

## Biological activity and analysis of $\alpha$ -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine

Woo-Rim Son<sup>1</sup>, Sang-Won Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Technical Convergence Team, Biohelath Convergence Center of Daegu Techno-Park, Daegu 704-801, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

### 오디와인의 생리활성 및 $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분석

손우림<sup>1</sup> · 최상원<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대구테크노파크바이오헬스융합센터, 기술융합팀

<sup>2</sup>대구가톨릭대학교 식품영양학과

#### Abstract

Wine extracts of four different berry fruits, such as mulberry, blueberry, strawberry, and raspberry, were investigated for antioxidant, anti-tyrosinase, and  $\alpha$ -glucosidase activities by using in vitro assays. Additionally, quantitative changes of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor in mulberry wine were determined by HPLC according to mulberry cultivars and fermentation process. Among four berry wines examined, mulberry wine showed the most potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with 69.37% at 0.23 mg/mL, while blueberry and strawberry wines exhibited the strongest inhibition against DPPH radical and tyrosinase activity, respectively. Four compounds were isolated and purified from mulberry wine by a series of isolation procedures, such as solvent fractionation, and Diaion HP-20, ODS-A, and Sephadex LH-20 column chromatographies. Among them, Comp. 4 exerted the strongest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity ( $IC_{50}$ =31.57  $\mu$ M), and its chemical structure was identified as quercetin by UV and NMR spectral analysis. Finally, the "Daeseongppong" (16.83 ppm) mulberry wine had larger amount of quercetin than the "Iksuppong" (14.85 ppm) and "Cheongilppong" (8.92 ppm) mulberry wines, but their contents of three mulberry wines decreased considerably with aging process. These results suggest that mulberry wine containing quercetin acted as  $\alpha$ -glucosidase inhibitor may be useful as a potential functional wine for improving diabetic disorder.

Key words : mulberry (*Morus alba* L.) wine,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, quercetin, quantification, fermentation

#### 서 론

오디는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로서 한방에서는 '상삼자'로 불린다. 동의보감에서 오디는 '소갈증을 낮게 하고 오장을 편안하게 하며, 오래 먹으면 백발이 검게 변하고 노화를 방지한다'고 기록되어 있고, 본초강목에서는 '오디는 혼을 안정시키고 정신을 진정시킨다' 라고 적혀져있다(1).

오디는 유리당, 유기산 및 무기질이 풍부할 뿐 아니라 항산화성 안토시아닌 색소, 항고혈압성분의  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA), rutin과 항당뇨성분인 1-deoxyojirimycin

(DNJ), 및 moracin 유도체, 그리고 항암, 항고혈압, 항염증, 항산화, 및 피부탄력증진물질로 알려진 resveratrol이 함유되어 있어 웰빙건강식품으로서 크게 각광을 받고 있다(2,3). 그러나 기능성이 우수한 오디는 같은 베리류 과일인 딸기, 복분자, 블랙베리, 및 블루베리에 비해 생산량이 많지 않아 판매 단가가 높고 풀내음 및 비린내 같은 바람직하지 못한 향기 때문에 오디가공품의 개발이 미흡하여 국내 오디 생산 농가 및 가공업체는 판로에 큰 어려움을 겪고 있어 오디를 대량 소비할 수 있는 고부가가치 가공식품의 개발이 요구되고 있다(4,5).

과실은 발효가 되면 새로운 맛과 향이 생성되어 기호성이 증가할 뿐 아니라 과실 자체가 지니고 있는 고분자물질이 저분자물질로의 전환에 따라 생리활성이 증가하며, 생

\*Corresponding author. E-mail : swchoi@cu.ac.kr  
Phone : 82-53-850-3525, Fax : 82-53-850-3525

체 내 흡수가 용이해지기 때문에 감, 복분자 및 자두와인과 같은 기능성 과실와인의 개발이 붐물을 이루고 있다(6-8). 특히 포도과에 존재하는 *trans-resveratrol* 성분이 항고혈압 및 항산화작용에 있어 심장질환의 예방효과가 있으며(9), 최근에는 elderberry 와인이 항산화, 항암 및 항고혈압성 플라보노이드 및 시남산유도체가 있어 건강에 유익하다고 보고된 바가 있다(10) 또한, 과실주의 중요한 향기성분인 farnesol은 항암, 항종양 물질로 우리나라의 대표적 전통주인 막걸리에 함유되어 있음이 보고되면서 막걸리의 소비가 크게 증가하고 있다(11). 이와 같이 과실와인의 우수한 기능성물질의 분석 및 생리활성 효능을 밝히는 연구는 과실와인의 산업화 및 상업화 뿐만 아니라 대중화를 이루기 위해서는 필수적이다. 지금까지 오디와인의 제조 및 이화학적 품질 특성에 관한 다수의 연구가 보고된 바 있으나 (12-14) 아직까지 오디와인의 생리활성 및 기능성물질 분석에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 식생활의 서구화로의 변모와 비만인구의 증가로 당뇨병자가 급격히 증가하면서 사회 문제가 되고 있다.  $\alpha$ -Glucosidase는 장의 말단에 존재하는 당분해효소로서 그 저해제는 탄수화물의 포도당으로 소화를 지연시킴으로써, 결국 식후의 혈당치를 감소시키는 역할을 한다(15). 지금까지 식물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분리 및 동정에 관한 연구가 보고되어져 왔으며(16), 특히 누에의 1-deoxynojirimycin (DNJ) 성분은  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 잘 알려져 있고(17), 그 외에도 acarbose 및 voglibose 등의 합성저해제도 시판되고 있다(18).

따라서 본 연구에서는 오디와인의 기능성 탐색 연구의 일환으로 4가지 베리류 과실(오디, 블루베리, 딸기, 복분자) 와인의 항당뇨, 항노화, 및 항산화활성을  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase 및 DPPH radical를 이용하여 측정 후 그 중  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 가장 높은 오디와인으로부터 효소 저해제를 분리 및 동정하였으며, 아울러 뽕나무 품종 및 발효에 따른 오디와인에 함유된 효소저해제의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 오디와인을 포함한 4가지 베리류 과실(오디, 블루베리, 딸기, 복분자)와인은 2011년 (주)한국와인에서 제조한 와인(알코올 12~15%)을 사용하였다. 한편, 오디와인으로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분리, 정제 및 동정 그리고 품종에 따른 효소저해제의 함량을 조사하기 위해 2011년 6월 초순경 영천, 영덕 및 상주에서 각각 수확한 3가지 뽕나무 품종(익수뽕, 대성뽕, 청일뽕)의 오디를 사용하여 오디와인을 제조하여 공시재료로 사용하였다.

### 시약 및 크로마토그래피용 충전제

본 실험에 사용한  $\alpha$ -glucosidase, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(*p*-NPG), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxy-phenyl alanine (L-DOPA)은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고  $\alpha$ -glucosidase 저해제를 분리 및 정제하기 위한 column chromatography용 충전물질로 Diaion HP-20 resin(Mitsubishi Chem, Co., Tokyo, Japan), ODS-A gel(12 nm, 150  $\mu$ m, YMC Inc., MA, USA) 및 Sephadex LH-20(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하였다. 다음, NMR 측정용 CD<sub>3</sub>OD는 Merck(Darmstadt, Germany)사 제품을 사용하였으며, 와인 제조용 효모는 Fermivin (Anchor Yeast, South Africa) 제품을, 그리고 설탕은 삼양사(Samyang Co., Incheon, Korea) 제품을 시중에서 구입하여 각각 사용하였다. 효소저해제 함량 분석을 위한 시약은 HPLC급(Merck, Darmstadt, Germany) 또는 분석용 특급을 사용하였으며, 그 외 측정용 1급 시약을 각각 사용하였다.

### 오디와인의 제조

오디와인으로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 추출 및 분리하기 전에 오디와인의 제조는 익수뽕, 대성뽕 및 청일뽕 오디를 각각 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 선별된 건전한 생오디(10 kg)에 100 ppm 메타중아황산칼륨(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 10 L 가하여 직접 손으로 파쇄하고 여기에 당도 24 °Brix의 1/2에 해당하는 설탕과 구연산(citric acid)을 가하여 pH를 3.8로 조절하여 1일간 상온에서 방치하였다(이때 착즙한 오디파쇄액을 must라 한다). 다음, 원료 중량의 0.05%에 해당하는 효모를 가하여 20±2°C 발효실에서 7일간 1차 발효한 다음 가재로 착즙하였다. 다음, 이 착즙액에 나머지 절반의 설탕을 첨가하여 2차 가당한 후 에어락(airlock)이 설치된 카보이(carboy)에 옮기고 같은 온도에서 2차 발효를 2개월간 실시하였다. 2차 발효 후 카보이 밑에 침전한 잔사를 제거하기 위해 racking 처리한 후 sheet filter를 사용하여 여과한 다음 발효오디와인을 제조하였다. 제조된 오디와인을 병입한 후 18±2°C에서 1년간 숙성하여 최종의 숙성 오디와인을 제조하였다.

### 4가지 베리류 과실와인의 생리활성 측정(*in vitro*)

4가지 베리류 과실(오디, 블루베리, 딸기, 복분자)와인의 생리활성 측정을 위해 먼저 각 와인 100 mL를 취한 후 rotary vacuum evaporator(N-N series, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C 이하에서 감압·농축한 다음 10% 에탄올수용액으로 100 mg/mL의 농도가 되도록 용해하여 생리활성 측정용 시료로 사용하였다. 오디와인으로부터 분리한 분획과 물질의 생리활성 측정 또한 위와 동일한 방법으로 제조하여 사용하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

4가지 베리류 과실와인과 오디와인으로부터 분리한 분획 및 물질의 항당뇨 활성은 Park 등의 방법(19)을 변형하여 기질과 효소반응을 이용한 분광학적방법으로 저해율을 측정하였다. 즉, 2 U/mL  $\alpha$ -glucosidase 50  $\mu$ L에 시료 용액 또는 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 10  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 5분간 반응시킨 후, 반응기질인 5 mM p-NPG 50  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 기질인 p-NPG로부터 유리되어 나오는 생성물인 p-nitrophenol을 측정하였다. 이때  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 다음 식에 따라 계산하였다. 저해율(%)=(1-A/B)×100, A: 시료 흡광도, B: 대조구 흡광도. 여기서 시료를 넣지 않은 대조구를 함께 측정하여 시료의 상대적인  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 후 회귀분석에 의해 산출된 IC<sub>50</sub>값( $\alpha$ -glucosidase 활성을 50% 저해하는 시료의 농도)을 나타내었다.

### DPPH radical 포착활성 측정

시료들의 항산화 작용은 Tagashira 등의 방법(20)을 변형하여 DPPH에 대한 전자공여 효과로 각 시료의 활성을 측정하였다. 즉, 0.1 mM DPPH를 함유한 메탄올 용액 2 mL에 시료 용액(4가지 베리류 과실와인) 0.1 mL를 가해 vortex하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 DPPH 라디칼 소거활성은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성의 계산방법과 동일하게 실시하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

시료들의 항노화 작용은 Choi 등의 방법(21)에 따라 mushroom tyrosinase(1,380 u/mL)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 효소활성의 측정은 0.1 M sodium phosphate buffer 500  $\mu$ L(pH 6.8), 증류수 450  $\mu$ L, 추출물 50  $\mu$ L, tyrosinase 50  $\mu$ L 순차적으로 첨가한 후 기질인 2.5 mM L-DOPA 500  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 1분간 반응시키고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성의 계산방법과 동일하게 실시하였다.

### 오디와인으로부터 $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분리 및 정제

오디와인으로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분리 및 정제는 Fig. 1과 같이 실시하였다. 오디와인(10 L)을 감압농축하여 오디와인추출물을 제조한 후 이를 다시 10% 에탄올수용액(500 mL)에 용해한 다음 여기에 ethyl acetate(EtOAc, 1 L) 가하여 2회 연속 분획한 후 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 탈수한 다음 감압농축하여 EtOAc 분획물(19.8 g)을 얻었다. 다음, EtOAc 분획물(19.8 g)을 20% 에탄올수용액으로 현탁시킨 후 미리 20% 에탄올수용액으로 평형화시켜 놓은 Diaion HP-20 column(6 cm×40 cm)에 충전시킨 다음 20%, 40%,

60%, 및 80% 에탄올수용액(각 4 L)으로 각각 순차적으로 용출시켰다. 각 분획의 용출액을 감압농축하여 4가지 분획물 즉, 20% aq. EtOH fr.(17.26 g), 40% aq. EtOH fr.(8.25 g), 60% aq. EtOH fr.(1.83 g), 및 80% aq. EtOH fr.(0.55 g)을 각각 얻었다. 다음, 앞서 분리된 4 개의 분획물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 결과, 80% 에탄올수용액의 분획이 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Table 3). 따라서 80% 에탄올분획물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제를 분리하기 위해 ODS-A column chromatography를 다음과 같이 실시하였다. 미리 40% 에탄올수용액으로 평형화시켜 놓은 ODS-A column(3 cm×38 cm)에 시료를 충전시킨 후 40% 에탄올수용액을 이동상으로 하여 튜브당 2 mL씩 100개 분획으로 나누어 용출하였다. 다음, 분리된 분획의 흡수스펙트럼은 UV-vis spectrophotometer(S-3100, Scinco Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정한 후 흡수스펙트럼이 동일한 분획을 모아 4가지 분획물(Fr. 1: 8.5 mg, Fr. 2: 119.2 mg, Fr. 3: 28.4 mg, Fr. 4: 80.3 mg)을 얻었으며, 위와 동일하게 효소저해활성을 측정하여 저해활성이 가장 높은 Fr. 4를 마지막으로 90% 에탄올수용액으로 Sephadex LH-20 column(2.5 cm×48 cm) chromatography를 실시하여 약간 노란색의 무정형 화합물(80.3 mg)을 최종 분리 및 정제하였다.

Mulberry wine (10 L)

partitioned with EtOAc  
evaporated in vacuum

EtOAc fr. (19.8 g)

dissolved in 20% aq. EtOH

Diaion HP-20 column chromatography

eluted successively with 20%, 40%, 60% & 80% aq. EtOH

20% EtOH fr. (17.26 g)    40% EtOH fr. (8.25 g)    60% EtOH fr. (1.83 g)    80% EtOH fr. (0.55 g)

ODS-A column chromatography

eluted with 40% aq. EtOH

Fr. 1 (8.5 mg)    Fr. 2 (119.2 mg)    Fr. 3 (28.4 mg)    Fr. 4

Sephadex LH-20 chromatography

eluted with 90% aq. EtOH

Quercetin (80.3 mg)

**Fig. 1. Schematic procedure for isolation and purification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from mulberry wine.**

### $\alpha$ -Glucosidase 저해제의 화학구조 동정

오디와인으로부터 분리된  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 구조 분석을 위해 먼저 자외선(UV) 흡수스펙트럼을 조사하였다. 분리한 모든 화합물을 메탄올에 용해한 다음 UV-vis

spectrophotometer를 사용하여 200 nm~600 nm 영역에서 scanning하여 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ )을 조사하였다. 또한, 오디와인으로부터 분리된 화합물의  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)과  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 분석은 Varian Unity Plus 400 spectrometer(Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 상온에서 측정하였으며, 이 때 시료는  $\text{CD}_3\text{OD}$ 에 용해하였다. 그리고 tetramethylsilane(TMS)을 내부 표준물질로 첨가하여 시료의 화학적 이동값을  $\delta$ 치(ppm)로 나타내었다.

#### 품종 및 발효에 따른 오디와인의 $\alpha$ -glucosidase 저해제 함량 측정

뽕나무 품종별 및 발효시기별 오디와인의  $\alpha$ -glucosidase 저해제 함량을 측정하기 위해 앞서 조제된 오디와인(50 mL)에 에틸아세테이트(100 mL)를 가하여 2회 연속 분획한 후 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 가하여 탈수한 다음 이를 감압·농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 얻어진 에틸아세테이트 분획물을 100% 메탄올에 용해한 후 같은 용매로 적절히 희석한 다음 membrane filter(0.45  $\mu\text{m}$ , 13 mm, Pall Gelman Lab., MI, USA)를 통과시킨 후 HPLC로  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 함량을 측정하였으며, 이때 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 칼럼: YMC-Pack Pro  $\text{C}_{18}$  column(5  $\mu\text{m}$ , 46 $\times$ 250 mm, YMC Inc., USA), 용매: 용매 A(0.05%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) & 용매 B( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 1 : 1 : 1.15$ , v/v/v)(linear gradient elution from A to B for 65 min), 유속: 0.8 mL/min, 주입량: 10  $\mu\text{L}$ , 검출기: 자외선(UV<sub>350nm</sub>). 이때  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 앞서 분리한 것의 retention time과 비교하여 확인하였으며, 저해제의 calibration curve ( $y=3.6846x-1.4517$ ,  $r^2=0.998$ )를 농도로 별로 작성한 다음 그로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 함량을 계산하였다.

#### 통계처리

본 실험 결과들은 3회 반복 측정한 후 SAS package (release 8.01 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)(22)를 사용하여 평균 $\pm$ 표준편차를 구하였으며, 각 실험을 3회 측정 후 얻어진 결과를 이용하여 회귀분석그래프를 작성하고  $\text{IC}_{50}$ 치를 구하였다. 그리고 각 시료 data의 유의성 검증은 일원분산분석(ANOVA)을 이용하여  $p<0.05$  수준에서 다중 범위검증(Duncan's multiple range test)를 실시하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

#### 4가지 베리류 과실와인의 생리활성 비교

4가지 베리류 과실(오디, 블루베리, 딸기, 복분자)와인의 생리활성 즉, 항당뇨, 항산화 및 항노화 활성을  $\alpha$ -glucosidase, DPPH 및 tyrosinase를 각각 이용하여 측정된 결과는 Table

1과 같다. 먼저 4가지 베리류 과실와인의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 0.23 mg/mL 농도에서 측정한 결과, 오디와인이 69.37%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 블루베리와 인(22.28%) > 딸기과인(15.11%) > 복분자와인(10.28%) 순으로 낮게 나타났다. 다음, DPPH 라디칼을 이용한 항산화 활성은 0.24 mg/mL 농도에서 블루베리와인이 64.57%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 오디와인(62.48%) > 복분자와인(40.66%) > 딸기과인(35.70%) 순으로 낮게 나타났다. 한편, tyrosinase 저해활성은 10 mg/mL 농도에서 딸기과인(59.63%)이 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 블루베리와인(48.03%) > 복분자와인(33.49%) > 오디와인(24.99%) 순으로 낮게 나타났다. 이와 같이 4가지 베리류 과실와인 중 오디와인이 tyrosinase 저해활성은 낮지만 항당뇨 및 항산화 활성이 큰 것을 알 수 있었으며, 특히  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 블루베리와인의 3.1배, 딸기과인의 4.6배 및 복분자와인의 6.7배로 아주 높게 나타났다. 따라서 오디와인은 다른 베리류 과실와인보다 항당뇨 활성이 높음을 알 수 있었다. 지금까지 보고된 베리류 과실의 기능성성분 및 생리활성에 관한 연구를 보면 딸기는 비타민 C 및 플라보노이드 성분이 주된 생리활성물질로 보고된 바가 있으며, 복분자는 triterpenoid 및 플라보노이드 성분이, 블루베리 및 블랙베리는 proanthocyanidin 및 anthocyanin 성분(23,24), 그리고 오디는 anthocyanin, flavonoid, resveratrol 및 moracin 성분이 함유된 것으로 보고되어 있다(2,3). 따라서 블루베리의 높은 항산화활성은 오디보다 많은 항산화성 anthocyanin 색소에 의한 것으로 생각되며, 딸기의 강한 tyrosinase 저해활성은 비타민 C에 기인된 것으로 생각된다. 반면, 오디의 강한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 아마도 오디에 함유된 항당뇨 성분인 flavonoid 및 moracin 성분에 기인된 것으로 사료된다.

**Table 1. Comparison of biological activity of four different berry wines**

Berry wine	Inhibition (%)		
	$\alpha$ -Glucosidase <sup>1</sup>	DPPH radical <sup>2</sup>	Tyrosinase <sup>3</sup>
Mulberry	69.37 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	62.48 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	24.99 $\pm$ 2.73 <sup>d</sup>
Blueberry	22.28 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	64.57 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	48.03 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>
Strawberry	15.11 $\pm$ 1.05 <sup>c</sup>	35.70 $\pm$ 0.25 <sup>d</sup>	59.63 $\pm$ 3.08 <sup>a</sup>
Raspberry	10.28 $\pm$ 0.59 <sup>d</sup>	40.66 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>	33.49 $\pm$ 1.46 <sup>c</sup>

Values are mean $\pm$ SD of triplicate analyses.

Values with different superscript in columns are significantly different at  $p<0.05$

<sup>1</sup>Sample concentration: 0.23 mg/mL

<sup>2</sup>Sample concentration: 0.24 mg/mL

<sup>3</sup>Sample concentration: 10 mg/mL

#### 오디와인으로부터 $\alpha$ -glucosidase 저해제의 분리·정제 및 동정

앞서 4가지 베리류 과실와인 중  $\alpha$ -glucosidase 저해활성

이 가장 강한 오디와인으로부터 효소저해제를 분리하기 위해 Fig. 1과 같이 오디와인을 EtOAc 용매분획 후 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 4가지 에탄올분획(20% aq. EtOH, aq. 40% EtOH, aq. 60% EtOH 및 80% aq. EtOH fr)을 얻었으며, 이중 80% aq. EtOH 분획(70.22%)이 가장 강한 효소 저해활성을 나타내었다(Table 1). 다음, 80% aq. EtOH 분획을 ODS-A 및 Sephadex LH-20 column chromatographies를 순차적으로 실시하여 4가지 분획들을 분리 및 정제하였으며, 그들의 효소 저해활성을 측정된 결과, Table 2와 같이 Fr. 4(IC<sub>50</sub>=0.02 mg/mL)가 가장 강한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었으며, 그 다음으로 Fr. 2(IC<sub>50</sub>=1.93 mg/mL) > Fr. 1(IC<sub>50</sub>=3.03 mg/mL) > Fr. 3(IC<sub>50</sub>=4.45 mg/mL) 순으로 낮게 나타났다.

**Table 2. Inhibitory activities of  $\alpha$ -glucosidase of four solvent fractions isolated by Diaion HP-20 column chromatography from mulberry wine**

Solvent fraction	$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity (%)
20% EtOH fr.	9.40±0.10
40% EtOH fr.	11.04±0.13
60% EtOH fr.	38.39±0.19
80% EtOH fr.	70.22±0.35

Values are mean±SD of triplicate analyses.

<sup>1</sup>Sample concentration: 0.1 mg/mL

#### $\alpha$ -Glucosidase 저해제의 화학구조 동정

오디와인으로부터 분리된 4가지 화합물 중  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 가장 강한 분획 4의 화학구조를 동정하기 위해 먼저 UV 흡수스펙트럼을 측정된 결과, 254 nm와 364 nm에서 최대 흡수파장과 310 nm 부근에서 shoulder를 나타내었기에 본 화합물은 flavonol 화합물로 추정되었다(25). 다음, 분획 4의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 측정된 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이  $\delta$ 6.81(H, d, J=8.5 Hz, H-5'),  $\delta$ 7.40(H, dd, J=2.0 & 8.5 Hz, H-6'), 및  $\delta$ 7.47(H, d, J=2.0 Hz, H-2')에서 flavonoid 화합물 benzene B ring의 ABX system을 나타내는 3가지 aromatic proton과  $\delta$ 6.15(H, d, J=2.0 Hz, H-6) 및  $\delta$ 6.35(H, d, J=2.0 Hz, H-8)에서 benzene A ring의 2 개의 meta-coupled doublet proton을 각각 확인할 수 있었다. 다음, <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 관찰한 결과,  $\delta$ 145.1(C-3') 및  $\delta$ 147.7(C-4')에서 benzene B ring의 2 개의 hydroxyl group을 가진 탄소 signal과,  $\delta$ 156.2(C-9), 160.8(C-5) 및 164.0(C-7)에서 benzene A ring의 3 개의 hydroxyl group을 가진 탄소 signal들을 각각 확인할 수 있었고, 그 외  $\delta$ 93.5(C-8), 98.3(C-6), 103.1(C-10), 115.2(C-2'), 115.7(C-5'), 120.1(C-6'), 122.1(C-1')에서 flavonol 특유의 탄소 signal 분리패턴을 나타내었다. 이와같이 자외선 흡수스펙트럼과 <sup>1</sup>H- & <sup>13</sup>C-NMR spectra 분석결과로부터 분획 4는 quercetin임을 쉽게 확인

**Table 3. Yields and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of four isolated fractions isolated from mulberry wine**

Compound	Yield (mg/10 L)	$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Fr. 1	8.5	3.03±0.22
Fr. 2	119.2	1.93±0.12
Fr. 3	28.4	4.45±0.31
Fr. 4	80.3	0.02±0.01

Values are mean±SD of triplicate analyses.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

IC<sub>50</sub> represents the concentration of a compound required for 50% inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity.

**Table 4. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectral data of quercetin isolated from mulberry wine**

Position	Fr. 4
<sup>1</sup> H-NMR	
6	6.15 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0)
8	6.35 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0)
2'	7.47 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0)
5'	6.81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.5)
6'	7.40 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0 & 8.5)
<sup>13</sup> C-NMR	
2	146.9
3	135.8
4	175.9
5	160.8
6	98.3
7	164.0
8	93.5
9	156.2
10	103.1
1'	122.1
2'	115.2
3'	145.1
4'	147.7
5'	115.7
6'	120.1

Chemical shift in  $\delta$  ppm, coupling constant (*J*) expressed in Hz in parenthesis and measured in the solvent CD<sub>3</sub>OD, Taking TMS as an internal standard.

할 수 있었다. 최근 본 연구진들은 뽕나무 열매 오디 및 오디씨로부터 여러 quercetin glycoside 및 aglycone을 분리 및 동정한 바가 있으며, 특히 오디에는 quercetin 배당체가 많이 존재하는 것으로 보고된 바가 있다(26,27). 그러나 오디와인에서 quercetin을 분리 및 동정된 것은 처음이며, 특히 오디와인의 항당뇨 활성의 주된 물질이 quercetin임을

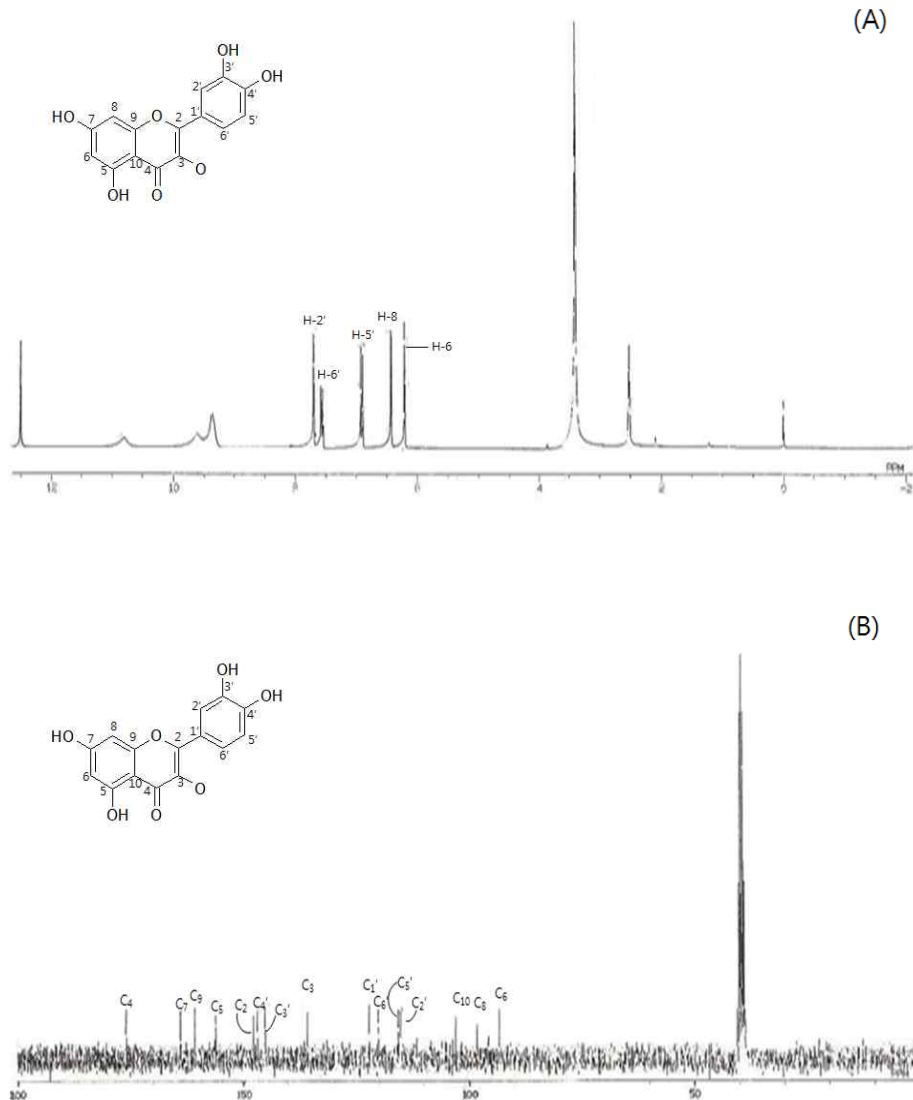


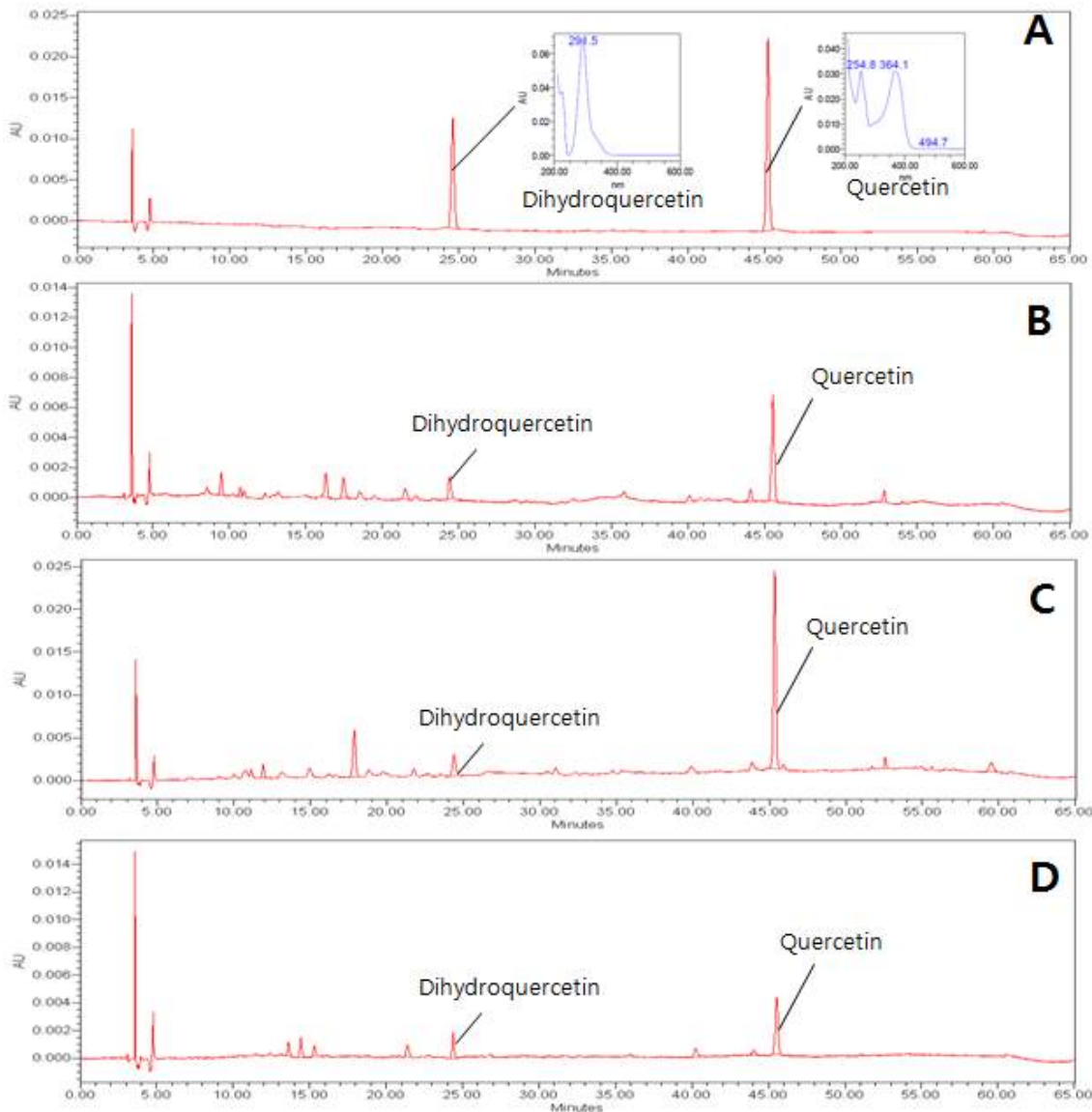
Fig. 2. <sup>1</sup>H-(A) and <sup>13</sup>C-(B)NMR spectra of quercetin isolated from mulberry wine.

밝힌 연구는 본 연구가 처음이다. 이러한 결과는 두층있으므로부터 분리한 α-glucosidase 저해제의 주된 물질이 quercetin 이라고 보고한 것과 유사하였으며, quercetin 유도체 중 아글리콘이 배당체보다 효소 저해활성이 강한 사실을 확인할 수 있었다(28). 또한 quercetin과 구조가 유사한 dihydroquercetin도 비록 quercetin보다 효소 저해활성이 낮았으나(data not shown), 다른 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서는 dihydroquercetin이 항당뇨 성분으로 보고한 바가 있다(30). 따라서 오디와인은 항당뇨 성분의 quercetin 및 그 유도체가 다량 존재하기에 당뇨병을 예방하는 기능성 와인으로 개발할 가치가 있다고 생각된다.

#### 품종 및 발효시기에 따른 오디와인의 α-glucosidase 저해제 함량 변화

뽕나무 품종별 및 발효시기별 오디와인의 α-glucosidase

저해제로 작용하는 quercetin 함량을 측정된 결과는 Table 5와 같다. 여기서 뽕나무 품종별, 즉 익수뽕, 대성뽕 및 청일뽕 오디와인으로부터 각각 얻어진 EtOAc 분획물의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 먼저 3가지 뽕나무 품종별로 제조된 오디와인의 quercetin 함량을 비교한 결과, Table 5와 같이 발효전 오디추출액(must)의 quercetin 함량은 익수뽕 4.90 ppm, 대성뽕 9.20 ppm, 및 청일뽕 2.20 ppm으로서 대성뽕이 가장 높았다. 다음, 발효가 된 익수뽕, 대성뽕 및 청일뽕 오디와인에서의 quercetin 함량은 각각 14.85, 16.83 및 8.92 ppm이었으나 발효가 진행됨에 따라 3 가지 오디와인의 quercetin 함량은 감소하였으며, 특히 1년 숙성한 오디와인의 quercetin 함량을 측정된 결과, 익수뽕 1.56 ppm, 대성뽕 4.64 ppm, 및 청일뽕 1.03 ppm로서 오디와인 숙성에 따라 모두 감소함을 알 수 있었다. 이와같이 뽕나무 품종 및 발효에 따른 오디와인



**Fig. 3.** HPLC chromatograms of two standards (A), dihydroquercetin and quercetin, and ethyl acetate fractions from the “Iksuppong” (B), “Daesung-ppong” (C) and “Cheongilppong” (D) wines.

HPLC chromatograms were detected at 350 nm.

**Table 5. Quantitative changes of quercetin in three mulberry wines according to fermentation process**

Cultivar	Fermentation time	Quercetin (ppm)
Iksu ppong	Must	4.90±0.20
	Fermented wine	14.85±2.10
	Aged wine	1.56±0.19
Daesung ppong	Must	9.20±0.45
	Fermented wine	16.83±2.31
Cheongil ppong	Must	2.20±1.13
	Fermented wine	8.92±0.32
	Aged wine	1.03±0.09

Values are mean±SD of triplicate analyses.

Standard deviations and statistical analysis are omitted for simplicity.

quercetin 함량의 차이를 확인할 수 있었으며, 발효 중 오디 와인의 quercetin 함량의 증가 후 감소 현상은 다른 과실와인의 발효 및 숙성 중 폴리페놀화합물의 함량 변화와 유사한 경향을 나타내었다(10,29). 그리고 비록 본 연구에서는 항당뇨 성분으로 확인되지 않았지만 다른 연구자들에 의해 항당뇨 성분으로 보고된 dihydroquercetin 성분은(30) 오디 와인 발효초기에 크게 증가한 후 발효가 진행되면서 감소하였으나 다른 생리활성물질보다 숙성 오디와인에 다소 많이 존재하고 있음을 확인하였다(data not shown).

오디에는 항고혈압, 항산화 및 항노화성 생리활성물질인 rutin, isoquercitrin, quercitrin 및 dihydroquercetin과 같은 quercetin 유도체와 항암, 항고혈압 및 항당뇨 성분인

resveratrol 및 piceid 그리고 mulberrofron 유도체인 moracin 및 4-prenylmoracin 성분이 함유되어 있다(2,3). 오디와인에도 이들 생리활성물질을 확인할 수 있었으며, 발효 및 숙성됨에 따라 대부분 감소하여 미량으로 존재하였으나 dihydroquercetin 및 quercetin 성분은 숙성와인에도 상당히 존재함을 알 수 있었기에 이들 화합물은 오디와인의 품질관리 지표성분으로 매우 중요하며, 또한 다른 베리류 과실와인에는 존재하지 않는 moracin 및 4-prenylmoracin 물질도 확인할 수 있어 오디와인의 품질차별성을 부각시킬 수 있었다. 이와같이 오디와인의 생리활성 측정 및 그로부터 항당뇨 물질의 분석은 오디와인 최종 제품의 표준화, 규격화 및 과학화 달성을 위한 품질관리시스템 확립에 매우 중요한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 생각되며, 현재 기존의 오디와인보다 기능성 및 기호성이 우수한 프리미엄 오디와인 제조기술 개발이 진행되고 있다.

## 요 약

본 연구는 오디를 이용한 고부가가치의 기능성와인을 개발하기 위한 연구의 일환으로 먼저 4가지 베리류과실(오디, 블루베리, 딸기, 복분자)와인의 항당뇨, 항노화 및 항산화활성을  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase 및 DPPH radical를 사용하여 측정 한 후  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 가장 강한 오디와인으로부터 저해제를 분리 및 동정하였다. 또한, 3 가지 빵나무 품종(익수빵, 대성빵, 청일빵) 오디를 이용하여 오디와인을 제조하여 품종과 발효에 따른  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 함량 변화를 측정한 결과는 다음과 같다.

4가지 베리류과실 와인의 항산화, 항당뇨 및 항노화 활성을 측정한 결과, 오디와인이 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을(69.37%) 나타내었으며, DPPH 라디칼 소거능은 블루베리(64.57%) 및 오디와인(62.48%)이 유사하게 높았으며, 딸기와인이 가장 높은 tyrosinase 저해활성(59.63%)을 나타내었다. 이 중  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 가장 높은 오디와인으로부터 효소저해제를 분리 및 동정하기 위해 오디와인을 먼저 감압농축하여 에틸아세테이트로 분획한 다음 Diaion HP-20, ODS-A 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 순차적으로 실시하여 4가지 분획을 얻었으며, 이 중  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 가장 강한 Fr. 4로부터 UV 및 NMR 분석을 통해 quercetin를 동정하였다. 마지막으로 빵나무 품종 및 발효에 따른 오디와인의  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 함량을 측정한 결과, 대성빵 오디와인의 quercetin 함량(16.83 ppm)이 가장 높았으나, 익수빵 및 청일빵 오디와인의 quercetin 함량은 각각 14.85 및 8.92 ppm으로 낮았다. 그리고 발효 및 숙성에 따라 오디와인의 quercetin 함량은 크게 감소하였다.

이상의 연구 결과로부터 4가지 베리류 과실와인 중 오디

와인이 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었으며, 주된 저해물질은 quercetin임을 기기분석을 통해 확인할 수 있었기에 향후 오디와인은 당뇨예방용 기능성와인으로서 크게 각광을 받을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역연고산업육성사업(RIS)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Hur J (1994) Dongeubogam Dongeuhak Institute, Ryogang Pub. Co., Seoul, Korea, p 2803
- Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH (2009) Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. J Agric Food Chem, 57, 9133-9140
- Kim EO, Lee YJ, Lee HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW (2010) Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry fruits from seven different *Morus alba* L. cultivars. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 1467-1475
- Oh HH, Hwang KT, Kim MY, Lee HW, Kim SZ (2008) Chemical characteristics of raspberry and blackberry fruits produced in Korea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 738-743
- Cho WJ, Song BS, Lee JY, Kim JK, Kim JH, Yoon YH, Choi JI, Kim GS, Lee JW (2010) Composition analysis of various blueberries produced in Korea and manufacture of blueberry jam by response surface methodology. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 319-323
- Cho KM, Lee JB, Kahng GG, Seo WT (2006) A study on the making of sweet persimmon (*Diospyros kaki* T) wine. Korean J Food Sci Technol, 38, 785-792
- Kim SJ, Lee HJ, Park KH, Rhee CO, Lim IJ, Chung HJ, Moon JH (2008) Isolation and identification of low molecular phenolic antioxidants from ethylacetate layer of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) wine. Korean J Food Sci Technol, 40, 129-134
- Yoon OH, Kang BT, Lee JW, Kim KO (2008) Effect of plum wine on the lipid metabolism and lipid peroxidation of rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 422-427
- Dudley JI, Lekli I, Mukherjee S, Das M, Bertelli AA,



- Das DK (2008) Does white wine quality for French paradox comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem*, 56, 9362-9373
10. Schmitzer V (2010) Elderberry (*Sambucus nigra* L.) wine: a product rich in health promoting compounds. *J Agric Food Chem*, 58, 10143-10146
  11. Ha JH (2011) Analysis of farnesol in Macgeulri by MSB-GC/MS, Korea Economy Newspaper News, 04. 14
  12. Kim HB (2000) Sensory characteristics of mulberry fruit jam and wine. *Korean J Seri Sci*, 42, 73-77
  13. Kim HR, Kwon YH, Kim HB, Ahn BH (2006) Characteristics of mulberry fruit and wine with varieties. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 49, 209-214
  14. Kim YS, Jeong DY, Shin DH (2008) Optimum fermentation conditions and fermentation characteristics of mulberry (*Morus alba*) wine. *Korean J Food Sci Technol*, 40, 63-69
  15. Derosa G, Maffioli P (2012)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*, 8, 899-906
  16. Zhang A, Ye F, Lu J, Zhao S (2013) Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. *Food Chem*, 141, 1854-1859
  17. Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS (2001) Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem*, 49, 4208-4213
  18. Fujisawa T, Ikegami H, Inoue K, Kawabata Y, Ogihara T (2005) Effect of two  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism*, 54, 387-390
  19. Park JH (2009)  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*. *Korean J Med Crop Sci*, 17, 357-362
  20. Tagashira M, Ohtake Y (1998) A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melisa officinalis*. *Planta Med*, 64, 555-558
  21. Choi SW, Lee SK, Kim EO, Oh JH, Yoon KS, Parris N, Hicks KB, Moreau RA. (2007) Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *J Agric Food Chem*, 23, 1090-1092
  22. SAS Institute Inc (1990) *SAS user's guide*. Statistical Analysis Systems Institute. Cary NC USA
  23. Seeram NP (2010) Recent trends and advances in berry health benefits research. *J Agric Food Chem*, 58, 3869-3870
  24. Tiwari BK, Brunton NP, Brennan CS (2013) *Handbook of Plant Food Phytochemicals*. John Wiley & Sons, Ltd Publishing Co., Chichester, West Sussex, UK, p 107-113
  25. Marby TJ, Markham KR, Thomas MB (1970) The ultraviolet spectra of flavones and flavonols, In : *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, New York, USA, p 41-43
  26. Lee JY, Moon SO, Kwon YJ, Lee SJ, Choi SW (2004) Identification and quantification of anthocyanins and flavonoids in mulberry (*Morus* sp.) cultivars. *Food Sci Biotechnol*, 13, 176-184
  27. Lee YJ, Kim EO, Choi SW (2010) Isolation and identification of polyphenolic compounds from mulberry (*Morus alba* L.) fruit seeds. *J Food Sci Nutr*, 40, 517-524
  28. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R (1997) Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biochem Biotech Biosci*, 61, 177-178
  29. Fang F, Li JM, Zhan P, Tang K, Wang W, Pan QH, Huang WD (2008) Effect of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wine. *Food Res Int*, 41, 53-60
  30. Haraguchi H, Ohmi I, Fukuda A, Tamura Y, Mizutani K, Tanaka O, Choi WH (1997) Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci Biotech Biochem*, 61, 651-654