대사증후군 개선을 위한 뽕잎, 오디, 누에 분말의 혼합 비율 최적화

김민주 · 김현숙¹ · 김애정

경기대학교 대체의학대학원, ¹경기대학교 대학원 대체의학과

Optimization of Mixing Ratio of Mulberry Leaf, Mulberry Fruit, and Silkworm for Amelioration of Metabolic Syndrome

Min-Ju Kim, Hyun-Sook Kim¹, Ae-Jung Kim

Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, ¹Department of Alternative Medicine, Graduate School of Kyonggi University

Received: November 3, 2018

Revised: November 28, 2018

Accepted: December 7, 2018

Correspondence to: Ae-Jung Kim
Graduate School of Alternative
Medicine, Kyonggi University, 24
Kyonggidae-ro 9-gil, Seodaemun-gu,
Seoul 03746, Korea
Tel: +82-2-390-5044
Fax: +82-2-313-4131
E-mail: aj5249@naver.com

Copyright © 2018 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: The aim of this study was optimized mixing ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm for amelioration of the metabolic syndrome by using response surface method (RSM).

Methods: Antioxidant, antidiabetic and antihypertensive activities of fifteen mixed powder of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm by RSM were measured as indicators of metabolic syndrome.

Results: The optimal mixing ratio of mulberry leaves, mulberry fruits, and silkworm with the greatest antioxidant, antidiabetic and antihypertensive activities was as follows: 2.5890 of mulberry leaf (A), 0.1222 of mulberry fruit (B), 2.9999 of silkworm (C). At this time, it was predicted that the total polyphenol content was estimated to be 185.51 tannic acid equivalent mg/g, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity 84.77%, 1-deoxynojirimycin content 415.66 mg/100 g, α -glucosidase inhibitory activity 64.31%, γ -aminobutyric acid content 267.77 mg/100 g, potassium content 1,899.11 mg/100 g, and angiotensin-converting-enzyme inhibitory activity was estimated to be 73.78%.

Conclusions: It was concluded that the significant effect of the mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm on the metabolic syndrome-related biological activity indices (antioxidant activity, antidiabetic activity and antihypertensive activity) was as follows: 2.5890 of mulberry leaf (A), 0.1222 of mulberry fruit (B), 2.9999 of silkworm (C).

Key Words: Mulberry leaf, Mulberry fruit, Silkworm, Metabolic syndrome, Optimization, Response surface methodology (RSM)

서론

2016년 국민건강통계(Korean National Health and Nutrition Examination Survey VII) 보고¹⁾에 따르면 30세 이상 성인 3명 중 1명이 복부비만, 높은 혈압, 높은 공복 혈당, 높은 중성지방 혈중, 낮은 high density lipoprotein-콜레스테롤 등 신체 대사를 나타내는 지표들 중 3개 이상이 정상 범위를 벗어나 있는 대사증후군 증상을 갖고 있는 것으로 나타났다²⁾. 대사증후군이란 비만, 고혈압, 내당능장애, 고중성지

방혈증 등의 심혈관질환 관련 증상이 복합적으로 발생하는 것³⁾으로 World Health Organization에 의해 확립된 대사적 이상 상태를 의미한다^{4,5)}.

최근 과식과 활동량 부족으로 인한 비만, 인슐린 저항성, 산화적 스트레스 등이 그 원인이 되어 각종 심혈관계 질환이나 당뇨병, 고혈압 등의 만성질환 발병 위험을 증가시키는 대사증후군 유병률이 크게 높아졌다^{6,7)}. 이와 같이 대사증후군 유병률이 계속 증가된다면 다른 질병들과는 다르게 1개 이상의 대사증후군 관련 만성질환을 치료

해야 하므로 의료비 또한 증가되어 막대한 국가적 차원의 손실이 우려된다⁸⁾.

양잠소재 중 기능성 식품 소재로 가장 많이 활용되어 온 뽕잎(*Morus alba* L., mulberry leaf)에는 flavones, 식물성 스테롤, triterpenes 등의 생리활성 물질이 다량 함유되어 있고⁹⁾, 특히 γ -aminobutyric acid (GABA)는 녹차 잎에 비해 10배 이상 함유되어 있어 혈압강하 및 항산화 효과가 우수한 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 또한 뽕잎은 중성지방과 low density lipoprotein-콜레스테롤 수준을 감소시키는 등 지질 대사를 개선시키며 공복 혈당을 낮춘다^{12,13)}.

오디(*Morus bombycis* Koidz, mulberry fruit)에 포함되어 있는 안토시아닌(anthocyanin) 색소는 항산화작용, 심혈관계 질환, 당뇨병성 망막장애 치료 등 다양한 생리활성¹⁴⁻¹⁶⁾이 있는 것으로 보고됨에 따라 천연 기능성 소재로 각광받고 있다. 특히 항당뇨 및 지질대사 개선 효과^{17,18)}가 많은 연구를 통해 확인되었다.

누에(*Bombyx mori*, silkworm)는 α -glucosidase 활성을 억제하여 식후 혈당상승을 억제¹⁹⁾하는 데 효과가 있다. 누에에 다량 함유되어 있는 1-deoxynojirimycin (DNJ) 성분은 강력한 α -glucosidase 활성 저해제로 잘 알려져 있으며²⁰⁾, 미토콘드리아의 활성을 증가시켜 adenosine tri-phosphate 생산을 유도하여 항비만 효과가 있는 것으로 보고되어 있다^{21,22)}.

Response surface methodology (RSM)는 통계적 방법을 이용하는 실험계획법의 하나로, 실험에서 얻은 데이터를 통해 적절한 모델 함수를 끌어내 반응 변수가 최대가 되는 반응 조건을 최적화시키는 통계적 기술이며, 최소한의 실험으로 최대한의 정보를 얻어낼 수 있도록 계획된다²³⁾. 본 연구에서는 대사증후군 개선을 위한 소재로 뽕잎, 오디, 누에를 선정하고 RSM을 이용하여 항산화, 항당뇨, 항고혈압 활성(대사증후군 관련 생리활성지표)이 최대로 발현되는 뽕잎, 오디, 누에의 최적 혼합 비율을 도출함으로써 새로운 대사증후군 개선 식품 제조의 기초 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 뽕잎, 오디, 누에는 2017년 국립농업과학원(National Institute of Agricultural Sciences, Jeonju, Korea)에서 생산된 것으로 동결건조(FD5808, Ilsin Biobase,

Dongducheon, Korea) 후 분쇄하여 40 mesh 체에 내려 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

2. 실험 설계

뽕잎, 오디, 누에 분말 시료의 최적 혼합 비율을 도출하기 위한 실험 설계는 Design Expert 10 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) 프로그램을 사용하였으며, 반응표면분석법(RSM)의 Box-Behnken 설계법에 따라 15개의 실험점을 설정하였다. 즉 독립변수는 뽕잎(X_1), 오디(X_2), 누에(X_3)의 함량으로 설정하였고, 예비 실험을 거쳐 각 요인의 최소 및 최대 범위는 여러 차례 예비실험을 거쳐 0~3으로 결정하였다.

종속변수는 total polyphenol 함량, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능, DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성, GABA 함량, potassium 함량, angiotensin-converting-enzyme (ACE) 저해 활성으로 설정하였다. 실험 설계에 따른 실험점은 Table 1에 제시된 바와 같다.

3. 실험 방법

1) 시료 추출물 제조

뽕잎, 오디, 누에 분말을 RSM에 의해 설정된 혼합 비율대로 혼합(Table 1)하여 15개의 혼합분말 시료를 다음과 같이 제조하였다. 즉 시료 무게 대비 각각 20배 부피의 70% (v/v) 에탄올을 첨가한 후 72시간 동안 상온에서 추출하였으며, 3회 여과(No. 2, Whatman, Maidstone, England)시켜 최종 에탄올 추출액을 얻었다. 에탄올 추출액은 진공감압농축기(vacuum rotary evaporator; N-1110, EYELA, Tokyo, Japan)로 30 mL까지 농축시킨 후 동결건조기(freezing dryer; FD5808, Ilsinbiobase, Dongducheon, Korea)에서 건조시켜 분말화하였으며 냉동 보관하면서 사용하였다. 분말 시료는 70% EtOH을 이용하여 1,000 μ g/mL 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다. GABA 함량, DNJ 함량, potassium 함량 측정을 위한 전처리는 각 실험 방법에 따로 제시하였다.

2) Total polyphenol 함량

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 에탄올 추출 시료의 total polyphenol 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하는 Singleton과 Rossi²⁴⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 추출물 350 μ L에 50% Folin-Ciocalteu 시약 70 μ L를 가하여 3분간 정치한 후, 2% (w/v) Na_2CO_3 용액 350 μ L를 첨가하여 60분간 반응시키고 이를 750 nm에서 흡

Table 1. Independent Variables and Their Coded Levels and Actual Values Used for Optimization

No.	Coded levels			Actual values (ratio)		
	X ₁	X ₂	X ₃	Mulberry leaf powder (X ₁)	Mulberry fruit powder (X ₂)	Silkworm powder (X ₃)
1	-1	0	-1	0	1.5	0
2	0	1	1	1.5	3.0	3.0
3	1	1	0	3.0	3.0	1.5
4	0	0	0	1.5	1.5	1.5
5	-1	-1	0	0	0	1.5
6	0	0	0	1.5	1.5	1.5
7	1	0	1	3.0	1.5	3.0
8	0	1	-1	1.5	3.0	0
9	-1	1	0	0	3.0	1.5
10	-1	0	1	0	1.5	3.0
11	1	0	-1	3.0	1.5	0
12	0	-1	1	1.5	0	3.0
13	1	-1	0	3.0	0	1.5
14	0	0	0	1.5	1.5	1.5
15	0	-1	-1	1.5	0	0

광도를 측정하였다. Total polyphenol 함량은 tannic acid를 이용한 표준곡선으로 계산하였다.

3) DPPH radical 소거능

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 에탄올 추출 시료의 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) radical 소거능은 Blois의 방법²⁵⁾을 다소 변형하여 실시하였다. 즉 시료 100 μ L에 1.5×10^{-4} M DPPH 용액 100 μ L를 가하여 실온의 암실에서 30분간 정치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) DNJ 함량

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 시료의 DNJ 함량 측정은 Kim 등²⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 시료 각 1 g을 50 mL centrifuge tube에 담고, 50 mM HCl 20 mL를 가하여 15분간 초음파로 추출하였다. 시료는 10분간 원심분리(4°C, 3,000 rpm)하여 상등액을 분리한 후 침전물에 다시 50 mM HCl 20 mL를 가하여 2분간 추가 추출을 실시하였다. 추출물을 원심분리하여 얻은 상등액을 모은 후 50 mM HCl을 이용하여 50 mL로 정용하였다. DNJ 표준용액 및 추출물의 유도체화는 표준용액과 추출물 10 μ L에 0.4 M potassium borate buffer (pH 8.5) 10 μ L를 넣고 균질화한

후 FMOC-Cl 20 μ L를 첨가하여 상온(20°C)에서 20분간 반응시켰다. 100 mM glycine 10 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후 반응액에 0.1% acetic acid 950 μ L를 첨가하고, nylon syringe filter (0.2 μ m; Whatman, Clifton, NJ, USA)를 이용하여 여과한 후 HPLC (Nexera X2 system, Shimadzu, Kyoto, Japan) 분석시료로 사용하였다.

5) α -glucosidase 저해 활성

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 에탄올 추출 시료의 α -glucosidase 억제 효능은 Tibbot과 Skadsen의 방법²⁷⁾을 다소 변형하여 측정하였다. 반응 혼합물의 총 부피는 160 μ L로 맞추었다. 각각의 well에 sample 20 μ L와 100 mM phosphate buffer (pH 6.8) 20 μ L를 넣은 후 α -glucosidase (10 mM phosphate buffer [pH 6.8]에 녹인 0.2 unit/mL 농도) 20 μ L를 넣고 37°C에서 5분 동안 preincubation을 시켰다. 기질로 사용된 2.5 mM *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (*p*NPG)는 100 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 20 μ L를 넣은 후 37°C에서 15분 동안 incubation 시켰다. 0.2 M sodium carbonate solution 80 μ L를 넣어 반응을 종결시킨 후 microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro, GreenMate Bio, Seoul, Korea)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 산출하였다.

Inhibition (%)

$$= \{1 - (\text{ASam} - \text{ASam}_C / \text{ACont} - \text{ACont}_C)\} \times 100$$

ASam: Sample 시료를 넣었을 때의 흡광도

ASam_C: Sample 시료를 넣고 pNPG를 넣지 않았을 때의 흡광도

ACont: Sample 시료를 넣지 않은 Control의 흡광도

ACont_C: 반응을 시키지 않은 Control의 흡광도

6) GABA 함량

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 시료의 GABA 분석을 위한 추출물 제조, 유도체화 및 HPLC 분석은 Tomita 등의 방법²⁸⁾을 다소 변형하여 실시하였다. 즉 뽕잎, 오디, 누에 혼합물 시료 각 1 g을 50 mL centrifuge tube에 담고 증류수 40 mL를 가한 후 homogenizer로 2분간 균질화시킨 시료는 4°C에서 10분간 원심분리(3,000 rpm)한 후 상등액을 분리해내고, 침전물에 다시 증류수 40 mL를 가하여 2분간 추가 추출을 하였다. 추출물을 원심분리하여 얻은 상등액을 모두 모은 후 증류수를 이용하여 50 mL로 정용하였다. 추출물은 0.2 μ m nylon syringe filter (Whatman, Clifton, NJ, USA)로 여과하고, Nexera X2 system (Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 분석하였다. Column으로 MightysilTM RP-18 GP column (4.6×250 mm, 5 μ m, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 이동상 A는 HPLC water 2 L에 AccQ-Tag Eluent A concentrate 200 mL를 희석하였고 이동상 B는 AccQ-Tag Eluent B를 이용하였다. 용매조성은 기울기 용리로 초기 A:B를 90:10으로 유지했으며, 15분까지 80:20, 30분까지 50:50, 50분까지 0:100 및 60분까지 90:10으로 분석하였다. 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 10 μ L, 검출기는 형광 검출기를 사용하여 excitation wavelength 250 nm, emission wavelength 395 nm로 분석하였다.

7) Potassium 함량

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 시료의 potassium 함량 측정은 습식 분해 후 inductively coupled plasma spectrometer (ICP, Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA, USA)로 분석하였다.

8) ACE 저해 활성

RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합분말 에탄올 추출 시료의 ACE 저해 활성은 Cushman과 Cheung²⁹⁾의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 기질인 Hippury-L-Histidyl-L-Leucine (HHL) (8.3 mM)은 sodium chloride를 300 mM 함유한 50 mM HCL buffer (pH 8.3)에 녹여 준비한 후 ACE enzyme 50 μ L, HHL 150 μ L와 sample 시료 50 μ L를 혼합하였으며, 대조군(control)은 sample 시료 대신 증류수 50 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1N HCl 250 μ L를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 ethyl acetate 500 μ L를 가하여 15초간 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리를 시켜 상등액 200 μ L를 취하였다. 상등액을 120°C에서 30분간 가열하여 건조시킨 뒤 증류수 1 mL를 가하여 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 구하였다.

Inhibition (%)

$$= \{1 - (\text{ASam} - \text{ASam}_C / \text{ACont} - \text{ACont}_C)\} \times 100$$

9) 통계 처리

본 연구의 모든 결과는 3회 반복 측정한 평균값을 이용하였으며, 실험 결과의 분석 및 최적화를 위해 Design Expert 10 (Stat Easy Co., Minneapolis, MN, USA) Program을 이용하여 회귀분석으로 도출된 반응함수들을 분산분석을 통해 유의성을 확인하였고, 모델의 적합성은 F-test로 유의성 검증을 하였다.

결과

1. 뽕잎, 오디, 누에 혼합 비율에 따른 종속변수 측정 결과

뽕잎(X₁), 오디(X₂), 누에(X₃) 함량을 독립변수로 하여 제조한 15개 뽕잎, 오디, 누에 혼합물 시료(Table 1)의 total polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성, GABA 함량, potassium 함량, ACE 저해 활성을 측정하였다(Table 2). Total polyphenol 함량의 경우 120.03 ~ 189.18 mg tannic acid equivalent (TAE)/g 범위의 값을 보였는데, 5번 샘플(뽕잎 0, 오디 0, 누에 1.5)이 120.03 mg TAE/g으로 가장 낮았고, 13번 샘플(뽕잎 3, 오디 0, 누에 3)이 189.180 mg TAE/g으로 가장 높게 나타났다. DPPH radical 소거능은 78.94 ~ 90.95% 범위의 값을

Table 2. Antioxidant Activities, Antidiabetic Activities, and Antihypertensive Activities of Mulberry Leaf (X_1), Mulberry Fruit (X_2), and Silkworm (X_3) by Response Surface Design

No.	Total polyphenol content (mg TAE/g)	DPPH radical scavenging activity (%)	DNJ content (mg/100 g)	α -glucosidase inhibitory activity (%)	GABA content (mg/100 g)	Potassium content (mg/100 g)	ACE inhibitory activity (%)
1	149.78	81.22	188.74	45.07	182.92	1,175.05	47.42
2	160.05	83.91	306.32	62.31	222.28	1,500.86	60.89
3	169.65	85.86	276.88	59.93	220.42	1,615.75	57.51
4	165.16	89.73	295.25	61.21	230.32	1,605.53	54.78
5	140.03	79.29	440.17	70.22	275.74	1,527.57	80.53
6	164.05	88.51	302.25	60.43	226.53	1,598.45	53.98
7	168.65	85.07	321.55	58.10	241.84	1,694.01	66.00
8	182.48	90.10	220.12	47.42	206.86	1,482.13	53.49
9	157.98	78.94	276.87	49.67	210.98	1,282.32	55.35
10	146.58	80.50	367.99	59.29	237.28	1,413.97	62.64
11	186.32	89.65	244.51	52.57	218.76	1,801.71	60.61
12	170.36	82.10	391.38	67.87	268.36	1,715.72	74.43
13	189.18	85.01	333.63	62.22	256.16	1,918.05	76.18
14	166.27	90.95	297.11	62.85	232.41	1,612.37	55.25
15	153.52	81.18	276.89	60.65	250.54	1,997.06	57.63

TAE: tannic acid equivalent, DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DNJ: 1-deoxynojirimycin, GABA: γ -aminobutyric acid, ACE, angiotensin-converting-enzyme.

보였는데, 9번 샘플(뽕잎 0, 오디 3, 누에 1.5)이 78.94%로 가장 낮았고, 14번 샘플(뽕잎 1.5, 오디 1.5, 누에 1.5)이 90.95%로 가장 높게 나타났다. DNJ 함량은 188.74 ~ 440.17 mg/100 g 범위의 값을 보였는데, 1번 샘플(뽕잎 0, 오디 1.5, 누에 0)이 188.74 mg/100 g으로 가장 낮았고, 5번 샘플(뽕잎 0, 오디 0, 누에 1.5)이 440.17 mg/100 g으로 가장 높게 나타났다. α -glucosidase 저해 활성의 경우 45.07 ~ 70.22% 범위의 값을 보였는데, 1번 샘플(뽕잎 0, 오디 1.5, 누에 0)이 45.07%로 가장 낮았고, 5번 샘플(뽕잎 0, 오디 0, 누에 1.5)이 70.22%로 가장 높게 나타났다. GABA 함량은 182.92 ~ 256.16 mg/100 g 범위의 값을 보였는데, 1번 샘플(뽕잎 0, 오디 1.5, 누에 0)이 182.92 mg/100 g으로 가장 낮았고, 5번 샘플(뽕잎 0, 오디 0, 누에 1.5)이 256.16 mg/100 g으로 가장 높게 나타났다. Potassium 함량 측정 결과 1,176.05 ~ 1,997.06 mg/100 g 범위의 값을 보였는데, 1번 샘플(뽕잎 0, 오디 1.5, 누에 0)이 1,176.05 mg/100 g으로 가장 낮았고, 15번 샘플(뽕잎 1.5, 오디 0, 누에 0)이 1,997.06 mg/100 g으로 가장 높게 나타났다. ACE 저해 활성은 47.48 ~ 80.53% 범위의 값을 보였는데, 1번 샘플(뽕잎 0, 오디 1.5, 누에 0)이 47.48%로 가장 낮았고, 5번 샘플(뽕잎 0, 오디 0, 누에 1.5)이 80.53%로 가장 높게 나타

났다. Potassium 함량을 제외한 6가지 지표에서 누에가 1.5 이상 포함된 샘플(5번, 13번)들이 가장 높게 나타나 뽕잎, 오디, 누에 중 누에가 생리활성 효과를 높이는 가장 큰 요인으로 작용했음을 알 수 있었다.

2. 뽕잎, 오디, 누에 혼합 비율에 따른 회귀 분석 결과

설정된 반응별로 모델링 한 후 유의성 검증을 한 결과와 회귀 분석을 통해 얻은 결과들은 Table 3, Fig. 1 ~ 7에 제시하였다. 7가지 지표의 회귀식 작성을 위해 5% 유의수준에서 후방소거법을 실시하여 P값이 0.05 이상인 인자들은 제거하였으며, 모델 적합성은 모두 $P < 0.05$ 수준에서 유의하게 나타났다.

그 결과, 뽕잎(A)과 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 polyphenol 함량이 높아졌고, 누에(C)는 첨가 비율이 증가할수록 total polyphenol 함량이 낮아졌으며, 독립변수 간에 선형효과와 교호작용이 있는 two factor interaction (2FI) model이 선정되었다(Fig. 1). 뽕잎(A)과 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 DPPH radical 소거능이 높아졌는데, 오디는 첨가 비율이 50% 이상이 되면 DPPH radical 소거능이 낮아졌고, 뽕잎의 DPPH radical 소거능은 첨가 비율이 75% 수준이 될 때까지 계속 높아지는 경향을 보였다. 누에(C)의

Table 3. Analysis of Predicted Model Equation for Antioxidant Activities, Antidiabetic Activities, and Antihypertensive Activities of Mulberry Leaf (X_1), Mulberry Fruit (X_2), and Silkworm (X_3)

Response	Model	Mean	R ²	F-value	P-value	Polynomial equation [†]
Total polyphenol content	2FI	164.67±4.29	0.9410	28.70	<0.0001	164.67+14.93A+2.13B-3.31C-9.37AB-9.82BC
DPPH radical scavenging activity	Quadratic	0.109±0.002	0.7759	8.66	0.0028	66.79+17.60A-16.53B+0.3960C-4.97AC-5.75A ² +7.46B ²
DNJ content	Linear	5.69±0.116	0.7515	18.15	0.0002	5.69-0.1406B+0.2023C
α -glucosidase inhibitory activity	Quadratic	58.65±2.80	0.9111	13.66	0.0008	62.98+1.07A-5.20B+5.23C+4.57AB-3.58A ² -4.53C ²
GABA content	Linear	232.09±13.39	0.7380	16.90	0.0003	232.09-1-23.78B+13.84C
Potassium content	Linear	39.86±1.32	0.8023	24.35	<0.0001	39.86+2.60A-1.97B
ACE inhibitory activity	Linear	61.11±6.54	0.5825	8.37	0.0053	61.11-7.69B+5.60C

FI: factor interaction, DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DNJ: 1-deoxynojirimycin, GABA: γ -aminobutyric acid, ACE, angiotensin-converting-enzyme. [†]0≤R²≤1, close to indicates regression line fit the model; [†]Coded equation (the levels of the factor are coded as +1~-1), A: mulberry leaf (%), B: mulberry fruit (%), C: silkworm (%).

Fig. 1. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on total polyphenol content of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm. TAE: tannic acid equivalent.

경우 유의미한 영향을 미치지 않는 요인으로 작용하였고, 독립변수 간에 선형효과와 곡선효과가 존재하는 quadratic model이 선정되었다(Fig. 2).

누에(C)는 첨가 비율이 증가할수록 DNJ 함량이 높아졌고, 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 DNJ 함량이 낮아졌음을 알 수 있었다. 뽕잎(A) 첨가 비율은 채택된 model 내에서는 DNJ 함량에 영향을 미치지 않는 요인으로 나타났으며, 독립변수가 독립적으로 작용하여 선형효과만 존재하는 linear model이 선정되었다(Fig. 3). 누에(C)는 첨가 비율이

증가할수록 α -glucosidase 저해 활성을 높이는 요인으로 작용하였고, 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 α -glucosidase 저해 활성을 낮추는 요인으로 작용하였으며, 독립변수 간에 선형효과와 곡선효과가 작용하는 quadratic model이 선정되었다(Fig. 4).

누에(C)는 첨가 비율이 증가할수록 GABA 함량이 높아졌고, 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 GABA 함량이 낮아졌음을 알 수 있었다. 뽕잎(A)의 첨가 비율은 채택된 model 내에서는 GABA 함량에 영향을 미치지 않는 요인

Fig. 2. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

Fig. 3. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on 1-deoxynojirimycin (DNU) content of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

으로 나타났으며, 독립변수가 각각 작용하여 선형효과만 나타나는 linear model이 선정되었다(Fig. 5).

뽕잎(A)은 첨가 비율이 증가할수록 칼륨 함량이 높아지는 요인으로 작용하였고, 오디(B)는 첨가 비율이 증가할수록 칼륨 함량이 낮아지는 요인으로 작용하였다. 누에

(C) 첨가 비율은 칼륨 함량에 영향을 미치지 않는 요인으로 나타났으며, 독립변수가 각각 작용하여 선형효과만 나타나는 linear model이 선정되었다(Fig. 6).

누에(C)는 첨가 비율이 증가할수록 ACE 저해 활성을 높이는 요인으로 작용하였으며, 오디(B)는 첨가 비율이

Fig. 4. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on α -glucosidase inhibitory activity of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

Fig. 5. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on γ -aminobutyric acid (GABA) content of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

증가할수록 ACE 저해 활성이 낮아지는 요인으로 작용하였다. 뽕잎(A)은 ACE 저해 활성에 영향을 미치지 않는 요인으로 나타났고, 독립변수가 각각 작용하여 선형효과만 나타나는 linear model이 선정되었다(Fig. 7).

뽕잎은 polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, 칼륨 함

량을 높이는 요인으로 작용하였고, 오디는 polyphenol 함량, DPPH radical 소거능을 높이는 요인으로 작용하였다. 누에의 경우 DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성, GABA 함량, ACE 저해 활성을 높이는 요인으로 작용하여 뽕잎, 오디, 누에 중 누에가 가장 많은 지표의 활성을 높이는 요

Fig. 6. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on potassium content of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

Fig. 7. Perturbation plot and response surface plot for the effect of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitory activity of different mixture ratio of mulberry leaf, mulberry fruit, and silkworm.

인으로 작용했음을 알 수 있다.

3. 뽕잎, 오디, 누에 분말 혼합 비율의 최적화

뽕잎, 오디, 누에 분말의 혼합 비율 최적화는 수치 모델과 모형적 모델을 이용하였다(Table 4). 독립변수인 뽕잎,

오디, 누에 분말은 실험 범위 내(뽕잎 0~3, 오디 0~3, 누에 0~3)로 설정하였다. 7가지 종속변수인 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성, GABA 함량, potassium 함량, ACE 저해 활성의 goal area를 모두 최대(maximum)로 설정하였고, 수치 최적화를 통해 제시

Table 4. Optimum Constraint Values Using Two Methods in the Object Goal

	Constrains name	Goal	Numerical optimization
Independent variables	Mulberry leaf powder	In range	2,5890
	Mulberry fruit powder	In range	0,1222
	Silkworm	In range	2,9999
Responses (dependent variables)	Total polyphenol	Maximize	185,51 mg/100 g
	DPPH radical scavenging activity	Maximize	84,77%
	DNJ	Maximize	415,66 mg/100 g
	α -glucosidase inhibitory activity	Maximize	64,31%
	GABA	Maximize	267,77 mg/100 g
	Potassium	Maximize	1,899,11 mg/100 g
	ACE inhibitory activity	Maximize	73,78%

DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhy drazyl, DNJ: 1-deoxynojirimycin, GABA: γ -aminobutyric acid, ACE, angiotensin-converting-enzyme.

Fig. 8. Overlay plot of optimized of mulberry leaf (A), mulberry fruit (B), and silkworm (C) on total polyphenol, 1, 1-diphenyl-2-picrylhy drazyl (DPPH) radical scavenging activity, 1-deoxynojirimycin (DNJ), α -glucosidase inhibitory activity, γ -aminobutyric acid (GABA), potassium, and angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitory activity.

된 34개의 최적점 중 가장 높은 desirability를 나타내는 최적점을 선택하여 최적 비율을 구하였다.

7가지 종속변수의 반응에 따른 최적 비율을 구한 결과, 뽕잎분말은 2.5890, 오디분말은 0.1222, 누에 분말은 2.9999의 비율로 혼합되었을 때 대사증후군 개선 관련 생리활성 효과가 최대로 발현되는 것으로 나타났다. 이때 종속변수

들의 반응값은 폴리페놀 함량이 185.51 mg/100 g, DPPH radical 소거능이 84.77%, DNJ 함량이 415.66 mg/100 g, α -glucosidase 저해 활성이 64.31%, GABA 함량이 267.77 mg/100 g, potassium 함량이 1899.11 mg/100 g, ACE 저해 활성이 73.78%로 예측되었다(Fig. 8).

고찰

최근 20년간의 국민건강통계¹⁾ 보고에 따르면 23.6% (1998년)에서 32.1% (2016년)로 대사증후군 환자가 급격히 증가하였음을 알 수 있다. 대사증후군은 만성질환 발병 위험을 높이고⁷⁾, 의약품에 의한 단기간의 치료로 개선이 될 수 없으므로 예방이나 개선을 위한 천연소재 발굴이 매우 중요하다^{30,31)}.

2016년 건강검진통계 자료(Statistics Korea)¹⁾를 분석한 결과, 대사증후군 위험요인 중 높은 혈압이 43%, 높은 혈당이 37.3%, 높은 중성지방 혈중이 31.1%의 비중을 차지하였다. 이에 위험요인 중 가장 많은 비중을 차지한 높은 혈압과 높은 혈당과 관련된 항고혈압(GABA 함량, potassium 함량, ACE 저해 활성), 항당뇨(DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성) 활성을 지표로 선택하였다. 또한 대사증후군 환자의 경우 건강인에 비해 체내 산화스트레스 수준과 과산화물이 높고, 항산화능이 떨어지게 되므로³²⁾ 항산화(DPPH radical 소거능, 총 폴리페놀 함량) 활성도 생리활성 지표로 선택하여 대사증후군 개선을 위한 뽕잎·오디·누에 분말의 최적 혼합 비율을 구하고자 하였다.

소재가 혼합될 경우 소재가 갖고 있는 항산화 성분들 간의 시너지 효과가 발생하며³³⁾, 폴리페놀 성분의 경우 산화적 스트레스를 감소시킨다³⁴⁾. 본 연구에서 RSM에 의해 설계된 15개의 뽕잎, 오디, 누에 혼합물 추출 시료의 total polyphenol 함량은 140.03~189.18 mg TAE/g으로 높은 수준이고, 뽕잎, 오디, 누에 단독 시료(15번, 1번, 5번)의 DPPH radical 소거능은 79.29~81.22% 수준이었지만, 뽕잎 1.5, 오디 1.5, 누에 1.5 비율로 혼합된 샘플(4번, 6번, 14번)의 DPPH radical 소거능은 거의 10% 이상 높은 88.51~90.95% 수준으로 나타나 뽕잎, 오디, 누에가 혼합될 경우 시너지 효과가 있음을 보여주어, 뽕잎·오디·누에 혼합물은 대사증후군 개선에 도움이 될 것이라 사료된다.

뽕잎과 누에 건조분말에 다량 함유된 DNJ 성분은 α -glucosidase 저해제로 작용하여 혈당 강하에 효과가 있다^{35,36)}고 하였는데, 최적 비율 혼합분말의 DNJ 함량(415.97 mg/100 g)과 α -glucosidase 저해 활성(65.32%) 결과와 일치하며, 뽕잎·오디·누에 최적 비율 혼합물이 혈당을 낮추는 소재가 될 수 있을 것이라 생각된다. GABA는 혈압 상승 억제 효과³⁷⁾뿐만 아니라 체중 감소 효과³⁸⁾가 있어 복합적인 대사증후군 개선에 도움이 될 수 있다. 최적 비율의 뽕잎·오디·

누에 혼합물은 누에(275.74 mg/100 g)보다는 약간 낮게 나타났지만, 뽕잎(250.54 mg/100 g)보다는 높은 267.77 mg/100 g으로 예측되어 뽕잎과 누에가 갖고 있는 GABA 성분의 유효 효과가 최적 비율 혼합물에서도 나타날 것이라 생각된다.

칼륨은 Na/K 펌프의 활성을 돕는 인자로 혈관을 확장시켜 나트륨이 배출되도록 돕기 때문에 중요한 고혈압 개선 인자³⁹⁾ 중 하나이다. 최적 비율 혼합분말에 다량 함유된 칼륨(1,899.11 mg/100 g)은 혈압 상승을 억제하는 데 있어 긍정적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

ACE는 혈압 상승 유발 효소로 angiotensin I 이 angiotensin II로 전환되도록 하여 혈압을 상승시키는데⁴⁰⁾, 식물 자원에 풍부한 페놀성 화합물들은 ACE가 angiotensin I 이 angiotensin II로 전환되는 것을 저해하여 혈압 상승을 억제한다⁴¹⁾. ACE 저해 활성 측정 결과 47.48~80.53% 범위의 값을 보였는데, 뽕잎, 오디, 누에가 함유하고 있는 다양한 페놀성 화합물들이 ACE 저해 활성 효과를 높인 것으로 생각된다.

본 연구 결과 최종적으로 도출된 뽕잎, 오디, 누에의 최적 비율(뽕잎 2.3999, 오디 0.1140, 누에 2.9999) 혼합분말은 7가지 생리활성지표(total polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, DNJ 함량, α -glucosidase 저해 활성, GABA 함량, potassium 함량, ACE 저해 활성)에서 모두 우수한 결과를 나타내 뽕잎·오디·누에 최적 비율 혼합물이 대사증후군 개선에 도움이 될 수 있음을 확인하였다.

결론

본 연구의 목적은 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 대사증후군 개선에 도움을 줄 수 있는 뽕잎, 오디, 누에 분말을 혼합하여 그 시너지 효과를 최대화 할 수 있는 비율을 찾는 것이다. 반응표면분석법을 이용하여 도출된 뽕잎, 오디, 누에의 최적 비율은 뽕잎 2.3999, 오디 0.1140, 누에 2.9999였으며, 이때 종속변수의 최대 반응값은 total polyphenol 함량 182.61 mg/100 g, DPPH radical 소거능 84.93%, DNJ 함량 415.97 mg/100 g, α -glucosidase 저해 활성 65.32%, GABA 함량 304.64 mg/100 g, potassium 함량 1,871.57 mg/100 g, ACE 저해 활성 73.82%로 예측되었다.

그동안 많은 소재들이 단일 소재로 연구되어 왔고, 뽕잎, 오디, 누에 역시 혼합물에 대한 연구는 거의 없었다. 하지만 본 연구는 뽕잎, 오디, 누에 분말을 혼합하여 항산화·

항당뇨·항고혈압에 시너지 효과를 내는 비율을 찾고자 하였다. 도출된 최적 혼합 비율은 최초의 시도라는 데 의의가 있지만, 세 소재 중 관능적 특성이 우수한 오디⁴²⁾의 비율이 매우 낮게 나타났다. 최적 혼합물의 맛을 고려한다면 오디의 비율을 높일 수 있는 후속 연구가 계속 필요하다고 생각된다. 이와 같이 생리활성이 규명된 최적 비율의 뽕잎·오디·누에 혼합분말이 향후 연구에 다양하게 활용되어 현대인의 대사증후군 개선에 도움이 되길 기대한다.

References

1. Ministry of Health & Welfare. 2016 Korean national health statistics. Chungju : Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2017 : 48-55.
2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JJ, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome; a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*. 2009 ; 120(16) : 1640-5.
3. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1998 ; 37(12) : 1595-607.
4. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Med*. 1998 ; 15(7) : 539-53.
5. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001 ; 24(4) : 683-9.
6. Chen CC, Li TC, Chang PC, Liu CS, Lin WY, Wu MT, et al. Association among cigarette smoking, metabolic syndrome, and its individual components: the metabolic syndrome study in Taiwan. *Metab Clin Exp*. 2008 ; 57(4) : 544-8.
7. Kang JS, Kang HS, Yun EK, Choi HR. Factors influencing health behavior compliance of patients with metabolic syndrome. *Korean J Adult Nurs*. 2012 ; 24(2) : 191-9.
8. Kim DH, Lee JY, Lee BH, Lee YJ. Effect of physical activity and lifestyle on the metabolic risk factors in mal office workers. *Korea J Sports Sci*. 2014 ; 23(6) : 1125-38.
9. Ju MJ, Kwon JH, Kim HK. Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J Food Preser*. 2009 ; 16(3) : 442-8.
10. Kim AJ, Kim MH, Chung KS. Effects of mulberry-leaf powder tofu consumption on carpal bone mineral density, biochemical bone turnover markers and serum lipid profiles in smoking male adults living in Choongnam. *J East Asian Soc Dietary Life*. 2007 ; 17(1) : 1-10.
11. Hwang KY, Kim YH, Cho YS, Park YS, Lee JY, Kang KD, et al. Hypoglycemic effect of fermented soybean culture mixed with mulberry leaves on neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2008 ; 37(4) : 452-8.
12. Yang JH, Han JS. Effect of mulberry leaf extract supplement on blood glucose, glycated hemoglobin and serum lipids in Type II diabetic patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(5) : 549-56.
13. Park SH, Jang MJ, Hong JH, Rhee SJ, Choi KH, Park MR. Effects of mulberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007 ; 36(1) : 43-50.
14. Scharrer A, Ober M. Anthocyanosides in the treatment of retinopathies. *Klin Mbl Augenheilk*. 1981 ; 178(5) : 386-9.
15. Kim HB. Quantification of Cyanidin-3-glucoside(C3G) in mulberry fruits and grapes. *Korean J Seric Sci*. 2003 ; 45(1) : 1-5.
16. Kim AJ, Yuh CS, Bang IS. Effect of mulberry fruit tea on the serum lipid profiles and cardiovascular disease markers of middle-aged people living in Choongnam. *J East Asian Soc Dietary Life*. 2006 ; 16(4) : 408-13.
17. Seo KH, Nam YH, Kim YE, Hong EK, Hong BN, Kang TH, et al. Recovery effect of flavonoids from *Morus alba* fruits on alloxan-induced pancreatic islet in zebrafish(*Danio rerio*). *J Appl Biol Chem*. 2015 ; 58(1) : 51-4.
18. Chae JW, Park HJ, Kang S, Cha WS, Ahn DH, Cho YJ. Inhibitory effects of various mulberry fruits(*Morus alba* L.) on related enzymes to adult disease. *J Life Sci*. 2012 ; 22(7) : 920-7.
19. Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim JM, Lee JS, Lee KG, et al. Effects of silk fibroin on oxidative stress and membrane fluidity in brain of SD rats. *Korean J Life Sci*. 2000 ; 10(5) : 511-8.
20. Chung SH, Yu JH, Kim EJ, Ryu KS. Blood glucose lowering effect of silkworm. *Bull K H Pharma Sci*. 1996 ; 24 : 95-100.
21. Nam YR. The effect of silkworm hemolymph on lipid profiles and glucose metabolism in obesity-induced mice [dissertation]. Daejeon (KR): Chungnam National University; 2011.
22. Choi SS, Rhee WJ, Park TH. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Biotechnol Prog*. 2002 ; 18(4) : 874-8.
23. Sim CH. Application of response surface methodology

- for the optimization of process in food technology. Food Eng. Prog. 2011 ; 15(2) : 97-115.
24. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1995 ; 16 : 144-58.
25. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 181(4617) : 1199-200.
26. Kim JW, Kim SU, Lee HS, Kim I, Ahn MY, Ryu KS. Determination of 1-deoxynojirimycin in Morus alba L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high- performance liquid chromatography. J Chromato A. 2003 ; 1002(1-2) : 93-9.
27. Tibbot BK, Skadsen RW. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. Plant molecular biology. 1996 ; 30(2) : 229-41.
28. Tomita R, Todoroki K, Machida K, Nishida S, Maruoka H, Yoshida H, et al. Assessment of the efficacy of anti-cancer drugs by amino acid metabolomics using fluorescence derivatization-HPLC. Anal Sci. 2014 ; 30(7) : 751-8.
29. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin- converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol. 1971 ; 20(7) : 1637-48.
30. Lee KS, Oh CS, Lee KY. Antioxidative effect of the fractions extracted from a Cactus Cheonnyuncho(*Opuntia humifusa*). Korean J Food Sci Technol. 2005 ; 37(3) : 474-8.
31. Yang M, Chung SJ, Floegel A, Song WO, Koo SI, Chun OK. Dietary antioxidant capacity is associated with improved serum antioxidant status and decreased serum C-reactive protein and plasma homocysteine concentrations. European J Nutr. 2013 ; 52(8) : 1901-11.
32. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Celik H, Guzel S, Selek S, et al. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. Int J Clin Pract. 2006 ; 60(10) : 1187-93.
33. Cho HS, Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Cho HS, Lee HJ, et al. Antioxidative activity and nitrite scavenging effect of the composites containing medicinal plant extracts. J Life Sci. 2007 ; 17(8) : 1135-40.
34. Kuhn AM, Tzieply N, Schmidt MV, von Knethen A, Namgaladze D, Yamamoto M, et al. Antioxidant signaling via Nrf2 counteracts lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses in foam cell macrophages. Free Radic Biol Med. 2011 ; 50(10) : 1382-91.
35. Asano N, Kato A, Kizu H, Matsui KM, Watson A, Nash RJ. Calystegine B4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*. Carbohydr Res. 1996 ; 293(2) : 195-204.
36. Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees(*Morus alba* L.) and silkworms(*Bombyx mori* L.). J Agric Food Chem. 2001 ; 49(9) : 4208-13.
37. Omori M, Yano T, Okamoto J, Tsushida T, Murai T, Higuchi M. Effect of anaerobically treated tea (Gaboron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Nippon Nigeikagaki Kaishi. 1987 ; 61(11) : 1449-51.
38. Tews JK. Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. Life Sci. 1981 ; 29(4) : 2535-42.
39. Muntzel M, Drüeke T. A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship. Am J Hypertens. 1992 ; 5(4 Pt 1) : 1S-42S.
40. Corvol P, Michaud A, Soubrier F, Williams TA. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin converting enzyme. J Hypertens Suppl. 1995 ; 13(3) : S3-10.
41. An BJ, Lee JT. Isolation and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitors from *Camellia sinensis* L. and their chemical structure determination. Food Sci Biotechnol. 1999 ; 8(5) : 285-9.
42. Kim AJ, Lee JA, Kim MJ, Kang MS, Kim HB, Lim JD. Quality characteristics of sauce for meat prepared with mulberry leaf powder and mulberry fruit powder. Korean J Food Nutr. 2016 ; 29(4) : 513-20.