

효소 처리 밀 배아 추출물의 화학적 특성 변화

이재강¹ · 장다빈² · 강동우¹ · 이정훈¹ · 금혜임¹ · 최용현¹ · 강 희³ · 최용석¹ · 김대옥^{2,*}
¹사조동아원(주) 제분연구소, ²경희대학교 식품생명공학과, ³경희대학교 후마니타스대학

Changes in chemical characteristics of cellulase-treated wheat germ extract

Jae-Kang Lee¹, Davin Jang², Dongwoo Kang¹, Jeonghoon Lee¹, Hyeim Kum¹,
Yonghoun Choi¹, Hee Kang³, Yong-Seok Choi¹, and Dae-Ok Kim^{2,*}

¹R&D Center, Sajo DongA One Co., Ltd.

²Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

³Humanitas College, Kyung Hee University

Abstract Wheat germ, which is rich in nutrients and phytochemicals, is a by-product during the milling process of wheat kernel. In this study, we aimed to increase the amount of bioactive 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ) in wheat germ using the cell-wall-degrading enzyme cellulase (Celluclast 1.5L). The amounts of organic acids, free sugars, and 2,6-DMBQ in wheat germ treated with Celluclast 1.5L were evaluated at various reaction times and temperatures. The results of reversed-phase high-performance liquid chromatography of Celluclast 1.5L-treated wheat germ revealed 2,6-DMBQ, four organic acids (tartaric, acetic, lactic, and succinic acids), and three free sugars (sucrose, fructose, and glucose). As reaction time and temperature of the mixture of wheat germ and Celluclast 1.5L increased, the contents of four organic acids, glucose, fructose, and 2,6-DMBQ increased, but that of sucrose decreased. Taken together, these results suggest that Celluclast 1.5L-treated wheat germ containing increased amounts of 2,6-DMBQ serves as a source of functional ingredients in food industry.

Keywords: by-product, 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, high-performance liquid chromatography, organic acids, wheat germ

서 론

밀 배아(wheat germ)는 영양적 가치가 높은 밀 알곡의 구성 요소이지만 밀의 제분 과정 중 발생하는 부산물이다. 밀알의 2-3%를 차지하고 있는 밀 배아는 불포화지방산 함량이 높으며, 주요 영양성분으로 알파-토코페롤(α -tocopherol), 비타민 B 복합체, 단백질, 식이섬유, 무기질이 풍부하게 함유되어 있어 식품 소재로서 가치가 높다(Mahmoud 등, 2015; Megahed, 2011; Rizzello 등, 2010; Zhu 등, 2006). 밀 배아의 기능성과 관련하여 밀배아유(wheat germ oil)의 항염증 효과(Kang 등, 2016a), *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 밀 배아의 세포 내 지방산 축적 억제 및 산화 스트레스(oxidative stress) 소거능(Park 등, 2015)이 알려져있다. 밀 배아의 불포화 지방산은 과산화물(peroxide) 형성을 촉매하는 리폭시게나아제(lipoxygenase)로 인하여 산화가 빠르게 진행된다. 따라서 밀 배아의 지방산 함량, 토코페롤 함량, 산화방지능에 관한 연구들이 보고되어 왔다(Mahmoud 등, 2015; Megahed, 2011).

2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ)는 β -1,6 글리코시드 결합(glycosidic bond)으로 올리고당에 연결된 메톡시하이드로퀴논(methoxyhydroquinone)의 산화된 형태이다(Jeong 등, 2017).

2,6-DMBQ는 밀 배아에 0.1 mg/g, 발효 밀 배아 추출물에 0.2 mg/g, 발아 밀 제품(germinated wheat product)에 0.001 mg/g 정도 함유되어 있으며(Tömösközi-Farkas와 Daood, 2004), 2,6-DMBQ를 함유하는 발효 밀 배아 추출물(fermented wheat germ extract)은 암 세포에 대해서 항종양 효능을 나타내었다(Mueller 등, 2011). 2,6-DMBQ는 밀 배아에 배당체 형태로 존재하고, 미생물에 존재하는 베타-글루코시다이스(β -glucosidase)의 가수분해에 의하여 유리된다고 알려졌다(Rizzello 등, 2013; Yoo와 Kim, 2010). 젖산균과 효모의 혼합 배양을 통해 밀 배아의 2,6-DMBQ 생산 효율을 증가시킬 수 있다는 연구가 보고되었다(Yoo와 Kim, 2010).

상업적 효소인 Celluclast 1.5L은 *Trichoderma* sp.에서 유래된 셀룰레이즈(cellulase; EC 3.2.1.4)로서 글리코시드 결합을 가수분해하여 셀룰로오스(cellulose)로부터 포도당과 셀로비오스(cellobiose)를 생성한다(Tsai와 Meyer, 2014). 효소적 가수분해를 위해 Celluclast 1.5L을 왕갈대(*Arundo donax*) 잎에 처리 시 효소 반응 시간에 따라 환원당이 증가하였고(Pirozzi 등, 2017), 열수 처리된 보리짚(hydrothermally pre-treated barley straw)에 처리 시 포도당이 증가하였다(Tsai와 Meyer, 2014). Celluclast 1.5L을 처리한 밀 배아에서 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량이 증가했다고 보고되었다(Choi 등, 2018). 밀 배아에 다양한 효소 처리 및 발효 기술을 적용함으로써 젖산과 같은 유기산, 2,6-DMBQ, 총페놀 함량을 증가시켜 보다 향상된 기능성을 확보할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

밀 배아의 대부분은 밀기울과 함께 혼합되어 저렴한 사료용으로 이용되고 있기 때문에, 밀 배아로부터 고부가가치 기능성 소재의 개발과 활용을 위한 연구가 필요하다. 본 연구는 밀 배아에

*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea
Tel: +82-31-201-3796
Fax: +82-31-204-8116
E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr
Received December 31, 2018; revised February 8, 2019;
accepted February 9, 2019

셀룰로오스 가수분해 효소인 Celluclast 1.5L을 가하여 다양한 반응 온도 및 시간을 변수로 하여 유리당, 유기산, 2,6-DMBQ 함량 변화를 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC)로 분석하였다. 밀의 제분 공정에서 발생하는 부산물인 밀 배아로부터 생리활성물질인 2,6-DMBQ의 비배당체화를 증진시키고, 이를 통해 효소 처리 밀 배아 추출물이 기능성 소재로서 활용 가능성을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

밀 배아 추출물 제조에 사용된 시료는 전라남도에서 2017년 수확된 조경밀을 제분하는 과정에서 부산물로 생산되는 밀 배아(Sajo DongA One Co., Ltd., Dangjin, Korea)를 생산 즉시 수거하여 4°C에 보관하여 사용하였다.

시약

추출에 사용한 셀룰레이즈(Celluclast 1.5L, ≥ 700 endoglucanase units/g of solution)는 Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark)에서 구입하였다. 주석산(tartaric acid), 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid), 호박산(succinic acid), 과당(fructose), 포도당(glucose), 설탕(sucrose)은 Sigma-Aldrich Co., LLC (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 2,6-DMBQ는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 클로로폼(chloroform)은 Merck Millipore Co. (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

효소 처리 밀 배아 추출액 제조

밀 배아 50 g을 500 mL 원심분리 튜브에 넣어 증류수 200 mL를 첨가하였다. 밀 배아 중량 대비 0.5% (v/w)의 농도로 Celluclast 1.5L을 투입한 다음, 유기산 분석을 위해 30, 45, 60°C로, 유리당 분석을 위해 30°C로 설정한 항온수조(MaXturdy18; Daihan Scientific Co., Wonju, Korea)에서 6, 12, 18, 24, 30시간 동안 반응을 진행하였고, 0시간을 대조군(control)으로 설정하였다. 밀 배아에 대한 각각의 효소 반응이 종료된 후에 곧바로 원심분리기(Union 5KR; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)를 이용하여 1,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리된 상층액은 여과지(Whatman no. 2; GE Healthcare, Little Chalfont, UK)로 상층액에 잔류하는 고형물을 제거하여 추출액을 제조했다. 추출액은 균질기(HG-15D; Daihan Scientific Co.)를 이용하여 3분간 균질화한 후 사용했다.

효소 처리 밀 배아 추출액의 유기산 함량 분석

효소 처리 밀 배아 추출액의 유기산 함량 분석은 Do 등(2005)의 방법을 수정해서 사용하였다. 메탄올 5 mL와 증류수 10 mL를 통과시켜 활성화시킨 Sep-Pak[®] C₁₈ 카트리지(Sep-Pak C₁₈ 1 cc Vac Cartridge; Waters, Milford, MA, USA)에 추출액 1 mL을 주입한 다음 증류수 1 mL을 3회 통과시켜 여과액이 최종 부피가 4 mL가 되도록 했다. 여과액을 다시 0.22 μ m polytetrafluoroethylene (PTFE) 필터(Merck Millipore Co., Carrigtwohill, Ireland)로 여과하여 유기산 함량 측정을 위해서 HPLC (SpectraSYSTEM; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였고, 분석을 위한 조건은 Table 1과 같다. 유기산 함량은 해당 유기산의 표준곡선(standard curve)을 이용하여 계산하였다.

효소 처리 밀 배아 추출액의 유리당 함량 분석

효소 처리 밀 배아 추출액의 유리당 함량 분석은 Park 등(2017)의 방법을 일부 수정하여 사용했다. 제조된 효소 처리 밀 배아 추출 용액 50 mL을 원심분리 튜브에 넣고 30분간 초음파 추출 후 원심분리기(Union 5KR; Hanil Science Industrial Co., Ltd.)를 이용하여 1,000×g에서 15분간 원심분리했다. 얻어진 상층액은 0.20 μ m PTFE 필터(Millex Simplicity filter; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)로 여과 후, 효소 처리 밀 배아 추출액의 유리당 함량은 HPLC (SpectraSYSTEM; Thermo Scientific)를 이용하여 측정하였고, 분석 조건은 Table 1과 같다. 유리당 함량은 해당 유리당의 표준곡선을 이용하여 계산했다.

유기산 첨가 효소 처리 밀 배아 추출액 제조

효소 처리 밀 배아 추출물 제조 시 유기산 첨가가 2,6-DMBQ의 비배당체화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 밀 배아 추출물에서 생성된 각각의 유기산으로 추출 용액의 pH를 4.5로 설정하였다. pH 4.5는 Celluclast 1.5L의 최적 pH로 알려져 있다(Lee 등, 2006). 2,6-DMBQ 함량 분석용 효소 처리 추출물은 다음과 같이 제조하였다. 효소 처리 밀 배아 추출물에 존재하는 것으로 확인된 유기산인 주석산, 젖산, 초산, 호박산을 사용하여 pH 4.5가 되도록 각각의 유기산 용액을 제조하였다. 유기산 용액(pH 4.5) 200 mL에 밀 배아 50 g을 넣은 후, Celluclast 1.5L을 밀 배아 중량 대비 0.5% (v/w)를 첨가하였다. 추출 온도는 30°C로 고정하였고, 6, 12, 18, 24, 30시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 즉시 원심분리기(Union 5KR; Hanil Science Industrial Co., Ltd.)를 이용하여 15분 동안 1,000×g로 원심분리한 후에 상층액을 여과지(Whatman no. 2; GE Healthcare)로 여과하여 2,6-DMBQ 함

Table 1. Analytical conditions of high-performance liquid chromatography for free sugars, organic acids, and 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ)

| Parameters | Conditions | | |
|-----------------------------|---|---|--|
| | Free sugars | Organic acids | 2,6-DMBQ |
| Detector (wavelength) | RI-150 | UV1000 (210 nm) | UV1000 (290 nm) |
| Pump | P2000 | P2000 | P2000 |
| Column | Hypersil APS-2 Amine column (250× ϕ 4.6 mm, ID 5 μ m) | SUPELCOSIL LC-18 column (150× ϕ 4.6 mm, ID 5 μ m) | Discovery RP-Amide column (250× ϕ 4.6 mm, ID 5 μ m) |
| Mobile phase | Acetonitrile:Water (70:30) | 0.25 mM phosphate buffer | 25 mM KH ₂ PO ₄ :Acetonitrile (90:10; pH 4.8) |
| Injection volume (μ L) | 20 | 20 | 20 |
| Flow rate (mL/min) | 1.0 | 0.3 | 0.7 |
| Run time (min) | 25 | 25 | 25 |
| Column temperature (°C) | 50 | 30 | 70 |

량 분석에 사용하였다.

유기산 처리 효소 처리 밀 배아 추출액의 2,6-DMBQ 함량 분석

4종류 유기산(주석산, 젖산, 초산, 호박산)을 이용하여 pH가 4.5로 보정된 효소 처리 밀 배아 추출액의 2,6-DMBQ 정량 분석은 Yoo와 Kim(2010)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 추출액 10 mL를 클로로폼 100 mL로 3회 액액추출(liquid-liquid extraction)로 분획하였다. 분획된 클로로폼층을 감압 농축기(N-1000; Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 농축한 다음 20 mL의 25 mM KH₂PO₄:acetonitrile (9:1 (v/v); pH 4.8)의 이동상으로 용해시켰다. 용해된 시료는 0.22 µm PTFE 필터(Merck Millipore Co.)로 여과한 후, 효소 처리 밀 배아 추출액의 2,6-DMBQ의 함량 분석은 HPLC (SpectraSYSTEM; Thermo Scientific)를 이용하였다 (Table 1). 2,6-DMBQ 함량은 농도와 면적의 1차적 상관 관계를 통해 얻어진 2,6-DMBQ 표준곡선을 이용하여 계산했다.

통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복한 결과를 평균±표준편차로 나타내었다. 미니탭(Minitab17; Minitab Inc., University Park, PA, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였다. 각 평균값의 유의적 차이는 p<0.05 유의수준에서 Tukey 동시 검정(Tukey's range test)으로 검증하였다.

결과 및 고찰

효소 처리 밀 배아 추출액의 유기산 함량 변화

효소 반응 온도와 시간을 달리했을 때 각 유기산 조성 및 총 유기산의 변화는 Table 2와 같다. 효소 처리 밀 배아 추출액에서 측정된 4종류의 유기산은 주석산, 젖산, 초산, 호박산이었다. 각 반응 온도에서 밀 배아에 대한 효소 반응 시간이 증가함에 따라 주석산, 젖산, 초산, 호박산과 이들의 총유기산 함량은 점점 증가하는 경향을 보였다(Table 2).

밀 배아 효소 반응 30°C, 30시간에서 젖산이 가장 많이 생성(대조군 대비 약 564% 증가)된 반면, 효소 반응 45°C, 30시간에서 초산이 가장 많이 생성(대조군 대비 약 628% 증가)되었다 (Table 2). 밀 배아를 30시간 동안 효소 반응했을 때 총유기산 함량은 대조군인 0시간 효소 반응에 비해 30°C 조건에서 약 210%, 45°C 조건에서 약 276%, 60°C 조건에서 약 41% 증가하였다(Table 2). 효소 처리 밀 배아에서 셀룰레이즈 등과 같은 각종 효소 작용으로 인하여 밀 배아 내에 존재하는 성분들의 분해와 더불어 여러 유기산이 생성되었을 것으로 생각된다. 60°C도 조건에서 추출은 30°C와 45°C의 추출 조건에 비해 유의적(p<0.05)으로 낮은 총유기산 함량을 보였다(Table 2). 60°C와 같은 조건에서 상대적으로 낮은 온도 조건보다 유기산 증가율이 낮은 것은 미생물 발효 및 효소 활성의 적정 온도 범위를 벗어났기 때문으로 생각된다.

밀 배아에는 젖산균(lactic acid bacteria)이 존재하는 것으로 알려져 있다(Rizzello 등, 2010; Rizzello 등, 2013). 본 연구에서 측정된 젖산과 같은 유기산의 생성은 Celluclast 1.5L과 밀 배아의 효소 반응 과정 중에 밀 배아에 존재하는 젖산균이 생육 때문인 것으로 추측된다. Celluclast 1.5L을 처리한 왕갈대(giant reed; *Arundo donax*)를 혐기발효시 초산, 젖산 등의 유기산 생성이 보고되었다(Toscano 등, 2014). 배추 폐기물의 효소적 가수분해(45°C)를 위해 Celluclast 1.5L을 처리 후 젖산균 발효(30°C)에 의해 젖산, 초산 같은 유기산의 생성이 증가하였다는 연구가 보고되었다(Kim 등, 2018). 저온 발효(20-30°C)한 막걸리에서 발효가 진행됨에 따라 젖산균과 효모의 작용으로 유기산 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다(Kang 등, 2016b). 본 연구의 결과에서 젖산과 초산의 함량이 대조군에 비해 유의적으로 (p<0.05) 증가한 것은 처리한 효소의 작용 이외에 밀 배아에 존재하는 초산균 또는 젖산균의 발효가 또 다른 하나의 이유일 것으로 생각되어지며, 향후 효소 처리 밀 배아 추출물의 미생물 동정과 관련된 추가적인 연구가 필요하다고 여겨진다.

Table 2. Contents of organic acids of Celluclast 1.5L-treated wheat germ extract at different reaction temperatures and times

| Temperature (°C) | Time (h) | Concentration (mg/mL) | | | | |
|------------------|----------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Tartaric acid | Lactic acid | Acetic acid | Succinic acid | Total |
| Control | 0 | 1.50±0.01 ^{fg1)} | 0.67±0.06 ^{hi} | 0.79±0.01 ^{feh} | 0.27±0.07 ^{ef} | 3.23±0.05 ^h |
| | 6 | 1.44±0.56 ^g | 0.76±0.01 ^{gh} | 1.16±0.04 ^{fg} | 0.24±0.08 ^{ef} | 3.60±0.56 ^h |
| | 12 | 1.87±0.27 ^{fg} | 0.81±0.03 ^{gh} | 1.76±0.08 ^e | 0.15±0.05 ^f | 4.59±0.28 ^f |
| | 18 | 2.55±0.13 ^{bc} | 1.43±0.08 ^d | 2.98±0.42 ^d | 0.23±0.06 ^{ef} | 7.19±0.53 ^d |
| | 24 | 2.45±0.27 ^{bc} | 3.79±0.33 ^b | 3.78±0.17 ^c | 0.27±0.00 ^{ef} | 10.30±0.20 ^b |
| 30 | 30 | 2.48±0.36 ^{bc} | 4.45±0.03 ^a | 2.70±0.04 ^c | 0.38±0.23 ^{def} | 10.01±0.51 ^b |
| | 6 | 1.93±0.24 ^{def} | 0.93±0.09 ^{fg} | 1.31±0.13 ^{ef} | 0.33±0.15 ^{ef} | 4.50±0.26 ^{fg} |
| | 12 | 2.35±0.25 ^{bcd} | 1.11±0.09 ^{ef} | 1.79±0.15 ^e | 0.98±0.12 ^a | 6.23±0.50 ^e |
| | 18 | 2.55±0.07 ^{bc} | 1.47±0.04 ^d | 3.69±0.08 ^c | 0.87±0.01 ^{ab} | 8.58±0.13 ^c |
| | 24 | 2.65±0.15 ^b | 2.14±0.06 ^c | 5.01±1.01 ^b | 0.73±0.38 ^{abc} | 10.53±1.06 ^b |
| 45 | 30 | 3.37±0.04 ^a | 2.15±0.02 ^c | 5.75±0.23 ^a | 0.86±0.06 ^{abc} | 12.13±0.25 ^a |
| | 6 | 1.49±0.22 ^{fg} | 0.69±0.10 ^{hi} | 0.66±0.08 ^h | 0.44±0.16 ^{de} | 3.28±0.40 ^h |
| | 12 | 1.93±0.05 ^{def} | 0.67±0.21 ^{hi} | 0.57±0.30 ^h | 0.63±0.04 ^{bcd} | 3.80±0.19 ^{gh} |
| | 18 | 2.09±0.03 ^{de} | 0.51±0.16 ⁱ | 0.41±0.07 ^h | 0.62±0.08 ^{bcd} | 3.63±0.28 ^h |
| | 24 | 2.29±0.42 ^{bcdde} | 1.15±0.11 ^e | 0.53±0.25 ^h | 0.75±0.20 ^{abc} | 4.72±0.34 ^f |
| 60 | 30 | 2.10±0.04 ^{cde} | 1.38±0.10 ^d | 0.47±0.03 ^h | 0.60±0.04 ^{cd} | 4.55±0.12 ^{fg} |

¹⁾Data are expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the different superscript letters in the same column indicate the significant difference by Tukey range test (p<0.05).

Table 3. Contents of free sugars of wheat germ extract treated with Celluclast 1.5L at various extraction times at 30°C

| Time (h) | Concentration (mg/mL) | | | |
|----------|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Fructose | Glucose | Sucrose | Total |
| Control | 0.45±0.02 ^{e(1)} | 0.70±0.02 ^f | 5.07±0.02 ^a | 6.22±0.04 ^c |
| 6 | 1.04±0.00 ^d | 1.72±0.09 ^e | 3.50±0.01 ^b | 6.26±0.01 ^{bc} |
| 12 | 1.25±0.01 ^c | 2.24±0.01 ^d | 3.06±0.01 ^c | 6.55±0.01 ^a |
| 18 | 1.39±0.05 ^b | 2.35±0.01 ^c | 2.76±0.01 ^d | 6.50±0.05 ^a |
| 24 | 1.44±0.03 ^a | 2.49±0.02 ^b | 2.18±0.02 ^e | 6.11±0.02 ^d |
| 30 | 1.43±0.00 ^{ab} | 2.83±0.02 ^a | 2.08±0.04 ^f | 6.34±0.05 ^b |

¹⁾Data are expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the different superscript letters in the same column indicate the significant difference by Tukey range test ($p<0.05$).

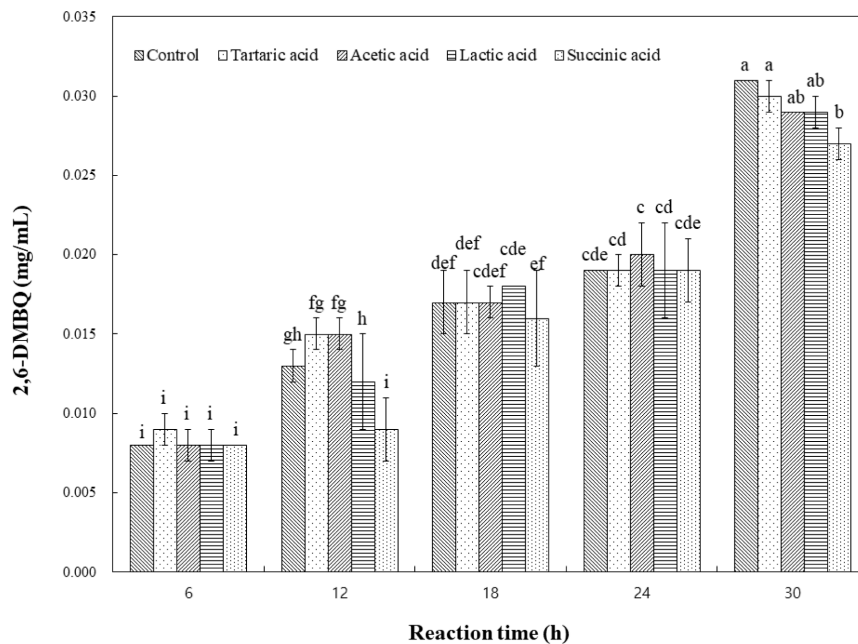


Fig. 1. Effects of extraction times on 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ) production in Celluclast 1.5L-treated wheat germ extracts. Fifty grams of wheat germ in 200 mL of each organic acid solution at pH 4.5 were reacted with 0.5% (v/w) Celluclast 1.5L at 30°C. Data are displayed with mean±standard deviation of three replications. Means with the different letters on the bars indicate the significant difference by Tukey range test ($p<0.05$).

효소 처리 밀 배아 추출액의 총 유리당 함량 변화

밀 배아에 Celluclast 1.5L을 처리하여 유기산 생성에 미치는 효과를 확인하기 위하여 효소 처리 후 밀 배아 추출액의 유기당을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 밀 배아에는 설탕, 포도당, 과당 등이 존재하며, 이 중 설탕이 가장 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(Rizzello 등, 2010). 본 연구에서도 밀 배아 효소 추출액에는 설탕, 포도당, 과당이 존재하는 것을 확인하였다(Table 3). 밀 배아 추출액의 설탕 농도는 효소 반응 시간이 증가할수록 지속적으로 감소한 반면에, 과당과 포도당의 농도는 효소 반응 시간이 길어질수록 증가하였다. 효소 반응 24시간째에 과당은 최고 농도 1.44 mg/mL로 대조군 대비 약 220% 증가하였으며, 포도당은 30 시간째에 최고 농도 2.83 mg/mL로 대조군 대비 약 304% 증가하였다. 설탕의 농도는 반응 0시간 대조군 대비 효소 반응 30시간째에 약 59% 감소하였다(Table 3).

베타-글루코시데이즈, endo-1,4-β-D-glucanase, exo-1,4-β-D-glucanase (cellobiohydrolase) 활성 등을 갖는 Celluclast 1.5L은 셀룰로오스의 β-1,4 결합을 가수분해하여 셀로비오스와 포도당을 유리

시킨다(Tsai와 Meyer, 2014). 증기로 전처리된 밀짚(steam-pretreated wheat straw)을 Celluclast 1.5L로 가수분해할 때에 셀로비오스와 포도당이 생성이 확인되었다(Rodrigues 등, 2015). 알칼리 전처리 옥수수 식이섬유에 Celluclast 1.5L을 처리함으로써 포도당과 더불어 환원당(reducing sugar) 함량이 증가한다고 알려졌다(Myat와 Ryu, 2016). 본 연구에서도 밀 배아에 Celluclast 1.5L을 처리했을 때에 설탕의 가수분해로 과당과 포도당이 생성되어, 추출액에서 포도당과 과당의 함량이 증가하는 것으로 판단된다. Celluclast 1.5L의 베타-글루코시데이즈 활성으로 인해 셀룰로오스에서 포도당이 해리되어 포도당의 농도 증가에 어느 정도 기여한 것으로 여겨진다.

밀 배아 추출액의 2,6-DMBQ 함량 변화

밀 배아 효소 반응액에서 주석산, 젖산, 초산, 호박산이 검출이 되었다(Table 2). 각 유기산 용액(pH 4.5)에 밀 배아와 Celluclast 1.5L을 혼합하여 30°C 조건에서 6, 12, 18, 24, 30시간 동안 효소 반응하여 얻어진 추출액의 2,6-DMBQ 함량 변화를 측정된 결과

는 Fig. 1과 같다. 밀 배아는 반응시간이 증가할수록 2,6-DMBQ 함량이 증가하는 경향을 보였다. 밀 배아와 효소를 6, 18, 24시간 반응 때에 pH 조절을 위해 유기산을 넣지 않은 대조군과 유기산으로 pH를 조정하여 효소 반응시킨 시험군 간의 2,6-DMBQ 함량은 유의적($p < 0.05$) 차이는 없었다.

밀 배아와 효소를 30시간 동안 반응시켰을 때 대조군에서 2,6-DMBQ 함량이 0.031 mg/mL로 가장 높았고, 호박산으로 pH를 4.5로 조정한 효소 반응에서 가장 낮은 2,6-DMBQ 함량을 보였다(Fig. 1). 주석산, 초산, 젖산으로 pH를 조정한 효소 반응에서 측정된 2,6-DMBQ 함량은 대조군보다 더 낮았지만 유의적 차이를 보이지는 않았다(Fig. 1). 이는 각각 생성된 유기산을 첨가하여 pH를 4.5로 조정한 효소 반응 추출은 2,6-DMBQ 함량 증가에는 별다른 영향을 주지 못했다고 해석할 수 있다.

미생물의 베타-글루코시데이즈 가수분해 작용으로 밀 배아에 배당체 형태로 존재하는 2,6-DMBQ가 유리되는 것으로 알려져 있다(Rizzello 등, 2013; Yoo와 Kim, 2010). 밀 배아를 *Lactobacillus plantarum* LB1와 *Lactobacillus rossiae* LB5와 같은 젖산균의 혼합배양(mixed culture) 발효 과정에서 2,6-DMBQ가 방출되었다고 보고되었다(Rizzello 등, 2013). 베타-글루코시데이즈 활성을 보유하는 *Lactobacillus zeae* 젖산균을 이용하여 밀 배아를 발효시 2,6-DMBQ가 증가하였다는 연구 결과가 있었다(Yoo와 Kim, 2010). 이는 밀 배아에서 배당체로 형태로 존재하던 2,6-DMBQ가 비배당체 형태로 방출되었다는 것을 의미한다. 구연산(citric acid)과 열처리를 병용하여 2,6-DMBQ의 수용화가 증가된 밀 배아 추출물이 2,6-DMBQ가 없는 밀 배아 추출물 보다 지방질다당류(lipopolysaccharide)로 자극된 복강대식세포(peritoneal macrophages)에서 염증성 사이토카인(cytokine)의 생성을 더 저해한다고 보고되었다(Jeong 등, 2017). 이는 본 연구를 통해서 얻어진 2,6-DMBQ 함량을 높은 효소 처리 밀 배아 추출물이 항염증 효능(anti-inflammatory activity)과 같은 생리활성이 증진된 기능성 소재로서 활용 가능성을 보여준다고 여겨진다.

요 약

밀 배아를 셀룰레이즈 활성이 있는 Celluclast 1.5L을 이용하여 다양한 시간 및 온도의 반응에서 생성되는 유기산(주석산, 젖산, 초산, 호박산)과 유리당(포도당, 설탕, 과당) 함량을 분석하였다. 또한 젖산, 초산, 호박산, 주석산으로 pH 4.5로 조정된 유기산 용액에서 Celluclast 1.5L과 밀 배아를 반응시켜 2,6-DMBQ의 함량에 미치는 영향을 평가하였다. 밀 배아에 대한 효소 반응 시간 및 온도가 증가함에 따라 주석산, 젖산, 초산, 호박산과 이들의 총유기산 함량은 증가하였다. 밀 배아 효소 반응 추출액의 설탕 농도는 효소 반응 시간이 증가할수록 지속적으로 감소한 반면에, 과당과 포도당의 농도는 효소 반응 시간이 길어짐에 따라 증가하였다. 유기산을 첨가한 Celluclast 1.5L 효소 추출 용액으로 반응시킨 밀 배아는 반응시간이 증가할수록 2,6-DMBQ 함량이 증가하는 경향을 보였지만, 대조군 대비 향상된 수치를 보이지 않았다. 향후 효소 처리 밀 배아 추출물을 활용한 다양한 생리활성에 대한 효능 평가와 더불어 효소 처리 밀 배아 추출물의 식품 소재화에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림기술기획평가원의 고부가가치 식품기술 개발사업(과제번호: 116005-3)의 지원에 의

한 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

Choi Y, Lee J, Lee J, Kum H, Choi Y, Shin M. Effects of enzyme treatment on antioxidant activity of wheat germ. *Korean J. Food Cook. Sci.* 34: 512-518 (2018)

Do Y-S, Whang H-J, Ku J-E, Yoon K-R. Organic acids content of the selected Korean apple cultivars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 992-927 (2005)

Jeong H-Y, Choi Y-S, Lee J-K, Lee B-J, Kim W-K, Kang H. Anti-inflammatory activity of citric acid-treated wheat germ extract in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Nutrients* 9: 730 (2017)

Kang B-K, Kim M-J, Jeong D-H, Kim K-B-W-R, Bae N-Y, Park J-H, Park S-H, Ahn D-H. Anti-inflammatory effect of wheat germ oil on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and mouse ear edema. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44: 236-245 (2016a)

Kang SM, Kim SJ, Ko KH, Nam S. Formation of biogenic amines and bioactivities of *Makgeolli* under different fermentation conditions. *Korean J. Food Preserv.* 23: 402-412 (2016b)

Kim HM, Park JH, Choi IS, Wi SG, Ha S, Chun HH, Hwang IM, Chang JY, Choi H-J, Kim J-C, Park HW. Effective approach to organic acid production from agricultural kimchi cabbage waste and its potential application. *PLOS One* 13: e0207801 (2018)

Lee S-H, Kim K-N, Cha S-H, Ahn G-N, Jeon Y-J. Comparison of antioxidant activities of enzymatic and methanolic extracts from *Ecklonia cava* stem and leave. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 1139-1145 (2006)

Mahmoud AA, Mohdaly AAA, Elneairy NAA. Wheat germ: an overview on nutritional value, antioxidant potential and antibacterial characteristics. *Food Nutr. Sci.* 6: 265-277 (2015)

Megahed MG. Study on stability of wheat germ oil and lipase activity of wheat germ during periodical storage. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2: 163-168 (2011)

Mueller T, Jordan K, Voigt W. Promising cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Avenar®) in human cancer cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30: 42 (2011)

Myat L, Ryu G-H. Optimization of enzyme dosages for hydrolysis of destarched corn fiber subjected to acid and alkaline pretreatments for improved fermentable sugar yield. *Cell. Chem. Technol.* 50: 791-802 (2016)

Park B-R, Kim N-J, Choi S-J, Han G-J, Kim H-Y. Physicochemical and sensory properties of *Yakhobak* (*Cucurbita maxima* subsp. *maxima*) paste under different high pressure heating conditions. *Korean J. Food Preserv.* 24: 44-51 (2017)

Park E, Kim HO, Kim G-N, Song J-H. Anti-oxidant and anti-adipogenic effects of ethanol extracts from wheat germ and wheat germ fermented with *Aspergillus oryzae*. *Prev. Nutr. Food Sci.* 20: 29-37 (2015)

Pirozzi D, Fagnano M, Fiorentino N, Toscano G, Rugari F, Sannino F, Zuccaro G, Florio C. Biotechnological synthesis of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* by exploitation of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Trans.* 57: 1741-1746 (2017)

Rizzello CG, Mueller T, Coda R, Reipsch F, Nionelli L, Curiel JA, Gobbetti M. Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2,6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ. *Micro. Cell Fact.* 12: 105 (2013)

Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chem.* 119: 1079-1089 (2010)

Rodrigues AC, Haven MØ, Lindedam J, Felby C, Gama M. Celluclast and Cellic® CTec2: saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme Microb. Technol.* 79-80: 70-77 (2015)

Tömösközi-Farkas R, Daoud HG. Modification of chromatographic method for the determination of benzoquinones in cereal products. *Chromatographia* 60: S227-S230 (2004)

Toscano G, Zuccaro G, Ausiello A, Micoli L, Turco M, Pirozzi D.

- Production of hydrogen from giant reed by dark fermentation. Chem. Eng. Trans. 37: 331-336 (2014)
- Tsai C-T, Meyer AS. Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate. Molecules 19: 19390-19406 (2014)
- Yoo J-G, Kim M-D. Production of 2-methoxy-1,4-benzoquinone (2-MBQ) and 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,6-DMBQ) from wheat germ using lactic acid bacteria and yeast. Food Eng. Prog. 14: 292-298 (2010)
- Zhu K-X, Zhou H-M, Qian H-F. Proteins extracted from defatted wheat germ: nutritional and structural properties. Cereal Chem. 83: 69-75 (2006)