

Anti-inflammatory Effect of *Citrus unshiu* Peels Fermented with *Aspergillus niger*

Sun Yi Lee¹, Ju Mi Hyun¹, Sang Suk Kim¹, Suk Man Park¹, Kyung Jin Park¹, Young Hun Choi¹, Sang Hun Kim^{2,3}, Sun Nyoung Yu² and Soon Cheol Ahn^{2,3*}

¹National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 440-706, 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

Received May 29, 2014 / Revised July 24, 2014 / Accepted July 25, 2014

Citrus, yield of which is the highest among fruits produced in Korea, is extensively consumed for processed food items. The amount of by-products of citrus produced from the processing within a short period after the harvest is tremendous. These by-products are mostly dumped into land or neglected because of cost involved in processing them. The aim of the present study was to explore the usefulness of the by-products as a new material by examining the anti-inflammatory activity of fermented extracts of citrus peels. The peels of 'unshu' (*Citrus unshiu*) was fermented with *Aspergillus niger* and their extracts before or after fermentation were analyzed using HPLC. The analysis showed that neohesperidin level considerably increased and the two new compounds were synthesized after fermentation. The anti-inflammatory activity of the fermented extracts was examined on RAW 264.7 murine macrophage cells stimulated with lipopolysaccharide. Fermented unshu extracts significantly enhanced the decrease of nitric oxide (NO) production, iNOS and COX-2 expression, comparing with those of unfermented extracts. Also TNF- α and IL-6 production, both of which are pro-inflammatory cytokine, were more inhibited in fermented extracts. These results showed that the fermentation and promotion of the function of the by-products of citrus peels will help find a new application.

Key words : Anti-inflammatory effect, *Aspergillus niger*, *Citrus unshiu*, fermentation

서 론

감귤은 우리나라 과수 전체 생산량의 1/3을 차지하고 있으며, 국내에서 가장 많이 생산되고 소비되는 과일이다. 생산된 감귤은 과거에는 대부분 생과로 소비되었으나, 식생활 패턴의 변화와 식품산업 및 가공기술의 발달로 현재는 20% 이상이 가공제품으로 소비되고 있다. 감귤은 다른 과실에 비해서 풍부한 과즙, 독특한 향미 및 고유한 색을 가지고 있을 뿐만 아니라 고 기능성 성분들의 보고로 잘 알려져 있다[13]. 감귤류의 flavonoid는 현재까지 약 40 여종 이상의 구조가 밝혀져[7], 주요 성분인 hesperidin, neohesperidin 및 naringin에 대한 분석과 효능에 대한 연구가 진행되어 왔다[9]. 감귤이 가지고 있는 플라보노이드류의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 작용, 고지혈증 억제작용, 항균효과, 항염효과, 암세포의 증식 억제, 고혈압 예방 등의 혈관 건강 증진 등이 보고되고 있다[3]. 최근에는 감귤류의 암 예방물질에 관한 연구가 활발히 진행되

어 flavone 류 중에서 polymethoxyflavone 류가 감귤류의 특징적인 활성 성분으로 밝혀졌고, 혈소판 응집억제, 임파구 증식억제, 항 궤양, 항염증 등의 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다[12, 14, 15]. 그러나 감귤류의 대표적인 flavonoid인 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등은 배당체 형태로 이루어져 있어 aglycone 형태인 naringenin 및 hesperetin에 비하여 생리활성이 낮게 나타나므로[5, 8] 감귤 배당체 형태의 flavonoid를 aglycone 형태로 전환함으로써 기능성 향상을 기대할 수 있다.

염증 반응은 생체나 조직에 물리적인 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 침습이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대 되면서 염증을 유발한다. 또한 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 일으킨다[11]. 염증에 관여하는 염증 매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성으로 인하여 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO) 형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증 과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 형성된다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증

*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.

상태에서 iNOS 에 의해 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[17, 18]. 또한, COX-2는 염증반응, 면역반응에 깊이 관여하고 있는 PGE₂를 형성시킨다. 이와 같은 염증 매개인자들의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다[10].

본 연구에서는 감귤과피 발효물의 유효물질들이 이러한 염증반응을 효과적으로 억제시키는지 검토하고자 lipopoly-saccharide (LPS)를 처리하여 RAW 264.7 macrophage 세포에 염증을 일으키고 감귤시료를 처리하여 세포가 방출하는 NO 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현과 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6 (IL-6)의 변화를 통해 항 염증성 활성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

감귤과 발효미생물

감귤은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 재배되고 있는 온주밀감(*Citrus unshiu*)을 채집하고 자연 건조하여 분말의 형태로 사용하였다. 발효에 사용된 미생물 *Aspergillus niger* KCTC6913은 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC; Daejeon, Korea)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다.

감귤과피 발효물의 제조

미생물의 종균배양은 potato dextrose broth (PDB, BD Difco, Sparks, MD, USA) 배지를 이용하여 30°C 항온기에서 2일 동안 진탕 배양하였다. 본 발효를 위해 5% (w/v) 온주밀감 과피분말이 함유된 PDB 배지를 사용하였으며, 종균을 5 l Jar fermentor에 10% (v/v) 접종한 후 30°C 항온 조건에서 5일 동안 진탕 배양하였다.

감귤과피 발효물의 HPLC 분석

감귤발효물의 성분분석은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 통해 확인하였으며, 모든 시약은 HPLC grade를 사용하였다. 전계용매인 acetonitrile과 acetic acid는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 분석에 사용된 표준물질(rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone, naringenin, hesperetin)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2489 UV visible detector, Waters e2695 Separations module (Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였으며, 분석 column은 YMC Pro C18 RS (180×4.6 mm; YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하였다. 유속은 1 ml/min으로 유지하였고 UV 280 nm에서 검출하였으며, 이

동상 용매는 0.1% acetic acid를 포함하는 증류수(A)와 acetonitrile (B)를 이용하였다. 이동상 용매 조건은 초기 20% B로 시작하여, 0-8 min 20-40% B, 8-15 min 40% B 유지하는 조건으로 분석하였다. 분석 S/W는 Waters의 Empower system을 사용하였다.

세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 실험에 사용된 LPS (*E.coli* serotype 0111:B4)는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였고, 배지는 GIBCO (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Nitric oxide (NO) 분석

RAW 264.7 cell (1.5×10⁶ cells/ml)을 18시간 전 배양 후, 시료와 LPS (1 µg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻ 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)를 표준용액으로 사용하여 정량하였다[2].

Cytokine 분석

RAW 264.7 cell (1.5×10⁶ cells/ml)을 18시간 배양 후, LPS를 1 µg/ml로 처리하여 염증성 cytokine 생성을 자극하고 동시에 시료를 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후 상등액을 취하여, 각각 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)의 mouse TNF- α 및 mouse IL-6 ELISA kit를 사용하여 생성된 cytokine을 정량하였다[2].

단백질 발현 분석

세포의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW 264.7 cell (1.0×10⁶ cells/ml)을 18시간 전 배양 후, LPS (1 µg/ml)와 시료를 농도 별로 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 200 µl의 lysis buffer (Pro-prep, iNTRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 가하여 균질화 한 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준용액으로 하여 Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 정량 하였다. 시료당 30 µg의

동일한 양의 단백질은 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 통해 분리하고, 분리된 단백질은 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮긴 다음, NOS₂ (1:1,000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology, San Francisco, CA, USA), COX-2 (1:1,000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology) 및 β -actin (1:5,000 dilutions; Sigma, St Louis, MO, USA)의 1차 항체를 희석하여 배양하고, horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-goat IgG (1:5,000 dilutions; Santa Cruz Biotechnology)의 2차 항체를 희석하여 배양하였다. ECL 기질(iNtRON Biotechnology)과 반응 시킨 후, MCID Analysis 7.0 Software (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada)를 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

통계처리

통계처리는 SPSS (Release 12.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 t-test 및 one-way ANOVA test로 유의성 검정을 실시하였다. 여러 군과의 비교를 위하여 Duncan test 및 LSD test를 실시하여 다중검정하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때를 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

감귤과피 발효물의 성분분석

배양이 종료된 감귤 발효물은 여과지로 여과한 후 동량의 ethyl acetate (EtOAc)를 첨가하여 2시간 동안 교반 추출하고 EtOAc 층만 분리 후, 감압 농축하여 사용하였다. 발효균과 동일한 양의 온주밀감 과피분말을 함유하는 PDB 배지에 미생물을 접종하지 않고 여과액을 EtOAc 용매로 추출하여 발효 전 실험군의 시료로 사용하였다.

우리나라에서 주로 재배되고 있는 온주밀감의 완숙과 과피는 narirutin과 hesperidin을 주로 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[4, 20]. 감귤 내에 존재하는 8가지 flavonoid 표준물질(rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone, naringenin, hesperetin)을 분석한 크로마토그램(Fig. 1A)과 비교한 결과, 실험에 사용된 온주밀감의 감귤과피에는 기존 문헌에서의 결과와 같이 다량의 narirutin과 hesperidin이 함유되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 1B).

본 연구에서는 온주밀감의 감귤과피를 배지에 첨가하여 *A. niger*로 발효한 결과, narirutin과 hesperidin이 배양일에 따라 점점 감소하였고, 5일 배양한 발효추출물에서 neohesperidin이 현저하게 증가하였다. 또한, RT 7.9min과 11min에서 발효 전 감귤과피 분석 결과에서 나타나지 않았던 compound 1과 compound 2가 확인되어, 8가지 감귤 flavonoid 표준물질과 비교한 결과, 일치되는 물질이 없어서 *A. niger* 발효에 의해 새롭게 생성된 물질임을 확인하였다(Fig. 1C).

Nitric oxide (NO) 생성량에 대한 영향

RAW 264.7 세포를 18시간 배양 후 LPS 처리하여 염증을 유발시키고 동시에 감귤 시료를 처리하여 24시간 후, NO 생성량을 측정하였다. LPS 단독 처리구에 비하여 감귤과피 발효 전과 발효 후 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성량을 저해하였고, 특히, 감귤과피 발효추출물은 100 μ g/ml의 처리 농도에서 80% 이상의 NO 생성 억제 효과가 나타났다. 이미 알려진 감귤의 NO 생성 억제 효과와 유사하게 본 연구에서도 발효 전 감귤과피 추출물 처리군에서도 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되었으나, 감귤과피 발효 추출물 처리군의 경우, 발효 전 감귤과피 추출물에 비해 3배 이상 높은 NO 생성 억제 효과가 나타났다(Fig. 2). 한편, 모든 감귤 처리군의 처리농도에서는 세포독성은 나타나지 않았다(data not shown).

iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 조절

LPS로 유도된 대식세포는 염증을 일으키는데, 이 과정에서 염증유발 단백질로 알려진 iNOS와 COX-2 단백질의 발현에 대한 감귤과피 발효물의 영향을 Western blot을 통해 확인하였다.

감귤과피 처리군에서는 iNOS와 COX-2 등과 같은 염증유발 단백질의 발현이 현저히 저해되었으며, 특히 감귤발효 추출물의 경우, 농도의존적인 단백질 발현 저해 효과를 나타내어 100 μ g/ml의 처리 농도에서 iNOS의 발현이 90% 이상 억제되었고(Fig. 3), PEG₂의 생성을 유도하는 COX-2 단백질은 100 μ g/ml의 감귤과피 발효추출물 처리 농도에서 10% 이상의 저해되었다(Fig. 4). iNOS 단백질 발현에서는 50, 100 μ g/ml농도의 시료를 처리하였을 때, 감귤과피 발효추출물이 발효 전 추출물에 비해 각각 2.5배, 8.4배 높은 단백질 발현 저해 효과를 보였다. 또한 COX-2 단백질 발현에서는 50 μ g/ml농도의 시료를 처리하였을 때 감귤과피 발효 전 추출물과 발효 후 추출물의 저해 효과는 비슷하였으나, 100 μ g/ml농도의 시료 처리군에서는 감귤과피 발효추출물이 발효 전에 비해 1.2배 높은 단백질 발현 저해 효과를 보였다.

염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성 억제 효과

LPS로 유도된 대식세포는 pro-inflammatory cytokine을 분비하게 되고 이를 통하여 염증반응의 정도를 확인 할 수 있었다. 각 시료들의 염증과 관련된 사이토카인 억제 정도를 확인하기 위하여 TNF- α 와 IL-6의 생성량에 대한 감귤과피 발효추출물의 영향을 하였다.

TNF- α 의 생성량은 감귤과피 발효 후 추출물이 발효 전 추출물에 비해 20~25% 이상 높은 효과를 나타냈으며(Fig. 5) 특히, 감귤과피 발효 추출물이 세포가 염증반응을 일으키는 동안 일정하게 생성되는 IL-6의 생성을 크게 억제시키는 것으로 나타났다. 감귤과피 발효 추출물을 50 μ g/ml과 100 μ g/ml 농도로 처리한 세포에서 IL-6 발현이 각각 30%, 54% 억제되는

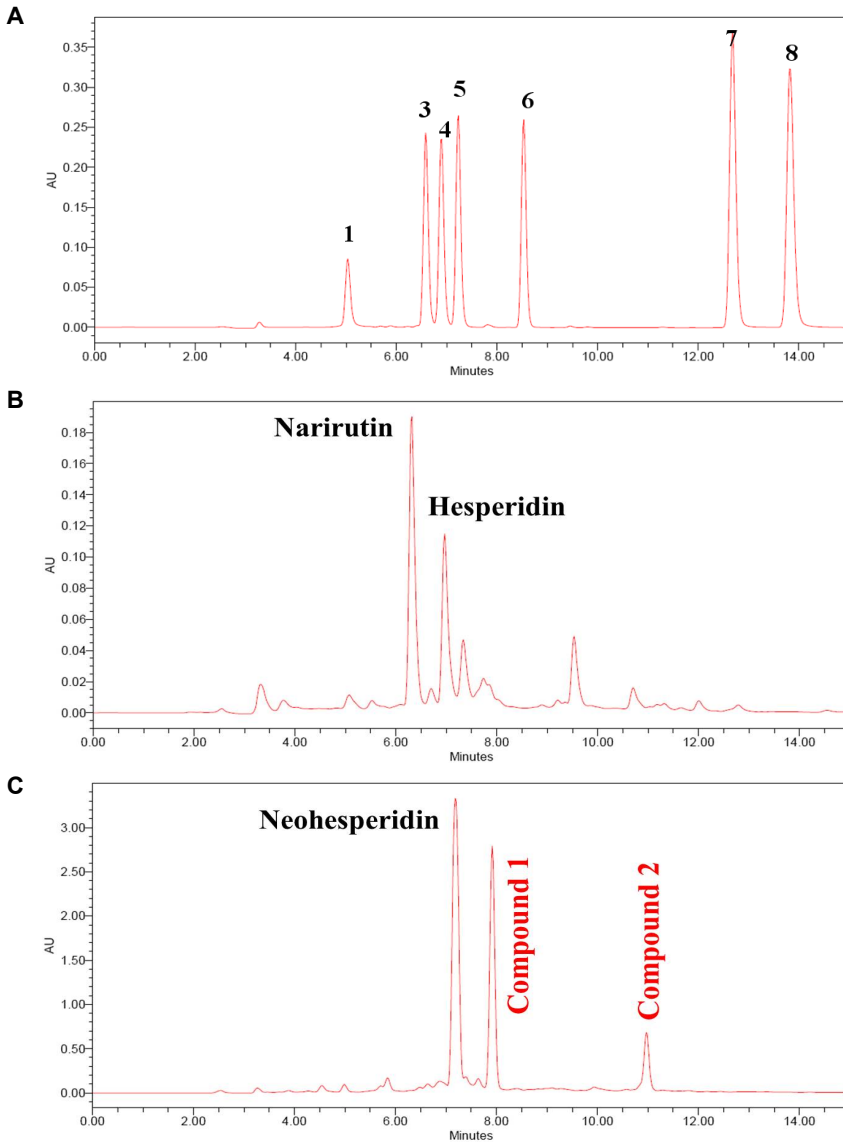


Fig. 1. HPLC chromatogram of Citrus unshiu peels fermented with *Aspergillus niger*. YMC Pro C18 RS (180×4.6 mm) column, flow rate: 1ml/min, detection at UV 280nm, mobile phase: water with 1% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B), gradient elution started with 20% of B, increased to 40% in 8min, and maintained to 40% in 15min. (A) Standard compounds: 1; rutin, 2; narirutin, 3; naringin, 4; hesperidin, 5; neohesperidin, 6; neohesperetin, 7; naringenin, 8; hesperetin; (B) Non-fermented citrus peels; (C) Fermented citrus peel with *A. niger* for 5 days.

효과를 보였고, 반면에 감귤과피 발효 전 추출물은 IL-6의 생성 억제 효과가 전혀 나타나지 않았다. 따라서, TNF- α 와 IL-6의 생성량이 감귤과피 추출물에 비하여 감귤과피 발효 추출물 처리구에서 가장 낮게 나타나 감귤과피 발효를 통하여 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 생성이 억제되는 것을 확인하였다.

고 찰

감귤과피에는 carotenoid 류, bioflavonoid 류, pectin 및 terpene 류가 과육보다 풍부하게 함유되어 있다[9]. 그러나 이러한 중요한 기능성 물질들을 함유하고 있는 감귤과피는 그 일부가 한약재로 쓰이는 것 외에는 대부분 자연에 투기 또는 방치됨으로써 환경오염 문제가 심각하게 대두되고 있다. 최근에는 가축 사료나 토양 비료로 이용하는 등 다양한 시도가

이루어지고 있으나 아직 미비한 실정이며 이를 좀 더 효율적이고 친환경적으로 해결하고자 많은 연구가 수행되고 있다.

감귤류가 다량으로 함유하고 있는 flavonoids는 대부분 당과 결합된 배당체 형태인 naringin, hesperidin 등으로 존재하고 있으며, 이 물질들은 무배당체 형태의 naringenin, hesperetin에 비해 생리활성이 낮은 것으로 알려져 있어, 당분해효소 등을 이용하여 무배당체 형태의 flavonoids로 생물전환하려는 다양한 연구가 보고되고 있다[1, 19]. 따라서 본 연구에서는 발효 미생물 *A. niger*를 이용하여 배당체 형태의 flavonoid 화합물을 무배당체 형태로 전환함과 동시에 새롭게 생성된 유효 성분을 탐색하고자 하였다. 감귤과피 발효에 사용된 *A. niger*는 주로 식품가공에 쓰이고 있으나 구연산 제조나 일부 약품생산에도 유용하게 이용되고 있어[16] 온주밀감의 과피 발효에 사용하여 온주밀감 과피의 성분변화와 염증 억제 효과 증대 여부를 확인하고자 하였다.

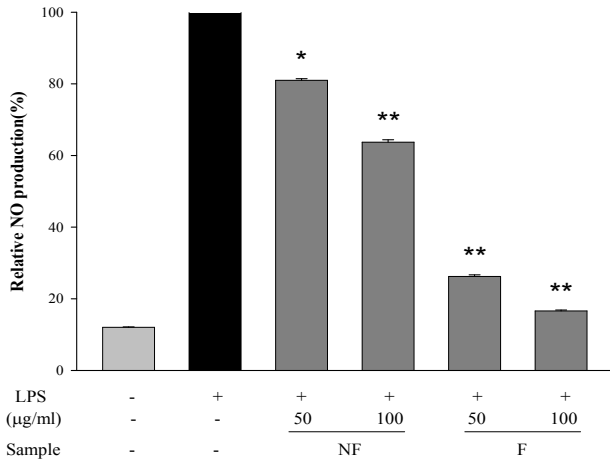


Fig. 2. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented unshu peels with *A. niger* on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with EtOAc extract and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. NO production was determined by Griess reagent. LPS (-): PBS without LPS, LPS (+): PBS with LPS, NF: EtOAc extract from non-fermented citrus peels, F: EtOAc extract from fermented citrus peels. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus LPS alone.

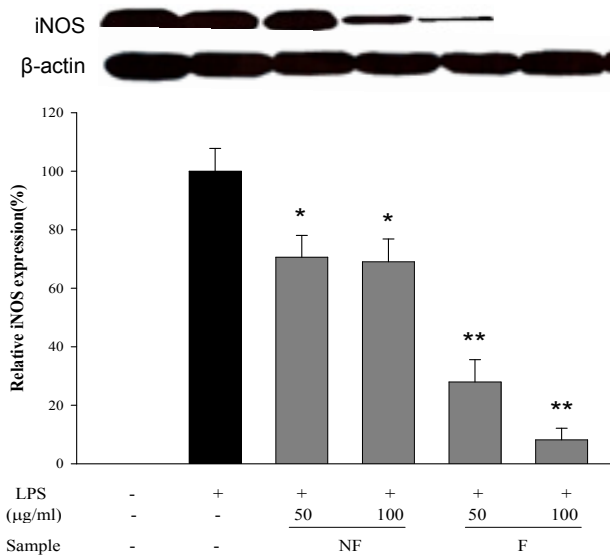


Fig. 3. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented unshu peels with *A. niger* on the expression of inducible nitric oxide synthases (iNOS) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with EtOAc extract and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. Total protein were resolved by SDS-PAGE and protein expressions were determined by Western blot analysis. LPS (-): PBS without LPS, LPS (+): PBS with LPS, NF: EtOAc extract from non-fermented citrus peels, F: EtOAc extract from fermented citrus peels. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus LPS alone.

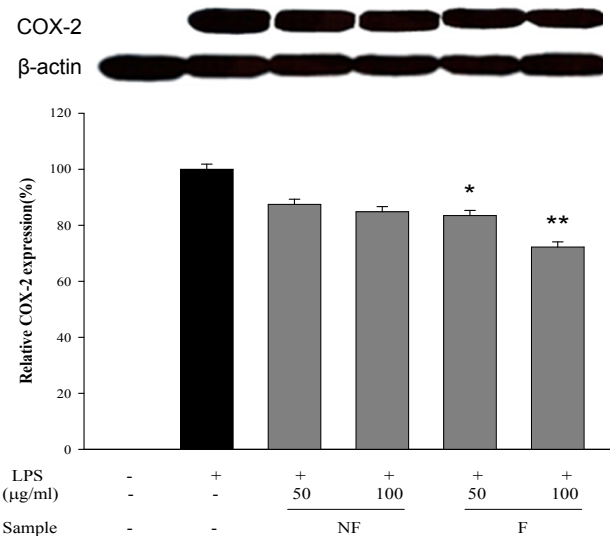


Fig. 4. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented unshu peels with *A. niger* on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with EtOAc extract and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. Total protein were resolved by SDS-PAGE and protein expressions were determined by Western blot analysis. LPS (-): PBS without LPS, LPS (+): PBS with LPS, NF: EtOAc extract from non-fermented citrus peels, F: EtOAc extract from fermented citrus peels. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus LPS alone.

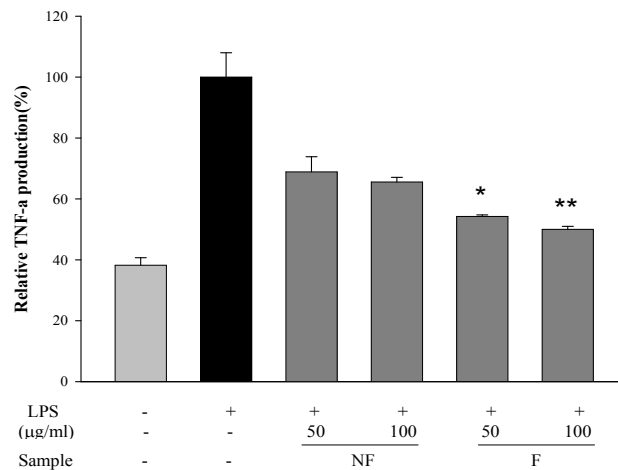


Fig. 5. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented unshu peels with *A. niger* on the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with EtOAc extract and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The concentrations of TNF- α was measured by ELISA. LPS (-): PBS without LPS, LPS (+): PBS with LPS, NF: EtOAc extract from non-fermented citrus peels, F: EtOAc extract from fermented citrus peels. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus LPS alone.

감귤과피 발효를 통한 생리활성 물질의 함량 및 성분 차이를 확인하기 위하여 HPLC를 통하여 감귤과피 발효 전, 후의 추출물 성분을 분석하였다. 감귤류의 과피에는 naringenin과 hesperidin의 함량이 가장 많은 것으로 알려져 있는데[6], 본 연구의 실험 재료인 온주밀감 과피에서는 hesperidin과 더불어 narirutin 함량이 높게 나타났다[4, 20]. 이러한 물질의 함량은 발효가 진행됨에 따라 점점 감소하는 경향을 나타내었으며, 발효 5일 후에는 neohesperidin의 함량이 급격하게 증가하였고, 감귤과피 발효 전에는 존재하지 않았던 새로운 2개의 물질을 확인하였다.

감귤에 함유되어 있는 hesperidin 또는 naringin은 항염활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며[9], 본 연구에서도 대조군인 감귤과피 뿐만 아니라 감귤과피 발효물 처리군에서 높은 NO 생성량 억제 효과를 나타내었다. 또한, 대식세포는 LPS로 자극시키면 다양한 염증인자들이 증가되는데, 이 염증반응에 감귤발효 추출물을 처리했을 때 iNOS, TNF- α 와 같은 염증인자들이 유의적으로 감소되는 결과를 확인하였다. iNOS에 의해 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있는데, 이러한 NO 생성은 LPS를 처리군에 비하여 감귤과피발효물에 의해 최대 80% 이상 감소되었으며, iNOS 단백질 발현도 90% 이상 억제되었다.

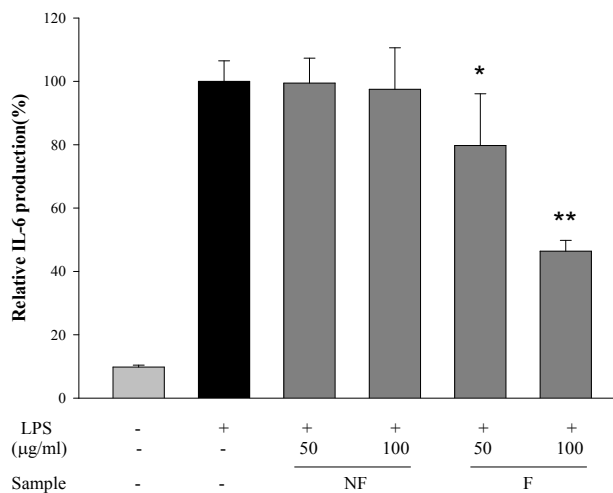


Fig. 6. Inhibitory effects of EtOAc extracts from fermented unshu peels with *A. niger* on the production of interleukin-6 (IL-6) in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with EtOAc extract and LPS (1 µg/ml) for 24hr. The concentrations of IL-6 were measured by ELISA. LPS (-): PBS without LPS, LPS (+): PBS with LPS, NF: EtOAc extract from non-fermented citrus peels, F: EtOAc extract from fermented citrus peels. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus LPS alone.

뿐만 아니라, COX-2는 염증반응에 관여하는 PGE₂를 생성하는데 이러한 COX-2 단백질 발현의 경우에도 감귤과피 발효물 처리군에서 유의적으로 감소하였고, 염증성 cytokine (TNF- α , IL-6) 생성도 효과적으로 억제되었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성을 저해하는 효과보다는 발효 감귤추출물이 iNOS의 발현을 억제하여 염증반응과 관련된 NO의 생산을 억제시키는 효과가 나타나는 것으로 여겨진다.

따라서, *A. niger*를 이용한 감귤과피 발효추출물이 감귤과피 추출물에 비해 항염 효과가 높게 나타났으며, 이는 *A. niger*의 생물전환을 통해 생합성된 compound 1, compound 2 (Fig. 1C) 혹은 HPLC 분석결과에는 제시되지 않은 미량의 전환 물질 등에 의한 것으로 추측된다. 이를 증명하기 위하여 추후 *A. niger*를 이용한 감귤과피의 대량배양과 추출을 통해 새롭게 생합성된 물질의 분리·정제 및 구조분석을 통해 감귤과피 발효물의 항염증 효과와의 연관관계 및 그 기전을 밝혀 폐기물로 처리되는 감귤과피 발효를 통해 기능성 소재로 개발하기 위한 기본적인 효능연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구개발사업으로 수행되었음.

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.
- Bae, D. S., Kim, C. Y. and Lee, J. K. 2012. Anti-inflammatory effects of dehydrogeijerin in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol* **14**, 734-739.
- Benayente-García, O. and Castillo, J. 2008. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* **56**, 6185-6205.
- Cheigh, C. I., Chung, E. Y. and Chung, M. S. 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *J Food Eng* **110**, 472-477.
- Cho, J. S. 2006. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharm Res* **29**, 699-706.
- Choi, S. Y., Ko, H. C., Ko, S. Y., Hwang, J. H., Park, J. G., Kang, S. H., Han, S. H., Yun, S. H. and Kim, S. J. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* **30**, 772-778.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U. and Caristi,

- C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* **12**, 1641-1673.
8. Habauzit, V., Nielsen, I. L., Gil-Izquierdo, A., Trzeciakiewicz, A., Morand, C., Chee, W., Barron, D., Lebecque, P., Davicco, M. J., Williamson, G., Offord, E., Coxam, V. and Horcajada, M. N. 2009. Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. *Br J Nutr* **102**, 976-984.
9. Huang, Y. S. and Ho, S. C. 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chem* **119**, 868-873.
10. Kang, S. R., Park, K. I., Park, H. S., Lee, D. H., Kim, J. A., Nagappan, A., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Park, M. K., Han, D. Y. and Kim, G. S. 2011. Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chem* **129**, 1721-1728.
11. Kim, K. H., Moon, E., Choi, S. U., Kim, S. Y. and Lee, K. R. 2013. Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **92**, 113-121.
12. Kim, Y. D., Ko, W. J., Koh, K. S., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr* **42**, 278-290.
13. Lee, J. H., An, H. J., Lee, S. Y., Choi, Y. H., Lim, B. S. and Kang, Y. J. 2009. Change in quality characteristics of 'setoka' (*Citrus spp*) using different storage methods. *Korean J Food Preserv* **16**, 644-649.
14. Lee, S., Ra, J., Song, J. Y., Gwak, C., Kwon, H. J., Yim, S. V., Hong, S. P., Kim, J., Lee, K. H., Cho, J. J., Park, Y. S., Park, C. S. and Ahn, H. J. 2011. Extracts from *Citrus unshiu* promote immunemediated inhibition of tumor growth in a murine renal cell carcinoma model. *J Ethnopharmacol* **133**, 973-979.
15. Li, S., Pan, M. H., Lo, C. Y., Tan, D., Wang, Y., Shahidi, F. and Ho, C. T. 2009. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J Funct Foods* **1**, 2-12.
16. Rodrigues, C., Souza Bandenberghe, L. P., Teodoro, J., Pandey, A. and Soccol, C. R. 2009. Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. *Appl Biochem Biotechnol* **158**, 72-87.
17. Shih, M. F., Cheng, Y. D., Shen, C. R. and Cherng, J. Y. 2010. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L.0 on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *J Nat Med* **64**, 330-335.
18. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. and Margioris, A. N. 2006. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1654-1661.
19. Xiao, J., Muzashvili, T. S. and Georgiev, M. I. 2014. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnol Adv In press*, 53-56.
20. Yang, Y. T., Kim, M. S., Hyun, K. H., Kim, Y. C. and Koh, J. S. 2008. Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake. *Korean J Food Preserv* **15**, 94-98.

초록 : *Aspergillus niger*로 발효한 감귤과피 추출물의 항염효과

이선이¹ · 현주미¹ · 김상숙¹ · 박석만¹ · 박경진¹ · 최영훈¹ · 김상현^{2,3} · 유선녕² · 안순철^{2,3*}

(¹농촌진흥청 국립원예특작과학원, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ³부산대학교 Brain Busan 21 면역조절치료소재 연구인력양성사업단)

본 연구에서는 미생물을 이용하여 감귤과피 발효를 실시하고, 발효 추출물의 생리활성 변화를 확인하였다. 분말화시킨 온주밀감 과피에 *Aspergillus niger*를 첨가하고 5일간 진탕 배양하고 감귤발효물을 ethyl acetate로 추출하였다. 대조구는 발효 전 감귤과피 추출물을 사용하였으며, 각 추출물의 성분변화는 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과, neohesperidin 함량이 현저히 증가하면서, 발효에 의해 compound 1, 2가 생합성되었다. 감귤발효 추출물의 항염 활성은 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 macrophage cell에서 확인하였다. 감귤발효 추출물이 대조군에 비해 NO (Nitric oxide) 생성이 유의적으로 감소하였으며, 염증반응과 관련된 단백질 iNOS와 COX-2의 발현도 감귤발효 추출물에서 유의적으로 감소하였다. 감귤발효 추출물은 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-6 생성을 억제하는 효과도 나타내었다. 본 연구 결과를 통하여 감귤 과피의 flavonoid 배당체 화합물들을 aglycone 형태로 전환함과 동시에 유효 생리활성 성분의 효능을 증대시켜 부산물로서 발생하는 감귤의 새로운 활용 방안으로 기대된다.