

*Bacillus subtilis*를 이용한 국내산 신이대 잎 발효에 따른 영양성분, 폴리페놀, 항산화능 변화

조한교¹, 김다송¹, 신현재^{1,2*}

Changes of Nutritional Components, Polyphenols, and Antioxidant Activities of Domestic Bamboo Tree (*Sasa coreana* Nakai) Leaves Fermented with *Bacillus subtilis*

Han-Gyo Jo¹, Da-Song Kim¹, and Hyun-Jae Shin^{1,2*}

Received: 1 March 2017 / Revised: 21 March 2017 / Accepted: 26 March 2017

© 2017 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Bamboo leaf has many nutritional and bioactive compounds such as polyphenols, and it can be used for various foods application. Fermentation is one of appropriate processes that can affect the nutrition, taste and flavor, and antioxidant activities of foods. In this study, a representative domestic bamboo tree (*Sasa coreana* Nakai) leaves were fermented by *Bacillus subtilis* KCCM 11315 and the changes of carbohydrates, minerals, amino acids, and phenolic compounds and antioxidant activities were investigated before and after fermentation. During the fermentation period, firstly, the leaf was softened and turned to brown. The constituent carbohydrates were slightly increased from 432.09±5.38 mg/g to 458.42±7.39 mg/g, and free sugars decreased by 95% from 28.12±2.03 mg/g to 1.4±0.14 mg/g. Mineral was 20987.5±345.1 µg/mL, which was slightly increased after the fermentation compared to 20804.1±364.6 µg/mL before that. The total amino acids were increased to 73881.94±137.59 mg/100 g compared to 58464.51±109.12 mg/100 g before fermentation, and free

amino acids decreased by more than 85% from 32782.67±92.49 mg/100 g to 4827.83±19.76 mg/100 g. Total polyphenols content (TPC) increased from 25.51±1.04 GAE*mg/g to 35.34±0.91 GAE*mg/g, and the total flavonoid content (TFC) increased to 80.57±0.22 QE*mg/g compared to 69.64±0.26 QE*mg/g. The total catechin content (TCC) of TFC was decreased from 69.64±0.94 mg/L to 58.23±0.76 mg/L. The DPPH radical IC₅₀ of bamboo leaves decreased to 2624.85±37.03 µg/mL and the ABTS radical IC₅₀ of 187.26±4.78 µg/mL was increased after the fermentation. These results could be used as essential nutritional data before developing processed food products using the bamboo leaf.

Keywords: Bamboo leaf, *Sasa coreana* Nakai, *Bacillus subtilis*, Fermentation, Polyphenol, Flavonoid, Antioxidant activity

1. INTRODUCTION

우리나라에 분포하는 대나무는 5속에 10종이 있으며 주로 남부에서 잘 자라며 *Phyllostachys*와 *Sasa* 종이 주를 이루고 있다 [1]. 대나무는 실생활의 전반에 걸쳐 활용도가 높은 산림 자원으로, 건축재로 쓰이기도 하며 가구와 죽세공품 등 그 용도가 매우 다양하다. 대나무의 여러 부위 중에서, 대나무 잎은 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본 등 아시아권역에서 주로 댓잎차, 댓잎환, 댓잎소금 등의 가공식품으로 활용되고 있다.

¹조선대학교 일반대학원 화학공학과

¹Department of Chemical Engineering, Graduate School of Chosun University, Gwangju 61452, Korea

²조선대학교 생명화학고분자공학과

²Department of Biochemical & Polymer Engineering, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226

e-mail: shinhj@chosun.ac.kr

대나무 잎에는 영양성분으로서 탄수화물, 미네랄, 아미노산 등이 함유되어 있으며, orientin, homoorientin, vitexin, isovitexin, linoleic acid 등 다양한 phytochemical이 포함되어 있어 항산화, 항진균, 항콜레스테롤과 같은 생리활성을 나타낸다 [2-4]. 최근 이러한 영양성분과 항산화 성분이 풍부한 대나무 잎을 가공하여 식품 소재로 활용하고, 그 추출물을 활용하기 위한 여러 시도가 보고되고 있다 [5-7]. 그러나 대나무 잎은 높은 셀룰로스 함량과 낮은 포만감, 독특한 향 때문에 대나무 잎 자체를 섭취하는 것보다는 차나 음료의 형태로 추출하여 섭취하는 경우가 많다. 차 혹은 음료의 맛과 영양을 증진시키기 위하여 발효공정을 도입하는 경우가 많다. 발효는 식품의 맛과 풍미에 영향을 미치며 저장성을 높일 수 있는 가공 방법 중 하나로, 발효 미생물로부터 유래한 효소작용에 의하여 식품의 영양소가 쉽게 소화될 수 있는 형태로 분해되면서 성분 함량이 변화를 줄 수 있다. 전통 발효식품 제조 방법은 지역, 제조방법, 원료 등에 의해 미생물이 동일하지 않아 균일한 품질을 갖기 힘들며, 고품질의 발효식품의 생산을 위해서는 고기능의 미생물을 선별하여 사용하는 것이 무엇보다 중요하다 [8]. 식품의 발효에는 *Bacillus* sp., Lactic acid bacteria, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces* sp. 등이 사용되고 있으며, 특히 *Bacillus* sp.는 우리나라 전통 발효 식품의 제조에 가장 널리 사용되는 종으로 probiotics로 손꼽히고 있다 [9]. 한편 잎 자체의 영양성분 연구에 비하여 발효공정을 적용했을 때, 발효 전후의 성분의 변화와 생리활성의 변화를 확인한 연구는 아직 부족한 실정이다. 따라서 대나무 잎을 여러 식품에 적용할 수 있는 효과적이며 환경친화적인 발효 및 관련 가공 공정을 발굴하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 다양한 식품, 음료에 적용할 수 있는 대나무 잎을 개발하고자 전라남도 담양군에 자생하는 국내산 대나무 수종 중 신이대 (*Sasa coreana* Nakai) 잎을 식용미생물인 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효하였고, 발효 전과 발효 후의 성분 변화, 항산화 성분과 그 활성에 대해 조사하여 추후 발효 대나무 잎의 활용방안 증대에 기여하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fermentation of bamboo leaf with microbial

발효에 사용된 공시균주는 *Bacillus subtilis* (KCCM 11315)로 한국미생물보존센터 (KCCM, Seoul)에서 분양 받아 사용하였다. *B. subtilis* 배양에는 tryptic soy broth (TSB)를 사용하였으며, 37°C에서 150 rpm으로 shaking하며 배양하였다. 대나무 잎은 전라남도 담양군 담양읍에서 2016년 8월 초순에 채취한 신이대 (*Sasa coreana* Nakai) 잎을 자연건조하여 사용하였다. 건조된 신이대 잎을 입구가 넓은 유리병에 담고 8시간 액체배양한 *B. subtilis*를 멸균된 0.9% NaCl을 사용하여 OD₆₀₀ 0.50±0.02로 맞춘 후 접종하였고, 입구를 막아 15일 동안 37°C incubator에서 발효하였다. 발효하지 않은 신이대 잎과 발효한 신이대 잎은 *S. coreana* Nakai non-fermented (SC-

N), *S. coreana* Nakai fermented (SC-F)로 명명하였으며, 각각 자연건조 후 분쇄하여 보관하였고, 일부는 80% ethanol을 사용하여 추출 후 농축하여 사용하였다.

2.2. Sugar content

구성당 분석을 위해 분쇄한 SC-N과 SC-F를 각각 72% H₂SO₄와 1:10 (w/v)으로 혼합 후 30°C에서 2시간 동안 shaking incubator에서 추출하였다. 추출물에 증류수를 가한 후 121°C에서 1시간 동안 산 가수분해를 진행하여 시료를 전처리하였다. 유리당 분석을 위해 분쇄한 SC-N과 SC-F를 각각 증류수와 1:50 (w/v)으로 혼합 후 70°C에서 5시간 동안 추출하여 시료를 전처리하였다. 반응액은 0.45 µm membrane filter로 여과 후 사용하였다. 당분석은 HPAEC (ICS-5000, Dionex Co., USA)를 이용하였고, column은 carbohydrate column (250×4 mm, CarboPac PA-1, Dionex Co., USA)을 사용하였다. 18 mM NaOH를 mobile phase로 사용하였고 flow rate 1.0 mL/min, column temperature 25°C, injection volume 25 µL, detector는 PAD를 사용하여 추출물의 구성당과 유리당을 분석하였다.

2.3. Mineral content

0.5 g의 분쇄한 SC-N과 SC-F에 7 mL 65% HNO₃와 1 mL 30% H₂O₂를 각각 가한 후 microwave digestion system (ETHOS TC, Milestone, Sorisole, Italy)을 사용하여 산 분해를 하였다. 산 분해 반응액을 냉각시킨 후 1% HNO₃를 이용하여 50 mL로 정용한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 미네랄 분석을 실시하였다. 미네랄 분석은 ICP-OES (OPTIMA 7300 DV, Perkin Elmer, USA)를 이용하였으며, Rf power 1400 W, gas flow rate 15 L/min, nebulizer gas flow 0.65 L/min, auxillary gas flow 0.2 L/min 조건에서 분석하였다.

2.4. Amino acids content

구성아미노산은 분쇄한 신이대 잎과 발효 신이대 잎에 HCl을 가하여 110°C에서 24시간 동안 가수분해하여 추출하였다. 유리아미노산은 80% EtOH로 추출한 추출물을 이용하였다. 각각 추출물을 MeOH를 이용하여 10,000 ppm으로 제조한 후 30 µL를 새로운 vial에 옮겨 완전히 건조시키고, 20 mL의 유도체화 용액 (MeOH:H₂O:TEA:PITC=7:1:1:1)을 넣고 상온에서 30 min 동안 유도체화하였다. 유도체화한 시료를 다시 건조한 후 200 µL의 140 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN에 녹이고 0.45 µm membrane filter로 여과하여 분석에 사용하였다. HPLC는 Hewlett Packard 1100 Series (Agilent Co., USA)를 이용하였고, column은 Nove-Pak (300×3.9 mm, 4.0 µm, C₁₈, Waters Co., USA)을 사용하였다. Mobile phase로는 140 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN (solution A)와 60% CH₃CN (solution B)를 사용하였고, gradient program을 이용하여 solution B를 0~12 min 8%, 12~13 min 12%, 13~15.2 min 20%, 15.2~22.5 min 46%, 22.5~22.72 min 100%, 22.72~25.7 min 100%, 25.7~26 min 0%, 26~30 min 0%로 설정하였다. Flow rate 1.0 mL/min, column temperature 46°C, injection volume

10 µL, UV detector 254 nm wavelength 에서 아미노산을 분석하였다.

2.5. Total phenolic content (TPC)

Total phenolic content (TPC)는 수정된 Folin-Denis법을 사용하여 측정하였다 [10]. 농축한 추출물을 MeOH를 사용하여 1,000 ppm 농도로 제조하여 사용하였다. 추출물 1,000 ppm과 0.2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2% Na₂CO₃을 모두 동일한 양을 혼합 후 실온에서 30분간 반응시켰다. UV-VIS spectrophotometer을 사용하여 750 nm 파장에서 반응시킨 용액의 흡광값을 측정하였다. TPC는 표준물질인 gallic acid 기준 농도 GAE*mg/g로 나타내었다.

2.6. Total flavonoids content (TFC)

Total flavonoid content (TFC)는 Chang (2002)의 방법을 변형하여 측정하였다 [11]. 농축한 추출물을 MeOH를 사용하여 1,000 ppm 농도로 제조하여 사용하였다. 0.5 mL 추출물 1,000 ppm과 1.5 mL methanol, 0.1 mL 10% aluminum chloride, 0.1 mL 1 M potassium acetate, 2.8 mL 증류수를 혼합 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. UV-VIS spectrophotometer을 사용하여 415 nm 파장에서 반응시킨 용액의 흡광값을 측정하였다. TFC는 표준물질인 quercetin 기준 농도 QE*mg/g로 나타내었다.

2.7. Total catechin content (TCC)

Total catechin content (TCC)는 HPLC (SPD-20A, SHIMADZU Co., Japan)를 사용하여 분석하였다. 농축한 추출물을 MeOH를 사용하여 1,000 ppm 농도로 제조하여 분석하였고, catechin은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-gallocatechin-3-gallate, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-catechin-3-gallate의 mixture 형태의 제품 (Cerilliant Co., USA)을 구입하여 사용하였다. Column은 Shim-pack GIS-ODS (C₁₈, 4.6×250 mm, 5.0 µm, Shimadzu Co., Japan)을 사용하였다. Mobile phase로는 3% (v/v) acetic acid (solution A)와 methanol (solution B)을 사용하였고, gradient program을 사용하여 solution B를 0~1 min 0%, 1~45 min 63%, 45~50 min 0%, 50~60 min 0%로 설정하였다. Flow rate 1.0 mL/min, column temperature 30°C, injection volume 30 µL, UV detector의 wavelength는 280 nm로 하여 catechin을 분석하였다. TCC는 catechin mixture의 모든 catechin 함량을 합한 함량으로 나타내었다.

2.8. Antioxidant activity assay

2.8.1. DPPH radical scavenging activity

Radical로 사용된 물질은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)로 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다 [12]. DPPH stock solution은 95% EtOH에 DPPH를 용해하여 0.1 mM로 제조하였다. 농축한 추출물은 MeOH를 이용하여 250~2,500 ppm으로 희석하여 사용하였다. 농도별로 제조한 추출물 200 µL와 800 µL DPPH stock solution을 혼합하여 15분간 암실에서 반응 후 UV-VIS spectrophotometer (SCINCO,

Seoul, Korea)을 사용하여 517 nm 파장에서 흡광값을 측정하였다. 양성 대조군으로 gallic acid를 사용하였다. 추출물의 IC₅₀는 DPPH radical에 대한 소거능을 나타내며 radical을 50% 제거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

2.8.2. ABTS radical scavenging activity

Radical로 사용된 물질은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma, USA)로 Jeong *et al.* (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다 [13]. ABTS stock solution은 7 mM의 ABTS solution과 2.45 mM potassium persulfate solution을 동량 혼합 후 PBS (pH 7.4)로 희석하여 730 nm 파장에서 흡광값이 0.80±0.02이 되도록 제조하였다. 농축한 추출물은 MeOH를 이용하여 50~500 ppm 농도로 희석하여 사용하였다. 농도별로 제조한 추출물 200 µL와 1,000 µL ABTS stock solution을 혼합하여 15분간 암실에서 반응 후 UV-VIS spectrophotometer (SCINCO, Seoul, Korea)을 사용하여 730 nm 파장에서 흡광값을 측정하였다. 양성 대조군으로 DPPH 방법과 동일한 gallic acid를 사용하였다. 추출물의 IC₅₀는 ABTS radical에 대한 소거능을 나타내며 radical을 50% 제거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Microbial fermentation

식물의 잎을 비롯한 다양한 biomass의 활용성을 증대하기 위하여 미생물을 이용한 발효공정이 자주 시도되고 있다. 높은 단백질 함량을 가진 콩잎의 추출물에 *Bacillus subtilis*를 접종하여 발효 콩잎의 활용 가능성을 검토하였다[14]. 한편 녹차에 *B. subtilis*를 접종하여 항산화 활성의 변화를 조사하여 미생물 발효차로서의 활용 가능성을 검토하기도 하였다[15]. 본 연구에서는 식품의 발효에 주로 사용되는 *B. subtilis*를 분양 받아 신이대 (*Sasa coreana* Nakai)에 접종하였다. 접종 후 15일 동안 37°C에서 발효하면서 잎의 색과 외형 변화를 비롯한 다양한 영양성분과 항산화활성을 관찰하여 식품으로 적용 가능성을 확인하였다. 거칠었던 표면과 선명하게 구분되던 잎맥이 발효 후 연화에 의해 표면이 부드러워지고 잎맥이 보이지 않았으며, 발효가 진행될수록 갈색을 띠는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 특히 페놀성 화합물 (polyphenols)의 경우 발효과정을 통하여 추출 효율에 향상이 이루어졌으며, 이외에 다양한 성분의 변화가 발생하였다. 식물에 존재하는 페놀 화합물은 유리 페놀 화합물과 세포벽 구조 성분과 공유 결합으로 결합된 페놀 화합물로 분류 될 수 있으며 [16,17], 결합 페놀 화합물을 추출하기 위해서는 몇 가지 가수 분해 공정이 필요하다. 발효공정은 이와 같은 목적을 달성하기 위한 효과적



Fig. 1. Colors change of *Sasa coreana* Nakai leaf during fermentation with *Bacillus subtilis*.

이며 환경 친화적인 방법이다. 또 다른 예로서 담배 잎을 8일 동안 발효한 후 미생물의 수는 감소하였으나 peroxidase, polyphenol oxidase, proteinase, α -amylase 등 효소의 활성은 증가하였다고 보고되었다 [18]. 식품의 발효 후 추출물의 수율이 증가하는 것도 이러한 미생물의 효소에 의해 가용성 성분의 함량이 증가하기 때문이다 [19,20].

3.2. Analysis of general composition change

3.2.1. Sugar content

구성당 분석 결과 발효 전 대나무잎 (SC-N)과 발효 후 대나무잎 (SC-F)의 포도당 (glucose) 함량이 각각 283.39 ± 1.99 mg/g, 291.17 ± 3.07 mg/g으로 가장 높았으며, xylose, arabinose, galactose, rhamnose 순서대로 높은 당 함량이 확인되었다 (Table 1). 구성당의 총 함량은 SC-N이 432.09 ± 5.38 mg/g, SC-F가 458.42 ± 7.39 mg/g으로 발효 전에 비하여 증가하였다. 유리당 분석 결과 SC-N은 glucose, fructose, galactose, xylose, arabinose 순서로 높은 함량을 가지고 있었으며, SC-F의 유리당은 arabinose, galactose, xylose만 검출되었다. 총 유리당 함유량은 SC-N이 28.12 ± 2.03 mg/g, SC-F가 1.4 ± 0.14 mg/g으로 발효 전에 비하여 감소하였고 xylose만 유일하게 발효 후에 증가하였다. 본 연구에서는 총 당 함량이 증가하였으나, 약썩과 인진썩을 *Bacillus* sp.를 이용하여 발효하였을 경우, 약썩과 인진썩 모두 발효 후 총 당 함량이 감소한 것과는 상이한 결과를 보였다 [21]. *Saccharomyces cerevisiae* 로 black tea를 발효할 시에는 glucose와 fructose를 비롯하여 총 당 함량이 감

Table 2. Mineral content in *Sasa coreana* Nakai [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai [SC-F] (Unit: μ g/mL)

Minerals	SC-N	SC-F
Fe	90.1 ± 2.8	78.3 ± 4.7
Zn	13.3 ± 2.0	17.2 ± 2.3
P	3782.3 ± 26.0	2541.0 ± 58.1
Na	23.2 ± 0.9	203.3 ± 8.9
K	11680.7 ± 386.2	12332.7 ± 316.7
Ca	3435.3 ± 34.1	4136.3 ± 32.0
Mg	1534.3 ± 38.1	1403.0 ± 115.2
Cu	4.1 ± 0.1	3.5 ± 0.6
Mn	240.6 ± 7.2	272.3 ± 42.4
Total	20804.1 ± 364.6	20987.5 ± 345.1

소하였다 [22]. 이러한 차이는 원료로 사용한 잎, 접종한 미생물의 종류와 발효조건의 차이로 판단되며, 당 조성이 변하는 이유는 접종한 미생물이 대사과정에서 당분을 생육촉진 인자로 이용하였을 가능성이 크다.

3.2.2. Mineral content

미네랄 분석은 총 9종 Fe, Zn, P, Na, K, Ca, Mg, Cu, Mn에 대하여 실시하였다. 미네랄 총 함량은 SC-N 20804.1 ± 364.6 μ g/mL, SC-F 20987.5 ± 345.1 μ g/mL로 발효 후 미네랄 총 함량이 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다 (Table 2). 한편 *Cassia obtusifolia* 잎을 발효하였을 때 5가지 미네랄 Na, K, Ca, Mg, P의 함량이 모두 증가하였으며, 발효된 잎을 조리한 후에도 미네랄 함량의 변화가 거의 없었다 [23]. 발효 후 미네랄 성분 에 따른 함량의 변화는 K의 경우 12332.7 ± 316.7 μ g/mL로 가장 높았고 다음으로 Ca, P, Mg의 함량이 높았으며, Ca은 증가하였으나 P와 Mg은 감소하였다 (Table 2). Na의 경우 약 8.76 배 (180.1 μ g/mL) 증가하였는데 이는 발효에 사용한 *B. subtilis*의 접종량 조절 시 삼투압 유지를 위해 사용한 0.95% NaCl (saline water)의 영향으로 사료된다. 한편 잎이 많은 채소의 잎을 발효하였을 때 모든 미네랄 성분의 함량이 증가하며, 특히 Ca과 K의 함량이 가장 많이 증가한다고 하였다 [24]. 이처럼 미네랄 성분의 함량 변화는 발효에 이용된 *B. subtilis*에 의해 잎의 연화가 진행되면서 미네랄의 확산이 더 용이해진 것으로 판단된다.

3.2.3. Amino acids content

구성아미노산과 유리아미노산에 대한 분석은 총 20종의 아

Table 1. Sugar content in *Sasa coreana* Nakai [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai [SC-F] (mg/g)

Sugars	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Fructose	Total
Free sugar							
SC-N	N. D.	0.15 ± 0.01	1.66 ± 0.03	15.60 ± 0.89	0.26 ± 0.05	10.45 ± 1.05	28.12 ± 2.03
SC-F	N. D.	0.13 ± 0.03	0.06 ± 0.01	N. D.	1.21 ± 0.10	N. D.	1.4 ± 0.14
Component sugar							
SC-N	1.44 ± 0.04	32.13 ± 0.52	18.27 ± 0.27	283.39 ± 1.99	96.86 ± 2.56	N. D.	432.09 ± 5.38
SC-F	1.90 ± 0.12	33.76 ± 0.93	16.85 ± 0.12	291.17 ± 3.07	114.74 ± 3.15	N. D.	458.42 ± 7.39

N.D.: Not detected.

미노산에 대하여 실시하였다. SC-N의 구성아미노산 총 함량은 58464.51±109.12 mg/100 g이었고, 그 중 필수아미노산 총 함량은 27922.49±66.63 mg/100 g이었다 (Table 3, 4). SC-F의 구성아미노산 총 함량은 73881.94±137.59 mg/100 g이었고, 필수아미노산 총 함량은 33584.59±80.11 mg/100 g이었다. 발효 전과 발효 후 모두 phenylalanine의 함량이 가장 높았으며, 다음으로 glutamine, glutamic acid와 asparagine, aspartic acid의 함량이 높았다. SC-N의 유리아미노산 총 함량은 32782.67±92.49 mg/100 g이었고, 그 중 필수아미노산 총 함량은 8469.60±24.59 mg/100 g이었다. SC-F의 유리아미노산 총 함량은 4827.83±19.76 mg/100 g이었고, 필수아미노산 총 함량은 2601.50±8.79 mg/100 g이었다. 유리아미노산의 경우 발효 후

Table 3. Contents of total amino acid in *Sasa coreana* Nakai [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai [SC-F] (Unit: mg/100 g)

	SC-N	SC-F
Cysteine & Cystine	1133.84±6.81	3648.61±5.12
Aspargin & aspartic acid	6013.94±11.62	7260.32±14.53
Glutamine & glutamic acid	7727.87±17.57	8396.07±22.83
Serine	3513.73±8.10	3695.28±4.58
Glycine	1089.43±10.05	4385.75±8.01
Histidine	N. D.	N. D.
Arginine	835.56±1.90	2586.01±5.94
Threonine	927.69±2.06	2903.74±8.71
Alanine	6417.36±23.04	4316.11±12.52
Proline	3125.70±9.33	4465.65±7.50
Tyrosine	684.59±4.13	1543.56±3.87
Valine	3344.51±17.30	3958.34±8.41
Methionine	N. D.	50.46±0.46
Isoleucine	2331.91±15.39	2967.57±3.42
Leucine	1334.09±5.24	4941.49±11.00
Phenylalanine	13019.00±23.52	11841.05±51.85
Tryptophan	3703.35±16.66	4754.50±12.49
Lysine	3268.60±14.93	2217.90±6.00
Total essential amino acid	27922.49±66.63	33635.05±79.65
Total amino acid	58464.51±109.12	73932.41±137.13

N.D.: Not detected.

Table 4. Contents of free amino acid in *Sasa coreana* Nakai [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai [SC-F] (Unit: mg/100 g)

	SC-N	SC-F
Aspartic acid	2368.37±18.89	357.67±2.08
Glutamic acid	450.17±5.03	1447.17±8.25
Asparagine	1885.33±4.51	N. D.
Serine	2915.67±17.21	N. D.
Glutamin	3194.67±18.23	N. D.
Glycine	356.01±4.39	N. D.
Histidine	N. D.	N. D.
Arginine	448.70±3.6	N. D.
Threonine	713.17±3.25	686.33±8.5
Alanine	5986.67±27.23	150.17±4.19
Proline	2722.33±22.5	N. D.
Tyrosine	2058.33±17.56	271.33±8.08
Valine	2650.33±9.7	N. D.
Methionine	139.33±2.52	N. D.
Cysteine	1926.83±7.29	N. D.
Isoleucine	1445.33±8.08	N. D.
Leucine	1082.33±10.5	N. D.
Phenylalanine	1755.33±6.43	1915.17±13.42
Tryptophan	476.67±3.06	N. D.
Lysine	207.10±1.65	N. D.
Total essential amino acid	8469.60±24.59	2601.50±8.79
Total free amino acid	32782.67±92.49	4827.83±19.76

N.D.: Not detected.

아미노산 함량이 85% 이상 감소하였으며, glutamic acid와 phenylalanine은 발효 전에 비해 증가하였다. 식품의 발효에 사용되는 *Bacillus* sp.와 *Aspergillus* sp.는 강력한 단백질 분해 효소를 생성하여 식품에 포함된 단백질을 저분자 펩티드와 아미노산으로 분해하는 것으로 알려져 있다 [25]. 발효 후 유리아미노산이 증가하였다는 보고가 많으나, 본 연구 결과는 상반되는 결과를 보였다. 이는 접종한 *B. subtilis*가 단백질 분해 효소를 분비함과 동시에 아미노산을 질소원으로 소비하기 때문으로 풀이된다. 예로서 *B. subtilis*를 이용하여 분숙의 죽순을 발효하였는데, 발효 후 구성아미노산의 함량이 증가한다고 하였다 [26]. *Lactobacillus plantarum*를 starter로 이용하여 *Oenococcus oeni*를 발효하여 와인을 제조할 시 발효에 사용된 *L. plantarum*이 arginine을 분해하여 ornithine을 합성하면서 arginine 함량이 감소한다고 하였다 [27]. 또한 *B. subtilis*를 이용한 콩(대두)을 발효하였을 때 arginine은 감소하였고 cysteine은 검출되지 않았으며, 이는 *B. subtilis*가 arginine과 cysteine을 우선적으로 섭취한 결과라고 하였다 [28].

3.3. Analysis of polyphenols and catechins

3.3.1. Total polyphenols content (TPC) and total flavonoids content (TFC)

식물의 대표적인 항산화 성분은 flavonoids, carotenoids, phenolic compounds와 더불어 vitamin A, C, E가 있으며, radical 제거 효과가 뛰어나 항암, 항산화 활성 등의 생리활성을 가진다 [29]. 가장 많은 함량을 차지하는 polyphenols은 flavonoid, tannin과 같이 2개 이상의 방향족 고리를 가지는 phenolic compounds를 말하며, 식물이 자라면서 극한 환경으로부터 스스로를 보호하기 위해 생산하는 물질로 알려져 있다 [30]. Phenolic compounds는 항산화 물질이며 인체 내에 존재하는 활성산소종(ROS) 조절, 산화적 손상 예방, pro-inflammatory 활성 저해 등 다양한 질병으로부터 보호할 수 있으며 식물의 잎이나 열매에 많이 존재한다 [31]. SC-N과 SC-F의 total polyphenols content (TPC) 측정 결과 각각 25.51 ± 1.04 GAE mg/g, 35.34 ± 0.91 GAE mg/g으로 확인되었고, total flavonoids content (TFC)는 각각 69.64 ± 0.26 QE mg/g, 80.57 ± 0.22 QE mg/g으로 발효 후 TPC와 TFC가 증가하였다 (Fig. 2). 발효 전후의 이러한 변화는 *B. subtilis*가 생성하는 가수분해 효소에 기인한 것으로 유추된다. 발효가 진행되는 동안 *B. subtilis*가 생성하는 효소에 의해 phenolic glycosides가 가수분해되어 aglycone이 생성되면서 phenolic 화합물이 증가하기 때문에 항산화 효과가 증가한다고 하였다 [32]. Okra (*Abelmoschus esculentus*) 종자 (seeds)를 뜨거운 물에 불린 후 발효하였을 때 24 시간 발효 시 total polyphenols과 total flavonoids 함량이 최대 로 생성되고 발효시간이 길어질수록 감소한다고 하였다 [33].

3.3.2. Total catechins content (TCC)

Flavonoids 중 대표적인 catechin은 차잎에 다량으로 함유되어 있으며, polyphenols과 함께 반응성 산소 종을 효과적으로 제거하는 역할을 하며 항산화 물질로 작용할 수 있다 [34].

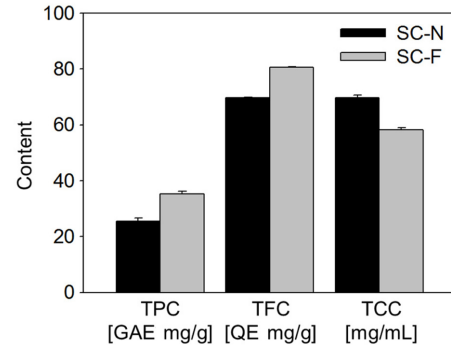


Fig. 2. Total polyphenol, total flavonoid and catechin contents of *Sasa coreana* Nakai extracts [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai extracts [SC-F].

Table 5. Contents of catechins in *Sasa coreana* Nakai [SC-N] and fermented *Sasa coreana* Nakai [SC-F] (Unit: mg/L)

	SC-N	SC-F
(+)-Catechin	9.59±0.46	19.88±0.91
(-)-Epigallocatechin-3-gallate	0.39±0.12	0.47±0.07
(-)-Epicatechin	34.10±0.87	20.72±1.04
(-)-Gallocatechin-3-gallate	3.62±0.21	5.51±0.23
(-)-Epicatechin-3-gallate	10.43±0.56	3.42±0.20
(-)-Catechin-3-gallate	11.50±0.58	8.23±0.69
Total	69.64±0.94	58.23±0.76

SC-N과 SC-F의 (+)-catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-gallocatechin-3-gallate의 함량은 증가하였고, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-catechin-3-gallate의 함량은 감소하였다 (Table 5). Total catechin content (TCC)는 SC-N 69.64 ± 0.94 mg/L, SC-F 58.23 ± 0.76 mg/L로 발효 후 감소하였다 (Fig. 2). 이렇게 발효 후 catechin 함량이 감소하는 이유는 발효가 진행되는 동안 catechin이 polyphenol oxidase에 의해 theaflavin과 thearubigins 같은 dimeric compounds를 생성하기 때문으로 사료된다 [35]. 올리브 잎의 발효의 결과로 glycoside 결합이 끊어지며 aglycones으로 분해됨으로써 polyphenols의 정성적인 변화가 생긴다고 하였다 [36]. *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*와 *Brassica juncea* Coss 잎을 발효하였을 때 분자량이 작은 compounds들이 확인되며, 발효 중에는 flavonoid의 aglycones의 위치 7의 glycoside 결합이 쉽게 절단되기 때문이다 [37]. 인체 대사반응에서 쉽게 작용할 수 있는 aglycone 형태의 polyphenol의 증가는 더욱 높은 기능성을 기대할 수 있다.

3.4. Antioxidant activity analysis

식물의 TPC의 변화는 항산화와 연관성이 있기 때문에 발효 후 대나무 잎의 TPC 변화에 대한 발효 효과를 확인하는 것이 필수적이다. 따라서 대표적인 radical로 DPPH radical과 ABTS radical에 대한 소거능을 확인하였다. SC-N과 SC-F의 DPPH radical과 ABTS radical 소거능을 확인한 결과, 추출물의 농도

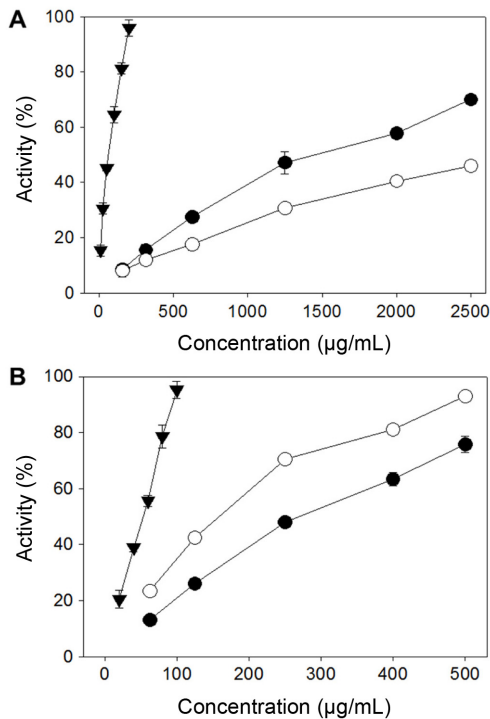


Fig. 3. Anti-oxidant activities of *Sasa coreana* Nakai extracts [SC-N, ●] and fermented *Sasa coreana* Nakai extracts [SC-F, ○]. (a) DPPH radical scavenging activity. (b) ABTS radical scavenging activity.

가 증가함에 따라서 radical 소거능도 증가하였으나 radical 종류에 따른 소거능은 서로 상반된 결과가 확인되었다 (Fig. 3). SC-N과 SC-F의 DPPH radical 소거능의 IC₅₀는 1621.05±55.88 µg/mL, 2624.85±37.03 µg/mL로 발효 후 radical 소거능이 감소하였고, ABTS radical 소거능의 IC₅₀는 301.24±8.96 µg/mL, 187.26±4.78 µg/mL로 발효 후 radical 소거능이 증가하였다. 양성대조군으로 사용한 gallic acid의 두 가지 radical 소거능의 IC₅₀ 값은 각각 75.64±2.30 µg/mL, 51.77±1.28 µg/mL로 측정되었다. 4종류의 말레이시아 허브차 Allspice, Scaphium, Gora, Cinnamon를 발효 후 항산화 활성을 측정하였을 때 발효 전에 비해 TPC 증가와 함께 항산화 활성이 증가하였다 [38]. 또한 망고 잎을 *Lactobacillus casei*와 effective microorganisms (EM)을 이용하여 발효하였고 TPC와 TFC 증가와 함께 항산화 활성이 증가함을 확인하였다 [39]. 이는 본 연구의 결과와 일치하며 신이대 잎의 발효 후 항산화 활성의 증가는 TPC 증가에 기인한 것으로 풀이할 수 있다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 전라남도 담양군에 자생하는 신이대 (*Sasa coreana* Nakai) 잎을 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효하였고, 발효 전과 발효 후의 당류, 미네랄, 아미노산, 페놀성 화합물

의 성분 변화와 그 활성에 대해 조사하여 추후 발효 대나무 잎의 활용방안 증대에 기여하고자 하였다. 일반성분의 경우 문헌과 비교하여 유의적인 차이는 없었으며, TPC, TFC, TCC의 경우 다른 문헌과 동일한 변화양상이 확인되었다. 본 연구의 결과는 대나무 잎을 이용하는 가공식품 개발에 주요 영양자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 현재 신규로 본 연구실에서 분리한 *Bacillus* 균주를 이용하여 다양한 대나무 수종의 잎 발효 연구가 진행 중이다.

Acknowledgements

이 논문은 2015년 교육부와 한국연구재단의 지역혁신창의인력양성사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (NRF-2015H1C1A1035883).

REFERENCES

- Park, J. O. and H. W. Jang (2009) Effects of *Sasa coreana*, Nakai on the Lipid Compositions of Serum in High Cholesterol Diet Rat. *J. Life Sci.* 19: 1145-1151.
- Choi, H. S., G. C. Kim, and H. J. Shin (2012) Comparison of Antimicrobial and Antioxidant Activities by Different Extraction Methods in Korean Bamboos. *KSBB J.* 27: 131-135.
- Kim, N. K., S. H. Cho, S. D. Lee, J. S. Ryu, and K. H. Shim (2001) Functional Properties and Antimicrobial Activity of Bamboo (*Phyllostachys* sp.) extracts. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 8: 475-480.
- Zhang, Y., J. Jiao, C. Liu, X. Wu, and Y. Zhang (2008) Isolation and Purification of Four Flavone C-glycosides from Antioxidant of Bamboo Leaves by Macroporous Resin Column Chromatography and Preparative High-performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* 107: 1326-1336.
- Kim, S. H., I. C. Lee, S. S. Kang, C. Moon, S. H. Kim, D. H. Shin, H. C. Kim, J. C. Yoo, and J. C. Kim (2011) Effects of Bamboo Charcoal and Bamboo Leaf Supplementation on Performance and Meat Quality in Chicken. *J. Life Sci.* 21: 805-810.
- Seki, T. and H. Maeda (2010) Cancer Preventive Effect of *Kumai-zasa* Bamboo Leaf Extracts Administered Prior to Carcinogenesis or Cancer Inoculation. *Anticancer Research* 30:111-118.
- Eun, J., H. D. Jeong, and M. S. Jang (2009) Optimization of Ingredient Mixing Ratio for Preparation of Sponge Cake with Bamboo (*Pseudosasa japonica* Makino) Leaves Powder. *Korean J. Food Cookery Sci.* 25: 317-329.
- Park, S. Y., M. A. Bang, B. J. Oh, J. H. Park, W. S. Song, K. M. Choi, E. S. Choung, H. O. Boo, and S. S. Cho (2013) Fermentation and quality characteristics of *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus subtilis* BC-P1. *Kor. J. Microbiol.* 49: 262-269.
- Moon, J. Y., S. W. Kwon, S. B. Hong, S. J. Seok, J. S. Kim, and S. J. Kim (2015) Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, *Cheonggukjang*. *Kor. J. Microbiol.* 51: 300-307.

10. Kahkonen, M. P., A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, and M. Heinonen (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
11. Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182.
12. Blois, M. S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181: 1199-1200.
13. Jeong, C. H., G. Choi, J. Kim, J. Kwak, H. Heo, K. H. Shim, B. R. Cho, Y. I. Bae, and J. S. Choi (2009) *In vitro* Antioxidative Activities and Phenolic Composition of Hot Water Extract from Different Parts of *Cudrania tricuspidata*. *J. Food Sci. Nutr.* 14: 283-289.
14. Seo, S. H., S. E. Park, E. J. Kim, D. Oh, and H. S. Son (2017) Characterization of Fermented Mulberry Leaf Using *Bacillus subtilis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 108-114.
15. Kim, Y. S., C. Jo, G. H. Choi, and K. H. Lee (2011) Changes of Antioxidative Components and Activity of Fermented Tea during Fermentation Period. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1073-1078.
16. Yadav, G., A. Singh, P. Bhattacharya, J. Yuvraj, and R. Banerjee (2013) Comparative analysis of solid-state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 36: 1563-1569.
17. Cerda, A., M. E. Martínez, C. Soto, P. Poirrier, J. R. Perez-Correa, J. R. Vergara-Salinas, and M. E. Zúñiga (2013) The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent. *Food Chem.* 139: 138-143.
18. Qiu, L., M. Zhao, F. Li, W. Qi, W. Zhang, X. Yue, and J. Cui (2003) Changes in biological activity during artificial fermentation of flue-cured tobacco. *Tob. Sci.* 46: 24-27.
19. Moktan, B., J. Saha, and P. K. Sarkar (2008) Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res. Int.* 41: 586-593.
20. Jo, H. G., M. H. Choi, and H. J. Shin (2015) Preparation of fermentation broth of *Sparassis latifolia* containing soluble β -glucan using four *Lactobacillus* species. *J. Mushrooms* 13: 50-55.
21. Song, H. N. (2013) Quality properties of fermented mugworts and the rapid pattern analysis of their volatile flavor components via surface acoustic wave (SAW) based electronic nose sensor in the GC system. *Korean J. Food Preserv.* 20: 554-563.
22. Reis, B. A. D., A. Kosińska-Cagnazzo, R. Schmitt, and W. Andlauer (2014) Fermentation of Plant Material-Effect on Sugar Content and Stability of Bioactive Compounds. *PJFNS* 64: 235-241.
23. Nuha, M. O., A. M. A. Isam, and E. B. Elfadil (2010) Chemical composition, antinutrients and extractable minerals of Sicklepod (*Cassia obtusifolia*) leaves as influenced by fermentation and cooking. *Int. Food Res. J.* 17: 775-785.
24. Ifesan, B. O. T., O. O. Egbewole, and B. T. Ifesan (2014) Effect of Fermentation on Nutritional Composition of Selected Commonly Consumed Green Leafy Vegetables in Nigeria. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 2: 291-297.
25. Kim, J. I., M. J. Kang, and T. W. Kwon (2003) Antidiabetic effect of soybean and chongkukjang. *Korea Soybean Digest* 20: 44-52.
26. Baeg, B. G., J. I. Cho, E. W. Moon, and J. S. Park (2015) Quality Characteristics of Bamboo Shoot Liquid Fermented by *Bacillus subtilis* Strain. *J. Korean Soc. Food Cult.* 30: 233-240.
27. Pozo-Bayón, M. A., E. G-Alegria, M. C. Polo, C. Tenorio, P. J. Martín-Álvarez, M. T. Calvo de la Banda, F. Ruiz-Larrea, and M. V. Moreno-Arribas (2005) Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8729-8735.
28. Sarkar, P. K., L. J. Jones, G. S. Craven, S. M. Somerset, and C. Palmer (1997) Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food. *Food Chem.* 59: 69-75.
29. Lee, Y. S. (2007) Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J. Food Preserv.* 14: 78-86.
30. Jeong, C. H., C. W. Jang, K. Y. Lee, I. H. Kim, and K. W. Shim (2012) Chemical components and anti-oxidant activities of black currant. *Korean J. Food Preserv.* 19: 263-270.
31. Fraga, C. G., M. Galleano, S. V. Verstraeten, and P. I. Oteiza (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 31: 435-445.
32. Hur, S. J., S. Y. Lee, Y. C. Kim, I. Choi, and G. B. Kim (2014) Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* 160: 346-356.
33. Adetuyi, F. O. and T. A. Ibrahim (2014) Effect of Fermentation Time on the Phenolic, Flavonoid and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Seeds. *NIFOJ* 32: 128-137.
34. Choi, M. H., Y. J. Jeon, and H. J. Shin (2015) Anthocyanin Analysis of Pressure-extracted Korean Blueberry Juice and *in vitro* Anti-inflammatory in RAW267.4 Cell line. *KSBB J.* 30: 191-196.
35. Tan, J., W. Dai, M. Lu, H. Lv, L. Guo, Y. Zhang, Y. Zhu, Q. Peng, and Z. Lin (2016) Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach. *Food Res. Int.* 79: 106-113.
36. Romero, C., M. Brenes, P. Garcia, A. Garcia, and A. Garrido (2004) Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1973-1979.
37. Harbaum, B., E. M. Hubbermann, Z. Zhu, and K. Schwarz (2008) Impact of Fermentation on Phenolic Compounds in Leaves of Pak Choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and Chinese Leaf Mustard (*Brassica juncea* Coss). *J. Agric. Food Chem.* 56: 148-157.
38. Ibrahim, N. A., S. Mustafa, and A. Ismail (2014) Effect of lactic fermentation on the antioxidant capacity of Malaysian herbal teas. *Int. Food Res. J.* 21: 1483-1488.
39. Park, A., T. Ku, and I. Yoo (2015) Antioxidant properties of fermented mango leaf extracts. *J. Cosmet. Sci.* 66: 1-13.