

## 뽕잎의 유산발효에 의한 Piperidine Alkaloid 함량 증진

류일환 · 권태오<sup>†</sup>

원광대학교 생명자원과학대학

### Enhancement of Piperidine Alkaloid Contents by Lactic Acid Fermentation of Mulberry Leaves (*Morus alba* L.)

Il Hwan Ryu and Tae Oh Kwon<sup>†</sup>

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

**ABSTRACT :** This study was carried out to investigate solid-state fermentation method using cellulolytic lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* TO-2100 in order to increase piperidine alkaloid contents in mulberry leaves. Piperidine alkaloid, one type of which include 1-deoxynojirimycin (1-DNJ), is known to inhibit  $\alpha$ -glycosidase activities. Using this strain, the optimal solid-state fermentation conditions on mulberry leaves powder were found as the following: initial moisture content, temperature and relative humidity were 20%, 30 ~ 35°C and 60 ~ 70%, respectively, and the fermentation time was 72 hrs. The piperidine alkaloid contents in the fermented mulberry leaves were 2.86% on dry powder, which is 7-fold increase from that of non-fermented mulberry leaves. The 1-deoxynojirimycin contents after applying preparative thin layer chromatography were 2.02% on dry powder, which is 8 times higher than that of non-fermented mulberry leaves.  $\alpha$ -Glycosidase activities was inhibited by 65.7 ~ 84.7% with 3 ~ 5% treatments of hot-water extracts of the fermented mulberry leaves, compared to 16.2 ~ 40.2% with 3 ~ 5% treatments of hot-water extracts of non-fermented mulberry leaves. Therefore, the results suggest that solid-state fermentation method does indeed increase of piperidine alkaloid contents on mulberry leaves.

**Key Words :** *Lactobacillus plantarum* TO-2100, Solid-State Fermentation, Piperidine Alkaloid Contents, Mulberry Leaves

## 서 언

뽕잎 (Mulberry leaves)은 신농본초경 (神農本草經), 본초강목 (本草綱目), 일본의 오처경 (五妻鏡), 깍다양생기 (喫茶養生記) 및 동의보감에 의하면 각기병, 부종, 당뇨, 탈항 등 약용 식물로서의 효과가 기록되어 있다. 뽕잎에는 녹차보다 많은 미네랄이 함유되어 있고 (Lee *et al.*, 2002), 기능성 성분인 rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin과 같은 flavonoid와 steroid, amino acid, vitamin 등이 함유되어 있다 (Kim *et al.*, 2009a). 중추신경계의 억제성 신경전달물질로 혈압상승억제 (Omori *et al.*, 1987), 식욕 및 포만감 조절 (Tews, 1981) 등 중요한 역할을 하는  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)가 비교적 풍부하며, 특히  $\alpha$ -glycosidase의 활성을 저해하여 당의 흡수를 감소시켜 혈당을 저하시키는 anti-hyperglycemic 활성이 우수한 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)과 N-containing sugar가 다량으로 함유되어 당뇨병의 치료 및 예방에 가장 주목되는 천연물 소재이다 (Miyahara *et al.*, 2004; Naowaboot *et al.*, 2009).

최근 약용식물 유용성분의 수득율을 증진시키기 위한 다양한 추출법이 제시 되고 있다. 그 중에 식물세포의 섬유질을 분해할 수 있는 세균 및 곰팡이와 알코올의 함량을 점진적으로 증가시킴으로서 유용성분의 추출을 용이하게 하는 효모균을 이용한 발효법이 주목을 받고 있다 (Doh *et al.*, 2010; Flint and Bayer, 2008; Katiyar, 2008; Kim *et al.*, 2007, 2009b; Ryu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). 그러나 이 방법 또한 기존의 방법들과 같이 유용성분의 특성을 고려하지 못한 단점을 가지고 있어, 약용 성분에 따른 차별화된 추출법 개발의 필요성이 대두되고 있다. 뽕잎은 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)을 포함하는 피페리딘 알칼로이드 (piperidine alkaloid)가 주된 활성성분으로 지금까지 주로 용매추출에 의해 분리되어 왔다 (Kim *et al.*, 2003). 피페리딘 알칼로이드 (piperidine alkaloid)는 다른 알칼로이드와 같이 물에 불용성이며 유기용매에 용해되는 특성을 갖고 있다. 이러한 특성은 차 및 물 추출물의 형태로 약용식물을 이용하는 현재의 기호도에서는 효능을 기대하기가 어렵다. Avula 등 (2009) 및 Lei 등 (2012)

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-63-850-6681 (E-mail) agrokto@wku.ac.kr

Received 2012 September 27 / 1st Revised 2012 October 22 / 2nd Revised 2012 November 20 / Accepted 2012 November 28

은 산 수용액을 사용하여 직접 알카로이드를 추출하였으며, Lou 등 (2011) 및 Kim 등 (2003)은 0.05 mol의 HCl 수용액으로 추출 시 DNJ의 함량이 가장 높았다고 보고하였다. 이는 피페리딘을 비롯한 대부분의 알카로이드가 산 수용액에서 염을 형성하여 수용성으로 전환되는 특성을 이용한 것이다 (Grinkevich, 1982). 이에 따라, 섬유질 소화능을 가진 신규 유산균 *Lactobacillus plantarum* TO-2100을 이용하여 알카로이드의 수용성을 증가시킬 수 있는 유산 생성과 식물 세포벽의 효소분해를 병용한 새로운 천연물 추출방법을 개발하고자 하였다. 또한 저렴한 발효시설, 손쉬운 발효공정과 장시간 발효 및 scale up이 쉬우며, 생성물의 회수를 용이하게 하고, 폐기물을 만들지 않는 친환경적인 방법으로 주목받고 있는 고체 발효 (solid-state fermentation)법 (Adams *et al.*, 2002; El-Bendary, 2006)을 적용하여 산업적 유용성도 고려하였다.

따라서 본 연구는  $\alpha$ -glycosidase 저해 활성으로 주목 받고 있는 빵잎을 유산균으로 고체발효하고, 활성성분인 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)을 포함하는 피페리딘 알카로이드 (piperidine alkaloid)의 증가를 측정하여, 빵잎을 이용한 다양한 기능성 제품을 제조하기 위한 기초자료로 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

본 시험에 사용한 빵잎은 전북 부안 소재 동훈푸드에서 제조한 동결건조 분말을 구입하여 초저온 냉동고 (-70°C)에 보관하여 실험 시료로 사용하였으며, 발효 유산균은 본 연구실에서 분리 동정한 *Lactobacillus plantarum* TO-2100 (수탁번호 KFCC 11537P)을 사용하였다. *L. plantarum* TO-2100을 *Lactobacillus* MRS (Difco™) 액체 배지 100 ml 에 1 백급이를 접종하고 30°C에서 48시간 배양 후 빵잎 발효를 위한 starter로 사용하였다.

### 2. 발효 유산균의 유산 생성량 측정 및 섬유질 분해 효소 활성

#### 1) 유산 생성량의 측정

분리 균주의 pH 및 유산 생성량을 측정하였다. 분리 균주를 25°C, 150 rpm으로 48시간 진탕 배양 후, pH는 pH meter (sp-701, Suntex Inc. Korea)로 측정하였으며, 유산 생성량은 Food analysis (Nielsen, 2003)에 의하여 발효액 20 ml 를 pH 가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 후 0.1 N NaOH 소요량을 다음 식에 의해 lactic acid (%) 생성량으로 환산하였다.

$$\text{Lactic acid (\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH 소비량} \times \text{NaOH 역가} \times \text{acid factor}}{\text{시료의 부피}} \quad (0.0090)$$

#### 2) Carboxymethyl Cellulose (CMCase) 활성측정

Cx 또는  $\beta$ -1,4 glucanase activity를 측정하기 위하여 Mandel과 Weber (1969), Mandel (1975)의 방법에 따라 1% carboxymethyl cellulose (CMC) 100 ml, 0.5 mol citrate buffer (pH 4.8) 10 ml, 1% merthiolate를 증류수 1 L로 희석한 용액을 기질로 사용하였다. *L. plantarum* TO-2100을 배양 후 원심분리하여 균체를 제거한 상등액 0.5 ml를 0.5 ml의 기질 용액에 첨가 후 50°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 3 ml DNS reagent (Miller, 1959)을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분간 정치 후 450 nm에서 비색정량하고, 사전에 작성된 표준곡선으로부터 환원당 (D-glucose)의 양을 환산하였다. 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol D-glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

#### 3) Filter Paper (FPase) 측정

Filter paper hydrate activity는 Ghose (1987)의 방법에 준하여 0.05 mol citrate buffer (pH 4.8) 1 ml에 1  $\times$  6 cm strips (50 mg)으로 절단한 Whatman No. 1 filter paper를 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액에 원심분리하여 균체를 제거한 *L. plantarum* TO-2100 배양 상등액 0.5 ml를 첨가하고 50°C에서 1시간 동안 반응한 후 3 ml DNS reagent를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에 5분간 정치 후 생성된 환원당의 양을 450 nm에서 비색정량하고, 표준곡선으로부터 환원당 (D-glucose)의 양을 환산하였다. 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol D-glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

### 3. 빵잎 유산 발효 방법에 의한 피페리딘 알카로이드 함량

#### 1) 초기 수분 첨가량의 영향

냉동 보관된 빵잎 건조분말 100g에 멸균 증류수를 각각 10, 20, 30, 40% (v/w)가 되게 첨가하고, 70°C에서 24시간 저온 살균하였다. 각각의 멸균 증류수를 첨가한 빵잎 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종한 후, 30°C에서 72시간 배양하여 수분 첨가량에 따른 질소화합물 및 피페리딘 알카로이드의 함량을 비발효 빵잎 분말과 비교 측정하였다.

#### 2) 발효 온도의 영향

발효 온도의 영향은 냉동 보관된 빵잎 건조분말 100g에 멸균 증류수를 20% (v/w) 첨가하고, 70°C에서 24시간 저온 살균한 각각의 빵잎 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종한 후, 발효온도 25, 30, 35, 40°C에서 72시간 배양하여 발효 온도에 따른 질소화합물 및 피페리딘 알카로이드의 함량을 측정하였다.

#### 3) 상대 습도의 영향

상대 습도의 영향은 냉동 보관된 빵잎 건조분말 100g에 멸균 증류수를 20% (v/w) 첨가하고, 70°C에서 24시간 저온 살

균한 각각의 뽕잎 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종한 후, 항온 항습기를 이용하여 30°C에서 상대습도를 50, 60, 70, 80%로 각각 조절하고, 72 시간 배양하여 상대습도에 따른 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드의 함량을 측정하였다.

**4. 질소화합물, Piperidine Alkaloid 함량 및 1-Deoxyojirimycin (1-DNJ) 정량**

피페리딘 알칼로이드 (piperidine alkaloid)의 추출은 Ahmad 등 (2002)의 방법을 변형하여 추출하였다. 발효분말에 20배량의 0.5 mol HCl 용액을 첨가하고 80°C, 5시간 추출 후, 이를 감압 여과하여 잔사를 제거하였다. 여액에 4 mol의 NH<sub>4</sub>OH 용액을 첨가하여 pH 12로 조절하고 2시간 실온에서 방치하였다. 이때 생성된 침전물을 측정하여 염기성의 질소화합물 함량으로 하였으며, 이 침전물을 증류수로 재 용해 후 CHCl<sub>3</sub>로 분획하였다. CHCl<sub>3</sub> 분획물을 감압 농축하고 70°C에서 12시간 건조 후 그 함량을 측정하여 피페리딘 알칼로이드 함량으로 하였다. 건조분획 1 g/ml의 시료 용액 10 µl를 TLC plate (silica gel 60 F254, Merck Co.)에 spotting하고 CHCl<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub>OH:MeOH (30:1:1)의 용매 system에서 전개하였다. Spot development는 iodine vapor를 spray하여 1-deoxyojirimycin의 표준물질과 비교하였다. 동일 용매 system에서 preparative thin layer chromatography (p-TLC, sigma-aldrich Co., USA)를 행한 후 1-deoxyojirimycin spot을 직접 절개 분리하고, MeOH에 용해 후 여과하여 실리카겔을 제거하였다. 여액을 감압농축 후 동결건조하여 1-deoxyojirimycin 함량을 측정하였다.

**5. α-Glycosidase 저해활성**

α-Glycosidase 저해활성은 Hsieh 등 (2010)의 방법에 준하여 측정하였다. 발효 및 비발효 뽕잎의 피페리딘 알칼로이드 1~5%를 정제수에 용해 후 감압 여과하여 잔존물을 제거하고 그 상등액 50 ml를 0.15 U/ml α-glycosidase 효소액 50 ml, 200 mmol potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50 ml와 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후 0.1 mol phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 3 mmol p-NPG (p-nitrophenyl-α-glucopyranoside) 100 ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1 mol 탄산나트륨 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 750 ml로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 α-glycosidase 저해활성을 측정하였다.

$$\text{효소저해활성 (\%)} = \frac{\text{(1 - 시료 첨가구의 흡광도)}}{\text{무처리구의 흡광도}} \times 100$$

또한, 뽕잎의 이용성을 증대시키기 위하여 발효 뽕잎 (초기

수분첨가량 20%, 발효온도 30°C, 상대습도 60%에서 72시간 발효) 및 비발효 뽕잎을 열수 추출하여 얻어진 추출물을 이용하여 동일한 α-glycosidase 저해활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 유산균주의 유산 생성량 및 섬유소 분해 효소 활성**

유산균주의 유산 생성량 및 섬유소 분해 효소 활성을 측정 한 결과, pH는 3.2, 유산 생성량은 0.68%이었다. CMCase와 FPase의 활성은 각각 40.1 unit와 0.35 unit였다 (Table 1). 이는 Fu와 Mathews (1999)가 *L. plantarum*에 의한 유당을 기질로 생성된 유산량이 0.95~1.3% (w/w)이었다는 보고와 유사 하였다. 또한 Somen과 Anita (2012a)는 rice straw에서 *Bacillus licheniformis* MVS1과 *Bacillus* sp. MVS3을 배양시 CMCase 및 FPase 활성은 각각 0.106, 0.082 IU 및 0.471, 0.444 IU였다고 보고하였으며, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2를 CMC, wheat straw와 rice straw에서 배양시 CMCase는 각각 0.065, 0.044, 0.053 IU였고, FPase의 활성은 각각 0.456, 0.206, 0.310 IU이었다는 보고 (Somen and Anita, 2012b)와 비교했을 경우, 공시된 유산균주는 *Bacillus* 종보다 우수한 섬유질 분해효소 생산능을 보였다. 이는 섬유질 분해와 유산 발효를 병용한 천연물 가공 산업에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

**Table 1.** The pH, lactic acid production and cellulase activity after 48hr cultivation of *Lactobacillus plantarum* TO-2100.

pH	3.20±0.33*
Lactic acid production (%)	0.68±0.18
CMCase (unit)**	40.10±2.65
FPase (unit)	0.35±0.06

\*Each value represents the mean ± SD (n = 3).  
\*\*One unit of CMCase and FPase activities were defined as the amount of enzyme that released 1 mmol of reducing sugars as D-glucose equivalents min<sup>-1</sup>.

**Table 2.** Effect of initial water addition amount for fermentation on contents of nitrogen-containing compound and piperidine alkaloid in mulberry leaves fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100.

Water addition amount (%)	Nitrogen-containing compound (%)	Piperidine alkaloid (%)
Non-fermented	3.12±0.35 <sup>c</sup>	0.40±0.06 <sup>d**</sup>
10	10.14±0.61 <sup>b</sup>	1.72±0.10 <sup>b</sup>
20	13.21±0.50 <sup>a</sup>	2.29±0.14 <sup>a</sup>
30	8.69±0.57 <sup>c</sup>	0.85±0.19 <sup>c</sup>
40	4.58±0.33 <sup>d</sup>	0.47±0.09 <sup>d</sup>

\*Each value represents the mean ± SD (n = 3).  
\*\*Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

2. 빵잎 유산 발효 방법에 의한 피페리딘 알칼로이드 함량

1) 초기 수분 첨가량의 영향

냉동 보관된 빵잎 건조분말 100 g에 멸균 증류수를 10, 20, 30, 40% (v/w)가 되게 첨가하고 70°C, 24시간 저온 살균한 각각의 빵잎 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종하고 30°C, 72시간 배양하여 수분 첨가량에 따른 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드의 함량을 비발효 빵잎 분말과 비교 측정된 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 20% 초기 수분 첨가 시 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드의 함량은 각각 13.21% 및 2.29%로 3.12% 및 0.40%인 비발효 빵잎에 비해 4.23 및 5.73배 증가하는 결과를 나타내었다. 수분 첨가량이 40% 이상이 되면 수분과다로 인한 조작의 불편, 잡균의 오염 가능성 및 발효 속도도 감소하는 것으로 나타났다. 수분은 미생물의 생육에 직접적인 영향을 미치는 요소로 수분량의 감소는 미생물의 생육을 저해한다. Wang 등 (1975)은 고체발효에서 수분량은 가장 중요한 요소이며, 최적의 수분량은 50~60% 이하로 감소시키는 것이 바람직하다고 보고하였다. Pastrana 등 (1995)은 습기를 머문 고체기질은 자유수가 없는 상태에서 영양원으로 이용된다고 보고하였다. 수분의 첨가량은 고체 발효 기질의 특성 및 구성 성분에 큰 영향을 받는 것으로 판단된다.

2) 발효 온도의 영향

발효온도의 영향을 측정하기 위하여 냉동 보관된 빵잎 건조분말 100 g에 멸균 증류수를 20% (v/w) 첨가하고 70°C에서 24시간 저온 살균한 각각의 빵잎의 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종하고 25~40°C에서 72시간 배양 후 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드의 함량을 측정된 결과, 30~35°C에서 빵잎 분말의 질소화합물 함량이 13.04~13.21%, 피페리딘 알칼로이드 함량이 2.22~2.29%로 상대적으로 높은 함량을 나타내었으나 이들 간에는 유의성은 인정되지 않았으며, 40°C 이상의 온도에서는 함량이 감소하는

것으로 나타났다 (Table 3). 일반적으로 유산균의 최적 생육온도는 20°C에서 45°C 범위로 Buchta (1983)는 *L. delbrueckii*, 와 *L. bulgaricus*의 최적 발효온도는 45°C라고 보고하였으며, Krischke 등 (1991)은 *L. casei*의 최적온도는 37°C로 보고하였다. 반면 Nabi와 Baniardalan (2004)은 *L. casei*를 이용한 발효에서 최적 온도는 28°C라고 보고하였다. Ray 등 (2009)도 *L. plantarum* MTCC1407 및 *L. amylophilus* 를 이용한 섬유질 폐기물 고체발효에서 최적온도는 각각 32°C 및 37°C라고 보고하였다. 본 연구의 결과도 이 범주에 포함되었다. 그러나 액체발효와는 달리 발효열에 의한 온도의 급격한 상승 및 냉각에 의한 온도의 급격한 하강 현상을 나타내어, 발효 기간 동안 일정한 온도를 유지하는 방안의 검토가 요구된다.

3) 상대 습도의 영향

발효 과정 중 상대습도의 영향을 조사하기 위하여 냉동 보관된 빵잎 건조분말 100 g에 멸균 증류수를 20% (v/w) 첨가하고 70°C에서 24시간 저온 살균한 각각의 빵잎의 분말에 *L. plantarum* TO-2100 균주 배양액 3 ml (10<sup>8</sup> cfu/ml)를 접종하고 항온 항습기를 이용하여 30°C에서 상대 습도를 50~80%로 각각 조절하여 72시간 배양 후 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드 함량을 측정하였다. Table 4에 나타난 바와 같이 60~70%의 상대 습도에서 질소화합물 및 피페리딘 알칼로이드의 함량은 16.41~16.54% 및 2.82~2.86%로 3.12% 및 0.40%인 비발효 빵잎에 비해 5.26~5.30배 및 7.05~7.15배 증가하여 기능성 성분의 증가에 고체 발효의 방법이 효과가 있음을 알 수 있었다. 상대 습도가 증가하면 함량이 감소하는 것은 분말 뭉침 등에 의해 원활한 통기가 일어나지 않음으로서 미생물의 생육을 저해하며, 상대습도가 낮을 경우 수분 증발로 인한 빵잎 분말의 건조가 심화되어 미생물의 생육을 저해하는 것으로 판단된다. 이는 Lonsane 등 (1985)의 보고와 같이 발효공정에 상대습도의 유지는 가장 중요한 요인이 증명되었다. Tunga 등 (1998)은 *Rhizopus oryzae*의 최적 상대

Table 3. Effect of temperature for fermentation on contents of nitrogen-containing compound and piperidine alkaloid in mulberry leaves fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100.

Temperature (°C)	Nitrogen-containing compound (%)	Piperidine alkaloid (%)
Non-fermented	3.12±0.35 <sup>d</sup>	0.40±0.06 <sup>*d**</sup>
25	12.28±0.36 <sup>b</sup>	1.97±0.10 <sup>b</sup>
30	13.21±0.50 <sup>a</sup>	2.29±0.14 <sup>a</sup>
35	13.04±0.47 <sup>a</sup>	2.22±0.14 <sup>a</sup>
40	10.46±0.45 <sup>c</sup>	1.49±0.18 <sup>c</sup>

\*Each value represents the mean ± SD (n = 3).

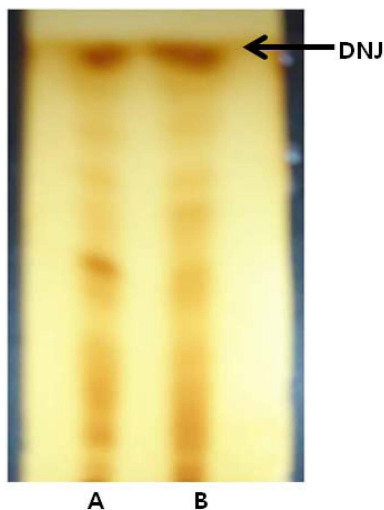
\*\*Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4. Effect of relative humidity for fermentation on contents of nitrogen-containing compound and piperidine alkaloid in mulberry leaves fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100.

Relative humidity (%)	Nitrogen-containing compound (%)	Piperidine alkaloid (%)
Non-fermented	3.12±0.35 <sup>d</sup>	0.40±0.06 <sup>*d**</sup>
50	13.65±0.56 <sup>c</sup>	2.08±0.19 <sup>c</sup>
60	16.54±0.54 <sup>a</sup>	2.86±0.12 <sup>a</sup>
70	16.41±0.51 <sup>a</sup>	2.82±0.18 <sup>a</sup>
80	15.46±0.46 <sup>b</sup>	2.49±0.11 <sup>b</sup>

\*Each value represents the mean ± SD (n = 3).

\*\*Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.



**Fig. 1.** DNJ contents by TLC analysis of piperidine alkaloid extracted from mulberry leaves non- and fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100. A; Piperidine alkaloid extracted from non-fermented mulberry leaves, B; Piperidine alkaloid extracted from fermented mulberry leaves, Solvent system; CHCl<sub>3</sub> : NH<sub>4</sub>OH : MeOH (30 : 1 : 1).

**Table 5.** Effect of non- and lactic acid fermentation on contents of piperidine alkaloid and 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves.

Fermentation	Piperidine alkaloid (%) (A)	1-Deoxynojirimyci (%) (B)	B/A (%)
Non-fermentation	0.40±0.06 <sup>b</sup>	0.25±0.05 <sup>*b**</sup>	62.5
Lactic acid fermentation	2.86±0.12 <sup>a</sup>	2.02±0.14 <sup>a</sup>	70.6

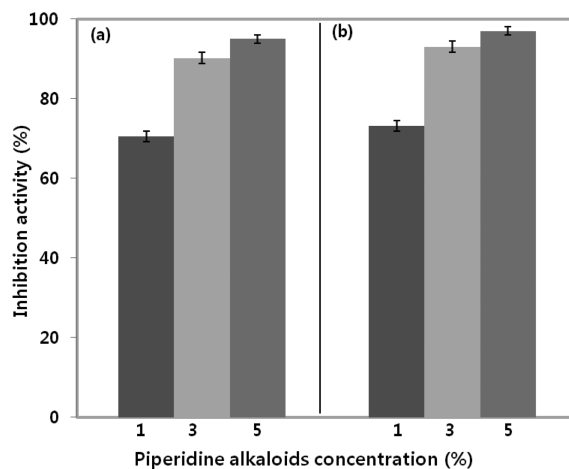
\*Each value represents the mean ± SD (n = 3).

\*\*Mean separation within each columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

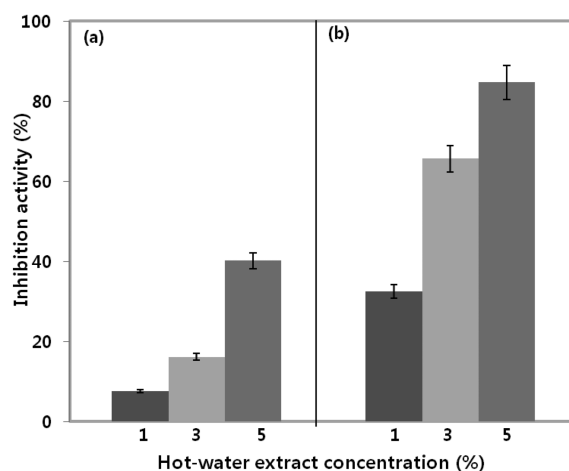
습도가 90~95%, Vu 등 (2008)은 *Lecanicillium lecanii* 41185의 상대습도는 75%, 또한 Bai 등(2004)이 보고한 *Aspergillus niger*의 상대습도는 75~90%이었으나, 이들보다 낮은 상대습도를 나타낸 것은 빵잎은 수용성 점질 다당의 함량이 높아 (Wang and Jiang, 2008) 비교적 적은 수분 함량에도 곰팡이 현상이 강하게 나타나는 빵잎의 특성에 기인한 것으로 판단된다.

### 3. 1-Deoxynojirimycin (1-DNJ)의 함량

초기 수분첨가량 20%, 향은 향습기를 이용하여 30°C에서 상대 습도를 60%로 조절하여 72시간 배양 후 추출한 피페리딘 알카로이드의 thin layer chromatography (TLC) 패턴을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 피페리딘 알카로이드는 대부분 DNJ임을 알 수 있었다. 또한 preparative TLC를 행한 후 직접 1-deoxynojirimycin을 분취하여 동결건조 후 그 함량을 측정한 결과 (Table 5), 발효 빵잎의 경우 2.02%로 0.25%인 비발효 빵잎에 비해 8.08배 증가하여 빵잎



**Fig. 2.**  $\alpha$ -Glycosidase inhibition activity according to the concentration of piperidine alkaloid extracted from mulberry leaves non- and fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100. (a); Piperidine alkaloid extracted from non-fermented mulberry leaves, (b); Piperidine alkaloid extracted from fermented mulberry leaves, Vertical bars represent standard errors.



**Fig. 3.**  $\alpha$ -Glycosidase inhibition activity according to the concentration of hot-water extracts of mulberry leaves non- and fermented by *Lactobacillus plantarum* TO-2100. (a); Hot-water extracts of non-fermented mulberry leaves, (b); Hot-water extracts of fermented mulberry leaves, Vertical bars represent standard errors.

으로부터 DNJ를 다량으로 얻을 수 있는 효과적인 방법으로 판단되었으며, 이는 빵잎 중에 가장 많은 피페리딘 알카로이드가 DNJ라는 Lou 등 (2011) 및 Song 등 (2009)의 보고와 같이 추출된 피페리딘 알카로이드 함량 중에는 약 70% 정도의 1-deoxynojirimycin 함량이 존재함을 알 수 있었다.

### 4. $\alpha$ -Glycosidase 저해활성

$\alpha$ -Glycosidase에 대한 저해능은 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항 당뇨 활성 측정의 주 표적 효소이다.

비발효 빵잎과 발효 빵잎 (초기 수분첨가량 20%, 발효온도 30°C, 상대습도 60%에서 72시간 발효)에서 추출된 피페리딘 알카로이드 함량에 따른  $\alpha$ -glycosidase 저해활성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 비발효 빵잎과 발효 빵잎에서 추출된 피페리딘 알카로이드 1% 첨가 시 70.6%, 73.2%의 저해활성을 보였으며, 3% 첨가 시 90.2%, 93.0%, 5% 첨가 시 95.0%, 97.0%의 저해활성을 보였으나 비발효 빵잎과 발효 빵잎 간에는 유의성이 없었다. 이는 빵잎에 함유된 피페리딘 알카로이드의 성분이 발효와 비발효 간의 큰 차이가 없는 것으로 판단된다. 그러나 비발효 빵잎과 발효 빵잎의 열수 추출물에 대한  $\alpha$ -glycosidase 저해활성 (Fig. 3)은 비발효 빵잎 열수추출물 1% 첨가 시 7.7%, 3% 첨가 시 16.2%, 5% 첨가 시 40.2% 저해활성을 보인 반면, 발효 빵잎 열수 추출물 1% 첨가 시 32.5%, 3% 첨가 시 65.7%, 5% 첨가 시 84.7%의 저해활성을 보여 비발효 빵잎과 발효 빵잎 간의 2~4배의 큰 차이를 나타내었다. 열수 추출물의 경우 효소 저해 활성이 큰 차이를 보인 것은 발효와 비발효 빵잎 간의 피페리딘 알카로이드 함량의 차이에 기인한 것으로 판단되며, 발효를 통하여 빵잎의 당질 관련 기능성을 한층 더 증가시킬 수 있음을 시사한다.

이상의 결과에서 유산균 *L. plantarum* TO-2100 (KFCC 11537P)은 유산 생성능 및 섬유질 분해 효소 활성이 우수하며, 이 유산균을 이용하여 빵잎 분말을 고체발효 시 최적 조건은 빵잎의 초기 수분 첨가량 20%, 발효온도 30~35°C, 상대 습도 60~70%이었다. 빵잎의 초기 수분 첨가량 20%, 발효온도 30°C에서 상대 습도 60%로 조절하여 72시간 발효 시 비발효 빵잎보다 피페리딘 알카로이드 함량이 7배, 1-deoxynojirimycin 함량은 8배 정도 증가하였으며, 비발효 빵잎과 발효 빵잎 간의 열수 추출물에 대한  $\alpha$ -glycosidase 저해활성은 2~4배의 큰 차이를 나타내었다. 이는 최근 천연물 재료로부터 유용물질의 함량 및 생산량 증가를 위해 용매추출, 효소추출, 초음파추출, microwave 추출 등 다양한 추출법이 개발되고 있는 시점에서 미생물을 이용한 발효법도 우수한 방법의 하나임이 증명되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 특화작목 연구개발과제 (과제번호: PJ007773032012)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- Adams TT, Eiteman MA and Hanel BM. (2002). Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresource Technology*. 82:33-41.
- Ahmad VU, Kamal A and Ali MS. (2002). Aspertins A-D: Further piperidine alkaloids from *Andrachne aspera*(Euphorbiaceae). *Turkish Journal of Chemistry*. 26:245-250.
- Avula B, Wang YH, Smillie TJ and Khan IA. (2009). Extraction and analysis of alkaloids from roots of goldenseal and dietary supplements by using UPLC-UV-MS methods. *Planta Medica*. 75:69-75.
- Bai ZH, Zhang HX, Qi HY, Peng XW and Li BJ. (2004). Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Technology*. 95:49-52.
- Buchta K. (1983). Lactic Acid(Vol. 3). In Dellweg H. (ed.). *Biotechnology: A comprehensive treatise*(Vol. 8). Verlag Chemie Press. Weinheim, Germany. p.409-417.
- Doh ES, Chang JP, Lee KH and Seong NS. (2010). Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:255-265.
- El-Bendary MA. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*. 46:158-170.
- Flint HJ and Bayer EA. (2008). Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academe Science*. 1125:280-288.
- Fu W and Mathews AP. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*. 3:163-170.
- Ghose TK. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59:257-268.
- Grinkevich NI, Lovkova MY and Buzuk GN. (1982). A study of the biogenesis of glaucium-flavum alkaloids and ways of regulating it. *Rastitel'nye Resursy*. 18:367-372.
- Hsieh PC, Huang GJ, Ho YL, Lin YH, Huang SS, Chiang YC, Tseng MC and Chang YS. (2010). Activities of antioxidants,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Botanical Studies*. 51:293-302.
- Katiyar CK. (2008). Aqueous alcoholic extraction of medicinal and aromatic plants by fermentation. In Sukhdev SH *et al.* (ed.). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste, Italy. p.107-113.
- Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Bae GJ, Ahn JH, Choi GP, Choi YB, Ko JR and Lee HY. (2007). Enhancement of immune activities of *Kadsura japonica* Dunal. through conventional fermentation process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:162-169.
- Kim EJ, Kim GY, Kim YM, Choi KH and Jang SJ. (2009a). Anti-obesity effect of mulberry leaves extraction in obese rats high-fat diet. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 23:831-836.
- Kim JW, Kim SU, Lee HS, Kim I, Ahn MY and Ryu KS. (2003). Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1002:93-99.
- Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, Seong DH and Lee HY. (2009b). Comparison of biological

- activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:280-285.
- Krischke W, Schroder M and Trosch W.** (1991). Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Applied Microbiology and Biotechnology. 34:573-578.
- Lee JR, Hah YJ, Lee JW, Song YM, Jin SK, Kim IS, Hah KH and Kwak SJ.** (2002). Physico-chemical and sensory properties of emulsified sausages containing mulberry and persimmon leaf powder. Korean Journal for Food Science of Animal Resource. 22:330-336.
- Lei W, Hea HP, Dia YT, Zhanga Y and Hao XJ.** (2012). Catharoseumine, a new monoterpene indole alkaloid possessing a peroxy bridge from *Catharanthus roseus*. Tetrahedron Letters. 53:1576-1578.
- Lonsane BK, Ghildyal NP, Budiartman S and Ramakrishna SV.** (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation. Enzyme Microbial Technology. 7:258-265.
- Lou DS, Zou FM, Yan H and Gui ZZ.** (2011). Factors influencing the biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. African Journal of Agricultural Research. 6:2998-3006.
- Mandel M and Weber J.** (1969). Production of cellulases. Advances in Chemistry Series. 95:391-414.
- Mandel M.** (1975). Microbial sources of cellulases. Biotechnology and Bioengineering. 5:81-105.
- Miller GL.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426-428.
- Miyahara C, Miyazawa M, Satoh S, Sakai A and Mizusaki S.** (2004). Inhibitory effect mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemic in normal rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 50:161-164.
- Nabi B, Gh R and Baniardalan P.** (2004). Batch and continuous production of lactic acid from whey by immobilized lactobacillus. Journal of Environmental Studies. 30:47-53.
- Nielsen SS.** (2003). Food analysis. 3rd Edition. Kluwer Academic/ Plenum Publisher. New York, New York, USA. p.207-226.
- Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes B and Kukongviriyapan U.** (2009). Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin- induced chronic diabetic rats. Plant Foods for Human Nutrition. 64:116-121.
- Omori M, Yano T, Okamoto J, Tsushida T, Murai T and Higuchi M.** (1987). Effect of anaerobically treated tea(Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 61:1449-1451.
- Pastrana LM, Gonzalez MP, Pintado J and Murado MA.** (1995). Interaction affecting gibberellic acid production in solid state culture. A factorial study. Enzyme Microbial Technology. 20:544-549.
- Ray RC, Sharma P and Panda SH.** (2009). Lactic acid production from cassava fibrous residue using *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. Journal of Environmental Biology. 30:847-852.
- Ryu IH, Lee EJ, Kwon JW, Lee KS and Kwon TO.** (2010). Fermentation property by novel cellulolytic lactic acid bacteria *Enterococcus* sp. TO-94 on omija(*Schizandra chinensis* Baillon). Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:429-438.
- Somen A and Anita C.** (2012a). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. Brazilian Archives of Biology and Technology. 55:497-503.
- Somen A and Anita C.** (2012b). Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. African Journal of Microbiology Research. 6:5453-5458.
- Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei Z and LU H.** (2009). Phytochemical profiles of different mulberry(*Morus* sp.) species from China. Journal of Agricultural Food Chemistry. 57:9133-9140.
- Tews JK.** (1981). Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. Life Science. 29:2535-2542.
- Tunga R, Banerjee R and Bhattacharyya BC.** (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. Bioprocess Engineering. 19:187-190.
- Vu VH, Hong SI and Kim K.** (2008). Production of aerial conidia of *Lecanicillium lecanii* 41185 by solid-state fermentation for use as a mycoinsecticide. Mycobiology. 36:183-189.
- Wang F, Li J and Jiang Y.** (2008). Polysaccharides from mulberry leaf in relation to their antioxidant activity and antibacterial ability. Journal of Food Process Engineering. 33:39-50.
- Wang HL, Swain EW and Hesseltine CW.** (1975). Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and the application in tempeh fermentation. Journal of Food Science. 40:168-170.
- Yang MC, Kim DS, Jeong SW and Ma JY.** (2011). Bioconversion constituents of Galgeun-tang fermented by *Lactobacillus plantarum*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:446-455.
- Yang X, Chen H, Gao H and Li Z.** (2001). Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. Bioresource Technology. 78:277-280.