

## 무독화한 옷발효초가 고지방식이를 급여한 흰쥐에 미치는 항비만 효과

정소라<sup>1</sup> · 김란선<sup>1</sup> · 박유경<sup>1</sup> · 백성열<sup>2</sup> · 여수환<sup>2</sup> · 이충환<sup>3</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

<sup>2</sup>국립농업과학원 발효식품과

<sup>3</sup>건국대학교 생명공학과

### Anti-Obesity Effect of Fermented Detoxified *Rhus verniciflua* Vinegar Supplementation in Diet-Induced Obese Rats

So Ra Cheong<sup>1</sup>, Ranseon Kim<sup>1</sup>, Yoo Kyoung Park<sup>1</sup>, SeongYeol Baek<sup>2</sup>,  
Soo-Hwan Yeo<sup>2</sup>, and ChoongHwan Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

<sup>2</sup>Fermented Food Science Division, Department of Agro-food Resource, NAAS, RDA

<sup>3</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University

**ABSTRACT** The study aimed to investigate the anti-obesity effects of 1% *Rhus verniciflua* vinegar (RV) supplementation in high-fat-diet (60% fat)-induced obese rats. A total of 50 4-wk-old male Sprague-Dawley rats were fed normal chow diet or maintained on high-fat diet (HFD) for 12 weeks to induce obesity and were then randomized into five groups as follows: normal diet+ultra-pure water (CON), HFD+ultra-pure water (OB-DW), HFD+1% acetic acid (OB-AA), HFD+1% RV (OB-RV), and HFD+0.1% caffeine (OB-CF). AA was used as a control for RV, and caffeine was used as a positive control due to its weight reducing effect. After 2 months, body weight, organ and adipose tissue weights, serum lipids, hepatic lipids, adipocyte size, and cell number per spot level were analyzed. As a result, food efficiency ratio, abdominal adipose tissue weight, serum levels of total cholesterol, triacylglycerol, free fatty acids, coronary artery index, and fecal lipid were significantly reduced in the RV treatment group. In this study, we found that dietary RV improved obesity by increasing lipid excretion and reducing lipogenesis. These results suggest that RV has potential as a functional anti-obesity food.

**Key words:** *Rhus verniciflua* vinegar, Korean tradition vinegar, high-fat diet fed rat, blood lipid, anti-obesity

## 서 론

식초는 기원전 약 3000년부터 동서양을 막론하고 조미료로 이용된 전통발효 식품으로(1,2), 초산을 포함하여 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산 및 에스테르 등을 함유하고 있다(3). 또한 최근에 식초의 항암, 항돌연변이, 항노화, 면역 등의 효과가 알려지면서 조미료뿐만 아니라 건강용 식품으로도 관심이 높아지고 있다(4). 식초는 함유된 원료 및 발효와 숙성 방법에 따라 각종 맛 성분과 향미 성분의 차이가 생길 수 있는데, 알코올 발효와 초산 발효 과정을 이용하여 생산된 전통 발효 식초는 알코올 발효를 거치지 않은 시판 상업용 식초에 비해 발효 공정 시 곰팡이, 효모, 박테리아를 포함한 다양한 종류의 유기체들에 의해 식초의 맛과 향을

풍부하게 하는 다양한 대사 화합물을 생성한다(5).

옷(*Rhus verniciflua*)은 중국, 일본, 한국 등 여러 아시아 국가에서 재배되는 약용 나무로 발한제, 배변, 항바이러스, 진정제 및 항류마티스 활동과 약용 성분이 포함되어 있어 여러 건강식품과 허브 치료제 및 식품 첨가제로 사용되어 왔다(6,7). 우리나라에서 옷나무 껍질은 당뇨병(8) 및 위장병(9)을 치료하기 위한 한약재로 이용되어 왔으며, 옷담이나 옷오리 등의 형태로 식품에 첨가하여 섭취하여 왔다. 옷에 함유된 폴리페놀 및 플라보노이드 성분은 항산화(10-12), 항돌연변이(13), 항염증(14,15) 및 항균과  $\alpha$ -glucosidase 억제 효과(16) 등이 있는 것으로 나타났으나, 옷의 주성분인 urushiol은 수포, 가려움, 발진 등의 접촉성 피부염을 유발하므로 식품으로서의 활용이 제한적이다(17,18). 발효 옷 추출물은 urushiol의 약리활성을 유지시키면서 독성유발 성분이 제거되었을 뿐 아니라 폴리페놀과 플라보노이드 성분 및 필수 아미노산과 다양한 유리 아미노산을 함유하고 있음이 밝혀진 바 있어 옷 추출물을 이용한 다양한 발효식품 개발이 필요한 실정이다(19).

Received 8 September 2015; Accepted 6 October 2015

Corresponding author: Yoo Kyoung Park, Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi-do 17104, Korea  
E-mail: ypark@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3816

비만의 유병률은 전 세계적으로 점점 증가하고 있으며 (20), 현재 우리나라 또한 생활 패턴의 서구화 및 운동 부족, 스트레스 등의 여러 요인으로 비만의 유병률이 점점 증가하고 있다(21). 비만은 외관상의 문제뿐 아니라 관상동맥 질환, 고혈압, 고지혈증, 제2형 당뇨병 등의 대사성 질환과 유방암, 대장암, 췌장암 등 각종 질병의 이환율을 증가시킨다고 보고된 바 있다(22,23). 각종 비만약물치료제가 개발되고 있으나 위장장애, 복부 팽만, 구갈, 변비, 혈압 상승 등의 부작용을 야기하므로 최근에는 화학성분보다는 천연물을 기반으로 한 안정성을 갖춘 건강기능식품과 특수용도식품 산업이 활성화되고 있는 추세이다(24,25). 그중 식초는 항암, 심혈관 보호, 항종양 효과 및 혈당 강하 등 여러 질병에 효능이 있다고 알려져 있으며(26), 식초를 섭취한 쥐에서 콜레스테롤의 혈장 수준을 감소시키고 간 손상, 고지혈증, 당뇨병 등의 방지 효과가 입증된 바 있다(27-29).

이에 본 연구는 발효식초가 항비만 기능이 있는 것으로 여겨지고 있으나 실제 항비만 기능성 연구는 전무한 실정이므로 발효를 통해 무독화된 율발효식초의 항비만 천연소재로서의 가능성을 검증해보고자 하였다. 비만치료제에 다량 함유되어 있는 카페인을 양성대조군으로 설정하여 비교하였으며, 빙초산은 발효 율 성분인 어떤 효능을 나타내는지 비교하기 위한 대조군으로 설정하여 실험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

율식초(*Rhus verniciflua* vinegar, RV)를 생성하기 위해 무독화한 율 추출물을 물과 동일한 양으로 혼합하고 10일 동안 30°C에서 설탕을 첨가하여 최종 25°Brix 농도로 맞추고 후 알코올 발효를 실시하였다. 알코올 발효 완료 후 6% 알코올로 30°C에서 14일 동안 초산 발효를 하여 최종산도 5.60% 식초를 제조하였다. 무독화된 율발효식초는 농촌진흥청에서 제공받았으며, 모든 실험시료는 실험 종료 시까지 4°C에서 보관하였다.

식초 샘플의 총 폴리페놀(total polyphenol, TP) 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 분석하였다(30). 20 µL의 시료에 0.2 N의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하고, 5분 후에 7.5% NaCO<sub>3</sub> 용액 80 mL를 가하였다. 어두운 곳에서 60분 동안 배양 혼합물에 첨가한 후 microplate reader(Spectronic Genesys 6, Thermo Electron, Madison, WI, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid 표준곡선( $y=0.0535x+0.0463$ ,  $R^2=0.9999$ )으로부터 100 mL 중의 mg gallic acid equivalents로 나타내었다.

총 플라보노이드(total flavonoid, TF)의 함량은 Lee 등(31)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 흡광도는 microplate reader(Spectronic Genesys 6, Thermo Electron)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의

**Table 1.** Total carotenoid and total polyphenol contents of OB-RV (mg/100 mL)

| <i>Rhus verniciflua</i> vinegar |            |
|---------------------------------|------------|
| Total phenolic content          | 26.61±0.17 |
| Total flavonoid content         | 2.97±0.17  |

Data values represents the mean±SD (n=3).

총 플라보노이드 함량은 naringin 표준곡선( $y=0.0239x+0.0355$ ,  $R^2=0.9992$ )으로부터 100 mL 중의 mg naringin equivalents로 나타내었다. 각 실험은 3회 반복하여 얻은 결과를 평균과 표준편차로 나타내었다(Table 1).

### 동물 및 식이

실험동물은 생후 4주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰 쥐(n=50)를 (주)대한바이오링크(Chungbuk, Korea)에서 구입하였고, 1주일간 적응시킨 후 정상식이군(CON)에게는 일반식이[Harlan 2018S(3.1 kcal/g, 44.2% carbohydrate, 18.6% protein, 6.2% fat; Harlan, Indianapolis, IN, USA)]를, 실험군은 고지방식이[60% kcal% fat, lard; 5.1 kcal/g, kcal%: carbohydrate 21.3%, fat 60.3%, protein 18.4%; diet(TD.06414, Harlan)]를 공급하여 12주간 비만유도를 실행하였다. 대조군과 비만군이 통계적으로 유의성을 나타낸 것은 비만군의 평균 체중이 대조군보다 10% 이상 체중이 증가된 이후였으므로 비만유도 종료 후 고지방식이(high fat diet, HFD)를 섭취한 그룹에서 대조군의 최대값의 10% 이상 체중이 증가된 실험동물을 취하여 난괴법에 의해 10마리씩 5군으로 나누어 실험에 사용하였으며, 고지방식사와 증류수를 섭취시킨 OB-DW군과 고지방식사와 1% 빙초산(Woosung Food Co., Gimpo, Korea)을 음용한 OB-AA군, 고지방식사와 1% 율식초를 음용한 OB-RV군, 고지방식사와 1% 카페인(CAS No. 58-08-2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 음용한 OB-CF군으로 나누어 해당 식이로 10주간 사육하였다. 해당 시료는 3차 증류수로 희석하여 음용수로 주었으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고 모든 실험식이는 사육기간 동안 냉장 보관하였다. 체중은 1주일에 두 번씩 일정시간에 측정하였으며, 식이섭취량은 실험기간 동안 매일 일정시간에 측정 후 급여량에서 잔량을 감하여 계산하였다. 동물사육실의 환경은 항온(24±2°C), 항습(55±5%)과 12시간 광주기(08:00~20:00)로 일정한 조건을 유지하였다. 동물사육은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호 KHUASP(SE)14-19).

### 시료 채취

실험 종료 시 실험동물은 12시간 절식시킨 후 희생하였으며, 혈청은 2,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리 한 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 간, 고환, 신장, 비장, 복부지방, 생식기지방, 내장지방 및 피하지

방은 채혈 후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거하여 중량을 측정하고 액화질소에서 급 냉동한 후 분석 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다. 생식기지방은 부고환 주위에 축적된 지방조직을 적출하였고, 내장지방은 장간막 사이에 있는 지방을, 복부지방은 신장 주위 및 복막하 부분에 축적된 지방조직을 적출하였으며, 피하지방은 귀의 견갑골 주위에 있는 지방을 적출하였다. 분변의 수집은 실험종료 일주일 전에 12시간 절식 후 대사케이지를 사용하여 수집하였으며, 그 기간 동안 음용수는 제한 없이 제공하였으나 식이는 제공하지 않았다. 분변은 수집 후 분석 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다.

**혈액 및 생화학 분석**

혈청의 중성지방(triglyceride, TG), 총콜레스테롤(total cholesterol, TC)과 HDL-cholesterol(HDL-C)은 표준 효소비색법에 의한 kit(Asan Pharm., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며, LDL-cholesterol(LDL-C)은 Friedewald 식[ $LDL-C=TC-(1/5TG+HDL-C)$ ]에 의하여 산출하였고(32), 유리지방산(free fatty acid)은 NEFA-HR II (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다. 심혈관 질환의 유병율과 관련이 있는 심장동맥경화지수(CRI=total cholesterol/ HDL-cholesterol)를 산출하였다(33).

간의 중성지방과 총콜레스테롤, 분변의 중성지방은 Folch 등(34)의 방법에 의해 지질을 추출한 후, 표준 효소비색법에 의한 kit(Asan Pharm.)을 사용하여 측정하였다.

글리세롤-3-포스페이트 탈수소 효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 활성은 복부지방조직을 0°C에서 200 μL의 GPDH 분석 완충액으로 균질화한 후, 5분 동안 12,000 rpm에서 원심분리 시키고 상등액을 수거한 다음 비색 분석 kit(BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

지단백질 리파아제(lipoprotein lipase, LPL) 활성은 복부지방조직을 0°C에서 20 mM Tris buffer(pH 7.5, 150 mM NaCl) 1 mL의 완충액으로 균질화한 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 시키고 상등액을 수거하여 정량적 형광 분석법 kit(Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 효소 활성 측정을 위한 단백질의 함량은 bovine serum albumin(BSA)(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 단백질 표준곡선을 작성하고 효소원 분획물의 단백질 함량을 각각 계산하였다.

**지방조직 분석**

적출한 복부지방조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 조직절편기로 6 μm 두께로 절단한 다음 polylysine으로 coating 된 slide에 붙였다. 조직절편은 xylen을 이용하여 paraffin을 제거하고 alcohol과 증류수로 10분간 함수시켜

증류수로 세척한 후, 지방구의 크기를 관찰하기 위해 H&E (hematoxylin&eosin) 염색을 실시하였다. 복부지방은 Carl-Zeiss Axiovert s100(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 형광 현미경으로 촬영하였으며, 지방 세포의 개수는 Image J software(ImageJ version 1.47, Sun Microsystems Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하였으며(35), 지방 세포의 평균 크기는 Image J software 경계면적당 개수로 나누어 계산하였다(36).

**통계처리**

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 21.0 프로그램(IBM-SPSS, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 평균치와 표준편차를 구하였다. 실험군 간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Tukey's multiple range test를 이용하여 사후 검증하였으며  $P<0.05$  수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**체중 변화, 식이섭취량, 식이효율 및 장기 무게**

실험기간 동안 체중 변화, 식이섭취량, 식이효율 및 장기 무게는 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 실험 시작 시 체중은 군들 간에 유의적 차이가 없었으나 12주 고지방식을 공급한 군(OB)들이 정상식이군(CON)에 비해 유의적으로 체중이 증가되어 비만이 유도되었음을 확인할 수 있었고 ( $P<0.05$ ), 실험 종료 시 최종 체중은 CON이 OB-DW군과 비교하여 23.2%가 낮았으며, OB-AA, OB-RV, OB-CF군은 OB-DW군과 비교하여 각각 6.5%, 6.7%, 14.9% 감소하였고 OB-CF군에서 유의적으로 낮았다( $P<0.05$ ). 식이섭취량은 고지방식이군들이 CON군보다 낮았으며, 식이효율은 OB-DW군과 비교하여 모든 군에서 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ )(Table 2). 이러한 결과는 산사발효초를 급여한 Chon 등(37)의 연구 결과에서도 최종 체중과 식이효율이 유의적으로 감소한 바 있다. 또한 Jeon 등(38)의 연구에 따르면 비만이 유도된 생쥐에 웃나무 추출물을 경구투여 하였을 때 비만치료제의 하나인 Xenical과 비슷한 정도의 체중 감소가 나타났으며, 실험 종료 시 체중은 웃 추출물을 투여한 군이 Xenical을 투여한 군에 비해 체중 감소에 유의성을 나타내어 웃 추출물이 체중 증가 억제제로서의 개발 가능성이 있음을 밝혀낸 바 있다.

귀의 장기 무게는 정상식이군(CON)과 고지방식이군(OB)에서 일반적으로 유사하였으나, OB-CF군의 신장 무게는 다른 그룹에 비해 현저하게 높았다(Table 3). 지방 조직의 중량은 모든 항목에서 CON이 OB-DW군과 비교하여 유의성 있게 낮았다( $P<0.05$ ). 총 지방 조직 중량은 OB-DW군과 비교하여 OB-CF군에서 유의성 있게 낮았으며( $P<0.05$ ), 복부지방 무게는 OB-DW군과 비교하여 OB-RV 및 OB-CF군에서 유의성 있게 낮았다( $P<0.05$ ).

**Table 2.** Body weight, food intake, caloric intake, and food efficiency ratio of the rats

|                               | CON <sup>1)</sup>         | OB-DW <sup>2)</sup>       | OB-AA <sup>3)</sup>        | OB-RV <sup>4)</sup>        | OB-CF <sup>5)</sup>        |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Weight (g)                    |                           |                           |                            |                            |                            |
| 0 week                        | 142.77±4.72               | 146.91±6.31               | 145.16±7.07                | 145.42±5.78                | 144.11±6.57                |
| 12th weeks (start supplement) | 502.63±20.43 <sup>b</sup> | 628.55±46.22 <sup>a</sup> | 628.61±47.65 <sup>a</sup>  | 628.28±44.84 <sup>a</sup>  | 628.79±46.36 <sup>a</sup>  |
| 21th weeks (end supplement)   | 573.95±42.68 <sup>c</sup> | 747.74±69.70 <sup>a</sup> | 699.26±65.41 <sup>ab</sup> | 697.84±63.01 <sup>ab</sup> | 636.30±51.58 <sup>bc</sup> |
| Weight gain <sup>6)</sup>     | 71.32±22.22 <sup>b</sup>  | 116.38±21.52 <sup>a</sup> | 73.99±11.31 <sup>b</sup>   | 80.33±15.07 <sup>b</sup>   | 17.48±10.23 <sup>c</sup>   |
| Intake                        |                           |                           |                            |                            |                            |
| Food intake (g/d)             | 46.36±3.79 <sup>a</sup>   | 37.88±1.72 <sup>b</sup>   | 34.83±2.71 <sup>b</sup>    | 34.43±2.55 <sup>b</sup>    | 33.14±2.48 <sup>b</sup>    |
| Calories intake (kcal/d)      | 143.71±11.74 <sup>b</sup> | 193.15±8.80 <sup>a</sup>  | 177.61±13.82 <sup>a</sup>  | 176.60±13.00 <sup>a</sup>  | 168.99±12.66 <sup>a</sup>  |
| FER (%) <sup>7)</sup>         | 1.35±0.42 <sup>bc</sup>   | 2.67±0.78 <sup>a</sup>    | 1.74±0.60 <sup>b</sup>     | 1.82±0.43 <sup>b</sup>     | 0.81±0.28 <sup>c</sup>     |

<sup>1)</sup>CON: normal diet (Harlan 2018s)+distilled water (n=10).

<sup>2)</sup>OB-DW: 60% high fat diet+distilled water (n=9).

<sup>3)</sup>OB-AA: 60% high fat diet+1% acetic acid (AA) (n=10).

<sup>4)</sup>OB-RV: 60% high fat diet+1% *Rhus verniciflua* vinegar (RV) (n=10).

<sup>5)</sup>OB-CF: 60% high fat diet+0.1% caffeine solution (n=10).

<sup>6)</sup>Weight gain (g)=12th weeks body weight (g)–21th weeks body weight (g).

<sup>7)</sup>FER (food efficiency ratio)=[weight gain (g)/d]/ [food consumed (kcal)/d].

Data are mean±SD. Statistical differences between experimental groups are based on one-way ANOVA and Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

**Table 3.** Organ weights after *Rhus verniciflua* vinegar supplementation

|                          | CON <sup>1)</sup>        | OB-DW                     | OB-AA                     | OB-RV                    | OB-CF                    |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Organ weights (g)        |                          |                           |                           |                          |                          |
| Liver                    | 14.57±1.65               | 16.60±2.31                | 15.75±1.83                | 15.59±1.90               | 16.06±2.83               |
| Spleen                   | 0.93±0.15                | 0.99±0.12                 | 1.02±0.17                 | 0.98±0.14                | 0.87±0.16                |
| Kidney                   | 3.11±0.35 <sup>b</sup>   | 3.52±0.30 <sup>ab</sup>   | 3.56±0.32 <sup>ab</sup>   | 3.44±0.27 <sup>b</sup>   | 3.90±0.65 <sup>a</sup>   |
| Testis                   | 4.18±0.26                | 4.04±0.25                 | 4.18±0.48                 | 3.93±0.36                | 3.80±0.24                |
| White adipose tissue (g) |                          |                           |                           |                          |                          |
| Visceral                 | 9.16±3.27 <sup>b</sup>   | 21.83±5.72 <sup>a</sup>   | 21.72±4.24 <sup>a</sup>   | 21.22±3.77 <sup>a</sup>  | 13.87±2.58 <sup>b</sup>  |
| Subcutaneous             | 10.48±3.73 <sup>c</sup>  | 26.03±7.10 <sup>a</sup>   | 25.26±2.84 <sup>a</sup>   | 24.74±4.52 <sup>ab</sup> | 14.83±2.43 <sup>bc</sup> |
| Testes                   | 13.93±4.88 <sup>b</sup>  | 26.93±8.41 <sup>a</sup>   | 24.55±2.92 <sup>a</sup>   | 33.71±6.42 <sup>a</sup>  | 17.42±3.39 <sup>b</sup>  |
| Abdominal                | 12.99±5.75 <sup>c</sup>  | 43.33±9.44 <sup>a</sup>   | 40.39±6.62 <sup>a</sup>   | 30.77±5.80 <sup>b</sup>  | 18.66±4.76 <sup>c</sup>  |
| Total                    | 46.56±15.34 <sup>b</sup> | 118.11±22.53 <sup>a</sup> | 111.04±10.41 <sup>a</sup> | 96.89±15.85 <sup>a</sup> | 64.78±11.16 <sup>b</sup> |

<sup>1)</sup>Groups are the same as Table 2.

Data are mean±SD. Statistical differences between experimental groups are based on one-way ANOVA and Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

본 연구의 결과에 따르면 항비만 효과에 대한 양성 대조군으로 사용된 카페인은 최종 체중 및 지방 조직 중량이 감소하는 등 뚜렷한 항비만 효과를 나타냈다. 카페인은 부신 수질에서 카테콜아민 분비를 자극하여 지방 산화를 촉진하여 체지방 감소 효과가 입증된 바 있으며, 각종 약물 및 체중감량 건강 보조 식품으로 널리 사용되고 있다(39,40). 하지만 카페인의 다량 복용 시 뇌나 근육을 자극하여 신경과민, 불안, 불면증 등을 유발할 뿐만 아니라 이노제로 작용하여 과도한 배설로 인해 각종 미네랄 결핍 및 신장 비대를 일으키는 수도 있는데(41–43), 본 연구 결과에서도 카페인을 음용한 군의 쥐들은 다른 군과 비교하여 신장 무게 증대가 나타났고, 이는 카페인 다량 복용에 따른 신장 비대로 사료된다.

### 혈청 및 간의 지질 농도 변화

혈청 및 간의 지질 농도 변화는 Table 4에 나타낸 바와 같이 TG, TC, LDL-C의 혈청농도와 CRI 값은 OB-DW군을 비교하여 CON군에서 유의하게 낮게 나타났으며( $P<0.05$ ),

HDL-C 및 free fatty acid 혈청농도에서는 OB-DW군을 비교하여 CON군에서 유의하게 높게 나타났다( $P<0.05$ ). TG 및 TC의 혈청 농도는 OB-DW군 비교하여 OB-RV 및 OB-CF군에서 유의성 있게 감소하였으며( $P<0.05$ ), HDL-C는 OB-DW군과 비교하여 OB-RV군에서 유의하게 높았다( $P<0.05$ ). LDL-C 혈청농도와 CRI 값은 OB-DW군과 비교하여 OB-AA, OB-RV 및 OB-CF군 모두에서 유의하게 낮았으며( $P<0.05$ ), 혈청 유리지방산의 농도는 OB-DW군과 비교하여 OB-RV군에서 21.4% 증가하여 유의적으로 높았다( $P<0.05$ ). 심장동맥경화지수(CRI=total cholesterol/ HDL-cholesterol)는 허혈성 심질환(IHD) 발생 위험 정도를 간단하게 나타낸 수치로(33) OB-DW군에 비해 OB-RV군에서 유의하게 낮았으며( $P<0.05$ ), 이는 윗식초가 비만 및 고지혈증, 고혈압, 심혈관 질환을 포함한 관련된 질환 발생 억제 효과가 있다는 것을 의미한다.

간의 TG 농도는 CON군과 비교하여 OB-DW군이 유의하게 높아( $P<0.05$ ) 지방간이 되었음을 확인할 수 있었으며,

**Table 4.** Effect of *Rhus verniciflua* vinegar on serum lipids, hepatic lipids, fecal lipid, and coronary artery index (CRI)

|                                 | CON <sup>1)</sup>        | OB-DW                     | OB-AA                      | OB-RV                    | OB-CF                     |
|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Serum</b>                    |                          |                           |                            |                          |                           |
| Total cholesterol (mg/dL)       | 88.31±18.58 <sup>b</sup> | 129.58±20.42 <sup>a</sup> | 94.20±25.81 <sup>ab</sup>  | 90.36±27.59 <sup>b</sup> | 89.39±23.21 <sup>b</sup>  |
| Triglyceride (mg/dL)            | 91.10±30.05 <sup>b</sup> | 136.06±38.38 <sup>a</sup> | 113.93±23.76 <sup>ab</sup> | 94.47±18.91 <sup>b</sup> | 83.99±24.61 <sup>b</sup>  |
| HDL-cholesterol (mg/dL)         | 57.64±15.13 <sup>a</sup> | 33.25±12.59 <sup>b</sup>  | 41.09±9.72 <sup>ab</sup>   | 54.80±15.26 <sup>a</sup> | 40.58±11.17 <sup>ab</sup> |
| LDL-cholesterol (mg/dL)         | 30.66±15.70 <sup>b</sup> | 69.84±17.64 <sup>a</sup>  | 32.99±22.52 <sup>b</sup>   | 31.95±20.49 <sup>b</sup> | 35.12±15.86 <sup>b</sup>  |
| Free fatty acid (mg/dL)         | 36.90±5.00 <sup>a</sup>  | 27.65±6.18 <sup>b</sup>   | 28.69±7.23 <sup>ab</sup>   | 33.57±5.32 <sup>ab</sup> | 35.06±6.95 <sup>ab</sup>  |
| CRI <sup>2)</sup>               | 1.57±0.45 <sup>b</sup>   | 3.59±1.10 <sup>a</sup>    | 2.15±0.72 <sup>b</sup>     | 2.03±0.59 <sup>b</sup>   | 2.11±0.78 <sup>b</sup>    |
| <b>Liver</b>                    |                          |                           |                            |                          |                           |
| Total cholesterol (µg/mg liver) | 2.90±0.65 <sup>b</sup>   | 5.14±1.21 <sup>a</sup>    | 3.63±1.05 <sup>ab</sup>    | 3.82±0.41 <sup>ab</sup>  | 3.08±1.39 <sup>b</sup>    |
| Triglyceride (µg/mg liver)      | 15.24±7.46 <sup>b</sup>  | 72.84±15.35 <sup>a</sup>  | 56.18±15.01 <sup>a</sup>   | 54.22±14.24 <sup>a</sup> | 25.71±18.68 <sup>b</sup>  |
| <b>Fecal</b>                    |                          |                           |                            |                          |                           |
| Triglyceride (µg/mg feces)      | 5.68±2.47 <sup>c</sup>   | 6.37±1.81 <sup>c</sup>    | 7.98±2.80 <sup>bc</sup>    | 11.86±1.33 <sup>ab</sup> | 12.92±3.12 <sup>a</sup>   |

<sup>1)</sup>Groups are the same as Table 2.

<sup>2)</sup>Coronary artery index (CRI)=total cholesterol/ HDL-cholesterol.

Data are mean±SD. Statistical differences between experimental groups are based on one-way ANOVA and Tukey's multiple range test at  $P<0.05$ .

OB-DW군과 비교하여 OB-AA군과 OB-RV군에서 24.3%, 30.9% 감소되었으나 유의성은 없었다. 간의 TC 농도 또한 CON군과 비교하여 OB-DW군이 유의하게 높았으며( $P<0.05$ ), OB-DW군과 비교하여 OB-CF군에서 유의성 있게 감소하였다( $P<0.05$ ). OB-AA군과 OB-RV군에서 각각 29.4%, 25.7% 감소되었으나 유의성은 없었다. 분변 지질 수준은 CON군과 OB-DW군의 수준은 유사했지만, OB-DW군과 비교하여 OB-RV군과 OB-CF군에서 유의하게 증가하였다( $P<0.05$ ).

본 연구의 결과에 따르면 OB-AA군과 OB-RV군에서 혈청과 간의 TG 농도가 감소되었는데, Fushimi 등(44)의 연구에서도 아세트산이 함유된 식이를 공급한 비만 쥐에서 혈청 및 간 TG의 농도가 유의적으로 감소되는 결과를 도출해 낸 바 있다. 식이로 공급된 아세트산은 아세틸-CoA로 변하면서 AMP의 생산이 증가되고 그에 따라 간세포 내의 AMP-활성 단백질 키나아제(AMP-activated protein kinase, AMPK)의 활성을 감소시켜 지방산과 스테롤의 합성을 억제하여 간과 혈청 지질의 농도를 감소시키는 역할을 한다(45, 46). 아세트산과 웃식초를 급여한 쥐에서 지질 감소 효과를 나타낸 것은 아세트산의 효능이라고 사료된다.

유리지방산 농도와 분변 내 지질 함량이 OB-RV군에서 높게 나타난 것은 Chon 등(37)의 연구와 동일한 결과로 산사발효초가 위장관 지질 흡수를 방해함으로써 지질을 제거하고 담즙산의 배설을 증가시킨 것이라고 보고된 바 있다. 본 연구에서도 웃식초 또한 위장관 지질 흡수를 억제하여 지질 배설이 증가된 것으로 사료된다. 소장에서 췌장 리파아제의 작용을 억제시켜 중성지방의 글리세롤과 지방산으로 분해되는 것을 막아 지방의 흡수를 억제하는 약물인 Orlistat이 개발된 바 있는데(47), 식품 내 폴리페놀과 플라보노이드가 Orlistat 작용과 유사하게 췌장 리파아제를 억제하여 지방 분해와 에너지 섭취에 영향을 미쳐 비만을 억제할 수 있다고 보고된 바 있다(48,49). 또한 공복상태에서 에너지를

사용하는 경우 호르몬 민감성 리파아제(HSL)의 활성이 증가되어 체내 지방조직에서 TG를 분해하여 혈청 유리지방산 농도가 증가한다(50). OB-RV군에서 혈청 유리지방산 농도가 증가한 것은 웃식초의 음용이 체내 지방조직의 분해에 영향을 미쳤다는 것을 의미하며, OB-RV군에서 분변 내 지질이 증가한 것은 웃식초 내의 폴리페놀과 플라보노이드에 의해 지질 배설을 증가시킨 것으로 사료된다.

**복부지방의 지방세포 변화 및 효소 활성**

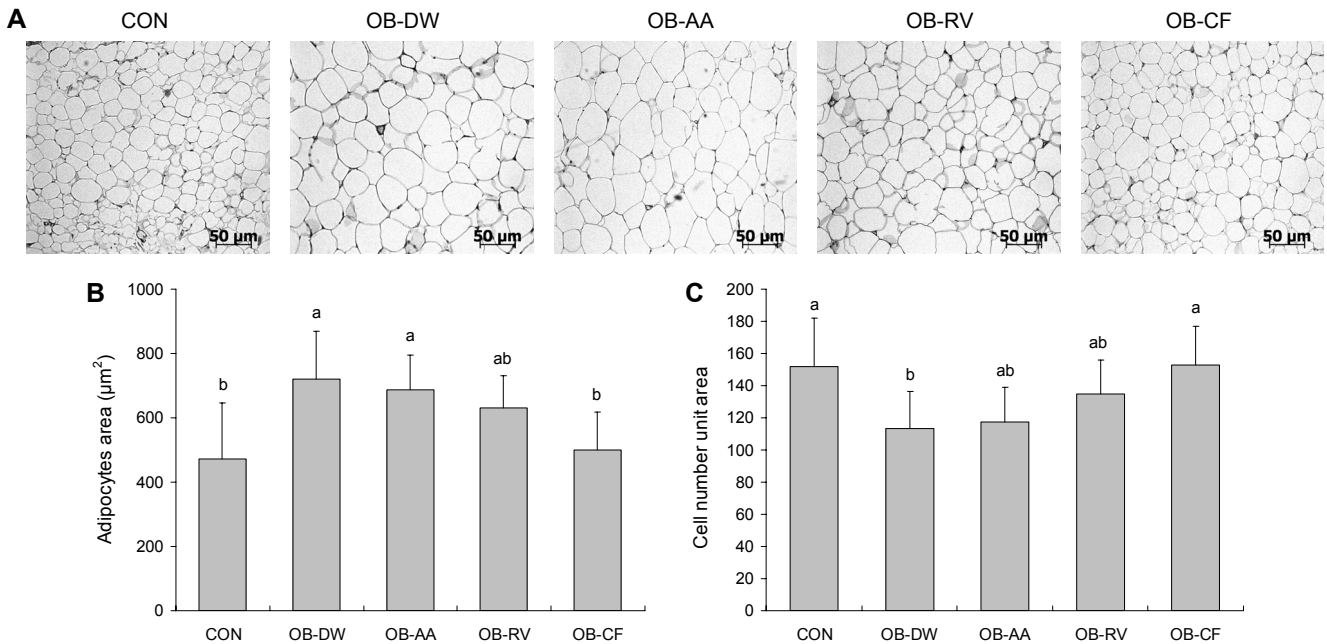
적출한 지방조직을 고정하여 지방세포의 크기를 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 복부지방 세포 면적은 OB-DW군이 CON군과 비교하여 유의적으로 높았고( $P<0.05$ ) OB-DW군과 비교하여 OB-CF군에서 유의적으로 감소하였으며( $P<0.05$ ), OB-AA군과 OB-RV군에서 각각 4.8%, 12.5% 감소되었으나 유의성은 없었다.

면적당(0.1 mm<sup>2</sup>) 세포의 수는 OB-DW군이 CON군과 비교하여 유의적으로 낮았으며( $P<0.05$ ), OB-DW군과 비교하여 OB-CF군에서 유의적으로 증가하였다( $P<0.05$ ). OB-AA군과 OB-RV군에서 각각 7.9%, 22.9% 증가되었으나 유의성은 없었다.

Table 5에 나타낸 바와 같이 GPDH 활성은 CON군에 비해 OB-DW군이 유의적으로 높았고( $P<0.05$ ), OB-AA군, OB-RV군, OB-CF군에서 각각 3.5%, 19.0%, 31.0% 감소되었으나 유의성은 없었다.

LPL 활성은 CON군에 비해 OB-DW군이 유의하게 높았으며( $P<0.05$ ), OB-AA군, OB-RV군, OB-CF에서 각각 28.3%, 62.6%, 64.2% 감소되었고 OB-RV군과 OB-CF군에서 유의성을 나타냈다( $P<0.05$ ).

지방 세포에서 지질의 축적은 TG의 합성 및 분해 과정에 의해 결정되는데, LPL과 GPDH는 지방 세포 내의 TG 축적에 주요한 효소로(51,52), 비만 쥐에서 LPL과 GPDH의 활성이 증대되었다고 발표된 바 있다(53,54). 본 논문 역시



**Fig. 1.** Effect of *Rhus verniciflua* vinegar on abdominal adipocyte. (A) Hematoxylin-eosin stained section of abdominal adipose tissue ( $\times 100$ ). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Carl-Zeiss Axiovert s100 (fluorescent microscope) and (B) adipocytes area ( $\mu\text{m}^2$ ) and (C) cell number per spot. Groups are the same as Table 2. Data values are expressed as means $\pm$ SD. Statistical differences between experimental groups are based on one-way ANOVA and Tukey's multiple range test at  $P < 0.05$ .

**Table 5.** Effect of *Rhus verniciflua* vinegar on abdominal adipose tissue enzyme activities

|                    | CON <sup>1)</sup>              | OB-DW                          | OB-AA                           | OB-RV                           | OB-CF                          |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| GPDH (nmol/min/mg) | 22.61 $\pm$ 5.29 <sup>b</sup>  | 36.79 $\pm$ 7.86 <sup>a</sup>  | 28.14 $\pm$ 10.20 <sup>ab</sup> | 31.35 $\pm$ 11.85 <sup>ab</sup> | 24.00 $\pm$ 9.25 <sup>ab</sup> |
| LPL (nmol/min/mg)  | 21.75 $\pm$ 13.23 <sup>b</sup> | 71.00 $\pm$ 19.75 <sup>a</sup> | 50.93 $\pm$ 13.77 <sup>a</sup>  | 26.53 $\pm$ 14.33 <sup>b</sup>  | 25.43 $\pm$ 16.06 <sup>b</sup> |

<sup>1)</sup>Groups are the same as Table 2.

Data are mean $\pm$ SD. Statistical differences between experimental groups are based on one-way ANOVA and Tukey's multiple range test at  $P < 0.05$ .

OB-DW군에서 LPL과 GPDH의 활성이 가장 높게 나타났으며, LPL과 GPDH 활성이 감소된 다른 군들에서 지방세포 크기가 감소한 것을 확인할 수 있다.

RV나 AA를 공급한 쥐의 체중은 DW를 공급한 쥐보다 적었던 반면에 복부지방의 지방세포 면적이나 크기가 DW를 공급한 쥐에 비해 통계적인 유의성이 나타나지 않았다. 하지만 경향성은 보여 조금 더 넉넉한 샘플수가 확보되었더라면 유의한 차이를 보였을 것으로 예측된다. 지방세포의 크기 또한 세포의 지질 축적으로 인해 좌우되므로 실험 종료 후 체중이 낮은 군들에서 지방 축적과 관련된 LPL과 GPDH가 낮은 것은 체중 감소에 끼치는 하나의 기전으로 설명될 수 있다.

## 요 약

본 연구에서는 고지방식이로 비만 유도된 쥐를 대상으로 10주간 윗식초를 급여하였을 때 비만에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 윗식초는 무독화된 윗을 이용하여 알코올 발효 후 아세트산 발효를 거쳐 제조하였으며, 흰쥐를 일반식이

(normal chow diet)와 고지방식이(fat 60 %kcal) 섭취군으로 나누어 12주 동안 비만 유도를 한 후 총 5군으로 나누었다. 일반식이와 정제수를 음용한 CON군, 고지방식이와 정제수를 음용한 OB-DW군, 고지방식이와 1% 아세트산을 음용한 OB-AA군, 고지방식이와 1% 윗식초를 음용한 OB-RV군, 고지방식이와 0.1% 카페인 용액을 음용한 OB-CF군으로 나누어 총 10주 동안 해당 식이와 실험시료를 공급하였으며, 연구 종료 후 체중, 지방 무게, 지방구 크기 및 개수, 혈액과 간 조직의 지질 profile, 지방조직의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase와 lipoprotein lipase(LPL) 효소 활성을 분석하였다. 그 결과 OB-DW군과 비교하여 OB-RV군에서 체중 증가량과 식이효율이 유의적으로 감소하였고, 혈중 총 콜레스테롤과 중성지방 함량, 심장동맥경화지수(CRI), LPL 활성이 유의적으로 감소하였으며, 또한 혈중 유리지방산과 분변 중성지방의 함량이 유의성 있게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 항비만 효과를 살펴보기 위해 비만 흰쥐에게 윗식초를 음용시켰을 때 혈청이나 간의 지질 함량을 개선시키고 지질 배설을 증가시켜 부작용 없이 식품소재로서 비만을 일부 개선시키는 효과를 규명하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 양조식초의 동물모델을 이용한 건강기능효과 구명, 세부과제번호: PJ00982602)의 지원에 의한 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chen JC, Chen QH, Guo Q, Ruan S, Ruan H, He GQ, Gu Q. 2010. Simultaneous determination of acetoin and tetramethylpyrazine in traditional vinegars by HPLC method. *Food Chem* 122: 1247-1252.
2. Hashimoto M, Obara K, Ozono M, Furuyashiki M, Ikeda T, Suda Y, Fukase K, Fujimoto Y, Shigehisa H. 2013. Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (*Kurozu*). *J Biosci Bioeng* 116: 688-696.
3. Jeong YJ, Lee MH. 2000. A view and prospect of vinegar industry. *Food Industry and Nutrition* 5(1): 7-12.
4. Jeong YJ. 2009. Current trends and future prospects in the Korean vinegar industry. *Food Sci Ind* 42: 52-59.
5. Moon SY, Chung HC, Yoon HN. 1997. Comparative analysis of commercial vinegars in physicochemical properties, minor components and organoleptic tastes. *Korean J Food Sci Technol* 29: 663-670.
6. Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS. 2004. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem Toxicol* 42: 1383-1388.
7. Hong MH, Kim JH, Lee SY, Go HY, Kim JH, Shin YC, Kim SH, Ko SG. 2010. Early antiallergic inflammatory effects of *Rhus verniciflua* Stokes on human mast cells. *Phytother Res* 24: 288-294.
8. Kim IT, Park YM, Shin KM, Ha J, Choi J, Jung HJ, Park HJ, Lee KT. 2004. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thumbergiana* and *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol* 94: 165-173.
9. Jung NC. 1998. Biological activity of urushiol and flavonoids from Lac tree (*Rhus verniciflua* Stokes). *MS Thesis*. Chonnam National University, Gwangju, Korea. p 88-91.
10. Kim JB. 2003. Identification of antioxidative component from stem bark of *Rhus verniciflua*. *Korean J Food & Nutr* 16: 60-65.
11. Lee JC, Lim KT, Jang YS. 2002. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim Biophys Acta* 1570: 181-191.
12. Son YO, Lee KY, Lee JC, Jang HS, Kim JG, Jeon YM, Jang YS. 2005. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol Lett* 155: 115-125.
13. Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi J, Choi MY, Kim GT, Jung HJ, Park HJ. 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol* 90: 73-79.
14. Lee JD, Huh JE, Jeon G, Yang HR, Woo HS, Choi DY, Park DS. 2009. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid

- arthritis fibroblast-like synovial cells and *in vivo* models. *Int Immunopharmacol* 9: 268-276.
15. Lee DS, Jeong GS, Li B, Park H, Kim YC. 2010. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 10: 850-858.
16. Kim JS, Kwon YS, Chun WJ, Kim TY, Sun J, Yu CY, Kim MJ. 2010. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect. *Food Chem* 120: 539-543.
17. Fukamizu R, Jang MH, Miyasaka M. 2009. The role of eosinophils in allergic inflammation and intestinal immunity. *Nihon Rinsho* 67: 2088-2093.
18. Lebovidge JS, Strauch H, Kalish LA, Schneider LC. 2009. Assessment of psychological distress among children and adolescents with food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 124: 1282-1288.
19. Choi HS, Yeo SH, Jeong ST, Choi JH, Park HS, Kim MK. 2012. Preparation and characterization of urushiol free fermented *Rhus verniciflua* stem bark (FRVSB) extracts urushiol. *Korean J Food Sci Technol* 44: 173-178.
20. World Health Organization. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed Jan 2015).
21. Kim CJ, Kim DJ, Chae SM. 2008. The validity and reliability of the Korean version of revised processes of change for weight control scale in adults with metabolic syndrome. *J Korean Acad Soc Nurs Edu* 14: 262-272.
22. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. 2007. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 298: 2028-2037.
23. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. 2003. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 289: 187-193.
24. Hseu YC, Chou CW, Senthil Kumar KJ, Fu KT, Wang HM, Hsu LS, Kuo YH, Wu CR, Chen SC, Yang HL. 2012. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the up-regulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. *Food Chem Toxicol* 50: 1245-1255.
25. Ihrig M, Dangler CA, Fox JG. 2001. Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop spontaneous hypercholesterolaemia and aortic atheromas. *Atherosclerosis* 156: 103-107.
26. Johnston CS, Gaas CA. 2006. Vinegar: medicinal uses and antihyperglycemic effect. *Med Gen Med* 8: 61.
27. Moon YJ, Cha YS. 2008. Effects of persimmon-vinegar on lipid metabolism and alcohol clearance in chronic alcohol-fed rats. *J Med Food* 11: 38-45.
28. Bouazza A, Bitam A, Amiali M, Bounihi A, Yargui L, Koceir EA. 2015. Effect of fruit vinegars on liver damage and oxidative stress in high-fat-fed rats. *Pharm Biol* 8: 1-6.
29. Iman M, Moallem SA, Barahoyee A. 2015. Effect of apple vinegar on blood glucose level in diabetic mice. *Pharm Sci* 20: 163-168.
30. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem* 49: 4083-4089.
31. Lee S, Jung ES, Do SG, Jung GY, Song G, Song JM, Lee CH. 2014. Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium* spp.). *J Agric Food Chem* 62: 2126-2133.
32. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.

- Clin Chem* 18: 499-502.
33. Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP. 1988. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis* 8: 207-211.
  34. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
  35. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int* 11: 36-42.
  36. Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Choi HR, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Jung HK, Park JH, Lee TB. 2013. Effects of extracts of unripe black raspberry and red ginseng on cholesterol synthesis. *Korean J Food Sci Technol* 45: 628-635.
  37. Chon JW, Park JK, Lee MA, Jeong MR, Han JH, Park YK. 2009. Fermented *Crataegi fructus* vinegar improves lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1024-1031.
  38. Jeon WK, Kim JH, Lee HW, Ko BS, Kim HK. 2003. Effects of *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) extract on diet-induced obesity in C57BL/6 mouse. *Kor J Pharmacogn* 34: 339-343.
  39. Michna L, Lu YP, Lou YR, Wagner GC, Conney AH. 2003. Stimulatory effect of oral administration of green tea and caffeine on locomotor activity in SKH-1 mice. *Life Sci* 73: 1383-1392.
  40. Zheng G, Sayama K, Okubo T, Juneja LR, Oguni I. 2004. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo* 18: 55-62.
  41. Orbeta RL, Overpeck MD, Ramcharran D, Kogan MD, Ledsky R. 2006. High caffeine intake in adolescents: associations with difficulty sleeping and feeling tired in the morning. *J Adolesc Health* 38: 451-453.
  42. Barry RJ, Rushby JA, Wallace MJ, Clarke AR, Johnstone SJ, Zlojutro I. 2005. Caffeine effects on resting-state arousal. *Clin Neurophysiol* 116: 2693-2700.
  43. Bhatti SK, O'Keefe JH, Lavie CJ. 2013. Coffee and tea: perks for health and longevity?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 688-697.
  44. Fushimi T, Suruga K, Oshima Y, Fukiharu M, Tsukamoto Y, Goda T. 2006. Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *Br J Nutr* 95: 916-924.
  45. Crabtree B, Gordon MJ, Christie SL. 1990. Measurement of the rates of acetyl-CoA hydrolysis and synthesis from acetate in rat hepatocytes and the role of these fluxes in substrate cycling. *Biochem J* 270: 219-225.
  46. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 3829-3835.
  47. Guerciolini R. 1997. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21: S12-23.
  48. McDougall GJ, Stewart D. 2005. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors* 23: 189-195.
  49. Noh SK. 2002. Functional action of flavonoids for treatment of obesity. *Food Industry and Nutrition* 7(2): 27-29.
  50. Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. 1995. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue *in vivo*: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul* 35: 163-178.
  51. Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Waern U. 1978. Lipoprotein-lipase activity in subcutaneous, adipose tissue in healthy subjects: variation of activity in a population of 60-year-old men. *Ups J Med Sci* 83: 45-52.
  52. Student AK, Hsu RY, Lane MD. 1980. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 pre-adipocytes. *J Biol Chem* 255: 4745-4750.
  53. Hasegawa N. 2001. Garcinia extract inhibits lipid droplet accumulation without affecting adipose conversion in 3T3-L1 cells. *Phytother Res* 15: 172-173.
  54. Iwashita K, Yamaki K, Tsushida T. 2001. Mioga (*Zingiber mioga* Rosc.) extract prevents 3T3-L1 differentiation into adipocytes and obesity in mice. *Food Sci Technol Res* 7: 164-170.