

## Bacillus subtilis를 이용한 뽕잎 발효 특성

서승호<sup>1</sup> · 박성은<sup>1</sup> · 김은주<sup>1</sup> · 오도건<sup>2</sup> · 손흥석<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동신대학교 한의과대학  
<sup>2</sup>(주)유니바이오

### Characterization of Fermented Mulberry Leaf Using *Bacillus subtilis*

Seung-Ho Seo<sup>1</sup>, Seong-Eun Park<sup>1</sup>, Eun-Ju Kim<sup>1</sup>, Dohgun Oh<sup>2</sup>, and Hong-Seok Son<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Korean Medicine, Dongshin University

<sup>2</sup>Unibio Corporation

**ABSTRACT** This study was performed to evaluate the characterization of fermented mulberry leaf using *Bacillus subtilis* by focusing on protein degradation and antioxidant activity. The crude protein and total amino acid compositions of mulberry leaf were 21.40% (w/w) and 105.06 mg/g, respectively. The pH level decreased sharply in mulberry leaf extracts fermented using *B. subtilis*, in accordance with an increase in bacteria cell populations (9.49 log CFU/mL) during 36 h of fermentation. The protease activity of mulberry leaf increased to 97.45 units/mL after 5 days of fermentation. After fermentation, free amino acid contents in fermented mulberry leaf increased from 486.91 µg/g to 644.35 µg/g due to considerable elevation of isoleucine (6-fold), alanine (4.67-fold), leucine (4.52-fold), and valine (4.21-fold). The DPPH radical scavenging activity of fermented mulberry leaf also increased from 25.93% to 73.22% after 5 days of fermentation. These results suggest that mulberry leaf fermentation using *B. subtilis* can improve nutritional quality and antioxidant activity.

**Key words:** mulberry leaf, *Bacillus subtilis*, fermentation, protein, antioxidant activity

## 서 론

뽕잎(mulberry leaf)은 식품으로 사용 가능한 원료로 식품공전에 등재된 1998년도부터 가공식품 및 건강식품의 원료로 다양하게 활용되고 있다(1). 뽕잎은 rutin과 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid) 유래 혈압강하 효능,  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol glycoside,  $\beta$ -ecdysone 및 inokosterone 등에서 유래하는 혈중 콜레스테롤과 중성지방 저하작용 등(1-3)이 알려져 기능성 원료로 주목받고 있는 한편, 뽕잎은 약 20% 이상이 단백질로 구성되어 있어 단백질 소재로의 이용가치가 증진되고 있다(4).

단백질은 동물성 단백질과 식물성 단백질로 구분이 되는데, 최근 가수분해를 통한 식물성 단백질 가수분해물의 아미노산 및 저분자 펩티드들이 가지는 다양한 기능성 및 생리활성이 알려지면서 식품 및 제약 산업에 중요한 자원으로 인식되고 있다. 식물성 단백질 펩티드에 관한 효능 연구로는 항고혈압(5-11), 항산화(12,13), 항혈전(14-16), 면역증진(17-19) 등이 보고되고 있으며, 마늘(5), 미역(6), 대두(19), 해바라기(20), 시금치(21) 등 다양한 식물들의 기능성 펩티

드에 관한 연구들이 보고되고 있다. 하지만 높은 단백질을 함유한 뽕잎의 경우 단백질의 기능성 및 생리활성 등 이용가능성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

일반적으로 식물성 단백질의 이용도를 증가시키기 위한 주된 방법은 산, 알칼리 등을 처리하여 가수분해하는 화학적 가수분해 방법이 주로 사용되어 왔다(22). 하지만 화학적 가수분해를 통한 단백질 분해는 과량의 염 생성, 독성물질 생성, 단백질 소화 저해, 아미노산의 racemization 등의 문제를 발생시킬 수 있다(23-26). 반면 미생물 발효를 통한 효소적 가수분해 방법은 단백질의 기능성 유지 및 증진에 도움을 주며, 안전성에서도 장점이 있는 것으로 알려져 있다(27,28). 뽕잎을 발효할 경우 단백질 분해로 인한 저분자 펩티드의 생산은 항산화 활성 등의 기능성 향상을 가져올 수 있고, 유리아미노산 증가는 사료 시장 등에서 소화 및 영양학적 가치가 있을 것으로 보인다.

본 연구에서는 뽕잎 추출물에 *Bacillus subtilis*를 접종하여 발효시킨 후 단백질 및 아미노산의 변화를 관찰하였으며, 항산화 활성 측정을 통해 발효 뽕잎의 활용 가능성을 검토하고자 한다.

Received 21 September 2016; Accepted 10 November 2016

Corresponding author: Hong-Seok Son, School of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 58245, Korea  
E-mail: hsson@dsu.ac.kr, Phone: +82-61-330-3513

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 빵잎 발효

실험에 사용된 빵잎은 전라남도 화순에서 2015년 재배한 것을 사용하였으며, 열풍 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 발효에 사용된 *Bacillus subtilis*는 한국생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 동결 건조된 형태로 분양받아 nutrient broth(Difco, Sparks, MD, USA)를 배지로 사용하여 30°C의 진탕배양기에서 150 rpm, 48시간 전배양을 실시한 후 실험에 사용하였다. 빵잎 발효는 빵잎 건조물 50 g에 20배의 증류수를 첨가하여 추출물을 제조한 후 배양된 *B. subtilis* 3%(v/v)를 접종하였다. 발효는 5일간 진행하였으며 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120시간마다 시료를 채취하여 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### pH 및 생균수 측정

pH는 pH meter기(pH-250L, ISTEK, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였고, 생균수는 시료 0.1 mL에 멸균증류수를 가하여 10배씩 단계별로 희석한 후 nutrient broth agar에 분주하여 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 콜로니수를 계수하였다.

### 빵잎 일반성분 분석

빵잎의 일반성분 분석은 동결 건조된 시료를 사용하였으며, AOAC(Association of Official Analytical Chemists)법(29)에 따라 조회분, 조단백, 조섬유, 조지방을 분석하였다.

### Protease 활성 측정

0.2 M phosphate buffer(pH 7.2)에 0.6% casein이 포함되어 기질용액을 제조하고, 1.5 mL의 기질용액에 시료 추출액 0.5 mL를 넣어 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 용액 2 mL를 가하여 반응을 정지시키고 water bath(37°C, 25 min)에서 방치시킨 다음 여과하였다. 그리고 여액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2.5 mL를 넣고 Folin-Ciocalteu 시약 1 mL를 가하여 37°C에서 20분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tyrosine을 활용하여 작성하였으며(R<sup>2</sup>=0.9882), 효소 활성은 시료 1 mL에 의해 1분간 tyrosine 1 µg을 생성하는 능력을 1 unit으로 나타내었다(30).

### Two-dimensional gel electrophoresis(2DE) 분석

2DE는 Park 등(31)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 sample buffer(7 M urea, 2 M thiourea, 4.5% CHAPS, 100 mM DTT, 40 mM Tris, pH 8.8)를 분취하여 pH 3~10의 nonlinear gradient strips(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 적용하였고, IEF(iso-electric focusing)는 80,000 Vh에서 실시하였다. 이차원 전기영동은 약 5시간 동안 gel당 40 mA에서 실시하였으며, 9~16%

linear gradient polyacrylamide gels(18 cm×20 cm×1.5 mm)에서 분석하였다. 그리고 40% methanol과 5% phosphoric acid로 1시간 동안 단백질을 고정화시킨 후, CBB G-250을 이용하여 12시간 동안 gel을 염색하였다. 그 후 gel을 H<sub>2</sub>O로 탈색하고, Bio-Rad(Richmond, CA, USA)로 스캔하였다.

### 구성아미노산 및 유리아미노산 분석

구성아미노산 분석을 위한 전처리는 동결 건조된 빵잎 0.1 g에 6 N HCl을 가하여 10배 희석하고 질소를 증진하여 밀봉한 후 100°C의 오븐에서 12시간 동안 분해를 시행하였다. 분해액을 증류수로 10배 희석한 후 0.45 µg syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 유리아미노산 분석을 위한 전처리는 동결 건조된 빵잎 0.1 g에 0.1% trifluoroacetic acid를 용매로 하여 10배 희석하고 2시간 동안 진탕 추출을 시행하였다. 추출액은 0.45 µg syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 구성아미노산과 유리아미노산의 분석은 1200 series LC(Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 결합된 6410A triple quadrupole mass spectroscopy를 사용하였다. Positive electro-spray ionization(+ ESI) 장치로 시료를 이온화시킨 후 multiple reaction monitoring(MRM) mode에서 분석을 시행하였으며, nebulizer 압력, N<sub>2</sub> gas 유속 및 온도는 각각 40 psi, 10 L/min, 310°C로 설정하였고 capillary voltage는 4 kV를 유지하였다. Column으로 Gemini-NX C18(4.6×150 mm, 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, 시료 주입량은 5 µL, column oven은 35°C를 유지하였다. 이동상으로는 5 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid가 혼합된 water(A)와 methanol(B)을 사용하였고, 이동상 B의 비율은 5분 4%, 22분 50%, 23.5분 95%, 26.5분 95%, 27분 4%, 30분 0%였으며 유속은 0.5 mL/min으로 유지하였다.

### DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 Blois(32)의 방법에 따라 시료 추출물 0.4 mL에 0.4 mM DPPH 용액 1.6 mL를 가하여 10분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 100 - [(OD of sample/ OD of control)×100]에 의하여 활성도를 산출하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 100 ppm으로 희석하여 사용하였다.

### 통계분석

실험은 3회 반복하여 실시하였고 결과는 평균에 대한 표준편차로 나타내었다. 유의성 검증은 SPSS 21.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석을 하고 Duncan의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 통해 95% 신뢰 수준에서 유의성 검증을 시행하였다.

**Table 1.** Proximate composition of mulberry leaf (%)

	Crude ash	Crude protein	Crude fat	Crude fiber
Mulberry leaf	10.59±0.07 <sup>1)</sup>	21.40±0.39	3.32±0.41	25.97±1.51

<sup>1)</sup>Mean±SD (n=3).

## 결과 및 고찰

### 뽕잎 일반성분 및 구성아미노산 분석

건조된 뽕잎의 일반성분 분석 결과를 Table 1에 나타내었다. 건조된 뽕잎의 조회분 함량은 10.59%, 조단백질 함량은 21.40%, 조지방 함량은 3.32%이며 조섬유 함량은 25.97%였다. 뽕잎의 성분을 분석한 Ye와 Bae(33)는 뽕잎의 조단백질 함량이 18.43%, Kim 등(4)은 조단백질 함량을 27.25%로 보고하고 있다. 각 연구에 따라 조단백질의 함량에 차이를 보이는 것은 뽕잎의 재배지역, 품종 등의 차이에 의한 것으로 생각한다.

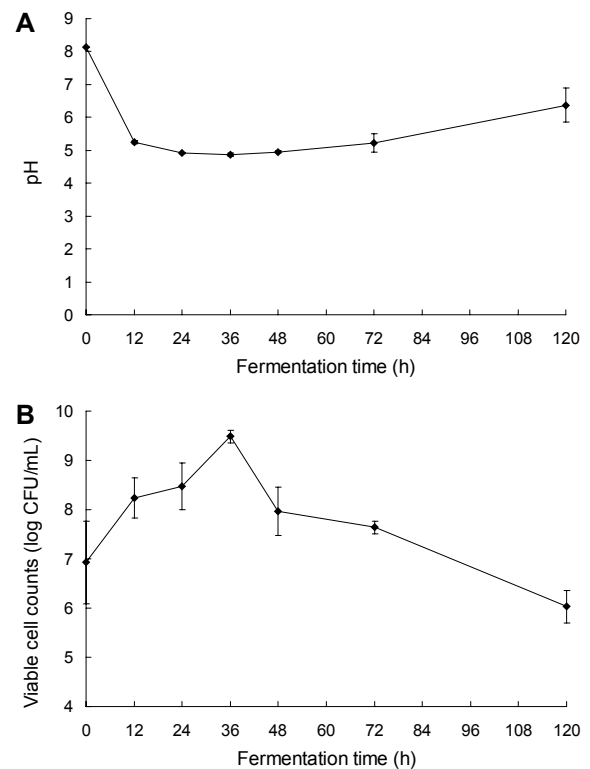
뽕잎 단백질을 구성하고 있는 구성아미노산 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 총 14종(alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine)의 아미노산이 검출되었고, 뽕잎에 함유된 총아미노산의 함량은 105.06 mg/g이었다. Glutamic acid가 32.90 mg/g으로 가장 많은 양이 검출되었으며, aspartic acid(30.78 mg/g), serine(13.27 mg/g) 순으로 높은 함량을 보였다.

### 뽕잎 발효

뽕잎 추출물에 *B. subtilis*를 접종하여 발효하는 동안의 pH 및 생균수 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 발효 전 뽕잎 추출물의 pH는 8.14였으며 12시간 발효 후 5.24로 급격하게 감소하였다. 그 후 48시간까지는 큰 변화를 보이

**Table 2.** The contents of total amino acid in mulberry leaf

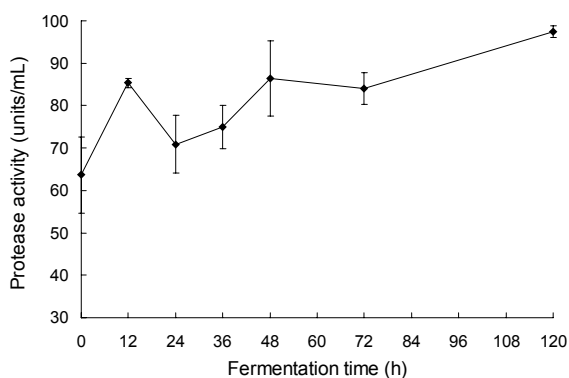
Amino acid	Mulberry leaf (mg/g)
Alanine	4.19±0.20 <sup>1)</sup>
Arginine	6.32±0.40
Aspartic acid	30.78±2.99
Glutamic acid	32.90±1.01
Isoleucine	1.07±0.06
Leucine	0.19±0.01
Lysine	3.04±0.23
Methionine	0.10±0.01
Phenylalanine	0.47±0.03
Proline	1.38±0.01
Serine	13.27±1.13
Threonine	10.13±0.43
Tyrosine	0.20±0.02
Valine	1.02±0.26
Total amino acids	105.06±5.83

<sup>1)</sup>Mean±SD (n=3).**Fig. 1.** Changes in pH (A) and viable cell counts of mulberry leaf extracts during fermentation. Mean±SD (n=3).

지 않았으나 72시간 이후부터 증가하기 시작하여 발효 종료(120시간)에는 6.37의 값을 나타내었다(Fig. 1A). *B. subtilis*를 이용한 뽕잎차 발효과정 중 pH의 변화를 측정된 Sini 등(34)의 연구에 따르면 발효 초기 pH가 감소하고 발효 중 다시 증가하여 본 연구와 유사한 경향성을 보였다. 발효 초기 pH의 감소는 *B. subtilis*의 당 대사 과정에서 pyruvate의 대사를 통해 succinic acid 등의 유기산을 생성하기 때문이다(35,36). 또한, 발효 72시간부터 pH가 증가하는 것은 *B. subtilis*의 발효 중 당을 모두 소모하여 산 생성이 저하되고 발효 과정 중 생성된 단백질 분해효소에 의해 단백질이 분해되면서 암모니아가 생성된 결과로 보인다(34). *B. subtilis*를 이용한 뽕잎 발효 시 생균수 측정 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. 발효 초기 생균수는 6.92 log CFU/mL였고, 12시간 경과 후 8.23 log CFU/mL로 증가하여 발효 36시간 후 9.49 log CFU/mL로 가장 많은 생균수를 보였다. 증자대두를 *B. subtilis* 균주를 이용하여 발효한 Ju와 Oh(37)의 연구에 따르면 12시간 발효 후  $1.1 \times 10^9$  CFU/g으로 생균수가 급격히 증가하는 결과를 보였는데, 본 연구의 결과도 이와 유사하여 다른 영양물질의 첨가 없이도 뽕잎의 환경에서 *B. subtilis*의 증식이 활발한 것으로 보인다.

### Protease 활성 및 단백질 spot 변화

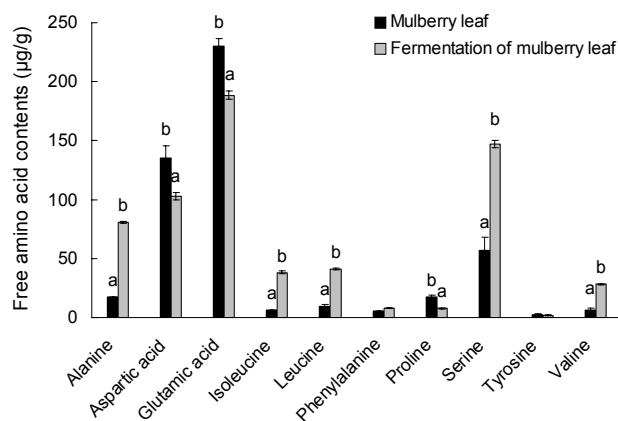
뽕잎 발효 동안 단백질 분해효소 활성 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 발효 12시간째 단백질 분해효소 활성은 85.33



**Fig. 2.** Changes in protease activities of mulberry leaf extracts during fermentation. Mean±SD (n=3).

units/mL였으며 발효 종료 시점에는 97.45 units/mL였다. 발효 24시간 후는 발효 12시간 후보다 효소 활성이 감소한 것으로 측정되었지만, 실험구마다 편차가 커서 반복실험구의 오차로 생각한다. *B. subtilis*를 활용하여 콩을 발효한 Zhu 등(38)의 연구에 따르면 발효 24시간 후 단백질 분해 효소 활성이 최대에 도달 후 발효가 끝날 때까지 유지된 것으로 나타났다.

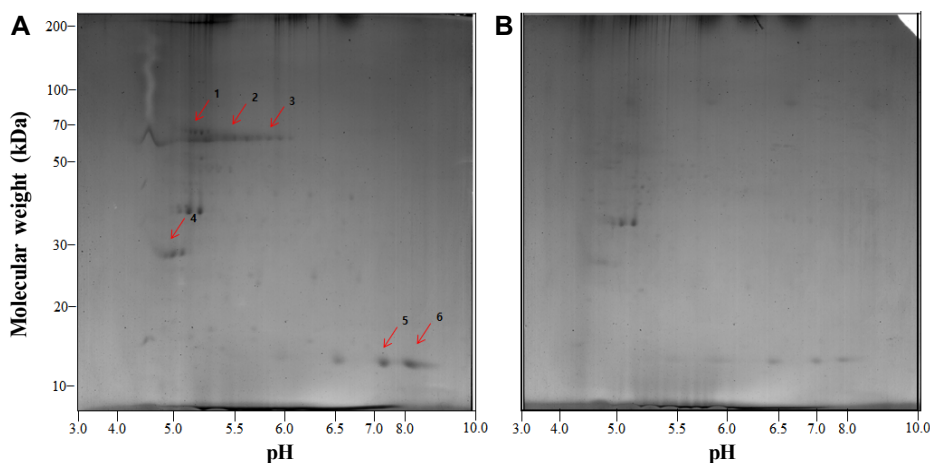
발효에 의한 단백질 변화 패턴을 알아보기 위해 2DE 분석을 시행하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 발효 전 뽕잎의 단백질 spot은 등전점(pI) 3~10, 분자량 10~100 kDa의 범위에서 발견되었다. 발효 후 1~4번 spot은 사라졌으며, 5번과 6번 spot은 희미해졌다. 대두박을 *B. subtilis*로 발효하여 2DE 분석을 시행한 Seo와 Cho(39)의 연구에 따르면 본 실험과 같은 범위에서 단백질 spot을 찍었을 때 발효 12시간 및 24시간 후에 대두박 단백질의 spot이 희미해지는 것을 확인하여 본 연구와 유사한 패턴을 보였다. 본 결과처럼 발효에 의해 단백질의 spot이 희미해지거나 없어지는 것은 *B. subtilis*의 발효과정에서 생성된 단백질 분해 효소에 의해 고분자의 단백질이 저분자 펩티드로 분해된 결과로 판단된다.



**Fig. 4.** Free amino acid contents of mulberry leaf and fermented mulberry leaf. Mean±SD (n=3). Means with different letters in each amino acid are significantly different at  $P<0.05$ .

### 발효 중 유리아미노산 변화

뽕잎 발효에 따른 유리아미노산의 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 측정된 유리아미노산은 alanine, aspartic acid, glutamic acid, isoleucine, leucine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, valine으로 총 10종이었으며, 발효 전 뽕잎의 총 유리아미노산 함량은 486.91 µg/g이었다. Glutamic acid의 함량이 230.26 µg/g으로 가장 높은 함량을 보였고, tyrosine이 2.48 µg/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. *B. subtilis* 균주를 이용하여 5일간 발효한 결과 총 유리아미노산의 함량은 644.35 µg/g으로 증가하였다. 특히 isoleucine의 경우 발효 후 38.31 µg/g으로 발효 전과 비교하여 약 6.26배가 증가하였고, alanine, leucine, valine의 함량도 발효 전과 비교하여 각각 4.67배, 4.52배, 4.21배로 큰 폭으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식품 발효에 사용되는 *Bacillus* 및 *Aspergillus*는 식품 내의 단백질을 분해시키기 위해 강력한 단백질 분해효소를 생성하고 단백질을 분해하는 것으로 알려져 있다(40,41). 미생물에 의해 분해된 단백질은 생체 내의 단백질 소화흡수력을 증진시키고, 단백질의 가수분해 때문에 생성된 저분자 펩티드



**Fig. 3.** Two-dimensional electrophoretograms of mulberry leaf (A) and fermented mulberry leaf (B).

및 아미노산은 다양한 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(42). *B. subtilis natto* 균주를 활용하여 콩 발효를 진행한 Omura 등(43)은 발효과정 중 생성된 단백질 분해효소 활성이 항혈전 활성과 상관관계가 있다는 것을 보고하였고, 마찬가지로 *B. subtilis*를 활용하여 콩 발효를 진행한 Ohno 등(44)은 *B. subtilis* 발효과정 중 단백질 분해효소에 의해 분해된 단백질이 저분자 펩티드인 iturin의 형태로 존재하여 강력한 항진균 작용을 한다고 보고하였다. 이러한 기능성의 향상은 콩 단백질 발효에만 해당하는 것이 아닌 마늘, 미역, 옥수수, 브로콜리, 알팔파 잎 등 다양한 식물성 단백질에서도 관찰되는 결과들(5,6,9,20,21,45,46)로 미루어 발효 단백질 발효할 경우에도 기능성의 향상이 예측된다.

### 항산화 활성

*B. subtilis* 균주를 이용하여 콩잎을 발효했을 때의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성(%)을 측정하였다(Fig. 5). 발효 전에는 25.93%의 소거 활성을 보였고 발효가 진행될수록 점차 증가하여 발효 종료에는 73.22%의 소거 활성을 보였다. 특히 발효 종료에서의 소거 활성은 100 ppm의 ascorbic acid와 유사한 소거 활성을 보였다. *B. subtilis*를 활용하여 검은콩의 항산화 효과에 대해 연구한 Juan과 Chou(47)는 발효 후의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가한다고 보고하였고, *B. subtilis*를 활용하여 콩과 콩비지를 발효시켰을 때의 항산화를 연구한 Zhu 등(38)도 발효가 진행될수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가한다고 보고하고 있다. *B. subtilis*를 이용한 단백질 발효 시 항산화 효과의 증가는 여러 가지 원인이 있을 수 있지만 단백질 분해로 인해 만들어지는 저분자 펩티드의 생성이 항산화 활성의 증가에 영향을 줄 수 있다. 막걸리의 발효과정 중 생성되는 펩티드와 항산화 활성의 관계를 연구한 Rhee 등(48)은 발효과정 중 단백질이 저분자 펩티드로 분해되는 것을 확인하였고, 이러한 저분자 펩티드가 항산화 활성을 보인다고 보고하였다. 대두발효식품의 경우 발효하지 않은 콩과 *B. subtilis*로 발효한 콩을 비교했을 때 항산화 활성이 증가하

는 것으로 알려져 있는데(49,50), 이러한 항산화 활성의 증가는 발효 중 추출에 의한 총폴리페놀 함량의 증가(50,51)와 발효 중 미생물 효소에 의한 펩타이드 함량의 증가가 원인인 것으로 알려져 있다(52). 본 연구 결과에서 *B. subtilis* 발효가 진행될수록 단백질 분해효소의 생성(Fig. 2)과 단백질의 분해(Fig. 3), 유리아미노산의 생성(Fig. 5)은 발효과정 중 변화하는 DPPH 라디칼 소거 활성과 관련성이 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서 *B. subtilis*를 이용하여 콩잎을 발효할 경우가 가장 높은 생균수를 보인 시간은 36시간이었으나, 항산화 활성은 발효 72시간까지 증가하는 모습을 보였으므로 최적 발효 시점은 72시간으로 생각되지만, 최적 발효 시점에 대해서는 발효조건에 따른 추가연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다. 또한, *B. subtilis*를 이용한 콩잎 단백질의 효소적 가수분해 과정에서 생성되는 저분자 펩티드에 관한 연구는 거의 없는 실정므로, 어떠한 펩티드가 항산화에 직접적인 연관성을 가지는지에 관해서도 연구가 필요할 것으로 생각한다.

### 요 약

*Bacillus subtilis* 균주를 이용하여 콩잎을 발효하고, 발효과정 중 성분 변화와 단백질의 변화, 항산화 활성을 측정하였다. 콩잎의 조단백 함량은 21.40%, 구성아미노산은 105.06 mg/g으로 측정되었으며, 그중 주된 아미노산은 aspartic acid와 glutamic acid였다. 콩잎 발효 36시간 후 *B. subtilis*의 생균수는 9.49 log CFU/mL였으며, protease의 활성은 발효가 진행될수록 증가하여 발효 120시간에는 97.45 units/mL로, 콩잎의 환경에서 *B. subtilis*의 생육이 우수하였다. 2DE 실험 결과 발효 전 관찰되던 단백질 spot이 발효 후 분해된 것을 확인하였다. 총 유리아미노산은 발효 전(486.91 µg/g)보다 발효 후(644.35 µg/g) 증가하였으며, 특히 alanine, isoleucine, leucine, valine의 함량이 3배 이상 증가한 것으로 나타났다. DPPH radical scavenging activity는 발효 전 25.93%에서 발효 후 73.22%로 증가하였다.

### 감사의 글

본 연구는 2015년 중소기업청의 융복합기술개발사업(과제 번호: S2357437)의 일환으로 수행하였습니다.

### REFERENCES

1. Park JH, Lee KW, Sung KS, Kim SS, Cho KD, Lee BH, Han CK. 2012. Effect of diets with mulberry leaf and *Cudrania tricuspidata* leaf powder supplements on blood glucose-related biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 766-773.
2. Kodama T, Ishida H, Kokubo T, Yamakawa T, Noguchi H. 1990. Glucosylation of quercetin by a cell suspension

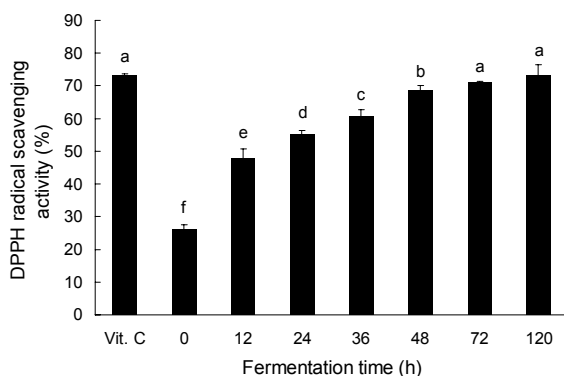


Fig. 5. DPPH radical scavenging activities of mulberry leaf extracts during fermentation. Mean±SD (n=3). Means with the same letter (a-f) are not significantly different at  $P<0.05$ .

- culture of *Vitis* sp.. *Agric Biol Chem* 54: 3283-3288.
3. Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yamane Y. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem* 97: 25-31.
  4. Kim MW, Ahn MS, Lim YH. 2003. The antioxidative activities of mulberry leaves extracts on edible soybean oil. *Korean J Food Cult* 18: 1-8.
  5. Suetsuna K. 1998. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic). *J Nutr Biochem* 9: 415-419.
  6. Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 15: 267-272.
  7. Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25: 621-627.
  8. Jang JH, Jeong SC, Kim JH, Lee YH, Ju YC, Lee JS. 2011. Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chem* 127: 412-418.
  9. Kokeyan Y, Nishii T, Sakakura H, Furuichi Y. 2005. Effect of frying with edible oil on antihypertensive properties of Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom. *Food Sci Technol Res* 11: 339-343.
  10. Choi HS, Cho HY, Yang HC, Ra KS, Suh HJ. 2001. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res Int* 34: 177-182.
  11. Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chem* 126: 878-884.
  12. Lu RR, Qian P, Sun Z, Zhou XH, Chen TP, He JF, Zhang H, Wu J. 2010. Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chem* 123: 1210-1218.
  13. Wu MJ, Clarke FM, Rogers PJ, Young P, Sales N, O'Doherty PJ, Higgins VJ. 2011. Identification of a protein with antioxidant activity that is important for the protection against beer ageing. *Int J Mol Sci* 12: 6089-6103.
  14. Nishi T, Hara H, Tomita F. 2003. Soybean  $\beta$ -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *J Nutr* 133: 352-357.
  15. Pupovac J, Anderson GH. 2002. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *J Nutr* 132: 2775-2780.
  16. Kaneko K, Iwasaki M, Yoshikawa M, Ohinata K. 2010. Orally administered soymorphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut  $\mu_1$ -receptor coupled to 5-HT<sub>1A</sub>, D<sub>2</sub>, and GABA<sub>B</sub> systems. *Am J Physiol* 299: G799-G805.
  17. Domínguez-Vega E, Kotkowska O, García MC, Crego AL, Marina ML. 2011. Fast determination of the functional peptide soymetide in different soybean derived foods by capillary-high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1218: 4928-4933.
  18. Tsuruki T, Yoshikawa M. 2004. Design of soymetide-4 derivatives to potentiate the anti-alopecia effect. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1139-1141.
  19. Yoshikawa M, Kishi K, Takahashi M, Watanabe A, Miyamura T, Yamazaki M, Chiba H. 1993. Immunostimulating peptide derived from soybean protein. *Ann N Y Acad Sci* 685: 375-376.
  20. Megías C, del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *J Agric Food Chem* 52: 1928-1932.
  21. Yang Y, Marczak ED, Usui H, Kawamura Y, Yoshikawa M. 2004. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. *J Agric Food Chem* 52: 2223-2225.
  22. Lee SH, Cho YJ, Chun SS, Kim YH, Choi C. 1995. Functional properties of proteolytic enzyme-modified isolated sesame meal protein. *Korean J Food Sci Technol* 27: 708-715.
  23. De Esliè WD, Cheryan M. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J Food Sci* 46: 1035-1042.
  24. Finley JW, Wheeler EL, Walker Jr HG, Finlayson AJ. 1982. Effect of cystine oxidation on lysinoalanine formation in proteins. *J Agric Food Chem* 30: 818-820.
  25. De Groot AP, Slump P. 1969. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *J Nutr* 98: 45-56.
  26. Provansal MM, Cuq JL, Cheftel JC. 1975. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid cross-links and isomerization of lysine residues. *J Agric Food Chem* 23: 938-943.
  27. Kim SY, Park PSW, Rhee KC. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J Agric Food Chem* 38: 651-656.
  28. Ponnampalam R, Vijayalakshmi MA, Lemieux L, Amiot J. 1987. Effect of acetylation on composition of phenolic acids and proteolysis of rapeseed flour. *J Food Sci* 52: 1552-1556.
  29. AOAC. 1990. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 994.
  30. Hull M. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J Dairy Sci* 30: 881-884.
  31. Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. 2002. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 1459-1466.
  32. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  33. Ye EJ, Bae MJ. 2010. Comparison of components between mulberry leaf tea and fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 421-427.
  34. Sini TK, Santhosh S, Mathew PT. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydr Res* 342: 2423-2429.
  35. Sarkar PK, Cook PE, Owens JD. 1993. *Bacillus* fermentation of soybeans. *World J Microbiol Biotechnol* 9: 295-299.
  36. Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15: 67-78.
  37. Ju KE, Oh NS. 2009. Effect of the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* 41: 399-404.
  38. Zhu YP, Fan JF, Cheng YQ, Li LT. 2008. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*

- 19: 654-661.
39. Seo SH, Cho SJ. 2016. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. *LWT—Food Sci Technol* 70: 208-212.
  40. Kil JO, Kim GN, Park I. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for the production of the enzyme produced from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from *Chungkook-jang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 51-56.
  41. Kim JI, Kang MJ, Kwon TW. 2003. Antidiabetic effect of soybean and chongkukjang. *Korea Soybean Digest* 20: 44-52.
  42. Singh BP, Vij S, Hati S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54: 171-179.
  43. Omura K, Hitosugi M, Zhu X, Ikeda M, Maeda H, Tokudome S. 2005. A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *J Pharmacol Sci* 99: 247-251.
  44. Ohno A, Ano T, Shoda M. 1993. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *J Ferment Bioeng* 75: 23-27.
  45. Baines AD, Shaikh N, Ho P. 1990. Mechanisms of perfused kidney cytoprotection by alanine and glycine. *Am J Physiol* 259: F80-F87.
  46. Kapel R, Rahhou E, Lecouturier D, Guillochon D, Dhulster P. 2006. Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochem* 41: 1961-1966.
  47. Juan MY, Chou CC. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiol* 27: 586-591.
  48. Rhee SJ, Lee CYJ, Kim MR, Lee CH. 2004. Potential antioxidant peptides in rice wine. *J Microbiol Biotechnol* 14: 715-721.
  49. Berghofer E, Grzeskowiak B, Mundigler N, Sentall WB, Walczak J. 1998. Antioxidative properties of faba bean-, soybean- and oat tempeh. *Int J Food Nutr* 49: 45-54.
  50. Lin CH, Wei YT, Chou CC. 2006. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiol* 23: 628-633.
  51. Moktan B, Saha J, Sarkar PK. 2008. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res Int* 41: 586-593.
  52. Park MK. 2011. Effect of enzymatic hydrolysis by proteases on antioxidant activity of *Chungkukjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 327-333.