

유자씨유의 지방산분석 및 Nitric Oxide 생성, 지방축적능, 렙틴분비 조절효과*

김태우^{1**} · 김경곤^{2**} · 강윤환^{1**} · 김대중¹ · 최 먼^{1,2†}

강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터, ¹ 강원대학교 생명건강공학과²

Fatty acid analysis and regulatory effects of citron (*Citrus junos* Sieb. ex TANAKA) seed oil on nitric oxide production, lipid accumulation, and leptin secretion*

Kim, Tae Woo^{1**} · Kim, Kyoung Kon^{2**} · Kang, Yun Hwan^{1**} · Kim, Dae Jung¹ · Choe, Myeon^{1,2†}

¹Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

ABSTRACT

Purpose: Citron seed oil (CSO) has been reported to have high antioxidant activity. However, the composition and other biologically activities of CSO have not been reported. In this study, we confirmed the fatty acid composition of CSO, which may be beneficial to vascular disease and obesity. **Methods:** We investigated the oil composition of CSO using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis, and cytotoxicity was confirmed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Nitric oxide (NO) production in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was measured using Griess reagent, and lipid accumulation and leptin secretion in 3T3-L1 cells were measured by Oil-Red O staining and commercial ELISA kit, respectively. **Results:** GC-MS analysis indicated that CSO contains several components, including linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid, linolenic acid, palmitoleic acid, and arachidic acid. In physiological activity analysis, CSO did not induce cytotoxic effects in HUVECs and 3T3-L1 cells. Further, CSO significantly induced nitric oxide and leptin secretion as well as inhibited lipid accumulation. **Conclusion:** CSO increased NO release, inhibited lipid accumulation, and induced leptin secretion, suggesting it may be useful for the management of vessels and weight gain. Although further studies are required to investigate the safety and mechanism of action of CSO, our results show that the composition and physiological activity of CSO are sufficient for its use as functional edible oil.

KEY WORDS: citron seed oil, fatty acid composition, nitric oxide, leptin, lipid accumulation.

서 론

유자 (*Citrus junos* Sieb. ex TANAKA)는 특유의 향미로 인해 전통적으로 차류 등의 기호식품으로 널리 애용되어왔으며, 비타민 C 함유량이 풍부하고 다양한 종류의 플라보노이드를 함유하고 있어 민간에서는 감기치료제로 이용되어 왔다. 최근 연구에 의하면 과피 추출물에서 AMP-activated protein

kinase (AMPK)와 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 를 통한 항비만효과가 확인되었으며, 과피로부터 추출한 oil에서 lipolytic activity가 확인되었다.^{1,2} 또한, 유자과피의 정유로부터 분리된 limonene은 항염증효과를 나타내는 것으로 보고되었다.³ 그러나 우수한 기능성 천연소재인 유자의 제품화과정에서 총 중량의 약 15%에 이르는 유자씨를 대부분 폐기하는 실정이며 그 활용을 위한 연구는 아직 활발히 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

Received: Jun 24, 2014 / Revised: Jul 11, 2014 / Accepted: Jul 31, 2014

*This work was supported by grants of High Value-added Food Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (312001-03-01-HD040), Well-being Bioproducts Regional Innovation Center project (B0009702) and Kangwon National University Institute of Biosciences and Biotechnology (320130015).

[†]To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-33-250-8645, e-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

**These authors contributed equally to this work.

© 2014 The Korean Nutrition Society

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.

유자씨 (Citron seed oil, CSO)에 대한 연구로는 일반성분 분석에서 지방의 함량이 약 35%로 가장 높았고 조단백질 16%, 수분 7.2%, 조회분 3%으로 보고되었고⁴ 유자씨유의 지방산은 linoleic acid 33.0%, oleic acid 27.7 %, palmitic acid 16.5%, stearic acid 11.0 % , linolenic acid 1.5%로 oleic acid와 linoleic acid가 대부분을 차지한다고 보고되었다.⁵ Oleic acid는 상처치료, 면역 및 염증 질환과 암에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 linoleic acid는 항염증작용이 잘 알려져 있다.^{6,7} 유자씨의 효능에 대한 연구는 Woo 등⁸과 Kim & Shin⁹에 의한 유자씨 추출물의 항산화 효과, Lee 등¹⁰에 의한 항암효과, Kim 등¹¹에 의한 항노화 및 미백효과, Minamisawa 등¹²에 의한 유자씨유의 항산화 효과 등이 있다.

근대의 서구화된 식생활과 외식산업의 발전은 전통적인 식사량을 감소시키고, 고열량 식사와 인공 감미료 사용을 증가시켜 현대인들의 고혈압, 동맥경화, 당뇨 및 비만 등의 만성대사 질환 발생을 지속적으로 증가시켰다.¹³ 이를 극복하기 위한 건강증진 효능물질을 포함한 천연식품의 개발과 연구가 지속적으로 활발하게 진행되고 있다.¹⁴ 그 중 식용유의 연구가 활발히 진행되고 있는데, 가정용 식용유의 주를 이루던 대두유를 대신해 건강기능성이 강조된 홍화유, 올리브유, 해바라기유 등이 증가하는 추세다.¹⁵ 또한 단백질, 탄수화물과 함께 3대 영양소로 알려진 지방의 섭취가 지속적으로 증가하면서 현대인의 건강에 문제를 일으키자 인체에 이로운 불포화 지방산의 발굴과 기능연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁵

NO는 혈관내피세포에서 분비되는 대표적인 혈관이완 인자이며 혈관이완 기전이 잘 알려져 있다.^{16,17} 이는 서구식생활에 의한 고혈압, 동맥경화와 같은 혈관질환의 개선에 도움을 줄 수 있는 인자이다. 3T3-L1은 지방세포로의 분화가 가능하며 분화가 완료된 세포에서는 지방의 합성과 분해에 관련되는 다양한 메커니즘의 연구가 가능하다.¹⁸ 그러므로 이 세포모델을 이용한 지방축적 저해효과의 관찰은 소재의 항비만효과 평가하는 대표적인 *in vitro* 연구방법이다. Leptin은 지방세포에서 분비되는 주요 호르몬 중 하나로 혈중농도는 체지방량에 비례하여 증가하며¹⁹ 순환계를 통해 뇌로 운반되면 시상하부 신경세포의 leptin 수용체와 결합하여 신호를 전달하게 되며 그로인해 음식섭취를 줄이고 에너지소비를 증가시키는 것으로 알려져 있다.²⁰ 이는 leptin의 분비촉진이 과체중 개선에 도움이 될 수 있음을 시사한다.

이에 본 연구는 유자씨유 (Citron seed oil, CSO)의 지방산을 분석하고, 내피세포와 지방세포를 이용하여 CSO의 NO 및 leptin의 분비 증가와 지방축적 억제효능을 확인함으로써 이를 이용한 다양한 제품의 개발 및 응용에 근거자료를 제공하고 자 한다.

연구 방법

유자씨유 (CSO) 제조

유자씨유 (CSO)는 유자씨 550 g에 n-hexan 700 ml를 혼합 후 30분 동안 초음파 추출하고 그대로 24시간 침지 시킨 후 0.45 μ m filter로 여과하여 감압 농축하여 확보하였다.

CSO의 3T3-L1 세포에 대한 독성

CSO의 세포독성은 Cell Counting Kit (CCK)-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 통해 확인하였다.²¹ 내피 세포의 NO 분비량 측정을 위한 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)과 지방축적과 leptin 분비량 측정을 위한 3T3-L1의 분화 전 세포를 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 각각 96 well에 1.5×10^5 cell/well로 분주한 후 24시간 부착시킨다. FBS가 첨가되지 않은 배지에서 CSO를 0.01~0.4 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 37℃에서 배양 하였다. 24시간 후 배양중인 배지 (200 μ l)에 CCK-8 reagent를 20 μ l씩 가해주고 3시간 동안 37℃에서 배양한 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교 하였다.

CSO의 지방산 분석

GC 분석용 시료 준비

GC 분석을 위한 CSO 샘플의 fatty acid methyl ester화는 Watkins 등²²의 방법을 이용하였다. CSO 25 mg을 cap-tube에 칭량하고 0.5 N methanolic NaOH 1.5 ml를 가한 뒤 약 100℃의 히팅블록에서 5분간 가열한다. 식물성 유지에는 트리글리세라이드의 양이 적어 비누화로 메틸레이션을 촉진시킨다. 가열된 시료를 30~40℃의 수욕상에서 1~2분간 냉각된 시료에 촉매역할을 위해 14% BF-methanol (Supelco Inc, bellefonte, PA, USA) 2 ml를 가한 후 vortex하여 충분히 혼합하고 약 100℃ 히팅블록에서 약 2분간 가열한다. 이후 30~40℃ 수욕상에서 1~2분간 방치하여 완전히 냉각 시킨다. 냉각된 CSO에 Isooctane 2 ml와 효과적인 층 분리를 유도하기 위해 saturated NaCl 1 ml를 가하고, 이후 충분히 vortex하여 1~2분간 방치한 뒤 상층액을 회수하고 sodium sulfate를 이용하여 여과, 탈수 한 뒤 gas chromatography (Agilent 6890N GC/FID, China)로 분석 하였다.

분석방법

시료 중 지방산의 분석은 식품공전의 일반분석법 중 “1.1.5.4

Table 1. Analysis condition of GC and GC/MSD

Item	Condition	
	GC	GC/MSD
Column	Supelco SP-2560 (US) (100 m × 0.25 mm I.D, 0.20 μm film)	Supelco SP-2560 (US) (100 m × 0.25 mm I.D, 0.20 μm film)
Detector	FID, 260℃	—
Oven	100℃ (3 min) → 3℃ /min → 240℃ (20 min)	100℃ (3 min) → 3℃ /min → 240℃ (15 min)
Injector	225℃	240℃
Split ratio	100 : 1	10 : 1
Injection volume	1 μl	0.2 μl
Mobile phase	He, 0.8 ml/min	He, 0.75 ml/min

지방산²³에 기초하여 gas chromatography를 이용하여 지방산을 분석하였다. 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. CSO는 standard fatty acid mix의 retardation time을 기준으로 지방산의 종류를, 지방산 함량은 내부표준 물질 undecanoic acid을 기준으로 계산하였으며 분석조건은 Table 1과 같다

HUVECs의 Nitric oxide (NO) 측정

CSO의 NO 분비량은 Griess Reagent를 이용하여 Zhang 등¹⁶의 방법에 따라 확인하였다. HUVEC을 96-well tissue culture plate에 1×10^5 cells/well로 100 μl씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지에 농도별로 제조한 CSO와 TNF-α (100 ng/ml)를 세포에 처리한 후 24시간 동안 37 ℃에서 배양 하였다. 24시간 후 배양중인 배지 100 μl에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 ELISA microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3T3-L1 지방축적 측정

3T3-L1세포 분화 및 지방축적 측정은 Oh 등의 방법을 이용하여 수행하였다.²⁴ 3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 100 U/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 첨가하여 5 % CO₂, 37 ℃에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5×10^5 cell/well의 세포를 분주하여 세포가 충분히 밀집되게 배양하였고 2일 후 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μM dexamethasone, 10 μg/ml insulin)solution과 10%

FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 3일 동안 배양함으로써 분화를 개시한 다음, 10 μg/ml insulin 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 3일 동안 분화를 진행시켰다. 그 이후로는 10% FBS만을 포함하는 DMEM배지에서 배양함으로써 세포 내 지방축적에 의해 지방방울 (lipid droplet)을 형성하는 지방세포로 분화시켰으며, 지방축적량은 Oil Red O를 사용하여 확인하였다.²⁵

3T3-L1의 Leptin 분비량 측정

지방세포에서 분비되어 배지에 함유된 렙틴의 양은 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.²⁶ 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 배양하였다. PBS-T로 3차례 세척한 후 100 μl의 biotinylated rabbit anti-mouse leptin IgG (200 ng/ml)을 넣고 1시간 동안 상온에서 배양한 후 다시 PBS-T로 3번 세척하였다. 각 well에 100 μl의 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 넣고 30분 동안 빛이 들어가지 않는 상태에서 반응시킨다. 이 반응은 well 당 50 μl의 2 M H₂SO₄를 첨가함으로써 종료시킨다. 반응 종료 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)로 450 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Leptin 분비량은 대조군과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) program을 이용하여 독립적인 3회 반복 실험값을 mean±SD로 표시하였고, 두 그룹간의 차이는 unpaired two-tailed t-tests로 분석하였으며 두 그룹 이상 비교는 one-way ANOVA test 후에 Duncan's multiple range test에 의해 p < 0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

CSO의 세포독성

CSO는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 하여 본 실험

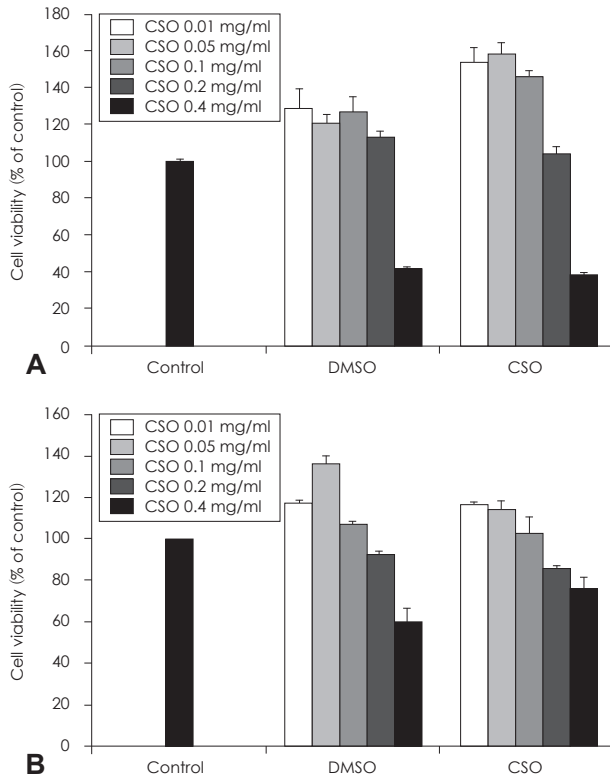


Fig. 1. Concentration-dependent effects of citron seed oil (CSO) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and 3T3-L1 cell growth. A: Cytotoxicity of CSO on HUVECs. B: Cytotoxicity of CSO on 3T3-L1. Cell viability was analyzed using the CCK-8 assay kit. Each bar is the Mean \pm S.D. from three independent experiment.

험에 사용되었으므로 CSO의 3T3-L1 세포에서의 독성실험은 DMSO 용매단독 처리군과 비교하여 확인하였다 (Fig. 1). HUVECs과 3T3-L1 세포에 CSO 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 그리고 0.4 mg/ml을 농도에 따라 처리하였으며 최고농도인 0.4 mg/ml에서 독성이 관찰되었다. 그러나 CSO 처리농도에 따라 배지에 처리되는 DMSO (0.5%, 2.5%, 5%, 10%, 20%)용매만을 단독 처리한 군에서도 CSO 독성실험과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 이는 실험에서 관찰된 CSO의 세포독성이 oil성분이 아닌 DMSO의 농도에 따른 것임을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 이후의 실험에서는 CSO 0.2 mg/ml 농도 이하에서 수행하였다.

CSO의 fatty acid 구성 분석

CSO에 함유된 성분을 분석한 결과 Fig. 2와 Table 2에 정리한 바와 같다. 분석결과 oleic acid 32%, linoleic acid 34%, palmitic acid 19.2%, stearic acid 3.8%, linolenic acid 2.0%, palmitoleic acid 0.6%, arachidic acid 0.3%가 확인되었다.

CSO 처리에 의한 HUVECs의 nitric oxide (NO) 분비량

NO는 혈관내피세포에서 분비되는 대표적인 혈관이완 인자이며 혈관이완 기전이 잘 알려져 있다. 본 실험에서는 CSO 처리가 HUVEC에서 NO의 분비에 미치는 영향을 배지내 NO의 함량을 측정함으로써 확인할 수 있었으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. TNF- α 의 처리에 의해 NO의 방출이 control 대비 약 12.4% 통계적으로 유의하게 감소된 것을 관찰하였으며, TNF- α 와 함께 CSO를 처리한 경우 TNF- α 단독처리군 대비 0.01 mg/ml에서 1.9%, 0.05 mg/ml에서 1% 소폭 감소한 것으로 관찰되다가 0.1 mg/ml에서 통계적으로 유의한 15.6%의 NO 분비 증가효과가 관찰되었다. 0.01 mg/ml과 0.05 mg/ml에서의 변화는 통계적으로 유의한 수준이 아니었지만 0.1 mg/ml

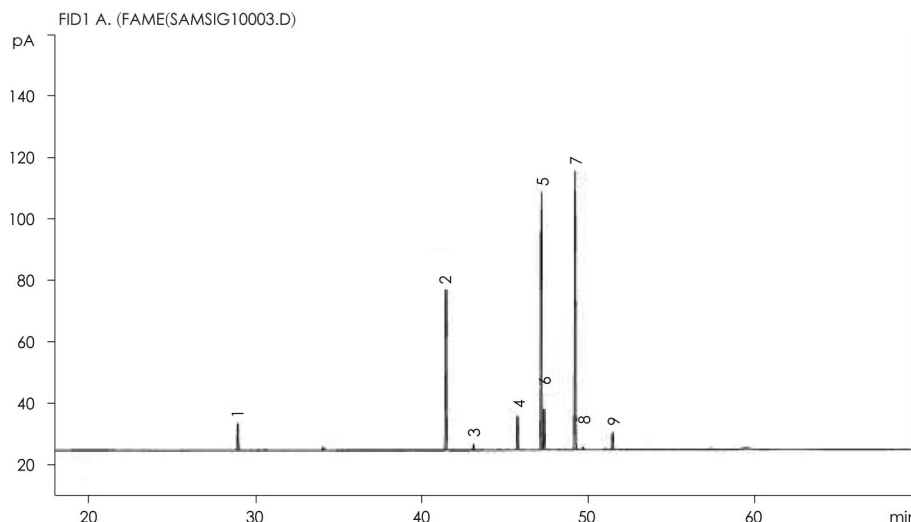


Fig. 2. GC chromatograms and MS fragments of individual fatty acids extracted from citron seed oil (CSO). 1: undecanoic acid, 2: palmitic acid, 3: palmitoleic acid, 4: stearic acid, 5: oleic acid, 6: Unknown, 7: linoleic acid, 8: arachidic acid, 9: linolenic acid.

Table 2. Fatty acid profiles of citron seed oil (CSO)

Peak #	Name (acid methyl esters)	Ret time (min)	Area	Area %
1	Undecanoic acid methyl ester ¹⁾	29.115	33.35	3.27
2	Palmitic acid methyl ester	41.618	195.51	19.16
3	Palmitoleic acid methyl ester	43.268	6.3	0.62
4	Stearic acid methyl ester	45.898	38.33	3.76
5	Oleic acid methyl ester	47.341	326.72	32.01
6	Unknown	47.5	45.71	4.48
7	Linoleic acid methyl ester	49.365	346.9	33.99
8	Arachidic acid methyl ester	49.839	2.69	0.26
9	Linolenic acid methyl ester	51.613	20.91	2.05

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

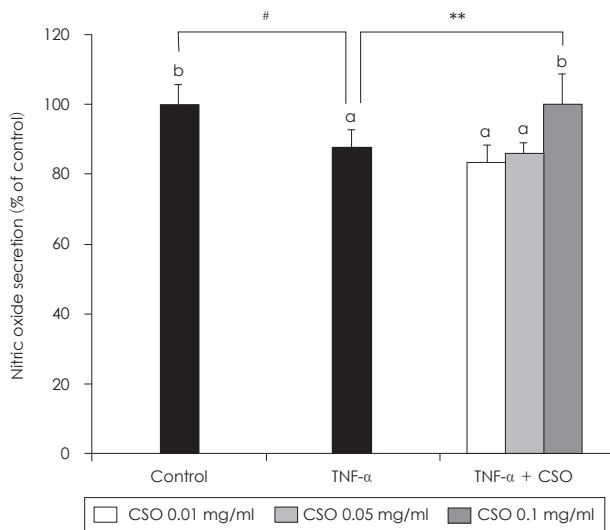


Fig. 3. Effect of citron seed oil (CSO) on nitric oxide (NO) secretion in HUVECs. Reductions of NO by TNF- α were recovered by CSO (0.1 mg/ml) treatment. Results are presented as Mean \pm S.D. of three independent experiments. #: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$ as compared to the TNF- α (100 ng/ml), different letters on the bars (a and b) indicate significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

에서는 통계적으로 유의한 수준의 NO 분비 개선효과를 관찰할 수 있었으며, Duncan's multiple range test를 통해 CSO 0.1 mg/ml 처리군의 NO 분비량이 control 수준 (통계값 b)으로 회복되는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 CSO가 TNF- α 에 의한 혈관이완인자인 NO 분비억제작용을 저해함으로써 혈관건강에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

CSO 처리에 의한 지방축적량 변화 측정

CSO 처리가 3T3-L1 adipocyte의 지방축적을 얼마나 저해할 수 있는지 Oil Red O staining을 통해 확인하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. Preadipocyte에서 adipocyte로 분화가 완료된 control 그룹과 adipocyte에 CSO 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml을 처리한 그룹을 비교한 결과 control (100%) 대비 약 27.5%,

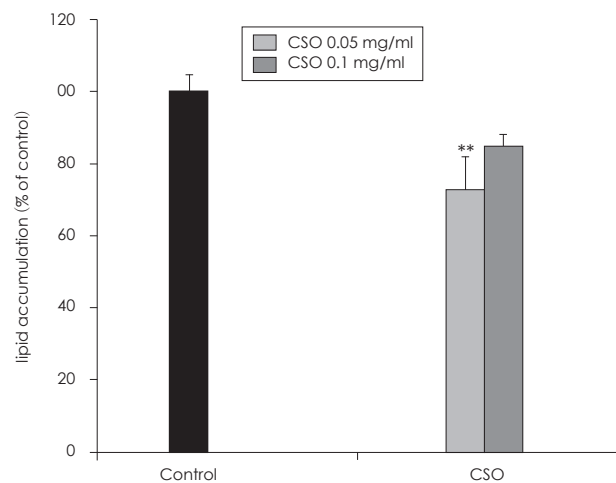


Fig. 4. Citron seed oil (CSO) inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/ml) of CSO and lipid accumulation was determined by Oil Red O staining. Results are presented as Mean \pm S.D. of three independent experiments. **: $p < 0.01$ as compared to the control by unpaired two-tailed t-tests.

15.1%의 지방적 형성 억제효과가 관찰되었다.

CSO의 leptin 분비유도 효과

본 실험에서는 3T3-L1세포를 이용하여 CSO 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml을 처리하였을 때 분비되는 leptin의 함량을 배지에서 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5와 같다. 분비되는 leptin의 함량은 지방세포분화가 완료된 control군 (100%)대비 CSO 0.05 mg/ml에서 144.5%, CSO 0.1 mg/ml에서 138.3%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

고찰

유자는 고유의 향미로 인해 차류 등의 기호식품으로 민간에서 애용되고 제품화되어 판매되기도 한다. 그러나 유자의 제품화과정에서 총 중량의 약 15%에 이르는 유자씨를 대부분 폐

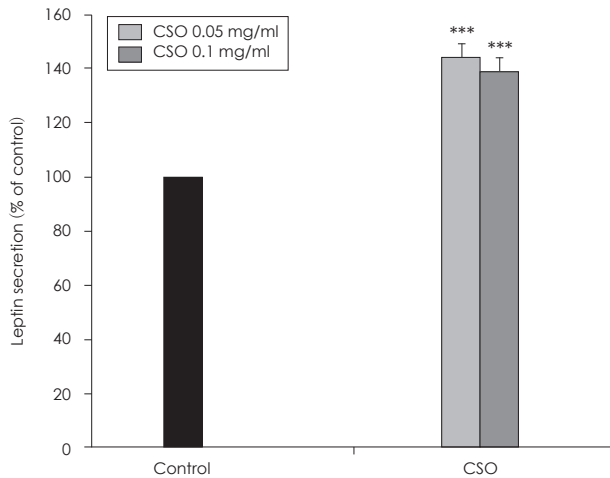


Fig. 5. Citron seed oil (CSO) induces leptin secretion in 3T3-L1 cells. Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/ml) of CSO. Leptin secretion was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results are presented as Mean \pm S.D. of three independent experiments. ***: $p < 0.001$ as compared to the control by unpaired two-tailed t-tests.

기되며 그 기능과 활용에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 연구는 유자씨로부터 기름성분을 추출 (Citron seed oil, CSO) 하여 지방산을 분석하였고, 생리활성으로는 HUVECs의 Nitric oxide 분비, 3T3-L1 세포의 지방적 측정, Leptin 분비량을 확인함으로써 CSO 기능에 대한 기초자료를 확보함과 동시에 그 활용가능성을 검토하고자 실험을 진행하였다.

CSO의 fatty acid 지방산분석은 Lee 등⁵과 Jeong 등²⁷의 연구에 의하면 oleic acid 27.7~37.3%, linoleic acid 33~36.5%, palmitic acid 16.5~20.1%, stearic acid 4.4~11%, linolenic acid 1.5~1.7%로 조사되었는데 본 실험 결과에서는 oleic acid 32%, linoleic acid 34%, palmitic acid 19.2%, stearic acid 3.8%, linolenic acid 2.0%, palmitoleic acid 0.6%, arachidic acid 0.3%로 유사하였으며 oleic acid와 linoleic acid가 과반을 차지하였다.

NO는 혈관내피세포에서 분비되는 대표적인 혈관이완 인자이며 NO-cGMP-PKG pathway에 의한 혈관이완 기전이 잘 알려져 있다.^{17,28} CSO에 의한 HUVEC에서의 NO 분비량 변화를 측정된 결과 TNF- α 에 의해 감소된 NO의 분비량이 CSO의 처리로 인해 증가하는 것이 관찰되었다. CSO 0.01 mg/ml과 0.05 mg/ml 처리군에서의 NO 분비량 변화는 유의한 수준이 아니었지만 0.1 mg/ml에서는 통계적으로 유의한 수준의 NO 분비 개선효과가 확인되었으며, control 수준까지 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 CSO가 TNF- α 에 의한 혈관이완인자 NO 분비억제작용을 회복시킴으로써 혈관건강에 도움을 줄 수 있음 시사하는 것이며, 이는 El-Mosallamy 등²⁹이 고혈압이 유도된 쥐에서 관찰한 호박씨유의 NO 발생

유도를 통한 항고혈압효과와 유사한 효능을 CSO도 나타낼 수 있음을 의미하는 것이므로 CSO의 혈압저하 기능에 대한 추가적인 기전연구가 필요할 것으로 판단된다.

경제적 발전에 따른 서구화된 고열량 식사가 현대인들의 만성대사질환 발생을 증가시키고 있음¹³을 서론에서 설명하였으며 이를 해결하기 위한 노력으로 기능성 식재료에 관한 연구와 개발이 활발하게 진행되고 있다.^{13,14} 그 중 현대인들의 비만과 혈관질환의 원인이 되고 있는 식용유의 기능화연구가 활발히 진행되고 있어¹⁵ 본 연구는 CSO를 이용하여 기능성식용유의 가능성을 실험하였으며 먼저 성분분석을 통해 불포화지방산인 oleic acid와 linoleic acid 등이 과반을 차지하는 것을 확인했으며 지방축적예방 등의 기능성을 확인하고자 지방세포내 지방적형성의 억제효과를 평가하였다. 그 결과 CSO를 처리하지 않은 control군과 비교하여 CSO 0.01 mg/ml 처리군에서는 control군과의 차이를 관찰할 수 없었지만 (data not shown) 0.05 mg/ml과 0.1 mg/ml을 처리한 실험군에서는 유의하게 지방적의 형성이 감소되는 것을 Oil-Red O staining을 통해 확인하였다. 농도의존적인 지방적 억제효과는 관찰되지 않았으나 0.05 mg/ml CSO의 처리가 3T3-L1 세포에서의 지방적 형성을 약 27% 억제하는 결과를 얻을 수 있었으며, 이는 CSO에 의한 지방세포에서의 지방적 형성억제작용이 처음으로 보고되는 결과이다. 이 결과는 증가되고 있는 기능성식용유 소재개발수요¹⁵를 충족시킬 수 있는 기초연구 자료라 할 수 있을 것이다.

본 실험에서는 3T3-L1 세포를 이용하여 CSO의 처리가 leptin의 분비량 변화에 미치는 영향을 확인한 결과 유의하게 leptin 분비를 증가시키는 것으로 확인되었다. 이 결과는 CSO의 섭취에 의한 leptin 분비량 증가로 식욕이 억제되고 에너지대사가 증가되어 체중이 조절될 수 있음을 시사하는 것이다. 식물성기름의 식욕억제에 관한 다른 연구에서 Pasman 등³⁰과 Hughes 등³¹은 사람을 대상으로 잣기름의 섭취가 endogenous cholecystokinin과 glucagon like peptide-1의 증가를 유도하여 식욕을 억제할 수 있음을 보고하였다. 이는 CSO의 식욕억제 기전에 대한 추가적인 연구와 함께 leptin에 의한 식욕억제 및 leptin의 분비량 증가에 의한 항비만 효과³²에 CSO가 미치는 영향에 대한 연구가 추가되어야 할 것이다.

본 실험에서 CSO의 지방산을 분석하고 생리기능으로 HUVEC과 3T3-L1 세포에서의 NO분비, 지방축적 억제 및 leptin 분비기능을 확인하였다. 이는 CSO가 향후 개발 가능한 기능성식용유의 잠재적 후보 소재임을 제시하는 것이며, 아직 안전성과 구체적인 작용기전에 대한 다양한 연구가 추가되어야 하지만 CSO의 새로운 기능과 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 유자씨유 (Citron seed oil, CSO)의 지방산분포와 생리활성 효과를 세포수준에서 확인함으로써 기능성 식용유 소재로서의 CSO의 활용가능성을 제시하고자 하였다. 그 결과 oleic acid 32%, linoleic acid 34%, palmitic acid 19.2%, stearic acid 3.8%, linolenic acid 2.0%, palmitoleic acid 0.6%, arachidic acid 0.3%를 함유하고 있었다. 세포독성실험을 통해 0.2 mg/ml 농도까지 독성이 관찰되지 않음을 확인하였으며 그 이상의 농도에서는 용매 DMSO에 의한 독성이 관찰되어 CSO의 독성 유무를 확인할 수 없었다. HUVECs과 3T3-L1 세포에서 생리활성을 확인하기위해 nitric oxide 생성, Oil Red O 염색을 이용한 지방적형성, leptin 분비를 관찰하였다. CSO는 HUVEC에서 TNF- α 의 처리에 의해 통계적으로 유의한 수준으로 감소된 nitric oxide를 농도 의존적으로 증가시켜 0.1 mg/ml에서 control 수준까지 nitric oxide 분비량을 회복시키는 것으로 관찰되었다. 또한, CSO는 MDI solution (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin) 처리를 통해 분화가 유도된 3T3-L1 adipocyte에서 control (100%) 대비 0.05 mg/ml에서 약 27.5%, 0.1 mg/ml에서 약 15.1%의 지방적 (lipid droplet) 형성 억제효과를 확인하였으며 이는 CSO가 항비만 활성에 잠재적으로 기능을 할 수 있음을 의미한다. 또한 leptin 방출이 control군 (100%)대비 CSO 0.05 mg/ml에서 144.5%, 0.1 mg/ml에서 138.3%로 증가하여 식욕억제작용을 유도할 수 있음을 시사한다. 연구결과를 종합해보면 CSO는 불포화지방산이 다량 함유된 우수한 식물성유지이며 몇 가지 생리활성효과를 가지는 우수한 소재임을 확인하였으므로 이를 이용한 기능성 식품 및 소재개발에 활용되기를 기대한다.

References

- Choi HS. Lipolytic effects of citrus peel oils and their components. *J Agric Food Chem* 2006; 54(9): 3254-3258.
- Kim SH, Hur HJ, Yang HJ, Kim HJ, Kim MJ, Park JH, Sung MJ, Kim MS, Kwon DY, Hwang JT. Citrus junos Tanaka peel extract exerts antidiabetic effects via AMPK and PPAR- γ both in vitro and in vivo in mice fed a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 921012.
- Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (Citrus junos Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci* 2010; 75(3): H87-H92.
- Kwon OC, Shin JH, Kang MJ, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. Antioxidant activity of ethanol extracts from citron (Citrus junos SIEB ex TANAKA) seed. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(3): 294-300.
- Lee SJ, Choi SY, Shin JH, Kim SH, Lim HC, Sung NJ. Fatty acid composition and oxidative stability of citron seed oils. *J Life Sci* 2006; 16(3): 427-432.
- 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* 2005; 336(3): 909-917.
- 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* 2013; 13(2): 201-210.
- Woo KS, Jeong JY, Hwang IG, Lee YJ, Lee YR, Park HJ, Park ES, Jeong HS. Antioxidant activity of ethanol extraction on citron seed by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(3): 384-390.
- Kim SY, Shin KS. Evaluation of physiological activities of the citron (Citrus junos Sieb. ex TANAKA) seed extracts. *Prev Nutr Food Sci* 2013; 18(3): 196-202.
- Lee YJ, Hwang IG, Joung EM, Kim HY, Park ES, Woo KS, Jeong HS. Physiological activity and antiproliferation effects of citron seed extracts on cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(12): 1672-1678.
- Kim DS, Kim DH, Oh MJ, Lee KG, Kook MC, Park CS. Anti-aging and whitening activities of ethanol extract of Yuza (Citrus junos SIEB ex TANAKA) by-product. *J Soc Cosmet Sci Korea* 2010; 36(2): 137-143.
- Minamisawa M, Yoshida S, Uzawa A. The functional evaluation of waste yuzu (Citrus junos) seeds. *Food Funct* 2014; 5(2): 330-336.
- Choi WH, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Seo JS, Ha TY. Effects of a rice-based diet on body weight and serum lipid levels in mice. *J East Asian Soc Diet Life* 2013; 23(1): 31-38.
- Jang YS, Jeong JM. Effects of phyto-extract mixture on adiposity and serum lipid levels in obese mice induced by high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010; 39(10): 1439-1445.
- Lim JK. Oil and fat industry. *Food Ind* 2004; 181: 10-37.
- Zhang X, Scicli GA, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 1997; 30(5): 1105-1111.
- Kang YH, Kang JS, Shin HM. Vasodilatory effects of cinnamic acid via the nitric oxide-cGMP-PKG pathway in rat thoracic aorta. *Phytother Res* 2013; 27(2): 205-211.
- Hsu CL, Yen GC. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(1): 53-61.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404(6778): 661-671.
- Yu JH, Kim MS. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J* 2012; 36(6): 391-398.
- Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and α -glucosidase inhibition activities among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. *J East Asian Soc Diet Life* 2014; 24(1): 101-108.
- 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* 1997; 127(6): 1084-1091.
- Ministry of Food and Drug Safety. Korean food code [Internet]. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2013 [cited 2014 Jul 21]. Available from: http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp.
- Oh SD, Kim M, Min BI, Choi GS, Kim SK, Bae H, Kang C, Kim DG, Park BJ, Kim CK. Effect of Achyranthes bidentata blume

- on 3T3-L1 adipogenesis and rats fed with a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 158018.
25. Kang ES, Ham SA, Hwang JS, Lee CK, Seo HG. Effects of *Garcinia cambogia* extract on the adipogenic differentiation and lipotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Anim Resour* 2013; 33(3): 411-416.
 26. 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* 2009; 145(6): 771-781.
 27. Jeong JW, Kwon DJ, Hwang JB, Jo YJ. Influence of the extraction method on quality of citron juice. *Korean J Food Sci Technol* 1994; 26(6): 704-708.
 28. Buys E, Sips P. New insights into the role of soluble guanylate cyclase in blood pressure regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23(2): 135-142.
 29. El-Mosallamy AE, Sleem AA, Abdel-Salam OM, Shaffie N, Kenawy SA. Antihypertensive and cardioprotective effects of pumpkin seed oil. *J Med Food* 2012; 15(2): 180-189.
 30. 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* 2008; 7: 10.
 31. 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(TM)) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids Health Dis* 2008; 7: 6.
 32. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395(6704): 763-770.