

Monascus pilosus로 발효시킨 뽕잎차의 품질특성과 항산화능

이상일¹ · 이에경² · 최종근² · 양승환² · 이인애² · 서주원² · 김순동^{2*}

¹계명문화대학 식품영양조리학부

²명지대학교 생명과학정보학부

Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Mulberry Leaf Tea Fermented by *Monascus pilosus*

Sang-Il Lee¹, Ye-Kyung Lee², Jongkeun Choi², Seung Hwan Yang², In-Ae Lee²,
Joo-Won Suh², and Soon-Dong Kim^{2*}

¹Dept. of Food, Nutrition and Cookery, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

²Division of Bioscience and Bioinformatics, College of Natural Science,
Myongji University, Gyeonggi-do 449-728, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the contents of monacolin K and citrinin, along with the sensory quality and antioxidant activity of mulberry leaf tea fermented by *Monascus pilosus* (FMM). Total monacolin K content of FMM was 0.058%, but citrinin was not detected. Redness of brewed FMM was remarkably higher than that of unfermented mulberry leaf tea (UFM). In sensory evaluation of brewed FMM, while astringent taste and savory taste were lower, flavor, color, and overall acceptability were significantly higher than those of UFM. Total polyphenol contents of UFM and FMM were 83.1 and 23.61 mg/g (dry basis), total flavonoid contents of UFM and FMM were 17.96 and 3.99 mg/g (dry basis), respectively. Xanthine oxidase (XO) inhibitory activity and superoxide dismutase (SOD)-like activity of FMM were lower than those of UFM. Electron-donating ability and ferric-reducing antioxidant power of FMM were slightly lower than those of UFM. However, the antioxidant activities of FMM per polyphenol content were markedly higher than those of UFM. These results suggest that FMM may scavenge excessive reactive oxygen species (ROS) via inhibition of XO and SOD-like activity. Furthermore, FMM demonstrated relatively higher acceptability and antioxidant ability along with functionality of *Hongguk* (red yeast rice), and therefore could be utilized to prevent various ROS-induced diseases.

Key words: mulberry leaf tea, fermentation, *Monascus pilosus*, monacolin K, antioxidant activity

서 론

뽕나무(*Morus alba*)는 예로부터 잎, 열매, 껍질 및 뿌리 모두를 식·의약 소재로 사용해 왔으며, 특히 수확량이 많은 잎은 당뇨병과 뇌졸중에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1). 또한 뽕잎은 여타의 천연소재들에 비하여 높은 양의 γ -aminobutyric acid와 rutin이 함유되어 있어 노인성 치매와 동맥경화를 예방하는 효과가 있고(2,3), 혈압상승을 억제할 뿐만 아니라 식욕조절을 통한 항비만 효과와 항암, 항산화, 항염 및 항고지혈 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(4-8). 이와 같은 다양한 생리활성 때문에 뽕잎을 다각적으로 활용코자하는 연구들이 많이 이루어지고 있다(9-11). 뽕잎차는 대부분 덩음차로 제조되었으나 발효에 의하여 차의 품질특성과 기능성이 향상된다는 결과가 보고되면서 발효방법과 기능성에 대한 관심들이 높아지고 있다(12,13).

한편, *Monascus*속 곰팡이는 전통적으로 홍국의 제조에 이용되어 왔으며 아시아 여러 나라에서는 식품의 보존과 질병치료에 사용하고(14), cholesterol 생합성을 저해하는 monacolin K, mevicolin 및 lovastatin과 같은 statin계 성분을 생합성 함으로써 동맥경화의 예방에 사용하며(15) 골 형성 촉진 및 골절률 감소효과가 있는 것으로 보고되고 있다(16). 특히, monacolin K는 항진균, 항당뇨, 항고혈압, 항콜레스테롤 및 항암 등의 효과가 있으며(17-21) rubropuntain, monascorubin, monascin, ankaflavin, rubropunctamine 및 monascorubramine(14,22) 등의 색소 성분은 항균 및 항암효과가 알려져 있다(23,24).

최근 본 연구자들은 *Monascus*속 미생물을 액체배양 하여 얻은 균사체의 ethanol 추출물이 고지방식으로 유도한 비만흰쥐에서의 항비만 효과(25)와 비만으로 손상된 간의 기능을 증진시키는 효과를 관찰한 바 있으며(26) 본 연구에

*Corresponding author. E-mail: tele-@hanmail.net
Phone: 82-31-330-6190, Fax: 82-31-336-0870

서는 *M. pilosus*를 이용한 발효 뽕잎차의 관능적 품질특성과 monacolin K의 함량 및 향산화 활성을 비발효 뽕잎의 경우와 비교하였다.

재료 및 방법

재료 및 균주

실험용 뽕잎(*M. alba* leaves)은 2011년 9월에 채취한 것으로 새아침영농조합법인(경북 상주시)에서 제공받았으며, 균주는 한국중균협회에서 분양받은 *M. pilosus* IFO 4480을 사용하였다.

뽕잎의 발효

뽕잎의 발효는 Fig. 1에서와 같이 생 뽕잎을 1×2 cm 크기로 자른 후 40°C에서 2일간 건조시켰으며(unfermented mulberry leaves: UFM), 발효는 건조시킨 뽕잎에 물을 가하여 총 수분 함량이 29%가 되게 조절한 후 2 L들이 polypropylene bag에 500 g씩 넣고 air filter를 부착하여 121°C에서 90분간 살균하였다. 다음에 미리 준비한 *M. pilosus* 배양액 50 mL를 접종한 후 30°C에서 15일간 배양하였다. 그리고 40°C에서 수분함량이 2% 내외가 되도록 건조시킨 후 2 mm 체로 쳐서 발효뽕잎차(FMM)를 제조하였다.

M. pilosus 배양액은 glucose(5%), peptone(2%), KH₂PO₄ (0.8%), MgSO₄·7H₂O(0.05%), CH₃COOK(0.2%), NaCl(0.1%)을 함유하는 배지에 균주를 접종하여 150 rpm의 진탕배양기에서 10일간 배양하여 사용하였다.

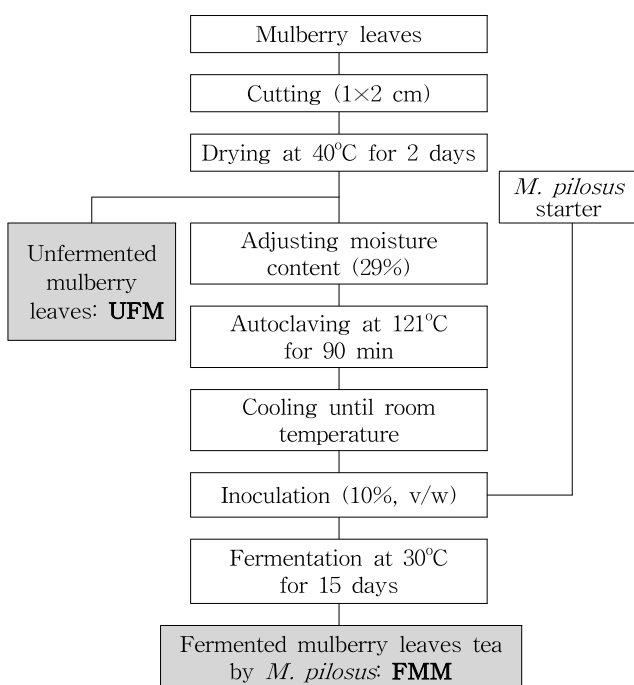


Fig. 1. Preparation procedure of mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*.

WSS 및 ESS 함량의 측정

WSS(water soluble substance) 및 ESS(ethanol soluble substance)의 함량은 UFM 및 FMM 각 1 g에 증류수 또는 70% ethanol을 가하여 100 mL로 채워 10분간 끓인 후 최종적으로 100 mL로 정용하고 여과한 여액 50 mL을 취하여 건조 중량을 측정하였다.

우린 차의 색상

우린 차의 색상은 차 추출기(Damian Tea Co., Anyang, Korea)에 UFM 및 FMM 각 1 g씩을 넣고 끓는 물 100 mL를 가하여 3분간 우려낸 차를 색차계(Chromameter CR-200, Minolta, Tokyo, Japan)로 밝기(L*: lightness), 적색도(a*: redness), 황색도(b*: yellowness) 및 hue angle(H°)을 측정하였다.

관능검사

차의 관능검사는 (사)우리차문화연합회 회원 25명으로 구성된 관능요원에 의하여 단맛, 신맛, 떫은맛, 구수한맛은 강도로 아주 낮다(1점), 낮다(2점), 보통이다(3점), 강하다(4점), 아주 강하다(5점)로 나타내었으며, 냄새기호도, 색상기호도 및 종합적 기호도는 아주 싫다(1점), 싫다(2점), 보통이다(3점), 좋다(4점), 아주 좋다(5점)로 평가하였다. 패널은 전통차의 이론과 실기교육을 담당하고 있는 40~60세의 여성으로 매주 2시간씩 4주간 상기의 묘사어를 중심으로 강도와 기호도에 대하여 훈련을 실시한 후 본 평가를 행하였다. 즉, UFM과 FMM 각 2 g씩을 취하여 커피여과지(Fine filters, Sungilunders Co., Gyeonggi-do, Korea)에 담아 차 추출기(Damian Tea Co.)에 넣은 후 끓는 물 200 mL로 채운 후 3분간 우려 우린차로 행귀 낸 백색 도자기 찻잔에 30 mL씩 부어 제공(70±2°C)하였다.

Monacolin K 함량

Roman과 Vladimir(27)의 방법에 따라 HPLC(Series 1200, Agilent Technologies Co., Ltd., Palo Alto, CA, USA)로 gradient를 행하였다. 표준품 monacolin K(lovastatin lactone form, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)는 75% ethanol에 용해하여 사용하였다. 이때 column은 Waters 120 ODS-AP(5 μm, 4.6×150 mm, Milford, MA, USA), detector는 UV 237 nm, flow rate는 1.0 mL/min, mobile phase는 CH₃CN : 0.2% H₃PO₄(gradient), 온도는 40°C의 조건으로 측정하였다. Acid form 표준용액은 10 mg의 lactone form monacolin K 70% ethanol 용액 2 mL에 0.05 N NaOH 용액 0.5 mL를 가한 후 실온에서 30분 방치하여 조제하였으며, 함량은 각각 검량선에 의하여 산출하였다.

Citrinin 함량

Reinhard와 Zimmerli(28)의 방법에 따라 HPLC[(Series 1200, Agilent Technologies Co., Ltd.), column: Waters 120 ODS-AP(5 μm, 4.6×150 mm), detector: UV(excitation

wavelengths 335 nm, measurement wavelengths 502 nm), flow rate: 1.0 mL/min, mobile phase: CH₃CN-0.1% tri-fluoroacetic acid(35/65), temperature: 40°C]로 분석하였다. 표준용액은 citrinin(Sigma-Aldrich) methanol 용액을 사용하였으며 표준품의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

Total polyphenol, total flavonoid 및 항산화능 분석 시료의 추출

TP(total polyphenol), TF(total flavonoid) 함량 및 항산화능 분석시료의 추출은 UFM과 FMM 각 1~5 g에 70% ethanol을 가하여 100 mL로 채운 후 4°C에서 5일간 방치하여 추출하였으며, 여과지(Advantec 5B, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 여과한 여액을 분석용 시액으로 사용하였다.

Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

Total polyphenol 함량은 Minussi 등(29)의 방법에 따라 시료추출액 100 µL에 2% sodium carbonate 2 mL와 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며, gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다. Total flavonoid 함량은 Meda 등(30)의 방법에 따라 시료추출액 1 mL에 2% aluminum chloride 1 mL와 50% ethanol 1 mL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준품 naringin(Sigma-Aldrich Co.)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

XO 저해활성

XO(xanthine oxidase) 저해활성은 우유로부터 정제된 효소원(31)을 이용하여 Stirpe와 Della Corte(32)의 방법에 따라 효소가 기질인 xanthine을 uric acid로의 전환을 억제하는 정도를 저해율 %로 나타내었다.

전자공여활성

Blois(33)의 방법에 따라 시료추출액 0.2 mL에 0.4 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8 mL를 가하여 10분간 방치한 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, electron donating ability(%)=[1-(시료흡광도/대조구흡광도)]×100에 의하여 활성도를 산출하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

Martin 등(34)의 방법에 따라 시료추출액 0.2 mL에 50 mM tris-HCl buffer(pH 7.4) 용액 3 mL와 5 mM hematoxylin 60 µL를 가하고 25°C에서 5분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, SOD 유사활성(%)=100-[대조구 OD-시료 OD]/(대조구 OD)×0.5]×100에 의하여 활성도를 산출하였다.

Ferric-reducing antioxidant power(FRAP)

Oyaizu(35)의 방법에 따라 시료추출액 0.75 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 0.75 mL와 1% potassium ferri-cyanide 용액 0.75 mL를 가한 후 50°C에서 20분간 반응시켰

다. 다음에 10% trichloroacetic acid 용액 0.75 mL를 가한 후 3,000×g에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액 1.5 mL에 증류수 1.5 mL와 1% FeCl₃ 용액 0.3 mL를 가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ferrous iron chelating 활성

Dinis 등(36)의 방법에 따라 시료추출액 1 mL에 3.7 mL의 증류수를 가한 후 2 mM의 ferrous chloride 0.1 mL와 5 mM의 ferrozine 0.2 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 562 nm의 흡광도를 측정하였다. 활성도(%)는 [1-[시료 OD/대조구 OD]×100]으로 계산하였다.

통계처리

분석은 3회 반복으로 실험하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 관능검사는 관능요원 25명의 평균값과 표준편차로 나타내었다. 유의성 검증은 version 12의 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test 및 t-test를 행하였다.

결과 및 고찰

Monacolin K 및 citrinin 함량

건조뽕잎(UFM)과 발효뽕잎차(FMM)를 시료로 하여 monacolin K와 citrinin을 분석한 결과는 Table 1과 같다. FMM의 총 monacolin K의 함량은 0.056%이었으며 활성형인 acid form이 0.047%, 비활성형인 lactone form이 0.009%로 acid form이 83.93%를 차지하였다. *Monascus*속 미생물을 번식시킨 홍국에서도 활성형과 비활성형이 공존하는 것으로 알려져 있다(37). 비활성형의 monacolin K lactone form도 체내의 carboxyesterase에 의하여 활성형인 acid form으로 전환되어 HMG CoA reductase를 저해시킴으로써 체내 cholesterol의 생합성을 억제하는 것으로 보고되고 있다(38). 체내 carboxyesterase의 활성은 개인차가 크며, 의약품으로 판매되고 있는 carboxyesterase는 lactone form의 개환과정에서 간과 신장의 손상 및 근 질환(myopathy)을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(39). 그러나 *Moascus*속

Table 1. Monacolin K and citrinin contents of mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus* % (dry basis)

| Measurements | UFM ¹⁾ | FMM ²⁾ |
|--------------|-------------------|---------------------------|
| Monacolin K | | |
| Acid form | — | 0.047±0.08 ^{a3)} |
| Lactone form | — | 0.009±0.00 ^{b)} |
| Total | — | 0.056±0.01 ^{a)} |
| Citrinin | — | ND ⁴⁾ |

^{1,2)}See Fig. 1.

³⁾Values are mean±standard deviations of triplicate determinations, and different superscripts within a column (a,b) indicate significantly different at p<0.05.

⁴⁾Not detected.

미생물을 배양한 홍국제품에 대한 규격은 활성형과 비활성형을 합한 총 monacolin K의 함량을 0.05% 이상으로 규정하고 있다(40).

한편, 신장과 간에 대한 독성물질로 알려진 citrinin은 고체발효 시에도 생성될 수 있으며(41,42). 색도가 높고 적색색소의 생성량이 높을수록 함량이 높으며 주로 액침배양 시에 생성되는 것으로 알려져 있다(43,44). 그러나 *M. pilosus* IFO 4480을 이용하여 제조한 발효 뽕잎차에서는 검출되지 않았다.

WSS 및 ESS 함량

UFM과 FMM의 물가용성물질(WSS)과 70% ethanol 가용성 물질(ESS)의 함량을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. UFM의 WSS 함량(Fig. 2A)은 24.20%(w/w)인데 비하여 FMM에서는 28.25%(w/w)로 유의적인 차이를 나타내었으나, ESS 함량(Fig. 2B)은 UFM(12.03%, w/w)과 FMM(11.34%, w/w)과의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 따라서 뽕잎의 발효 중 비수용성 물질이 수용성으로 전환되는 것으로 사료된다.

색상

UFM과 FMM 1% 열수추출액의 색상을 비교한 결과는 Table 2와 같다. FMM에서는 UFM에 비하여 밝기를 나타내는 L*값과 황색도를 나타내는 b*값이 현저하게 감소하는 반면 적색도를 나타내는 a*값은 증가하였으며 H°은 27.17로 light yellow에서 dark red로 변화되었다. 이러한 현상은 차잎의 발효에서와 같이 뽕잎에도 catechin과 같은 polyphenol 성분들이 발효 중에 *M. pilosus*가 생성하는 효소에 의하여 산화, 중합되어 theaflavins 또는 thearubigins가 생성되는 것으로 생각된다(45).

관능적 품질

UFM과 FMM 1% 열수추출액을 이용하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 3과 같다. 감미와 산미는 1.25~1.85점으로 상호간의 차이를 보이지 않았다. 떫은맛은 UFM(2.43점)이 FMM(1.88점)에 비하여 수치적으로는 다소 높고 구수한

Table 2. Color of brewed mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*

| Measurements | UFM ¹⁾ | FMM ²⁾ |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|
| L* (lightness) | 64.00±0.21 ^{a3)} | 34.38±0.14 ^b |
| a* (redness) | 5.94±0.79 ^b | 24.35±0.39 ^a |
| b* (yellowness) | 34.26±0.29 ^a | 9.50±0.15 ^b |
| H° (hue angle) | 83.60±0.70 ^a | 27.17±0.15 ^b |

^{1,2)}See Fig. 1.

³⁾Values are mean±standard deviations of triplicate determinations, and different superscripts within a row (a,b) indicate significantly different at p<0.05.

Table 3. Sensory characteristics of brewed mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*

| Attributes | UFM ¹⁾ | FMM ²⁾ |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Sweet taste ³⁾ | 1.85±0.19 ^{NS10)} | 1.68±0.12 |
| Sour taste ⁴⁾ | 1.25±0.12 ^{NS} | 1.30±0.14 |
| Astringent taste ⁵⁾ | 2.43±0.25 ^{NS} | 1.88±0.24 |
| Savory taste ⁶⁾ | 3.45±0.21 ^{NS} | 3.66±0.28 |
| Flavor acceptability ⁷⁾ | 3.27±0.22 ^a | 2.75±0.25 ^b |
| Color acceptability ⁸⁾ | 3.02±0.17 ^b | 3.45±0.18 ^a |
| Overall acceptability ⁹⁾ | 3.05±0.26 ^b | 3.64±0.24 ^a |

^{1,2)}See Fig. 1.

³⁻⁶⁾Values are mean±standard deviation of 25 panels evaluated from very low (1 point) to very strong (5 points). Different superscripts at the same row (a-c) indicate significant differences (p<0.05).

⁷⁻⁹⁾Values are mean±standard deviation of 25 panels evaluated from very poor (1 point) to very good (5 points).

¹⁰⁾Different superscripts on the same row (a,b) indicate significant differences (p<0.05). NS: not significant.

맛은 UFM(3.45점)이 FMM(3.66점)에 비하여 낮은 것으로 나타났으나 상호 유의적인 차이를 보이지 않았다. 한편 색상과 종합적인 기호도에서는 FMM이 UFM에 비하여 높았다.

Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

UFM과 FMM의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량(dry basis)을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. FMM의 total polyphenol 함량은 23.61 mg/g(dry basis)으로 UFM의 83.10 mg/g(dry basis)의 28.41%에 불과하였으며, total flavonoid의 함량은 3.99 mg/g(dry basis)으로 UMM의 22.22%

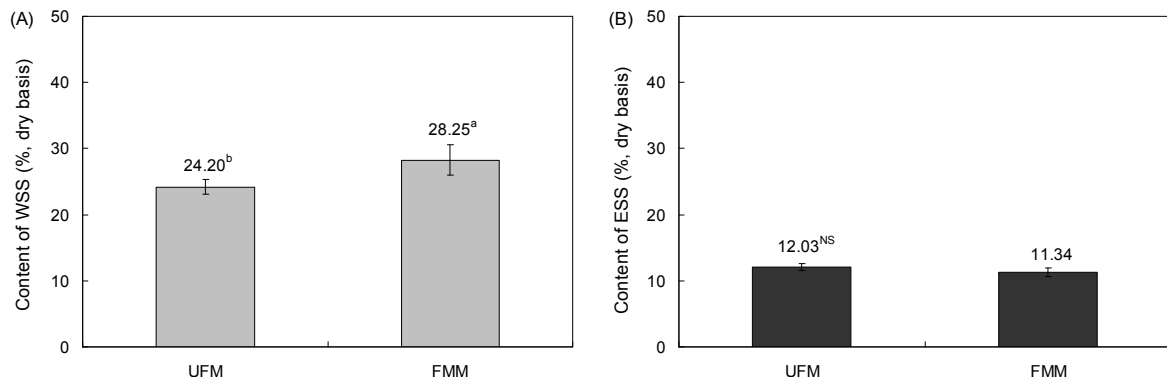


Fig. 2. Content of water soluble (WSS) (A) and 70% ethanol soluble solid (ESS) (B) of mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*. UFM and FMM: See Fig. 1. NS: not significant. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a,b) indicate significantly differences (p<0.05).

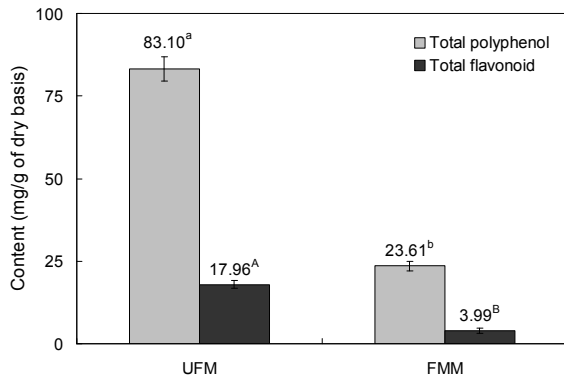


Fig. 3. Content of total polyphenol and total flavonoid of mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*. Abbreviations: See Fig. 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a,b and A,B) indicate significantly differences ($p<0.05$).

에 불과하여 발효과정에서 큰 폭으로 감소하였다. 이와 같은 현상은 차잎을 발효시켰을 때 polyphenol 성분이 산화되어 감소한다는 Zuo 등(46)의 결과와 유사하였다. 녹차를 홍차로 발효시키면 phytoenzyme의 산화작용으로 차에 존재하는 catechin이 산화 중합하여 일종의 색상성분인 theaflavins나 thearubins로 변화된다. 이와 같은 변화는 보이차와 같은 후발효차에서는 세균이나 곰팡이류의 효소에 의하여 이 같은 산화작용이 더욱 촉진되기 때문이라 생각된다(47). 발효병잎차에서 total polyphenol과 total flavonoid의 함량이 크게 감소하는 것은 이들 polyphenol 성분이 *M. pilosus*가 생성하는 효소류에 의하여 산화 또는 산화·중합되어 병잎차의 새로운 색소물질(Table 2)로 전환되기 때문이라 생각된다. Polyphenol은 항산화작용을 하는 등의 유익한 작용도 있으나 hydrogen peroxide와 같은 유독성 물질을 생성하는 것으로 보고되고 있다(48).

XO 저해활성

UFM과 FMM 70% ethanol 추출물의 XO 저해활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. UFM과 FMM 다 같이 농도 비례적으로 높아지는 경향을 나타내었으며 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 UFM은 51.82%, FMM은 46.36%의 저해활성을 나타내었다. XO는 XOR(xanthin oxidoreductase)의 oxidase type 효소로 생체 내에서 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 uric acid로 산화하는데 관여하며(49-51), 산소(O_2)를 전자수용체로 이용하여 ROS를 생성함으로써 지질의 과산화, 노화 등에 관여할 뿐만 아니라 각종 성인병 유발의 원인이 된다(52-54). 따라서 생체 내 XO의 활성을 저해시킬 수 있는 polyphenol 또는 flavonoid 등을 비롯한 각종 phytochemicals에 관한 연구가 다수 이루어지고 있으며, 그 저해활성은 이들 성분의 함량과 구조에 따라 차이를 보이는 것으로 알려져 있다(55-60). FMM의 polyphenol 및 flavonoid 함량이 UFM의 22.19~28.41%(Fig. 3)에 지나지 않음에도 XO 저해활성이 높게 나타나는 현상은 병잎의 발효에 의하여 새롭게

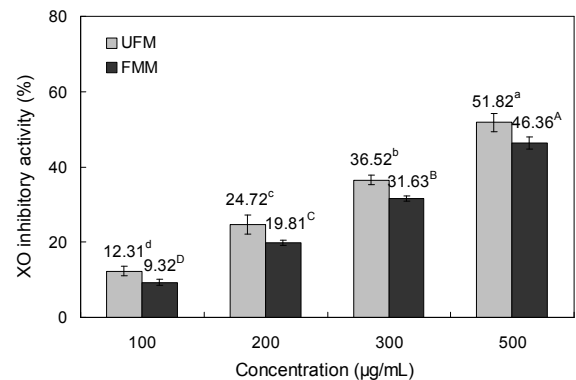


Fig. 4. Xanthine oxidase (XO) inhibitory activity of mulberry leaves tea fermented by *M. pilosus*. Abbreviations: See Fig. 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a-d and A-D) indicate significantly differences ($p<0.05$).

생성되는 성분과 더불어 *M. pilosus*가 생성하는 2차 대사산물에 의한 효과라 사료된다.

전자공여능 및 FRAP

전자공여능은 체내에서 ROS에 전자를 공여함으로써 산화를 막는 항노화 활성의 지표로 알려져 있으며(61). FRAP는 Fe^{3+} 이 Fe^{2+} 로 환원되는 능력을 측정함으로써 항산화 활성을 알 수 있는 항산화지표의 하나로 주로 phenolic acid 및 flavonoid 등 phenolic 물질의 항산화작용을 측정하는데 활용되고 있다(62). UFM과 FMM 추출물의 전자공여능과 FRAP를 조사한 결과는 Fig. 5 및 6과 같다. UFM과 FMM 모두 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며 전자공여능과 FRAP 모두 UFM의 경우가 FMM에 비하여 3.41~5.85배의 높은 활성을 보였다(Fig. 5). 이와 같은 현상은 발효에 의하여 항산화력이 높은 polyphenol 성분들이 크게 감소하는 반면 theaflavins 또는 thearubigins와 같은 polyphenol의 산화중합체가 생성되기 때문이라 해석된다(63).

FRAP(Fig. 6)의 경우 전자공여능과 유사한 경향으로 UFM의 경우가 FMM에 비하여 2.58~4.60배가 높았다. 일

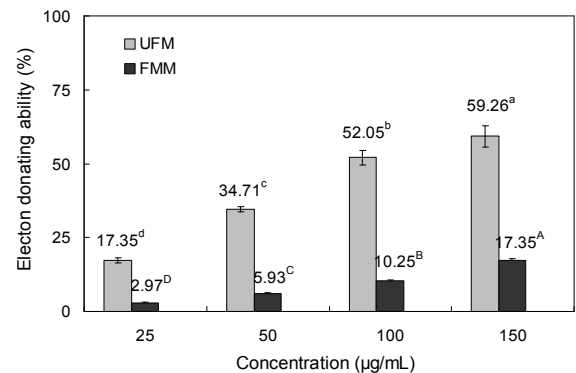


Fig. 5. Electron donating ability of mulberry leaves tea 70% ethanol extracts fermented by *M. pilosus*. Abbreviations: See Fig. 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a-d and A-D) indicate significantly differences ($p<0.05$).

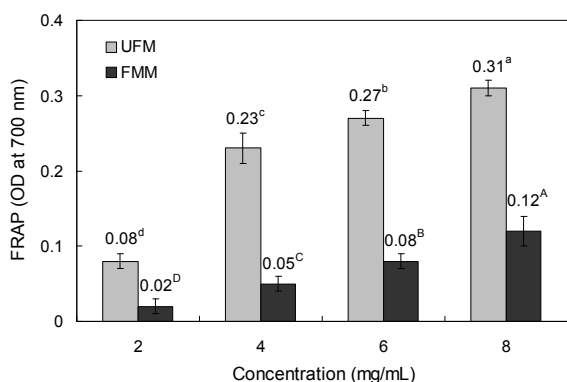


Fig. 6. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of mulberry leaves tea 70% ethanol extracts fermented by *M. pilosus*. Abbreviations: See Fig. 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a-d and A-D) indicate significantly differences ($p < 0.05$).

반적으로 phenolic 물질의 항산화능은 주로 환원력에 기인하며(64), 그 함량이 높을수록 항산화력이 증가한다(65). 그러나 한편으로는 phenolic 물질의 함량이 높을수록 강한 산화작용이 있는 hydrogen peroxide의 함량이 높고(66), 단백질 및 효소 등과 강하게 결합함으로써 소화작용이 떨어지는 등의 문제점이 있으나 발효차에서 느낄 수 있는 독특한 향미와 더불어 세계적인 선호도는 발효차가 비발효차에 비하여 높은 것으로 알려져 있다(67).

SOD 유사활성 및 ferrous iron chelating 활성

SOD는 superoxide를 과산화수소로 전환하는데 관여하는 효소이며, SOD 유사활성은 SOD와 같이 superoxide의 산화반응을 억제함으로써 생체를 보호하는 저분자의 phytochemicals로 알려져 있다(68). 또한, ferrous iron chelating 활성은 지질의 산화를 촉매 하는 전이금속 이온들과 결합하여 반응계로부터 제거됨으로써 간접적인 항산화 활성을 나타내며(69), 일반적으로 ferrozine과 ferrous ion의 chelating을 억제하는 정도를 측정한다(36,70).

Fig. 7에서는 UFM과 FMM 추출물에 대한 SOD 유사활성 및 ferrous iron chelating 활성을 조사하였다. UFM과

FMM 모두 농도에 비례하여 SOD 유사활성이 증가하는 경향을 나타내었으며, UFM이 FMM에 비하여 1.04~1.52배가 높은 활성을 나타내었다(Fig. 7A). Ferrous iron chelating 활성은 UFM과 FMM 추출물 모두 1~3 mg/mL에서는 농도에 비례하여 증가하는 경향이었으나 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였으며, 3 mg/mL에서의 활성은 UFM과 FMM이 각각 59.33% 및 54.91%로 유사한 값을 나타내었다(Fig. 7B).

요 약

*Monascus pilosus*에 의한 발효뽕잎차(FMM: fermented mulberry leaves tea)의 monacolin K 함량, citrinin의 유무, 관능적 품질, total polyphenol 및 total flavonoid의 함량, ROS 생성계 효소인 xanthine oxidase 저해활성 및 ROS 소거계 효소류의 활성을 건조뽕잎(UFM: unfermented mulberry leaves)과 비교하였다. FMM은 UFM에 비하여 색상 기호도 및 종합적 기호도가 유의적으로 높았다. FMM에 함유된 total monacolin K 함량은 0.056%(dry basis)로 활성형이 83.93%를 차지하였으며 citrinin은 검출되지 않았다. Total polyphenol과 total flavonoid의 함량 모두 UFM에서 현저히 높았다. XO 저해활성과 SOD 유사활성은 농도에 비례하여 높았으며 UFM이 FMM에 비하여 높았다. 전자공여능과 ferric-reducing antioxidant power(FRAP)의 경우도 UFM과 FMM 모두에서 농도에 비례하여 증가하였으나, UFM에서 FMM에 비하여 현저히 증가하였다. Ferrous iron chelating 활성의 경우에도 추출물의 첨가 농도에 비례하여 증가하였고 그 증가의 정도는 UFM이 FMM에 비해 더욱 강하게 나타났으나, 4.0 mg/mL 이상의 농도에서는 감소하였다. 한편 polyphenol 또는 flavonoid 함량 당의 XO 저해활성과 SOD 유사활성 및 FRAP는 FMM이 UFM에 비하여 현저하게 높았다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 뽕잎을 *M. pilosus*로 발효시킨 FMM은 홍국의 기능성을 가짐과 더불어 상당히 강한 항산화능과 기호성을 관찰할 수 있어 ROS로

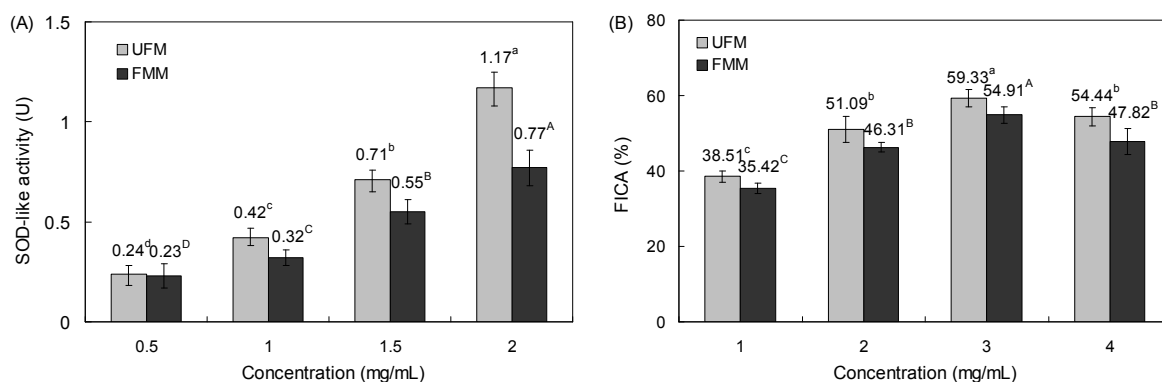


Fig. 7. SOD-like activity and ferrous iron chelating activity (FICA) of mulberry leaves tea 70% ethanol extracts fermented by *M. pilosus*. Abbreviations: See Fig. 1. Values are mean±standard deviations of triplicate determinations. Different superscripts on the same bars (a-d and A-D) indicate significantly differences ($p < 0.05$).

야기될 수 있는 여러 질병의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있는 기초자료가 될 것이라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 한국 농림수산식품부의 농림바이오기술 산업 화지원사업(810007-03-1-SU000)에 의해 수행되었습니다.

문 헌

- Kim HB, Lee YW, Lee WJ, Moon JY. 2001. Physiological effects and sensory characteristics of mulberry fruit wine with chongilppong. *Korean J Seris Sci* 43: 16-20.
- Lee IS, Lee SW, Lee IZ. 2003. Effect of tissue cultured ginseng on blood glucose and lipid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol* 35: 280-285.
- Chae JY, Lee JY, Hoang IS, Whangbo D, Choi PW, Lee WC, Kim JW, Kim SY, Choi SW, Rhee SJ. 2003. Analysis of functional components of leaves of different mulberry cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 15-21.
- Omori M, Yano T, Okamoto J, Tsushida T, Murai T, Higuchi M. 1987. Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Nogekagaku Kaishi* 61: 1449-1451.
- Tews JK. 1981. Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. *Life Sci* 29: 2535-2542.
- Bea MJ, Ye EJ. 2010. Antioxidant activity and in vitro anticancer effects of manufactured fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 796-804.
- Cho YJ, An BJ. 2008. Anti-inflammatory effect of extracts from Cheongmoksang (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide-stimulated Raw cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 44-48.
- Kim SY, Lee WC, Kim HB, Kim AJ, Kim SK. 1998. Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol induced hyperlipidemia in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1217-1222.
- Hansawasdi C, Kawabata J. 2006. α -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2. *Fitoterapia* 77: 568 - 573.
- Lim MJ, Bae YI, Jeong CH, Cho BR, Choi JS. 2007. Phytochemical components of mulberry leaf tea by different roasting processes. *J Agric Life Sci* 41: 17-24.
- Kim DC, In MJ, Chae HJ. 2010. Preparation of mulberry leaves tea and its quality characteristics. *J Appl Biol Chem* 53: 56-59.
- Bae MJ, Ye EJ. 2010. Analysis of active components and quality characteristics in the manufacturing of fermented mulberry leaf (*Morus alba*) tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 859-863.
- Kang OJ. 2010. Production of fermented tea with *Rhodotorula* yeast and comparison of its antioxidant effects to those of unfermented tea. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 422-427.
- Ma JY, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48: 220-225.
- Endo A. 1980. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot (Tokyo)* 33: 334-336.
- Choi MJ, Yu TS. 2004. Effects of red-yeast-rice supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 37: 423-430.
- Inoue K, Mukaiyama Y, Tsuji K, Tanabe N, Tarui S, Abe S, Takahashi M. 1995. Effect of beni-koji extracts on blood pressure in primary hypertensive volunteers. *Jpn J Nutr* 53: 263-271.
- Martinkova L, Patakova-Juzlova P, Krent V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, Prikrylova V. 1999. Biological activities of oligopeptide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* 16: 15-24.
- Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S, Takido M. 1996. Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 53: 247-249.
- Kang MR, Kim JY, Hyun YJ, Kim HJ, Yeo HY, Song YD, Lee JH. 2008. The effect of red-yeast-rice supplement on serum lipid profile and glucose control in subjects with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Korean J Nutr* 41: 31-40.
- Kim EY, Rhyu MR. 2008. Antimicrobial activities of *Monascus* koji extracts. *Korean J Food Sci Technol* 40: 76-81.
- Endo A. 1979. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)* 32: 852-854.
- Birch AJ, Cassera A, Fitton P, Holker JSE, Smith H, Tompson GA, Whalley WB. 1962. Studies in relation to biosynthesis. Part XXX. Rotiorin, monascin and rubropunctatin. *J Chem Soc* 3583-3587.
- Tsuji K, Ichikawa T, Tanabe N, Obata H, Abe S, Tarui S, Nakagawa Y. 1992. Extraction of hypotensive substance from wheat benzi-koji. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39: 913-918.
- Lee SI, Kim JW, Lee YK, Yang SH, Lee IA, Suh JW, Kim SD. 2011. Anti-obesity effect of *Monascus pilosus* mycelial extract in high fat diet induced obese rats. *J Appl Biol Chem* 54: 197-205.
- Lee SI, Kim JW, Lee YK, Yang SH, Lee IA, Suh JW, Kim SD. 2011. Protective effect of *Monascus pilosus* mycelial extract on hepatic damage in high-fat diet induced-obese rats. *J Appl Biol Chem* 54: 206-213.
- Roman K, Vladimir K. 1993. Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *J Chromatogr* 630: 415-417.
- Reinhard H, Zimmerli B. 1999. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J Chromatogr A* 862: 147-159.
- Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem* 82: 409-416.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
- Özer N, Müftüoğlu M, Ataman D, Ercan A, Ögüs IH. 1999. Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk. *J Biochem Biophys Methods* 39: 153-159.
- Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of

- a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
34. Martin JP, Dailey M, Sugarman E. 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255: 329-336.
 35. Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
 36. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315: 161-169.
 37. Juzlova P, Martinkova L, Kren V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J Ind Microbiol* 16: 163-170.
 38. Manzoni M, Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 555-564.
 39. Thomson PD, Clarkson P, Karas RH. 2003. Statin-associated myopathy. *JAMA* 289: 1681-1690.
 40. Pyo YH. 2006. Optimum conditions for production of mevinnolin from the soybean fermented with *Monascus* sp. *Korean J Food Sci Technol* 38: 256-261.
 41. Wang JJ, Lee CL, Pan TM. 2004. Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. *J Agric Food Chem* 52: 6977-6982.
 42. Chen F, Hu X. 2005. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *Int J Food Microbiol* 103: 331-337.
 43. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. 1995. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol Lett* 17: 291-294.
 44. Eisenbrand G. 2006. Toxicological evaluation of red mould rice. *Mol Nutr Food Res* 50: 322-327.
 45. Ngure FM, Wanyoko JK, Symon M, Mahungu SM, Shitandi AA. 2009. Catechins depletion patterns in relation to theaflavin and thearubigins formation. *Food Chem* 115: 8-14.
 46. Zuo YG, Chen H, Deng YW. 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57: 307-316.
 47. Michiharu A, Naohiro T, Yoshito I, Chihiro T, Takuji I, Kiyohiko N. 2008. Characteristic fungi observed in the fermentation process of Puer tea. *J Food Microbiol* 124: 199-204.
 48. Arakawa H, Maeda M, Okubo S, Shimamura T. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol Pharm Bull* 27: 277-281.
 49. Park GY, Lee SJ, Lim JG. 1997. Effects of green tea catechin on cytochrome P450, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 901-907.
 50. Parks DA, Granger DN. 1986. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 87-99.
 51. Roy R, McCord JM. 1982. Ischemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Fed Proc* 41: 767-773.
 52. Ham YK, Kim SW. 2004. Protective effects of plant extract on the hepatocytes of rat treated with carbon tetrachloride. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1246-1251.
 53. Hashim MS, Lincy S, Remya V, Teena M, Anila L. 2005. Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chem* 92: 653-660.
 54. Lee F. 1991. Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Rad Biol* 11: 463-494.
 55. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. 1988. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 51: 345-348.
 56. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Ikegami Y, Matsuda M, Yazaki K, Agata I, Nishibe S, Noro T, Yoshizaki M. 1991. Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Plant Med* 57: 83-84.
 57. Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1993. Inhibitory effect of condensed tannins isolated from Korean green tea against xanthine oxidase. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 418-422.
 58. Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 167-172.
 59. Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 451: 111-118.
 60. Da Silva SL, Da Silva A, Honório KM, Marangoni S, Toyama MH, Da Silva ABF. 2004. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J Mol Struct (Theochem)* 684: 1-7.
 61. Choi CH, Song ES, Kim SJ, Kang MH. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216-1220.
 62. Torel J, Gillard J, Gillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 25: 383-385.
 63. Sang S, Tian S, Jhoo JW, Wang H, Stark RE, Rosen RT, Yang CS, Ho CT. 2003. Chemical studies of the antioxidant mechanism of theaflavins. Radical reaction products of theaflavin 3,3'-digallate with hydrogen peroxide. *Tetrahedron Lett* 44: 5583-5587.
 64. Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 241-251.
 65. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. 2002. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int* 35: 207-211.
 66. Zhang L, Ma ZZ, Che YY, Li N, Tu PF. 2010. Protective effect of a new amide compound from Pu-erh tea on human micro-vascular endothelial cell against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Fitoterapia* 82: 267-271.
 67. Choi SW, Kang WW, Chung SK, Cheon SH. 1996. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. *Food Sci Biotechnol* 5: 119-123.
 68. Shin SR, Hong JY, Nam HS, Yoon KY, Kim KS. 2006. Antioxidative effects of extracts of Korean herbal materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 187-191.
 69. Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem* 83: 85-92.
 70. Elmastas M, Gulcin I, Isildak O, Kufrevioglu OI, Ibaoglu K, Aboul-Enein HY. 2006. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *J Iran Chem Soc* 3: 258-266.