

핵산 추출 종실유의 지방산 분석 및 3T3-L1 지방세포의 지방 축적과 렙틴 분비에 미치는 영향 연구

김태우¹ · 김경곤² · 강운환¹ · 김대중¹ · 이정일³ · 최 먼^{1,2*}

¹강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터, ²강원대학교 생명건강공학과, ³(주)한빛향료

Analysis of Seed Oil Fatty Acids and Their Effect on Lipid Accumulation and Leptin Secretion in 3T3-L1 Adipocytes

Tae Woo Kim¹, Kyoung Kon Kim², Yun Hwan Kang¹, Dae Jung Kim¹, Jeong Il Lee³, and Myeon Choe^{1,2*}

¹Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University

²Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University

³Basic Lab., Hanbit Flavor & Fragrance

Abstract In this study, we evaluated the fatty acid composition and physiological activities of oils extracted from eight types of seeds, pepper (*Capsicum annuum* L.), green tea (*Camellia sinensis* L.), perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara), peanut (*Arachis hypogaea* L.), cotton (*Gossypium indicum* LAM.), sesame (*Sesamum indicum* L.), walnut (*Juglans regia* L.), and safflower (*Carthamus tinctorius* L.). The composition and quality analysis showed that the oils were potentially suitable for food-grade applications. The composition analysis showed that the oils were mostly composed of unsaturated fatty acids including linoleic acid and oleic acid. In 3T3-L1 adipocytes, green pepper, perilla, and peanut seed oils inhibited lipid accumulation, and green pepper, perilla, peanut, sesame, walnut, and safflower seed oils induced leptin secretion. These results show that the inhibitory effect of edible seed oils on lipid accumulation, and induction of leptin secretion may be useful for obesity management.

Keywords: seed oil, fatty acid composition, lipid accumulation, leptin secretion, weight management

서 론

경제가 발전하고 식생활이 서구화되면서 동물성 지방의 섭취가 해마다 증가하고 있다. 그로 인해 암, 동맥경화증 및 심혈관계 질환 등 각종 질환들의 발병률이 증가하여 사망률이 증가함을 역학조사나 동물실험 등을 통해 증명함에 따라 식이섭취의 중요성이 대두되고 있다. 이에 따라 최근 사회적으로 지방섭취를 줄이는 동시에 식물성 지방의 섭취비율을 늘이려는 노력이 진행되고 있다(1,2). 또한 웰빙열풍으로 건강의 중요성이 부각되면서 불포화지방산의 함량이 높은 식물성 기름의 소비가 증가됨에 따라 다양한 종류의 식용기름 소비가 증가하는 추세이다(3).

고추(*Capsicum annuum* L.)씨기름은 고추의 매운맛을 내는 성분인 capsaicin이 함유되어 있는 것으로 보고되었으며, 지방을 태우고 신진대사를 활발하게 한다(4-6). 찌개류나 볶음을 만들 때 활용하면 칼칼하면서도 톡 쏘는 듯한 매운맛을 낼 수 있다.

녹차(*Camellia sinensis* L.)씨기름은 동물실험에서 콜레스테롤 및 항산화, 항염증 반응을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 peroxisome

proliferator-activated receptor- γ 를 억제하여 체중증가를 억제한다는 보고가 있었다(7,8). 또한 녹차씨에는 생리활성 물질인 사포닌, 플라보노이드류, 비타민 등이 풍부하게 함유되어 있어 식용유지 자원으로서의 가치가 매우 높고(9) 고급 샐러드유나 드레싱오일로 활용이 가능하다.

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara)기름은 고소한 들깨에서 뽑은 식용유로 혈관 건강을 돕는 성분인 오메가-3 지방산이 전체 지방산의 약 60%를 차지하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 공기 중에서 빠르게 산화해 유해한 과산화 지질로 변하는 단점이 있다(10).

땅콩(*Arachis hypogaea* L.)기름은 전통적으로 요리, 마사지, 치료의 목적으로 사용되었다. 알러지 유발 등의 문제점이 있지만, 최근 다양한 연구결과들을 통해 항산화효과, 항암효과, 항심혈관 질환 및 항동맥경화에 이로운이 알려지고 있다. 이는 땅콩기름이 함유하고 있는 많은 양의 항산화물질과 mono- and poly-unsaturated fatty acid 때문인 것으로 알려져 있다(11).

목화(*Gossypium indicum* LAM.)씨기름(면실유)은 오래전부터 최고급 식용유로 이용되어 왔다. 이것은 면실유 자체의 향취가 적어 타 식품 고유의 풍미를 줄이지 않고 조리될 수 있는 특징 때문이다. 면실유의 주요 지방산으로는 linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid, linolenic acid가 보고되었으며, 이들 주요 지방산의 함량은 전체 지방산함량의 97.7%를 차지하는 것으로 알려져 있다(12).

참깨(*Sesamum indicum* L.)기름은 고소한 고유의 향미와 산화안정성이 우수하여 전통적으로 우리 한식에 즐겨 사용된 식용유 및

*Corresponding author: Myeon Choe, Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-8645

Fax: 82-33-342-7368

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

Received August 28, 2014; revised December 8, 2014;

accepted January 8, 2015

조미료이다. 최근 세사민 등 항산화 기능성 물질의 존재가 밝혀짐에 따라 그 수요가 증가하고 있다(13). 하지만 공정상 볶음-압착공정에서 발암물질인 benzo(a)pyrene이 생성되는 것으로 알려져 있어 이에 대한 개선방안이 다양한 연구를 통해 검토되고 있는 실정이다(14).

호두(*Juglans regia* L.)기름은 조지방의 함량이 99.9%이며 비타민 A와, 비타민 E가 함유되어 있으며 비타민 E 중 γ -tocopherol의 함량이 가장 높은 것으로 보고되었다. 주요 지방산으로 linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, palmitic acid, stearic acid가 분석되었으며 그 중 linoleic acid는 전체 지방산의 62.8%를 차지하는 것으로 알려져 있고 항알러지 기능이 보고되었다(15).

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)씨기름은 동맥경화 예방효과와 지방질유도 인슐린 저항성 예방효과가 보고되어 있어 건강기능식품 소재로 관심을 받고 있다(16,17). 그러나 불포화지방산 함유율이 높아 산패에 취약하여 산화적 안정성을 확보하기 위한 연구가 다수 진행되고 있다(18).

본 연구에서는 고추씨, 녹차씨, 들깨, 땅콩, 목화씨, 참깨, 호두, 홍화씨를 건강기능식품의 기능성 원료 분리 및 식용유지류 추출의 목적에 일반적으로 허용되는 핵산을 이용하여 기름을 추출한 후 구성 성분을 분석하고 3T3-L1 지방세포의 생리활성에 미치는 영향을 연구함으로써 식물성 유지를 이용한 기능성 식용유의 개발 및 산업화에 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

핵산 추출 종실유 제조

고추씨는 충북 음성, 녹차씨는 경남 하동, 들깨와 참깨는 강원 홍천, 땅콩은 서울 경동시장, 목화씨는 강원 원주, 호두는 충북 영동, 홍화씨는 경남 함양에서 2013년 구매하였으며, 각각의 종실유는 550 g의 씨앗에 *n*-hexane 700 mL을 혼합 후 상온에서 30분 동안 초음파 추출기(5510E-DTH, Branson, Shelton, USA)를 이용하여 초음파 추출한 다음 그대로 24시간 침지시킨 후 0.45 μ m filter로 여과하고, Heidolph사(Schwabach, Germany)의 WB2000과 VU2000 모델 감압농축기를 이용하여 감압 농축함으로써 준비하였다. 분리된 종실유의 추출율(%)은 씨앗 550 g 대비 고추씨기름 13.9%, 녹차씨기름 3.8%, 들깨기름 39%, 땅콩기름 63.2%, 면실유 17.1%, 참깨기름 25.2%, 호두기름 46.2%, 홍화씨기름 17.7%로 확인되었으며 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 사용하여 20 mg/mL 농도로 stock solution을 제조한 후 실험에 사용하였다.

GC 분석용 시료 전처리

GC 분석을 위한 샘플의 fatty acid methyl ester화는 Watkins 등(19)의 방법을 이용하였다. 샘플 25 mg을 cap tube에 칭량하고 0.5 N methanolic NaOH 1.5 mL을 가한 뒤 100°C 가량의 히팅블록에서 5분간 가열하였다. 식물성 유지에는 트리글리세라이드의 양이 적어 saponifying으로 메틸레이션을 촉진시킨다. 가열된 시료를 30-40°C의 수욕상에서 1-2분간 냉각하고 냉각된 시료에 촉매역할을 위해 14% BF-methanol (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 2 mL을 가한 뒤 충분히 vortex한 뒤 약 100°C 히팅블록에서 약 2분간 가열하였다. 이후 30-40°C 수욕상에서 1-2분 방치하여 완전히 냉각시킨다. 냉각된 샘플에 isooctane 2 mL와 충분히 유도를 위해 saturated NaCl 1 mL를 가하고, 이후 충분히 vortex한 뒤 1-2분간 방치한 후 상층액을 회수하여 sodium sulfate를 이용하여 여과, 탈수하여 전처리하였다.

핵산 추출 종실유의 성분 분석방법

시료 중 지방산의 분석은 식품공전의 일반분석법 중 “1.1.5.4 지방산”에 기초한 gas chromatography법을 이용하여 지방산을 분석하였다(20). 지방산 표준용액은 지방산메틸에스터 혼합(37종) 표준품 FAME Mix C4-C24 (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 100 mg을 isooctane 1 mL에 녹여 조제하였다. 지방산의 정량을 위해 gas chromatography (Agilent 6890N GC/FID, Agilent Technologies, Beijing, China)를 이용하였으며 지방산 37종의 머무름 순서를 확인하기 위해 GC/MSD (Agilent 5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

핵산 추출 종실유의 수분함량 측정

원료 중 수분함량은 식품공전의 제9 일반시험법 중 “1.1.1.1 건조감량법”에 기초하여 측정하였다(20). 적외선 수분 측정기(Hansung, Seoul, Korea)를 사용하여 분쇄된 원료 1-2 g을 칭량접시에 채취한 후 원료의 수분을 증발시켜 처음 시료와 건조 후 시료의 무게차를 측정하여 수분함량을 계산하였다.

핵산 추출 종실유의 조지방함량 측정

원료 중 조지방함량은 식품공전의 제9 일반시험법 중 “1.1.5.1.1 에테르추출법”에 기초하여 측정하였다(20). 원통여과지에 분쇄된 원료 1-2 g을 채취하여 analytical soxtec 2050 (Foss, Hilleroed, Denmark)에 장착한 후 항량시킨 추출컵에 ether 80 mL를 담아서 장착한다. 40분간 지방추출이 끝난 후 추출컵을 103°C에서 30분간 건조, 방냉하여 조지방함량을 계산하였다.

핵산 추출 종실유의 유지 안전성 측정

유지 안전성 측정을 위한 active oxygen method (AOM)는 AOCS (American Oil Chemists' Society)방법(21)을 응용하여 수행하였다. 산화안정도를 측정하기 위하여 873 Biodiesel Rancimat (Metrohm, AG, Herisau, Switzerland)의 공기주입량을 20 L/h로 조정된 후 유지시료 3 g을 reactive vessel에 취하여 100, 110, 120°C에서 공기를 주입하면서 산화시키고 이때 생성되는 산화물을 포집병에 증류수 60 mL를 넣고 흡수시켜 이의 conductivity를 자동 기록한 곡선으로부터 유도시간을 각각 측정하여 표시하였다.

핵산 추출 종실유의 산가 측정

원료의 산가 측정은 식품공전 제9. 일반시험법 중 “1.1.5.3.1 산가”에 기초하여 측정하였다(20). 산가란 지질 1 g을 중화하는데 필요한 수산화칼륨의 mg수이다. 검체 5-10 g을 정밀히 달아 삼각플라스크에 넣고 중성의 에탄올에테르혼액(1:2) 100 mL를 넣어 녹인다. 이를 1% phenolphthalein 용액을 지시약으로 하여 엷은 홍색이 30초간 지속할 때까지 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액으로 적정하였다.

$$\text{산가} = \frac{5.611 \times a \times f}{S}$$

S: 검체의 채취량(g)

a: 0.1 N 에탄올성 수산화칼륨용액의 소비량(mL)

f: 0.1 N 에탄올성 수산화칼륨용액의 역가

핵산 추출 종실유의 과산화물가 측정

원료의 과산화물가 측정은 식품공전 제9. 일반시험법 중

“1.1.5.3.5 과산화물가”에 기초하여 측정하였다(20). 과산화물가란 규정의 방법에 따라 측정하였을 때 유지 1 kg에 의하여 요오드칼륨에서 유리되는 요오드의 밀리당량수이다. 검체 약 1-5 g을 달아 초산 chloroform (3:2) 25 mL에 필요하면 약간 가온하여 녹이고 쓸 때에 만든 포화요오드칼륨용액 1 mL를 가볍게 흔들어 섞은 다음 어두운 곳에 10분간 방치하고 물 30 mL를 가하여 세계 흔들어 섞은 다음 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01 N Na₂S₂O₃으로 적정하였다. 따로 공시험을 하여 보정하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \frac{(a-b) \times f}{\text{검체의 채취량(g)}} \times 10$$

- a: 0.01 N Na₂S₂O₃의 적정수(mL)
- b: 공시험에서의 0.01 N 티오황산나트륨액의 소비량(mL)
- f: 0.01 N Na₂S₂O₃의 역가

핵산 추출 종실유의 검화가 측정

원료의 검화가 측정은 식품공전 제9. 일반시험법 중 “1.1.5.3.2 비누화”에 기초하여 측정하였다(20). 검화가(비누화)란 지질 1 g 중의 유리산의 중화 및 에스테르의 검화에 필요한 수산화칼륨의 mg수이다. 검체 1-2 g을 200 mL의 플라스크에 정밀히 달아 넣고 0.5 N 수산화칼륨 에탄올용액 25 mL를 정확히 가하고 이에 환류냉각기를 연결하여 water bath에서 30분간 흔들어주면서 가열하였다. 냉각한 후 페놀프탈레인시약을 지시약으로 하여 즉시 0.5 N HCl으로 과잉의 수산화칼륨을 적정한다. 따로 검체를 사용하지 않고 같은 방법으로 공시험을 하였다.

$$\text{검화가} = 28.05 \times (b-a) \times f/S$$

- a: 검체를 사용했을 때의 0.5 N HCl의 소비량(mL)
- b: 공시험에 있어서의 0.5 N HCl의 소비량(mL)
- S: 검체의 채취량(g)
- f: 0.5 N HCl의 역가

핵산 추출 종실유의 세포독성 시험

종실유 8종의 세포독성은 cell counting kit (CCK)-8 assay를 통해 확인하였다(22). 3T3-L1 세포를 96 well에 1.5×10⁴ cell/well로 분주한 후 24시간 부착시킨다. Fetal Bovine Serum (FBS)가 첨가되지 않은 배지에서 종실유를 0.01-0.4 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배양 중인 배지(100 μL)에 CCK-8 reagent를 10 μL씩 가해주고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 microplate reader (EL808, BioTek, Winooski, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교하였다.

3T3-L1 세포배양 및 지방축적 측정

3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)에 100 U/mL penicillin과 100 μg/mL streptomycin을 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5×10⁵ cell/well의 세포를 분주하여 세포가 완전히 밀집되게 배양하고, 2일을 더 배양한 후 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin) solution, 및 10% FBS 을 포함하는 DMEM 배지에서 2일 동안 배양함으로써 분화를 개시하였다. 그 다음 10 μg/mL insulin 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 3일 동안 분화를 진행

시켰다. 그 이후로는 10% FBS만을 포함하는 DMEM배지에서 배양함으로써 세포 내 지방구(lipid droplet)을 형성하는 지방세포로 분화시켰으며, 지방구의 양은 oil red O를 사용하여 확인하였다(23).

Leptin 분비량 측정

지방세포에서 분비되어 배지에 함유된 leptin의 양은 ELISA assay 방법을 이용하여 측정하였다(24). 방법은 commercial kit (Quantikine & Immunoassay Kit, R&D System, Minneapolis, MN, USA)에서 제공하는 ELISA protocol을 따랐다. Leptin 항체가 부착되어 있는 96 well plate에 배지 sample 100 μL씩을 넣어 1시간동안 정치하였다. PBS-T로 3차례 세척한 후 100 μL의 biotinylated rabbit anti-mouse leptin IgG (200 ng/mL)을 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 PBS-T로 3번 세척하였다. 각 well에 100 μL의 TMB를 넣고 30분 동안 빛이 들어가지 않는 상태에서 추가 반응시킨 후 well 당 50 μL의 2 M H₂SO₄를 첨가함으로써 종료시킨다. 반응 종료 후 microplate reader (EL808, BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Leptin 분비량은 대조군과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program을 이용하여 mean±SD로 표시하였고, One-way ANOVA test 후 Duncan’s multiple range test에 의해 p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

핵산 추출 종실유의 fatty acid 구성 분석

종실유 8종의 fatty acid 구성을 GC/MS를 이용하여 37종의 fatty acid standard 혼합물의 pattern과 비교하여 확인하였다. 확인된 fatty acid들의 함량은 undecanoic acid의 양을 기준으로 계산한 후 상대적인 함량 비를 퍼센트로 환산하여 Table 1에 정리하였다. 그 결과, 종실유들의 주요 성분으로 palmitic acid, oleic acid 및 linoleic acid가 확인되었으며 함량에서도 과반을 차지하는 것이 관찰되었다. 특히하게 들깨기름에서는 linolenic acid (57.82%)가 과반을 차지하는 것으로 확인되었다. 주요성분들 중 불포화 지방산인 oleic acid는 상처치료, 면역 및 염증 질환에 효과가 있으며(25), 최근 항암효과가 알려지면서 주목받고 있는 성분이며(26), linoleic acid는 항염증작용(27)과 함께 insulin 저항성을 막아주는 기능(28)이 보고되었으며, linolenic acid는 심혈관질환, 당뇨, 골절위험의 개선에 도움이 되는 것(29)으로 알려져 있다. 이는 불포화 지방산이 함유된 기능성 식용유로의 개발 가능성이 높음을 시사한다.

원재료의 일반성분 및 핵산 추출 종실유의 품질 측정

고추씨, 녹차씨, 들깨, 땅콩, 목화씨, 참깨, 호두, 홍화씨의 수분 및 조지방을 측정된 결과 수분은 2.19-6.23%의 범위에서 측정되었고, 조지방은 13.66-62.14%의 범위에서 확인되었다. 수분은 목화씨에서 가장 높게 측정되었으며, 조지방은 호두씨에서 가장 높게 측정되었다. 측정된 값들은 Ku 등(30), Rah 등(31), Ji와 Jeong (32), 및 Lee와 Kim(33)의 결과에서 보고된 고추씨의 수분함량 2.71-6.73%, 조지방 18.05-29.27%, 녹차씨의 수분함량 6.3%, 조지방 34.6%, 들깨의 수분함량 6.6%, 조지방 51.62%, 땅콩의 수분함량 4.0%, 조지방 42.8%, 목화씨의 수분함량 7.3%, 조지방 22.2%,

Table 1. Fatty acid profiles of seed oils

| Name (acid methyl esters) | Area (%) | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | PSO ¹⁾ | GSO | PO | PNO | CSO | SO | WNO | SSO |
| Undecanoic ²⁾ | 3.37 | 3.17 | 3.03 | 3.01 | 3.44 | 3.14 | 3.05 | 3.03 |
| Myristic | 0.27 | - | - | - | 0.49 | - | - | - |
| Palmitic | 13.88 | 14.51 | 6.22 | 10.64 | 24.19 | 8.27 | 4.97 | 6.13 |
| Stearic | 2.94 | 3.25 | 2.44 | 3.51 | 3.14 | 5.64 | 3.18 | 3.04 |
| Oleic | 7.72 | 58.05 | 15.72 | 40.76 | 15.06 | 35.42 | 15.20 | 7.61 |
| Linoleic | 67.72 | 18.44 | 13.31 | 35.57 | 50.03 | 45.15 | 65.25 | 78.71 |
| Arachidic | - | - | - | 1.36 | - | 0.56 | - | 0.31 |
| cis-11-Eicosenoic | - | 0.81 | - | 0.78 | - | - | - | - |
| Linolenic | 0.77 | - | 57.82 | - | - | 0.41 | 7.16 | - |
| Behenic | - | - | - | 2.22 | - | - | - | - |
| etc. | 3.33 | 1.77 | 1.46 | 2.15 | 3.65 | 1.41 | 1.19 | 1.17 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

¹⁾Abbreviations: PSO: pepper (*Capsicum annum*L.) seed oil, GSO: green tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil, PO: perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) seed oil, PNO: peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil, CSO: cotton (*Gossypium indicum* LAM.) seed oil, SO: sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil, WNO: walnuts (*Juglans regia* L.) oil, SSO: safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil.

²⁾Undecanoic acid (C 11:0, 29.065 min) was used as a internal standard (ISTD).

Table 2. General component and quality measurement of seed oils

| No. | Seed oil | Moisture (%) | Crude fat (%) | AOM ¹⁾ (h) | Acid value | Peroxide value | Saponification value |
|-----|-------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1 | PSO ²⁾ | 3.55±0.12 ^c | 13.66±0.40 ^a | 24.30 | 0.61±0.06 ^{cd} | 6.72±0.50 ^d | 138.67±0.58 ^b |
| 2 | GSO | 6.23±0.24 ^f | 28.27±1.80 ^d | 53.00 | 2.03±0.08 ^g | 8.60±0.47 ^e | 136.67±0.58 ^a |
| 3 | PO | 2.29±0.02 ^a | 44.08±0.03 ^f | 10.64 | 1.60±0.35 ^e | 3.90±0.01 ^a | 138.00±1.00 ^b |
| 4 | PNO | 4.15±0.14 ^{cd} | 36.40±0.17 ^e | 20.34 | 0.31±0.03 ^b | 5.81±0.33 ^c | 138.33±1.53 ^b |
| 5 | CSO | 5.42±0.07 ^e | 20.52±1.33 ^c | 0.42 | 0.51±0.04 ^c | 6.97±0.61 ^d | 155.33±2.52 ^d |
| 6 | SO | 2.57±0.06 ^{ab} | 45.25±0.08 ^f | 31.57 | 1.94±0.17 ^f | 8.88±0.53 ^e | 138.00±0.00 ^b |
| 7 | WNO | 2.19±0.07 ^a | 62.14±1.72 ^g | 6.22 | 0.21±0.01 ^a | 4.05±0.01 ^b | 137.67±0.58 ^{ab} |
| 8 | SSO | 2.50±0.18 ^{ab} | 19.68±1.25 ^b | 7.97 | 2.60±0.34 ^{gh} | 20.51±0.56 ^f | 139.67±1.53 ^{bc} |

¹⁾AOM: active oxygen method

²⁾Abbreviations: PSO: pepper (*Capsicum annum*L.) seed oil, GSO: green tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil, PO: perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) seed oil, PNO: peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil, CSO: cotton (*Gossypium indicum* LAM.) seed oil, SO: sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil, WNO: walnuts (*Juglans regia* L.) oil, SSO: safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil.

Different superscripts in the same column (a-h) indicate significant differences ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

참깨의 수분함량 4.78%, 조지방 45.41%, 홍화씨의 수분함량 7.2%, 조지방 34.8% 보다 수분함량과 조지방함량이 약간씩 낮은 것은 수확시기와 저장방법의 차이에 의해 충분히 발생할 수 있는 수준으로 판단된다. 호두의 수분과 조지방함량에 대한 측정 자료는 아직 논문에 보고된 바가 없으며 본 실험에 사용된 소재들 가운데 조지방의 함량(62.14%)이 월등히 높은 것으로 측정되었다. 추출된 종실유의 품질확인을 위해 AOM, 산가, 과산화물가, 검화가를 측정하였다. 일반성분과 함께 종실유의 품질 측정 결과는 Table 2에 정리된 바와 같다. 종실유 8종의 AOM에 의한 유지의 안정성을 평가한 결과 0.42-53시간의 범위에서 관찰되었으며 목화씨기름이 0.42시간으로 가장 짧아 안정성이 떨어지는 것으로 측정되었으며 녹차씨기름이 53시간으로 가장 길게 관찰되어 안정성이 가장 좋은 것을 확인할 수 있었다. 산가는 0.21-2.60의 범위에서 측정되었으며, 호두기름의 산가가 0.21로 가장 낮은 값을 보였고 홍화씨기름이 2.60으로 가장 높은 값을 나타내었다. 과산화물가는 3.90-20.51의 범위에서 관찰되었으며, 들깨기름이 3.90으로 가장 낮은 값을 나타내었고 홍화씨기름이 20.51로 가장 높게 관찰되었다. 식품의 제조·가공에 있어서 유당 및 유처리 시 유지의 산가는 2.5 이하, 과산화물가 50 이하로 규정되어 있고, 유당·유처리 조제품의 경우, 산가 5.0 이하, 과산화물가 60 이

하로 규정되어 있어 본 실험의 유지들은 식품 가공공정에 활용이 가능한 것으로 평가되었다(20). 검화가는 136-155의 범위에서 관찰되었으며 녹차씨기름이 136으로 가장 낮았으며 목화씨기름이 155로 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 동백씨기름의 검화가 154.8과(34) 유사한 값으로 그 값이 크면 지방산 사슬이 짧고 작으면 사슬이 길다는 것을 의미하지만 본 실험에 사용된 종실유 간에는 의미있는 차이가 없는 것으로 판단된다. 각 종실유에 따라 AOM, 산가, 과산화물가, 검화가의 차이가 관찰되지만 식품 및 식품가공에 잠재적으로 적합한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 향후 지방정제 공정을 거친 후에도 화학적 시험분석 결과가 식품공전의 규격에 적합한지 여부는 추가시험 및 공정연구가 필요할 것이다.

핵산 추출 종실유의 3T3-L1 세포에 대한 독성시험

Fatty acid 구성, 일반성분 및 품질측정이 완료된 8종의 종실유를 이용하여 3T3-L1 세포에 대한 세포독성을 cell counting kit (CCK)-8를 이용하여 시험하였다. 3T3-L1 세포에 종실유 및 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하지 않은 상태를 control로 하였으며, 종실유의 처리농도 증가에 따라 용매인 DMSO의 처리량이 증가하므로 대조군으로 종실유처리에 따라 증가된 DMSO

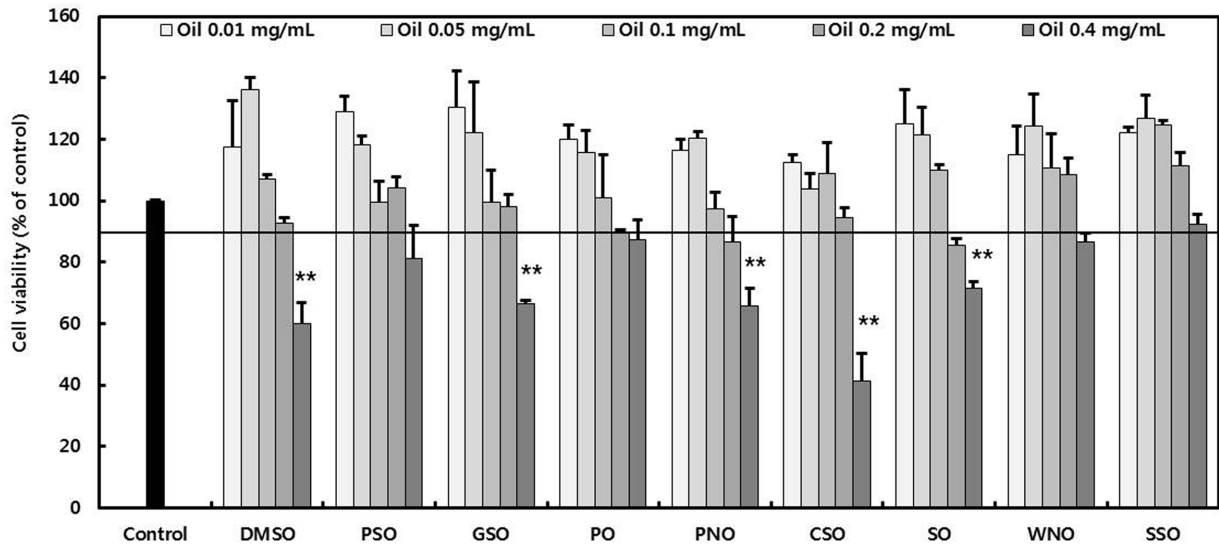


Fig. 1. Concentration-dependent effects of seed oils on cell viability. Cell viability was analyzed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay kit. Each bar represents mean±standard deviation from three independent experiments. ** $p < 0.01$ as compared to the control. DMSO: single-DMSO treatment, PSO: pepper (*Capsicum annuum* L.) seed oil, GSO: green tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil, PO: perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) seed oil, PNO: peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil, CSO: cotton (*Gossypium indicum* LAM.) seed oil, SO: sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil, WNO: walnuts (*Juglans regia* L.) oil, SSO: safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil.

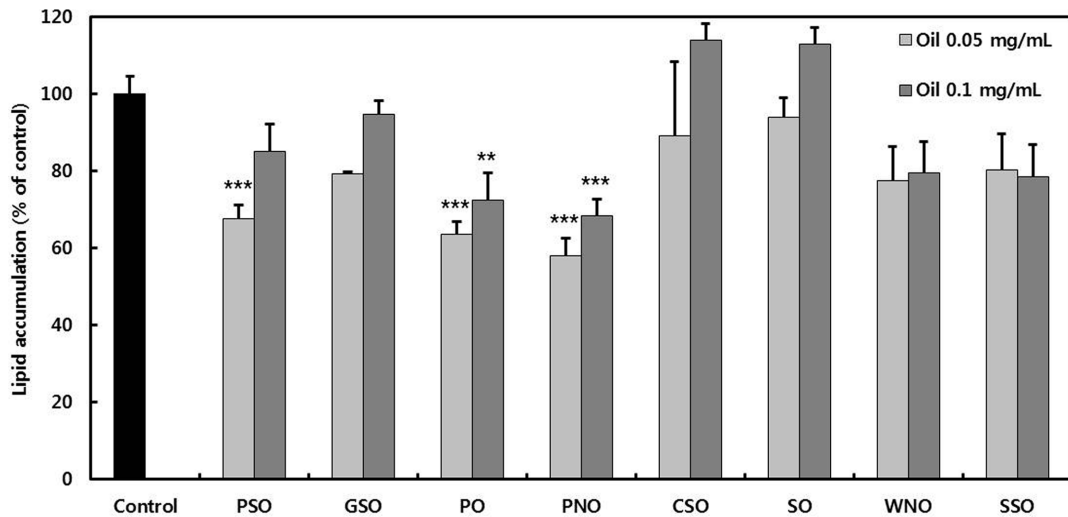


Fig. 2. Seed oils inhibit lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/mL) of seed oils. Lipid accumulation was determined by oil red O staining. Results are presented as mean±standard deviation from three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to the control. PSO: pepper (*Capsicum annuum* L.) seed oil, GSO: green tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil, PO: perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) seed oil, PNO: peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil, CSO: cotton (*Gossypium indicum* LAM.) seed oil, SO: sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil, WNO: walnuts (*Juglans regia* L.) oil, SSO: safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil.

의 함량만큼 세포에 DMSO만 처리한 군을 설정하였다. 이와 비교하여 종실유 8종을 각각 농도별로 처리한 실험군을 이용하여 독성시험을 수행한 결과는 Fig. 1에 정리된 바와 같다. 고추씨기름, 녹차씨기름, 들깨기름, 땅콩기름, 목화씨기름, 참깨기름, 호두기름 및 홍화씨기름을 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 그리고 0.4 mg/mL씩 처리하여 세포독성을 확인한 결과, 녹차씨기름, 땅콩기름, 목화씨기름, 참깨기름에서 최고농도인 0.4 mg/mL에서만 독성이 관찰되었다. 그러나 이 농도는 DMSO 대조군 시험의 함량별 세포독성과 동일한 형태를 보여, 종실유에 의한 독성보다 DMSO의 함량증가에 의한 독성으로 판단된다. 고추씨기름, 호두기름, 홍화씨기름에서는 0.4 mg/mL 농도까지 유의한 수준의 독성

이 관찰되지 않았다. 3T3-L1 세포를 이용하여 수행한 세포독성 시험을 바탕으로 모든 종실유에서 공통으로 세포독성이 관찰되지 않는 0.2 mg/mL 농도 이하에서 향후의 모든 실험을 수행하였다.

핵산 추출 종실유의 처리에 의한 지방축적량 변화 측정

Adipocyte로의 분화가 완료된 3T3-L1세포에 종실유를 처리한 후 세포의 지방축적변화를 세포내 지방구의 함량을 oil red O 염색법으로 측정함으로써 종실유가 지방세포 비대화에 미치는 영향을 관찰할 수 있다. 분화된 3T3-L1 세포에 종실유를 각각 0.05 mg/mL 및 0.1 mg/mL를 처리한 결과 지방축적량에 변화가 관찰되었으며 그 결과는 Fig. 2에 정리된 바와 같다. Adipocyte로 분

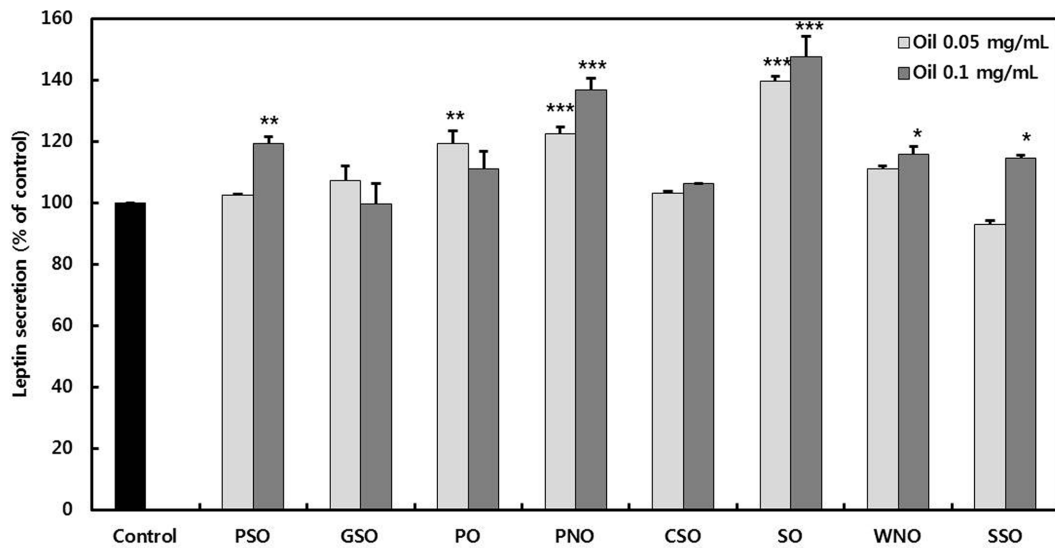


Fig. 3. Induction of leptin secretion by treatment of 3T3-L1 adipocytes with seed oils. Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/mL) of seed oils. Leptin secretion was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results are presented as mean±SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to the control. PSO: pepper (*Capsicum annuum* L.) seed oil, GSO: green tea (*Camellia sinensis* L.) seed oil, PO: perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara) seed oil, PNO: peanut (*Arachis hypogaea* L.) oil, CSO: cotton (*Gossypium indicum* LAM.) seed oil, SO: sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil, WNO: walnuts (*Juglans regia* L.) oil, SSO: safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil.

화가 완료된 세포의 지방축적량을 나타내는 control 그룹과 adipocyte에 고추씨기름, 녹차씨기름, 들깨기름, 땅콩기름, 목화씨기름, 참깨기름, 호두기름, 홍화씨기름을 각각 0.05 mg/mL와 0.1 mg/mL를 처리한 그룹들을 비교한 결과 control (100%) 대비 고추씨기름은 각각 약 67, 85%, 녹차씨기름은 79, 94%, 들깨기름은 63, 72%, 땅콩기름은 58, 68%, 목화씨기름은 89, 113%, 참깨기름은 93, 112%, 호두기름은 77, 79%, 홍화씨기름은 80, 78%까지 지방적의 형성의 변화가 관찰되었다. 그중 고추씨기름 0.05 mg/mL, 들깨기름 0.05, 0.1 mg/mL, 땅콩기름 0.05, 0.1 mg/mL을 처리하였을 때 control 대비 유의한 수준으로 지방구의 형성을 억제하는 것이 관찰되었다. 이는 Sessler 등(35)이 발표한 polyunsaturated fatty acid (arachidonic acid, linoleic acid 및 linolenic acid)에 의한 지방산합성효소인 stearoyl-CoA desaturase 1 유전자의 안정성 저해가 원인이 되어 triacylglycerol의 축적이 저해되기 때문으로 유추된다(36). 그러나 종실유에 의한 stearoyl-CoA desaturase 1 유전자 발현 및 안정성에 관한 연구가 필요할 뿐만 아니라 실험에 사용된 모든 소재가 linoleic acid를 다량 함유하고 있어 stearoyl-CoA desaturase 1 유전자의 안정성 저해 한가지만이 원인은 아닌 것으로 판단된다. 또한 농도의존적인 지방축적 억제효과가 감소하는 것이 관찰되고 있어, 이는 유효 성분이 포함되어 있지만 종실유의 과량 섭취는 지방세포의 비대화를 유도할 수 있음을 보여준다.

핵산 추출 종실유의 leptin 방출유도 효과

Leptin은 지방세포로부터 분비되는 호르몬으로 혈중 leptin 농도는 체지방량에 비례하여 증가하며, 에너지 대사를 증가시키고 식이섭취량을 감소시켜 체중을 조절하는 것으로 알려져 있다(37). 본 실험에서는 3T3-L1세포를 이용하여 고추씨기름, 녹차씨기름, 들깨기름, 땅콩기름, 목화씨기름, 참깨기름, 호두기름, 홍화씨기름을 각각 0.05, 0.1 mg/mL를 처리한 후 방출되는 leptin의 함량을 배지에서 측정하였으며 그 결과는 Fig. 3와 같다. 종실유 0.05 mg/

mL과 0.1 mg/mL을 처리한 결과, adipocyte control (100%) 대비 각각 고추씨기름 102, 119%, 녹차씨기름 107%, 99%, 들깨기름 119, 110%, 땅콩기름 122, 136%, 목화씨기름 103, 106%, 참깨기름 139, 147%, 호두기름 111, 115%, 홍화씨기름 93, 114%를 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 고추씨기름, 들깨기름, 땅콩기름, 참깨기름, 호두기름, 홍화씨기름에서 control 대비 유의한 leptin 분비증가를 확인할 수 있었으며, 녹차씨기름과 목화씨기름에서는 leptin의 유의한 증가를 확인할 수 없었다. 지방축적을 억제하고 고추씨기름, 들깨기름, 땅콩기름과 지방축적 감소경향을 보인 호두기름과 홍화씨기름에서의 leptin 분비량 증가는 식욕억제와 에너지 대사 촉진을 통한 비만억제의 효과를 유추할 수 있는 결과로 판단되며, 참깨기름에서의 leptin 분비량 증가는 통계적으로 유의한 수준은 아니지만 지방세포가 지방을 축적하면서 비대해진 영향으로 leptin의 분비량이 증가한 것(38)으로 유추할 수 있다. 그러나 참깨기름의 지방세포비대에 미치는 영향에서 유의성을 관찰하지 못한 만큼 leptin 분비에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다. 식물성기름의 식욕억제에 관한 연구는 Pasman 등(39)과 Hughes 등(40)이 사람을 대상으로 잣기름의 섭취가 endogenous cholecystokinin과 glucagon like peptide-1의 증가를 유도하여 식욕을 억제할 수 있음을 보고한 바 있다. 이는 종실유의 식욕억제 기능의 가능성과 함께 endogenous cholecystokinin과 glucagon like peptide-1의 증가에 미치는 영향 및 leptin의 분비유도에 대한 추가적인 연구가 필요함을 의미한다.

요 약

본 연구에는 고추씨기름, 녹차씨기름, 들깨기름, 땅콩기름, 목화씨기름, 참깨기름, 호두기름, 홍화씨기름의 fatty acid 구성을 분석하여 oleic acid, linoleic acid 등의 불포화 지방산이 과반이상 함유되어 있음을 확인하였으며 들깨기름은 특이하게 linolenic acid (57.8%)가 과반이상 함유된 것을 확인할 수 있었다. 원재료의 일 반성분과 추출한 기름의 품질을 측정하여 식용유 및 튀김용 기

름으로 사용하기에 식품공전의 식용유지 및 튀김용유지의 기준 및 규격에 잠재적으로 적합함을 확인하였다. 또한 종실유들의 생리활성을 예측하기 위해 세포독성, 지방축적 및 leptin 방출에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 실험에 사용된 모든 종실유가 0.2 mg/mL 이하에서 독성이 나타나지 않았으며, 고추씨기름(67%, 0.05 mg/mL), 들깨기름(63%, 0.05 mg/mL; 72%, 0.1 mg/mL), 땅콩기름(58%, 0.05 mg/mL; 68%, 0.1 mg/mL)의 처리가 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$, $p < 0.001$)에서 3T3-L1 세포내 지방축적을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, 고추씨기름(119%, 0.1 mg/mL), 들깨기름(119%, 0.05 mg/mL), 땅콩기름(122%, 0.05 mg/mL; 136%, 0.1 mg/mL), 참깨기름(139%, 0.05 mg/mL; 147%, 0.1 mg/mL), 호두기름(115%, 0.1 mg/mL), 홍화씨기름(114%, 0.1 mg/mL)의 처리가 3T3-L1 세포에서 leptin의 분비를 통계적으로 유의하게($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) 증가시키는 것이 관찰되었다. 종실유의 정제 및 대량생산 공정개발 등의 향후 연구가 많이 남아있지만 본 연구를 통해 다양한 종류의 종실유들이 식용유소재 및 요리재료로 사용될 수 있는 잠재적 가능성을 가지고 있음을 확인하였으며 유효한 생리활성을 포함하고 있어 기능성 소재로의 개발가치가 높음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부 고부가가치 식품개발사업 (312001-03-01-HD040), 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터 (B0009702) 및 강원대학교 생명공학연구소 (320130015)의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

1. Kwak CS, Choi HM. Effect of intake of perilla oil or corn oil and 2-acetylaminofluorene treatment on lipid peroxidation, prostaglandin E2 and thromboxane B2 productions in rats. *J. Nutr. Health* 25: 351-359 (1992)
2. Choi KS, Shin KO, Kim YH, Yoo IS, Jeong H, Kim KS, Lee JS. The effect of *Prunus sargentii* R. seed oil on the lipid profile in serum in mice. *Korean J. Food Nutr.* 26: 670-677 (2013)
3. Lim JK. Oil and fat industry. Available from: http://www.kfia.or.kr/kfia/publication/2004/s181/HSPGBF_2004_s181_10.pdf Accessed May 26, 2014
4. Kim BJ, Ahn MS. A study on the oxidative stabilities and organoleptic properties of Korean red pepper seed oil upon species and dried methods. *Korean J. Food Cook Sci.* 14: 380-387 (1998)
5. Lee MS, Kim CT, Kim IH, Kim Y. Effects of capsaicin on lipid catabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother. Res.* 25: 935-939 (2011)
6. Han J, Isoda H. Capsaicin induced the upregulation of transcriptional and translational expression of glycolytic enzymes related to energy metabolism in human intestinal epithelial cells. *J. Agr. Food Chem.* 57: 11148-11153 (2009)
7. Kim JK, Kim SH, Noh KH, Jang JH, Song YS. Effects of green tea oil on the cholesterol, TBARS and inflammatory responses in C57BL/6 mice fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 284-290 (2007)
8. Kim NH, Choi SK, Kim SJ, Moon PD, Lim HS, Choi IY, Na HJ, An HJ, Myung NY, Jeong HJ, Um JY, Hong SH, Kim HM. Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Pflug. Arch. European J. Phys.* 457: 293-302 (2008)
9. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 54: 2951-2956 (2006)
10. Baek SE. Oxidative stability of perilla oil by storage temperature.

- J. East Asian Soc. Dietary Life 4: 97-102 (1994)
11. Akhtar S, Khalid N, Ahmed I, Shahzad A, Suleria HA. Physico-chemical characteristics, functional properties, and nutritional benefits of peanut oil: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54: 1562-1575 (2014)
12. Yoon HS, Kim SB, Park YH. Analysis of molecular species of vegetable oil triglycerides by capillary column GC-MS. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 391-398 (1989)
13. Park CH, Choi KJ, Shim KB, Ha TJ, Lee MH, Hwang JD, Pae SB, Park KY, Baek IY. Studies on the improvement of roasting condition of sesame seed for producing seed season and oil. *Korean J. Crop Sci.* 56: 205-211 (2011)
14. Oh SC. Benzo(a)pyrene reduction in sesame oil using microwaving method. *J. Korean Oil Chemists' Soc.* 29: 323-329 (2012)
15. Seo YH, Kim UH, Kim KM, Hwang TY, Son HS. Physico-chemical composition and anti-allergic effects of walnut oil. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 11: 204-208 (2001)
16. Cox C, Mann J, Sutherland W, Chisholm A, Skeaff M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *J. Lipid Res.* 36: 1787-1795 (1995)
17. Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu CL, Wang Y, Pypaert M, Petersen KF, Shulman GI. Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* 282: E395-E401 (2002)
18. Wang S, Choe E. Effects of light on temperature dependence of safflower oil oxidation and tocopherol degradation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 287-292 (2012)
19. Watkins BA, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KG, Seifert MF. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J. Nutr.* 127: 1084-1091 (1997)
20. http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp. Accessed Apr. 04, 2014
21. AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 5th ed. Method cd 12-57. American Oil Chemists' Society. Champaign, IL, USA (1998)
22. Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and glucosidase inhibition activities among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 24: 101-108 (2014)
23. Kang ES, Ham SA, Hwang JS, Lee CK, Seo HG. Effects of *Garcinia cambogia* extract on the adipogenic differentiation and lipotoxicity. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 411-416 (2013)
24. Maeda T, Horiuchi N. Simvastatin suppresses leptin expression in 3T3-L1 adipocytes via activation of the cyclic AMP-PKA pathway induced by inhibition of protein prenylation. *J. Biochem.* 145: 771-781 (2009)
25. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini-Rev. Med. Chem.* 13: 201-210 (2013)
26. Carrillo C, Cavia Mdel M, Alonso-Torre SR. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: a review. *Nutr. Hosp.* 27: 1860-1865 (2012)
27. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 909-917 (2005)
28. Matravadia S, Herbst EA, Jain SS, Mutch DM, Holloway GP. Linoleic and a-linolenic acid both prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* E102-E114 (2014)
29. Rajaram S. Health benefits of plant-derived a-linolenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 100 (Supplement 1): 443S-448S (2014)
30. Ku KH, Choi EJ, Park JB. Chemical component analysis of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seed with various cultivars. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1084-1089 (2008)
31. Rah HH, Baik SO, Han SB, Bock JY. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinensis* L.). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Cham.* 35: 272-275 (1992)

32. Ji JL, Jeong HC. Quality characteristics and dough rheological properties of pan bread with perilla seed powder. *Korean J. Culinary Res.* 19: 142-155 (2013)
33. Lee MJ, Kim KH. The comparison in the physicochemical properties of sesame seeds by producing areas. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 128-131 (2005)
34. Miao J, Che K, Xi R, He L, Chen X, Guan X, Zhuang X, Wen X, Cao Y. Characterization and benzo[a]pyrene content analysis of *Camellia* seed oil extracted by a novel subcritical fluid extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90: 1503-1508 (2013)
35. Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 29854-29858 (1996)
36. Ralston JC, Badoud F, Cattrysse B, McNicholas PD, Mutch DM. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes upregulates elongase 6 and downregulates genes affecting triacylglycerol synthesis. *Int. J. Obes. (Lond)* 38: 1449-1456 (2014)
37. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671 (2000)
38. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY. Antiobesity effect of *kochujang* (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J. Med. Food* 9: 15-21 (2006)
39. Pasman WJ, Heimerikx J, Rubingh CM, van den Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks HF, Einerhand AW, Scott C, Keizer HG, Mennen LI. The effect of Korean pine nut oil on *in vitro* CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids Health Dis.* 7: 10 (2008)
40. Hughes GM, Boyland EJ, Williams NJ, Mennen L, Scott C, Kirkham TC, Harrold JA, Keizer HG, Halford JC. The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids Health Dis.* 7: 6 (2008)