

Development of a Beverage Using the Extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizome* and *Inonotus obliquus*

Eun Joo Kim^{1†}, Soon Hee Kim² and Soo Min Kim¹

¹Department of Herbal Foodceutical Science, Daegu Haany University, Kyeongsan 712-715, Korea

²Department of Hotel & Food Service Industry, Gimchen University, Gimchen 740-704, Korea

누에, 뽕나무, 산약 및 차가버섯 추출물을 이용한 음료 개발

김은주^{1†} · 김순희² · 김수민¹

¹대구한의대학교 한방식품약리학과, ²김천대학교 호텔외식산업학과

Abstract

In this study, various antioxidant properties were evaluated by analyzing the proximate composition and free-sugar and DNJ contents of the *Bombyx mori* L., *Mori fructus*, *Morus ramulus*, *Mori folium*, *Dioscoreae rhizome* and *Inonotus obliquus* extracts, and the antidiabetic effect was evaluated through an in-vivo experiment. Product evaluation was conducted after preparing a beverage for the easy use of the mixed extract for biological activity, as a functional resource. The biochemical composition of the extracts was 0.31% crude protein, 0.114 g/100 mL free sugar and 161.02 mg/gdw DNJ, all of which showed excellent results in all the antioxidant ability and α -glucosidase inhibition ability experiments. The beverage showed the following functionalities. The total-polyphenol content was 71.93%, but the electron-donating ability was highest in the 5% extract concentration. Moreover, when the TBARS values were experimented on, KO₂ showed an especially high scavenging ability. During the five-week beverage supply after inducing diabetes with streptozotocin (STZ), the change in the blood sugar was measured, and the STZ-induced diabetes+oral-beverage group (C) showed a lower blood sugar level than the diabetes comparative group (B) in the second week. In the STZ-induced diabetes+free-diet/beverage group (D), the blood glucose level also slowly decreased in the second week. The lowest blood glucose level among the STZ-induced diabetes groups was shown in the fifth week.

Key words : biological activity, DNJ content, α -glucosidase, antioxidant, Mulberry mixed beverage

서 론

음료는 대부분의 인구가 거의 매일 소비하는 식품으로 건강에 대한 관심의 증가로 섬유음료, 기능성 음료 등이 지속적으로 개발되고 있고 이에 따라 내수도 지속적으로 증가할 것으로 전망되고 있다(1). 과거에는 녹차음료에 한정되어 있었던 웰빙 차 음료 시장은 최근에 이르러 참취(2), 호박(3), 생강(4), 진피(5), 등 천연 식물재료의 약리 성분을 함유한 기능성 음료를 개발을 비롯하여 동충하초, 쑥, 솔잎, 감잎차, 홍차 및 코코아의 발효물을 이용한 기능성 음료 제조(6), 생맥산의 처방을 응용한 홍삼, 오미자 및 맥문동

혼합음료의 제조(7)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

누에(*Bombyx mori* L.), 상심자(*Morus fructus*), 상엽(*Morus ramulus*), 상지(*Mori folium*), 산약(*Dioscoreae rhizoma*) 및 차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 공통적으로 항당뇨에 대한 효과가 보고되어 있는데 누에분말의 약리적 기작은 소장의 당분해효소 α -glucosidase 억제작용에 기인한다는 보고(8), 상심자의 항당뇨 효과 보고(9), 유도 당뇨마우스에서 상엽의 항당뇨효과 및 기전에 관한 보고(10), 상백피 추출물이 당뇨 쥐의 혈당 및 효소에 미치는 영향에 관한 보고(11), 산약의 항당뇨 효능에 관한 보고(12) 및 streptozotocin으로 유발한 당뇨쥐에 있어서 차가버섯의 혈당 및 DNA 손상 개선효과에 관한 보고(13) 등이 그러하다. 이외에도 상심자 anthocyanin 색소의 항염증 효능(14), 식용 대두유에 대한 뽕잎추출물의 항산화 작용(15), 산약 추출물

[†]Corresponding author. E-mail : power7274@daum.net
Phone : 82-53-819-1432, Fax : 82-53-819-1427

의 항비만 효과(16), 차가버섯의 추출 조건에 따른 항암효능 비교(17), 상지, 상엽, 상백피 및 상심자의 항지혈효과에 관한 연구(18), 혈액응고에 의한 관상동맥 치료 효과(19), 산약 mucopolysaccharide의 면역증가 효과(20), 산약 열수 추출물의 항골다공증 효과(21), 유전독성 효과(22) 등이 있다.

이에 본 연구에서는 최근까지 우수한 효능이 연구되어 온 뽕나무 산물인 누에, 상심자, 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯을 편리하게 응용할 수 있도록 음료로 개발하여 이화학적 특성, 성분 분석, 기능성 평가 및 항당뇨 동물실험을 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 시료는 동결건조 누에(백옥잠, 영천양잠조합), 상심자(한울 1호, 한울 2호, 수원뽕, 익수뽕, 영천양잠조합), 상엽(청일뽕, YK209, 영천양잠조합), 상지(부강물산), 산약(부강물산), 차가버섯(러시아산)이다. 동결건조 누에와 상심자는 구입하여 1 Kg단위씩 나누어 -75°C deep freezer에 보관하면서 사용하였다. 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯은 1 Kg단위씩 나누어 -25°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

혼합 추출물의 제조

각 추출물은 10배의 증류수를 가하여 초음파기(Kodo technical research Co Ltd, Korea)로 40°C에서 1시간 동안 추출한 후 75°C에서 3시간 동안 환류추출기로 추출하는 방법을 2회 반복한 후 농축하지 않고 실험에 사용하였다. 추출에 사용한 6가지의 시료는 혼합하여 추출한 것을 실험에 사용하였다. 누에, 상심자, 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯의 혼합비율은 Table 1과 같다.

Table 1. Formulation of extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

Samples	Composition
<i>Bombyx mori</i> L.	25
<i>Morus fructus</i>	15
<i>Morus ramulus</i>	15
<i>Mori folium</i>	15
<i>Dioscoreae rhizoma</i>	15
<i>Inonotus obliquus</i>	15

일반성분 분석

수분함량은 상압건조법(23)에 따라 측정하였다. 조회분

은 AOAC(24)에 준하여 실시하였다. 조지방은 Soxhlet법(25)으로 측정하였다. 조단백질은 Kjeldahl법(26)으로 측정하였다. 탄수화물은 시료전체를 100%로 하여 수분, 조단백질, 조지방, 회분 함량 %를 감한 것을 탄수화물(carbohydrates) 함량(%)으로 하였다.

유리당 분석

유리당 분석은 식품공전(27)(일반시험법 당류시험법)의 방법에 따라 실시하였다. 시료 약 5 g을 50 mL 메스플라스크에 정밀히 달아 증류수 25 mL를 가하여 녹인 후 acetonitrile로 50 mL까지 정용하였다. 이를 0.45 µm의 membran 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 표준용액의 조제는 fructose, glucose, galactose, maltose, sucrose, lactose 표준품을 각각 100 mL용 메스플라스크에 정밀히 달아 물 50 mL로 녹인 후 acetonitrile로 100 mL까지 정용하였다. 분석용 column은 waters carbohydrate high performance(4 µm 4.6×250 mm cartridge)를 사용하였고, detector는 RI를 사용하였다. Mobile phase는 acetonitrile과 water를 83:17로 하여 35°C에서 시료 주입량을 20 µL로 조절하여 분석하였다.

1-Deoxynojirimycin(DNJ) 함량 분석

혼합 추출물의 1-deoxynojirimycin(DNJ) 함량은 Stead와 Richards의 방법(28)으로 분석하였다. 시료 0.1 mL에 증류수 10 mL를 가하여 1시간 동안 ultrasonication한 후 30초 동안 vortexing하였다. 다시 60°C에서 1시간 동안 추출한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 모았다. 위의 방법을 2회 반복 추출하여 얻어진 상등액을 증류수로 100 mL가 되도록 희석하였다. 추출물 10 µL, 0.4 M borate buffer (pH 8.5) 10 µL 및 5 mM Fmoc-Cl (in CH₃CN) 20 µL를 첨가한 후, 20°C water circulator에서 20분간 반응시킨 후 20°C로 유지된 0.1 M glycine 10 µL를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응액에 0.1% acetic acid 950 µL를 첨가한 후 0.2 µM syringe filter에 통과시킨 후 24°C를 유지하고 있는 HPLC(Spectra System HPLC ThermoQuest, USA)에 autosampler를 이용하여 20 µL씩 주입하여 분석하였다. 표준용액은 표준품 5 mg을 위하여 증류수 1 mL에 용해시켜 사용하였다. 사용한 column은 Phenomenex Luna C₁₈ column(4.6×250 mm), 측정온도 24°C, 유속은 1.0 mL/min, 형광검출기는 여기파장 254 nm 및 방사파장 322 nm를 사용하였다. 이동상으로는 0.1 % AcOH : CH₃CN(50:50, v/v)를 사용하였다.

전자공여능

전자공여능은 Blois의 방법(29)을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 mL에 2×10⁻⁴ M DPPH 1.0 mL를 넣고 vortex한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였

다. 전자공여능은 [1-(시료첨가구의 흡광도-시료의 흡광도/시료무첨가구의 흡광도)]×100으로 나타내었다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)

TBARS를 측정하기 위하여 oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 mL를 넣은 다음 50 µL의 Tween-40과 0.5 mL 정도의 fish oil을 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3조각을 넣고 교반하면서 0.1 N HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하여 사용하였다. TBARS는 Buege와 Aust의 방법(30)을 약간 수정하여 측정하였다. 1 mL 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 50 µL dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2 mL TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2,000×g의 속도로 15분간 원심분리시켰다. 상등액을 흡광도(Hitachi UV-2001) 531 nm에서 측정하였고, 공시료는 시료대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS 값은 [1-(시료첨가구의 흡광도-시료의 흡광도/시료무첨가구의 흡광도)]×100으로 나타내었다.

α-Glucosidase 저해 활성

혼합 추출물의 α-glucosidase 저해활성은 Haglind와 Tengblad의 방법(31)을 약간 수정하여 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 p-nitro-phenol-α-D- glucopyranosite를 용해시켜 기질로 사용하고, 여기에 효소액 5 unit/0.03 mL를 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 mL, 반응구에는 시료 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 M glyciner NaOH (pH 9.0)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol (PNP)는 405 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 다음 식으로 저해활성을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 p-nitrophenol 생성량}}{\text{대조구의 p-nitrophenol 생성량}}\right) \times 100$$

음료의 배합비

음료 제조를 위한 배합비는 Table 2와 같다. 배합비는 30여명의 학생을 대상으로 3차례 예비 관능평가를 통하여 결정된 것이다. 제품 1000 kcal당 비타민 A, B₁, B₂, B₆, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상이 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가하였다. 당뇨병환자용 식품은 당뇨병환자의 식사 전부 또는 일부를 대신하기 위하여 제품 1000 kcal당 비타민 A, B₁, B₂, B₆, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고

영양소를 첨가하여야 한다. 그리고 포화지방 유래열량은 총 열량의 10% 미만으로 한다. 또한 콜레스테롤은 제품 1000 kcal당 100 mg 이하로 하며, 단당류 및 이당류 유래 열량은 총열량의 10% 미만으로 한다(32).

Table 2. Preparation ratio of beverage using extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

Ingredients	Content(%)
Mixed extract ¹⁾	80.000
Fructooligosaccharide	5.000
Cyclodextrin	5.000
Polydextrose	2.000
Mulberry flavor	0.200
Grape vinegar	0.700
Citric acid(hydrated)	0.250
Sodium citrate	0.020
Sucralose	0.003
Vita FM	0.040
Calcium lactose	1.000
Vitamin C	0.500
Dry yeast	0.105
Ferrous lactate	0.090
Vitamin E mixture	0.036
Zinc oxide	0.036
Vitamin A mixture	0.009
Vitamin B ₆ hydrochloride	0.0045
Vitamin B ₁ hydrochloride	0.003
Vitamin B ₂	0.003
Vitamin D ₃ mixture	0.003
Folic acid	0.0012
Water	4.9963
Total	100

¹⁾Mixed extract: *Bombyx mori* L. 25% + *Mori fructus* 15% + *Morus ramulus* 15% + *Mori folium* 15% + *Dioscoreae rhizoma* 15% + *Inonotus obliquus* 15%.

음료 제조과정

음료의 주원료, 부원료 및 정제수는 배합비율에 따라 혼합하였다. 배합된 음료를 50~60°C에서 교반하여 완전 용해시킨 후 여과기를 통과시켜 1차 여과하였다. 1차 여과된 음료를 90~95°C에서 3~5초간 살균시킨 후 여과기를 통과시켜 2차 여과하였다. 살균, 여과된 액을 병에 충전한 후 충전된 병에 캡을 덮고 실링하였다. 후살균 및 냉각공정은 검사된 제품을 일정한 온도에서 15~30분간 살균 후 냉각시켰다.

관능평가

음료의 관능평가 요원은 대구한의대학교 학생 27명을 선발하여 이들에게 실험 목적 및 평가 항목에 대해 설명하고 충분한 훈련을 실시하여 품질 차이를 식별할 수 있는 능력을 갖춘 전문패널로 구성하였다. 관능평가법은 5점 기호도 검사법(33)(1점 : 아주 나쁘다, 2점: 나쁘다, 3점: 보통이다, 4점: 좋다, 5점 : 아주 좋다)으로 실시하였다. 음료 관능평가의 평가 항목은 외관의 색, 향, 단맛, 쓴맛 및 종합적인 기호도이었다.

실험동물 당뇨 유발

실험동물은 4주령 된 ICR 수컷 마우스를 (주)효창사이언스(대구광역시, 한국)에서 구입하여, 1주일간 일반 고형사료로 적응시킨 후 평균체중이 유사하도록 난괴법에 의해 군을 나누어 실험에 사용하였다. 사육조건은 온도 22±2℃, 상대습도 55±5%, 명암시간 12시간(light/dark cycle)으로 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하였으며, 사료는 (주)효창사이언스에서 공급받은 멸균된 실험동물용 고형사료를, 물은 여과된 멸균 정제수를 충분히 공급하였다. 실험군은 기본식이를 공급한 정상군(A), streptozotocin (STZ)으로 당뇨를 유발한 당뇨 대조군(B), 당뇨 유발 후 16 mL/Kg 추출물 경구투여군(C), 당뇨 유발 후 50% 추출물 자유급여군(D)으로 나누었다. 당뇨의 유발은 streptozotocin (Sigma aldrich, S-0130, USA)을 pH 4.5의 신선한 0.1 M citrate buffer에 용해하여 55 mg/kg 농도로 1회 복강 주사하였고 정상군은 당뇨 유발군과 동일한 스트레스를 주기 위하여 0.1 M citrate buffer를 복강에 주사하였다. 당뇨 유발 확인은 streptozotocin 주사 3일 후 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 비공복시 혈당 수준이 300 mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하고 실험을 실시하였다. 당뇨유발 후 5주 동안 A군, B군, C군은 물과 식이를 자유롭게 섭취하게 하였으며, D군은 50% 추출물과 식이를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

혈당 측정

혈당 측정은 혈당 측정 전 12시간 동안 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 간이혈당계로 측정하였다.

혈액채취

실험동물로부터 혈액채취는 마우스를 에테르로 마취시켜 심장 천자로 약 1 mL 정도의 혈액을 채취한 다음 혈액을 2시간 실온에서 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

체중증가량

체중 측정은 매주 1회 일정시각에 측정하였으며, 혈당 유도 후 시작 체중과 최종 체중을 비교해 증가량을 나타내었다.

혈청 중 간기능 지표효소의 활성도 측정

혈청 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성도는 Reitman과 Frankel의 방법(34)에 준해 제조된 kit (Eiken Co)를 이용하여 측정하였으며, 효소의 활성도는 혈청 1 mL 당 1분간에 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 활성능을 1단위로 하는 Karmen unit로 나타내었다.

결과 및 고찰

추출물의 일반성분, 유리당 함량 및 DNJ 함량

누에, 상삼자, 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯을 혼합 추출하여 일반성분, 유리당 함량, DNJ 함량 및 기능성 평가를 실시한 결과는 Table 3과 같다. 일반성분은 조단백질 0.31%, 조지방 0.38%, 탄수화물 0.42% 및 조회분 0.19%로 분석되었다. 유리당 함량은 fructose 0.067 g/100 mL, glucose 0.047 g/100 mL로 분석되었다. DNJ 함량은 161.02 mg/100 g으로 분석되었다. DNJ (1-deoxyojirimycin)는 monocyclic piperidine 계열의 polyhydroxylated alkaloid 물질로서 뽕나무 뿌리에서 처음으로 분리되었으며(35), 당뇨병에서 혈당 상승의 역할을 하는 α -glucosidase 저해제로 잘 알려져 있다(36). 라 등(37)은 당뇨환자를 위한 새로운 식이요법제 개발에 관한 연구에서 상엽, 상삼자, 인삼, 구기자 및 차가버섯을 추출하여 만든 시료의 DNJ 함량을 분석한 결과 0.85 mg/g이라고 하였는데 이는 본 실험에 사용한 혼합추출물보다 낮은 DNJ 함량을 나타내었는데 본 실험에 사용된 누에 함량(25%)의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

Table 3. Proximate composition, free sugar contents and DNJ (1-deoxyojirimycin) contents of extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

	Calorie(kcal/100g)	6.34±0.37 [*]
	Moisture	98.70±0.28 [*]
Proximate composition (%)	Crude protein	0.31±0.48 ^{**}
	Crude fat	0.38±0.41 [*]
	Carbohydrates	0.42±0.20 [*]
	Crude ash	0.19±0.49 ^{**}
Free sugar contents (g/100 mL)	Fructose	0.067±0.15 ^{***}
	Glucose	0.047±0.32 ^{***}
	Maltose	-
	Sucrose	-
The contents of DNJ(mg/100 gdw)		161.02±3.71 ^{**}

The results are Mean ± S.D.
***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

추출물의 기능성 평가

누에, 상심자, 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯 혼합 추출물의 기능성을 평가한 결과는 Table 4와 같다. 전자공여능과 지방산패 억제능은 전반적으로 높은 기능성을 나타내었으나 시료 간에 유의적 차이가 크지는 않았다. α-Glucosidase 억제능은 추출물 농도 100%에서 79.16%로 높은 억제능을 나타내었다. 본 실험에서 α-glucosidase의 저해효과가 김등(38)이 보고한 강원도산 상엽과 누에의 α-glucosidase 저해효과보다 높았는데 이 역시 본 실험의 추출물의 DNJ 함량이 높게 나타나 이러한 것이 α-glucosidase 저해활성에 영향을 미친 것으로 사료된다.

당 함량을 분석 결과는 Table 6과 같다. 일반성분은 수분 89.19%, 조단백질 0.42%, 조지방 0.31, 탄수화물 9.9%, 조회분 0.19 및 열량은 44.1 kcal를 나타내었다. 유리당은 fructose 1.109%, glucose 1.600%, maltose 0.332% 및 sucrose 0.179%로 나타났다. 혼합 추출의 유리당 분석 결과에서는 fructose 0.067%, glucose 0.047%로 분석되었었고 maltose와 sucrose는 분석되지 않았었다. 그러나 음료를 만든 후 유리당 분석 결과와 비교했을 때 fructose와 glucose의 양이 증가하였고 maltose와 sucrose가 나타났다. 이는 음료 제조 시 첨가한 다양한 재료들의 영향인 것으로 사료된다.

Table 4. The antioxidant ability of extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus* according to different concentration

Antioxidant ability	Concentration of mixed extracts(%)		
	50	75	100
Electron donation ability	53.22±0.21 ^a	53.80±0.35 ^a	54.23±0.11 ^a
Inhibition ability of lipid oxidation	57.63±0.14 ^b	59.86±0.04 ^b	66.57±0.07 ^a
Inhibition ability of lipid oxidation of reacted with H ₂ O ₂	63.37±0.35 ^b	65.97±0.05 ^a	66.83±0.21 ^a
α-Glucosidase inhibition ability	41.20±0.01 ^c	60.36±0.02 ^b	79.16±0.03 ^a

The results are Mean ± S.D.

Means followed by the same superscript in a row are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

음료의 이화학적 특성(당도, pH, 색차 및 탁도)

누에 25%, 상심자 15%, 상엽 15%, 상지 15%, 산약 15% 및 차가버섯 15%의 비율로 혼합한 추출물은 조단백질 0.31%, 유리당 0.114 g/100 mL, DNJ 161.02 mg/gdw을 함유하고 있으며 항산화성을 검토한 결과 모든 항목에서 고르게 우수한 결과를 나타내었다. 또한 α-glucosidase 저해활성도 우수하였다. 이러한 실험 결과를 종합했을 때 음료 제조에 적합한 소재로 판단되었다. 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료의 당도, pH, 색차 및 탁도를 측정할 결과는 Table 5와 같다. 당도는 12.21 °Brix, pH 4.16으로 나타났다. 탁도는 2.818로 나타났다. L, a 및 b값은 각각 1.61, 1.78 및 0.60으로 나타났다.

음료의 기능성 평가

혼합 추출물을 이용하여 음료를 제조한 후 기능성을 평가한 결과는 Table 7과 같다. Total polyphenol 함량을 측정할 결과 음료 농도 5%가 71.93%로 가장 높은 함량을 나타내었고 1%와 3%는 각각 63.37%와 64.24%로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 전자공여능은 음료 농도 5%에서 60.97%로 가장 높았고 음료 농도 1%와 3%는 각각 57.00%, 57.53%로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 조 등(39)은 청일뽕 품종의 뽕잎이 55.2%의 낮은 전자공여능을 나타내었으며 이외의 다른 대부분의 품종은 물과 80% 에탄올 추출물에서 높은 전자공여능을 나타내었다고 보고하여 본 실험 결과와는 차이를 보인다. 이는 본 실험에서 음료를

Table 5. physicochemical characteristics of beverage using extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

Samples	Sugar degree (°Brix)	pH	Hunter value			Turbidity (660 nm)
			L	a	b	
Beverage ¹⁾	12.21±0.06 ^a	4.16±0.08 ^{***}	1.61±0.03 ^{**}	1.78±0.16 ^{**}	0.60±0.08 ^{**}	2.818±0.05 ^{***}

The results are Mean ± S.D.

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

¹⁾Refer to Table 2.

음료의 일반성분 분석 및 유리당 함량

혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료의 일반성분과 유리

제조하기 위하여 첨가한 혼합 추출물 속의 다양한 소재들의 상승효과에 따른 결과인 것으로 사료된다. TBARS를 측정

한 결과 음료 농도 5%에서 지방산패능은 37.37%로 나타났다. H₂O₂와 반응한 경우 32.99%의 억제능을 나타내었고 KO₂와 반응한 경우 79.83%의 억제능을 나타내 특히 KO₂에 대한 억제능이 높은 것으로 나타났다. 전반적으로 음료 농도에 비례하여 지방 산패를 억제하는 경향을 나타내었다.

Table 6. Proximate composition and free sugar contents of beverage using extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

Proximate composition (%)	Calorie(kcal/100g)	44.1±0.38 ^{***}
	Moisture	89.19±0.66 ^{**}
	Crude protein	0.42±0.24 ^{**}
	Crude fat	0.31±0.13 ^{***}
	Carbohydrates	9.9±1.66 ^{**}
	Crude ash	0.19±0.07 ^{**}
Free sugar contents (g/100 mL)	Fructose	1.109±0.21 ^{**}
	Glucose	1.600±0.05 [*]
	Maltose	0.332±0.14 ^{***}
	Sucrose	0.179±0.02 ^{**}

The results are Mean ± S.D.

^{***}p<0.001, ^{**}p<0.01, ^{*}p<0.05.

에 첨가된 다양한 재료들의 향과 맛이 음료에 영향을 주어 낮은 평가를 받은 것으로 사료된다.

실험동물의 체중변화

Streptozotocin(STZ)으로 당뇨를 유발한 후 5주간 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료를 공급하여 체중변화를 측정된 결과는 Table 9와 같다. 실험 기간 시작과 마지막 체중을 비교한 결과 4군 모두 눈에 띄는 체중 변화를 나타내지 못했으나, 당뇨 대조군인 B군과 경구 투여 실험군인 C군에서는 미묘한 체중 감소 경향을 나타내었다. 이것은 streptozotocin(STZ) 투여 후 실험 시작과 마지막에 체중을 비교한 이 등(40)의 결과와 유사한 경향을 나타낸 것으로 STZ 투여에 의한 insulin 생성 부족으로 당뇨가 유발되면 에너지 대사에 이상이 발생하기 때문인 것으로 해석되고 있다.

혈당 변화

Streptozotocin(STZ)으로 당뇨를 유발한 후 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료 공급에 의한 혈당의 변화를 5주간 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험 기간 중 정상군(A)은 혈당변화가 거의 없었으며, 당뇨 대조군(B)은 당뇨유발

Table 7. The antioxidant ability of beverage using extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus* according to different concentration

Antioxidant ability	Concentration of beverage(%)		
	1	3	5
Total polyphenol contents	63.37±0.05 ^b	64.24±0.63 ^b	71.93±0.06 ^a
Electron donation ability	57.00±0.19 ^b	57.53±0.23 ^b	60.97±0.08 ^a
Inhibition ability of lipid oxidation	4.87±0.09 ^c	27.27±0.28 ^b	37.37±0.01 ^a
Inhibition ability of lipid oxidation of reacted with H ₂ O ₂	19.28±0.08 ^c	25.41±0.47 ^b	32.99±0.07 ^a
Inhibition ability of lipid oxidation of reacted with KO ₂	13.78±0.16 ^c	34.50±0.01 ^b	79.83±0.17 ^a

The results are Mean ± S.D.

Means followed by the same superscript in a row are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

음료의 관능평가

혼합 추출물을 이용하여 음료를 제조한 후 관능평가를 실시한 결과는 Table 8과 같다. 색 3.26, 향 2.17, 단맛 2.98, 쓴맛 3.01 및 종합적인 기호도 2.47로 나타나 색을 제외한 모든 항목에서 3점 이하로 나타났다. 이는 혼합 추출물 이외

2주까지는 다소 큰 혈당 증가를 나타내다가 2주째부터 5주차까지 비슷하게 경향의 높은 혈당치를 나타내었다. 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료 경구 투여군인 C군에서는 1주차에서는 당뇨 대조군에 비해 높은 혈당치를 나타내다가 2주차부터 당뇨 대조군(B)에 비해 낮은 혈당치를 나타내

Table 8. Sensory evaluation of beverage using extracts from *Bombyx mori* L., *Morus alba* L., *Dioscoreae rhizoma* and *Inonotus obliquus*

Sample	Color	Flavor	Sweet taste	Bitter taste	Overall acceptability
Beverage ¹⁾	3.26±1.02 ^{**}	2.17±0.89 [*]	2.98±1.24 ^{***}	3.01±1.41 ^{**}	2.47±1.17 ^{**}

The results are Mean ± S.D.

^{***}p<0.001, ^{**}p<0.01, ^{*}p<0.05.

¹⁾Refer to Table 2.

었으며, 3주차부터 5주차까지는 비슷한 혈당치를 나타내었다. 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료 자유급여군인 D군은 처음 1주차까지는 당뇨 대조군(B)에 비해 높은 혈당치를 나타내다가 2주차부터 혈당치가 완만하게 떨어져 최종 5주차에서는 당뇨 유발 시험물질 투여군 중 가장 낮은 혈당치를 나타내는 경향을 보였다. 최 등(41)은 누에 추출물을 이용한 기능성 항당뇨음료의 개발에 관한 연구에서 뽕잎 추출물은 대조그룹에 비하여 전혀 유의적인 혈당강하효과를 기대할 수 없었다고 하였다. 그러나 누에 추출물 투여그룹은 투여 2일째부터 유의적인 혈당 강하효과가 나타나기 시작하였고, 투여 4일째부터 대조그룹에 비하여 현저한 혈당 강하효과가 나타났다고 보고하였다.

Table 9. Effect of beverage on body weight changes in STZ-induced diabetic mice

Group ²⁾	Body weight	
	Initial(g)	Final(g)
A	35.03 ± 1.50 ^{ad1)}	36.24 ± 1.68 ^{ad}
B	29.82 ± 0.92 ^{bd}	27.83 ± 0.93 ^{ce}
C	28.41 ± 1.42 ^{bd}	27.73 ± 1.93 ^{cd}
D	29.79 ± 2.51 ^{bd}	30.04 ± 2.16 ^{bd}

¹⁾Each value represents the mean±S.E. for groups of seven mice
Means a-c followed by the same letter in column are not significantly different(p <0.05)
Means d, e followed by the same letter in row are not significantly different(p <0.05)
²⁾A: basal diet, B: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg), C: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 16 mL/kg, D: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 50% beverage

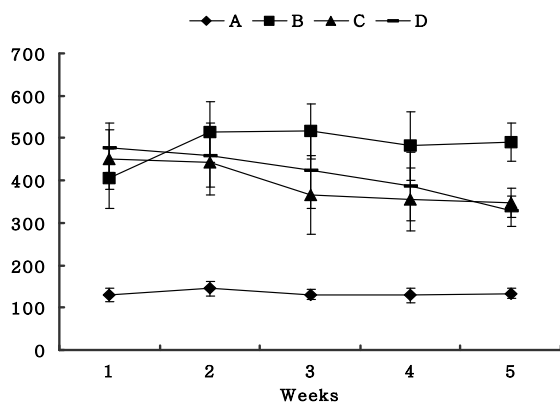


Fig. 1. Effect of beverage on blood glucose level of STZ-induced diabetic rats.

A: basal diet, B: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg), C: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 16 mL/kg, D: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 50% beverage

혈액 중 ALT 및 AST 활성 변화

혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료 공급이 당뇨를 유발한 흰쥐의 간지표 효소인 ALT 및 AST 활성에 미치는 영향을 관찰하여 Table 10에 나타내었다. ALT 활성은 정상군(A)에 비해 당뇨 대조군(B)에서 유의적인 증가를 나타내

었으며 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료 투여 시 ALT 활성이 감소되었는데 특히 50%로 희석한 음료 공급군(D)에서 정상군(A)과 유사한 수치를 나타내었고, 혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료를 경구투여한 군(C)에서도 감소 정도가 큰 것으로 분석되었다.

AST 활성은 당뇨 대조군(B)에서 유의적으로 증가하였고, 50%로 희석한 음료 공급군(D)에서 유의적인 감소가 나타났으며, 양잠산물을 경구투여한 군(C)에서도 AST 활성이 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 10. Effect of beverage on the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase(AST) activities in STZ-induced diabetic rats

(Karmen unit/mL of serum)

Group ³⁾	ALT	AST
A	65.00±12.31 ^(b)2)	37.67±4.03 ^e
B	96.50±18.83 ^a	53.83±4.83 ^a
C	70.17±7.78 ^b	47.83±5.60 ^{ab}
D	65.00±8.00 ^b	44.50±6.02 ^b

¹⁾Each value represents the mean±S.E. for groups of seven rats.
²⁾Means followed by the same letter in column are not significantly different(p<0.05).
³⁾A: basal diet, B: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg), C: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 16 mL/kg, D: basal diet + STZ(i.p. 55 mg/kg) + 50% beverage

요 약

본 연구는 누에, 상심자, 상엽, 상지, 산약 및 차가버섯을 편리하게 응용할 수 있도록 제품을 개발하기 위하여 혼합 추출물의 성분과 기능성을 분석한 후 음료를 제조하여 음료의 성분 분석, 기능성 평가 및 동물실험을 수행하였다.

혼합 추출물의 일반성분 분석 결과 조단백질 0.31%, 조지방 0.38%, 탄수화물 0.42% 및 조회분 0.19%이었다. 유리당은 fructose 0.067 g/100 mL, glucose 0.047 g/100 mL이었고 DNJ는 161.02 mg/gdw을 함유하고 있었으며 항산화성을 검토한 결과 모든 항목에서 우수한 결과를 나타내었다. 또한 α-glucosidase 저해활성도 우수하였다.

혼합 추출물을 이용하여 제조한 음료의 일반성분을 분석한 결과 조단백질 0.42%, 조지방 0.31 및 탄수화물 9.9%로 나타났다. 음료의 유리당 함량 분석 결과 fructose와 glucose가 증가하였다. 음료의 기능성을 평가한 결과 total polyphenol 함량은 71.93%이었고 전자공여능은 농도 5%에서 가장 높았으며 TBARS를 실험한 결과 특히 KO₂에 대한 억제능이 높은 것으로 나타났다.

Streptozotocin으로 당뇨를 유발한 후 5주간 음료를 공급하여 혈당의 변화를 측정된 결과 실험 기간 중 정상군(A)은

혈당변화가 거의 없었으며, 당뇨 대조군(B)은 2주째부터 5주차까지 비슷하게 경향의 높은 혈당치를 나타내었다. 음료 경구 투여군(C)에서는 2주차부터 당뇨 대조군(B)에 비해 낮은 혈당치를 나타내었다. 음료 자유급여군(D)은 2주차부터 혈당치가 완만하게 떨어져 5주차에서는 당뇨 유발 시험물질 투여군 중 가장 낮은 혈당치를 나타내는 경향을 보였다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 지식경제부에서 지원하는 지역연구 산업육성사업(RIS)에 선정된 대구한의대학교 RIS 약선식품브랜드화사업단(접수번호 : A000900017)의 연구사업비의 일부로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim YK, Moon JS, Ryu SH, Lee JH, Kim YS (2010) The relationship between the popular beverages in Korea and reported postprandial heartburn. *Korean J Gastroenterology*, 55, 109-118
- Kim SJ, Kim CK, Kim GH (2004) Quality characteristics of aster scaber and development of functional healthy drinks using its extract. *Korean J Soc Food Cookery Sci*, 20, 310-316
- Youn SJ, Kim GE, Jeong YJ (2003) Monitoring on recipe of old pumpkin extract drink. *Korean J Food Preserv*, 10, 308-313
- Park SH, Baek SH, Han SH (2004) Effects in blood pressure and cerebral blood flow with green ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and development of health drink by using it. *Korean J Food Culture*, 19, 150-157
- Min SH, Park HO, Oh HS (2002) A study on the properties of hot water extracts of Korean dried tangerine peel and development of beverage by using it. *Korean J Soc Food Cookery Sci*, 18, 15-56
- Park GS, An SH, Choi KH, Jeong JS, Park CS, Choi MA (2000) Preparation of the functional beverages by fermentation and its sensory characteristics. *Korean J Soc Food Sci*, 16, 663-669
- Hur NY, Baek EK (2005) Development of traditional drinks using sangmaksin. *Korean J Cul Res*, 11, 166-178
- Chung SH, Kim MS, Ryu KS (1997) Effect of silkworm extract on intestinal α -glycosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet. *Korean J Seric Sci*, 39, 86-92
- Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Yuom JK, Lee HS Moon JY (1996) A study on the antidiabetic effect of mulberry fructuss. *Korean J Seric Sci*, 38, 100-107
- Lee KH, Chung SH (2000) Antidiabetic effect and mechanism of Mori folium on streptozotocin-induced diabetic mouse. *Bull KH Pharma Sci*, 28, 87-99
- Yoon SH, Jung SY, Ha H (2001) Hypoglycemic and enzyme effects of the water extract of Mori radicis cortex in streptozotocin- induced diabetic rats. *J Korean Soc Hygienic Sciences*, 7, 119-123
- Morrison EY, Ragoobirsingh D, Peter SA (2006) The unitarian hupothesis for the aetiology of diabetes mellitus. *Med Hypothesis*, 67, 1115-1150
- Park YK, Kim JS, Jeon EJ, Kang MH (2009) The improvement of chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*) extract supplementation on the blood glucose and cellular DNA damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr*, 42, 5-13
- Kim SY, Park KJ, Lee WC (1998) Antiinflammatory and antioxidative effects *Morus* spp. fructus extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 6, 204-209
- Kim MW, Ahn MS, Lim YH (2003) The antioxidative activities of mulberry leaves extracts on edible soybean oil. *Korean J Food Culture*, 18, 1-8
- Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH, Lee JS, Lim JK, Kim JS (2003) Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 1451-1456
- Park KC, Kil KJ, Lee YJ (2007) The comparative study of the effects of fructificatio inonoti obliqui aqueous extract according to the extraction temperature(1) -anti-oxidative effect-. *Korean J Herbology*, 22, 177-185
- Lee KS, Cho KH, Kim YS, Shin GC, Kwak Y, Bae HS (1992) Experimental studies on the anti-hyperlipidemic effects of mori ramulus, mori folium, mori cortex and mori fructus. *J Kyung Hee Univ Med Cent*, 8, 44-49
- Au ALH, Kwok CC, Lee ATC, Kwan YW (2004) Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca^{+} -activated K^{+} channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgnen. *Eur J Pharmacol*, 502, 123-133
- Choi EM, Koo SJ, Hwang JK (2003) Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated fro, yam(*Dioscorea batatas*). *J Ethnopharmacol*, 91, 1-6

21. Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Tran QL, Miyahara T, Chen Y, Kadota S (2004) Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharm Bull*, 27, 583-586
22. Ham SH, Oh SW, Kim YK, Shin KS, Chang HY, Chung GH (2003) Antioxidant and genotoxic inhibition activity of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 1071-1075
23. Kwon EH, Jang HS, Kim SW, Choi SW, Rhee SJ, Cho SH (2007) Effects of mulberry juice and cake powders on blood glucose and lipids lowering and erythrocytic antioxidative enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr*, 40, 199-210
24. AOAC (1980) *Official Methods of Analysis*. 15th ed. association of official analytical chemists, Washington DC, 47
25. AOAC (1980) *Official Methods of Analysis*. 15th ed. association of official analytical chemists, Washington DC, 32
26. The Korean Society of Food Science and Nutrition (2000) *Handbook of experiments in food science and nutrition*. 1th ed. Hyoil press, Seoul, 173-174
27. The Korea Foods Industry Association (2008) *Korean food standard codex*. Moonyoung press, Seoul, 616-617
28. Stead DA, Richard RM (1996) Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography B*, 375, 295-302
29. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1201
30. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310
31. Haglund C, Tengblad J (1994) Effects of caffeine containing energy drinks. *Scand J Nutr*, 43, 169-175
32. The Korea Foods Industry Association (2010) *Korean food standard codex*. Moonyoung press, Seoul, 5-19-17
33. Lee YC, Kim KO (1989) Sensory evaluation of food. Hackyeon press, Seoul, 179
34. Reitman S, Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, 28, 8
35. Asano N, Nash RJ, Molyneux RJ, Fleet GWJ (2000) Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 1645-1680
36. Niwa T, Inouye T, Koaze TY, Niida T (1970) "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. *Agar Biol Chem*, 34, 966-971
37. Ra JC, Bae JH, Park HG, Kang KS (2003) Studies on a new alimentotherapy for diabetic patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 614-620
38. Kim SH, Kim KS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Park YJ, Lee HY (1997) Comparison of glucose-lowering activity of the extracts from Kangwon-do mountain mulberry leaves (*Mori folium*) and silk worm. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol*, 25, 391-395
39. Cho YJ, Ju IS, Kim BO, Kim JH, Lee BG, An BJ, Choo JW (2007) The antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant effect from the extracts of mulberry leaves (*Morus alba* L.). *Korean Soc Appl Chem*, 50, 334-343
40. Lee SH, Chun HK, Park HJ, Lee YS, Chang SN (2003) Effect of different kind of plant oil sources on serum and hepatic lipid levels of Streptozotocin-induced diabetic mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 710-714
41. Choi JH, Kim DI, Park SH, Baek SJ, Kim NJ, Ryu KS (2003) Development of anti-diabetes drink using with silkworm (*Bombyx mori* L.) extract. *Korean J Seric Sci*, 45, 96-102

(접수 2011년 6월 1일 수정 2011년 10월 19일 채택 2011년 10월 28일)