

뽕잎의 당침 및 유산발효에 의한 추출물의 기능성 품질 특성

류일환 · 권태오*
원광대학교 생명자원과학대학

Functional quality characteristics of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves (*Morus alba* L.)

Il-Hwan Ryu and Tae-Oh Kwon*

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

(Received September 17, 2013, Accepted October 25, 2013)

ABSTRACT

This study was carried out to investigate functional quality characteristics of extract obtained after sugar-leaching for 12 weeks (SLE) and extract obtained after lactic acid fermentation for 8 weeks (LFE) of mulberry leaves. The yield, sugar content, pH, and total acidity of SLE were 27%, 43 °Brix, 4.6, and 0.45%. The yield, sugar content, pH, and total acidity of LFE were 166%, 33 °Brix, 3.6, and 1.17% respectively. The lactic acid bacteria viable numbers (1.2×10^{10} CFU/ml) of LFE were more than those of SLE (2.8×10^2 CFU/ml). The LFE expressed activities of hydrolytic enzymes (amylase, cellulase, pectinase, protease), but SLE did not express. The contents of acetic acid, citric acid, and malic acid of SLE were higher than those of LFE, but lactic acid content of LFE was higher than that of SLE. The main free sugars of SLE were glucose (200.93 mg/g), fructose (236.32 mg/g), and sucrose (18.41 mg/g), but LFE did not detect all free sugars. The contents of polyphenol, anthocyanin, and piperidine alkaloid of LFE were higher than those of SLE. α -Glycosidase activities were inhibited 3.4% and 16.2% by SLE and LFE. These results suggest that lactic acid fermentation extraction is an effective method to increase the yield and contents of functional quality of mulberry leaves extract.

Key words : Functional quality, Sugar-leaching extract, Lactic acid fermentation extract, Mulberry leaves

서 론

뽕잎 (mulberry leaves)은 녹차보다 많은 미네랄이 함유되어 있고 (Lee et al. 2002), rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin과 같은 flavonoid와 resveratrol, steroid, amino acid 및 vitamin 등이 다량 함유되어 있어 (Kim et al. 2012), 항산화 재료로 주목받고 있다 (Kim et al. 2007a, Kim et al. 2007b). 중추신경계의 억제성 신경전달물질로 혈압상승억제 (Omori et al. 1987), 식욕 및 포만감 조절 (Tews 1981) 등 중요한 역할을 하는 γ -aminobutyric acid (GABA)가 비교적 풍부하며, 특히, α -glucosidase의 활성을 저해하여 당의 흡수를 감소시켜 혈당을 저하시키는 anti-hyperglycemic 활성이 우수한 1-deoxyojirimycin (1-DNJ)과 N-containing sugar가 다량으로 함유되어 당뇨병의 치료 및 예방에 가장 주목되는 대표적인 천연

연물 소재이다 (Kimura et al. 1995, Miyahara et al. 2004, Naowaboot et al. 2009).

약용식물은 치료의 목적으로 생물 및 건조분말의 형태로 사용되어 왔으며, 복용량의 과다 및 짧은 보존기간 등의 문제를 해결하기 위하여 다양한 추출방법이 개발되었다. 그 중, 전통적인 추출 방법의 하나로 직접 음용 및 희석 후 음용을 목적으로 과량의 당질 첨가에 의한 자연 발효의 방법이 사용되어 왔다 (Lee et al. 2008a, Lee et al. 2008b, Lee et al. 2012). 이 방법은 “효소액”이라는 이름으로 각종 매체를 통하여 유용성이 언급되고 있으나, 학술적인 증명이 전무한 상태임은 물론 과도한 당질의 첨가에 의한 당질 대사 관련 장애 및 장시간의 추출 시간을 필요로 하고, 식물 세포벽의 치밀도에 의한 수율 저하 및 유용성분의 효과적인 추출 등 유용성이 증명되지 않은 문제점을 갖고 있다. 최근 많은 관

*Corresponding author. E-mail: agrokto@wku.ac.kr

심을 받고 있는 유용 미생물을 이용한 발효 추출법은 이러한 단점을 보완할 수 있을 것으로 판단된다 (Doh et al. 2010). 발효법에 이용되는 미생물로는 식물 세포의 섬유질을 분해할 수 있는 세균 및 곰팡이와 알코올을 생산하는 효모균이 주목을 받고 있다 (Flint and Bayer 2008, Katiyar 2008, Ryu et al. 2010). 이러한 발효의 방법은 식물 세포벽을 자화하여 추출 수율을 증가시키고, 알코올의 함량을 점진적으로 증가 시킴으로 유용성분의 추출을 용이하게 하고, 식물 내 존재하는 불필요한 당을 제거하여 유용한 물질로 전환시키는 이점을 가지고 있다 (Katiyar 2008). 이러한 관점에서 본 연구는 섬유질 자화능을 가지는 신규 유산균 (Ryu and Kwon 2012)을 이용하여, 과량의 당을 첨가하는 전통 발효 방법에 의한 빵잎 당칩 추출액의 유용성을 검증함은 물론, 그 제조 방법을 개선하고, 수율 향상 및 유용성분의 변화 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에 사용한 빵잎은 전북 부안 소재 빵나무 농장에 서 오디 수확 후 전정 시에 빵잎을 따서, 24시간 이내에 당칩 및 유산발효의 제조에 사용하였으며, 발효 유산균은 본 연구실에서 분리 동정한 *Lactobacillus plantarum* TO-2100 (수탁번호 KFCC 11537P)을 사용하였다. *L. plantarum* TO-2100은 MRS 액체 배지에 1 백급이를 접종하고 30°C에서 48시간 배양 후 빵잎 발효를 위한 starter로 사용하였다. 사용된 starter (5×10^8 CFU/ml)는 생 빵잎 무게의 4% (v/w)를 사용하였다.

2. 당칩 및 유산발효 추출물의 제조

수확한 빵잎은 세척 후 탈수한 다음, 야생균주의 살균을 위해 85°C, 2분간 데치기 작업을 수행하여 전통 방식으로 생 빵잎 원료 1kg을 입병하고 백설탕 (삼양설탕)을 1:1 (w/w)의 중량비로 혼합하여 밀봉한 다음 25°C에서 당칩 숙성하였다. 또한, 유산발효 추출액의 제조는 세척 후 탈수한 다음, 야생균주의 살균을 위해 85°C, 2분간 데치기 작업을 수행한 생 빵잎 1kg에 살균 정제수 및 백설탕을 1:1:0.7 (w/w/w)의 중량비로 혼합하여 밀봉한 다음 25°C에서 발효하였다. 백설탕의 첨가량은 빵잎 중량비의 10~100%로 조절하여 유산균의 증식 효과를 사전 조사하여 30 °Brix인 70%로 결정하였다. 데치기 조건은 야생균주의 사멸 속도 및 생 빵잎의 조직 연화와 가열 취 등 재료적 가치를 사전 조사하여 설정하였다.

3. 수율 및 당도 측정

빵잎 당칩 추출액의 수율은 12주 동안 2주 간격으로 당

칩 추출액을 멸균 여과포(Nylon monofilament filter bag; 10"L, pore size: 100 μm, Cole-Parmer International, USA)로 1시간 동안 자연 여과한 뒤 얻어진 당칩 추출액의 중량을 측정하여 초기 첨가 빵잎 중량의 비로 표시하였으며, 유산 발효 추출액의 수율은 8주 동안 2주 간격으로 추출액을 멸균 여과포로 1시간 동안 자연 여과한 뒤 얻어진 추출액의 중량을 측정하여 초기 첨가 빵잎 중량의 비로 표시하였다. 당도(°Brix)는 당도계 (master refractometer, ATAGO, Japan)을 이용하여 측정하였다.

4. pH 및 총 산도의 측정

pH는 pH meter (sevenCompact™ pH/Ion S220, Mettler-Toledo, Switzerland)로 측정하였으며, 총 산도는 Food analysis (Nielsen 2003)에 의하여 추출액 20 ml를 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 후 0.1 N NaOH 소요량을 다음 식에 의해 citric acid (%) 생성량으로 환산하였다.

Citric acid (%)

$$= \frac{0.1 \text{ N NaOH 소비량} \times \text{NaOH 역가}}{\text{시료의 부피}} \times \text{Acid factor (0.0090)}$$

5. 미생물 생육 측정

당칩 및 유산발효 추출액의 미생물의 변화는 단계 희석에 의한 생균수로 측정하였다. 유산균의 증식은 1% sodium carbonate가 포함된 *Lactobacillus* MRS agar, *Bacillus* sp.는 brain heart infusion agar를 사용하였으며, 효모는 yeast extract peptone dextrose 평판배지를 사용하였다.

6. 효소 활성 변화 측정

당칩 및 유산발효 추출액의 amylase, cellulase, pectinase, protease의 활성 측정은 평판 확산에 의한 염색법 및 비색 정량법에 의해 측정하였다. 평판 확산에 의한 염색법의 amylase 활성 측정은 1% soluble starch가 포함된 한천 평판배지에 500 μl의 빵잎 당칩 및 유산발효 추출액을 적신 paper disk를 올려놓고, 35°C에서 30분간 반응 시킨 후 gram's iodine 염색액으로 염색 후 형성된 투명환의 크기를 비교하였다. Cellulase의 활성은 1% carboxymethyl cellulose (CMC)가 첨가된 평판배지에서의 분해 활성을 gram's iodine 염색액으로 염색하였으며, pectinase의 활성은 1% pectin이 첨가된 평판배지에서의 분해활성을 gram's iodine 염색액으로 염색하였고, 염색 후 형성된 투명환의 크기를 비교하였다. Protease의 활성은 1% skim milk가 첨가된 평판 배지에서의 투명환을 측정하였고, 1% casein이 첨가된 평판배지에서의 분해활성은 amide black 염색

액으로 염색 후 형성된 투명환의 크기를 비교하였다. 비색정량법에 의한 amylase의 활성은 Matsui et al. (1990)의 방법에 따라 20 mmol sodium acetate, 5 mmol CaCl₂ (pH 5.5)에 12.5 mg/ml의 soluble starch를 첨가한 용액을 기질 용액으로 사용하였다. 원심분리하여 이물을 제거한 당칩 및 유산발효 추출액의 상등액 0.5 ml를 0.5 ml의 기질 용액에 첨가 후 40°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.25 ml의 0.5 mol NaOH를 첨가하여 반응을 중지시키고 형성된 고형분을 제거 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose를 이용하여 사전에 작성된 표준곡선으로부터 환원당의 양을 환산하였다. 1 unit는 1분 동안 1 µmol D-glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Cellulase의 활성은 Mandel (1975)의 방법에 따라 1% carboxymethyl cellulose 100 ml, 0.5 mol citrate buffer (pH 4.8) 10 ml, 1% merthiolate를 증류수 1L로 희석한 용액을 기질로 사용하였다. 원심분리하여 이물을 제거한 당칩 및 유산발효 추출액의 상등액 0.5 ml를 0.5 ml의 기질 용액에 첨가 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 3 ml DNS reagent를 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 µmol D-glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다. Pectinase의 활성은 0.5% crude pectin (pH 10) 용액을 기질 용액으로 사용하였다. 원심분리하여 이물을 제거한 당칩 및 유산발효 추출액의 상등액 0.5 ml를 0.5 ml의 기질 용액에 첨가 후 40°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 3 ml DNS reagent를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분간 정치 후 235 nm에서 비색정량하고, 사전에 작성된 표준곡선으로부터 환원당 (D-galacturonic acid)의 양을 환산하였다. 1 unit는 1분 동안 1 µmol D-galacturonic acid를 생성하는 효소의 양으로 하였다. 또한 protease 활성은 Cho et al. (2010)의 방법에 따라 500 mmol Tris-HCl (pH 9.0)에 녹인 0.5% (w/v) casein 100 µl 및 0.5% skim milk 100 µl를 기질 용액으로 사용하였다. 원심분리하여 이물을 제거한 당칩 및 유산발효 추출액의 상등액 100 µl를 첨가한 후 45°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 400 µl를 가하여 반응을 정지시키고, 4°C, 15,000 rpm에서 원심분리 후, 상등액에 525 mmol NaOH 700 µl를 가한 후, 442 nm에서 비색 정량 하였다. 효소의 활성 단위는 흡광도 0.01을 1 unit로 정하였다.

7. 유기산의 함량 측정

당칩 및 유산발효 추출액의 유기산 측정은 건강 기능성 식품공전 (2008)에 준하여 C18 카트리지에 ACN/DW (1 : 1)

10 ml에 당칩 및 유산발효 추출액 10 ml를 가하여 초기 용출액 4~5 ml를 제거 후 HPLC System (Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다.

8. 유리당의 측정

당칩 및 유산발효 추출액의 유리당 측정은 식품공전 일반시험법의 기기분석법에 의한 당류의 정성 및 정량법 (2011)에 준하여 carbohydrate high performance 4 µm (4.6 × 250 nm) column을 사용하여 HPLC System (Shiseido, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

9. 총 폴리페놀의 함량 측정

당칩 및 유산발효 추출액을 10배 희석한 5 ml에 Folin-Ciocalteu 시약 5 ml를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 용액 (w/v) 5 ml를 넣어 진탕하고 실온에서 방치한 후 700 nm에서 비색정량 하였다. Tannic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

10. Antocyanin의 함량 측정

당칩 및 유산발효 추출액 10 ml를 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v) 40 ml에 혼합하고 24시간 진탕 추출하였다. 추출된 색소는 3,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v)으로 100 ml로 정용한 후 528 nm에서 비색정량하였다. Cyanidin-3-glucoside를 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 anthocyanin 함량을 측정하였다.

11. Piperidine alkaloid 함량 측정

Piperidine alkaloid의 추출은 Ryu and Kwon (2012)의 방법에 준하여 추출하였다. 당칩 및 유산발효 추출액 10 ml에 20배량의 0.5 mol HCl 용액을 첨가하고 80°C, 5시간 추출 후, 이를 감압 여과하여 잔사를 제거하였다. 여액에 4 mol의 NH₄OH 용액을 첨가하여 pH 12로 조절하고 2시간 실온에서 방치하였다. 이때 생성된 침전물을 증류수로 재 용해 후 CHCl₃로 분획 하였다. CHCl₃ 분획물을 감압 농축하고 70°C에서 12시간 건조 후 그 함량을 측정하여 piperidine alkaloid 함량으로 하였다.

12. α-Glycosidase 저해활성

α-Glycosidase 저해활성은 Hsieh et al. (2010)의 방법에 준하여 측정하였다. 당칩 및 유산발효 추출액 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 preincubation한 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 Na₂CO₃ 750 ml로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

결과 및 고찰

1. 수율 및 당도

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 수율 및 당도를 측정한 결과를 그림 1에 나타내었다. 당침 추출액의 경우 당침 8주 후 10%의 수율을 보였으며, 12주 후 27%의 회수율을 보여 매우 낮은 회수율을 보인 반면, 유산발효 추출액은 발효 시작 2주 후 122%, 8주 후 166%의 회수율을 보였다. 이는 유산균 증식의 촉진을 위해 100%의 정제수를 첨가한 연유로 인한 결과 및 유산발효에 의한 추출 촉진에 의한 것으로 판단된다. 또한, 발효시간의 현저한 단축 효과를 확인하였다. 당도는 당침 추출액의 경우 8주 후 60 °Brix에서 12주 후 43 °Brix로 28.3% 감소한 반면, 유산발효 추출액의 경우 발효 2주 후 33 °Brix로 증가하여 발효 8주 후까지 큰 변화가 없었다. 이는 당침 추출액의 경우 뽕잎의 수용성 성분의 침출에 의한 당질 희석 효과를 나타낸 반면 유산발효 추출액은 뽕잎의 matrix 당질의 분해가 병행된 것으로 판단된다. Lee et al. (2008a)은 구기자차의 제조 시 80% 당 첨가로 77.5%의 수율을 보였다는 보고와 차이를 나타내었다. 이는 과일과 열의 재료적 차이에 기인한 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 유산발효 추출법이 당침 추출법에 비해 최종산물의 당 함량은 낮으나 발효시간, 회수율을 감안할 때 더 효과적임을 확인하였다.

2. pH 및 총 산도

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 pH 및 총 산도를 측정한 결과를 그림 2에 나타내었다. 당침 추출액의 경우 당침 8주 이전까지 액상의 유출이 진행되지 않아 측정이 불가능하였고, 8주 후 6.3이던 pH는 12주 후 4.6으로 감소하였다. 총 산도는 12주 후 0.45%였다. 유산 발효 추출액의 pH는 초기 7.2에서 4주 후 3.7로 급격히 감소하였으며 그 이후 3.6으로 약간의 감소를 보였고, 총 산도는 초기 0.04%에서 4주 후 0.78%로 급격히 증가하였으며 이후 소폭의 증가를 보여 8주 후 1.17%였다. 이러한 차이는 유산균의 증식에 따른 산의 생성 및 뽕잎 유기산의 수용성 증가에 의한 것으로 판단된다.

3. 미생물의 증식

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 유산균, 일반

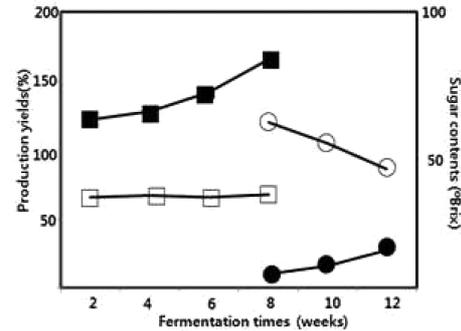


Fig. 1. The changes of yield and sugar content of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves.
 ●: Yield of sugar-leaching extract.
 ■: Yield of lactic acid fermentation extract.
 ○: Sugar content of sugar-leaching extract.
 □: Sugar content of lactic acid fermentation extract.

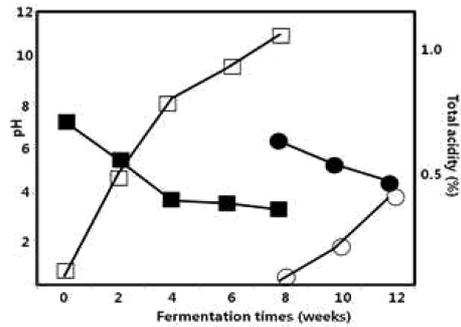


Fig. 2. The changes of pH and total acidity of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves.
 ●: pH of sugar-leaching extract.
 ■: pH of lactic acid fermentation extract.
 ○: Total acidity of sugar-leaching extract.
 □: Total acidity of lactic acid fermentation extract.

Table 1. The microorganism numbers in extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

Micro-organism	Viable cell number (CFU/ml)	
	Sugar-leaching**	Lactic acid fermentation***
<i>Lactobacillus</i> sp.	$2.8 \times 10^{2*}$	1.2×10^{10}
<i>Bacillus</i> sp.	3.3×10^5	7.3×10^3
Yeast	7.3×10^5	3.2×10^2

*Each value is mean of 3 repetition.

**Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

***Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

세균 및 효모의 증식을 당침 추출액의 경우 12주 후 추출액, 유산발효 추출액은 8주 후 추출액을 사용하여 측정한 결과를 표 1에 나타내었다. 당침 추출액의 유산균 수는 2.8×10^2 CFU/ml 로 현저히 낮았으며, 유산발효 추출

액의 유산균 증식은 초기 4.1×10^4 CFU/ml에서 8주 후 1.2×10^{10} CFU/ml로 증가하였다. 앞의 pH 및 총 산도의 변화는 유산균 증식에 따른 산도의 증가에 기인한 것으로 판단되었다. 반면 일반세균 및 효모의 수는 당침 추출액의 경우 3.3×10^5 CFU/ml 및 7.3×10^5 CFU/ml로 유산발효 추출액의 7.3×10^3 CFU/ml과 3.2×10^2 CFU/ml에 비해 높은 수치를 나타내었다. 이로부터 당침이나 유산발효 제조 시 설정한 데치기 조건이나 숙성 기간 동안 야생균주의 완전 멸균상태를 유지할 수 없음을 알 수 있으며, 야생균주의 증식은 탄산가스의 발생, 미지 물질의 생성, 이미, 이취 등 다양한 생물학적 변화를 수반한다고 알려져 있다. 이로 인해 발효 등 천연소재의 제조 가공 시 미생물의 증식은 중요한 검토 조건이다. 또한 유산발효 추출액의 세균 및 효모의 증식 억제에 유산균은 항균활성을 가지며, 병원성균을 포함하는 그람음성균과 효모에 대하여 강한 생육저해를 나타낸다고 하였다 (Ryu et al. 2011).

4. 효소 활성

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 전분, CMC, pectin, skim milk 및 casein 분해활성을 평판 확산법 및 spectrometry법으로 측정된 결과를 그림 3 및 표 2에 나타내었다. 그림 3에서 보는 바와 같이 당침 추출액에서는 모든 기질에 대하여 분해활성을 보이지 않은 반면, 유산발효 추출액의 경우 CMC 및 pectin의 분해활성이 우수하였으며, skim milk의 분해활성도 비교적 우수하였다. 반면 전분 및 casein 분해활성은 낮은 것을 확인하였다. 또한 spectrometer를 이용하여 측정된 효소활성을 비교한 결과 (표 2), 당침 추출액에서는 amylase 활성만 극소 나타났으나 모든 기질에 대하여 활성이 없었으며, 유산발효 추출액에 있어서는 amylase, CMCase 및 pectinase 활성은 각각 23.72 unit, 47.13 unit 및 42.97 unit였다. 단백질의 종류에 따라 활성의 정도가 다른 protease는 skim milk와 casein을 기질로 사용 하였을 때 각각 38.71 unit와 17.75 unit로 casein에 비해 skim milk에서의 활성이 우수하였다. 식물세포벽을 구성하는 cellulose 및 pectin 분해활성은 유산균 발효액의 제조에 사용된 *Lactobacillus plantarum* TO-2100 균주의 특성에 기인한 것이라 생각되어지며 (Ryu and Kwon 2012), 뽕잎이 성숙해지면서 amylase 및 cellulase 활성은 급격히 감소하는 반면, 단백질 분해효소의 활성은 변화가 없다는 보고 (Sattar et al. 1996)와 같이 protease 활성은 뽕잎 잔존에 기인한 것으로 판단되나, 추후 시험이 요구되어진다. 이상의 결과로부터 백설탕 첨가에 의한 당침 추출액은 효소기능이 전무한 것으로 확인되었으며, 효소의 기능적 측면에서도 유

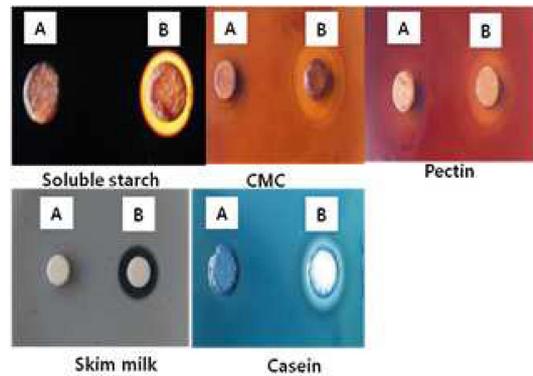


Fig. 3. Several enzymes activities by paper disk diffusion method of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves.

A: Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

B: Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

Table 2. Several enzymes activities by spectrometry method of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

Enzyme	Substrate	Activity (unit)	
		Sugar-leaching**	Lactic acid fermentation***
Amylase	Soluble starch	0.35*	23.72
CMCase	Carboxymethyl cellulose	0	47.13
Pectinase	Pectin	0	42.97
Protease	Skim milk	0	38.71
	Casein	0	17.75

*Each value is mean of 3 repetition.

**Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

***Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

산 발효 추출액이 현저히 우수한 것으로 확인되었다.

5. 유기산의 함량

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 유기산 함량을 분석한 결과 (표 3), 뽕잎 당침 추출액의 malic acid, acetic acid, citric acid의 함량은 각각 0.38 mg/g, 2.47 mg/g, 1.98 mg/g인 반면, 유산발효 추출액은 0 mg/g, 1.76 mg/g, 1.23 mg/g으로 당침 추출액에 비해 큰 폭의 감소를 나타내었다. Tartaric acid는 두 시료 모두에서 검출되지 않았다. 가장 큰 차이를 보인 것은 lactic acid로 당침 추출액의 11.57 mg/g에 비해 유산발효 추출액은 29.55 mg/g으로 2.6배 높은 양을 나타내었다. 유산발효 추출액에서 lactic acid의 함량 증가는 유산균의 생육에 의한 생산 및 malic acid가 lactic acid로 전환되었기 때문으로 판단되며 (Avinash et al. 2011), citric acid 함량 감소는 젖산균의 에너지 대사에 사용된 것으로

Table 3. The contents of organic acid of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

Organic acid	Content (mg/g)	
	Sugar-leaching**	Lactic acid fermentation***
Lactic acid	11.57*	29.55
Tartaric acid	-	-
Malic acid	0.38	-
Acetic acid	2.47	1.76
Citric acid	1.98	1.23

*Each value is mean of 3 repetition.

**Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

***Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

Table 4. The contents of free sugar of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

Free sugar	Content (mg/g)	
	Sugar-leaching**	Lactic acid fermentation***
Glucose	200.93*	-
Fructose	236.32	-
Sucrose	18.41	-
Maltose	-	-

*Each value is mean of 3 repetition.

**Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

***Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

판단된다 (Fugelsang and Edwards 2007). Lee et al. (2008a)은 생 구기자를 당 첨가하고 5개월간 당침 숙성한 구기자청의 주요 산이 citric acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid라는 보고와 같이 뽕잎 당침 추출액의 유기 산도 유사한 성분 특성을 나타내었으나, 뽕잎 유산발효 추출액 유기산의 대부분은 lactic acid였다. 유산균에 의한 lactic acid의 함량 증가는 대부분의 발효식품 (김치, 와인, 피클 등)의 맛 및 기능성을 증가시킨다는 것은 주지의 사실이다 (Kristek et al. 2004, Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 2010). 뽕잎의 유산 발효 추출액은 낮은 pH, 높은 산도를 갖고 있음에도 관능 및 기능성에서 유산발효 추출액이 당침 추출액에 비해 유익함을 나타낸 것으로 판단된다.

6. 유리당의 변화

회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 유리당 함량을 분석한 결과 (표 4) 상이한 결과를 나타내었다. 당침 추출액의 경우 glucose, fructose, sucrose가 주된 당으로 각각 200.93 mg/g, 236.32 mg/g, 18.41 mg/g이 함유되어 있었다. 반면, 특이하게도 유산발효 추출액에는 모든 유리당이 검출

되지 않았다. 이는 Lee et al. (2008b)의 구기자청의 제조 시 유리당의 변화 보고에서와 같이 당침 추출액의 경우 sucrose는 glucose와 fructose로 전환되었으며 4%의 sucrose를 포함하였다. 이는 당침 추출액의 당 농도 43 °Brix가 모두 식품의 품질변화를 유발하는 sucrose 및 혈당을 상승시키는 주요 흡수 당인 glucose 및 fructose로 구성되어 있어 혈당지수(Glycemic index, GI) 상승에 직접적인 영향을 미칠 것으로 판단된다. 통상적으로 GI는 glucose를 100으로 하여 작성된 지수로, 55이하를 낮은 GI 식품으로, 70 이상을 높은 GI 식품으로 규정하고 있다 (Jenkins et al. 1981). Glucose은 높은 GI (100)이고 fructose는 낮은 GI (25)로 분류하고 있으나, 액상의 fructose는 내장지방 및 혈중 콜레스테롤을 증가시키고, 인슐린 민감성을 둔화시키는 당으로 알려져 있다 (LeBlanc et al. 2009). 반면, 유산발효 추출액의 경우 모든 유리당이 생물학적 변화를 일으켰음을 나타낸다. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*의 유산균은 sucrose와 fructose를 다른 화합물로 전환할 수 있는 능력이 있음이 보고되어 있다. Saha and Nakamura (2003)는 *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693가 fructose를 mannitol 생성으로 전환시킨다고 보고하였으며, Monsan et al. (2001), Van Hijum et al. (2006)은 유산균이 세포 외 glucosyl-과 fructosyltransferase에 의해 glucooligosaccharide와 fructooligosaccharide 및 homopolysaccharide로 전환할 수 있다고 보고하였다. 이를 근거로 유산균 발효액은 다당, 올리고당 및 당알코올로 완전히 전이되었을 것으로 판단된다. 이의 검증을 위해 추후 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 당침 추출액의 유리당은 혈당지수에 부정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다. 반면, 유산발효 추출액의 경우 모든 유리당이 비 대사성 올리고당 등으로 전환되는 생물학적 변화를 일으켰음을 나타낸다. 이는 당침 추출액에 비해 유산발효 추출액이 기능성 증진에 적합하다고 판단된다.

7. Total polyphenol, anthocyanin 및 piperidine alkaloid의 함량

뽕잎에는 다량의 폴리페놀 및 안토시아닌 색소를 함유하는 것으로 알려져 있다. 폴리페놀과 안토시아닌은 우수한 항산화 활성을 나타내는 성분으로 뽕잎의 기능성을 부여하는 데 중요한 역할을 하는 성분이다. 특히 DNJ는 피페리딘의 구조를 가지는 알칼로이드 성분으로 뽕잎의 당질대사 조절에 핵심적인 물질이다. 회수된 뽕잎 당침 및 유산발효 추출액의 폴리페놀, 안토시아닌, 피페리딘 알칼로이드 함량을 분석한 결과 (표 5), 폴리페놀은 당침 추출액 130.5 mg/100 g에 비해 유산발효 추출액 330.0 mg/100 g

Table 5. The amounts of total polyphenol, anthocyanin, and piperidine alkaloid in extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

Extraction process	Total polyphenol (mg/100 g)	Anthocyanin (ppm)	Piperidine alkaloid (mg/100 ml)
Sugar-leaching**	130.5*	5.8	40.0
Lactic acid fermentation***	330.0	38.0	320.0

*Each value is mean of 3 repetition.

**Extract obtained by sugar-leaching for 12 weeks.

***Extract obtained by lactic acid fermentation for 8 weeks.

으로 2.5배의 높은 함량을 나타내었고, 안토시아닌 함량은 당침 추출액 5.8 ppm 보다 유산 발효 추출액 38.0 ppm으로 6.6배의 증가된 함량을 나타내었다. 그러나, 기능성을 나타내기에는 함량이 낮음을 확인하였다. 또한, 피페리딘 알칼로이드의 함량은 유산발효 추출액은 320.0 mg/100 ml로 40.0 mg/100 ml의 당침 추출액보다 8배 증가하였다. 통상적으로 폴리페놀 성분은 종류에 따라 젖산균의 생육을 저해하는 물질로 알려져 있으나 Maria et al. (2012)은 페놀 성분의 종류에 따라 젖산균의 생육에 직접적 영향을 미치며, protocatechinic acid, gallic acid는 젖산균의 생육을 억제하는 반면, quercetin, rutin, catechin, caffeic acid, vanillic acid는 *Lactobacillus hilgardii* X1B 생육에 도움을 준다고 보고하였다. 또한 젖산균 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus vaginalis* 균주는 폴리페놀 성분에 민감한 반면, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* 등은 생육이 증진되었다는 Tabasco et al. (2011)의 보고와 같이 *Lactobacillus plantarum* TO-2100 은 빵잎 폴리페놀에 대하여 저해 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. 또한, 빵잎의 당질대사에 직접적으로 관여하는 DNJ는 피페리딘의 구조를 가지는 알칼로이드 성분으로 약산성 용액 및 알콜 용액에 용출되어지는 기능성 성분이다 (Lou et al. 2011, Kojima et al. 2010). 유산발효 추출액의 피페리딘 알칼로이드 함량 증가는 유산균에 의한 산도의 증가로 알칼로이드 성분의 유효 용출에 의한 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 빵잎의 유산발효 추출액은 당침 추출액에 비해 수율, 침출시간, 효소활성 및 기능성분의 함량 모두에서 우수한 결과를 보였다.

8. α -Glucosidase 저해활성

α -Glucosidase는 소장 상피세포의 brush-border membrane에 존재하는 효소로서 탄수화물이 소화 흡수되기 용이한 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. α -Glucosidase에 대한 저해능은 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항 당뇨 활성 측정의 주 표적 효소이다. 회수된 빵잎

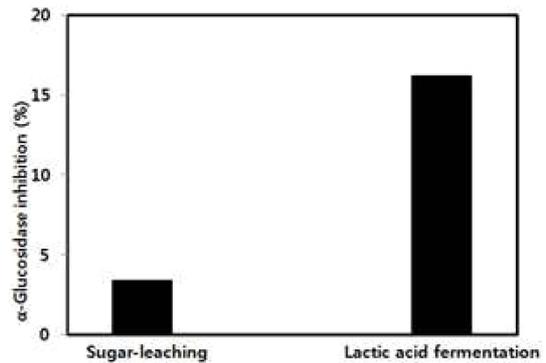


Fig. 4. α -Glucosidase inhibition activities of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves

당침 및 유산발효 추출액의 α -glucosidase에 대한 저해능을 측정한 결과 (그림 4) 당침 추출액은 3.4%, 유산발효 추출액은 16.2%의 저해활성을 보였다. 효소 저해 활성의 차이는 피페리딘 알칼로이드 함량의 차이 및 lactic acid, 미지의 올리고 당질의 함량에 기인한 것으로 판단되며, 발효를 통하여 빵잎의 당질 관련 기능성이 한층 증가된 제품 개발이 가능할 것으로 판단된다.

적 요

이 연구는 빵잎을 전통방식의 당침 추출액과 *Lactobacillus plantarum* TO-2100 유산균을 이용한 유산발효 추출액의 기능성 품질 특성을 조사하였다. 당침 추출액은 12주 동안 추출하였으며, 유산발효 추출액은 8주간 추출하였다. 당침 추출액 및 유산발효 추출액의 수율은 각각 27%와 166%였으며, 당 함량은 각각 43 °Brix와 33 °Brix였다. pH와 총 산도는 4.6, 0.45%와 3.6, 1.17%였다. 유산발효 추출액의 유산균 생균수는 1.2×10^{10} CFU/ml로 당침 추출액의 2.8×10^2 CFU/ml보다 월등히 많았다. 유산발효 추출액이 amylase, cellulase, pectinase, protease 등 분해효소의 활성을 보인 반면, 당침 추출액은 분해효소의 활성을 나타내지 않았다. 유기산의 경우 malic acid, acetic acid, citric acid의 함량은 당침 추출액이 높은 반면, lactic acid의 함량은 유산발효 추출액이 2.6배 높았다. 당침 추출액의 유리당은 glucose (200.93 mg/g), fructose (236.32 mg/g), sucrose (18.41 mg/g) 등 GI값이 높은 단당으로 구성된 반면, 유산발효 추출액에서는 유리당이 검출되지 않았다. 기능성 성분인 polyphenol, anthocyanin 및 당질대사 저해물질인 piperidine alkaloid의 함량 또한 유산발효 추출액이 당침 추출액보다 높았다. 당질대사의 주 효소인 α -glucosidase의 활성을 당침 추출액이 3.4% 저해한 반면 유산발효 추출액은 16.2% 저해 활성을 보였다. 이 결과로부터 전통

방식의 당칩 추출법에 비해 유산발효 추출법이 뽕잎의 수율 향상 및 기능성 성분의 함량 증진에 더 효과적이며, 이로 인한 대사기능장애의 예방 및 기능증진에 더 유효할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 특화작목 연구개발과제 (과제 번호: PJ00966303)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

인용 문헌

- Avinash T, Ajay JY, Pradeep KG, Dinesh J, Deepak KJ (2011) Conversion of malic acid into lactic acid in aloe vera by using lactic acid bacteria. *J Phytol* **3**, 1~11.
- Cho WD, Lee JK, Lim CS, Park AR, Oh YS, Roh DH (2010) Isolation of *Pseudoxanthomonas* sp. W12 and WD32 producing extracellular protease. *Kor J Microbiol* **46**, 63~67.
- Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS (2010) Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. *Korean J Medicinal Crop Sci* **18**, 255~265.
- Flint HJ, Bayer EA (2008) Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Ann NY Acad Sci* **1125**, 280~288.
- Fugelsang KC, Edwards CG (2007) Wine microbiology practical application and procedures. Chapter 2. Lactic acid bacteria. Chapman and Hall. pp29~34. USA.
- Hsieh PC, Huang GJ, Ho YL, Lin YH, Huang SS, Chiang YC, Tseng MC, Chang YS (2010) Activities of antioxidants, α -glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Botanical Studies* **51**, 293~302.
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH (1981) Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr* **34**, 362~366.
- Katiyar CK (2008) Aqueous alcoholic extraction of medicinal and aromatic plants by fermentation. In Sukhdev Swami Handa *et al.*, (ed.). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. pp107~113. Trieste, Italy.
- Kim HB, Kang CK, Sung GB, Kang SW, Lee J (2007a) Antioxidative capacity of mulberry leaf and its tea. *Korean J Seric Sci* **49**(1), 18~23.
- Kim HB, Koh SH, Oh NK, Jeong JS, Sung GB, Hong IP, Chung IM, Lee KG (2007b) Agronomic characteristics and antioxidant capacity of mulberry genetic resources conserved by Jeollabuk-do. *Korean J Seric Sci* **49**(2), 60~66.
- Kim HB, Kim JB, Kim SL, Seok YS, Sung GB (2012) Seasonal resveratrol contents of wild-type mulberry leaves collected from Gangwon province in Korea. *J Seric Entomol Sci* **50**(1), 10~14.
- Kimura M, Chen F, Nakashimqa N, Kimura I, Asano N, Koya S (1995) Anti-hyperglycemic effect of N-containing sugars delivered from mulberry leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *J Trad Med* **12**, 214~219.
- Kojima Y, Kimura T, Nakagawa K, Asai A, Hasumi K, Oikawa S, Miyazawa T (2010) Effects of mulberry leaf extract rich in 1-deoxynojirimycin on blood lipid profiles in humans. *J Clin Biochem Nutr* **47**, 155~161.
- Korea Food & Drug Administration (2008) Health functional food code. Section III. 2.4.2 Organic acid and Acidity. Food and Drug Administration. p17. Seoul, Korea.
- Korea Food & Drug Administration (2011) Food code. General test method. 1.1.4.1.4 The qualitative and quantitative analysis of sugars by instrumental method. p10-1-28. Seoul, Korea.
- Kristek S, Besslo D, Pavlovic H, Kristek A (2004) Effect of starter cultures *L. mesenteroides* and *L. lactis* ssp. *lactis* on sauerkraut fermentation and quality. *Czech J Food Sci* **22**, 125~132.
- LeBlanc BW, Eggleston G, Sammatarot D, Cornett C, Dufault R, Deeby T, St. Cyr E (2009) Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee. *J Agric Food Chem* **57**, 7369~7377.
- Lee JR, Hah YJ, Lee JW, Song YM, Jin SK, Kim IS, Hah KH, Kwak SJ (2002) Physico-chemical and sensory properties of emulsified sausages containing mulberry and persimmon leaf powder. *Korean J Food Sci Ani Resour* **22**, 330~336.
- Lee KS, Kim GH, Kim HH, Lee HC, Paik SW, Lee SS (2008a) Physicochemical properties of added sugar ratio on Gugija-sugar leaching by using Gugija (*Lycii fructus*) raw fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 744~751.
- Lee KS, Kim GH, Kim HH, Lee HC, Paik SW, Lee SS (2008b) Changes of free sugar on Gugija-sugar leaching processing from Gugija (*Lycii fructus*) raw fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 1182~1189.
- Lee YJ, Yoon BR, Kim DB, Kim MD, Lee DW, Kim JK, Lee OH (2012) Antioxidant activity of fermented wild grass extracts. *Korean J Food Nut* **25**, 407~412.
- Lou DS, Zou FM, Yan H, Gui ZZ (2011) Factors influencing the biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. *Afr J Agric Res* **6**, 2998~3006.
- Mandel M (1975) Microbial sources of cellulases. *Biotechnology and Bioengineering* **5**, 81~105.
- Maria RA, Maria CMN, Mario EA (2012) Influence of phenolic compounds on the growth and arginine deiminase system in wine lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol* **43**, 167~176.
- Matsui I, Matsui E, Ishikawa K, Miyairi S, Honda K (1990) The enzymatic and molecular characteristics of Saccharomycopsis alpha- amylase secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* **54**, 2009~2015.
- Miyahara C, Miyazawa M, Satoh S, Sakai A, Mizusaki S (2004) Inhibitory effect of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemic in normal rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **50**, 161~164.
- Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Siméon MR (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* **11**, 675~685.
- Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes

- B, Kukongviriyapan U (2009) Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin- induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* **64**, 116~121.
- Nielsen SS (2003) *Food analysis*. 3rd Edition. Kluwer Academic/ Plenum Publisher. p207-226. New York. New York, USA.
- 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 Nogeikagaku Kaishi* **61**, 1449~1451.
- Rattanachakunsopon P, Phumkhaichorn P (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Anal Biol Res* **1**, 218~228.
- Ryu BH, Sim GS, Choi HY, Ha WK (2011) A study on the natural preservative (Lactobacillus-fermented antimicrobial solution), fermented with plant originated lactic acid bacteria. *Food Science and Industry* **44**, 45~51.
- 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 J Medicinal Crop Sci* **18**, 429~438.
- Ryu IH, Kwon TO (2012) Enhancement of piperidine alkaloid contents by lactic acid fermentation of mulberry leaves (*Morus alba* L.). *Korean J Medicinal Crop Sci* **20**, 472~478.
- Saha BC, Nakamura LK (2003) Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnol Bioeng* **82**, 864~871.
- Sattar MA, Sarkar AA, Absar N (1996) Studies on the activities of amylase, cellulase and protease in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Bull Sericulture Resear* **7**, 19~22.
- Tabasco R, Sánchez-Patán F, Monagas M, Bartolomé B, Victoria Moreno-Arribas M, Peláez C, Requena T (2011) Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiology* **28**, 1345~1352.
- Tews JK (1981) Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. *Life Science* **29**, 2535~2542.
- Van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IGH (2006) Structural relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 157~176.