

고지방 식이 섭취한 마우스 비만모델에서의 홍국발효 대두의 항비만효과

김 선 희^{1,2} · 강 순 아^{3,4*}

¹호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정, ²호서대학교 보건산업연구소 연구원,

³호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, ⁴호서대학교 보건산업연구소 소장

Anti-Obesity Effect of Soybean Fermented with *Monascus* in High-Fat Diet Induced Obese Mice Model

Sun Hee Kim^{1,2} and Soon Ah Kang^{3,4*}

¹Ph. D. Student, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Republic of Korea

²Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Republic of Korea

³Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Republic of Korea

⁴Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Republic of Korea

ABSTRACT

This study investigated the anti-obesity effect of soybean fermented with *Monascus*. After inducing obesity by feeding high-fat diet using C57BL/6J mice for 4 weeks, a total of 46 rats were divided into 6 groups. Weight gain, dietary efficiency, fat tissue weight change, blood biochemical change, and histological change were analyzed by ingestion of soybean fermented with *Monascus* (UPSM_L, UPSM_H) and soybean (UPS) extract. The weight change in the UPSM_L and UPSM_H group was higher than that in the normal group, but was lower than that in the UPS group. The results of changes in heart, liver, kidney, peritoneal, epididymal and mesenteric fat, cardiac hypertrophy and heart failure of high-fat group (HF) were significantly higher than those in Nor, UPS, UPSM_L and UPSM_H groups. The UPSM_H group showed a statistically significant decrease in the weight of kidney, mesenteric fat, and epididymal fat compared to the UPS group ($p < 0.05$). Biochemical analyses showed that the concentration of serum triglyceride and LDL-cholesterol were lower in the UPSM_H group than those in the UPS group. suppressed fat accumulation in liver tissue. In the soybean group, the effects of inhibiting lipid deposition within liver tissue by hematoxylin and eosin (H&E) staining and fat accumulation suppression in fat cells by oil red-O staining were observed. Our results indicate that dose-dependent research can be used in a wide range of disease models such as liver disease improvement and metabolic syndrome, and the high concentration of soybean fermented with *Monascus* extract is much better.

Key words: soybean fermented with *Monascus*, obese mice model, anti-obesity effect

서 론

비만은 섭취 칼로리와 소비 칼로리 간의 에너지 불균형으로 인해 발생하여 고혈압, 제 2형 당뇨병, 심혈관 질환, 수면무호흡증, 일부 암 등과 같은 합병증의 발병 위험을 증가시키는 질병이다(Sharma AM 등 2009). WHO(2017)에 의하면, 매년 약 400만 명이 과체중, 비만으로 인한 합병증으로 사망하고, 1975년부터 2016년까지 과체중, 비만 유병율이 4배 이상 증가하였다고 보고하였다(Cardel MI 등 2020). Yi D 등(2018)은 2014-2015년 국민건강영양조사를 이용한 연구한 결과에서 20세 이상 한국인의 대사증후군 유병율은 21.7%였으며, 남성이 여성보다 높은 것으로 보고되었다. 비만은 식

이 조절과 식생활 개선, 운동이 복합적으로 이루어져야 치료가 가능하지만, 가장 간편한 비만 치료 방법으로 비만치료제, 보조제 섭취에 의존하는 경향이 있다(Jang YJ 등 2011). 비만 치료제로 사용되었던 약물에는 대표적으로 정신 질환 치료제, 위장 리파제 억제제, 식욕억제제(Reductil, Phenter mine), 지방흡수억제제(Xenical) 등이 있지만, 복통, 변비, 불면, 두통, 중독, 심근 경색, 뇌졸중과 같은 부작용이 많이 발생하여 부작용이 적은 식물성 스테롤, 대두, 페놀성 화합물과 같은 식품 및 천연물 유래 기능성 소재에 대한 수요가 증가하고 있다(Heal DJ 등 1998; Li M & Cheung BM 2009). 부작용을 줄일 수 있는 소재 연구에서 최근에는 바나나 껍질 추출물(Kim RH 등 2020), 꾸찌뿌 신초 엽위별 잎 추출물(Park JH 등 2021) 등과 같이, 식품 소재 자체의 항비만 활성을 조사하는 연구들이 활발히 수행되고 있다.

* Corresponding author : Soon Ah Kang, Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

대두는 한국, 일본, 중국 등 아시아권 국가에서 약 5,000년 이 넘게 재배되어 왔고, 1940년대 이후부터 미국에서 재배된 식물성 단백질의 주요 급원이다(Valliyodan B 등 2016). 대두는 오랫동안 사용되어져 온 만큼 심혈관 질환, 제 2형 당뇨병, 면역 장애, 비만 등 다양한 모델에서 생물학적 활성이 입증되었고, 그 중에서도 대두 펩타이드가 콜레스테롤과 중성 지방을 감소시키고, 지방 합성, 저장을 억제시키는 것은 그 기작이 명확하게 밝혀진 연구 중 하나이다(Chatterjee C 등 2018; Kwon DY 등 2002). 또한, 대두 유래 7,3',4'-trihydroxyisoflavone은 3T3-L1세포에서 높은 항비만 활성을 가진다(Roh C 등 2015). 대두의 생리 활성 펩타이드는 발효, 효소 가수 분해, 가공 과정에서 발생하며, 특히 대두에 미생물을 접종해 발효하는 것은 가수 분해 단백질 생성에 가장 효율적이고 경제적인 방법이다(Singh BP 등 2014).

홍국은 Red koji라고 불리며 *Monascus purpureus*를 접종하여 제조한 것으로 발효 과정에서 폴리케타이드 계열인 monacolin이 생성되고, 이 성분은 콜레스테롤 생합성 단계에 필수적으로 사용되는 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A(CoA) 환원 효소를 저해함으로써 강력한 지방 생성 억제 효과를 가진다(Jeong EJ 등 2013; Kim SH 등 2015; Zhu B 등 2019; Mohankumari HP 등 2021). 특히 홍국에 있는 monacolin K의 경우 mevinolin, lovastatin으로 알려져 있으며, 이상지질혈증, 심혈관 치료제인 mevacor라는 약물에 사용된 *Aspergillus* 유래 monacolin K와 동일한 구조를 가진다(Musselman ME 등 2011). 이외에도 홍국에는 β -시토스테롤과 같은 식물성 스테롤, 이소플라본, 아연, 셀레늄, 단일 불포화 지방산 등이 포함되어 있다(Journoud M & Jones PJ 2004; Xue-Mei LI 등 2011; Lu YA 등 2020). 홍국의 항비만 효과를 검증한 선행 연구에는 홍국의 3T3-L1 세포에서 지방 생성 인자, 유전자 발현 제어 효과(Jeon T 등 2004), 지질 대사 장애 개선(Zhou W 등 2019) 등이 있다. 최근에는 홍국 자체의 항비만 효과를 검증하는 것뿐만 아니라, 홍국발효 식품에 대한 항비만 효과를 검증하는 연구들이 이루어지고 있으며, 그 예로는 홍국발효 홍삼(Park JC 등 2009), 홍국발효 monascin, ankaflavin(Lee CL 등 2013), 홍국발효메밀(Hong H 등 2017), 홍국발효 참당귀 추출물(Kim YW 등 2018), soyfiber-홍국 제조용 콩의 혈청지질 감소 효과(Shin JG 등 2005), 난소절제 쥐의 홍국 첨가에 의한 중성지방 감소 효과(Choi MJ & Yu TS 2005) 등이 있다. 그러나 홍국발효대두의 항비만 관련 연구는 미비한 편이다.

따라서 본 연구에서는 고지방 식이(high fat diets)로 비만을 유도한 C57BL/6J 마우스에서 항비만 효과가 있는 monacolin K 함유량이 높은 홍국균을 접종한 홍국발효 대두의 항비만 효과를 확인하기 위하여 체중변화량, 식이효율 변화, 장기무

게, 지방조직무게, 혈중 생화학, 간 및 지방조직의 조직학적 변화 등을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 대두는 경상북도산 백대(*Glycine max*)를 구입하여 에어제트밀(Retsch ZM100, $\phi=1.0$ mm, Rheinische, Germany)로 초미세 분쇄하여 사용하였다. 분말화시킨 대두의 입도를 Lazer Particle Size Analyzer(Beckman Coulter Inc, Pasadena, California, USA)로 분석하여 평균 입도는 $30.1 \mu\text{m}$ 크기로 액상 기질화 실험을 하였다. 초미세 분쇄 대두소개의 액상발효물에 적합한 홍국균주 개발은 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 2015)에서 하였고, *Monascus* sp. RY1 균주를 이용하여 발효시킨 홍국발효 대두를 본 연구의 실험 재료로 제공받아 사용하였다. 일반 대두와 홍국대두 발효물을 -20°C 에서 냉동시킨 후, 동결건조기(FD5512, Ilshin BioBase Co., Korea)로 건조하였다. 건조시킨 대두와 홍국발효대두는 각각 Ultra-Blender(Rumilly, Haute-Savoie, France)로 분말화하여 분말시료 1 g에 에탄올 10 g을 혼합 후 25°C 에서 8시간 동안 3회씩 교반하여 추출하였다. 추출한 용액은 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축시킨 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 실험동물, 식이조성 및 사육조건

실험동물은 5주령의 C57BL/6J, SPF계 수컷 46마리를 ㈜대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입하여 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50.0 \pm 15.0\%$, 명암주기 12시간(명주기: 07:00~19:00), 조도 150~300 Lux, 환기 횟수 시간당 10~20회로 자동 설정된 동물 사육실(Polysulfone, 331D \times 159W \times 132H (mm))에서 4주간 사육하였다. 실험 전 동물의 외관 검사를 실시하고, 체중 측정 후, 개체식별법에 따라 7일의 순화 기간을 거쳐 해당 동물실로 이동하며, 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 전자저울로 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중 변화를 확인하여 체중증가에 이상이 없는 동물을 대상으로 체중을 기준으로 하여 동물을 배치하였다. 급여용 사료는 정상식이(10 kcal% fat: PO Box 19798, St. Louis, MO 63144, USA), 고지방식이(60 kcal% fat: PO Box 19798, St. Louis, MO 63144, USA)로 (주)두얼바이오텍에서 구매하여 사용하였으며, 급이기에 사료를 넣어 자유섭취시켰다. 시험물질은 투여 당일에 투여용량에 맞게 전자저울로 칭량한 후, 멸균수와 혼합하여 30분간 sonication 후 사용하였으며, 존데(DAZ01, Fuchigami, JPN)를 이용해 경구투여하

였다. 실험군은 정상식이군(Nor), 고지방식이군(HF), 양성대조군(PC, Orlistat 30 mg/kg), 대두군(UPS)과 홍국발효대두저농도(400 mg/kg, UPSM_L), 고농도(800 mg/kg, UPSM_H)로 총 6개 군을 나눠 28일 동안 사료를 하루 1회 동일한 시간에 경구투여하였다(Table 1). 사육 기간 중 식이 섭취량과 일반 증상 확인은 매일, 체중은 7일 주기로 일정한 시간에 측정하였다. 본 실험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용하는 모든 규정을 준수하였고, 동물보호법(제정 1991년 5월 21일 법률 제 4379호, 일부개정 2020년 2월 11일 법률 제 16977호)에 근거한 (주)KLSBIO의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의하여 승인을 받아 진행하였다(승인번호: KLSIACUC2020 1201-4-01).

3. 혈액 및 시료채취

동물실험은 4주간 조제한 식이를 급여한 후, 모든 생존동물에 대하여 심장채혈을 진행하였다. 시험 기간 종료 후, 모든 생존 동물에 대하여 주사기, 1 mL syringe(REF301321, BD, USA)로 심장 채혈은 살아있는 상태에서 호흡기마취기를 이용하여 이소푸루란 호흡마취제를 사용하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후 4°C에서 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청은 혈청 생화학적 분석에 사용하였다. 실험 최종일에는 12시간 절식 후 에테르로 가볍게 마취하여 해부를 하여 채혈 후 각 장기(간, 신장, 심장)를 적출하고, fat을 부위별(subcutaneous, mesentric, epididymal, peritoneal)로 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 전자저울(BT224S, Sartorius, GER)로 측정 후, 간 및 fat(epididymal fat) 조직의 일부는 조직검사를 위해 적출하여 시료로 사용하였다.

4. 체중 변화 및 식이효율 분석

실험동물의 체중 변화를 확인하기 위해 전자저울(Entris

2202, Sartorius, GER)로 체중을 주 1회 일정한 시간에 측정하였고, 식이 효율(food efficiency ratio; FER)은 체중 증가량을 동일 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어서 산출하였다.

$$FER = (\text{Body weight gain for experimental period(g)} / \text{food intake for experimental period (g)})$$

5. 혈중 지질농도 및 생화학적 지표분석

혈중 지질농도 및 생화학적 지표를 분석하기 위해 생화학 자동분석기(H7020, HITACHI, JPN)를 이용하여 트리글리세라이드(Triglyceride: TG, mg/dL, WAKO, JPN), 총콜레스테롤(total cholesterol: T-Chol, mg/dL, WAKO, JPN), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL Cholesterol, mg/dL, WAKO, JPN), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL Cholesterol, mg/dL, WAKO, JPN), 종양괴사인자알파(TNF- α : pg/mL, Invitrogen, Waltham, Messachisett, USA) 검사를 실시하였다. 또한, TNF alpha Mouse ELISA Kit(Invitrogen, Catalog # BMS607-3, Waltham, Messachisett, USA)를 이용하여 항원항체 면역흡착법(ELISA)으로 TNF- α 와 항체를 반응시킨 후 발색하여 ELISA 리더기(spectramaxM2, MOLECULAR DEVICES, USA)로 분석하였다(Kim H 등 2006; Ma Y 등 2017; Yeom CH & Jeong HJ 2020).

6. H&E 염색에 의한 간 및 지방 조직 내 조직학적 변화

H&E 염색에 의한 간, 지방 조직 내 조직학적 변화 확인을 위해 간(좌측 큰엽)과 지방(부고환지방) 조직을 적출하고, 냉각 생리식염수로 세척하고 10% 포르말린에 고정시킨 후 장기를 조직표본 제작에 적합한 크기, 약 2~3 μ m의 두께로 삭정 후 개체번호가 작성된 카세트에 넣어 13시간 동안 조직처리(STP120 Spin tissue Processor, Myr)를 실시하였다. 이후, 박절기(Finesse ME Microtome, Thermo Shandon)를 이용하여

Table 1. Experimental group

	Group	Treatment	Number (n)
Nor ¹⁾	Normal	Non-treatment	6
HF	High fat diets	Non-treatment	8
PC	High fat diets / Positive control/ Orlistat	30 mg/kg	8
UPS	High fat diets / UPS	400 mg/kg	8
UPSM_L	High fat diets / UPSM, low conc.	400 mg/kg	8
UPSM_H	High fat diets / UPSM, high conc.	800 mg/kg	8

¹⁾ Nor: normal, HF: high-fat diet induced obesity animal (DIO), PC: positive control (orlistat 30 mg/kg), UPS: DIO oral administration ultrafine pulverized soybean 400 mg/kg, UPSM_L: DIO oral administration ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* 400 mg/kg, UPSM_H: DIO oral administration ultrafine pulverized soybean fermented with *Monascus* 800 mg/kg.

여 약 3 μm 두께로 절편을 슬라이드에 부착 건조 후 탈 파라핀과 합수 과정을 거쳐 증류수로 세척 후 H&E (hematoxylin and eosin) 염색을 하여 버추얼 슬라이드 스캐너(Pannoramic MID, 3D Histech Ltd., Budapest, Hungary)로 관찰하였다 (Alwahaibi NY 등 2015; Cardel MI 등 2020).

7. Oil Red O 염색에 의한 간 조직 내 지질의 조직학적 변화

간 조직 내 지질의 조직학적 변화 관찰을 위해 적절한 간 조직은 액체질소로 급냉하고 Oil red O 염색에 의하여 분석하였다. 간은 적출하여 10% 포르말린에 고정시킨 후 조직 표본 제작에 적합한 크기로 장기를 약 2~3 μm 의 두께로 삭정 후 30% sucrose(Merck) 용액에 처리하였다. Sucrose 처리가 완료된 조직은 OCT Compound(Tissue Tek OCT Compound)를 이용하여 cryoblock을 제작 후, 동결 박절기(CM3000, Leica)를 이용하여 절편을 제작하여 슬라이드에 부착하여 건조 후 Oil red O stain 염색을 실시하였다(Riva G 등 2018).

8. 자료 분석방법

실험결과는 평균치(mean)와 표준편차(Standard Deviation, S.D)를 사용하여 나타내었으며, 각 군간의 비교는 Software Statview(Version 4.51, Abacus Concepts, Berkeley, CA)를 사용하여 ANOVA분석 One-way analysis of variance를 수행하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 을 적용하여 검증하였다. 실험 그룹별 유의성은 SAS(Statistical analysis system) version 9.3(SAS Institute, Ctrth carolina, USA)을 사용하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군간의 유의성을 검증하였고, 유의성 표기가 a, b, c로 표기될 수 있게 사후검정을 수행하였다. 실험군간을 비교하여 5%의 유의수준에서 실험군간

의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중변화

5주령의 동물을 4주간 정상식이와 고지방식이 유도 후 체중 변화 결과는 Table 2와 같다. 4주간의 체중 변화를 측정할 결과, 양성대조군을 제외한 전체 실험군에서 체중이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 정상식이군(Nor)의 체중은 3.0 ± 0.3 g 증가하였고, 고지방식이군(HF)은 체중이 9.2 ± 1.3 g 늘어나 가장 높은 체중 증가율을 보이면서 고지방식이에 의하여 체중증가 현상이 일어났으며, 양성대조군(PC)은 0.6 ± 1.4 g 증가로 가장 낮은 체중증가율을 보였다. 대두군(UPS), 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L) 및 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)은 고지방식이군(HF)에 비하여 유의적으로 낮은 체중증가율을 보였고($p < 0.05$), 특히, 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)과 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)은 대두군에 비하여 유의적이지는 않지만 낮은 체중 증가량을 보이면서 대두보다 홍국발효대두가 체중 감소 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 또한, 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)과 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)의 경우, 정상식이군(Nor)과 가장 유사한 체중 변화를 보였다. Kim YW 등(2018)의 연구에서는 8주간 고지방식이 유도한 rat 실험 결과, 전체 실험군에서 약 304 g~462 g 정도의 체중이 증가하였고, 홍국발효 참당귀 추출물 첨가 식이를 급여한 실험군에서 고지방식이군(HF)보다 약 79 g~112 g 정도 상대적으로 낮은 체중 증가를 보여 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

2. 식이섭취량 및 식이효율

실험군의 식이섭취량과 식이효율 결과는 Table 3과 같다.

Table 2. Changes in body weight and body weight gain in diet induced obesity model

Groups	Weeks					Final weight gain (g)
	0	1	2	3	4	
Nor ¹⁾	23.5±1.9 ^b	24.3±2.0 ^b	24.7±2.0 ^b	25.7±2.0 ^b	26.5±2.0 ^d	3.0±0.3 ^c
HF	29.2±2.1 ^a	29.8±2.1 ^a	32.3±1.9 ^a	34.7±2.5 ^a	38.0±2.4 ^a	9.2±1.3 ^a
PC	28.9±1.0 ^a	27.7±0.9 ^{ab}	27.8±0.7 ^b	28.5±1.1 ^b	29.5±1.0 ^c	0.6±1.4 ^d
UPS	29.2±1.1 ^a	29.0±0.9 ^a	30.2±0.7 ^{ab}	32.1±1.8 ^{ab}	34.1±1.7 ^b	5.1±1.8 ^b
UPSM_L	29.2±1.5 ^a	29.0±1.3 ^a	29.9±1.0 ^{ab}	32.2±1.2 ^{ab}	33.3±0.9 ^{bc}	3.8±1.3 ^{bc}
UPSM_H	29.2±1.5 ^a	29.0±1.6 ^a	29.9±1.7 ^{ab}	31.8±1.6 ^{ab}	32.2±1.6 ^{bc}	3.5±0.8 ^{bc}

Values is expressed as mean±S.D.

^{a-d}: In a same column are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

¹⁾ Groups are specified in Table 1.

Table 3. Changes in food intake and FER in diet induced obesity model

Groups	Food intake (g)				FER
	weeks				
	1	2	3	4	
Nor ¹⁾	2.98±0.01 ^a	2.71±0.08 ^a	2.77±0.01 ^{ab}	2.91±0.13 ^b	1.01±0.10 ^c
HF	2.31±0.02 ^b	2.59±0.19 ^{ab}	2.85±0.13 ^a	3.13±0.02 ^a	2.93±0.82 ^a
PC	2.45±0.03 ^{ab}	2.15±0.07 ^b	2.05±0.51 ^c	2.33±0.47 ^c	0.27±0.61 ^d
UPS	2.46±0.06 ^{ab}	2.57±0.06 ^{ab}	2.35±0.25 ^{bc}	2.52±0.06 ^{bc}	2.01±0.61 ^b
UPSM_L	2.45±0.10 ^{ab}	2.52±0.04 ^{ab}	2.47±0.12 ^{bc}	2.69±0.12 ^{bc}	1.42±0.54 ^{bc}
UPSM_H	2.44±0.05 ^{ab}	2.62±0.07 ^{ab}	2.52±0.11 ^b	2.66±0.25 ^{bc}	1.45±0.33 ^{bc}

Values is expressed as mean±S.D.

^{a-d}: In a same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

FER: food efficiency ratio.

¹⁾ Groups are specified in Table 1.

전체군에서 식이섭취량 변화는 고지방식이군(HF)에서 높게 나타났고, 정상식이군(Nor)과 시료처리군에서는 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 Kim YW 등(2018)의 연구에서도 식이 섭취량과 음수 섭취량이 유의적인 차이를 보이지 않아 본 연구와 일치하였다. 식이효율은 시험물질 투여 용량과 관련해서 떨어진 것으로 보이며, 시험물질들은 에너지대사를 촉진하는 것으로 사료된다(Table 3). 식이효율은 고지방식이군(HF)이 2.93±0.82로 가장 높았고, 양성대조군(PC)이 0.27±0.61로 가장 낮았다. 대두군(UPS)과 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L), 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)이 각각 2.01±0.61, 1.42±0.54, 1.45±0.33으로 고지방식이군(HF)보다 유의하게 낮음으로써($p<0.05$) 대두 및 홍국발효대두가 식이효율에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과, 고지방식이로 비만 유도 후 대두에 의한 연구(Lee JJ 등 2011)에서도 고지방 처리군의 식이 효율이 가장 높게 나오고, 체중증가율이 낮은 대두군에서 낮은 식이효율을 보여 본 연구 결과와 유사하였다. 또한 Jang YJ 등(2011)의 연구에서도 저지방식이군의 식이효율이 고지방식이군의 식이효율보다 낮게 나옴으로써 본 연구 결과와 일치하는 경향을 나타내었다. 이는 대두와 홍국발효대두 추출물을 첨가한 식이가 체중 감소에 도움을 주는 것으로 판단된다.

3. 장기 무게 및 조직무게 변화

장기 무게 변화 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 정상식이군(Nor)에 비하여 고지방식이군(HF)은 전반적으로 장기의 무게가 증가하는 경향을 보였다. 대두(UPS), 홍국발효대두(UPSM) 실험군의 간과 신장의 무게와 심장비대증은 정상식

이군(Nor)과 유의적인 차이가 없을 정도로 대두와 홍국발효대두의 효과가 있음을 보여주었다. 그러나, 간의 무게와 cardiac hypertrophy는 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)과 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)에서 고지방식이군(HF)에 비하여 유의하게 감소함을 보였다($p<0.05$). 특히 대두군(UPS)보다 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)의 신장의 무게, 간의 무게 및 cardiac hypertrophy는 통계적으로 유의하게 감소함으로써 홍국발효대두가 체중 및 장기무게 감소에 더 효과적인 것으로 사료된다. 또한, 신장 지방(peritoneal fat), 창자간막 지방(mesenteric fat), 부고환 지방(epididymal fat), 피하 지방(subcutaneous fat)무게는 전체 실험군에서 고지방식이군(HF)에서 정상식이군(Nor)에 비하여 유의하게 증가하였고($p<0.05$), 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)과 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)은 고지방식이군(HF)에 비하여 지방조직의 무게가 유의하게 감소함을 보였다($p<0.05$)(Fig. 2). 홍국발효대두는 저농도보다 고농도군(UPSM_H)이 대두군(UPS)보다 신장지방, 창자간막지방, 부고환지방의 무게가 통계학적으로 유의하게 감소하는 것을 보였다($p<0.05$). 이 결과는 대두보다 홍국발효대두가 장기 무게 및 지방무게 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인함으로써 기능성 소재의 가치를 긍정적으로 보였다고 판단된다. Lee JJ 등(2011)의 연구에서 고지방-고콜레스테롤식이로 증가된 장간막지방조직과 부고환지방의 무게를 대두분말식이가 감소시킴을 보임으로써 본 연구와 비슷한 경향성을 보였다. 또한, 뒷장분말을 급여한 Lee HJ & Kim JG(2002)의 연구에서도 고지방-고콜레스테롤식이군의 간의 중량이 농도에 의존적으로 감소하였고, 부고환지방도 감소함을 보임으로써 본 연구 결과와 유사하였다. Hu J 등(2020)은 홍국에 있는 Monascin과 Ankaflavin

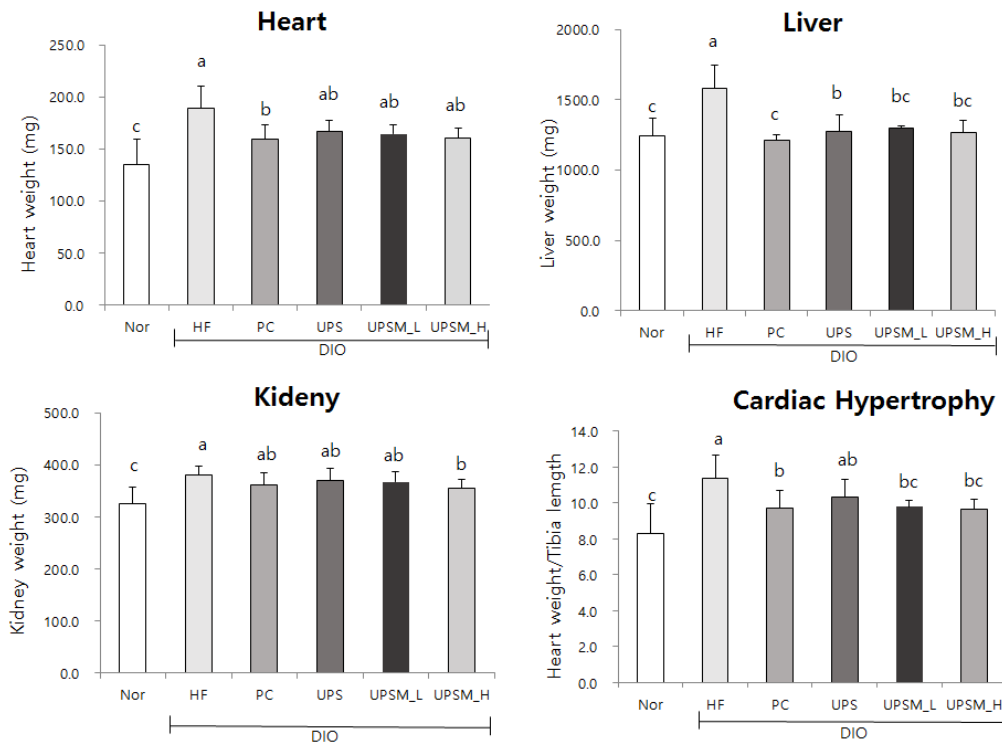


Fig. 1. Changes in organ weights in diet induced obesity model (DIO).

Groups are specified in Table 1. Each value represents the mean±S.D.

^{a-c} Means indicated with different letters are significantly different among DIO groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

은 HMG-CoAR의 단백질 발현을 감소시키고, 생체 내 콜레스테롤 합성을 억제하는 반면, apo A의 발현을 증가시켜 콜레스테롤 역수송을 촉진한다고 보고하였으며, 이는 혈중 지질, 체중 증가 개선에 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구에서 대두보다 홍국발효대두가 체중 감소에 더 효과적이었던 것은 홍국에는 풍부한 Monacolin 계열 성분이 존재하기 때문인 것으로 사료된다.

4. 혈중 지질농도

혈중지질 농도 변화는 Fig. 3에 보여주듯이, 혈중 총콜레스테롤의 경우 고지방식이군(HF)에서 가장 높은 값을 보였으며, 홍국발효대두의 농도를 증가시킬수록 총 콜레스테롤이 감소함을 보였다. 또한, 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)의 경우 대두군, 고지방식이군(HF)과 비교하여 유의하게 낮은 LDL값을 보였다($p < 0.05$). 중성지방의 경우 대두군(UPS)과 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)은 고지방식이군에 비하여 유의하게 낮은 값을 보였다($p < 0.05$). 이는 Lee JJ 등(2011)의 연구에서 고지방-고콜레스테롤식이로 증가된 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 농도가 대두분말식에 의하여 감소함을 보임으로써 본 연구와 비슷한 경향성을 보

였다. Lim YR 등(2014)의 연구에서는 홍국균으로 고체발효한 에티오피아모카의 PPAR γ 와 C/EBP α 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, 지방전구세포에서 PPAR γ 와 C/EBP α 발현을 억제하고 지방합성 및 수송에 관여하는 FAS와 aP2 발현량을 감소시킨다고 하였으며, 이는 홍국발효가 지방구 크기와 중성지방 생성량 감소에 영향을 미쳐 지방세포 분화 억제에 영향을 미친다고 보고하였다. 혈중의 지질 농도는 심장병, 고혈압 등과 같은 심혈관계 질환의 진단지표이다(Kim YW 등 2018). 비만의 경우, HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 균형이 깨져서 심혈관계 질환이 발병한다고 알려져 있다. Zhou W 등(2019)의 연구에서는 홍국균이 가지고 있는 *Monascus* 색소는 HMG-CoAR mRNA 발현을 억제해 콜레스테롤 감소에 영향을 미치며, Monascin과 Ankaflavin은 acyl coenzyme A-cholesterol acyltransferase(ACAT)를 저해시켜 LDL 콜레스테롤을 감소시킨다고 보고하였다.

5. 혈중 TNF- α 농도

TNF- α 의 결과는 Fig. 4에 보여주듯이 고지방식이에 의해 유의하게 증가한 수치가 홍국발효대두 처리에 의해 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었고($p < 0.05$), 홍국발효대두 고

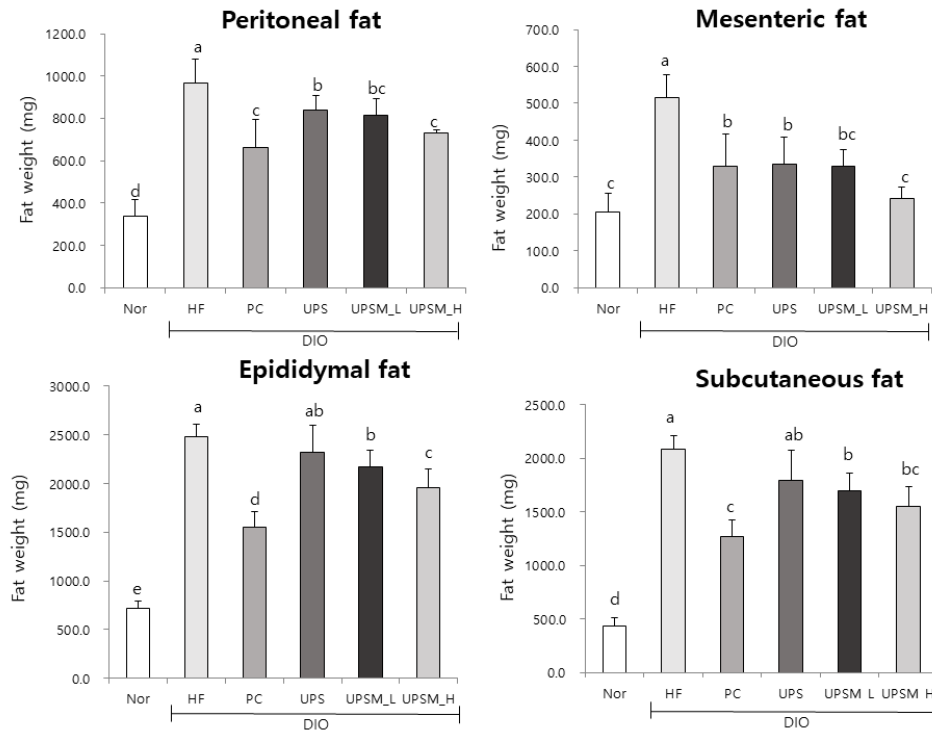


Fig. 2. Changes in weight of fat tissue in diet induced obesity model (DIO).

Groups are specified in Table 1. Each value represents the mean±S.D.

^{a~c} Means indicated with different letters are significantly different among DIO groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

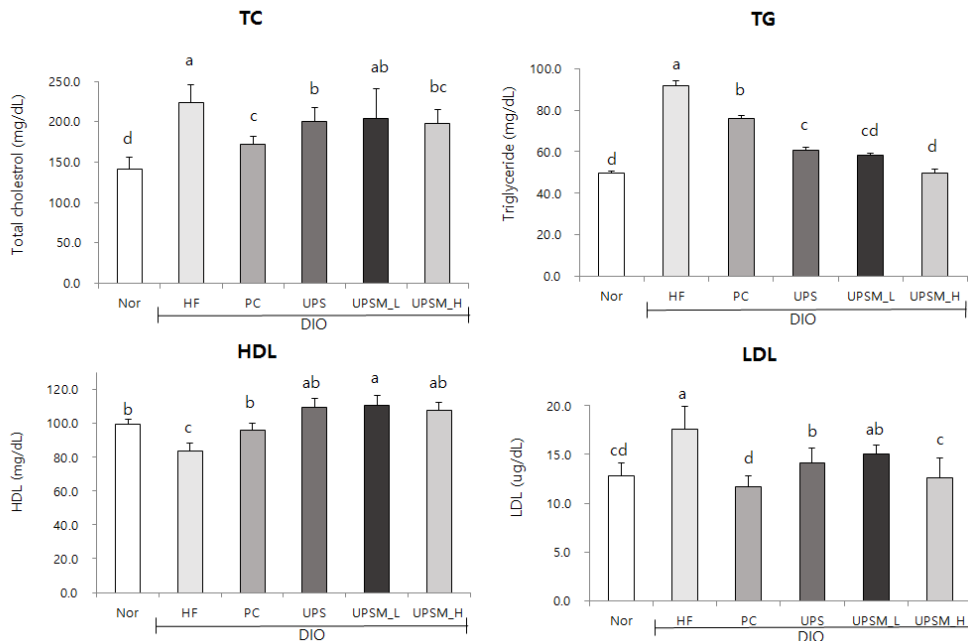


Fig. 3. Changes in blood biochemistry in diet induced obesity model (DIO).

Groups are specified in Table 1. Each value represents the mean±S.D.

TC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL: high density lipoprotein cholesterol, LDL: low density lipoprotein cholesterol.

^{a~d} Means indicated with different letters are significantly different among DIO groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

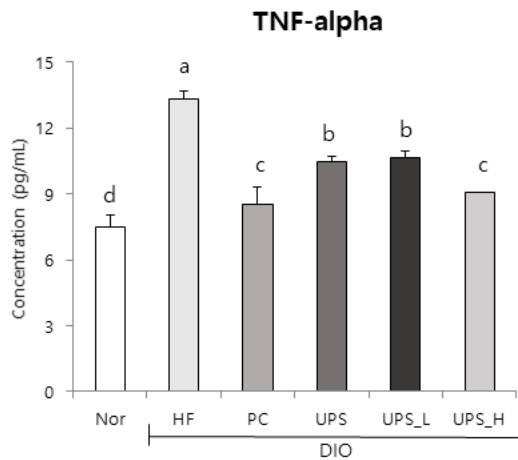


Fig. 4. Changes in blood TNF- α in diet induced obesity model (DIO).

TNF- α : tumor necrosis factor- α .

Groups are specified in Table 1. Each value represents the mean \pm S.D.

^{a-d} Means indicated with different letters are significantly different among DIO groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

농도군(UPSM_H)이 대두군(UPS), 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)보다 낮아 홍국발효대두 농도가 증가할수록 TNF- α 의 발현 저해능이 높아지는 것으로 사료된다. Choi HW 등 (2018)은 홍국의 monacolin K가 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 TNF- α 의 발현을 저해하고, 염증 반응을 증폭시키는 NF- κ B를 차단하여 항염증 효과를 보인다고 보고하였다. 본 연구에서 홍국발효대두군에서 높은 TNF- α 의 발현 저해능을 보인 것은 monacolin 계열 성분에 기인한 것으로 판단된다.

6. 간 및 지방 조직의 병리학적 관찰

간과 지방 조직의 Oil Red O 염색 및 H&E stain 결과는 Fig. 5에 나타내었다. H&E stain 결과, 고지방식이군(HF)에서는 간 소엽 구조의 배열성이 깨지면서 지방들이 축적되면서 지방간 현상이 일어나면서 붉은색의 정도가 짙은 것을 관찰할 수 있었고, 홍국발효대두군에서 선홍색이 희미하게 관찰되면서 간 조직 내에 지질 침착을 억제하는 효과를 보였다. 이는 Ryu HJ 등(2011)의 연구에서도 고지방식이군(HF)의 간세포 내 지방 축적이 비정상적으로 나타났고, 느티만가닥버섯 분말 첨가 식이군에서는 지방구 크기 및 수가 감소하여 지방 침착이 억제되었다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 또한 대두군(UPS)과 비교하였을 때 홍국발효대두에 의하여 지방 세포벽의 파괴가 적어짐에 따라 지방구의 크기가 감소하면서 지방 세포 내의 지방 축적을 방해하는 것으로

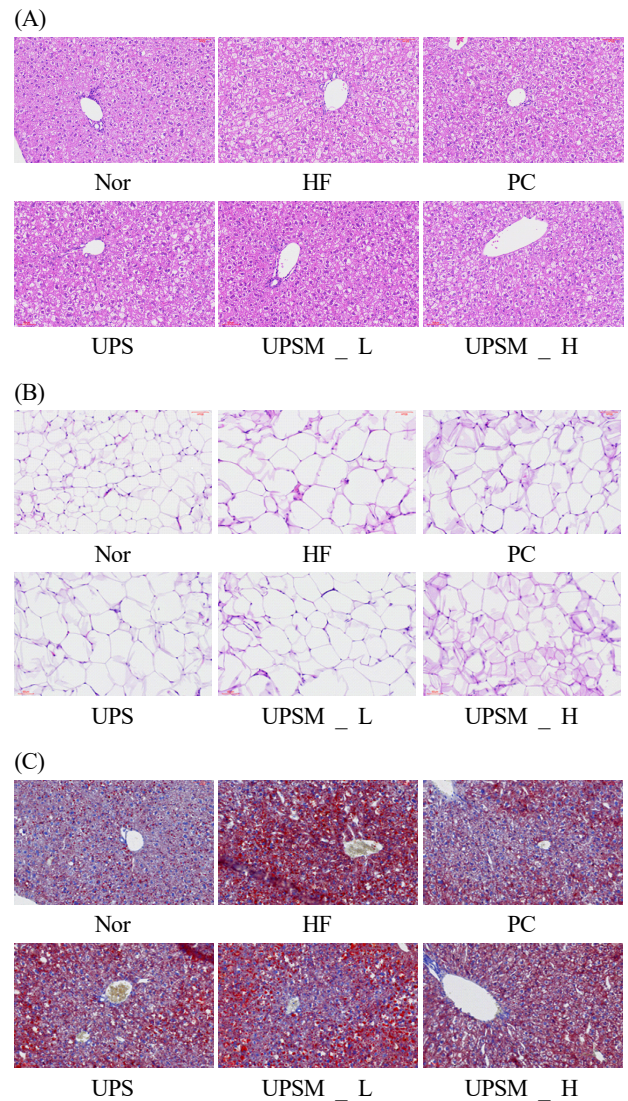


Fig. 5. Histological change of hepatic tissue.

(A) epididymal fat tissue (B) by H&E stained and hepatic tissue (C) using Oil red O stain for the male C57BL/6 mice ($\times 200$). Groups are specified in Table 1.

볼 수 있었다.

Oil red 염색법은 지방이 많을수록 붉게 관찰되는 방법으로, 간 조직의 지방구를 붉은색으로 염색하여 확인하는 것이다(Kim YW 등 2018). Oil Red O stain 결과, 간조직에 축적된 지방구는 붉은색으로 염색되어 지방이 많을수록 붉게 관찰되어지는데, 고지방식이군(HF)은 붉은색이 광범위하게 퍼져 있었다. 홍국발효 대두를 고농도 투여한 군에서는 지방구에 의한 붉은 염색의 정도가 감소하면서 지방이 축적되는 현상을 억제함을 보여주었다. 전체 실험군에서 붉은색이 광범위하고 분포된 것을 확인할 수 있었으며, 가장 붉은색을 띄는 것은 고지방식이군(HF)으로 홍국발효대두 처리군에서는

상대적으로 덜 붉은 것으로 확인되었다. 홍국발효 참당귀 추출물을 급여한 Kim YW 등(2018)의 연구에서도 홍국발효 참당귀를 투여한 군에서 붉은색의 정도가 감소함을 보여줌에 따라 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서는 대두군(UPS)보다 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L)보다 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)이 덜 붉은 것으로 확인되어 대두보다 홍국발효대두가 간 조직의 지방 축적 억제에 효과가 있을 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구는 C57BL/6J mice를 고지방식으로 4주간 비만유도모델 DIO(Diets induced obesity)를 이용하여 홍국발효대두의 섭취에 의한 체중증가, 식이효율, 장기무게 변화, 지방조직의 무게 변화, 혈중 생화학적 변화, 조직학적 변화를 분석하였다. 특히, 양성대조군으로 orlistat라는 식이 지방의 분해와 흡수를 방해함으로써 체중 감소를 유도하는 약물과 비교하여 대두군(UPS)과 홍국발효대두군(UPSM)의 효과를 보고자 하였다. 시험물질 대두군(UPS), 홍국발효대두 저농도군(UPSM_L), 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)에서 체중 억제 효능을 보였지만, 양성대조군에 대비하여서는 미진한 비만 억제 효능 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 체중 증가율 변화, 식이효율 변화, 장기무게 변화, 지방조직무게 변화, 혈중 중성지방 및 LDL 농도의 변화에서 대두군보다 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)에서 더 효과적인 체중 감소 효과를 보였고, 지방조직의 무게가 유의하게 감소하였으며, 중성지방 및 LDL농도의 감소, 간조직의 지방 축적 억제 효과를 관찰함으로써 홍국발효대두의 항비만효과 가능성을 확인할 수 있었다. 특히, 홍국발효대두 고농도군(UPSM_H)은 대두군(UPS)보다 신장지방, 창자간막지방, 부고환지방의 무게가 통계학적으로 유의하게 감소하는 것을 보였다($p<0.05$). 또한 대두보다 홍국발효대두가 간 조직의 지방 축적 억제 및 지방세포 내의 지방 축적 억제를 방해하는 효과를 보였다. 이상과 같이 홍국발효대두 추출물의 고농도투여군의 효능이 월등하게 좋게 나오므로써 간질환 개선 및 대사증후군 등과 같은 광범위한 질환 모델에 이용하여 농도의존적인 연구를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Alwahaibi NY, Alkhatri AS, Kumar JS (2015) Hematoxylin and eosin stain shows a high sensitivity but sub-optimal specificity in demonstrating iron pigment in liver biopsies. *Int J Appl Basic Med Res* 5(3): 169-171.
- Cardel MI, Atkinson MA, Taveras EM, Holm JC, Kelly AS (2020) Obesity treatment among adolescents: A review of current evidence and future directions. *JAMA Pediatr* 174(6): 609-617.
- Chatterjee C, Gleddie S, Xiao CW (2018) Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients* 10(9): 1211.
- Choi HW, Shin PG, Lee JH, Choi WS, Kang MJ, Kong WS, Kim GD (2018) Anti-inflammatory effect of lovastatin is mediated via the modulation of NF- κ B and inhibition of HDAC1 and the PI3K/Akt/mTOR pathway in RAW264. 7 macrophages. *Inter J Mol Med* 41(2): 1103-1109.
- Choi MJ, Yu TS (2005) Effects of red-yeast-rice supplementation on blood lipids and relations among cholesterol, bone markers, and hormones in ovariectomized rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15(3): 264-270.
- Heal DJ, Aspley S, Prow MR, Jackson HC, Martin KF, Cheetham SC (1998) Sibutramine: A novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(1): 18-28.
- Hong H, Park J, Lumbera WL, Hwang SG (2017) *Monascus ruber*-fermented buckwheat (red yeast buckwheat) suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Med Food* 20(4): 352-359.
- Hu J, Wang J, Gan QX, Ran Q, Lou GH, Xiong HJ, Peng CY, Sun JL, Yao RC, Huang QW (2020) Impact of red yeast rice on metabolic disease: A review of possible mechanisms of action. *J Agri Food Chem* 68(39): 10441-10455.
- Jang YJ, Kwon SO, Yeo KM, Hong MJ, Kim BN, Han DS (2011) Anti-obesity effect of *Sargassum confusum* ethanol extract in obese rats. *Korean J Food Sci Technol* 43(2): 189-194.
- Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Park DK (2004) Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 75(26): 3195-3203.
- Jeong EJ, Kim KP, Bang BH (2013) Quality characteristics of cookies added with hongkuk powder. *Korean J Food & Nutr* 26(2): 177-183.
- Journoud M, Jones PJ (2004) Red yeast rice: A new hypolipidemic drug. *Life Sci* 74(22): 2675-2683.
- Kim H, Kim TD, Eom SY, Zhang YW, Kim NS, Hahn YS,

- Shin KS, Song HG, Park SY, Kim JS, Kang JW (2006) Effects of Keumsa Sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts on the IL-12, IFN- γ and TNF- α expression in Human. Korean J Health Promot Dis Prev 6(4): 245-249.
- Kim MJ, Jeon HY, Kim JH (2015) Anti-obesity effect of Korean hamcho (*Salicornia herbacea* L.) powder on high-fat diet-induced obese rats. J Nutr Health 48(2): 123-132.
- Kim RH, Lee SC, Kim GN (2020) Effect of Banana (*Musa acuminata* Colla) Peel extract on the anti-adipogenic activity in 3T3-L1 adipocytes. J Korean Soc Food Sci Nutr 49(12): 1335-1341.
- Kim SH, Park BW, Kim JH (2015) Quality characteristics of tarakjuk (milk porridge) prepared with red yeast-rice. Korean J Food Nutr 28(2): 313-319.
- Kim YW, Kim TH, Sim SY, Ahn HY, Park KR, Kim JW, Cho YS (2018) Effects of extracts of *Monascus*-fermented *Angelica gigas* Nakai in high-fat diet-induced obesity in rat. Journal of Life Sci 28(1): 58-67.
- Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (2015) *Monascus* strain suitable for liquid fermentation of ultra finely pulverized substrate and uses thereof. Korea Patent 10-1542909, Republic of Korea.
- Kwon DY, Oh SW, Lee JS, Yang HJ, Lee SH, Lee JH, Sohn HS (2002) Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate. Food Sci Biotechnol 11(1): 55-61.
- Lee CL, Wen JY, Hsu YW, Pan TM (2013) *Monascus*-fermented yellow pigments monascin and ankaflavin showed antiobesity effect via the suppression of differentiation and lipogenesis in obese rats fed a high-fat diet. J Agric Food Chem 61(7): 1493-1500.
- Lee HJ, Kim JG (2002) Effects of dietary supplementation of Korean soybean paste (Doen-jang) on the lipid metabolism in rats fed a high fat and/or a high cholesterol diet. J Korean Public Health Assoc 28: 282-305.
- Lee JJ, Kim AR, Lee H, Kim CH, Chang HC, Lee MY (2011) Effects of soybean, cheonggukjang and doenjang on serum cholesterol level and weight reduction in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. Korean J Food Preserv 18(2): 226-235.
- Li M, Cheung BM (2009) Pharmacotherapy for obesity. Br J Clin Pharmacol 68(6): 804-810.
- Lu YA, Lee, HG Li, X Hyun JM, Kim HS, Kim TH, Jeon YJ (2020) Anti-obesity effects of red seaweed, *Plocamium telfairiae*, in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. Food Funct 11(3): 2299-2308.
- Lim YR, Shin JY, Kim H, Baek GH, Yu KW, Jeong HS, Lee JS (2014) Anti-adipogenic effect of fermented coffee with *Monascus ruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(4): 624-629.
- Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J (2017) IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. Adv Clin Exp Med 26(3): 421-426.
- Mohankumari HP, Naidu KA, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G (2021) Bioactive pigments of monascus purpureus attributed to antioxidant, HMG-CoA reductase inhibition and anti-atherogenic functions. Front Sustain Food Syst 15(10): 3389.
- Musselman ME, Pettit RS, Derenski KL (2011) A review and update of red yeast rice. Evid Based Complementary Altern Med 17(1): 33-39.
- Park JC, Cha JY, Hyeong LC, Doh ES, Kang IH, Cho YS (2009) Biological activities and chemical characteristics of *Monascus*-fermented Korean red ginseng. Korean Soc Life Sci 19(11): 1553-1561.
- Park JH, Guo L, Kang HM, Song BG, Kang JS, Lee YJ, Park YH, Je BL, Choi YW (2021) Leaves of *Cudrania tricuspidata* on the shoot positional sequence show different inhibition of adipogenesis activity in 3T3-L1 cells. J Life Sci 31(2): 209-218.
- Riva G, Villanova M, Cima L, Ghimenton C, Bronzoni C, Colombari R, Crestani M, Sina S, Brunelli M, D'Errico A, Montin U, Novelli L, Eccher A (2018) Oil red O is a useful tool to assess donor liver steatosis on frozen sections during transplantation. Transplant Proc 50(10): 3539-3543.
- Roh C, Lee SJ, Uddin SN, Kim JK, Kang C (2015) Characterization of anti-obesity compounds from soybean paste. Eur Food Res 240(4): 865-869.
- Ryu HJ, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Huh D, Kim TW, Ha TY (2011) Anti-obesity effect of hypsizigus marmoreus in high fat-fed mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 40(12): 1708-1714.
- Sharma AM, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal L, Maggioni AP, SCOUT Investigators (2009) Blood pressure changes associated with sibutramine and weight management - an analysis from the 6 week lead in period of the

- sibutramine cardiovascular outcomes trial (SCOUT). *Diabetes Obese Metab* 11(3): 239-250.
- Shin JG, Lee SI, Kwon JH, Kim SD (2005) Effect of beni-koji with chitosan-ascorbate on serum lipid profile of rats fed a high fat diet. *J East Asian Soc Dietary Life* 15(5): 524-530.
- Singh BP, Vij S, Hati S (2014) Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54: 171-179.
- Valliyodan B, Qiu D, Patil G, Zeng P, Huang J, Dai L, Nguyen, HT (2016) Landscape of genomic diversity and trait discovery in soybean. *Scientific Reports* 6: 1-10.
- World Health Organization (2017) The Statistics of Obesity. <https://www.who.int> (accessed on 10. 3. 2021)
- Xue-Mei LI, Xing-Hai SHEN, Zhen-Wen DUAN, Shu-Ren GUO (2011) Advances on the pharmacological effects of red yeast rice. *Chin J Nat Med* 9(3): 161-166.
- Yeom CH, Jeong HJ (2020) Immunometric method using ELISA and Quenchbody. *BT News* 27(1): 71-78.
- Yi D, Khang AR, Lee HW, Son SM, Kang YH (2018) Relative handgrip strength as a marker of metabolic syndrome: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) VI (2014 - 2015). *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 11(227): 227-240.
- Zhou W, Guo R, Guo W, Hong J, Li L, Ni L, Lv X (2019) Monascus yellow, red and orange pigments from red yeast rice ameliorate lipid metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis in Wistar rats fed on a high-fat diet. *Food Funct* 10(2): 1073-1084.
- Zhu B, Qi F, Wu J, Yin G, Hua J, Zhang Q, Qin L (2019) Red yeast rice: A systematic review of the traditional uses, chemistry, pharmacology, and quality control of an important Chinese folk medicine. *Front Pharmacol* 10(3389): 27.

Date Received	Jul. 21, 2021
Date Revised	Oct. 5, 2021
Date Accepted	Oct. 22, 2021