

## *Lactobacillus plantarum*으로 발효한 뽕잎 추출물의 항당뇨 효과

최지수<sup>1</sup> · 이설희<sup>1,2</sup> · 박영서<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>가천대학교 식품생물공학과, <sup>2</sup>한국식품연구원 헬스케어연구단

### Anti-diabetic effect of mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus plantarum*

Jisu Choi<sup>1</sup>, Sulhee Lee<sup>1,2</sup>, and Young-Seo Park<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University

<sup>2</sup>Research Group of Healthcare, Korea Food Research Institute

**Abstract** The purpose of this study was to isolate novel lactic acid bacteria to ferment mulberry leaf extract (MLE) and to investigate its anti-diabetic effect. *Lactobacillus plantarum* SG-053 isolated from *gatkimchi* was selected to ferment MLE because it exhibited high  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (96.8%) and enhanced the content of 1-deoxynojirimycin (DNJ), an anti-diabetic substance, in fermented MLE up-to 2.2 times. MLE fermented with *L. plantarum* SG-053 (FMLE) showed growth promoting activity against L6 myotubes and increased the gene expressions of *IRS-1*, *PI3K p85 $\alpha$* , and *GLUT-4* up-to 1.4, 2.2, and 1.4 times, respectively, and 2-deoxyglucose uptake up-to 40.7%. In rat skeletal muscle tissue, the expressions of *PI3K p85 $\alpha$*  and *GLUT-4* increased by 6.4 and 2.1 times, respectively. These results suggest that *L. plantarum* SG-053 could enhance the DNJ content of MLE by fermentation and that FMLE is effective in ameliorating insulin resistance via activation of the insulin signaling pathway.

**Keywords:** Mulberry leaf, 1-deoxynojirimycin, anti-diabetic effect, *Lactobacillus plantarum*

## 서 론

뽕나무(*Morus alba* L.)는 전통적으로 누에의 먹이로 사용되어 왔으나 최근 당뇨, 고혈압 등의 성인병에 효능이 있다고 보고되어 기능성 식품 소재로 사용되고 있다(Lee 등, 2003). 뽕잎에는 다양한 식이섬유와 비타민, 미네랄이 풍부하고, chlorogenic acid, 플라보노이드,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), 1-deoxynojirimycin (DNJ) 등의 생리활성물질이 함유되어 항암, 항고혈압, 항당뇨 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2015). 이 중에서 DNJ는  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 작용하여 항당뇨 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Asano 등, 1994; Lee와 Choi, 2012).

DNJ는 포도당의 2번 탄소에 산소원자 대신 아민기가 결합되어 있는 형태의 포도당 유도체로, 소장  $\alpha$ -glucosidase의 활성 부위에 결합해 효소 활성을 저해한다(Kojima 등, 2010). DNJ는 화학적으로 합성되거나, 뽕잎 등의 식물이나 누에로부터의 추출, *Bacillus* 속 또는 *Streptomyces* 속 미생물의 발효에 의해 생산된다(Gao 등, 2016). DNJ의 항당뇨활성은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성에 의한 것으로, 간에서 글리코겐 탈분지효소인  $\alpha$ -1,6-glucosidase와 장내  $\alpha$ -1,4-glucosidase의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있으나,

장내 sodium-의존성 glucose cotransporter 2, glucose transporter 2의 발현도 억제한다(Gao 등, 2016; Li 등, 2013).

유산균은 그 안전성이 연구되어 다양한 식품에 이용되고 있으며, 유산균을 이용한 식품 발효 시 다양한 휘발성 유기화합물을 생성하여 발효 식품의 향미를 증진시키고, 식품의 보존성을 향상시킨다(Caplice와 Fitzgerald, 1999; Hitendra 등, 2016; Holzapfel과 Schillinger, 2002). 뿐만 아니라 유산균은 항당뇨 효능을 가져 당뇨병의 증상을 완화시키고, 당뇨에 의한 합병증을 예방할 수 있다. Honda 등(2012)의 연구에서 정상 쥐에게 살아있는 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 슈크로스 또는 전분과 함께 투여하였을 때 식후 혈당이 증가하는 것을 유의적으로 억제하였으며, 제2형 당뇨병 모델인 KK-Ay 쥐에게 6주간 *L. rhamnosus* GG를 투여한 결과 공복 혈당이 유의적으로 감소하였다. Lee 등(2018)의 연구에서 *L. plantarum* Ln4는 지방세포의 형성을 억제하고 3T3-L1 지방세포의 포도당 흡수를 촉진하며, 간에서 포도당과 지방의 대사에 관여하는 유전자 *IRS-2*, *Akt2*의 발현을 증가시켜 고지방 식이에 의한 비만과 당뇨를 치료할 수 있을 것이라고 보고하였다. 뽕잎 추출물을 *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus*를 이용하여 발효하였을 때 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, chlorogenic acid, DNJ 함량이 증가하였으며, *L. pentosus*의 발효는 뽕잎의 GABA 함량을 5배 이상 증가시켰다고 보고된 바 있다(Lee 등, 2017; Zhong 등, 2019).

본 연구에서는 항당뇨 효능이 있는 것으로 알려진 뽕잎을 발효하여 기능성을 향상시킬 수 있는 유산균주를 탐색하고, 항당뇨 효능이 강화된 유산균 발효 뽕잎 추출물을 제조하여 그 기능성을 평가하고자 하였다. 이를 위해 다양한 식품으로부터 분리한 유산균주의 뽕잎 추출물에 대한 발효 적성을 평가하고, 유산균

\*Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 13120, Korea  
Tel: +82-31-750-5378  
Fax: +82-31-750-5389  
E-mail: ypark@gachon.ac.kr  
Received February 17, 2020; revised March 12, 2020;  
accepted March 20, 2020

빵잎 추출물의 발효물을 근원세포와 동물실험을 통하여 항당뇨 효능을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 빵잎 추출물의 제조

본 연구에 사용된 빵잎은 제천약초(Jecheon, Korea)에서 건조된 것을 구입하여 4°C에서 보관하며 사용하였다. 건조된 빵잎 무게의 20배에 해당하는 증류수를 넣고 100°C에서 2시간 동안 추출한 뒤 여과포로 여과하여 3°Bx로 농축한 것을 빵잎 추출물로 사용하였다.

### 빵잎 추출물 내 생육 활성이 우수한 균주 선별

유산균의 분리를 위해 제주도에서 김치, 젓갈 등의 발효식품과 해산물, 감귤류 등을 다수의 지역 시장에서 수집하였다. 각 시료 1g을 멸균 생리식염수(0.88% (w/v) NaCl)에 현탁한 후 심진회석하여 0.005% bromocresol purple이 첨가된 PCA 배지(KisanBio, Seoul, Korea)에 도말한 뒤 37°C에서 16시간 배양하였다. 각 배지에서 형태가 다른 집락을 선택하여 순수 분리된 균주는 MRS 배지(BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 배양한 후 40% (v/v) 글리세롤을 동량 첨가하여 -80°C에 보관하여 사용하였다. 분리된 균주는 특허 미생물 국제공인기탁기관인 (사)한국중균협회 부설 한국미생물보존센터에 기탁하였다(기탁번호: KCCM 43365).

### 균주 동정

선별된 균주의 동정은 Lee와 Park(2017)의 방법에 따라 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 계통수(phylogenetic tree) 작성 및 분석에 의해 수행하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성이 우수한 균주 선별

선별된 유산균은 MRS 한천배지에서 배양시켜 집락을 형성시킨 후 한 개의 집락을 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양시킴으로써 종배양액을 제조하였다. 종배양액을 MRS 배지(BD Difco)에 1% (v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤 13,000×g에서 1분간 원심분리한 후, 상등액의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하였다. Phosphate buffered saline (PBS, pH 6.8, 100 mM) 70  $\mu$ L에 유산균 배양 상등액 5  $\mu$ L, 기질로서 25  $\mu$ L의 10 mM 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37°C에서 10분간 방치한 뒤, 0.05 U/mL의  $\alpha$ -glucosidase (Sigma-Aldrich Co., Catalog no. G0660)를 50  $\mu$ L 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 직후 100  $\mu$ L의 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시판  $\alpha$ -glucosidase 저해제 계열의 경구용 혈당강하제인 acarbose (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. 유산균의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해 활성(\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive control}} - A_{\text{negative control}})] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$ : 시료와 효소 첨가 시 흡광도

$A_{\text{blank}}$ : 효소를 제외하고 시료 첨가 시 흡광도

$A_{\text{positive control}}$ : 시료를 제외하고 효소 첨가 시 흡광도

$A_{\text{negative control}}$ : 시료와 효소 미첨가 시 흡광도

### 1-Deoxynojirimycin 함량을 증가시키는 균주 선별

빵잎 추출물에 유산균 종배양액을 1% (v/v) 접종하고 37°C에

서 24시간 배양한 뒤 배양액 내 DNJ의 함량을 분석하였다. HPLC를 이용하여 유산균 발효 빵잎 추출물의 DNJ 함량을 분석하기 위해 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl, Sigma-Aldrich Co.)의 첨가반응을 다음과 같이 진행하였다. 5 mM의 농도가 되도록 acetonitrile에 용해시킨 FMOC-Cl 용액 20  $\mu$ L에 10  $\mu$ L의 유산균 발효 빵잎 추출물과 10  $\mu$ L의 0.4 M borate 완충용액(pH 8.5)을 첨가하여 20°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 종료를 위해 20°C에서 보관된 0.1 M glycine을 10  $\mu$ L 첨가한 후 950  $\mu$ L의 0.1% (v/v) acetic acid를 첨가하여 0.2  $\mu$ m PVDF 여과지로 여과하였다. 여과한 시료는 HPLC로 분석하여 발효 전에 비해 DNJ 함량이 100% 이상 증가한 유산균을 선별하였다. DNJ 분석에 이용된 HPLC는 UltiMate™ 3000 HPLC 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 검출기는 UltiMate™ 3000 Fluorescence Detector (Thermo Fisher Scientific)를 이용하였으며, 분석 파장은 여기파장 254 nm, 방출파장 322 nm로 설정하였다. 컬럼은 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×250 mm, 5  $\mu$ m, Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼 오븐의 온도는 30°C로 설정하고, 시료는 10  $\mu$ L씩 주입하였다. 이동상은 0.1% (v/v) acetic acid와 acetonitrile을 각각 60, 40% (v/v)로 설정하여 1.2 mL/min의 유속으로 30분간 분석하였고, 결과는 Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System을 사용하여 분석하였다.

### 세포 배양

유산균 발효 빵잎 추출물의 당뇨 억제 활성을 평가하기 위해 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 rat 유래의 L6 근원세포(KCLB 21458)를 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 세포는 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific)과 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific)이 포함된 저농도-포도당 DMEM에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포의 분화에는 1% penicillin-streptomycin과 2% horse serum (Thermo Fisher Scientific)이 포함된 저농도-포도당 DMEM 배지를 사용하였으며, 분화 유도 후 48시간마다 새로운 배지로 교체하여 5일 이후 사용하였다.

### 시료 준비

유산균으로 발효된 빵잎 추출물은 동결건조기(FDU-1110, EYELA, Bohemia, NY, USA)로 동결건조한 후 일정 농도가 되도록 PBS에 용해한 후 사용하였다.

### 세포 독성 측정

L6 근원세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 96-well plate에 200  $\mu$ L씩 부착시켜 20시간 동안 배양한 뒤, 동결건조 후 PBS에 용해한 시료를 2  $\mu$ L씩 첨가하여 20시간 배양하였다. EZ-CYTOX (DoGenBio, Seoul, Korea)를 20  $\mu$ L 첨가하여 37°C의 암소에서 30분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 계산하였다.

### 유전자 발현 분석

L6 근원세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 12-well plate에 2 mL씩 부착시켜 분화를 유도하였다. 분화가 완료되면 처리 농도의 100배에 해당하는 시료를 20  $\mu$ L씩 첨가하여 20시간 배양하였다. 배양된 세포의 RNA 추출에는 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하였다. 세포를 1 mL easy-BLUE™로 용해시키고 200  $\mu$ L의 chloroform (Sigma-Aldrich Co.)을 첨가한 뒤 4°C에서 13,000×g로 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상등액을 동량의 2-propanol

**Table 1. The sequence of primers for real-time PCR**

Gene	Primer sequence (5'→3')	
	Forward	Reverse
GAPDH	ATCCCATCACCATCTTCCAG	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
IRS-1	ATGTGGAAATGGCTCGGA	TAAGGCAGCAAAGGGTAGGC
PI3K p85 $\alpha$	GAAGGCAACGAGAAGGA	CGTCAGCCACATCAAGTA
GLUT-4	GCCATGAGCTACGTCTCCATT	GGCCACGATGAACCAAGGAA

(Sigma-Aldrich Co.)과 혼합하여 상온에 10분간 정치한 후 4°C에서 13,000×g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상등액을 제거하고 1 mL의 75% (v/v) 에탄올을 가한 뒤 4°C에서 10,000×g로 5분간 원심분리한 뒤 건조하였다. RNA는 30  $\mu$ L의 멸균 3차 증류수에 용해시킨 뒤 Take3 Micro-Volume Plates (BioTek, Winooski, Vermont, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다. cDNA는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 mRNA로부터 합성하였다. 합성한 cDNA는 FastStart Essential DNA Green Master (Roche)를 이용하여 LightCycler<sup>®</sup> 96 (Roche)에서 측정하였다. Primer의 서열은 Table 1에 나타내었고(Cai 등, 2016), 유전자의 상대적 발현량은 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 계산법을 사용하여 분석하였다(Livak와 Schmittgen, 2001).

**세포 내 포도당 흡수 측정**

L6 근원세포의 포도당 이용 능력은 2-deoxyglucose (2DG)의 흡수를 측정해 분석하였으며, 2-Deoxyglucose Uptake Measurement Kit (CosmoBio, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 세포 수가 1×10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 6-well plate에 부착시킨 후 분화를 유도하였다. 분화가 완료된 세포의 배지를 무혈청 저농도-포도당 DMEM으로 교체하여 배양하였다. 배양 6시간 후 3 mL의 Krebs-Ringer Phosphate Hepes (KRPH) 완충용액(1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7.5)으로 세포를 3회 세척한 후 2%의 bovine serum albumin (BSA)이 포함된 KRPH 완충용액을 3 mL씩 첨가하였다. KRPH 완충용액 첨가 30분 후 인슐린을 최종 농도 1  $\mu$ M이 되도록 첨가하고, 시료를 일정 농도별로 처리하였다. 시료 처리 20분 후 2DG를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가하여 20분 배양하였다. Phloretin이 200  $\mu$ M 포함된 PBS로 세포를 3회 세척하고 3 mL의 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 세포를 용해시킨 후 초음파 파쇄기(Vibra cell VCX600, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였다(전류량 40%, 2분). 파쇄된 세포는 80°C에서 15분 열처리한 뒤 4°C, 15,000×g에서 20분간 원심분리하였다. Kit의 시료 희석용 완충용액으로 5배 희석한 상등액을 glucose uptake assay의 시료로 사용하여 제공된 실험 방법에 따라 세포 내 2DG 흡수를 측정하였으며, 시료의 단백질질을 정량하여 표준화하였다.

**Sprague-Dawley rat을 이용한 시료의 항당뇨 효능 평가**

유산균 발효 뽕잎 추출액의 당뇨 억제 활성은 서울대학교 융합과학기술대학원(Suwon, Korea)에 의뢰하여 평가하였으며, 우정 바이오(Suwon, Korea)의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 허가를 받아 진행되었다(승인번호 WJIACUC20190405-2-06). 실험동물은 7주령의 Sprague-Dawley (SD) rat 수컷을 이용하여 수행하였고, (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기 횟수 시간당 10-20회, 조명시간 12시간(오전 8시-오후 8시) 및 조도 150-300 Lux

의 조건에서 사육하였으며, 2주 이상의 적응 기간 이후 경구 당부하 검사와 실험동물의 허벅지 근육 조직에서 포도당 대사에 관여하는 유전자의 발현을 정량하였다.

**경구 당부하 검사**

실험동물의 내당능 측정을 위해 대조군(PBS 투여군, control), 포도당 투여군(Glc), 포도당/시험물질 동시투여군(Glc/F), 맥아당 투여군(Mal), 맥아당/시험물질 동시투여군(Mal/F)으로 시험군을 나누었다( $n=6$ ). 실험 전 절식하여 공복 상태를 유지하고, Glc/F와 Mal/F 시험군에게 체중 kg 당 1.84 g의 시험물질(6 mg DNJ/kg 체중)을 경구 투여한 뒤, 꼬리 정맥에서 채혈해 혈당 농도를 측정하였다. 시료 투여 30분 후 40% 포도당 용액과 맥아당 용액을 체중 kg 당 5 mL씩 경구 투여하고, 투여 직후와 30, 60, 90, 120분 뒤의 혈당 농도를 측정하였다.

**허벅지 근육 조직에서 포도당 대사 관련 유전자 발현 정량**

수컷 SD rat에 체중 kg 당 1.84 g (6 mg DNJ/kg body weight)의 유산균 발효 뽕잎 추출물을 경구 투여한 뒤 30분 후 40% 포도당 용액을 체중 kg 당 5 mL 경구투여하였다. 당 용액 투여 2시간 후 과량의 isoflurane으로 희생시켜 허벅지 근육 조직을 분리하였다. 분리된 조직 50 mg에 1 mL easy-BLUE를 첨가한 뒤 균질기를 이용해 조직을 파쇄하여 총 RNA를 추출하고 포도당 대사에 관여하는 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 정량하였다.

**통계처리**

실험 결과는 세 번의 반복 실험에 의해 얻어졌으며, 평균 값±표준 편차로 표시하였다. 실험값은 SPSS 23 software (IBM, NY, USA)를 이용하여 Student's *t*-test를 통해  $p<0.05$  수준에서 두 집단의 유의성을 검증하였으며, 다 그룹 간의 차이는 one-way ANOVA를 시행한 후  $p<0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 집단 간 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**$\alpha$ -Glucosidase 저해 활성이 우수한 유산균주 탐색**

실험에 사용된 총 975개의 균주 중에서 909개의 유산균이 뽕잎 추출물에서 생육이 가능한 것으로 나타났으며, 발효 전과 비교하여 600 nm에서의 흡광도가 0.5 이상 증가한 27개 균주를 생육 활성이 우수한 균주로 1차 선별하였다. 1차 선별된 유산균주를 대상으로  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 27개 균주 중에서 16개 균주가 90% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 특히 SG-053 균주는 96.8%의 저해 활성을 나타내 1 g/mL 농도의 acarbose의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성인 96.5%보다 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 관찰되었다(Table 2). 글리코시드 결합을 가수분해하여 포도당을 방출시키는  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해하면 식후 혈당의 증가를 억제할 수 있어 고혈압과 심혈관계 질환 등

**Table 2. Growth rate of *Lactobacillus plantarum* SG-053 in mulberry leaf extract,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *L. plantarum* SG-053, and 1-Deoxynojirimycin content of mulberry leaf extract by fermentation using *Lactobacillus plantarum* SG-053**

Growth rate in mulberry leaf extract ( $\Delta A_{600}$ )	$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity (%)	1-Deoxynojirimycin content ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		Before fermentation	After fermentation
0.576 $\pm$ 0.063	96.8 $\pm$ 1.1	18.72 $\pm$ 3.61	40.83 $\pm$ 7.59

당뇨병에 의한 합병증의 예방에 도움이 될 수 있다(Ceriello, 2005). Ramchandran과 Shah(2009)는 세포의 다당체를 생산하는 *Streptococcus thermophilus*로 발효한 요거트가 세포의 다당체를 생산하지 않는 *S. thermophilus*로 발효한 요거트보다 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내, 유산균이 가지는  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 유산균이 생성하는 세포의 다당체에 의한 것이라고 보고한 바 있다. Li 등(2016)은 연구에 사용된 *L. plantarum* 6균주 중에서 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 지니는 *L. plantarum* X1을 당뇨 쥐에 투여했을 때 혈당강하제로 시판되고 있는 pioglitazone을 투여한 그룹과 같은 수준으로 식후 혈당이 감소하였으며, 비교적  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 낮은 *L. plantarum*을 투여했을 때와 비교하여 인슐린 저항성을 유의적으로 감소시켜 유산균의  $\alpha$ -glucosidase 활성이 인슐린 저항성 개선 효과와 관련 있다고 보고하였다.

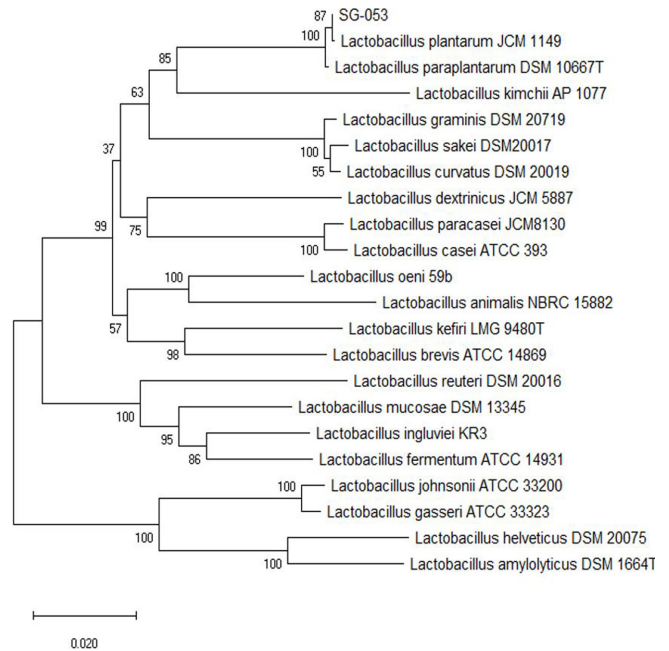
#### 1-Deoxynojirimycin 함량을 증진시키는 균주 탐색

쌀잎 추출물 내에서 생육 활성이 높고,  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 높은 16개 균주 중에서 쌀잎 추출물 발효에 의해 DNJ 함량을 증가시키는 균주를 탐색한 결과, 경기도 성남시 소재 재래 시장에서 구입한 갖김치에서 분리된 SG-053 균주로 발효한 쌀잎 추출물의 DNJ 함량이 발효 전 18.72 mg/mL에서 발효 후 40.83 mg/mL로 발효에 의해 2.2배 증가하여 다른 균주에 비해 높은 DNJ 생성량을 나타내었다(Table 2). Jeong 등(2014)의 연구에서 쌀잎 추출물의 DNJ 함량은 *L. plantarum*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *B. subtilis* 등의 발효에 의해 증가하였으며, Ryu 등(2012)은 유산균 발효에 의한 쌀잎의 DNJ 함량 증가는 유산균의 섬유소 분해 활성에 기인한다고 보고하였다. Takasu 등(2018)의 연구에서 DNJ 표준물질과 *B. amyloliquefaciens*의 배양 상등액, 쌀잎 추출물의 DNJ 함량을 동일하게 조절하여 rat의 경구 sucrose 부하시험을 진행하였을 때 혈중 포도당 농도의 상승을 억제하는 효과에서 큰 차이가 나타나지 않아 DNJ의 유래에 따른 활성의 차이가 없다고 보고하였다.

상기 결과로부터 갖김치에서 분리된 SG-053 균주를 쌀잎 추출물의 발효를 위한 균주로 최종 선정하였다. 최종 선정된 유산균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 계통수 분석을 수행한 결과 SG-053 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 검색 결과 *L. plantarum* JCM1149, *L. plantarum* FFNL190, *L. plantarum* X7022, *L. plantarum* HBUAS56083, *L. plantarum* SRCM101511, *L. plantarum* FSWK112 등의 16S rRNA 유전자 염기서열과 100% 상동성을 나타내었고, 계통수를 작성하여 분석한 결과 *L. plantarum* SG-053으로 동정 명명하였다(Fig. 1).

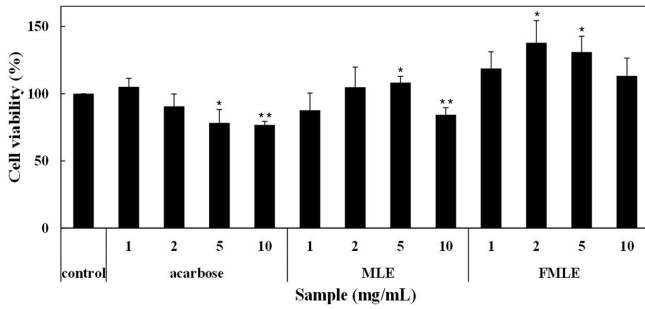
#### L6 근관세포에서의 항당뇨 효능

L6 세포는 rat의 허벅지 근육으로부터 분리한 근관세포로 horse serum 등의 자극에 의해 근관세포로 분화하며, 인슐린에 반응하



**Fig. 1. Phylogenetic tree of *L. plantarum* SG-053 generated by neighbor-joining method based on the sequence of 16S rRNA gene.**

여 다양한 포도당 수송체(GLUT)를 발현하기 때문에 세포의 포도당 흡수 측정 시 널리 이용되고 있다(Kang 등, 2005). *L. plantarum* SG-053으로 발효한 쌀잎 추출물의 L6 근관세포에 대한 세포 독성 평가를 수행하기 위하여, 분화된 L6 근관세포에 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 acarbose와 발효 전후의 쌀잎 추출물을 농도별로 첨가한 뒤 세포의 생존율을 측정하여 생존 세포 수가 시료 미첨가군 대비 80% 이하일 경우 세포에 대한 독성이 있는 것으로 판단하였다(Fig. 2). Acarbose는 5 mg/mL 이상에서 세포의 생존율을 유의적으로 감소시켜 10 mg/mL를 처리하였을 때 생존율이 76.8%까지 감소하여 세포독성이 있는 것으로 확인되었다. 쌀잎 추출물은 5 mg/mL 농도에서 세포의 생존율을 8.3% 증가시킨 반면, 10 mg/mL에서는 15.7% 감소시켰다. *L. plantarum* SG-053으로 발효한 쌀잎 추출물은 처리한 모든 농도에서 세포의 생육을 촉진하는 것으로 나타나 쌀잎 추출물이나 쌀잎 추출물의 유산균 발효액은 L6 근관세포에 대하여 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다. Bae 등(2018)의 연구에서도 0.1 mg/mL의 쌀잎 추출물이 L6 근관세포에 세포독성을 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다. 한편 *L. delbrueckii*를 유럽바다농어(*Dicentrarchus labrax*, L.)에 급여하였을 경우 성장 촉진 및 근관세포의 증식에 관여하는 단백질인 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 유전자 발현을 증가시키고, 근육 세포의 성장과 분화를 억제하는 단백질인 myostatin의 유전자 발현을 감소시킨다고 보고되어 있다(Carnevali 등, 2006).



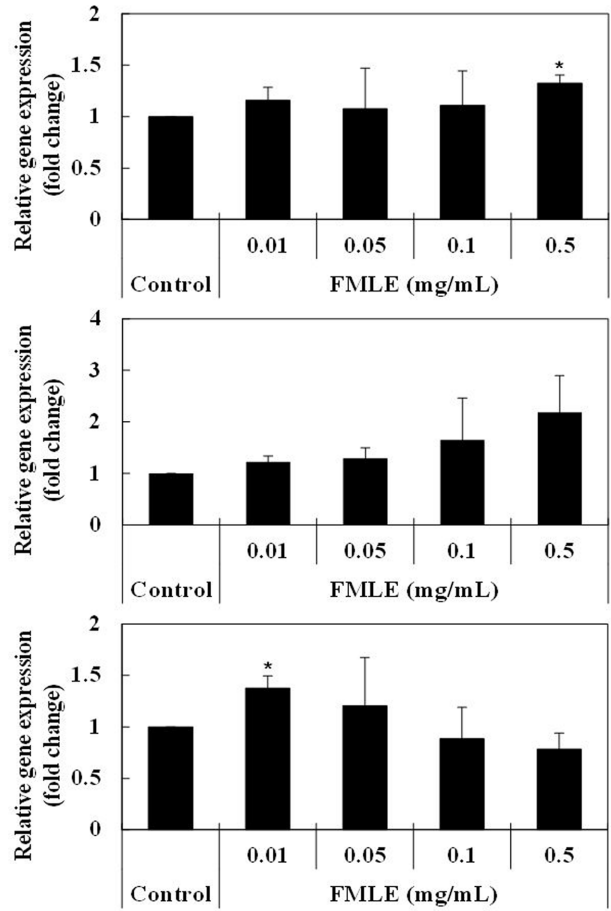
**Fig. 2. Effect of fermented mulberry leaf extract on the viability of L6 myotubes.** MLE, non-fermented mulberry leaf extract treated; FMLE, fermented mulberry leaf extract treated. Data are expressed as mean values with standard deviations shown by vertical bars. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control value

**뽕잎 추출액 발효물이 인슐린 신호전달경로에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향**

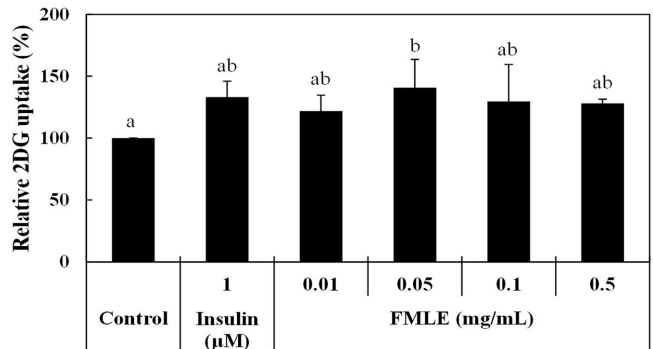
유산균 발효 뽕잎 추출물의 혈당 강하 효과를 확인하기 위해, 분화된 L6 근관세포에 유산균 발효 뽕잎 추출물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/mL의 농도로 처리한 후 인슐린 신호전달경로에 관여하는 IRS-1, PI3K p85 $\alpha$ , GLUT-4의 발현량을 측정하였다. 유산균 발효 뽕잎 추출물의 농도가 0.1 mg/mL 이하에서는 IRS-1 유전자 발현에 유의적인 변화가 나타나지 않았지만, 0.5 mg/mL 농도에서는 1.4배 증가하여 유의적인 차이가 나타났다(Fig. 3(A)). PI3K p85 $\alpha$ 의 발현은 농도 의존적으로 증가하여 0.5 mg/mL 농도에서는 2.2배 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 3(B)). GLUT-4의 발현량은 저농도(0.01 mg/mL)의 유산균 발효 뽕잎 추출물 처리 시 1.4배 유의적으로 증가하였다(Fig. 3(C)). IRS-1 유전자의 발현이 저해되면 세포는 인슐린에 대한 저항성을 갖게 되고, PI3K는 세포의 성장과 분화 등 다양한 기능에 관여하는 효소이며, p85 $\alpha$ 는 PI3K의 조절부위로, 인슐린 수용체 신호전달 경로에 관여한다(Brüning 등, 1998; Czech와 Covera, 1999). GLUT-4는 근육에서 주로 발현되는 포도당 수송체로, 활성화된 인슐린 수용체와 PI3K에 의해 세포막으로 이동하여 포도당의 세포 내 흡수를 촉진한다. IRS-1에 의해 세포의 인슐린 수용체가 활성화되고, 그 신호가 PI3K와 p85 $\alpha$ 로 전달되어 PI3K의 촉매부위인 p110을 통해 Akt를 활성화시키면, AS160 (160 kDa의 Akt 기질)을 통해 GLUT-4에 신호가 전달되어 세포막으로 이동하게 된다. 세포막의 GLUT-4는 혈액에 존재하는 포도당을 세포 내로 흡수되어 혈당을 저하시킨다(Huang 등, 2018). 본 연구결과로 유산균 발효 뽕잎 추출물은 인슐린 신호전달경로의 중요한 단백질인 IRS-1, PI3K p85 $\alpha$ , GLUT-4의 발현을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선하고, 혈중 포도당을 세포 내로 흡수시켜 혈당을 저하시키는 것으로 판단되었다.

**세포 내 포도당의 흡수량 평가**

유산균 발효 뽕잎 추출물 처리에 따른 L6 근관세포의 포도당 흡수도 변화는 2DG를 이용하여 평가하였다. 세포 내로 2DG가 흡수되면 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG6P)로 인산화된 뒤 6-phospho-2-deoxyglucuronic acid로 산화되는데, 이 과정에서 발생하는 NADPH를 검출하여 세포의 2DG 흡수량을 정량할 수 있다(Saito 등, 2011). 세포의 포도당 흡수는 1  $\mu$ M의 인슐린을 처리하였을 때 33.1% 증가하였으며, 유산균 발효 뽕잎 추출액을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 21.8, 40.7,

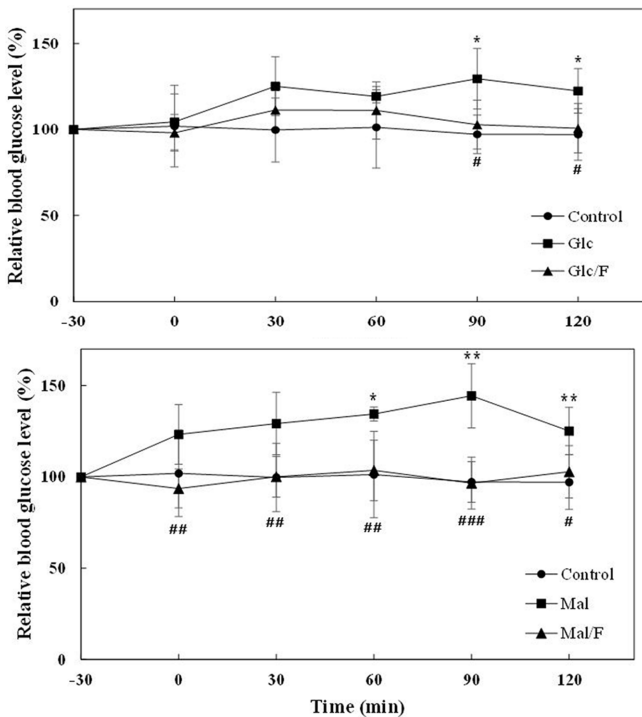


**Fig. 3. Effect of fermented mulberry leaf extract on the expressions of IRS-1 (A), PI3K p85 $\alpha$  (B), and GLUT-4 (C) genes in L6 myotubes.** FMLE, fermented mulberry leaf extract treated; Data are expressed as mean values with standard deviations shown by vertical bars. \* $p < 0.05$ , significantly different from control value.



**Fig. 4. Effect of fermented mulberry leaf extract on the uptake of 2DG in L6 myotubes.** FMLE, fermented mulberry leaf extract treated; Data are expressed as mean values with standard deviations shown by vertical bars. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test for significance of individual comparisons ( $p < 0.05$ ). Different lower case letters indicate significant differences in each group.

29.6, 28.0% 증가하였다(Fig. 4). 유산균 발효 뽕잎 추출액에 의한 포도당 흡수 효과를 1  $\mu$ M의 인슐린을 처리한 군과 비교했을 때, 0.05 mg/mL의 유산균 발효 뽕잎 추출액 처리군이 인슐린 처리군



**Fig. 5. Relative postprandial blood glucose level of SD rats treated with or without fermented mulberry leaf extract and glucose (A) and maltose (B).**  $n=5$  for control group,  $n=6$  for other groups. Glc, Glucose-treated group; Glc/F, Glucose with fermented mulberry leaf extract-treated group (A);  $n=5$  for control group,  $n=6$  for other groups. Mal, Maltose-treated group; Mal/F, Maltose with fermented mulberry leaf extract-treated group (B). Data are expressed as mean values with standard deviations shown by vertical bars. \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ , significantly different from control group; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  and ### $p<0.001$  significantly different between glucose- or maltose-treated group and glucose- or maltose-treated with fermented mulberry leaf extract group

보다 유의적으로 우수한 효과를 나타냈다. Kan 등(2017)의 연구에서 빵잎 추출물은 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서도 사람 피하지방세포의 2DG 흡수를 100% 이상 증가시켰으며, 이는 0.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 DNJ에 해당하는 매우 낮은 농도로, 빵잎 추출물에 DNJ 외에 세포의 포도당 흡수에 관여하는 물질이 있을 것이라고 예상되었다. Jung 등(2019)은 빵잎 추출물을 탄수화물 가수분해효소인 viscozyme L으로 처리하였을 때 C2C12 근관세포와 3T3-L1 지방세포의 2DG의 흡수가 viscozyme L의 처리 전에 비하여 더욱 증가하였는데, 이는 trans-caffeic acid와 syringaldehyde (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-benzaldehyde)의 생성에 의한 것이라고 보고하였다. 주로 lignin이 분해되어 생성되는 페놀화합물인 syringaldehyde는 1 nM 농도에서 L6 근관세포의 2DG 흡수를 유의적으로 증가시켰고, caffeic acid도 12.5  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 마우스의 FL83B 간세포에서 2DG의 흡수를 2배 이상 증가시켰다(Huang 등 2009; Huang 등, 2012). 또한, 최근 Cubas-Cano 등(2019)의 연구에서 xylose를 발효하여 syringaldehyde를 생성하는 유산균이 발견되어 유산균을 이용한 생물전환의 가능성이 제시되었다.

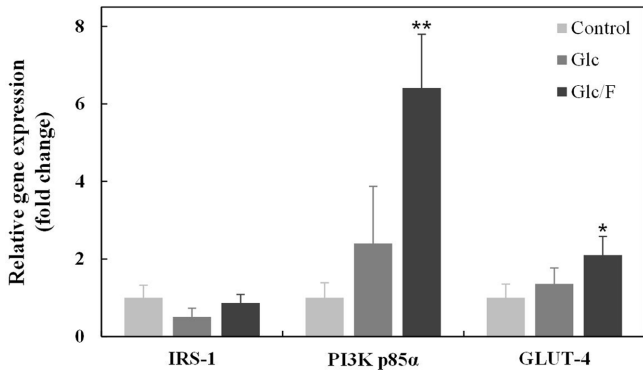
#### Sprague-Dawley rat를 이용한 발효 빵잎 추출물의 항당뇨 효능

경구 포도당 부하시험(oral glucose tolerance test, OGTT)은 공복 혈당과 포도당 용액 경구 투여 2시간 뒤의 혈당을 통해 당뇨

병을 진단하는 방법으로, OGTT 수행시 혈중 포도당 농도는 호르몬이나 신경 반응, 장 운동 등의 영향을 받기 때문에 재현성의 문제가 있지만, 피험자의 제2형 당뇨병을 쉽게 진단할 수 있어 수십 년간 당뇨병의 진단에 사용되어 왔다(Bartoli 등, 2011). 본 연구에서는 모든 시험군의 공복 혈당 농도를 100%로 설정한 뒤 체중 kg 당 5mL의 40% 포도당 용액을 투여한 후 30분 간격으로 혈당을 측정하여 공복 혈당 농도에 대한 백분율로 표시하였다(Fig. 5(A)). 포도당 용액을 투여하지 않은 대조군(Control)의 혈당 농도는 공복 혈당 농도 대비 97.1-102.0% 범위로 유지되었다. 포도당 용액을 투여한 시험군(Glc)의 혈당은 포도당 용액 투여 직후, 30, 60분 후 각각 104.4, 125.2, 119.2%로 증가하다가, 90분 후 129.5%로 크게 증가하여 최대 혈당 농도를 나타냈다. 포도당 용액 투여 120분 후 122.4%로 여전히 높은 혈당 농도가 유지되어 90, 120분에서 대조군과 유의적인 차이를 보였다( $p<0.05$ ). 반면에, 유산균 발효 빵잎 추출물을 함께 투여한 시험군(Glc/F)의 혈당은 30, 60분 후 각각 111.4, 111.1%로 최대 혈당 농도를 나타내었으나 Glc 시험군에 비하여 낮은 수치였고, 90, 120분 후 102.8, 100.8%로 감소하여 Glc 시험군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p<0.05$ ). 빵잎 추출물은 100 mg/kg 이상 투여하였을 때 db/db 마우스의 OGTT에서 식후 혈당을 당뇨 치료제인 metformin 수준으로 강하시켰으며, 고지방식이와 streptozotocin으로 유도된 제2형 당뇨병 마우스에서 60분 이후 혈당을 유의적으로 빠르게 감소시킨 것으로 보고되어 있다(Bae 등, 2018). Li 등(2013)의 연구에서 정상 쥐와 당뇨 쥐의 OGTT 실험에서 DNJ가 혈당의 상승을 억제했는데, 소장에서 포도당을 체내로 흡수하는 SGLT1과 GLUT2의 발현이 감소하여 DNJ에 의해 포도당이 체내로 흡수되지 않는 것으로 확인되었다. OGTT 시험을 통해 유산균 발효 빵잎 추출물의 투여는 식후 혈당 농도를 완만하게 상승하도록 하며, 빠르게 정상 수준으로 회복시킨다는 것을 확인하였다. 이는 소장에서의 포도당 흡수를 지연시키거나, 체내 흡수된 포도당을 세포에서 빠르게 이용하도록 하는 것과 관련이 있는 것으로 판단되었다.

또한, 유산균 발효 빵잎 추출물의 식후 혈당 강하 기전을 확인하기 위하여 경구 맥아당 부하 시험(oral maltose tolerance test, OMTT)을 수행하였다. 경구 투여된 맥아당은 소장과 췌장에서 분비되는 maltase에 의해 포도당으로 분해되어 흡수된다. OMTT는 탄수화물의 소화 과정 중 이당류의 분해 능력을 확인할 수 있어 *in vivo*  $\alpha$ -glucosidase 저해능을 평가할 수 있는 시험 방법으로, 가수분해 전분을 이용하는 것보다 오차가 적고, 포도당을 이용하는 것보다 부작용이 적다(Harano 등, 1977; Jeon 등, 2018). 본 연구에서는 모든 시험군의 공복 혈당 농도를 100%로 설정한 뒤 맥아당 용액 투여 후 30분 간격으로 혈당을 측정하여 공복 혈당에 대한 백분율로 표시하였다(Fig. 5(B)). 맥아당 용액을 투여하지 않은 대조군(Control)의 혈당 농도는 공복 혈당 농도 대비 97.1-102.0% 범위에서 측정되었다. 맥아당 용액을 체중 kg 당 2 g이 되도록 투여한 시험군(Mal)의 투여 직후 혈당은 공복혈당 대비 23.3% 증가하였으며 30, 60, 90, 120분 후 각각 129.2, 144.4, 125.1%로 증가하여 60분부터는 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 맥아당 용액 투여 30분 전 유산균 발효 빵잎 추출물을 투여한 시험군(Mal/F)에서는 맥아당 용액 투여 후 120분 동안 혈당 농도에 큰 변화가 없었으며, 93.7-103.6% 사이에서 유지되어 Mal 시험군과 유의적인 차이를 보였다. Mal 시험군과 Mal/F 시험군의 최대 혈당 농도는 각각 공복 혈당 대비 144.4, 103.6%로 40.8%의 차이를 나타냈으며, Mal/F 시험군에서는 맥아당 투여 후 2시간 동안 혈당이 거의 증가하지 않은 것으로 보아 Mal/F 시험



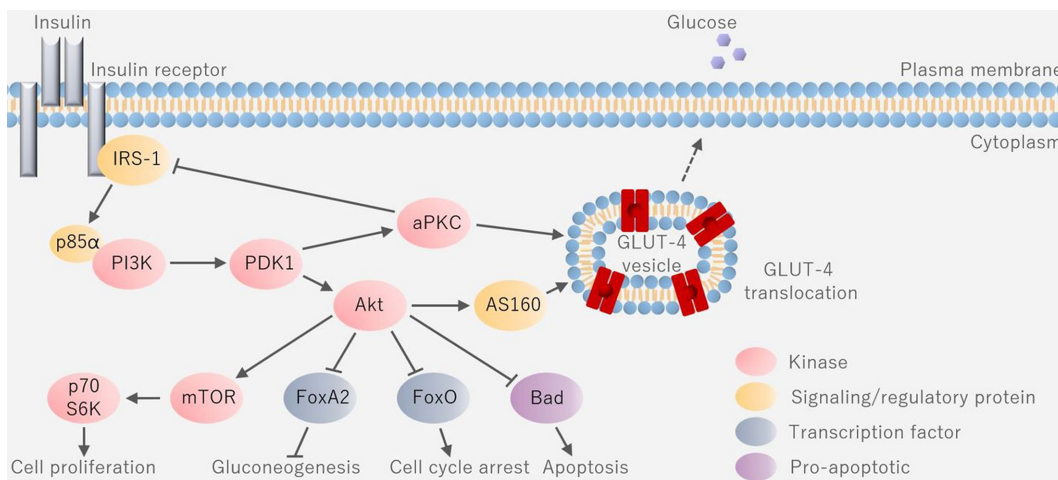


**Fig. 6. Effect of fermented mulberry leaf extract on the expressions of IRS-1, PI3K p85α, and GLUT-4 genes in SD rats.** Glc, Glucose-treated group; Glc/F, Glucose with fermented mulberry leaf extract-treated group; Data are expressed as mean values with standard deviations shown by vertical bars. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, significantly different from control group

군에서 소장의 α-glucosidase에 의한 맥아당의 분해가 저해되어 체내로 흡수되지 않은 것으로 판단되었다. Park 등(2009)의 연구에서 정상 쥐와 당뇨 쥐에게 뽕잎 추출물을 단회 경구 투여한 후 맥아당 용액을 투여하였을 때 최대 혈당 농도가 당뇨 쥐에서 28%, 정상 쥐에서 62%가 감소하였고, Kim 등(2011)은 뽕잎 추출물이 전분, 맥아당, 자당을 이용한 당 부하 검사에서도 식후 혈당이 상승하는 것을 감소시켰으며, α-amylase 저해 활성에 의해 전분이 소화되지 않아 생기는 부작용이 다른 α-glucosidase 저해제에 비해 현저히 감소하였다고 보고하였다. 뽕잎 추출물에 함유된 6 mg/kg의 DNJ는 소장에서 맥아당을 포도당으로 분해하는 α-glucosidase의 활성을 대부분 저해하여 체내로 흡수되는 포도당을 감소시켰고, 유산균 발효 뽕잎 추출물은 이당류 섭취 후 혈당이 급격하게 상승하는 것을 막아 식후에도 낮은 혈당을 유지할 수 있도록 조절할 수 있다는 것이 확인되었다.

한편, 포도당과 유산균 발효 뽕잎 추출물을 투여한 SD rat의 허벅지 근육 조직으로부터 총 RNA를 추출하여 mRNA 수준에서 PI3K p85α, IRS-1, GLUT-4의 유전자 발현을 측정하였다. 그 결

과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 포도당을 투여하였을 때 IRS-1의 발현은 유의적인 변화는 없었으나 대조군의 0.5배로 감소하였고, 유산균 발효 뽕잎 추출물을 투여한 뒤 포도당을 투여한 시험군의 IRS-1 발현은 포도당 투여군에 비해 1.7배 증가하였으나, 대조군과는 유사하였다. PI3K p85α의 발현은 포도당에 의해 2.4배 증가하였으나 유의적인 차이는 없었고, 유산균 발효 뽕잎 추출물에 의해 포도당 처리군보다는 2.7배 증가, 대조군보다는 6.4배 증가하였다. GLUT-4 발현도 또한 포도당 투여군에서 대조군의 1.4배 발현되었으나 유의적인 차이는 없었고, 포도당과 유산균 발효 뽕잎 추출물 투여군에서 대조군의 2.1배 유의적으로 증가하였다. 근육 조직에서 PI3K p85α와 GLUT-4의 발현이 증가하여 L6 근관세포와 유사한 결과가 나타났으나, IRS-1의 발현은 감소하였다. IRS-1은 인슐린, IGF-1, 사이토카인 등에 반응하여 tyrosine 잔기가 인산화되는 수용체 분자로, 인슐린의 신호전달에 중요한 역할을 한다. 인슐린에 의해 IRS-1은 tyrosine이 인산화되면서 활성화되어 PI3K 등의 신호전달자를 구성한다(Gual 등, 2005). 인슐린에 의해 활성화된 인슐린 수용체는 PI3K 경로를 통해 GLUT-4를 세포막으로 이동시켜 세포 내 포도당 흡수를 촉진하는데, 이 경로에서 PI3K에 의해 활성화되는 단백질인 aPKC는 GLUT-4의 이동을 촉진하는 반면 IRS-1의 조절부위인 serine 307 (Ser-307)을 인산화시켜 IRS-1과 인슐린 수용체의 상호작용을 방해함으로써 인슐린에 의한 PI3K 경로와 MAPK 경로가 활성화되는 것을 저해한다(Müssig 등, 2005). Ser-307의 인산화는 인슐린 수용체로부터 IRS-1을 분리하고, IRS-1의 tyrosine 인산화를 감소시키며 IRS-1의 분해를 촉진한다(Gual 등, 2005). PI3K의 하류에 있는 aPKC가 PI3K의 상류에 있는 IRS-1의 활성화를 저해하는 음의 되먹임 기작에 의해 인슐린의 작용이 신호에 특이적으로 조절될 수 있다(Lee 등, 2008; Huang 등, 2018). 본 연구결과에서도 유산균 발효 뽕잎 추출물에 의해 이러한 음의 되먹임작용에 의해 IRS-1의 발현이 저해되는 것으로 판단되었으며, 이를 통해 인슐린에 의한 포도당의 흡수가 적절히 조절되는 것으로 예측된다(Fig. 7), 따라서 유산균 발효 뽕잎 추출물을 당뇨 예방 및 치료를 위한 건강기능성식품으로 개발할 경우 많은 당뇨 치료제들의 문제점인 저혈당증 문제를 극복할 수 있을 것으로 기대된다.



**Fig. 7. Insulin receptor signaling pathway.** IRS-1, insulin receptor substrate-1; GLUT-4, glucose transporter-4; PI3K, phosphoinositide3-kinase; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1; aPKC, atypical protein kinase C; Akt, protein kinase B; AS160, Akt substrate of 160 kDa; p70 S6K, ribosomal protein S6 kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; FoxA2, forkhead box protein A2; FoxO, forkhead box protein O; BAD, Bcl-2-associated death promoter. Line with arrowhead and line with blocked head indicate activation and inhibition, respectively.

## 요 약

본 연구에서는 발효식품으로부터 항당뇨 효능을 지닌 유산균을 분리하여 빵잎 추출물을 발효하고, 제조된 유산균 발효 빵잎 추출물의 항당뇨 효능을 평가하였다. 갖김치에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* SG-053은  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 96.8%로 가장 우수하고, 빵잎을 발효하여 빵잎에 존재하는 항당뇨 지표물질인 1-deoxyojirimycin (DNJ)의 함량을 2.2배 증가시키며 우수한 생육 활성을 나타내어 본 연구에서 빵잎 추출액의 발효에 사용하였다. *L. plantarum* SG-053으로 발효한 빵잎 추출물은 L6 근관세포에 대한 세포독성은 없었고, IRS-1, PI3K p85 $\alpha$ , GLUT4 유전자 발현을 각각 1.4, 2.2, 1.4배로 증가시켰으며, 세포의 2-deoxyglucose 흡수를 1  $\mu$ M의 인슐린보다 높은 수준인 40.7% 증가시켜 인슐린 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 세포의 인슐린 저항성을 개선하는 것으로 확인되었다. 경구 당 부하 검사를 통해 유산균 발효 빵잎 추출물이 포도당 섭취에 의해 증가한 혈당을 빠르게 감소시키고,  $\alpha$ -glucosidase의 저해를 통해 maltose의 분해에 의한 혈당 증가를 억제하였다. 유산균 발효 빵잎 추출물은 SD rat의 허벅지 골격근 조직의 PI3K p85 $\alpha$ 와 GLUT4 유전자 발현을 각각 6.4, 2.1배 증가시켜 L6 근관세포에서와 유사한 결과를 나타냈으며, *in vivo* 근육 조직에서도 인슐린 신호전달경로의 활성화에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 본 연구 결과로 *L. plantarum* SG-053이 빵잎을 효과적으로 발효하여 DNJ의 함량을 증진시킨다는 것을 확인하였으며, *L. plantarum* SG-053으로 발효한 빵잎 추출물은 우수한 항당뇨 효능을 지니는 것을 세포 및 동물실험 수준에서 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구결과는 중소벤처기업부에서 지원하는 2018년도 산학협력 기술개발사업(과제번호: S2602630)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## References

- Asano N, Oseki K, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. N-Containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* 259: 243-255 (1994)
- Bae UJ, Jung ES, Jung SJ, Chae SW, Park BH. Mulberry leaf extract displays antidiabetic activity in db/db mice via Akt and AMP-activated protein kinase phosphorylation. *Food Nutr. Res.* 62: 1473 (2018)
- Bartoli E, Fra GP, Carnevale Schianca GP. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur. J. Intern. Med.* 22: 8-12 (2011)
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell.* 2: 559-569 (1998)
- Cai S, Sun W, Fan Y, Guo X, Xu G, Xu T, Hou Y, Zhao B, Feng X, Liu T. Effect of mulberry leaf (*Folium Mori*) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *Pharm. Biol.* 54: 2685-2691 (2016)
- Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 50: 131-149 (1999)
- Carnevali O, Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S, Cresci A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258: 430-438 (2006)
- Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 54: 1-7 (2005)
- Choi SW, Lee YJ, Ha SB, Jeon YH, Lee DH. Evaluation of biological activity and analysis of functional constituents from different parts of mulberry (*Morus alba* L.) tree. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 823-831 (2015)
- Cubas-Cano E, Gonzales-Fernandez C, Tomas-Pejo E. Evolutionary engineering of *Lactobacillus pentosus* improves lactic acid productivity from xylose-rich media at low pH. *Bioresource Technol.* 288: 121540 (2019)
- Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *Biol. Chem.* 274: 1865-1868 (1999)
- Gao K, Zheng C, Wang T, Zhao H, Wang J, Wang Z, Zhai X, Jia Z, Chen J, Zhou Y, Wang W. 1-Deoxyojirimycin: occurrence, extraction, chemistry, oral pharmacokinetics, biological activities and *in silico* target fishing. *Molecules* 21: E1600 (2016)
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87: 99-109 (2005)
- Harano Y, Sakamoto A, Izumi K, Shimizu Y, Hoshi M, Shichiri M, Shigetani Y, Ohgaku S, Abe H. Usefulness of maltose for testing glucose tolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 924-931 (1977)
- Hitendra J, Narotham Prasad BD, Gurumurthy H, Suvama VC. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5: 255-257 (2016)
- Holzappel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 35: 109-116 (2002)
- Honda K, Moto M, Uchida N, He F, Hashizume N. Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in normal and type 2 diabetic mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 51: 96-101 (2012)
- Huang CH, Chen MF, Chung HH, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of syringaldehyde in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nat. Prod.* 75: 1465-1468 (2012)
- Huang X, Liu G, Gou J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* 14: 1483-1496 (2018)
- Huang DW, Shen SC, Wu JSB. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Agr. Food Chem.* 57: 7687-7692 (2009)
- Jeon HJ, Kim SH, Lee BY. Oral glucose and maltose tolerance test and inhibition effect of  $\alpha$ -glucosidase of *Ecklonia cava* extract (seapolynol) and dieckol. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 47: 347-351 (2018)
- Jeong JH, Lee NK, Cho SH, Jeong DY, Jeong YS. Enhancement of 1-deoxyojirimycin content and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in mulberry leaf using various fermenting microorganisms isolated from Korean traditional fermented food. *Biotechnol. Bioproc. E.* 19: 1114-1118 (2014)
- Jung SH, Han JH, Park HS, Lee DH, Kim SJ, Cho HS, Kang JS, Myung CS. Effects of unaltered and bioconverted mulberry leaf extracts on cellular glucose uptake and antidiabetic action in animals. *BMC Complem. Altern. M.* 19: 55 (2019)
- Kan J, Velliquette RA, Grann K, Burns CR, Scholten J, Tian F, Zhang Q, Gui M. A novel botanical formula prevents diabetes by improving insulin resistance. *BMC Complem. Altern. M.* 17: 352 (2017)
- Kang DH, Khil LY, Park KS, Lee BH, Moon CK. Effects of cadmium on glucose transport in L6 myocytes. *J. Environ. Toxicol.* 20: 75-85 (2005)
- Kim GN, Kwon YI, Jang HD. Mulberry leaf extract reduces postprandial hyperglycemia with few side effects by inhibiting  $\alpha$ -glucosidase in normal rats. *J. Med. Food.* 14: 712-717 (2011)
- Kojima Y, Kimura T, Nakagawa K, Asai A, Hasumi K, Oikawa S, Miyazawa T. Effects of mulberry leaf extract rich in 1-deoxyojirimycin on blood lipid profiles in humans. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47: 155-161 (2010)
- Lee WJ, Choi SW. Quantitative changes of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. *Prev. Nutr. Food. Sci.* 17: 280-285 (2012)
- Lee WC, Kim AJ, Kim SY. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci. Ind.* 36: 2-14 (2003)
- Lee HJ, Lee H, Choi YI, Lee JJ. Effect of lactic acid bacteria-fermented mulberry leaf extract on the improvement of intestinal



- function in rats. Korean J. Food Sci. An. 37: 561-570 (2017)
- Lee S, Lynn EG, Kim JA, Quon MJ. Protein kinase C- $\alpha$  phosphorylates insulin receptor substrate-1, -3 and -4 but not -2: isoform specific determinants of specificity in insulin signaling. Endocrinology 149: 2451-2458 (2008)
- Lee S, Park YS. Oligosaccharide production by *Leuconostoc lactis* CCK940 which has glucansucrase activity. Food Eng. Prog. 21: 383-390 (2017)
- Lee D, Yu JS, Lee SR, Hwang GS, Kang KS, Park JG, Kim HY, Kim KH, Yamabe N. Beneficial effects of bioactive compounds in mulberry fruits against cisplatin-induced nephrotoxicity. Int. J. Mol. Sci. 19: E1117 (2018)
- Li YG, Ji DF, Zhong S, Lin TB, Lv ZQ, Hu GY, Wang X. 1-Deoxyojirimycin inhibits glucose absorption and accelerates glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice. Sci. Rep. 3: 1377 (2013)
- Li X, Wang N, Yin B, Fang D, Zhao Z, Zhang H, Wang G, Chen W. *Lactobacillus plantarum* X1 with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity ameliorates type 2 diabetes in mice. RSC Adv. 6: 63536-63547 (2016)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods 25: 402-408 (2001)
- Müssig K, Staiger H, Fiedler H, Moeschel K, Beck A, Kellerer M, Häring HU. Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. J. Biol. Chem. 280: 32693-32699 (2005)
- Park JM, Bong HY, Jeong HI, Kim YK, Kim JY, Kwon O. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart Wistar rats. Nutr. Res. Pract. 3: 272-278 (2009)
- Ramchandran L, Shah NP. Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme- and  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 92: 895-906 (2009)
- Ryu IH, Kwon TO. Enhancement of piperidine alkaloid contents by lactic acid fermentation of mulberry leaves (*Morus alba* L.). Korean J. Med. Crop Sci. 20: 472-478 (2012)
- Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, Okamoto S, Minokoshi Y. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. Anal. Biochem. 412: 9-17 (2011)
- Takasu S, Parida IS, Onose S, Ito J, Ikeda R, Yamagishi K, Higuchi O, Tanaka F, Kimura T, Miyazawa T, Nakagawa K. Evaluation of the anti-hyperglycemic effect and safety of microorganism 1-deoxyojirimycin. PLoS One 13: e0199057 (2018)
- Zhong Y, Wu S, Chen F, He M, Lin J. Isolation of high  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and fermentation in mulberry leaf powders. Exp. Ther. Med. 18: 147-153 (2019)