 8, arrows)이 발효하지 않은 추출물(Fig. 1B, lanes 3 and 4, arrows)보다 GABA 밴드가 더 강하게 나타났다. 이는 보리 잎과 옥수수 수염의 혼합과 유산균 발효로 인해 GABA의 생성이 더욱 촉진되기 때문이라고 사료된다. 더불어

Fig. 1A의 lane 11에서 asterisk로 표시된 밴드는 옥수수 수염 단독 발효에 의해 나타난 밴드로서 표준 GABA 밴드보다 아래에 위치하므로 GABA는 아닐 것으로 판단되나 향 후 분석이 필요할 것으로 사료된다. 유산균을 이용한 GABA의 생산 및 함량 증진은 이미 다수의 보고가 있으며 유산균과 같은 미생물 발효를 통해 생산된 GABA는 일반적으로 안전하며 식품으로서의 이용이 가능하다고 알려져 있다(Hudec et al., 2015).

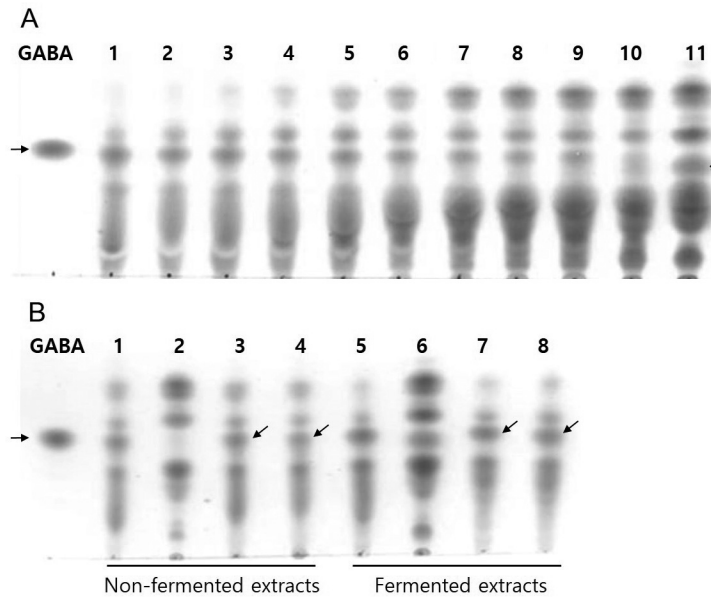


Fig. 1. Analysis of GABA in the fermented extracts.

- (A) Thin layer chromatography analysis of GABA in the extracts of the fermented mixture of barley leaf and corn silk. Lane GABA: GABA standard; lane 1: fermented barley leaf extract (10:0); lanes 2-10: fermented mixtures of barley leaf and corn silk (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 and 1:9 ratios, respectively), lane 11: fermented corn silk extract (0:10).
- (B) Thin layer chromatography analysis of GABA in the extracts of the fermented and non-fermented 9:1 and 8:2 mixtures of barley leaf and corn silk. Lane GABA: GABA standard; lane 1: non-fermented barley leaf extract; lane 2: non-fermented corn silk extract; lanes 3-4: non-fermented extracts from 9:1 and 8:2 mixtures of barley leaf and corn silk, respectively; lane 5: fermented barley leaf extract; lane 6: fermented corn silk extract; lanes 7-8: fermented extracts from 9:1 and 8:2 mixtures of barley leaf and corn silk, respectively.

3. GABA의 정량분석

보리 잎(10:0) (w/w), 옥수수 수염(0:10) (w/w), 보리 잎과 옥수수 수염을 일정한 비율(9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) (w/w)로 혼합한 혼합물을 각각 48시간 동안 유산균 발효하여 열수 추출한 후, 추출물의 GABA 함량을 GABase 분석법을 이용하여 정량분석하였다

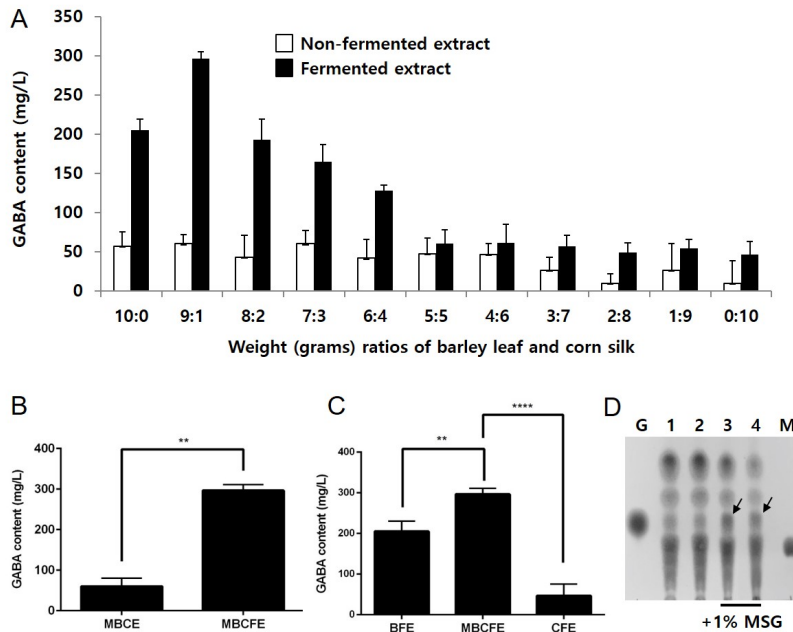


Fig. 2. Analysis of GABA contents.

- (A) GABA contents of different combinations of barley leaf and corn silk mixtures. The barley leaf and corn silk were mixed with eleven different weight combinations (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, and 0:10, respectively), fermented with lactic acid bacteria and extracted with hot water. The GABA contents were analyzed by GABase assay method and compared with the non-fermented extracts.
- (B) Comparison of GABA contents in the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk with or without fermentations (MBCE: non-fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk; MBCFE: fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk). Results expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (** p <0.01).
- (C) Comparison of GABA contents in the extracts of the fermented barley leaf, the extract of the fermented 9:1 mixture of barley leaf and corn silk, and the extract of the fermented corn silk (BFE: fermented extract of barley leaf; MBCFE: fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk; CFE: fermented extract of corn silk). Results expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (** p <0.01, **** p <0.0001).
- (D) Thin layer chromatography analysis of GABA production. MRS media supplemented with 1% MSG were used to culture the lactic acid bacteria for 48 h. Arrows indicate GABA produced from MSG. Lane G: GABA standard; lanes 1 and 2: *Lactobacillus plantarum* K-1BR; lanes 3 and 4: *Lactobacillus plantarum* K-1BR with 1% MSG; lane M: MSG standard.

(Fig. 2). Fig. 2A의 결과에서 보듯이 혼합물에서 보리 잎의 비율이 높을수록 GABA 함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 보리 잎(10:0)과 옥수수 수염(0:10) 각각의 단독발효추출물보다 보리 잎과 옥수수 수염을 9:1로 혼합한 혼합발효추출물의 GABA 함량이 가장 높았다 (Fig. 2A). 즉, 혼합물에서 보리 잎의 비율이 높을수록 GABA 함량이 증가함을 알 수 있었

다. 특히 보리 잎과 옥수수 수염을 9:1로 혼합하여 발효한 추출물(MBCFE)의 GABA 함량은 296.67 mg/L로 테스트한 발효추출물 중에서 가장 높은 증가를 나타냈으며 발효하지 않은 9:1 혼합추출물(MBCE)보다 약 5배 정도 GABA 함량이 증가하였다(Fig. 2B). 또한, 9:1 혼합 발효추출물(MBCFE)은 보리 잎 단독발효추출물(10:0, BFE)보다 약 1.5배, 옥수수 수염 단독 발효추출물(0:10, CFE)보다는 약 6배 정도 증가하였다(Fig. 2B and 2C). 이와 같은 결과는 소량 첨가한 옥수수 수염과 유산균 발효로 인해 보리 잎과 옥수수 수염 9:1 혼합발효추출물에서의 GABA 함량이 보리 잎 단독발효추출물에서보다 증진되는 효과가 있음을 의미한다. 더불어 본 연구에서 사용한 균주인 *L. plantarum* K-1BR의 GABA 생성능을 monosodium glutamate (MSG)를 기질로 하여 테스트한 결과 우수한 GABA 생성능을 지닌 균주임을 확인하였다(Fig. 2D). 특히 보리 잎과 옥수수 수염 9:1 혼합비율에서의 유산균의 증식과 발효가 최대화됨으로써 보리 잎과 옥수수 수염에 함유된 glutamic acid를 효과적으로 GABA로 전환시키고 결과적으로 9:1 혼합비율에서 GABA의 함량이 극대화된 것으로 사료된다.

4. 보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물의 세포독성 측정

보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT 분석을 실시하였다(Fig. 3). BV2와 RAW264.7 세포 각각에 대하여 무처리 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 보리 잎과 옥수수 수염 9:1 혼합 및 혼합발효추출물의 농도별 처리에 따른 세포 생존율을 측정하였다. 각각의 세포에 보리 잎과 옥수수 수염 단독 및 혼합추출물과 단독 및 혼합발효추출물 0.5~10 mg/mL을 각각 처리한 경우 세포생존율은 80% 이상으로서 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Lee et al., 2004) (Fig. 3A and 3B). 즉 모

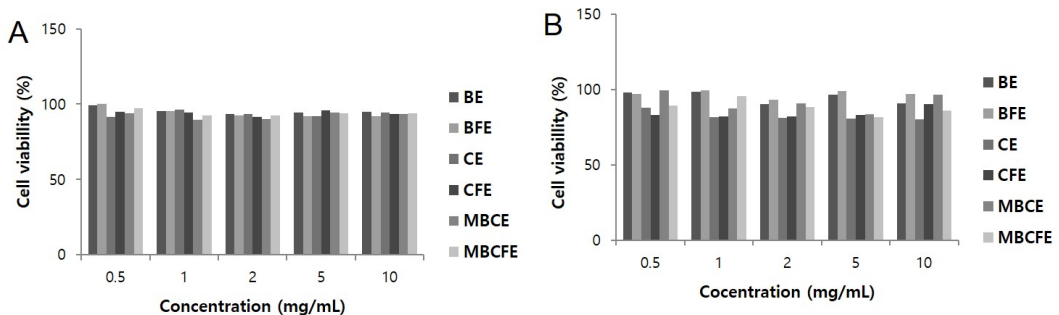


Fig. 3. Cytotoxicity Assays of extracts from barely leaf and corn silk.

Fermented extracts from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk were used to assay viability of (A) BV2 and (B) RAW264.7 cells by the MTT method. BE: non-fermented extract of barley leaf; BFE: fermented extract of barley leaf; CE: non-fermented extract of corn silk; CFE: fermented extract of corn silk; MBCE: non-fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk; MBCFE: fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk.

든 추출물은 10 mg/mL농도 이하의 범위에서 BV2 세포와 RAW264.7 세포에 대해서 세포독성이 나타나지 않았다. 이는 보리 잎과 옥수수 수염을 유산균으로 발효한 후 추출했을 때에도 세포에 무해한 안전한 상태를 유지하고 있음을 의미한다.

5. 항산화 활성

보리 잎과 옥수수 수염은 자연 식품으로 항산화 활성이 우수하다고 보고된 식품이다(Ku et al., 2009). 따라서 이들의 혼합과 발효기법이 항산화 활성의 증대효과를 일으키는지의 여부를 보리 잎과 옥수수 수염 9:1 혼합추출물과 혼합발효추출물을 이용하여 농도별(0.4, 2, 10 mg/ml)로 확인하였다(Fig. 4). 시료의 농도가 0.4 mg/mL에서 보리 잎 발효추출물(10:0) (BFE)이 22.86%로서 가장 높은 항산화 활성을 보였으며 보리 잎 추출물(10:0) (BE), 혼합발효추출물(9:1) (MBCFE), 혼합추출물(9:1) (MBCE), 옥수수 수염 발효추출물(0:10) (CFE), 옥수수 수염 추출물(0:10) (CE)의 순서로 항산화 활성이 나타났다. 2 mg/mL에서는 보리 잎 발효추출물(BFE) (66.99%), 보리 잎 추출물(BE) (64.11%), 혼합발효추출물(MBCFE) (60.19%), 혼합추출물(MBCE) (61.31%), 옥수수 수염 발효추출물(CFE) (13.37%), 옥수수 수염 추출물(CE) (3.09%)의 순서로 항산화 활성 능력을 보였다. 시료의 농도가 높아질수록 항산화 활성은 증진되었고, 모든 시료에서 발효하지 않은 추출물보다 발효한 추출물의 항산화 활성이 높았다. 시료의 농도가 10 mg/mL이었을 때 발효하지 않은 추출물의 항산화 활성은 큰 상승을 보이지 않았으나 유산균 발효한 추출물의 항산화 활성은 보리 잎 발효추출물(BFE) (72.38%), 옥수수 수염 발효추출물(CFE) (56.74%), 혼합발효추출물(MBCFE) (77.55%)로 상승 효과를 보였다. 양성대조군으로 사용된 항산화제인 45 uM ascorbic acid의 항산화 활성 (76.50%)과 비교하였을 때에도 혼합발효추출물(MBCFE) (77.55%)은 더 높은 항산화 활성을 나타내었다.

발효기술은 원재료에 없는 생리활성 물질을 생성하거나 증진시킬 수 있어 자주 이용되어 왔다(Park et al., 2015). 최근에는 차잎의 발효를 이용한 GABA 증진과 GABA 함유 토마토 발효물 등의 연구가 보고되어 있으며 천연소재 발효물의 항산화 효과, 레몬 밤 추출물의 항산화 효과 등 발효를 이용하여 항산화 활성을 증진시킨 결과도 많이 보고되고 있다(Yoo et al., 2002; Cho et al., 2007; Yang et al., 2009; Cho et al., 2012). Fig. 4의 결과에서 보듯이 보리 잎과 옥수수 수염 혼합발효추출물의 항산화 활성이 증진되는 것으로 보아 발효기법이 항산화 능력에도 상당한 영향을 주는 것으로 판단된다. 특히 Fig. 2A와 Fig. 4의 결과에서 제시된 바와 같이 보리 잎과 옥수수 수염의 9:1 혼합과 발효기법을 통해 얻은 혼합발효추출물(MBCFE)의 항산화 활성은 10 mg/mL 농도에서 비발효 9:1 혼합추출물(MBCE)의 항산화 활성보다 유의적으로 증진되었으며 더불어 GABA 함량도 또한 비발효 9:1 혼합추출물(MBCE)보다 약 5배 정도 증진되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 혼합과 발효기법이 보

리 잎과 옥수수 수염에서의 GABA 함량과 항산화 활성 모두를 증진시킬 수 있는 효과적인 방법임을 의미한다고 사료된다.

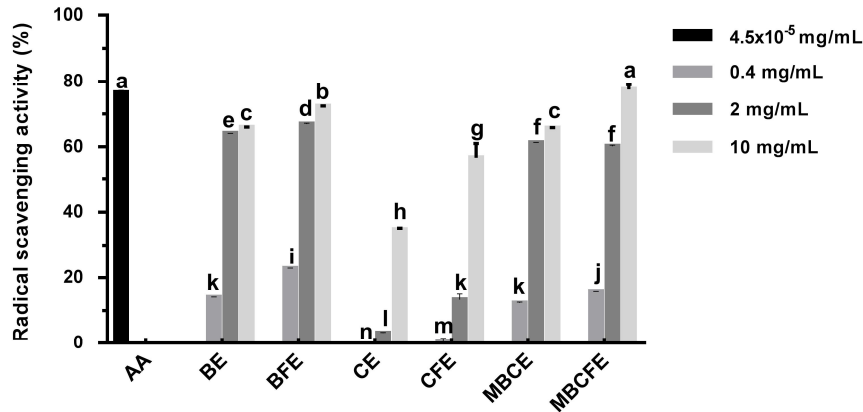


Fig. 4. DPPH scavenging activity of extracts from barely leaf and corn silk.

Three different concentrations (0.4, 2, and 10 mg/mL) of extracts were tested. AA: 45 μ M ascorbic acid; BE: non-fermented extract of barley leaf; BFE: fermented extract of barley leaf; CE: non-fermented extract of corn silk; CFE: fermented extract of corn silk; MBCE: non-fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk; MBCFE: fermented extract from the 9:1 mixture of barley leaf and corn silk. Values are means of three replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

GABA 증진 기술에 관한 연구는 발효기술과 대사제어 기술을 이용한 방법이 최근에 주로 활발히 진행되고 있다(Dung Pham et al., 2016). GABA 생산 증진을 위한 발효기술에 이용되는 미생물로서는 유산균이 주목받고 있으며 발효된 쌀, 콩, 김치 등에서 분리된 유산균이 GABA를 생성하며 특히 김치에서 분리된 유산균인 *L. plantarum*이 높은 GABA 생성능을 나타낸다고 보고된 바 있다(Di Cagno et al., 2010). 본 연구에서도 보리 잎과 옥수수 수염의 혼합발효를 위해 김치에서 분리한 *L. plantarum*을 사용하였으며 또한 유산균 발효를 통해 천연물 소재에서의 기능성이 증진될 수 있음을 확인하였다(Park et al., 2015). 본 연구에서 사용한 *L. plantarum* K-1BR 균주도 MSG를 기질로 하여 수행한 실험에서 우수한 GABA 생성능을 지녔음을 확인하였다. 또한 9:1 혼합 비율에서의 유산균 증식이 가장 활발하게 진행되었고 따라서 유산균에 의해 보리 잎과 옥수수 수염에 함유된 GABA의 유리화 이용성이 증진되고 동시에 이 혼합물에 함유된 GABA의 전구체로 알려진 glutamic acid를 효과적으로 GABA로 전환시킴으로써 9:1 혼합발효추출물에서의 GABA 함량이 증가되는 것으로 사료된다. 유산균은 또한 유용물질 증진 외에도 높은 항균 효과를 나타내므로 발효식품 소재로서 널리 활용되고 있으며 식품의 유통과 보관에도 유용하게 응용할 수 있을 것으로 기대된다(De Vuyst and Leroy, 2007).

결론적으로 보리 잎과 옥수수 수염의 9:1 혼합과 유산균 발효를 통해 생리활성 물질인 GABA의 함량이 증가함을 확인하였으며 9:1 혼합발효추출물의 항산화 활성도 유의적으로 증진되었고 세포독성은 나타나지 않음을 확인하였다. 따라서 보리 잎과 옥수수 수염 혼합 발효추출물을 이용한 건강기능성식품의 개발 가능성은 충분히 있다고 사료된다.

IV. 적 요

GABA는 glutamic acid decarboxylase에 의해서 L-glutamic acid가 탈탄산화되어 생합성된 비단백질 아미노산이다. GABA는 식물에서 스트레스에 대한 대응반응으로 생성된다. 사람의 중추신경계에서는 주요 억제성 신경전달물질 중 하나로 항고혈압, 항당뇨 효능이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서 우리는 보리 잎과 옥수수 수염을 유산균과 함께 발효함으로써 GABA 생성을 증진시키고자 하였다. 보리 잎과 옥수수 수염을 다양한 무게 비율로 조합하여 혼합하였고, 30℃에서 48시간 동안 배양기 안에서 *L. plantarium*과 함께 발효시켰다. 발효된 혼합물을 열수 추출한 후, thin layer chromatography와 GABase assay를 이용하여 GABA의 생산을 분석하였다. 우리는 9:1 혼합발효추출물이 다른 비율의 추출물 보다 GABA 함량이 높은 것을 확인하였는데 이것은 혼합과 발효기술이 보리 잎과 옥수수 수염 내 GABA 양 증진에 효과가 있음을 의미한다. 또한 몇 가지 생리활성을 분석한 결과 혼합 발효추출물의 항산화 효능이 비발효 추출물에 비하여 증진되었고 세포독성은 나타나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 보리 잎과 옥수수 수염의 조합과 이것을 유산균과 함께 발효시키는 방법이 고함량의 GABA와 증진된 생리 활성을 지닌 기능성 식품으로서의 개발 가능성이 있음을 의미한다.

[Submitted, December. 8, 2016 ; Revised, February. 5, 2017 ; Accepted, February. 8, 2017]

References

1. An, E. S. 2003. Chemical properties of corn silk and its bacteriocidal effects on food poisoning bacteria. Chonnam National University Master's thesis.
2. An, M. K., J. B. Ahn, S. H. Lee, and K. G. Lee. 2010. Analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) content in germinated pigmented rice. Korean J. Food Sci. 42: 632-636.
3. Bae, M. O., H. J. Kim, Y. S. Cha, M. K. Lee, and S. H. Oh. 2009. Effects of kimchi lactic

- acid bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with high GABA producing capacity on liver function improvement. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1499-1505.
4. Bondet, V., W. Brand-williamas, and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 30: 609-615.
 5. Chang, J. S., B. S. Lee, Y. G. Kim. 1992. Changes in γ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treated conditions and of anaerobically treated green tea leaves. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 315-319.
 6. Cho, E. J., C. H. Hwang, and M. O. Yang. 2007. Changes in free amino acids and sensory evaluation of fermented tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) according to the degree of fermentation. J. East Asian Soc. Dietary Life 17: 911-918.
 7. Cho, S. C., D. H. Kim, C. S. Park, J. H. Koh, Y. R. Pyun, and M. C. Kook. 2012. Production of GABA-rich tomato paste by *Lactobacillus* sp. Fermentation. Korean J. Food Nutr. 25: 26-31.
 8. De Vuyst, L., and F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13: 194-199.
 9. Di Cagno, R., F. Mazzacane, C. G. Rizzello, M. De Angelis, G. Giuliani, M. Meloni, B. De Servi, and M. Gobbetti. 2010. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 731-741.
 10. Dung Pham, V., S. Somasundaram, S. H. Lee, S. J. Park, and S. H. Hong. 2016. Efficient production of γ -aminobutyric acid using *Escherichia coli* by co-localization of glutamate synthase, glutamate decarboxylase, and GABA transporter. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 43: 79-86.
 11. Hudec, J., L. Kobida, M. Čanigová, M. Lacko-Bartošová, O. Ložek, P. Chlebo, J. Mrázová, L. Ducsay, and J. Bystrická. 2015. Production of γ -aminobutyric acid by microorganisms from different food sources. J. Sci. Food Agric. 95: 1190-1198.
 12. Jeon, G. U., M. Y. Lee, J. Yoon, S. Jang, M. Jung, H. S. Jeong, and J. Lee. 2010. Effects of heat treatment and selected medicinal plant extracts on GABA content after germination. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 154-158.
 13. Kim, D. C., D. W. Kim, S. D. Lee, and M. J. In. 2006. Preparation of barley leaf powder tea and its quality characteristics. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 734-737.
 14. Kim, E. A., S. Y. Mann, S. I. Kim, G. Y. Lee, D. Y. Hwang, H. J. Son, C. Y. Lee, and D. S. Kim. 2013. Isolation and identification of soycurd forming lactic acid bacteria which produce GABA from kimchi. Korean J. Food Preserv. 20: 705-711.

15. Kim, K. T., H. M. Seog, S. S. Kim, H. D. Hong, Y. T. Lee, and J. G. Kim. 1995. Chemical composition of barley leaves from different varieties. *Agr. Chem. Biotechnol.* 38: 431-434.
16. Kim, S. L., M. J. Kim, Y. Y. Lee, G. H. Jung, B. Y. Son, J. S. Lee, Y. U. Kwon, and Y. I. Park. 2014. Isolation and identification of flavonoids from corn silk. *Korean J. Crop Sci.* 59: 435-444.
17. Kim, S. L., C. H. Park, E. H. Kim, H. S. Hur, and Y. K. Son. 2000. Physicochemical characteristics of corn silk. *Korean J. Crop Sci.* 45: 392-399.
18. Ku, K. M., S. K. Kim, and Y. H. Kang. 2009. Antioxidant activity and functional components of corn silk (*Zea mays* L.). *Korean J. Plant Res.* 22: 323-329.
19. Lee, G. Y., S. I. Kim, M. G. Jung, J. H. Seong, Y. G. Lee, H. S. Kim, H. S. Chung, B. W. Lee, and D. S. Kim. 2014. Characteristics of chungkookjang that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. *J. Life Sci.* 24: 1102-1109.
20. Lee, M. G., G. P. Choe, I. H. Lyu, G. Y. Lee, C. Y. Yu, and H. Y. Lee. 2004. Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12: 36-42.
21. Lee, S. H. 2015. Development of mulberry-leaf tea containing γ -aminobutyric acid (GABA) by anaerobic treatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 652-657.
22. Min, O. J., B. R. Sharma, C. M. Park, and D. Y. Rhyu. 2011. Effect of Myadis stigma water extract on adipogenesis and blood glucose in 3T3-L1 adipocytes and *db/db* mice. *Korean J. Pharmacogn.* 42: 201-208.
23. Ohn, J. and J. H. Kim. 2012. Intake pattern and needs assessment for the development of web-contents on health functional foods according to age of adults. *Korean J. Community Nutr.* 17: 26-37.
24. Park, H. S., W. K. Kim, H. P. Kim, and Y. G. Yoon. 2015. The efficacy of lowering blood glucose levels using the extracts of fermented bitter melon in the diabetic mice. *J. Appl. Biol. Chem.* 58: 259-265.
25. Qui, T., H. Li, and Y. Cao. 2010. Pre-staining thin layer chromatography method for amino acid detection. *African J. Biotechnol.* 9: 8679-7681.
26. Tsukatani, T., T. Higuchi, and K. Matsumoto. 2005. Enzyme-based microtiter plate assay for γ -aminobutyric acid: Application to the screening of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria. *Anal. Chim. Acta* 540: 293-297.
27. Yang, H. J., E. H. Kim, J. O. Park, J. E. Kim, and S. N. Park. 2009. Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists*

Korea 35: 47-55.

28. Yoo, H. J., S. H. Lee, D. S. Lee, and H. B. Kim. 2002. Antioxidant activity of fermented barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Korean J. Microbiol.* 38: 230-233.
29. Zhang, G. and A. W. Bown. 1997. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochem.* 44: 1007-1009.