

감귤의 발효와 발효산물의 기능적 특성

문상욱 · 강신혜 · 진영준 · 박지권 · 이영돈¹ · 이영기² · 박덕배² · 김세재*
제주대학교 생명과학기술혁신센터, ¹제주대학교 해양과환경연구소, ²제주대학교 의학과

Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and Functional Characteristics of the Fermented Products

Sang-Wook Moon, Shin-Hae Kang, Young-Joon Jin, Ji-Gweon Park, Young-Don Lee¹,
Young-Ki Lee², Deok-Bae Park², and Se-Jae Kim*

Technology Innovation Center for Life Science
¹Marine and Environmental Research Institute
²School of Medicine, Cheju National University

Functional characteristics of citrus products fermented with lactic acid bacterium and yeast were investigated. Flavonoid composition of fermented citrus extracts increased significantly compared to control, leading to increases of naringenin and hesperetin concentrations. All citrus extracts showed anti-apoptotic effects in HepG2 cells regardless of fermentation, with citrus-fermented products showing greater anti-apoptotic effect and intracellular Reactive Oxygen Species content reduction compared to native citrus extracts. Male Sprague-Dawley rats were orally dosed with native or fermented citrus extracts. Significantly higher body weight reductions were observed in higher-fermented citrus-dosed (100 mg/kg body weight) group compared to the other groups. Plasma total cholesterol level was slightly, but not significantly, reduced. Fatty liver formation induced by high-fat diet was significantly suppressed in rats administered with fermented citrus extracts. Results suggest fermented citrus extracts have potent anti-apoptotic and anti-oxidative activities *in vitro*, and inhibitory activity against fatty liver formation by high-fat diet *in vivo*.

Key words: citrus, fermentation, flavonoids, anti-apoptotic effects, ROS, hepatoprotective activity

서 론

감귤은 비타민, 베타카로틴, 플라보노이드 등의 기능성 영양 물질이 높게 함유된 과일이며, 이러한 측면에서 감귤을 직접 소비하는 형태 이외에도 기능성 식품으로 개발하여 감귤의 소비를 증진시키는 것은 기능성 과일로서의 감귤의 개발 및 홍보뿐만 아니라 제주의 지역경제 활성화에도 중요한 요인이 된다. 특히, 감귤류 과피의 주성분중 하나인 flavonoids는 심장 순환기계 질환 및 항암, 항산화, 항염증에 대한 개선효과가 있는 것으로 알려져 있으며(1-8), 이에 따른 감귤류 과피분말 및 과피 추출물은 기능성 식품으로서 개발되어 왔다.

그러나, 감귤은 한정된 계절에 생산되며, 그 보존 및 가공에는 현실적으로 많은 애로점이 있는 것으로 지적되어 왔다(9). 예로서, 감귤의 장기보존에는 저온시설 등이 필요하며 많은 양의 감귤을 장기간 저장하는 것은 경비상의 문제가 발생하게 된

다. 또한, 감귤에 함유된 식이섬유의 가공개발 노력이 있었으나, 식이섬유 생산과정 중에는 상당한 양의 폐기물이 부수적으로 발생되어 그 처리에 막대한 경비 등이 소요된다. 이러한 점들을 극복하기 위한 방법의 일환으로 감귤을 식품미생물에 의해 소화가 용이하도록 발효시킴과 동시에 그 기능성을 향상시키는 것은 감귤을 이용한 기능성 식품 개발을 위한 중요한 토대가 되며, 감귤가공의 좋은 방안으로서 판단된다.

본 연구에서는 식품미생물을 이용하여 감귤을 발효하였고, 그 발효산물의 생리활성 효과를 파악하여, 감귤을 활용한 기능성 식품소재로서의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

감귤시료

제주도 남제주군 가시리 소재 감귤원(23년생 일반조생; 궁천)에서 2000년 2월부터 2001년 1월까지 무농약 재배법에 의해 재배된 감귤을 2001년 2월에 구입하여 사용하였다. 감귤의 당도는 11.0 Brix, 산도는 0.8%이었다.

감귤시료의 발효

감귤시료 200 kg을 수도수로 세척 후, 습식분쇄기로 분쇄하

*Corresponding author: Se-Jae Kim, Department of Life Science, College of Natural Sciences, Jeju National University, 1, Ara 1-dong, Cheju city, Jeju do 690-756, Korea
Tel: 82-64-754-2135, 3529
Fax: 82-64-726-3539
E-mail: sjkim@cheju.ac.kr

여 실험에 이용될 때까지 -20°C 하에서 보존하였다. 감귤시료의 발효과정은 다음과 같다. 감귤시료 40 kg에 물 40 kg을 첨가한 후, 여기에 당분(설탕 5%, w/w)을 첨가하고 3 N NaOH를 이용하여 전체 혼합액의 pH를 7.0으로 조절한 후, 가압멸균(120°C , 25 min)하였다. 젖산균과 효모의 전배양은, 젖산균(*Lactobacillus plantarum*, ATCC8014)인 경우 MRS broth 배지를 이용하여, 38°C 에서 3일간 혐기, 정치배양 하였고, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, IFO 0203)는 YM broth 배지에서 25°C , 5일간 호기, 교반조건(120 rpm) 하에서 배양하였다. 각 미생물 배양액을 혼합하여(젖산균, 3.0×10^7 cells/mL; 효모, 4.0×10^6 cells/mL), 전체 감귤배지의 5%(w/v)되게 접종하고, 당밀을 3%(w/v) 첨가한 후 38°C 에서 7일간 혐기적으로 배양하였다. 배양은 120 L 용량의 발효기(Best Korea Co. Ltd.)를 이용하였으며, 7일간 배양 후 배양액의 pH는 3.5 부근까지 도달하며, 젖산균은 1.5×10^9 cells/mL, 효모는 3.1×10^8 cells/mL이었다.

일반성분

감귤 및 감귤발효액의 일반성분은 AOAC방법(10)에 따라 분석하였다. 수분함량은 105°C 상압 가열건조법, 조지방함량은 Soxhlet 추출법(Soxtex system 1046, Tecator, Sweden), 조단백질 함량은 Semimicro Kjeldahl법(Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator, Sweden), 조회분은 직접회화법으로 측정하였다.

감귤의 주요 플라보노이드 분석

배양이 완료된 감귤발효액은 -40°C 에서 냉동 후 200 kg/day 용량의 동결건조기(Ilshin T.H.E. Co. Ltd)로 건조시키고 나서 건식분쇄기로 분말화하였다. 건조분말에 10배 용량(w/v)의 에탄올(70%)을 첨가하여 실온 및 암조건 하에서 5일간 추출하였다. 추출물을 GF/C 여과지로 여과한 후 여과액을 감압농축하여 에탄올을 제거하고, 남은 시료를 건조하여 추출액 시료(fermented citrus extract)를 만들었다. 동시에 발효과정을 거치지 않은 감귤시료를 상기와 같은 방법에 의해 추출을 수행하였으며 이 추출액 시료(citrus extract)를 대조구로 하였다. 추출액 중 함유된 플라보노이드(naringenin, hesperetin) 성분 등은 고속액체크로마토그래피(HPLC; KNAUER model)에 의해 분석하였으며, 표준물질로서 naringenin, hesperetin(Sigma Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

항산화도 측정

항산화 활성 측정은 superoxide radical 소거활성법(11)에 의해 수행되었고, 비교시료로서 항산화 물질로 알려져 있는 vitamin E, BHA(tert-butylhydroxyanisole) 등을 사용하였다. 우선, spectrophotometer cell(3 mL)에 xanthine 용액 0.2 mL, buffer 1 mL, NBT 0.2 mL 및 시료를 각각 0.1 mg/mL, 0.3 mg/mL, 1.0 mg/mL씩 넣은 후 xanthine oxidase 20 μL 를 넣어 혼합하였다. 다음 spectrophotometer로 530 nm에서 시간에 따른 광흡수도 변화를 측정하여 이를 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 간암세포주인 HepG2 세포는 세포주은행(서울)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium(D-Mem) 액을 사용하여 5% CO_2 및 37°C 가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 Multiwell culture dish에서 배양된 후 FBS가 제거된 serum-

free 배양액에서 24시간 동안 전배양(serum-starvation)한 후 실험에 사용하였다.

MTT assay

세포의 생존여부를 측정하기 위해서 96-well 배양접시에 배양중인 세포에 일정시간 동안 시료를 처리하였다. 배양액을 제거하고 200 μL 의 MTT reagent(Sigma Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시킨 후 반응액을 제거하고 200 μL isopropanol을 넣어 발색반응을 유도하여 570-690 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Flow cytometric analysis

배양세포를 0.025% trypsin으로 분리한 후 70% ethanol로 고정하고 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propidium iodide로 염색한 후 flow cytometer(Becton Dickinson)를 이용하여 세포내 DNA 함량을 측정하였으며 subG1 peak area를 환산하여 apoptotic cell의 percentage를 측정하였다.

H33342 염색

배양중인 세포에 H33342(Sigma Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)를 첨가한 후 37°C 에서 30분간 배양 후 CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 형광현미경 하에서 세포를 관찰하였다. 세포핵의 응축정도와 apoptotic body의 형성 여부를 세포의 생존 또는 세포사멸의 지표로 사용하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포는 5% 2-mercaptoethanol을 포함한 Laemmli sample buffer(15)에 녹여 균질화시켰다. 단백질은 70°C 에서 10분간 가열하고 4-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 poly vinylidene difluoride(PVDF) membrane에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer[Tris-buffered saline-0.1% (w/v) Tween-20] (TBS-T)으로 상온에서 1시간 동안 반응시키고 난 뒤 1차 항체(1:1,000-1:3,000)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25°C) 또는 16시간(4°C)동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 방법으로 현상하였다.

활성산소물질 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 측정

ROS의 측정을 위해서 세포막 투과성 ROS 탐색자(probe)인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(H₂DCFDA; Sigma Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 세포질 내 ROS의 생성과 측정을 측정하였다. 배양이 끝난 세포를 PBS로 세척한 후 10 mM/L의 H₂DCFDA를 함유한 PBS에서 37°C , 10분간 배양 한 후 multiwell 형광측정기(Tecan, Austria)를 이용하여 485 nm/535 nm의 파장에서 형광의 강도를 측정하였다.

동물실험

4주령된 Sprague-Dawley rats(SD rat) 수컷 42마리를 실험 직전까지 정상 식이로 적응시킨 뒤 무작위로 실험 군별로 6마리씩 나누어 42일 동안 사용하였다. 대조군(control) 실험동물에게는 고칼로리 식이(Table 2)를 투여하였고, 비교실험군에는 고칼로리 식이와 함께 감귤 추출물과 감귤발효 추출물을 20% ethanol에 녹여 각각 50 mg/kg, 100 mg/kg씩 매일 경구투여 하였다. 사육조건은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 밤과 낮을 12시간 주기로 유지시켰으며 식이와 물은 42일 동안 자유롭게 섭취

Table 1. Proximate compositions of *Citrus unshiu* Marc. before and after fermentation

(unit: %)

Samples	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude ash
Citrus	91.9	0.46	0.43	0.47
Fermented citrus	95.6	0.70	0.75	0.60

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredient	Content (%)
Casein	20
Sucrose	56
Cholesterol	0.75
Sodium cholate	0.25
Mineral complex ¹⁾	3.5
Vitamin complex ²⁾	1.0
Lard	10
Cellulose powder	5.0
D,L-methionine	0.3
Choline bitartrate	0.2
Corn oil	3.0

¹⁾Mineral complex: calcium phosphate dibasic: 500 g, sodium chloride: 74 g, potassium citrate monohydrate: 220 g, potassium sulfate: 53 g, magnesium oxide: 24 g, manganese carbonate: 3.50 g, ferric citrate: 6.0 g, zinc carbonate: 1.60 g, cupric carbonate: 0.30 g, potassium iodate: 0.01 g, chromium potassium sulfate: 0.55 g, sucrose, finely powdered to make 1,000 g.

²⁾Vitamin complex(AIN-76): thiamine · HCl: 600 mg, riboflavin: 600 mg, pyridoxine · HCl: 700 mg, nicotinic acid: 3000 mg, D-calcium pantothenate: 160 mg, cyanocobalamin: 1.0 mg, folic acid: 200 mg, D-biotin: 20.0 mg, retinyl acetate: 400,000 IU, α-tocopherol acetate: 5,000 IU, cholecalciferol: 2.5 mg, menaquinone: 5.0 mg, sucrose, finely powdered to make 1,000 g.

취시켰다. 몸무게와 식이량은 일주일에 두 번씩 측정하였다. 실험이 끝난 후 12시간 동안 절식시킨 후 혈액과 간조직을 분리하였다. 혈장 내 총 콜레스테롤과 HDL 함량은 total cholesterol Kit(AM 202-K, 아산제약)와 HDL cholesterol Kit(AM203-K, 아산제약)를 사용하여 측정하였다. 적출한 간 조직은 4% paraformaldehyde에 고정된 후 통상적인 방법에 따라 알코올에 탈수하고 파라핀 절편을 만들어 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 광학현미경(Olympus BX51TR)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

일반 성분

감귤과 감귤발효액의 일반성분을 Table 1에 나타내었다. 전반적으로 수분함량이 가장 높게 나타났으며, 감귤이 91.9%, 감귤발효액이 95.6%였다. 감귤발효액의 조지방, 조지방, 조단백 등은 0.60-0.75%로 나타나 감귤의 0.43-0.47%보다 다소 높게 나타났다.

감귤 및 감귤발효액 추출물의 SOD 활성

감귤 및 감귤발효추출액의 항산화활성을 감귤에 함유된 대표적인 플라보노이드인 naringenin, naringin과 일반적으로 잘 알려진 항산화물질인 vitamin E 등과 비교하였다(Fig. 1). 감귤발효 추출액의 항산화 활성은 각 농도별(0.1 mg/mL, 0.3 mg/mL, 1.0 mg/mL) 40, 72, 84% 등으로 vitamin E의 48, 76, 96%에

Fig. 1. Antioxidative activity (Superoxide radical scavenging activity) of citrus extracts, some citrus flavonoids and vitamin E. FCE: fermented citrus extract, CE: citrus extract.

비해 낮았지만, 감귤추출액, naringenin 등과 비교했을 때 상대적으로 높은 항산화 활성을 나타냈다.

감귤 및 감귤발효산물의 주요 플라보노이드

감귤생과 분쇄액과 감귤발효물을 동결건조하여 고형분을 각각 17.2, 8.4% 얻었으며, 이 분말시료를 이용하여 에탄올로 1회 추출하여 추출물을 각각 7.9, 8.7% 수득하였다. 각 추출물을 DMSO에 500 mg/mL 농도로 녹여서 시료 중 naringenin, hesperetin의 성분을 분석하였다(Fig. 2A, 2B). 표준품을 이용한 naringenin과 hesperetin의 RT는 각각 39.8 min, 42.1 min이었다. 감귤발효액에서 naringenin(2.86 µg/추출액 mg)과 hesperetin (3.20 µg/추출액 mg)의 함량은 감귤 추출액에 비해 각각 1.9배와 6.2배 높게 검출되었다.

Naringin과 hesperidin은 당과 결합한 형태로서 생리학적 활성이 매우 약하지만, 섭취 후 장내 미생물에 의해서 당이 제거되어 활성이 더 강한 naringenin과 hesperetin으로 전환된다고 알려져 있으며(12), 항균성에서도 일반적으로 플라보노이드의 비당체는 배당체보다 우수한 것으로 나타나고 있다(13,14). 이외에도 타 생리활성 효과와 관련하여 감귤과피에 함유하는 플라보노이드(naringin, hesperidin)는 항천식(15), 항진통(16), 모세혈관 강화(17), 콜레스테롤 생합성 저해에 의한 동맥경화증 예방치료(1) 등의 생리활성능이 알려져 있으며, 아급성 독성(18) 및 생식독성실험(19)에서도 무독성이 보고되고 있다. 이러한 가능성이 높은 감귤을 젖산균과 효모 등의 미생물에 의해 발효처리 할 경우 naringenin이나 hesperetin 등의 비당체 플라보노이드 농도(Fig. 2B) 및 항산화도(Fig. 1)가 증가하며, 따라서 이들 식품미생물에 의한 발효는 감귤의 기능성을 한층 증진시키는 개발방법 중의 하나로서 그 가능성이 높을 것으로 기대되었다.

감귤발효산물이 세포의 생존능에 미치는 영향

배양액 내 혈청 제거로 발생하는 세포의 사멸에 감귤 추출

Fig. 2. HPLC elution profiles of (A) flavonoids from the extract of *Citrus unshiu* Marc., and (B) flavonoids from fermented extract of *Citrus unshiu* Marc. by lactic acid bacterium and yeast.
 Analytical conditions for HPLC were as follows: C₁₈ column; wavelength, 254 nm; flow rate, 1.0 mL/min; injection volume, 20 µL; mobile phase, acetonitrile:water = 16 : 84 to 35 : 65.

물(citrus extract, CE) 및 발효감귤 추출물(fermented citrus extract, FCE)이 미치는 영향을 MTT assay로 측정하였다(Fig. 3). 혈청을 제거한 배양액에서 48시간 배양 후 약 55%의 세포가 더 이상 생존하지 못하였으나 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물은 세포의 생존능을 유의하게 증가시켰다. 특히 62.5 µg/mL의 농도에서 발효감귤 추출물의 효과는 감귤 추출물의 효과보다 뚜렷하게 증가된 효과를 보였다. 그러나 MTT assay 결과는 단순히 세포의 생존여부의 지표일 뿐 세포괴사(necrosis)인지 세포사멸(apoptosis)인지는 구분하지 못하므로 보다 구체적인 효과를 관찰하기 위하여 H33342 염색 및 flow cytometry 방법으로 세포사멸의 여부를 검증하였다(Fig. 4, 5). H33342로 염색하였을 때 세포사멸 현상은 세포핵 내 염색질의 응축(nuclear chromatin condensation)과 세포사멸소체(apoptotic body)의 특징을 보여 주었다. 혈청이 제거된 배양액(serum-free)에 48시간 배양하면 세포핵의 응축과 apoptotic body의 생성을 나타내는 형광의 강도가 강하게 보여지나 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물을 처리하였을 경우 공히 세포사멸을 억제하였는데 특히 발효감귤추출물의 경우가 보다 효과적이었다. 이러한 효과는 flow cytometry 결과에서도 분명히 반복되었다(Fig. 5). Fig. 5에서 화살표가 가리키는 peak는 apoptosis의 지표가 되는 sub G1 DNA content를 나타내는데 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물 모두 peak의 수치를 감소시키는 세포사멸로부터의 보호 효과를 보였으며 발효감귤 추출물의 효과가 보다 분명하였다.

Fig. 3. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on cell proliferation.

HepG2 cells were serum-starved for 24 h and further incubated in the presence of citrus extract (CE) or fermented citrus extract (FCE) for an additional 48 h. MTT activity assay was measured as described in 'Materials and Methods'. Each bar represents the mean + SE (n = 3-4).

감귤 발효산물이 세포사멸 관련 단백질의 변화에 미치는 영향

세포사멸 과정에는 여러 단백질의 변화가 수반되는데 대표적인 것이 DNA 손상회복 효소인 PARP의 가수분해, 세포주기 조절단백질인 cyclin 함량의 변화등이 나타난다. 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물이 이러한 단백질의 변화에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다(Fig. 6). 감귤 추출물에 비해 발효감귤 추출물의 처리는 PARP의 가수분해를 보다 효과적으로 억제하였으며 cyclin B1의 함량 역시 발효감귤 추출물에 의해 크게 증가하므로써 세포사멸의 억제에 발효 후 산물이 더욱 효과적임을 보였다. 흥미로운 것은 세포증식 과정에서 활성화되는 mitogen activated protein kinase(MAP kinase)의 하나인 ERK의 활성이 발효감귤 추출물에 의해 크게 증가하는 현상을 보임으로서 발효감귤 추출물 성분들 가운데 세포증식에 관련되는 인자(tropic factor)가 포함되어 있을 가능성을 시사하였다.

감귤 발효산물이 세포 내 활성산소(ROS)의 변화에 미치는 영향

배양중인 HepG2 세포에서 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물이 ROS의 생성에 미치는 효과를 분석하였다. 서로 다른 농도의 감귤 추출물, 발효감귤추출물을 첨가하여 배양하였을 경우 세포내 ROS의 양은 발효감귤 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 7). 감귤 추출물과 감귤발효물은 모두 세포사멸을 보호하는 효과를 가지고 있지만, 발효감귤 산물이 감귤추출물보다 월등한 효과를 보였다.

감귤 발효산물이 간 조직 및 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

SD rat에 감귤추출물과 발효감귤 추출물을 42일간 경구투여하여 각 실험군이 체중 증가에 미치는 영향을 분석하였다(Table 3). 체중 증가량은 각 실험군들이 고칼로리 식이(control)보다 다소 높은 경향을 보였지만 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 그러나 100 mg/kg 발효감귤 추출물 투여군에서는 155.83±5.46 g으로 다른 군보다 유의한 수준으로 감소하였다. 그러나 사료 효율성, kidney, liver, 그리고 spleen 무게는 고칼로리 식이(control)군과 각 실험군 간의 유의한 차이는 없었다. Kim 등(20)은 고칼로리와 0.02% hesperetin을 혼합급여한 실험에서 체중 감소 효과를 보고한 바 있다. 발효감귤액 투여군의 증체량 감소 효과는 감귤에 포함된 물질의 발효과정에서 생긴 유도체에 기인

Fig. 4. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on cellular fate. HepG2 cells were serum-starved for 24 h and further incubated with reagents indicated for an additional 48 h.

Cellular viability was assessed by staining cells with H33342, a cell-permeable, fluorescent DNA-specific dye, to observe the degree of nuclear condensation as a marker of apoptotic processes.

FBS: fecal bovine serum, CE: citrus extracts ($\mu\text{g/mL}$), and FCE: fermentated citrus extracts ($\mu\text{g/mL}$).

Fig. 5. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on cell viability.

HepG2 cells were serum-starved for 24 h and further incubated with reagents indicated for an additional 48 h. Cellular viability was assessed by measuring intracellular DNA content with flowcytometry. The first peak indicates cells having subG1 DNA content, an indication of apoptotic results.

FBS: fecal bovine serum, CE: citrus extracts ($\mu\text{g/mL}$), and FCE: fermentated citrus extracts ($\mu\text{g/mL}$).

할 것으로 사료되지만, 이를 확인하는 구체적인 연구가 요구된다.

혈장 내 total cholesterol과 HDL 함량을 분석한 결과 100 mg/kg 발효감귤 추출물 투여군에서는 total cholesterol의 함량을 감소시키는 효과를 나타내었으나 다른 실험군들 간의 비교에서는 유의적인 차이가 없었다(Table 4). HDL 함량은 고칼로리 식이군에 비해 모든 실험군들이 높게 나타났으나 실험군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 발효감귤 추출물에서 HDL/TC(%)함량이 다소 높게 나타났지만 감귤 추출물 투여군과 비교해 볼 때 유의적인 차이는 없었다. 그러나 같은 함량 간의 비교에서는 발효감귤 추출물이 감귤 추출물보다 HDL/TC(%)함량이 높게 나타남을 보여주고 있다. 이것은 오렌지 주스를 섭취한 고 콜레스테롤 환자와 감귤 주스를 급여한 토끼에서 HDL

함량이 증가한다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다(21,22). 또한 Seo 등(23)은 에탄올을 투여한 쥐에서 감귤 성분중의 하나인 naringin이 혈장내 HDL과 HDL/total cholesterol 함량을 증가시킨다고 보고하였고, 고칼로리를 섭취한 쥐에서도 콜레스테롤 함량이 감소한다고 보고한 바 있다(24). 그러므로 이런 효과는 발효감귤 추출물 내에 있는 flavonoid 함량증가에 의한 결과로 추정되지만 실제 flavonoid에 의한 영향인지를 확인하기 위한 연구가 더 요구된다.

각 실험군의 간조직의 지방간 형성을 비교하였다(Fig. 8). 고칼로리 식이군(Fig. 8A)과 알코올 투여군(Fig. 8B)에서는 지방과립이 현저하게 증가하여 지방간이 유도됨을 확인할 수 있었다. 그러나 감귤 추출물 투여군(Fig. 8C)에서는 지방과립이 다

Fig. 6. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on different intracellular proteins.

HepG2 cells were serum-starved overnight (24 h) and further preincubated with different extracts for an additional 48 h. Cells were lysed and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting as indicated.

*CE: citrus extract, FCE: fermented citrus extract.

소 감소하는 효과를 나타내었고, 발효감귤 추출물 투여군(Fig. 8D)에서는 지방과립 형성이 현저하게 감소하였다. Hesperetin 및 그 유도체와 naringin은 HMG-CoA reductase 및 ACAT 활성을 억제시킴으로써 지질 함량을 감소시키는 효과를 나타낸다는 보고가 있다(19,24). 이러한 결과로 미루어 볼 때 감귤 추출물 및 발효감귤 추출물에 의한 지방간 형성저해 효과는 감귤 추출물과 발효감귤 추출물에 함유되어 있는 flavonoid가 간 지질대사에 관련된 여러 효소들의 작용에 영향을 미침으로써 그 효과를 나타낸다고 사료된다. 하지만, flavonoid 외에 발효과정에서 생성된 특이적인 활성성분들 또한 다양한 기능성을 나타낼 수 있다고 추정되기 때문에 향후 발효 감귤 추출물의 활

Fig. 7. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on ROS generation.

HepG2 cells were serum-starved for 24 h and further incubated with different extracts together with H2DCFDA, a cell-permeable ROS-specific fluorescent dye for 30 min. The fluorescence intensity was measured with multiwell fluorescence reader at 485nm/595nm for excitation and emission, respectively.

성 성분에 대한 더욱 구체적인 연구가 요구된다.

요 약

본 연구는 젓산균과 효모에 의해 발효처리한 감귤의 기능적 특성을 파악하고자 수행되었다. 발효감귤 추출물의 항산화도는 발효하지 않은 감귤 추출물과 비교할 때 뚜렷하게 증가하였다.

Table 3. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on body weight, food intake, liver weight, and spleen weight

Group	Weight gain (g/42 day)	Food intake (g/42 day)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Liver/weight gains (%)
Control	163.7 ± 1.71 ^{ab}	286.8 ± 9.91	16.3 ± 0.64	2.51	1.01	4.26
20% Ethanol	175.95 ± 7.57 ^b	286.06 ± 18.91	17.03 ± 0.87	2.59	0.95	4.29
20% Ethanol+50 mg CE ¹⁾	170.57 ± 4.08 ^{ab}	281.27 ± 8.01	16.14 ± 0.76	2.53	1.03	4.11
20% Ethanol+100 mg CE	172.38 ± 3.03 ^{ab}	286.13 ± 2.70	18.25 ± 0.39	2.53	0.92	4.56
20% Ethanol+50 mg FCE ²⁾	171.63 ± 6.41 ^{ab}	272.1 ± 5.44	16.42 ± 0.68	2.62	0.89	4.20
20% Ethanol+100 mg FCE	155.83 ± 5.46 ^a	283.58 ± 3.9	16.12 ± 0.45	2.39	1.17	4.35

^{1,2)}CE: citrus extract, FCE: fermented citrus extract.

Values are expressed as the Mean ± S.E. (n = 6).

^{ab}Values within groups with different superscript letter are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effects of extracts of *Citrus unshiu* Marc. on plasma cholesterol, and HDL level

Group	TC (mg/dL)	HDL (mg/dL)	HDL/TC (%)
Control	161.84 ± 2.27 ^a	19.61 ± 0.83 ^a	12.10 ± 0.36 ^a
20% Ethanol	149.16 ± 13.36 ^a	40.15 ± 4.83 ^b	28.38 ± 5.64 ^b
20% Ethanol+50 mg CE ¹⁾	134.52 ± 3.11 ^a	31.62 ± 3.13 ^{ab}	23.54 ± 2.43 ^b
20% Ethanol+100 mg CE	157.18 ± 7.98 ^a	31.28 ± 4.56 ^{ab}	20.09 ± 3 ^{ab}
20% Ethanol+50 mg FCE ²⁾	140.11 ± 4.47 ^a	42.41 ± 5.39 ^b	30.25 ± 3.65 ^b
20% Ethanol+100 mg FCE	136.47 ± 9.57 ^a	36.51 ± 4.86 ^b	26.48 ± 1.68 ^b

^{1,2)}CE: citrus extract, FCE: fermented citrus extract.

Values are expressed as the Mean ± S.E. (n = 6).

^{ab}Values within groups with different superscript letter are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Fig. 8. Representative photographs of livers from high calories diet-fed (A), combined high calories diet and 20% ethanol (B), combined high calories, ethanol and 100 mg citrus extracts-fed (C), ethanol and 100 mg fermented citrus extracts-fed (D) rat.

The lipid droplets are indicated by arrow. A, B, C and D are light microscopic findings of the livers; Hematoxylin-eosin staining of paraffin sections with original magnification, X100.

또한, 대조구와 비교할 때 발효처리한 감귤 추출물에서 플라보노이드 조성변화가 나타났으며, 각각 naringenin, hesperetin의 농도가 증가하였다. 감귤은 발효처리와 상관없이 HepG2 세포의 세포사멸 보호효과를 나타내었으나, 발효처리구에서 세포사멸 보호효과와 ROS(Reactive oxygen species) 생성 감소효과가 더욱 차별적으로 나타났다. 수컷의 Sprague-Dawley rats에 감귤 추출물과 발효감귤 추출물을 경구 투여하였다. 체중은 다른 실험군에 비해 발효감귤 추출물의 고농도 투여(100 mg/kg 체중)에서 유의적으로 감소하였고 혈장 콜레스테롤 함량은 다소 감소하였으나, 다른 실험구에 비하여 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 고지방 식이에 의해 유도된 지방간 형성은 발효 감귤 추출물 투여에 의해 유의하게 감소되었다. 본 연구 결과는 발효 감귤 추출물은 세포수준에서 감귤추출물에 비해 증강된 세포사멸 보호효과와 항산화 효과를 나타내며, 동물실험에서는 고지방 식이에 의해 유도된 지방간 형성을 저해하는 효과를 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 지역기술개발용역사업(제주0102)과 산업자원부의 지역혁신인력양성사업의 연구결과로 수행되었음.

문헌

1. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. 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.* 29: 1182-1185 (1999)
2. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide

- scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 19-21 (1990)
3. Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76 (1996)
4. Damon P, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Lavrid C, Crastes de Paulet A. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 α and thromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittel Forschung* 37: 1449-1153 (1987)
5. Emim JA, Oliviera AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 118-122 (1994)
6. Francis AR, Shetty TK, Bhattacharya RK. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 10: 1953-1955 (1989)
7. Guengerich FP, Kim DM. *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 11: 2275-2279 (1990)
8. Guthrie N, Carroll KK. Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. pp. 227-236. In: *Flavonoids in the Living System*. Manthey JA, Buslig BS (eds). Plenum, New York, NY, USA (1998)
9. Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Ind. Nutr.* 5(2): 42-52 (2000)
10. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15th ed. Method 994. Association of Official Analytical Communities, Washington, DC, USA (1990)
11. Kim CJ. Screening of Physiologically Active Substance. Jayou Academy, Seoul, Korea. pp. 325-338 (1996)
12. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacteria metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 21: 17-23 (1998)
13. Han SS, Lee CK, Kim YS. Antimicrobial effects of naringenin alone and in combination with related flavonoids. *Yakhak Hoeji*

- 35: 407-411 (1992)
14. Yoshio S. Bactericidal, paramedicinal and spermatocidal actions of some flavonoids. *GifuKa Daigaku Kiyo* 10: 123-130 (1963)
 15. Hosoda K, Noguchi M, Chen YP, Hsu HY. Studies on the preparation and evaluation of Kijitsu, the immature citrus fruits. IV. Biological activities of immature fruits of different citrus species. *Yakugaku Zasshi* 111: 188-192(1991)
 16. Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Foestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoids (Note 1): Anti inflammatory and analgesic activity. *Pharmacology* 40: 709-712 (1994)
 17. Galley P, Thiollet M. A double blind placebo controlled trial of a new venoactive flavonoids fraction in the treatment of symptomatic capillary. *Int. Angiol.* 12: 69-72 (1993)
 18. Kurata Y, Fukushima S, Hagiwara A, Ito H, Ogawa K, Ito N. Carcinogenicity study of methyl hesperidin in B6C3F1 mice. *Food Chem. Toxicol.* 28: 613-618 (1990)
 19. Kawashima K, Nakaura S, Usami M, Yamaguchi M, Tanaka S, Takanaka A, Omori Y. Effect of methyl hesperidin on prenatal developments of rats. *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci. Tokyo.* 104: 64-68 (1986)
 20. Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin. Chim. Acta* 327: 129-137 (2003)
 21. Kurowska EM, Borradaile NM, Spence MD, Carroll KK. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr. Res.* 20: 121-129 (2000)
 22. Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piche LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1095-1100 (2000)
 23. Seo HJ, Jeong KS, Lee MK, Park YB, Jung U, Kim HJ, Choi MS. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. *Life Sci.* 73: 993-946 (2003)
 24. Bok SH, Shin YW, Bae KH, Jeong TS, Kwon YK, Park YB, Choi MS. Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol red rats. *Nutr. Res.* 20: 1007-1015 (2000)

(2004년 5월 21일 접수; 2004년 8월 4일 채택)