

Antiobesity Effect of Citrus Peel Extract Fermented with *Aspergillus oryzae*

Hyun Joo Jeon^{1†}, Sun Nyoung Yu^{2†}, Sang Hun Kim^{2,3}, Seul Ki Park^{2,3}, Hyeun Deok Choi², Kwang Yeon Kim⁴, Sun Yi Lee⁵, Sung Sik Chun⁶ and Soon Cheol Ahn^{2,3*}

¹Department of Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, Korea

²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

³Immunoregulatory Therapeutics Group in Brain Busan 21 Project, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

⁴School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan 689-798, Korea

⁵Department of Horticultural Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

⁶Department of Food Science, International University of Korea, Jinju 660-759 Korea

Received April 22, 2014 / Revised July 11, 2014 / Accepted August 25, 2014

There is a rising trend in obesity due to various factors, including changes in eating habits, lack of exercise, and genetic and psychological factors. Citrus peel has been reported to prevent obesity via antioxidative, antihypertensive, and LDL cholesterol-lowering effects. This study investigated the effects of citrus peel extract fermented with or without *Aspergillus oryzae* in a mouse model of diet-induced obesity. The animals were divided into four groups: a high-fat diet group (HFD), a normal fat diet (NFD) group, a citrus peel extract (CP) group, and a citrus peel extract fermented with *A. oryzae* (CPA) group. The citrus peel extract improved lipid metabolism and weight loss in the high-fat diet-induced obese mouse model. As expected, the body weight was higher in the HFD group compared with the NFD, CP, and CPA groups. However, the concentrations of total cholesterol (TG) and triglyceride (TC) in the serum and liver of the CP and CPA groups were lower than in the HFD group. There were no significant differences in the HDL cholesterol concentration among the groups. Taken together, our results suggest that extract of citrus peel biotransformed with *A. oryzae* had more antiobesity activity than citrus peel not transformed by *A. oryzae* through the fermentation of metabolites.

Key words : Anti-obesity, *Aspergillus oryzae*, biotransformed, citrus peel, serum lipids

서 론

비만이 발생하는 원인에는 여러 가지가 알려져 있지만, 서구화된 식습관 변화, 운동부족, 유전적 원인, 심리적 요인 등이 복잡하게 얽히면서 발생되고 있다고 한다[3, 4, 21, 27]. 비만이란 체내에 지방조직이 과다한 상태를 말하며, 우리나라에서는 체질량지수(BMI = 체중(kg) / [신장(m)]²)가 25 이상이면 비만으로 정의한다. 세계보건기구(WHO)는 1997년 비만을 질병으로 분류하였고, 세계 인구 중 약 12억 명 이상이 비만이라고 발표하였다, 최근 비만은 전 세계적으로 급속한 증가를 보이고 있으며[25]. 우리나라에서도 지난 10년간 비만인구 증가율이 150%에 달하는 비만국이 되었다. 또한, 생활환경과 식생활의 서구화로 인해 성인뿐만 아니라 소아에서도 비

만이 증가하는 추세이다[5].

비만은 당뇨병, 고혈압, 심혈관계질환, 뇌혈관계질환, 관절염, 지방암 및 대장암 등의 여러 합병증 발생을 유발함으로써 의학적으로 심각한 질병으로 분류되고 있다[17]. 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 비만이 유발되는데, 비만예방 및 치료를 하기 위해서는 식습관 조절이나 운동을 통한 방법이 있지만 많은 사람들은 체중조절을 위한 방법으로 절식, 다이어트 식품, 약물복용 등을 많이 이용하고 있다. 하지만 최근 들어 비만에 의한 만성질환의 증가와 비만개선을 위한 약물복용의 부작용이 사회문제로 대두되면서 천연물을 소재로 한 항비만 물질 혹은 음식에 관심이 증가되고 있는 실정이다[7]. 특히 최근에는 식물에 함유된 일부 영양소, 식이섬유, 식물성 화합물이 체지방의 축적을 억제하는 등의 작용들이 있음이 밝혀짐에 따라 이러한 기능성 식품소재를 이용하여 비만의 예방 및 치료제의 개발이 점차 가속화되고 있다[7].

이러한 천연물 중 감귤류는 쌍떡잎식물로 운향목 운향과 감귤나무아과에 속하는 식물 과수의 일종으로[8], 우리나라 제주도에서는 연간 600만 톤(2010년)이 생산되어 전체 과실 중 30%를 차지하고 있으며 감귤 생산량 중 80~85%는 생식용으로 15~20%는 가공용으로 소비되고 있다[26]. 감귤 가공품

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

제조 시 발생하는 가공부산물인 감귤박은 진피, 귤피, 지실 등의 이름으로 예로부터 한약재로 사용되었을 뿐만 아니라, 현재 비타민, 유기산 및 유리당 등 영양성분의 공급원으로 건강식품의 일종으로서 그 소비량이 증가하고 있다. 감귤박에는 naringin과 hesperidin의 함량이 감귤과육보다 많이 존재하며, 총 식이섬유소 또한 과육보다 과피부분이 더 높은 것으로 보고되고 있다. 감귤류에는 carotenoid, coumarin, phenylpropanoid, limonoid 등 60여종의 생리활성 물질을 함유하고 있으며[16], 감귤박에는 bioflavonoid, carotenoid, hesperidin, terpenes, deosmine, rutin 등이 풍부하게 함유되어 있다[2, 14]. 이 성분들은 지질과산화산물과 세포독성을 감소시키며, 고혈압 예방, 혈중 low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) 저하작용 및 high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)을 높이며, 순환계 질환의 예방 및 개선효과 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다[6, 18].

하지만 감귤박은 분해하기 어려운 pectin, cellulose, hemicellulose, β -1,4-glucan 등과 같은 성분들로 구성되어 있으며, 감귤의 대표적인 배당체 형태의 생리활성물질로 알려진 naringin과 hesperidin은 이들의 aglycon 형태인 naringenin과 hesperitin에 비해 항산화, 소염, 항암 활성 등이 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 감귤 배당체 형태의 flavonoid 화합물을 aglycon 형태의 화합물로 전환함으로써 기능성을 향상시킬 수 있을 것으로 여겨진다[19]. 또한, 다양한 종류의 당분해 효소(cellulase, amylase, β -glucosidase, pectinase) 등을 이용하여 감귤에 함유된 배당체 형태 flavonoid 화합물들을 aglycon 형태의 flavonoid로의 전환과 세포벽 구성 성분의 가수분해를 통한 유효생리활성 성분의 추출성을 증대시키거나[1, 22, 23], β -glucosidase 활성이 있는 *Aspergillus oryzae*등으로 발효하여 유효한 생리활성물질을 생산하기도 하였다[13].

따라서 본 연구는 기존 연구[6, 10, 18, 20]에서 항비만에 효과가 있는 것으로 밝혀진 감귤박의 생리 활성 물질의 증대를 위하여 *A. oryzae*를 이용하여 생물전환시키고, 전환물의 항비만 효과를 고지방식으로 유도된 생쥐모델에서 확인하였다.

재료 및 방법

감귤박 시료의 제조와 분석

감귤박 시료는 (주)일해(Jeju, Korea)에서 제공한 감귤박을 사용하였고, 감귤박 추출물을 만들기 위하여 10 μ g의 감귤박을 함유한 감귤박 현탁액 100 ml를 75% (v/v) 메탄올로 추출하여 제조하였다. *A. oryzae* 전환시료는 10% 감귤박 현탁액에 7일간 배양한 *A. oryzae*를 10% (v/v) 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 일주일간 배양한 후 75% (v/v) 메탄올로 추출하여 사용하였다. 모든 추출물은 filter paper (Quantitative Filter Paper, Korea)로 여과하여 evaporator (EYELA, Japan)로 농축 후, 10 mg/ml로 정량하여 동물실험하였다.

전환된 배양물질을 확인하기 위하여 high performance

liquid chromatography (HPLC) 분석법을 이용하였으며, 각 감귤박 메탄올 추출물을 ethyl acetate 추출하여 분석하였다. 시료는 10 μ l씩 주입하였으며, 고정상은 Supelcosil TMLC-PAH column (4.6 \times 150, 5 μ m)을 사용하였고, 이동상은 0.1% acetic acid (A)와 acetonitrile (C)을 사용하여 20-30% C (0-10 min), 30% (10-35 min)로 농도구배를 주면서 0.5 ml/min의 속도로 흘렸다. Detector는 SPD-M10A diode array detector (Shimadzu, Japan)을 이용하여 280 nm에서 측정하였다.

비만유도 실험동물 모델을 이용한 항비만 분석

실험동물 및 식이

본 실험에서는 평균체중 18.3 \pm 1.3 g인 4주령 ICR 암컷 생쥐를 구입하여 일반식이로 1주일간 적응시킨 후에, 일반식이군과 고지방식이 군으로 나누어 한 그룹 당 4마리로 나누었다 (Table 1). 일반식이와 고지방식이는 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험군은 일반식이섭취군(normal fat diet group, NFD), 고지방식이 섭취군(high fat diet group, HFD), 감귤박 추출물 투여군(high fat diet with citrus peel extract group, CP), *A. oryzae*로 발효한 감귤박 추출물 투여군(high fat diet with citrus peel extract fermented with *A. oryzae*, CPA) 등 4군으로 나누었다. 시료를 투여하는 CP군과 CPA군은 고지방식이를 섭취시킴과 동시에 48시간간격으로 추출물을 34.5 mg/kg, 총 20번 복강 투여하였고, 일반식이섭취군과 고지방식이 섭취군에는 시료 투여군과 동일한 횟수로 saline을 복강주사하였으며, 실험기간 동안 이들에 한 번 체중을 측정하였다. 사육실 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 55 \pm 10%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 조절하였고, 물과 식이는 제한 없이 공급하였다.

체중측정 및 혈청, 장기 추출

4주간 사육한 생쥐는 희생시키기 전, 16시간 동안 절식시킨 후 ether (Junsei, Japan)로 마취하여 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 실험군 별로 채취된 혈액은 상온에서 30분간 방

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredient	Proportion (%)	
	High fat diet	Normal fat diet
Protein	17.7	18.6
Fat	40.0	6.4
Fiber	5.0	16.2
Ash	4.0	5.3
Moisture	3.3	-
Carbohydrate	30.0	42.2
Minerals	-	2.5
Amino acids	-	8.8
Total	100.0	100.0
Total calories	5.5 kcal/g	3.1 kcal/g

치 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 -70°C에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다. 채혈한 후 간, 비장, 신장, 복부 내장 지방 등의 장기를 즉시 적출하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 행군 후 여과지를 이용하여 표면의 물기를 제거하고 무게를 측정하였다. 간은 지질측정을 위해서 무게 측정 후 즉시 PBS에 담아 사용하였다.

체중은 2일 간격으로 측정하였고, 분리한 장기들도 미세저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 체중 증가량은 [마지막 체중 - 처음 체중]으로 계산하였고, 체중 증체율은 {[마지막 체중 - 처음 체중] / 처음체중} × 100]으로 계산하였다.

지질농도 측정

혈청

혈청 내 지질 농도를 알아보기 위해 혈청 중성지질(triglyceride, TG), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC) 및 고밀도 지단백 콜레스테롤(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 농도는 혈청 생화학적 측정기계(DRI-CHEM 3500i, FUJI Film, Japan)를 이용하여 비색측정하였다. 한편, TG, TC, HDL-C 수치를 이용하여 Lauer 등 [15]의 방법에 따라 HDL-C / TC 비 (HDL-C / TC ratio, HTR) 및 동맥경화지수(atherogenic index, AI)를 계산하였다

$$HTR = \text{HDL-C의 농도} / \text{TC의 농도}$$

$$AI = [\text{TC의 농도} - (\text{HDL-C의 농도})] / \text{HDL-C 농도}$$

간의 지질농도 측정

간 조직의 TG, TC 및 HDL-C 농도를 측정하기 위해 Folch 등의 방법을 수정, 보완하여 지질 성분을 추출한 후 분석하였다[9]. Chloroform : methanol (2:1, v/v) 용액과 증류수를 3 : 1로 섞은 용액에 간 조직을 넣은 후 homogenizer (Heidolph DIAX900)를 사용하여 균질화시켰다. 이 균질 액을 13,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여 아래층인 chloroform 층을 지질분석에 사용하였다. TG 측정은 chloroform 층 10 µl를 1.5 ml tube에 넣고 hood에서 12시간 자연건조 시킨 후 50 µl methanol을 넣어 용해시켰다. 여기에 중성지방 측정 효소시약(ASAN, Korea) 1.5 ml를 넣고 37°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 spectrophotometer (VERSAmax microplate reader, Molecular Devices, USA)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. TC 및 HDL-C 측정은 chloroform 층 500 µl를 1.5 ml tube에 넣고 hood에서 24시간 자연건조 시킨 후 50 µl Triton X-100 : chloroform (1:1, v/v)을 넣어 용해시킨 후 450 µl chloroform으로 희석하여 10 µl를 1.5 ml tube에 넣은 후 hood에서 12시간 자연건조 시킨 후 사용하였다. TC의 경우 total cholesterol 측정 효소시약(ASAN, Korea)을 1.5 ml를 넣고 37°C water bath에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 500 nm에서의 흡광도를 측정하였고, HDL-C의 경우 HDL cholestase 분리시약(ASAN, Korea) 50 ul을 넣고 잘

혼합하여 실온에서 10분간 방치 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여, 상층 50 µl와 HDL cholestase 측정 효소시약(ASAN, Korea) 1.5 ml를 넣고 37°C water bath에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

간 지질 함량은 아래와 같은 식으로 계산하였고, HTR과 AI는 혈청에서와 같은 방법으로 계산하였다.

$$TG \text{ (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 300$$

$$TC \text{ (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 300$$

$$HDL-C \text{ (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 100$$

통계처리

모든 실험의 결과는 3번 반복 수행하여 얻어진 것으로, 통계분석은 ANOVA에 의해 분석하여 mean ± S.D로 표시하였고, 통계적 유의성은 p ≤ 0.05로 판정하였다.

결 과

감귤박 추출물의 분석

감귤박과 *A. oryzae*를 이용하여 발효한 감귤박을 ethyl acetate로 추출한 후 HPLC 분석을 통하여 비교하였다(Fig. 1). *A. oryzae*로 전환하여 다양한 변화가 있는 것을 확인할 수 있었다. 5.7, 8.1, 14.9, 24.1 분에 새로운 peak가 나타났고, 12.4 분의 peak는 증가한 것을 확인하였다. 이를 통하여 생물전환에 의해 새로운 성분이 나타났다는 것을 알 수 있었다.

체중변화와 체중 증가량

일반식으로 1주일간 적응시킨 후, 무작위로 일반식이 투여군(NFD), 고지방식이 투여군(HFD), 감귤박 추출물 투여군(CP), 감귤박 발효 추출물 투여군(CPA) 4군으로 나누었으며 실험 시작 시 체중은 평균 18±0.6 g 이었다. 고지방식을 투여하여 비만을 유도하고 한편으로는 6주간 감귤박을 투여한 후 측정된 체중의 변화는 Fig. 2A에 나타난 것과 같았다. 실험 종료 시 체중의 경우, NFD군은 28.63±2.57 g, HFD군은 35.22±4.23 g, CP군은 22.92±1.98 g, CPA군은 21.05±1.32 g 이었다. HFD군에 비해 감귤 투여군인 CP군에서는 34%, CPA군에서는 체중이 40% 낮게 측정되었으며, CPA군이 CP보다 체중이 8% 낮았다. 실험 기간 동안의 체중 증가량은 NFD군은 9.83 g, HFD군은 15.94 g, CP군은 4.78 g, CPA군은 3.61 g이었고, 초기 체중으로 나눈 체중 증체율은 Fig. 2B에서와 같이 NFD군은 52%, HFD군은 82%, CP군은 26%, CPA군은 20%의 증가를 보여 HFD군이 다른 실험군들에 비해 체중증가가 가장 높았고, 감귤 추출물 투여군인 CP군과 CPA군의 경우 정상식이군이 NFD군보다 낮았다. 이러한 결과는 5%의 감귤박을 식이와 혼합한 실험에서 항비만 효과를 보인 Jung 등의 결과와 일치하였다[14]. 따라서 같은 고지방식을 섭취

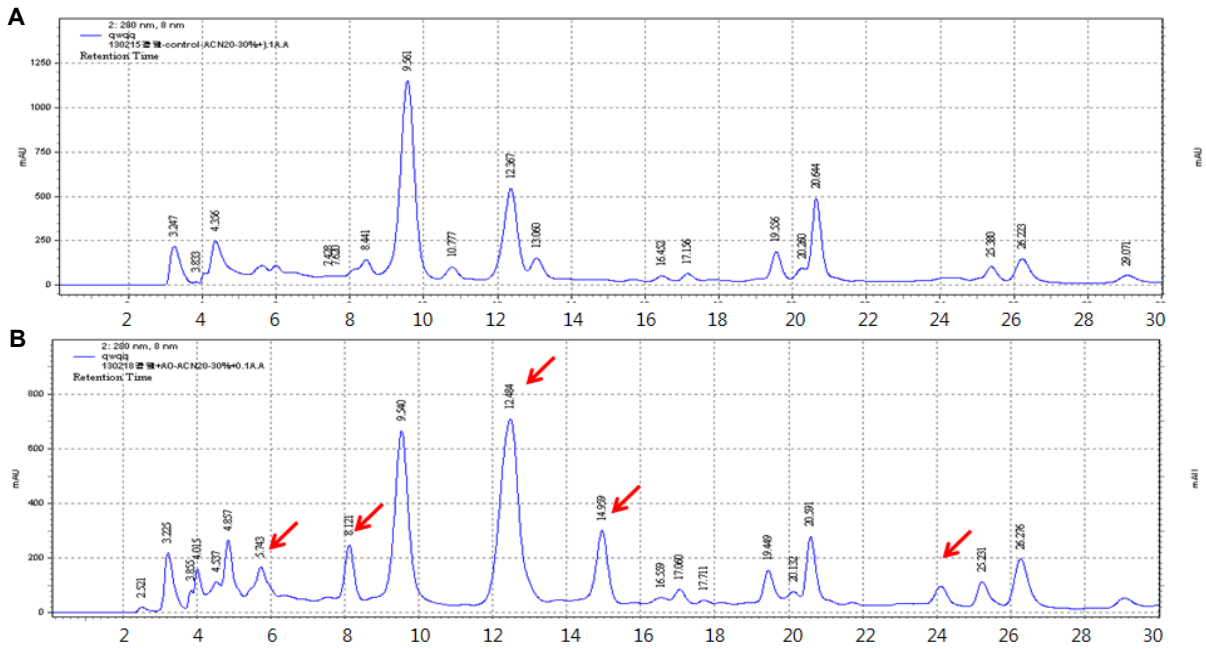


Fig. 1. High performance liquid chromatography of citrus peel extracts. (A) Ethyl acetate extract of citrus peel, (B) Ethyl acetate extract of citrus peel fermented with *A. oryzae*. Arrows indicate the metabolites biotransformed with *A. oryzae*.

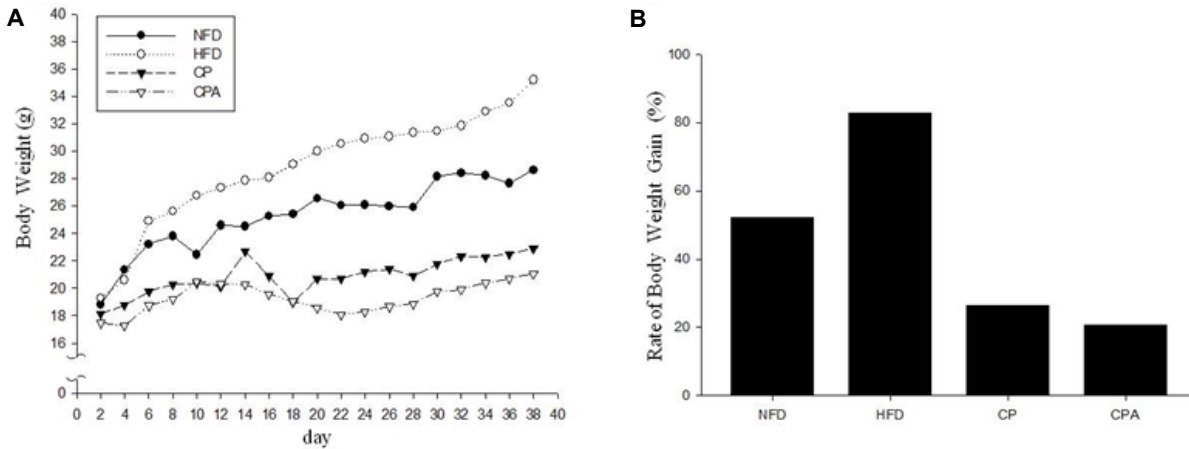


Fig. 2. Body weight in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts. (A) Body weight, (B) Rate of body weight gain in mouse group during 3 weeks. The weights of mice in each group were measured once every two days. NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean \pm SD (n = 3 in each group). *** $p < 0.001$ vs. high fat diet group.

하더라도 감귤박 추출물에 의해 체중의 증가가 억제되었으며, 감귤박 추출물보다 *A. oryzae*에 의해 발효된 감귤박 추출물의 항비만 효과가 더 높았다.

장기 및 지방 조직 무게

실험동물을 희생시킨 후 적절한 장기 및 지방조직의 무게는 Fig. 3, Table 2와 같았다. 간의 무게는 HFD군(1.92 \pm 0.19 g)이 NFD군(1.66 \pm 0.17 g) 보다 높았으나 유의적 차이는 없었고, CP군(1.53 \pm 0.06g), CPA군(1.40 \pm 0.14 g)은 HFD군에 비해

유의적으로 낮았다. CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 각각 약 7%, 15% 낮았으며, 특히 CPA군이 다른 군들에 비해 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. 비장의 무게 또한 HFD군(0.34 \pm 0.02 g)이 NFD군(0.18 \pm 0.02 g), CP군(0.20 \pm 0.04 g), CPA군(0.18 \pm 0.02 g) 들에 비해 유의적으로 높았고, CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 각각 약 11%, 1% 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 복부 내장 지방의 무게는 HFD군(1.40 \pm 0.41 g)이 NFD군(0.93 \pm 0.23 g)에 비해 높았으나 유의적 차이는 없었고, CP군(0.63 \pm 0.22 g), CPA군(0.52 \pm 0.21 g) 들에 비해 유의적

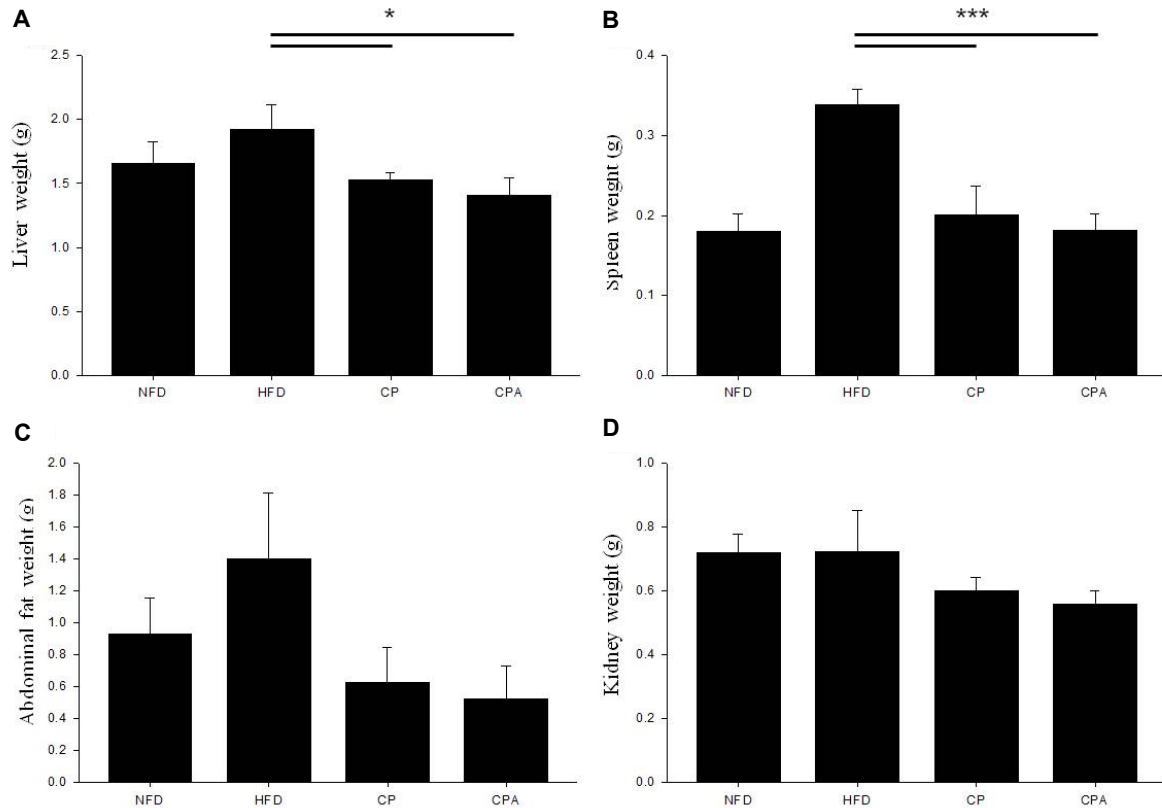


Fig. 3. Organ weight in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts. (A) Liver weight, (B) Spleen weight, (C) Abdominal fat weight, (D) Kidney weight. NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean \pm SD (n=3 in each group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet group.

Table 2. Organ weight in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts

Group	Organ weight (g)			
	Liver	Spleen	Abdominal Fat	Kidney
NFD	1.66 \pm 0.17	0.18 \pm 0.02	0.93 \pm 0.23	0.72 \pm 0.06
HFD	1.92 \pm 0.19	0.34 \pm 0.02	1.40 \pm 0.41	0.72 \pm 0.13
CP	1.53 \pm 0.06	0.20 \pm 0.04	0.63 \pm 0.22	0.60 \pm 0.04
CPA	1.40 \pm 0.14	0.18 \pm 0.02	0.52 \pm 0.21	0.56 \pm 0.04

NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean \pm SD (n=3 in each group).

로 현저하게 높았다. CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 각각 약 32%, 43% 낮았지만 유의적인 차이는 없었다. 신장의 무게는 HFD군(0.72 \pm 0.13 g)은 NFD군(0.72 \pm 0.06 g)과 비슷한 양상을 보였지만 CP군(0.60 \pm 0.04 g)과 CPA군(0.56 \pm 0.04 g)은 NFD군과 HFD군과의 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 이로 인해 감귤박 추출물이 비만을 유도한 생쥐 모델에서 장기 및 조직의 무게에 변화를 준다 것을 확인하였다

지질함량

혈청 지질 분석

각 군별 혈청을 대상으로 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein- cholesterol (HDL-C) 함량을 혈청 생화학적 측정기계(DRI-CHEM 3500i, FUJI Film, Japan) 로 측정하였다. 그 결과, 혈청 지질농도는 Fig. 4와 Table 3에서와 같이, 혈청 TC 농도는 HFD군(121.5 \pm 6.4 mg/dl)이 NFD군(103.5 \pm 16.3 mg/dl), CP군(108.0 \pm 10.0 mg/dl), CPA군(95.0 \pm 16.0 mg/dl)에 비해 높은 수치를 보여 HFD군은 NFD군에 비해 17% 유의한 증가를 보였다. 한편 CP군은 NFD군에 비해 약 4% 높은 양상을 보였으나, CPA군은 NFD군보다 약 8% 낮았다. 혈청 HDL-C 농도는 HFD군(75.0 \pm 19.8 mg/dl)이 NFD군(85.0 \pm 19.7 mg/dl), CP군(76.0 \pm 4.2 mg/dl), CPA군(80.0 \pm 8.5 mg/dl)에 비해 낮았고, CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 각각 약 10%, 5% 낮은 수치를 보였지만 HFD군 보다는 각각 약 1%, 6% 높았다. TG 농도는 HFD군(148.0 \pm 17.7 mg/dl)이 NFD군(131.0 \pm 14.1 mg/dl)에 비해 높았지만 유의적인 차이는 없었고, CP군(103.0 \pm 10.6 mg/dl), CPA군(107.3 \pm 24.7 mg/dl)에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 각각 약 21%, 18% 로

Table 3. Serum lipid levels in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts

Group	Lipid profiles				
	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)	HTR	AI
NFD	103.5±16.3	85.0±19.7	131.0±14.1	0.82±0.07	0.22±0.07
HFD	121.5±6.4	75.0±19.8	148.0±17.7	0.62±0.13	0.62±0.10
CP	108.0±10.0	76.0±4.2	103.0±10.6	0.70±0.02	0.42±0.02
CPA	95.0±16.0	80.0±8.5	107.3±24.7	0.84±0.05	0.19±0.05

NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean ± SD (n=3 in each group).

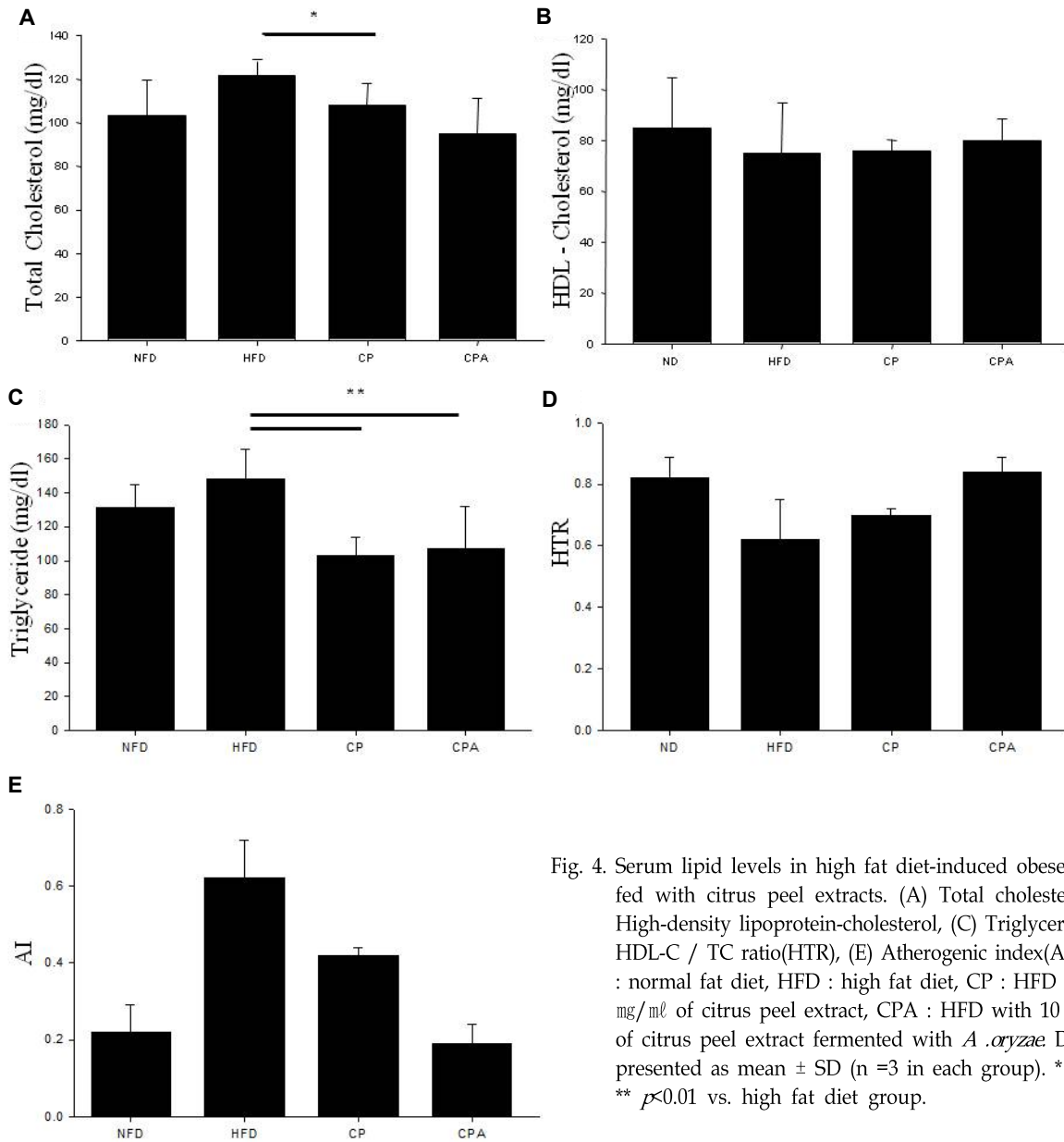


Fig. 4. Serum lipid levels in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts. (A) Total cholesterol, (B) High-density lipoprotein-cholesterol, (C) Triglyceride, (D) HDL-C / TC ratio(HTR), (E) Atherogenic index(AI). NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean ± SD (n =3 in each group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. high fat diet group.

유의적으로 낮았다. HTR은 HFD군(0.62±0.13)이 NFD군(0.82±0.07), CP군(0.70±0.02), CPA군(0.84±0.05) 비해 높았고, 특히 CPA군은 NFD군에 비해 2% 높았다. AI는 HFD군(0.62±

0.10)이 NFD군(0.22±0.07), CP군(0.42±0.02), CPA군(0.19±0.05)에 비해 높았고, CPA군이 NFD군보다 약 13% 낮은 것을 확인하였다. 따라서 감귤박 추출물은 고지방식이 섭취로 인한

Table 4. Liver lipid levels in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts

Group	Lipid profiles				
	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)	HTR	AI
NFD	152.7±2.2	42.7±0.6	142.4±18.7	0.28±0.00	2.57±0.03
HFD	175.5±14.7	42.3±0.9	193.8±17.3	0.24±0.02	3.15±0.37
CP	165.3±3.6	44.0±2.2	150.3±27.3	0.27±0.01	2.76±0.17
CPA	165.3±20.7	46.2±3.9	151.0±22.2	0.27±0.01	2.65±0.18

NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean ± SD (n =3 in each group).

이 유도된 생쥐에서 항비만 효과를 나타내었지만, *A. oryzae*로 발효시킨 경우, 감귤박 추출물의 지질개선 효과가 증가하는 것을 확인하였다.

간 조직 지질 분석

간 조직 지질 농도는 Fig. 5와 Table 4에 나타난 것과 같았다. TC 농도는 CP군(165.3±3.6 mg/dl), CPA군(165.3±20.7

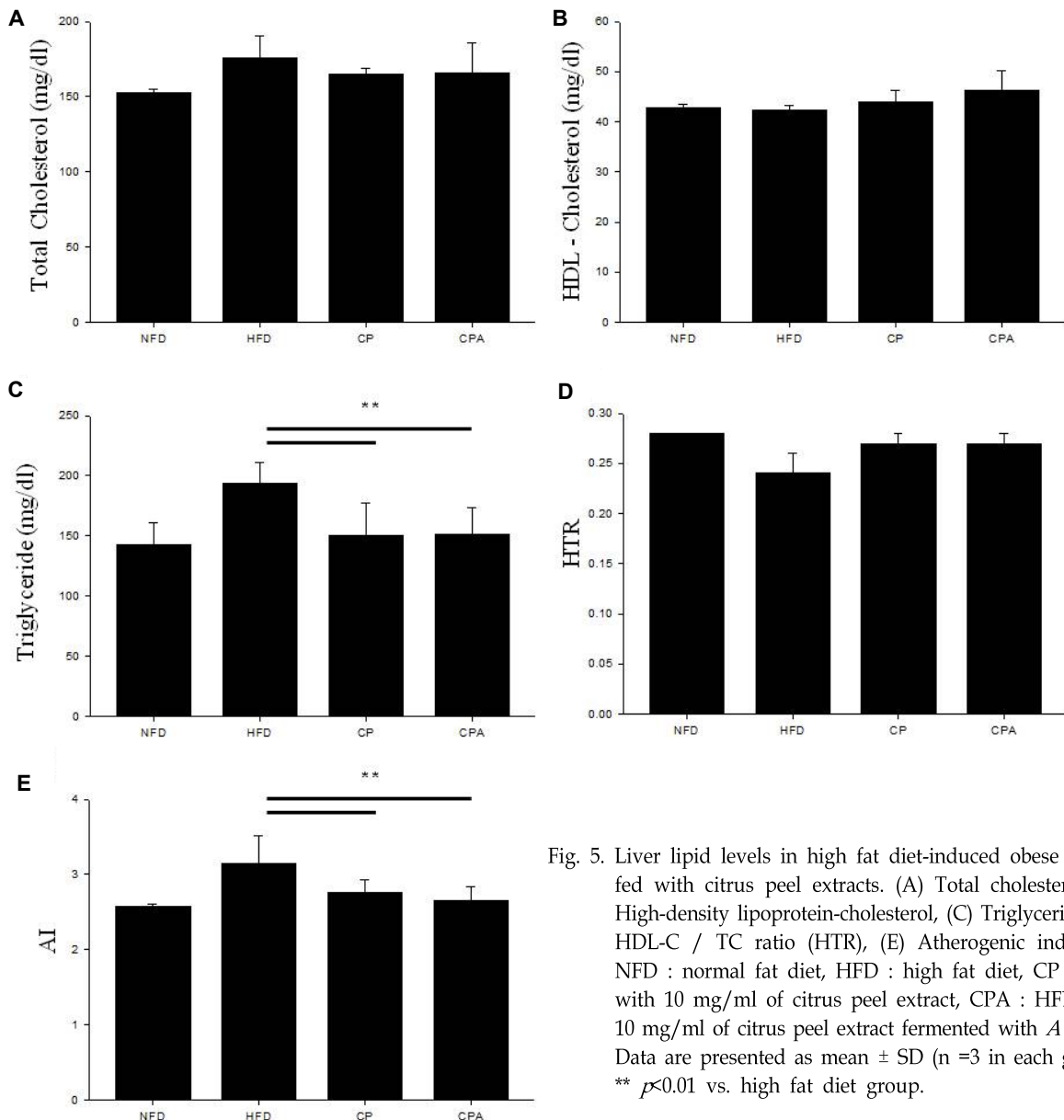


Fig. 5. Liver lipid levels in high fat diet-induced obese mouse fed with citrus peel extracts. (A) Total cholesterol, (B) High-density lipoprotein-cholesterol, (C) Triglyceride, (D) HDL-C / TC ratio (HTR), (E) Atherogenic index(AI). NFD : normal fat diet, HFD : high fat diet, CP : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract, CPA : HFD with 10 mg/ml of citrus peel extract fermented with *A. oryzae*. Data are presented as mean ± SD (n =3 in each group). ** p < 0.01 vs. high fat diet group.

mg/dl) 및 NFD군(152.7±2.2 mg/dl) 모두 HFD군(175.5±14.7 mg/dl)에 비해 낮았고, CP군과 CPA군은 NFD군에 비해 약 8% 높았다. 한편, HDL-C농도는 NFD군(42.7±0.6 mg/dl), CP군(44.1±2.2 mg/dl), CPA군(46.2±3.9 mg/dl) 모두 HFD군(42.3±0.9 mg/dl) 보다 낮았고, CPA군은 NFD군보다 약 8% 높았다. TG 농도는 NFD군(142.4±18.7 mg/dl), CP군(150.3±27.3 mg/dl), CPA군(151.0±22.2 mg/dl)이 HFD군(193.8±17.3 mg/dl)에 비해 유의적으로 낮았지만, CP군, CPA군은 NFD군보다는 각각 약 5%, 6% 유의적으로 높았다. 혈청내의 총 cholesterol 중 HDL cholesterol의 함량을 백분율로 나타내는 HTR은 CP군(0.27±0.01)과 CPA군(0.27±0.01)이 HFD군(0.24±0.02)보다 높았지만, NFD군(0.28±0.00)과 비슷한 양상을 보였다. 동맥경화 수치(AI)의 경우 CP군(2.76±0.17)과 CPA군(2.65±0.18)은 HFD군(3.15±0.37)보다 유의적으로 낮아 CP군과 CPA군의 지질개선 효과가 있었다. 이는 감귤박과 *A. oryzae*로 생물전환된 감귤박을 처리한 군이 동맥경화에 걸릴 확률이 낮다는 것을 의미하며, 특히 *A. oryzae*의 생물전환으로 인해 증가된 성분이 동맥경화 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 사료 되어진다.

고 찰

비만은 섭취된 에너지와 소비된 에너지 사이에서 발생되는 불균형으로 체내 지방이 과다 축적된 만성적 대사장애라고 할 수 있다. 현재 비만에 대한 문제가 점차 대두되고 심각한 질병으로 분류되어, 비만을 치료하기 위한 절식, 다이어트 식품, 약물복용 등이 많이 소개 되어지고 있지만 최근 들어 이러한 약물복용의 부작용 등이 야기되면서 천연물을 소재로 한 항비만 물질 혹은 음식에 관심이 증가 되고 있다.

본 연구에서는 ICR 생쥐에서의 감귤박과 생균제인 *A. oryzae*를 이용하여 생물전환시킨 감귤박의 항비만 효과를 비교 하였다. 생쥐의 체중변화, 조직의 무게를 관찰하였고, 군별 혈청 지질 농도(total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol)의 변화, 간 지질 농도(total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol)의 변화를 비교하였다.

*A. oryzae*는 기존의 연구들에서 식물내의 다양한 성분을 유효 활성물질로 전환시키는 데에 효과적인 생균제임이 입증되었다. Wang의 연구[24]에서 *Polygonum cuspidatum*의 구성 성분인 piceid를 전환시켜 3.6배의 높은 resveratrol을 확보하였다. Hwan의 연구[12]에서는 *A. oryzae*를 이용하여 생물전환시킨 soybean에서 증가된 antioxidant 효과를 관찰하였다. 감귤박에 *A. oryzae*를 이용하여 생물전환 시킨 후 TLC 분석으로 확인한 결과, 감귤박에서는 나타나지 않았던 성분이 증가된 것을 확인하였다. 기존 연구에서는 감귤박 함유 성분인 naringenin의 무배당 형태인 naringenin의 항비만 효과에 대한 결과가 발표되어지고 있다. Naringenin은 지방세포의 전구세포인 3T3-L1 pre adipocyte의 growth를 28.3% 감소 시키며

[11], low-density lipoprotein receptor-null mice에 high fat만 식이한 군보다 plasma triglyceride 와 cholesterol이 50% 감소하는 효과를 확인하였다[20]. 또한, atherosclerosis 증상 역시 naringenin을 섭취한 군에서 70% 감소하는 것은 관찰하였다[20]. 최근 연구에서는 naringenin이 human과 rat에서 hepatic lipid metabolism의 중요한 transcriptional factor인 PPARalpha, PPARgamma, LXRA를 조절하는 것으로 나타났다[10]. 즉, CYP4A11, ACOX, UCP1 and ApoAI와 같은 fatty acid oxidation gene을 조절하는 PPAR family 유전자의 발현을 유도하고, FAS, ABCA1, ABCG1, 그리고 HMGCR와 같은 lipogenesis관련 유전자를 조절하는 LXRA의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

시간에 따라 각 군별로 체중의 변화를 확인한 결과(Fig. 2), 일반식을 투여한 NFD의 경우 4주의 실험 기간 동안 체중이 3.06±0.22 g 증가하였고, 고지방식을 투여한 HFD는 6.63±0.36 g 증가하여 NFD에 비해 약 2배 더 증가하였다. 하지만 고지방식과 함께 감귤박을 투여한 CP와 감귤박에 *A. oryzae*로 발효시킨 CPA가 HFD보다 체중 증가량이 유의적으로 가장 감소하여 NFD투여군 보다 낮았다. 특히 감귤박에 *A. oryzae*로 발효시킨 CPA가 체중 증가량이 가장 적었다. 따라서 감귤박을 투여한 것이 체중 증가를 억제하는 효과가 있으며 감귤박보다 감귤박에 *A. oryzae*로 발효시킨 것이 더 효과가 높다는 것을 확인하였다.

또한, 장기 및 지방조직 무게를 확인한 결과 간, 비장 지방 조직의 경우 HFD의 경우 NFD에 비하여 조직과 지방조직의 무게가 증가하였지만, CP와 CPA는 HFD보다 감소하여 NFD와 비슷한 양상을 보였다. 즉, 감귤박은 체중의 증가 뿐만 아니라 체내의 장기와 지방조직의 축적을 감소시키는 효과도 있다는 것을 확인하였다.

Fig. 4와 같이 혈청 지질 분석을 한 결과, CP와 CPA의 총 콜레스테롤이 고지방식을 먹은 HFD에 비하여 유의성 있게 낮으며, HDL-C은 HFD에 비해 오히려 증가하였는데 HDL-C이 동맥경화를 예방하는 유익한 cholesterol이라는 것을 고려해보면 감귤박이 유익한 cholesterol을 증가시켜 체내에 이로움을 한다는 것을 알 수 있다. 또한 TC 분석결과, 감귤박과 감귤박 전환물을 처리한 군에서 현저히 낮게 나타난 것을 확인 하였다. 비만이나 고지혈증으로 유발되는 심혈관계의 대표적인 질병 중 하나인 동맥경화의 예상지표를 나타내는 atherogenic index (AI)는 고지방식을 섭취한 군보다 감귤박추출물을 처리한 CP에서 유의성 있게 감소 하였고, 특히 *A. oryzae*로 생물전환한 CPA의 경우, 현저하게 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 Fig. 5의 간지질 분석결과에서도 유사하게 나타났다.

따라서 감귤박의 섭취로 체내 고지혈증, 심혈관계 질환, 비만 등의 지질 대사와 관련된 여러 질병을 예방할 수 있으며, *A. oryzae*를 이용하여 발효시킨 감귤박 발효산물은 생물전환

으로 인해 증가된 성분이 항비만효과를 증대 시킬 수 있을 것으로 예상되어진다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Ahn, S. C., Kim, M. S., Lee, S. Y., Kang, J. H., Kim, B. H., Oh, W. K., Kim, B. Y. and Ahn, J. S. 2005. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Korean J Microbiol Biotechnol* **33**, 288-294.
- Andrade, J. E. and Burgess, J. R. 2007. Effect of the citrus flavanone naringenin on oxidative stress in rats. *J Agric Food Chem* **55**, 2142-2148.
- Apfelbaum, M., Vague, P., Ziegler, O., Hanotin, C., Thomas, F. and Leutenegger, E. 1999. Long-term maintenance of weight loss after a very-low-calorie diet: a randomized blinded trial of the efficacy and tolerability of sibutramine. *Am J Med* **106**, 179-184.
- Astrup, A., Buemann, B., Christensen, N. J., Toubro, S., Thorbek, G., Victor, O. J. and Quaade, F. 1992 The effect of ephedrine/caffeine mixture on energy expenditure and body composition in obese women. *Metabolism* **41**, 686-688.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Selbeck, M. and Stender, S. 2008. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev* **9 Suppl 1**, 48-52.
- Bok, S. H., Lee, S. H., Park, Y. B., Bae, K. H., Son, K. H., Jeong, T. S. and Choi, M. S. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* **129**, 1182-1185.
- Cefalu, W. T., Ye, J. and Wang, Z. Q. 2008. Efficacy of dietary supplementation with botanicals on carbohydrate metabolism in humans. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **8**, 78-81.
- Chung, S. K., Kim, S. H., Choi, Y. H., Song, E. Y. and Kim, S. H. 2000. Status of citrus fruit production and view of utilization in cheju. *Food Industry Nutr* **5**, 42-52
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Goldwasser, J., Cohen, P. Y., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, M. L. and Nahmias, Y. 2010. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha. *PLoS One* **5**, e12399.
- Hsu, C. L. and Yen, G. C. 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res* **50**, 1072-1079.
- Hwan Nam, D., Jung Kim, H., Sun Lim, J., Heon Kim, K., Park, C. S., Hwan Kim, J., Lim, J., Young Kwon, D., Kim, I. H. and Kim, J. S. 2011. Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Food Sci* **76**, H194-200.
- Kim, B. H., Kang, J. H., Lee, S. Y., Cho, H. J., Kim, Y. J., Kim, Y. J. and Ahn, S. C. 2006. Biotransformation of Ginseng to Compound K by *Aspergillus oryzae*. *J Life Sci* **16**, 136-140.
- Kim, J. W., Jeon, Y. J., Lee, J. H. and Lee, S. C. 2006. Effect of Far-infrared irradiation and heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus pomaes. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **49**, 60-64.
- Lauer, R. M., Lee, J., Clarke, W. P. 1988. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* **82**, 309-318.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N. and Osawa, T. 1998. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* **33**, 689-695.
- Mokdad, A. H., Bowman, B. A., Ford, E. S., Vinicor, F., Marks, J. S. and Koplan, J. P. 2001. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* **286**, 1195-1200.
- Monforte, M. T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Galati, E. M. and Lo Curto, R. B. 1995. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* **50**, 595-599.
- Montanari, A., Chen, J. and Widmer, W. 1998. Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease. Discovery of new flavonoids from Dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves. *Adv Exp Med Biol* **439**, 103-116.
- Mulvihill, E. E., Assini, J. M., Sutherland, B. G., DiMattia, A. S., Khami, M., Koppes, J. B., Sawyez, C. G., Whitman, S. C. and Huff, M. W. 2010. Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 742-748.
- Rolls, B. J., Shide, D. J., Thorwart, M. L. and Ulbrecht, J. S. 1998. Sibutramine reduces food intake in non-dieting women with obesity. *Obes Res* **6**, 1-11.
- Ruiz-Teran, F., Perez-Amador, I. and Lopez-Munguia, A. 2001. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *J Agric Food Chem* **49**, 5207-5209.
- Santamaria, R. I., Reyes-Duarte, M. D., Barzana, E., Fernando, D., Gama, F. M., Mota, M. and Lopez-Munguia, A. 2000. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent. *J Agric Food Chem* **48**, 3063-3067.
- Wang, H., Liu, L., Guo, Y. X., Dong, Y. S., Zhang, D. J. and Xiu, Z. L. 2007. Biotransformation of piceid in *Polygonum*

- cuspidatum to resveratrol by *Aspergillus oryzae* Appl Microbiol Biotechnol **75**, 763-768.
25. World Health Organization. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* **894**, 1-253.
26. Yang, J., Chio, I. S., Lee, J. H., Cho, C. W., Kim, S. S. 2012. Change of Physicochemical Properties and Hesperidin Contents of Jeju Processing Citrus Fruits with the Harvest Date. *Korean J Food Preserv* **19**, 652-658
27. Zhi, J., Melia, A. T., Guercioli, R., Chung, J., Kinberg, J., Hauptman, J. B. and Patel, I. H. 1994. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **56**, 82-85.

초록 : *Aspergillus oryzae*로 생물전환한 감귤박의 항비만 효과

전현주^{1†} · 유선녕^{2†} · 김상현^{2,3} · 박슬기^{2,3} · 최현덕² · 김광연⁴ · 이선이⁵ · 전성식⁶ · 안순철^{2,3*}

(¹경상대학교 의학전문대학원 미생물학 교실, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ³부산대학교 면역조절치료소재연구인력양성사업단, ⁴울산과학기술대학교 생명과학부, ⁵농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과, ⁶한국국제대학교 보건과학대학 식품과학과)

서구화된 식습관의 변화와 편리한 생활에 따른 운동 부족, 유전적 요인, 심리적 요인 등이 복잡하게 얽히면서 비만이 꾸준히 증가하는 추세이다. 한편, 감귤류에는 carotenoid, coumarin, phenylpropanoid, limonoid 등 60여종의 생리활성 물질이 함유되어 있으며 감귤박에는 bioflavonoid, carotenoid, hesperidin, terpenes 등이 풍부하게 함유되어 있다. 감귤박은 항산화 효과, 고혈압 예방, 혈중 LDL 콜레스테롤 함량 감소 효과 등이 있음이 보고되어 있고 최근 들어 감귤박의 비만을 억제하는 효능이 밝혀져 항비만 효과가 입증되었다. 본 연구에서는 고지방식이로 유도한 비만모델 ICR 생쥐에서 *Aspergillus oryzae*로 발효한 감귤박의 증강된 항비만 효과를 확인하고자 하였다. 항비만 효과를 확인하기 위해 생쥐의 체중변화와 조직의 무게변화를 관찰하였고, 그룹별 혈청 지질 농도, 간 지질농도 및 동맥경화지수를 관찰하였다. 그 결과, 고지방식이 투여군(HFD)에 비해 감귤박 추출물 투여군(CP)과 감귤박 발효 추출물 투여군(CPA)은 체중 증가량과 증체율이 감소하였고, 혈청과 간의 total cholesterol (TG), triglyceride (TC) 함량이 현저히 감소하였다. 한편, 유익한 cholesterol로 알려진 high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 함량은 일반식이 투여군(NFD)과 CPA 투여군이 비슷하였다. CP 투여군과 CPA 투여군의 조직 무게에서도 HFD 투여군보다 감소하여, 전체적으로 CPA 투여군에서 특히 유의적으로 감소하였다.