

Fermentation characteristics of mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruits produced using microbes isolated from traditional fermented food, and development of fermented soybean food

Eun-Sil Lee¹, Seung-Wha Jo¹, Eun-Jung Yim¹, Yun-Sun Kim¹, Hae-Suk Park¹,
Myung-Kon Kim², Sung-Ho Cho^{1*}

¹Microbial Institute for Fermentation Industry, Sunchang 595-804, Korea

²Department of Food Sciences and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

전통장류로부터 분리한 발효미생물을 이용한 꾸지뽕 열매 발효물의 특성 및 장류제품 개발

이은실¹ · 조승화¹ · 임은정¹ · 김윤순¹ · 박해석¹ · 김명곤² · 조성호^{1*}

¹(재) 발효미생물산업진흥원, ²전북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Abstract

The aim of this study was to develop a new functional traditional fermented soybean food using *Cudrania tricuspidata* fruits and fermentation microbes isolated from traditional fermented food. *Aspergillus oryzae* koji, *Lactobacillus* sp., and *Bacillus* sp. were used for the selection of a suitable microbe for the fermentation of *Cudrania tricuspidata* fruits, and as a result, *Bacillus licheniformis* SCDB 1234 was selected. SCDB 1234 enhanced the concentration of kaempferol in the *Cudrania tricuspidata* fruits from 9.54 to 217.04 µg/g (about 22 times). The DPPH radical scavenging activity of the fermented materials was similar to that of BHA and BHT (92~99 ppm). The tyrosinase inhibitory activity was high with arbutin (95 ppm) and kojic acid (90 ppm). *Doenjang*-added fermentation materials of the *Cudrania tricuspidata* fruits were developed, and the organic acid, reducing sugar, and free amino acid of the developed *Doenjang* were analyzed. The pancreatic lipase inhibitory (PLI) activity and α-glucosidase inhibitory (AGI) activity of the fermentation materials of the *Cudrania tricuspidata* fruits and the developed *Doenjang* were investigated, and it was found that after fermentation, the PLI and AGI activities of the fermentation materials of the *Cudrania tricuspidata* fruits were higher than those before fermentation, and that the AGI activity of the developed *Doenjang* after aging (91.25±0.04%) was higher than that before aging (84.89±0.08%).

Key words : *Bacillus licheniformis*, agricultural resources, *Cudrania tricuspidata*, fermentation, fermented soybean food

서 론

꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽성 소교목 또는 관목으로 굻가시나무라고도 하며, 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등지에 주로 분포하는 식물이며, 약 10여종이 있으며 잎은 주로 뽕잎 대용으로 사용하

고, 열매는 주로 잼이나 술을 담그며, 나무의 껍질과 뿌리는 약용이나 종이의 원료로 이용된다(1). 생리활성과 관련하여 꾸지뽕나무의 부위별 용매 추출물이나 구조가 밝혀진 성분을 중심으로 항산화, α-glucosidase 저해, monoamine oxidase 저해, neuraminidase 저해활성, 시험관내 암세포 생육 저해활성, tyrosinase 저해활성, angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성, 항균활성, 신경독성 개선, 지질대사 및 간 기능 개선효과에 대한 연구결과들이 보고되어 있다(1-3).

꾸지뽕나무 성분에 관한 연구에서 밝혀진 다양한 기능성

*Corresponding author. E-mail : sunghyej3@nate.com
Phone : 82-63-653-9578, Fax : 82-63-653-9590
Copyright © Korean Journal of Food Preservation. All rights reserved.

은 본체는 주로 페놀성화합물인 것으로 알려져 있으며(4), 그 중 특히 quercetin과 kaempferol 및 그 배당체들이 주요성분임이 보고된 바 있다(5). flavonoid의 일종인 quercetin과 kaempferol은 많은 종류의 식물들에 함유되어 있으며, 다양한 생리활성을 발현하는 것으로 알려져 있어 생체내에서의 대사에 대한 연구들 또한 심도있게 행해지고 있다. flavonoid의 일부 화합물들은 항산화, 세포보호, 항암 및 간콜레스테롤생합성 저해와 같은 다양한 생리활성을 가진다고 보고되고 있다(6,7). 특히, kaempferol은 베리류, 양배추와 파류에서 발견되고 항산화 식이 화합물로 알려져 있다(8).

근래 꾸지뽕 나무의 건강 유용성에 대한 소비자의 관심 증대로 특정 지역을 중심으로 꾸지뽕 나무의 재배면적은 급속히 증가하고 있으며 재배농가의 소득증대와 안정적 재배면적 확보를 위해서는 고부가가치 제품의 개발과 제품의 다양화 기술개발이 절실히 요구되고 있다. 특히 꾸지뽕 나무의 열매는 단맛이 강하고 특유의 색소와 향을 지니고 있고 생산량도 많은 편이어서 적절한 가공기술만 개발한다면 우수한 식품 원료 또는 건강기능성 소재로 활용가치가 높은 원료이다.

이번 연구에서는 장류발효식품에서 유래한 *Bacillus*속 균주를 이용한 꾸지뽕열매의 발효를 수행하였다. 꾸지뽕열매 발효물의 항당뇨, 항비만 효과에 대한 기능성을 분석하고 장류제품 개발을 통하여 발효식품의 기능성소재로써 활용가능성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

꾸지뽕 열매 발효균주 선발

사용균주 및 꾸지뽕 열매 발효

냉동 꾸지뽕 열매를 마쇄하여 열매 무게의 2배량의 수도수에 현탁시킨 후 100°C에서 1시간 살균한 후 순창장류에서 증자살에 *Aspergillus oryzae*(Chungmubalhyo, Ulsan, Korea)로 제조한 koji, 재단법인발효미생물산업진흥원으로부터 분양받은 *Lactobacillus* 6종(*Pediococcus pentosaceus* SRCM100444, *Weissella kimchi* SRCM100473, *Leu. paramesenteroids* SRCM100474, *Leuconostoc citreum* SRCM100478, *Enterococcus faecium* SRCM100482, *Lactobacillus paraplantarum* SRCM100483)과 *Bacillus* 2종(*B. subtilis* 19, *B. licheniformis* SCDB 1234) 균을 접종하여 37°C에서 72시간 배양한 후 동결 건조하였다. 동결건조한 시료를 분말로 분쇄한 다음 -20°C에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

시료의 전처리

Phenolic acid 및 flavonoid분석을 위한 시료는 분말 2

g을 취하여 100% methanol 30 mL를 가하여 0.5시간 동안 초음파 처리한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 위의 과정을 3번 반복하였으며 상등액을 모두 합하여 45°C에서 감압 농축하여 용매를 모두 증발 시켜 100% methanol 4 mL에 용해하였다. 이것을 0.45 µm NYLON syringe filter로 여과한 후 분석용 시료로 사용하였다.

DPPH 자유라디칼 소거활성 및 tyrosinase 저해활성 분석을 위한 분석용 시료는 *B. licheniformis* SCDB 1234균으로 발효하여 동결건조하여 사용하였다. 각 시료 1 g씩을 취해 methanol 30 mL를 가하여 0.5시간 동안 초음파 처리 후 원심분리하였다. 위의 과정을 3번 반복하여 상등액만을 모아 45°C에서 농축한 후 2 mL methanol에 녹여 0.45 µm NYLON syringe filter로 여과 후 20배 희석하여 사용하였다.

Phenolic acid 및 flavonoid 분석

Phenolic acid와 flavonoid 조성은 HPLC를 사용하여 분석하였다. HPLC 기기는 Sycam(Germany)사의 S2100 pump, S5200 autosampler와 S3210 photo-diode array(PDA) 검출기를 사용하였다. Column은 Waters사의 sunfire ODS C₁₈(4.6×250 mm, i.d. 5 µm)와 C₁₈ guard column(4.6×20 mm, i.d. 5 µm)을 사용하였다. 성분 분리는 gradient mode로 하였으며, 이동상 A는 0.1% formic acid in 10% acetonitrile, 이동상 B는 0.1% formic acid in 90% acetonitrile을 사용하여 기울기 용리 조건에서 분석하였다. 분석은 상온에서 실시하였으며 유량은 1.0 mL/min, injection volume은 20 µL, 검출기 파장은 280 nm로 하여 분석하였다. 기울기 용리 조건은 100% A/0% B at 0 min, 100% A/0% B at 2 min, 90% A/10% B at 4 min, 37% A/63% B at 25 min, 50% A/50% B at 10 min, 100% A/0% B at 4 min으로 하였다.

DPPH 자유라디칼 소거활성

DPPH에 의한 자유라디칼 소거활성은 Blois의 방법(9)을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 20 µL와 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 80 µL 및 500 µM DPPH in methanol 용액 100 µL를 96-well plate에 넣고 실온에서 30분간 방치한 다음 ELISA microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로서는 BHA(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 BHT(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. DPPH 자유 라디칼 소거활성은 다음과 같이 계산하였으며, 각 시료는 3반복 측정하여 평균값으로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A : absorbance of sample

B : absorbance of blank

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해활성은 Jung 등(10)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 35°C의 수조에서 온도를 미리 조정하여 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 60 µL, 5 mM L-DOPA 용액 60 µL 및 시료 40 µL를 96-well plate에 넣고 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 60 µL를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 ELISA microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로서는 arbutin(Sigma-Aldrich Co., USA)과 kojic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. tyrosinase 저해활성은 다음과 같은 식에 의해 계산 하였으며, 각 시료는 3반복 측정하여 평균값으로 표시하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition rate(\%)} \\ = [1 - (A_{\text{sample}}(475 \text{ nm}) / A_{\text{control}}(475 \text{ nm}))] \times 100$$

꾸지뽕 열매 된장의 제조와 품질분석

된장 제조

꾸지뽕 열매 발효물(fermentation materials of fruits of *Cudarnia tricuspidata*, FMFCT)을 첨가하여 된장을 제조하였다. 된장은 메주를 제조한 뒤 3개월 염수침지 후 장분리된 메주(숙성전 된장, *Doenjang*)와 숙성 1년 후의 된장(숙성후 된장, *Aged Doenjang*)을 사용하였으며, 순창문육례식품에서 제공받아 사용하였다. 꾸지뽕 열매 발효물의 첨가량을 무첨가(이하 0%), 3%, 5%, 7% 및 10%씩 숙성전 된장과 숙성후 된장에 각각 첨가하였고, 첨가후 4주간 숙성하여 주차별로 샘플링하여 분석에 이용하였다.

된장 품질분석

유기산과 유리당의 분석은 시료 5 g에 증류수 45 mL를 가하여 1시간동안 균질화 시킨 후 0.45 µm membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge(MeOH 2 mL, Water 2 mL로 활성화)에 통과시킨 후 HPLC로 분석하였다. 유기산의 column은 Aminex column HPX-87H(300×7.8 mm)을 사용하였으며, column 온도는 60°C, mobile phase는 0.01 N H₂SO₄, flow rate는 0.6 mL/min, injection volume은 20 µL, 검출기는 Agilent Detector DAD 210 nm로 분석하였다. 유리당의 column은 Ashipak NH2P-504E(4.6 mm×250 mm)을 사용하였으며, column 온도는 35°C, mobile phase는 acetonitrile/water 75:25(v:v), flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 20 µL, 검출기는 RI-detector(Shiseido SI 2)로 분석하였다

유리아미노산은 시료 2 g을 취하여 3차 증류수 30 mL 넣고 교반한 후 50 mL로 정용한수 초음파를 이용하여 20분간 추출한 후 원심분리(3000 rpm, 10분)한 다음 상등액 2 mL에 5% TCA 2 mL를 넣은 후 원심분리(10,000 rpm, 10분)한 후 상등액을 취하여 0.02 N-HCL로 희석한 후 0.2 µm syringe filter에 통과시킨 후 아미노산분석기(Amino acid

analysis(Hitachi L-8900, Hitachi High Technologies America, Inc., USA)로 분석하였다. 이 때 column은 hitachi 4.6×60 mm(speration), hitachi 4.6×40 mm(ammonia filtering)을 사용하였으며, column 온도는 50°C, mobile phase는 buffer set(PH-SET KANTO), flow rate(mL/min)는 buffer 0.4, ninhydrin 0.35, injection volume은 20 µL였다.

기능성 평가

시료의 준비

꾸지뽕 열매 발효물(fermentation materials of fruits of *cudarnia tricuspidata*, FMFCT) 및 된장에 꾸지뽕 열매 발효물을 농도별로 첨가 후 숙성시켜 시료로 사용하였고 모든 시료는 동결 건조하여 -80°C에서 보관하였다.

항비만 시험은 동결 건조된 시료에 10배량의 80% 메탄올을 가하여 24시간동안 실온에서 진탕 추출하였다. 추출물은 원심분리기(US/Legend Micro 17, SORVALL, Germany)로 3,500 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 잔사는 이와 동일한 방법으로 1회 반복 추출하여 이를 질소농축기로 농축한 후 동결건조기로 건조하여 -80°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시료는 3차 증류수를 이용하여 500 mg/mL 농도의 stock solution을 만들고, membrane filter(0.2 µm, satorius)로 여과한 후 항비만 실험에 사용하였다.

항당뇨 시험은 동결건조한 분말시료 2 g에 70% 에탄올 18 mL를 가하여 20°C에서 10시간 동안 진탕추출한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 분석시료로 사용하였다.

Pancreatic lipase 저해 활성

Lipase 저해활성은 Jung 등(11)의 방법을 변형하여 측정하였다. Porcine pancreatic lipase 0.3 mg에 10 mM MOPS와 1 mM EDTA(pH 6.8)를 포함하는 buffer를 30 µL를 넣고 tris buffer(100m M tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)를 850 µL 첨가하여 enzyme buffer를 준비하였다. Enzyme buffer에 시료 20 µL를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 10 mM p-nitrophenyl butyrate(Sigma-Aldrich Co., USA) 20 µL를 첨가하여 다시 37°C에서 15분간 반응시켰다. p-nitrophenyl butyrate가 p-nitrophenol로 가수분해된 정도를 Elisa reader (Infinite 200 TECAN, Bio tex, Austria)를 사용하여 흡광도 400 nm에서 측정하였다. Lipase 저해활성(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Pancreatic lipase inhibitory activity(\%)} = [1 - (B - C) / A] \times 100$$

A : Absorbance without addition of the sample

B : Absorbance of the sample

C : Absorbance without addition of the enzyme

α-glucosidase inhibitory (AGI) 활성

AGI 활성은 Watanabe 등(12)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 50 μL에 0.5 U/mL α-glucosidase 효소액 50 μL (in 0.1M PBS, pH 6.8)을 혼합하여 37°C에서 10분 동안 pre-incubation하였다. 3 mM p-NPG(p-nitro-phenyl-α-glucopyranoside, in 0.1 M PBS, pH 6.8) 100 μL를 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.1M Na₂CO₃ 100 μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol의 양을 분광광도계(Infinite M200, Bio-tex)를 사용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다. 각 시료의 AGI 활성은 다음 식에 의해 시료 반응구와 무처리구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$AGI \text{ activity}(\%) = [1 - (As - Ab) / Ac] \times 100$$

As : Absorbance of the sample

Ab : Absorbance without addition of the enzyme

Ac : Absorbance without addition of the sample

통계처리

실험결과 중 항비만 활성 결과에 대하여 Minitab 16 statistical program(Minitab Inc.)을 사용하여 분산분석(ANOVA) 하고, 이중 꾸지뽕 발효물의 항비만 활성은 사후검정(Tukey)을 실시하였으며, 꾸지뽕을 이용한 된장의 항비만 활성은 공변량분석(ANCOVA, generally linear model)을 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

꾸지뽕 열매 발효균주 선발

꾸지뽕 열매를 *A. oryzae* koji, *Lactobacillus* 6종, *Bacillus*

2종의 균을 접종하여 37°C에서 72시간 발효시킨 결과, 대부분의 발효 미생물들에 의하여 꾸지뽕 열매 발효물의 polyphenol류 및 flavonoid 함량이 크게 증가하는 경향을 보였다. 특히 *A. oryzae* koji에 의한 발효에서는 protocatechuic acid(487.53 μg/g)가, *Lactobacillus*속 균들에 의해서는 chlorogenic acid(207.08~365.82 μg/g)가 발효에 의해서 크게 증대하는 것으로 나타났다(Table 1). 기능성 flavonoid 성분으로는 kaempferol이 대부분의 균주들에 의하여 큰 폭으로 증가되었는데 무발효 꾸지뽕의 9.54 μg/g에 비해 발효 꾸지뽕의 경우 57.89~217.04 μg/g의 범위로 거의 10배 정도 함량이 증가되는 경향을 보여 열매 중의 kaempferol은 배당체 형태로 존재하다가 발효 미생물들의 발효·분해에 의하여 aglycone인 kaempferol 함량이 크게 증가하는 것으로 보인다. 그 중에서도 *B. licheniformis* SCDB 1234균주는 원료 중의 kaempferol 함량인 9.54 μg/g 대비 217.04 μg/g으로 약 22배의 높은 생성율을 보여 향후 꾸지뽕 열매의 기능성 분 증강에 우수한 균으로 평가되었다. Seo 등(13)도 꾸지뽕 열매의 유산균 발효에 의하여 꾸지뽕 열매에 함유된 폴리페놀의 함량이 약 47% 증가된다고 보고한 바 있다.

우수 균주로 선발한 *B. licheniformis* SCDB 1234균주로 꾸지뽕 열매를 상온에서 7일간 발효시키면서 경시적으로 성분변화를 검토한 결과(Table 2, Fig. 1), phenolic acid 성분들보다 taxifolin, quercetin, kaempferol 등과 같은 flavonoid 성분들의 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다. Taxifolin은 1.8배, quercetin은 2.4배, kaempferol(188.31 μg/g)은 약 8배의 함량 증가를 보여 *B. licheniformis* SCDB 1234균주는 꾸지뽕 열매의 기능성 flavonoid 함량 증대에 우수한 균주임이 확인되었다. 이들 기능성 flavonoid의 발효기간에 따른 변화는 배양 6일째에 가장 높게 나타났다. kaempferol은 혈당 감소, 고지혈증 억제 등에 효과가 있다는 실험 결과들이 보고되어 있다(14,15). 또한, 항산화, 항염증, 항균 작용

Table 1. Phenolic acid and flavonoid contents of fermented *Cudrania tricuspidata* fruits.

Compounds	Control	Koji	BS 19 ¹⁾	BL SCDB 1234 ²⁾	483 ³⁾	482	474	473	444	478	(unit; μg/g)
Protocatechuic	-	487.53	50.15	300.35	-	131.49	284.53	263.13	188.83	32.55	
Chlorogenic	-	-	-	-	207.08	365.82	248.46	272.97	248.09	212.25	
Caffeic	171.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rutin	189.98	57.96	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ferulic	-	-	-	6.03	-	-	-	-	5.95	-	
Taxifolin	33.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
t-m-Coumaric	-	-	-	-	-	-	19.73	0.61	0.61	-	
Myricetin	-	-	-	-	34.66	40.57	52.74	-	-	42.71	
Salicylic	36.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
t-Cinnamic	2.84	13.60	-	7.85	-	-	-	-	-	-	
Kaempferol	9.54	81.77	57.89	217.04	102.00	71.20	62.93	91.19	109.36	64.80	

¹⁾BS 19, *Bacillus subtilis* 19; ²⁾BL SCDB 1234, *Bacillus licheniformis* SCDB 1234; ³⁾483, 482, 474, 473, 444 & 478, kinds of lactic acid bacteria

이 있고, 암세포의 사멸(apoptosis)을 유도하여 항암작용에 관여하는 것으로 알려져 있어(16-18) 꾸지뽕 열매의 발효물은 우수한 기능성 소재로 충분한 가치가 있음을 확인할 수 있었다.

Kang 등(19)도 *B. licheniformis*와 *B. subtilis* 균주로 꾸지뽕 열매를 발효하고 70% ethanol추출물 중의 polyphenol류는 각각 35.67%와 46.37%가 증가하였고, total flavonoid 함량 역시 대조구에 비하여 각각 25.97% 및 20.13%가 증가하였다는 보고와 유사한 경향을 보였다. Baek(20)은 *B. licheniformis* 균주로 40°C에서 48시간 발효시킨 청국장의 polyphenol 함량은 발효하기 전에 비하여 38.05%가 증가한다고 하였고, Lee 등(21)은 *B. subtilis* 균주로 40°C에서 24시간 발효시킨 탈지대두 grits 발효물의 80% ethanol 추출물은 total polyphenol 및 flavonoid 함량이 발효시키기 전에 비하여 3.8~4.8배 증가한다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 균주 발효군에서 total polyphenol 및 flavonoid 함량이 증가한 현상은 발효과정 중에 분해되거나 새롭게 합성되는 성분에 의한 결과로 사료된다(22).

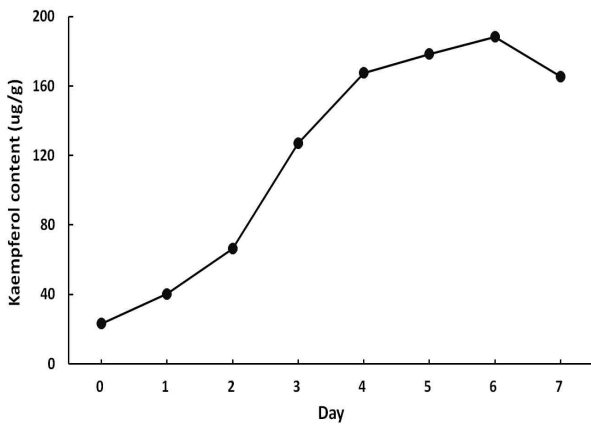


Fig. 1. Changes of kaempferol contents during fermentation.

꾸지뽕 열매 발효물의 생리활성 측정

발효기간에 따른 꾸지뽕 열매 발효물의 생리활성을 검토하고자 DPPH법에 의한 항산화활성과 tyrosinase 저해활성을 조사한 결과는 각각 Fig. 2A 및 Fig. 2B와 같다. 꾸지뽕은 polyphenol류와 flavonoid류가 풍부하여 기본적으로 높은 항산화력을 가지고 있기 때문에 발효균 처리에 의한 항산화활성(DPPH법)의 비교를 위하여 발효물 시료를 20배 희석하였음에도 불구하고 DPPH radical 소거활성이 50~57% 수준으로 양호한 활성을 보였다. 대조구로 사용한 BHA, BHT과의 비교 결과 발효 꾸지뽕은 BHA, BHT의 92~99 ppm 농도와 유사한 항산화 활성을 보여 항산화활성이 우수한 면을 보이고는 있으나 발효에 의하여 polyphenol류와 flavonoid류의 증가에 따른 변화가 그리 높지 않았던 것은 분석시료의 희석에 의한 영향도 있겠지만 가장 크게 증가한 (약 8배) kaempferol의 영향도 상당히 미쳤을 것으로 판단된다. Villa 등(23)은 보통 식물체에서 발견되는 polyphenol류와 flavonoid류를 대상으로 DPPH 소거활성을 비교한 결과 kaempferol의 DPPH radical 소거활성에 대한 EC₅₀값이

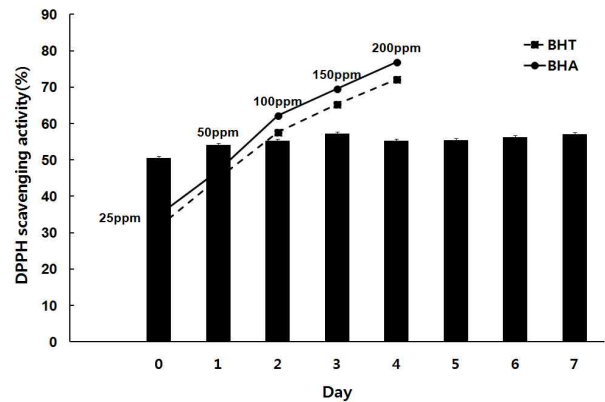


Fig. 2A. Changes of anti-oxidation activity of fermented *Cudrania tricuspidata* fruits by *B. licheniformis* SCDB 1234 during fermentation periods.

Table 2. Contents of phenolic acid and flavonoids during fermentation of *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234.

(unit; µg/g)

Compounds	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Protocatechuic	45.22	47.40	51.22	88.27	96.44	76.23	67.77	37.16
Chlorogenic	162.10	93.96	76.04	126.49	135.68	158.10	170.99	133.16
Isovanillic	61.78	-	-	-	-	-	-	-
Ferulic	48.22	24.43	41.20	44.32	59.88	47.66	42.81	35.20
Taxifolin	84.02	97.17	100.20	111.21	113.90	133.30	150.30	125.94
Quercetin	88.47	93.89	120.25	165.25	180.33	198.84	208.61	153.20
Kaempferol	23.20	40.25	66.32	127.06	167.49	178.39	188.31	165.51
Total	489.81	357.85	390.91	538.54	590.23	619.13	646.48	491.66

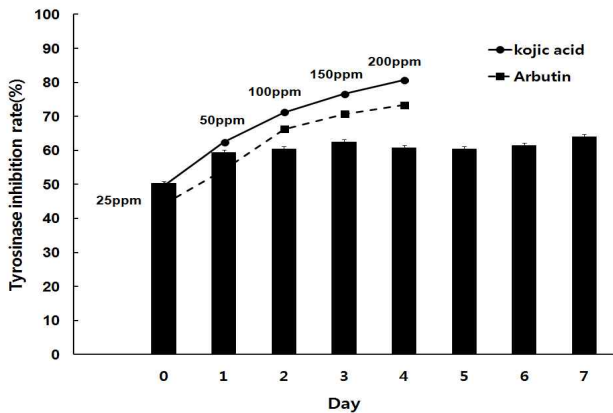


Fig. 2B. Changes of tyrosinase inhibition rate of fermented *Cudrania tricuspidata* fruits by *B. licheniformis* SCDB 1234 during fermentation periods.

18.8×10⁻³ mM으로 타 polyphenol류와 flavonoid류에 비하여 현저히 낮다고 보고한 바 있어 이의 영향이 컸을 것으로 추측된다.

Tyrosinase 저해활성도 20배 희석한 시료에 대하여 대조구로 arbutin과 kojic acid와 비교분석한 결과 시료를 20배 희석하였음에도 불구하고 50~64%의 저해활성을 보여 발효 꾸지뽕은 우수한 미백용 소재로서의 가능성을 보였고 이때의 활성은 arbutin이나 kojic acid의 95 ppm과 90 ppm와 같은 양호한 저해활성을 나타내었다. 발효기간에 따른 변화는 발효 초기부터 증가하였고 그 이후의 변화는 비교적 적었다. Kang 등(19)도 *B. licheniformis*와 *B. subtilis* 균주로 꾸지뽕 열매를 발효하고 70% ethanol추출물에 대한 ABS 라디칼 소거능, SOD 유사활성, ferrous ion chelating 효과와 tyrosinase 저해활성 등이 균주발효균에서 활성이 증가하여 발효 꾸지뽕열매는 기능성 증진용 소재로 활용가치가 높다고 주장한 바 있다.

꾸지뽕 열매 된장의 제조와 품질분석

꾸지뽕 열매 발효물의 첨가 시점에 따라 숙성전 된장과 숙성후 된장으로 구분하였다. 숙성전 된장은 3개월간 염수 침지후 장분리한 메주에 첨가하였고, 숙성후 된장은 1년간 숙성시킨 된장에 첨가하여 4주간 발효패턴을 분석하였다. 숙성기간 중 꾸지뽕 열매 발효액의 첨가량을 무첨가, 3%, 5%, 7% 및 10%로 하여 시료별 변화를 측정하였다.

유기산의 함량은 유기산의 종류에 따라 상이한 결과를 보였다(Table 3). Citric acid는 숙성이 진행될수록 감소하는 경향을 보였고, 숙성후 된장보다 숙성전 된장에서의 함량이 높게 나타났다. Lactic acid는 된장에 비해 숙성후 된장이 현저히 높은 값을 나타내었으며, citric acid와는 반대로 숙성이 진행될수록 증가하였다. 본 연구결과는 재래식 된장에서 lactic acid가 가장 높은 함량을 나타내었다는 연구결과(24)와 일치하였다.

Acetic acid는 숙성전 된장 실험구의 경우 숙성 2주차에는 증가하였지만 숙성 4주차에는 감소하는 경향을 보였고, 발효물이 첨가되지 않은 실험구에서는 0일차에는 검출되지 않았지만 2주차에는 급격하게 증가했음을 알 수 있었다. 반면 숙성후 된장의 경우, 숙성이 진행될수록 acetic acid의 함량은 감소하였다. 이는 호기성균인 초산균의 일시적인 증식에 의해 증가된 초산이 혐기적인 된장의 발효조건에 따라 숙성기간에 따라 초산이 감소하는 경향을 보이는 것으로 사료된다. 숙성전 된장의 succinic acid는 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으나 그 양은 미비한 수준이었다. Oxalic acid의 경우는 숙성이 진행되면서 숙성전 된장에서는 전반적으로 감소하는 경향이였으며 숙성후 된장에서는 숙성기간에 상관없이 비슷한 수치를 보였다. 이는 oxalate, malate, citrate, succinate 순으로 함유하고 있다는 결과(25)와는 상이한 결과였다.

유리당 중 fructose는 숙성전 된장과 숙성후 된장 모두에서 0일차에는 검출 되었지만, 숙성이 진행되면서 검출되지 않았다. Glucose는 숙성전 된장의 경우 전반적으로 숙성이 진행될수록 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다. Sucrose는 숙성 0일차에서만 검출되었으며 숙성전 된장은 발효액이 첨가되지 않은 실험구에서만 검출되었다. Maltose는 숙성전 된장의 경우 숙성이 진행될수록 증가하는 경향을 보였으며, 숙성후 된장은 꾸지뽕열매 발효액의 첨가량에 따라 일정한 패턴을 보이지는 않았다(Table 4). 본 연구결과의 유리당 함량은 된장의 유리당의 함량중 glucose가 가장 높게 나타났다는 연구결과(26)와 유사하였다.

유리아미노산을 분석한 결과(Table 5), 숙성전 된장의 경우 발효물을 첨가한 후 숙성이 이루어지기 때문에 숙성이 진행될수록 유리아미노산이 증가하였지만, 숙성후 된장은 숙성이 상당부분 진행된 시점에 발효물을 첨가하였기 때문에 발효물이 유리아미노산에 미치는 영향이 낮은 것으로 판단된다. 숙성전 된장과 숙성후 된장 모두 꾸지뽕 열매 발효물 첨가량에 따라 유리아미노산의 유의적인 증가나 감소의 경향은 보이지 않았다. 재래된장에서 맛에 대한 기여도는 leucine과 isoleucine 같은 쓴맛 성분이 가장 큰 영향을 미치며, 다음으로 cysteine, aspartic acid, glutamic acid와 같은 구수한 맛 성분이 영향을 미친다고 보고 되고 있다 (27). 본 연구결과 꾸지뽕 된장의 구수한 맛 성분으로는 glutamic acid가 aspartic acid의 함량보다 높은 결과를 나타내었는데 이는 전통된장에서 glutamic acid가 aspartic acid보다 더 많이 존재한다는 보고(28)와 유사하였다. 이는 꾸지뽕 열매 발효물의 첨가가 된장의 맛성분의 패턴에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

기능성 평가

Pancreatic lipase 저해 활성

Pancreatic lipase는 지방질 가수분해 효소로 triglyceride

Table 3. Changes of organic acid during aging of *Doenjang* with *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234.

(unit ; mg/kg)

		<i>Doenjang</i> (10^3)				
		0%	3%	5%	7%	10%
Citric acid	0 weeks	1163.05	954.72	921.38	829.11	817.46
	2 weeks	526.25	504.64	629.23	629.27	729.82
	4 weeks	439.69	305.73	518.05	602.51	639.31
Lactic acid	0 weeks	601.13	611.87	602.70	629.21	581.91
	2 weeks	814.96	1223.50	799.79	888.12	1055.65
	4 weeks	897.13	1590.57	917.95	1000.79	1025.35
Acetic acid	0 weeks	6.20	151.18	30.95	90.92	130.98
	2 weeks	331.19	457.50	330.62	326.25	314.72
	4 weeks	244.83	373.18	276.62	199.53	235.22
Succinic acid	0 weeks	-	-	-	-	-
	2 weeks	37.15	39.87	24.06	20.85	16.84
	4 weeks	40.29	31.81	31.41	31.78	30.87
Oxalic acid	0 weeks	10.98	9.81	7.71	7.79	5.75
	2 weeks	7.06	7.99	7.01	6.14	5.38
	4 weeks	7.97	8.80	5.81	5.43	5.12
		Aged <i>Doenjang</i> (10^3)				
		0%	3%	5%	7%	10%
Citric acid	0 weeks	587.90	562.42	468.13	438.05	381.95
	2 weeks	439.40	367.50	391.47	346.30	399.07
	4 weeks	354.67	375.72	361.94	349.55	359.77
Lactic acid	0 weeks	630.81	1563.18	1350.55	1231.22	1364.75
	2 weeks	1302.68	1279.68	1224.74	1394.71	1513.83
	4 weeks	1025.84	1352.89	1151.19	1412.34	1334.33
Acetic acid	0 weeks	-	207.20	165.86	174.03	188.76
	2 weeks	126.99	115.35	97.57	131.06	162.24
	4 weeks	64.75	68.02	63.52	54.78	69.55
Succinic acid	0 weeks	-	36.48	31.57	13.82	27.80
	2 weeks	27.47	31.98	31.42	32.54	31.79
	4 weeks	23.93	33.34	28.96	34.09	33.30
Oxalic acid	0 weeks	8.65	9.27	8.14	8.23	9.12
	2 weeks	8.98	8.65	8.42	7.84	7.35
	4 weeks	7.81	8.28	8.76	7.73	7.96

의 에스테르 결합을 가수분해시켜 glycerol 과 fatty acid로 분해한다. 섭취한 지방은 lipase의 작용에 의해 주로 monoglyceride와 fatty acid로 분해되어 담즙산염과 미셀을 형성해서 흡수된다. 흡수된 지방산은 소장상피세포에서 triglyceride로 재합성되어 순환혈액 속에 들어가고 간장, 지방조직, 근육 등으로 보내져 사용되고 남은 triglyceride는 각 조직에 축적된다. 이때 지방의 축적이 과도하면 비만을 초래할 수 있다. 지방 흡수의 중요한 역할을 하는 lipase의

활성저해를 통해 지방이 체내에 소화, 흡수 되지 않고 체외로 배설되게 함으로 지방의 축적을 막을 수 있다(29).

꾸지뽕 열매 발효물의 pancreatic lipase 저해활성을 측정 한 결과는 Fig. 3와 같다. 발효물은 발효 전 보다 발효 후에 더 높은 저해능을 나타내었으며, 발효 후의 저해능은 농도 의존적임을 알 수 있었다. 꾸지뽕 발효물은 대체적으로 $68.68 \pm 1.81 \sim 86.49 \pm 0.33\%$ 의 높은 저해능을 나타내어 꾸지뽕이 보유한 lipase 저해 물질이 항비만을 유도할 수 있을

Table 4. Changes of reducing sugars during aging of Doenjang with *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234. (unit ; mg/kg)

		<i>Doenjang</i>				
		0%	3%	5%	7%	10%
Fructose	0 weeks	24413.41	20694.5	13389.6	15905.93	17800.32
	2 weeks	871.41	-	-	-	-
	4 weeks	-	-	-	-	-
Glucose	0 weeks	71493.03	3180.7	5521.045	6426.24	6704.76
	2 weeks	4962.79	4373.65	5752.85	6147.05	5607.36
	4 weeks	3199.89	3310.74	3921.69	3131.0	3022.76
Sucrose	0 weeks	2491.19	-	-	-	-
	2 weeks	-	-	-	-	-
	4 weeks	-	-	-	-	-
Maltose	0 weeks	684.80	245.25	128.78	240.23	240.72
	2 weeks	541.56	702.665	753.45	672.80	772.84
	4 weeks	723.17	859.65	911.94	647.32	582.03
		<i>Aged Doenjang</i>				
		0%	3%	5%	7%	10%
Fructose	0 weeks	9906.41	7548.12	7470.66	12195.27	16209.35
	2 weeks	717.34	-	-	-	-
	4 weeks	-	-	-	-	74.08
Glucose	0 weeks	132817.5	-	-	-	-
	2 weeks	69194.03	-	-	-	-
	4 weeks	-	-	-	-	280.43
Sucrose	0 weeks	1921.77	1608.39	1470.05	92.34	-
	2 weeks	-	-	-	-	-
	4 weeks	-	-	-	-	-
Maltose	0 weeks	548.49	825.0	444.07	526.16	468.33
	2 weeks	264.05	555.40	582.16	552.34	564.25
	4 weeks	448.65	380.63	357.35	-	740.32

것이라고 추측할 수 있었다. Jo(30)에 따르면 꾸지뽕을 추출하여 분리 정제한 결과, isocudraniaxanthone B, cudracuspixanthone A 등이 동정되었는데 이들 화합물이 가장 높은 pancreatic lipase 저해능을 나타내어 위 발효물 중에서도 이와 유사한 화합물들의 역할이 컸을 것으로 사료되어진다.

메주에서 염수를 분리하여 숙성시키기 전에 꾸지뽕 열매 발효물을 0, 5, 10%로 첨가하여 만든 숙성전 된장의 pancreatic lipase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 4A와 같다. 숙성 0주에서는 꾸지뽕 발효물을 10% 첨가한 된장이 첨가하지 않은 된장에 비해 소량 높은 저해능을 나타내었으나, 숙성 후에는 5% 첨가한 된장이 다른 처리구에 비해 더 높은 저해능을 보여주었다. 또한 숙성 0주에는 처리구별로 농도 의존적인 결과를 나타내었으나 숙성 후에는 250 mg/mL에서 가장 높은 저해능(83.25±3.29~83.68±3.31%)

을 보여주었다. 저해능에 대한 공변량분석(ANCOVA, generally linear model) 결과, 숙성전(0일차)과 후(4주차) 시료간에는 유의적 차이를 나타내지 않았고(p=0.71), 꾸지뽕 발효물의 첨가 농도 구간(0%, 5%, 10%)에서도 유의적인 차이를 보이지 않았는데, 이는 꾸지뽕 열매 발효액의 첨가 여부에 관계없이 된장에 의한 항비만 효과를 보인 것으로 사료된다.

숙성이 완료된 된장에 0, 5, 10%의 농도로 꾸지뽕 열매 발효물을 첨가하여 제조한 숙성후 된장의 pancreatic lipase 저해활성은 Fig. 4B와 같다. 꾸지뽕 발효물의 첨가 농도에 의존한 결과는 나타나지 않았다. 하지만 대체적으로 57.79±2.98~91.09±6.82%의 저해능을 나타내었으며, 숙성 0일차 250 mg/mL의 농도에서 높은 저해능을 나타내었다. 저해능에 대한 공변량분석 결과에서는 숙성전(0일차)과 후

Table 5. Changes of free amino acids during aging of *Doenjang* with *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234. (unit ; mg/kg)

		Aspartic acid			Glutamic acid			Omitine		
		Oday	2week	4week	Oday	2week	4week	Oday	2week	4week
<i>Doenjang</i>	0%	121.2	304.9	444.6	263.0	518.2	262.7	6.1	9.4	27.3
	3%	112.1	297.3	415.2	235.0	522.5	238.6	6.5	39.1	96.8
	5%	93.6	314.1	426.3	245.9	694.4	827.0	7.1	17.6	36.4
	7%	78.1	225.8	331.2	199.9	105.8	578.6	6.1	9.6	43.9
	10%	71.6	223.4	334.8	167.6	62.3	565.6	5.9	12.1	19.6
<i>Aged Doenjang</i>	0%	275.9	285.5	246.1	754.5	757.3	207.1	71.6	70.3	58.4
	3%	230.6	216.1	257.1	622.7	568.7	216.3	59.6	52.9	61.3
	5%	212.1	238.6	246.8	568.3	621.3	209.1	54.1	58.2	58.9
	7%	202.0	224.3	173.5	538.8	582.5	674.5	51.3	54.2	62.3
	10%	222.1	252.5	164.5	590.8	645.4	654.7	56.7	61.0	60.6
		Valine			Leucine			Tyrosine		
		Oday	2week	4week	Oday	2week	4week	Oday	2week	4week
<i>Doenjang</i>	0%	1884.2	1711.0	1807.5	197.1	463.4	587.4	71.8	188.7	228.6
	3%	1712.4	1627.3	1637.5	172.7	436.0	521.2	67.3	181.6	210.9
	5%	1545.1	1703.3	702.5	148.8	445.2	508.7	54.0	193.6	220.0
	7%	1503.1	1455.1	711.4	144.0	391.8	466.5	50.9	170.2	217.0
	10%	1400.3	758.1	1856.5	132.1	294.6	522.6	47.0	233.8	239.8
<i>Aged Doenjang</i>	0%	2101.9	643.8	944.0	506.6	507.1	427.6	282.4	281.7	237.4
	3%	800.7	471.8	1004.2	410.5	382.5	445.7	203.2	206.3	233.8
	5%	1384.5	628.4	1362.5	384.4	417.9	437.2	193.8	220.9	240.5
	7%	1926.2	1226.6	754.3	370.7	397.0	455.9	187.8	211.8	253.4
	10%	2116.8	2096.4	1597.2	408.1	447.5	445.4	223.0	243.3	226.9

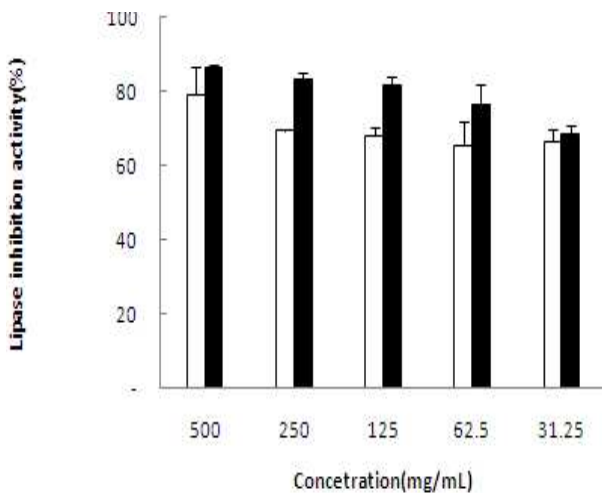


Fig. 3. Pancreatic lipase inhibitory activity in fermentation materials of *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234.

□, Before fermentation; ■, After fermentation. Data represent the mean±SD of at least three independent experiments. Different alphabetical letters mean significantly different at p<0.05.

(4주차)의 시료간에는 유의적 차이를 나타내지 않았다 (p=0.30).

대체적으로 숙성전 된장이 숙성후 된장에 비해 더 높은 저해능을 나타내었다. 이는 꾸지뽕 발효물과 된장이 숙성 중에 미생물들과 꾸지뽕 발효물에 들어있는 화합물의 작용이 활발히 진행되어진 결과라고 사료되어진다.

α-glucosidase inhibitory(AGI) 활성

α-Glucosidase는 α-amylase에 의해 분해된 당질을 최종적인 단당류로 전환시킨다. 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연시킴으로 식후 당 농도를 제한한다고 보고되고 있다(31). 또한 α-Glucosidase 저해제는 제2형 당뇨와 같은 당질 관련 질병을 위한 치료제 개발에 유용하다고 제시하고 있다(32).

꾸지뽕 열매 발효액을 제조하여 AGI활성을 비교 분석한 결과는 Fig. 5A와 같다. 꾸지뽕 열매의 발효전 AGI활성은 89.27±0.59~89.78±0.35% 이었으며, 발효후에는 93.60±1.14~95.95±0.32%로 발효전보다 발효후가 높게 측정되었다.

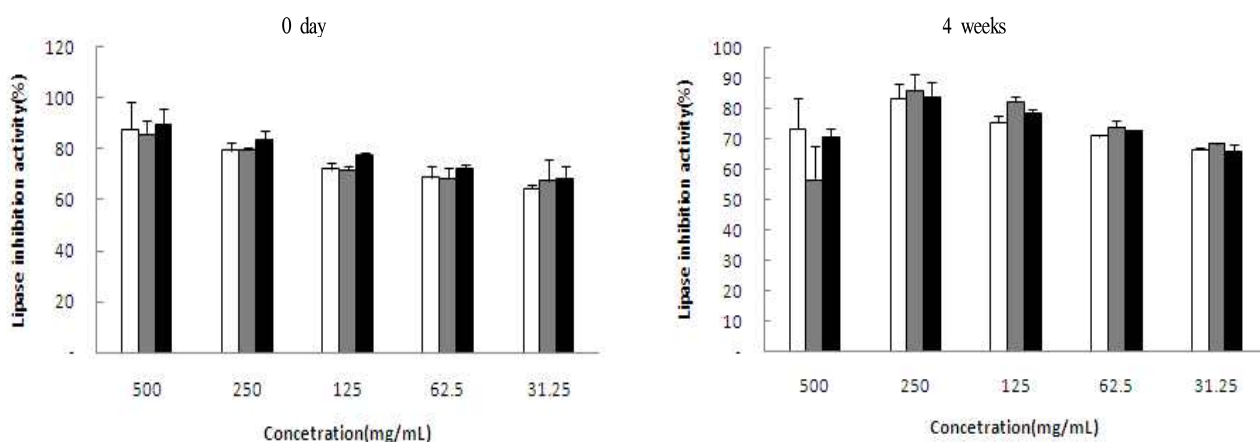


Fig. 4A. Pancreatic lipase inhibitory activity in *Doenjang* added fermentation materials of *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234 in process before aging.

□, 0%; ■, 5%; ■, 10%. Data represent the mean±SD of at least three independent experiments.

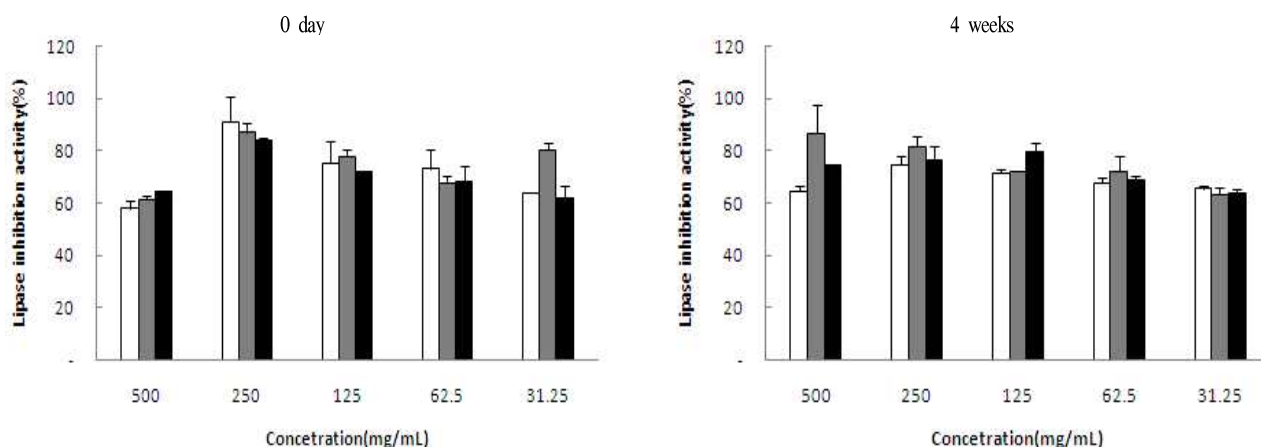


Fig. 4B. Fig. 5. Pancreatic lipase inhibitory activity in *Doenjang* added fermentation materials of *Cudrania tricuspidata* fruits by using *B. licheniformis* SCDB 1234 in process after 1 year aging.

□, 0%; ■, 5%; ■, 10%. Data represent the mean±SD of at least three independent experiments.

꾸지뽕 열매 발효액을 첨가한 숙성전 된장과 숙성후 된장에 대하여 AGI 활성을 측정한 결과는 Fig. 5B와 같다. 숙성전 된장의 경우 발효 0일차(63.26±0.02~65.26±0.08%) 보다 발효후인 숙성 4주차(70.25±0.69~84.89±0.08%)의 AGI 활성이 높게 나타났으며, 숙성후 된장도 발효 0일차(63.32±0.08~67.44±0.08%)보다 발효4주차(74.55±0.04~91.25±0.04%)의 AGI 활성이 높게 나타났다. 꾸지뽕 열매 발효액을 10% 첨가한 숙성전 된장의 AGI 활성은 84.89±0.08%, 숙성후 된장은 91.25±0.04%를 나타내어 숙성후 된장이 높게 나타났다. Lee 등(33)이 24종의 된장메탄올추출물에 대한 AGI 활성을 측정한 결과, 0.97~18.53%의 저해활성을 보였고, 이는 대조구인 시판 식후혈당강하제 acabose (99.54±3.13%)에 비해 월등히 낮은 수준이었으나, 본 연구에서 개발한 꾸지뽕 열매 발효액을 10% 첨가한 꾸지뽕 된장에서는 acabose와 유사한 저해활성을 보여주었다. 결

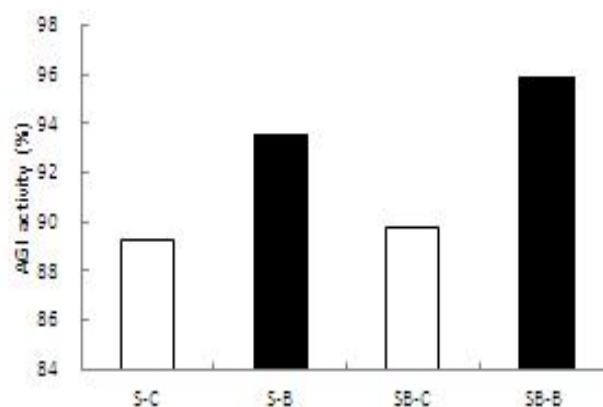


Fig. 5A. α -glucosidase inhibitory activity in fermentation materials of *Cudrania tricuspidata* fruits.

□, Before fermentation; ■, After fermentation. S-C & S-B, FMFCT fermented after NaCl addition; SB-C & SB-B, FMFCT fermented without NaCl addition. Data are expressed as means±SD of three experiments.

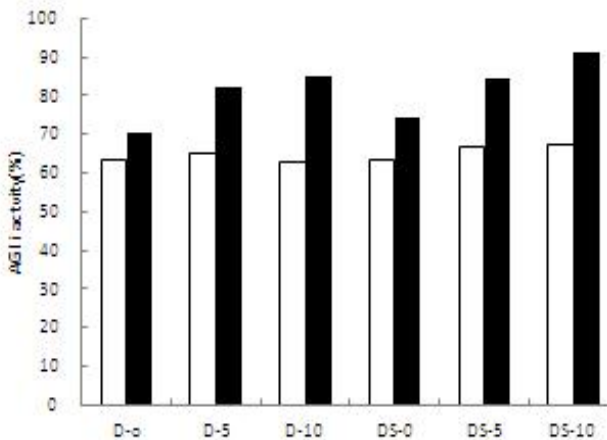


Fig. 5B. α -glucosidase inhibitory activity in doenjang added fermentation materials of *Cudrania tricuspidata* fruits.

□, 0 day; ■, 4 week aging. D-0, doenjang+FMFCT 0%; D-5, Doenjang+FMFCT 5%; D-10, Doenjang+FMFCT 10%; DS-0, Aged Doenjang+FMFCT 0%; DS-5, Aged Doenjang+FMFCT 5%; DS-10, Aged Doenjang+FMFCT 10%. Data are expressed as means \pm SD of three experiments.

과적으로 꾸지뽕 열매 발효액을 첨가한 꾸지뽕 된장은 식후 혈당강하능력이 있는 것으로 사료된다.

요 약

전통발효식품으로부터 분리한 발효능이 우수한 미생물과 기능성이 밝혀진 농특산 향토자원을 활용한 새로운 기능성 장류를 개발하고자 하였다. 꾸지뽕 열매를 *A. oryzae* koji, *Lactobacillus* 6종 및 *Bacillus* 2종에 대하여 발효시킨 결과, *B. licheniformis* SCDB 1234 균주가 kaempferol 함량을 9.54 μ g/g에서 217.04 μ g/g을 약 22배 증강시켜 최종 발효균주로 선발되었다. 꾸지뽕 열매를 선발균주를 활용하여 발효한 발효물 20배 희석액의 DPPH 항산화 활성은 대조구인 BHA, BHT의 92~99 ppm 농도와 유사한 활성을 보였고, tyrosinase 저해 활성도 arbutin이나 kojic acid의 95 ppm과 90 ppm과 같은 높은 저해 활성을 보였다. 꾸지뽕 열매 발효물을 첨가한 된장을 개발하여 유기산, 유리당 및 유리 아미노산을 분석하였다. 전반적으로 꾸지뽕 열매 발효물을 첨가하지 않은 장류와 유의적인 차이점을 보이지 않았다. 꾸지뽕 열매 발효물과 개발한 된장의 pancreatic lipase 저해 활성을 측정하였다. 발효물의 경우에는 발효전보다 발효후에 더 높은 80% 이상의 높은 저해능을 보여주었다. 개발한 된장은 숙성전 된장이 숙성후 된장에 비해 더 높은 저해능을 보여주었다. 해당노 효과로 AGI활성을 분석한 결과, 꾸지뽕 열매는 발효전보다 발효후에 활성이 높게 측정되었고, 꾸지뽕 열매 발효액 10%를 첨가한 숙성전 된장의 AGI 활성은 84.89 \pm 0.08%, 숙성후 된장은 91.25 \pm 0.04%를 나타내었다. 결론적으로 꾸지뽕 열매의 발효물의 생리활성 및 항산화 활성은 발효를 통하여 상승함을 보여주었고, 새로

운 건강기능성 식품 개발에 활용가능성이 높은 잠재적 소재임을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 2013년 농림축산식품부 고부가가치 식품기술 개발 사업(과제번호 313026-3)와 2014년 지역농식품선도 클러스터 육성사업(제목 : 향토자원 활용 발효공정 최적화 원천기술 개발)에 의해 수행되었습니다.

References

1. Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2011) Physiological activities of extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 942-948
2. Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2011) Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes with water and ethanol extracts of *Cudrania tricuspidata* leaves. Korean J Food Preserv, 18, 244-249
3. Lee CM, Lee TJ, Kim BH (2011) Improving effect of *Cudrania tricuspidata* ethanol extract on lipid profile and blood glucose in HFD-induced obese mice. J Inves Cosmetol, 7, 309-318
4. Cha JY, Cho YS (2001) Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the concentrations of lipids and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. Korean J Food Sci Technol, 33, 128-134
5. Cho JY, Ji SH, Moon JH, Lee KH, Jung KH, Park KH (2008) A novel benzoyl glucoside and phenolic compounds from the leaves of *Camellia japonica*. Food Sci Biotechnol, 17, 1060-1065
6. Glaßer G, Graefe EU, Struck F, Veit M, Gebhardt R (2002) Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. Phytomedicine, 9, 33-40
7. Lee JY, Moon SO, Kwon YJ, Rhee SJ, Park HR, Choi SW (2004) Identification and quantification of anthocyanins and flavonoids in *Cudrania tricuspidata* cultivars. Food Sci Biotechnol, 13, 176-184
8. Yamaguchi F, Ariga T, Y. Yoshimura Y, Nakazawa H (2000), Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. J Agric Food Chem, 48, 180-185
9. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use

- of a stable free radical. *Nature*, 181, 1990-1200
10. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol*, 27, 891-896
 11. Jung SA, Kim KBWR, Kim DH, Cho JY, Kim TW, Ahn DH (2012) Lipase inhibitory mode of dieckol isolated from *Eisenia bicyclis* ethanol extract. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 41, 112-118
 12. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R (1997) Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from tochucha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotech Biochem*, 61, 177-178
 13. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK (2013) Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. *J Life Sci*, 23, 682-688
 14. Miura T, Kato A (1995) The difference in hypoglycemic action between polygonati rhizoma and *Polygonati officinalis* rhizoma. *Biol Pharm Bull*, 18, 1605-1606
 15. Roh SW, Kim JB (2008) Effects of polygonati rhizoma on the diet-induced hyperlipidemia in rats. *Korean J Oriental Physiol Pathol*, 22, 1147-1151
 16. Parveen Z, Deng Y, Saeed MK, Dai, R, Ahamad W, Yu YH (2007) Antiinflammatory and analgesic activities of thesium chinense turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, 127, 1275-1279
 17. Singh R, Singh B, Singh S, Kumar N, Kumar S, Arora S (2008) Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd Ex Del. *Toxicol In Vitro*, 22, 1965-1970
 18. Gabrielska J, Soczynska-Kordala M, Przystalski S (2005) Antioxidative effect of kaempferol and its equimolar mixture with phenyltin compounds on UV-irradiated liposome membranes. *J Agric Food Chem*, 53, 76-83
 19. Kang DH, Kim JW, Youn KS (2011) Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit. and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv*, 18, 236-243
 20. Baek LM (2009) Effect of soybean germination on the quality characteristics of Cheongkookjang inoculated with *Bacillus licheniformis* B-59 isolated from rice straw. MS Thesis, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea, p 34
 21. Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS (2009) Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUCI. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 657-662
 22. Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY (2004) Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* jb-1 from Chungkook-jang and fermentation characteristics of jb1. *Korean J Microbial Biotechnol*, 32, 291-296
 23. Villa D, Fern´andez-Pach´ MS, Moy´a ML, Troncoso AM, Garc´ia-Parrilla MC (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230 - 35
 24. Oh GS, Kang KJ, Hong YP, An YS, Lee HM (2003) Distribution of organic acids in traditional and modified fermented foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 1177-1185
 25. Jeon JH, Kim JS, Lee SD, Choi SH, Oh MJ (1998) Studies on the contents of free amino acids, organic acids isoflavones in commercial soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 27, 10-15
 26. Kim SH, Kim SJ, Kim BH, Kang SG, Jung ST (2000) Fermentation of doenjang with salt. *Korean J Food Sci Technol*, 32, 1365-1370
 27. Yang SH, Choi MR, Kim JK, Chung YG (1992) Characteristics of the taste in traditional Korean soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 21, 443-448
 28. Jung BM, Roh SB (2004) Physicochemical quality comparison of commercial *Doenjang* and traditional green tea *Doenjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 132-139
 29. Kwon OJ, Lee HY, Kim TH, Kim SG (2014) Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of *Anemarrhena asphodeloides*. *Korean J Food Preserv*, 21, 421-426
 30. Jo YH (2014) Chemical constituents of the roots of *Cudrania tricuspidata* and their pancreatic lipase inhibitory activity. MS Thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, p 21-65
 31. Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, Placido J, William ZS (2008) α -Glucosidase inhibitory activity of *Syagium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res* 343, 1278-1281
 32. Baron AD (1998) Postprandial hyperglycemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pr*, 40, 51-55
 33. Lee SY, Kim IS, Park SL, Lim SI, Choi HS (2012) Antidiabetic activity and enzymatic activity of commercial *Doenjang* certified for traditional foods. *KSBB J*, 27, 361-366