

## 고초균에 의한 탈지대두 grits 발효물의 항혈전 및 콜레스테롤 저하 효과

이성규<sup>1,3</sup> · 김현정<sup>2</sup> · 임남경<sup>1</sup> · 이은주<sup>3</sup> · 이삼빈<sup>1,2</sup> · 이인선<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과, <sup>2</sup>계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터, <sup>3</sup>(주)엔유씨전자 바이오 연구소

### Antithrombotic and Cholesterol Reduction Effects of Defatted Soybean Grits Fermented by *Bacillus subtilis* NUC1

Sung-Gyu Lee<sup>1,3</sup>, Hyun-Jeong Kim<sup>2</sup>, Nam-Kyung Im<sup>1</sup>, Eun-Ju Lee<sup>3</sup>, Sam Pin Lee<sup>1,2</sup>, and In-Seon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Technology, Keimyung University

<sup>2</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

<sup>3</sup>Bio Research Institute, NUC Electronics Co. Ltd.

**Abstract** This study investigated antithrombotic and hypocholesterolemic activities of defatted soybean grits (DSG) and fermented DSG (FD). The FD was prepared by the solid state fermentation using *Bacillus subtilis* NUC1 at 40°C for 24h. The water extracts of fermented DSG (FDW) exhibited higher fibrinolytic activity and inhibition of platelet aggregation induced by ADP than water extracts of DSG (DW). However, the DW and FDW inhibited HMG-CoA reductase activity and significantly decreased the intracellular cholesterol contents in HepG2 cells. In addition, DW treatment did not show any cholesterol adsorption capacity, while FDW demonstrated the highest cholesterol adsorption by 90%. The results suggest that fermented DSG have significant antithrombotic and hypocholesterolemic effects *in vitro* and these activities were improved during fermentation by *B. subtilis* NUC1.

**Key words:** defatted soybean grit, fermentation, antithrombotic, cholesterol reduction

## 서 론

고도의 산업화와 경제적 수준의 향상으로 식생활 패턴이 서구화되면서 한국인의 사망 원인 중 뇌혈관계 질환, 악성 종양, 고혈압 및 심장 질환 등의 만성질환으로 인한 사망률이 크게 증가하고 있으며, 소아 성인병 또한 증가추세에 있어 국민 보건에 심각한 문제점으로 지적되고 있다(1,2). 특히 서구화된 식생활로 인한 동물성 식품과 정제된 식품의 섭취량 증가로 지방간, 동맥경화, 심혈관계질환, 고지혈증, 고혈압 등의 질환 이완률도 꾸준히 증가하고 있다. 이 중 고지혈증은 혈장 내 콜레스테롤이나 중성지방이 비정상적으로 증가된 상태이고, 그 중 고콜레스테롤혈증은 죽상동맥경화증을 유발하는 것으로 알려져 있으며 고지혈증 개선을 위한 콜레스테롤 합성저해제가 다방면으로 연구되고 있다(3-7).

콜레스테롤 생합성 과정중 HMG-CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)로부터 mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-CoA reductase는 cholesterol의 합성속도를 조절하는 효소로 간 내에 HMG-CoA reductase 활성이 저하되면 간의 LDL-receptor의 활성

이 증가되어 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 보고되고 있다(8-10). 따라서 최근에는 HMG-CoA reductase의 활성을 조절하는 statin류의 물질들이 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증의 치료제로 많이 사용되고 있으나(11), 여러 부작용을 수반한다고 알려져 있어 식품으로부터 부작용이 없는 cholesterol 합성 저해 생리활성물질을 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

한편, 대두는 우수한 단백질원으로 그 사용량이 매년 증가하고 있으며 동물성 단백질인 casein에 비해 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시킨다는 연구들이 많은 동물실험(12-14)과 임상실험(15)을 통해 보고되고 있다. 또한 대두를 *Bacillus subtilis*균으로 발효시킨 청국장 등의 경우 soy peptides, globulins, isoflavones, saponin 등의 생리활성 물질이 생산되어(16) 혈전용해능(17), 항암(18), 항산화 및 항동맥경화 효과(19), 그리고 혈당조절 및 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 감소로 인한 지질대사를 개선하는 기능(20) 등이 보고되었다. 그렇지만 대두가 발효되면서 새로 생성되는 이들 성분들은 사용하는 균주에 따라 성분의 함량이나 생리활성에서 차이가 날 수 있다(21).

따라서 본 연구에서는 대두 대신에 탈지대두 grits (defatted soybean grits, DSG)를 *Bacillus subtilis*균으로 발효시켜 청국장과 유사한 항혈전 및 콜레스테롤 개선능을 가지는 소재로의 가능성을 확인해 보고자 하였다. DSG는 대두유 제조로 생산되는 부산물인 탈지대두박 분말(100 mesh 이하)보다 더 큰 알갱이 형태로 제조한 것으로, 단백질을 60% 이상 함유하고 있는 대두단백 제품의 가장 간단한 형태이다. 이 DSG를 단백질 분해 및 점질물 생성능이 우수한 *Bacillus subtilis* NUC1 균주로 발효시킨 발효물

\*Corresponding author: In-Seon Lee, Department of Food and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5538  
Fax: 82-53-580-5538  
E-mail: inseon@kmu.ac.kr  
Received April 15, 2009; revised June 12, 2009;  
accepted June 23, 2009

과 함께 발효하지 않은 DSG의 추출물을 각각 제조하여 *in vitro* 상에서 항혈전 및 콜레스테롤 개선능이 있는지 비교 검토해 보았다.

## 재료 및 방법

### 발효물 및 추출물 제조

탈지대두 grits(DSG)는 ADM사(Decatur, IL, USA)에서 구입하여 사용하였고, *Bacillus subtilis* NUC1 균주는 (주)NUC전자 바이오연구소로부터 분주받아 사용하였다. 먼저 DSG 원료를 40°C에서 12-18시간 동안 증자하거나, 증류수를 원료대비 2.5배 증량비로 첨가한 후 고압 멸균기(JP/MIR 551, SANYO, Tokyo, Japan)로 121°C에서 15분간 증자하였다. 증자된 DSG를 실온에서 50-60°C로 냉각하여 실험에 사용하였다. *B. subtilis* NUC1균의 접종을 위해 5%의 대두분말 용액에서 48시간 배양한 배양액을, 증자한 DSG에 *B. subtilis* NUC1균이 2%가 되게 각각 접종 후 40°C에서 24시간 발효시켜 DSG 발효물을 제조하였고, 발효된 DSG는 열풍건조(60°C, 48 hr) 하였다. DSG 및 DSG 발효물의 물 추출물의 제조는 각각의 시료에 10배의 증류수를 첨가하여 상온에서 2시간동안 추출한 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 여과하여 실험에 사용(22)하였다.

### 혈전용해 활성의 측정

혈전용해 활성은 Astrup과 Mullertz의 방법(23)을 응용한 fibrin plate method를 사용하여 측정하였다. Fibrin plate는 최종농도 0.5%가 되도록 fibrinogen(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 완전히 용해시킨 후 10 mL당 thrombin(Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 unit를 첨가하여 충분히 혼합한 후 상온에서 30분간 방치하여 고형화 시켰다. 시료를 원심 분리하여 상층액 20 µL을 fibrin plate에 점적하여 37°C에서 2시간 반응 후 형성된 투명 환의 크기를 측정하였으며, 대조구로서는 5 unit/mL human plasmin(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 20 µL 사용하여 효소활성을 비교하였다.

### Washed platelet의 조제

Rat를 ethyl ether로 마취하고, 항응고제 0.15M sodium citrate를 혈액과 1:9(v/v)의 비율이 되도록 함유한 주사기로 복대동맥으로부터 채혈하였다. Platelet rich plasma(PRP)는 200×g에서 10분간 원심분리하여 상층액의 PRP를 얻었고, 계속하여 800×g에서 15분간 원심분리하고, 침전된 혈소판을 washing buffer(137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)로 2회 세척한 후 suspension buffer(137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜서 washed platelet을 조제하였다(24). 혈소판 응집 억제능에 사용한 washed platelet을 cell counter(Hema-vet HV950FS, Draw Scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 측정하고 buffer로 희석하여 혈소판이 3×10<sup>8</sup> platelet/mL이 되도록 조정하였다. 혈소판은 저온에서 응집되므로 이상의 실험은 상온에서 실행하였다.

### 혈소판응집 억제능 측정

Rat의 혈소판 응집 억제능은 aggregometer(Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA, USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정하였다. Washed platelet을 37°C에서 3분간 incubation 시킨 후 농도별로 시료를 처리하고 2분후 혈소판 응집을 유도하는 물질 ADP(6 µM)로 응집을 유도하였으며, 10분간 측정 후 억제정도를 계산

하였다. 억제정도(%)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 아래와 같은 방법으로 구하였다.

$$\text{Inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: control의 aggregation %

B: sample 처리시의 aggregation %

### HMG-CoA reductase 저해활성

간 조직의 효소원은 Hulcher 등(25)의 방법을 일부 수정하여 분리하였다. 적출한 간 조직 1 g당 4배량의 완충용액(0.1 M triethanolamine, 0.02 M ethylenediminetraacetic acid, 2 mM dithiothreitol, pH 7.4)을 가한 후 빙냉 상태에서 glass teflon homogenizer로 마쇄 균질화 하였다. 마쇄 균질액은 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 하였고 상층액을 다시 20,000 rpm, 4°C에서 1시간 동안 초원심분리하여 생성된 pellet을 microsomal 분획으로 사용하였다. 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때 까지 -80°C에서 보관하였다.

측정 방법은 1 mL cuvette에 시료 20 µL, 0.5 mM phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM DTT 100 µL, 3 mM NADPH(Sigma-Aldrich Chemical Co., Mo. USA) 100 µL, 효소원 100 µL를 넣었다. 반응액의 온도는 37°C로 일정하게 유지하여 약 10분간 preincubation 한 후에 3 mM HMG-CoA(Sigma-Aldrich Chemical Co., Mo. USA) 100 µL를 가하여 효소 반응을 시작하였다. 반응이 시작됨과 동시에 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. HMG-CoA reductase의 억제활성은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{HMG-CoA reductase inhibition rate (\%)} = 1 - \frac{C}{T} \times 100$$

T: ΔO.D. of sample

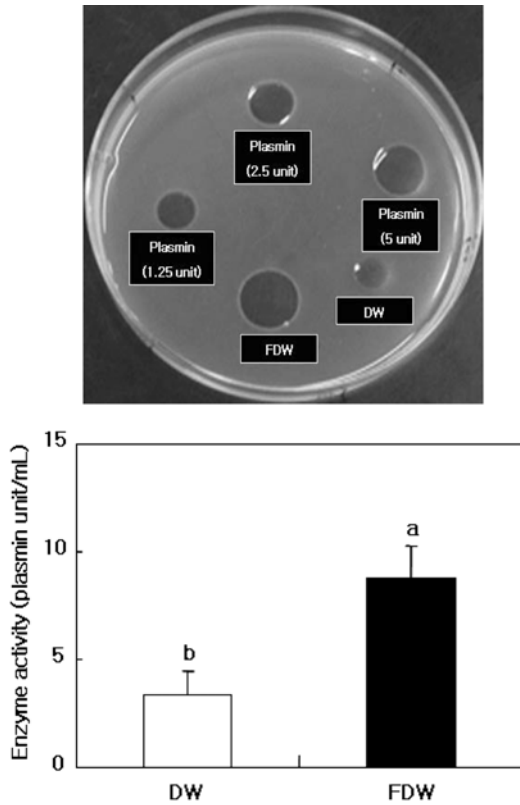
C: ΔO.D. of blank

### 세포주를 이용한 총 콜레스테롤 함량 측정

세포주를 이용한 총 콜레스테롤 함량 측정은 Park 등(26)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 HepG2 세포는 human hepatoma cell line으로서 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. HepG2 세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)과 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic가 첨가된 배지에서 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다. HepG2 세포를 6-well plate(Corning, Corning, NY, USA)에서 DMEM (FBS 2%) 배지에 5×10<sup>5</sup> cell/mL로 분주하고 24시간 배양하여 이를 PBS로 세척한 후 10 µg/mL의 콜레스테롤이 함유되어 있는 DMEM(FBS 0%) 배지에 시료 추출물을 최종 농도가 1 mg/mL가 되게 각각 첨가하여 8시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 다음 1% 에탄올을 함유하는 PBS로 세포를 1회 세척하고 다시 에탄올이 첨가되지 않은 PBS로 세포를 3회 세척한 후 lysis 시켜 총 콜레스테롤 함량을 효소법에 의한 kit(Asan Pharm., Seoul, Korea)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, 단백질은 Lowry 법(27)으로 정량하여 콜레스테롤 양을 산출하였다.

### 총 콜레스테롤 흡착능 측정

총 콜레스테롤 흡착능 측정은 효소법에 의한 kit(Asan Pharm., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 30 µg의 콜레스테롤을 첨가하여 25°C에서 20분 동안 잘 섞어준 후, 0.1 M



**Fig. 1. Fibrinolytic activities of DW and FDW by the area of clear zones on the fibrin plate.** Concentration of sample was 100 mg/mL. Values represent means±SD. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). DW: Water extracts of DSG. FDW: Water extracts of fermented DSG

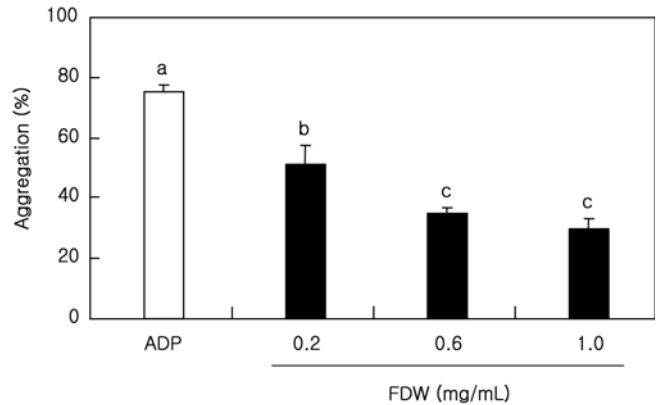
hexadecyltrimethylammonium bromide 을 50  $\mu$ L를 가하여 섞이게 한 뒤 15,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 효소액과 37°C에서 5분간 반응시켜 500 nm에서 측정하였다 (28).

### 결과 및 고찰

#### DSG 발효물의 혈전 용해능

*B. subtilis* NUC1 균으로 제조한 DSG 발효물의 혈전 용해능은 fibrin plate를 이용하여 fibrin이 가수분해되어 투명해지는 면적을 측정하여 판정하였다. DW 및 FDW의 혈전용해 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. DW와 FDW의 투명부위의 면적이 각각 8, 15 mm로 FDW가 약 2배 정도 넓게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 대조군으로 이용된 plasmin의 처리농도(1.25-5.0 unit/mL)가 증가할수록 투명부위의 면적도 비례하여 증가함을 확인하였다. 특히 plasmin으로부터 얻은 표준곡선을 이용해 혈전용해 활성도를 계산해 본 결과, DW와 FDW의 혈전용해 활성이 각각 3.42와 8.75 plasmin unit/mL로 발효된 DSG 추출물에서 약 2 배의 높은 혈전용해 활성을 가짐을 알 수 있었다.

현재 혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 혈전 용해제 등이 사용되고 있으나, 대표적인 항혈소판제인 아스피린은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양 등의 부작용을 일으키며(29), 항응고제 등의 약제는 가격이 너무 고가인 문제가 있다. 이에 버섯, 대두, 그리고 청국장, 된장, 젓갈, 낫또와 같은 발효식품에서 혈전용해 활성이 확인되어 혈전용해 효소의 정제



**Fig. 2. Effect of water extracts from FDW on rat washed platelet aggregation induced by ADP in a dose-dependent manner for 6 min.** Values represent means±SD. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). FDW: Water extracts of fermented DSG.

및 생산 균주의 분리 등(30-32)의 연구가 진행되고 있다. 특히 청 국장은 혈전용해 물질을 함유하고 있는 식품으로 잘 알려져 있으며(33), 혈전을 용해시키는 물질의 섭취는 혈관계 질환의 예방 과 치료 효과도 기대할 수 있다. 따라서 60% 이상의 단백질을 함유(34)하고 있는 DSG의 발효물에서도 높은 혈전용해 활성을 가지는 것을 확인하여 청국장처럼 혈전용해 물질을 함유하고 있 는 식품 소재로 이용 가능할 것이다.

#### 혈소판 응집 억제효과

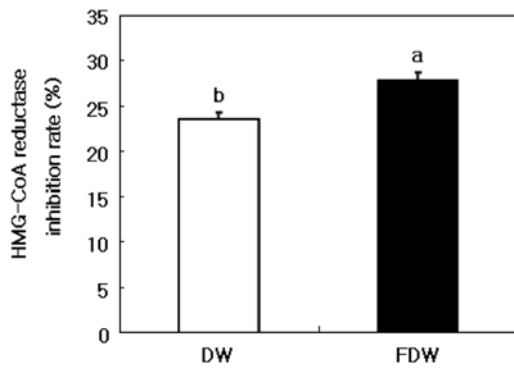
DW와 FDW의 혈소판 응집 억제효과를 확인하기 위하여, aggregometer로 응집 억제효과를 측정하였다(Fig. 2). 혈소판의 응 집 촉진제로 사용된 ADP에 의해서 rat의 washed platelet의 응집 이 유도되었으며, 혈소판을 시료와 2분간 전 처리한 후 ADP(6  $\mu$ M)로 응집을 유도하여 DW와 FDW에 의한 혈소판 응집 억제 능을 관찰한 결과 DW는 응집 억제효과가 없었지만(data not shown), 이에 반해 FDW는 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제효 과를 나타내었다. 특히 FDW의 혈소판 응집능은 처리농도가 가 장 높은 1.0 mg/mL의 농도에서 29.7%의 가장 낮은 응집력을 나 타내는 것을 확인하였다.

혈소판은 여러 물리, 화학적 자극에 의해 혈관이 손상되면 활 성화되어 지혈작용을 유도하여 혈액손실을 방지하지만 생리적인 요인들에 의해 혈액 순환장애나 혈관이 손상되어 혈소판이 과도 하게 활성화가 되면 심혈관계에서 혈전을 형성하여 동맥경화, 협 심증, 고혈압 등을 유발하게 된다(35,36). 따라서 혈소판 응집능 이 낮게 측정된 발효된 DSG는 혈소판응집 억제효과를 가지는 천연식품 소재가 되리라 생각된다.

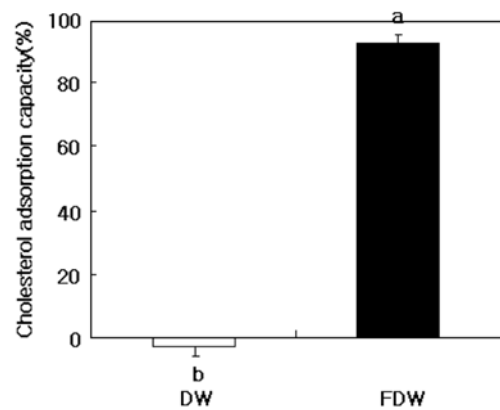
#### HMG-CoA reductase 저해활성 및 콜레스테롤 생합성 억제능

DW와 FDW의 콜레스테롤 생합성에 미치는 영향은 HMG-CoA reductase의 저해활성을 측정하여 확인하였다. HMG-CoA reductase 는 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 조절 효소로서 스테롤 이나 isoprenoid계 화합물의 생합성 경로의 중간단계인 mevalonic acid의 합성을 매개하는 역할을 하며, 여러 역학 연구에서 혈중 콜레스테롤치나 혈중 LDL-콜레스테롤치가 높을수록 관상동맥성 심장질환에 걸릴 위험성이 높아진다고 보고되고 있다(37).

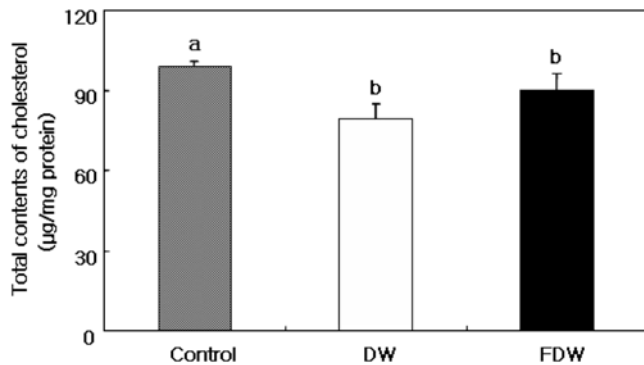
DW와 FDW에 의한 HMG-CoA reductase 저해활성은 Fig. 3과 같이 나타났다. DW의 경우 약 23% 정도의 저해활성을 나타내



**Fig. 3. *In vitro* HMG-CoA reductase inhibition rate of DW and FDW.** The reaction mixture consisted of sample solution 20  $\mu$ L (100 mg/mL), 0.5  $\mu$ M phosphate buffer (pH 7.0) 100  $\mu$ L, 20 mM DTT 100  $\mu$ L, 3 mM NADPH 100  $\mu$ L, enzyme source 100  $\mu$ L, and 3 mM HMG-CoA 100  $\mu$ L. Values represent means $\pm$ SD. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). DW: Water extracts of DSG. FDW: Water extracts of fermented DSG



**Fig. 5. *In vitro* cholesterol adsorption capacity of DW and FDW.** Values represent means $\pm$ SD. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). DW: Water extracts of DSG. FDW: Water extracts of fermented DSG



**Fig. 4. Total contents of cholesterol in intracellular of HepG2 cell.** HepG2 cells were treated with cholesterol (10  $\mu$ g/mL), and then sample were treated at 1 mg/mL. Values represent means $\pm$ SD. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). DW: Water extracts of DSG. FDW: Water extracts of fermented DSG.

었고, FDW에서는 약 28%로 저해활성이 조금 더 증가되었다. 이는 콩의 단백질, soy peptides, globulins 등이 콜레스테롤 및 지질 저하 효과(38,39)가 알려져 있으므로, 이들 성분을 함유하고 있는 DSG 물추출물 및 발효된 DSG 물추출물에서 HMG-CoA reductase 저해활성을 보인 것으로 생각된다.

한편, 세포내에서의 콜레스테롤 합성 억제능을 알아보기 위해 인간유래 간암세포주인 HepG2 세포주를 이용하여 콜레스테롤 합량을 측정하였다. HepG2 세포내로 콜레스테롤이 가장 잘 유입되는 조건을 검토하여 콜레스테롤 처리농도 10  $\mu$ g/mL에서 8시간 세포 배양으로 실험하였다. 즉 콜레스테롤(10  $\mu$ g/mL)만 투여한 대조군 그리고 콜레스테롤 첨가배지(10  $\mu$ g/mL)에 DW와 FDW를 1 mg/mL의 농도가 되도록 각각 처리해 8시간 배양한 다음 HepG2 세포 내의 콜레스테롤 함량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이, DW와 FDW 처리군 모두 세포 내의 콜레스테롤 함량이 대조군보다 유의적으로 감소하였으나 DW와 FDW 처리군간의 유의성은 보이지 않았다. 따라서 DSG와 DSG 발효물은 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA reductase를 저해하여 간 세포내의 콜레스테롤 함량을 감소시킨 것으로 생각된다.

### 총 콜레스테롤 흡착능

DW와 FDW의 콜레스테롤 흡착능을 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. DW에서는 콜레스테롤 흡착능을 보이지 않았지만, FDW에서는 약 90% 정도의 우수한 흡착능을 보였다. 이는 탈지대두 grits에서는 점질물 함량이 거의 측정되지 않았으나, DSG 발효물에서는 점질물 함량이 28.7%로 측정되었다는 보고(40)와 일치되게 FDW에서만 우수한 콜레스테롤 흡착능이 있음을 확인할 수 있었다.

대두를 발효시키게 되면 대두에 함유되어 있는 생리활성 물질 이외에, 발효과정 중 polyglutamate, levan 등의 새로운 생리활성 물질을 생성한다고 보고(41,42)되고 있어, 당뇨중세 개선, 콜레스테롤 개선, 지질대사 개선, 혈압 강하 및 항균작용 등이 기대되고 있다. 이처럼 DSG도 발효과정을 거치면서 점질물 등의 새로운 생리활성 물질들이 생성되어 항혈전 및 콜레스테롤 개선효과를 나타낸 것으로 생각된다. 앞으로 DSG 발효물의 활성성분 규명과 동물실험을 통한 독성평가가 병행된다면 항혈전 및 콜레스테롤 개선과 관련된 기능성 식품 및 치료 소재로서 DSG 발효물의 유용성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 탈지대두 grits(DSG)와 *B. subtilis* NUC1균주로 발효시킨 탈지대두 발효물(FD)을 제조한 다음 열풍건조한 시료를 물 추출하여 이들 DSG 물추출물(DW)과 발효된 DSG 물추출물(FDW)의 항혈전 활성과 콜레스테롤 저하 효과를 알아보았다. 그 결과, FDW는 DW보다 항혈전 활성 및 혈소판의 응고 억제 효과가 더 우수하였으며, 유의적으로 높은 HMG-CoA reductase 저해활성을 가졌다. 그러나 DW와 FDW 처리군 둘다 HepG2 세포를 이용한 콜레스테롤 생합성 억제능을 보였고, 대조군에 비해 세포 내의 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켰다. 그리고 콜레스테롤 흡착능에서는 FDW만 약 90% 정도의 높은 흡착능을 보였고, DW는 콜레스테롤 흡착능을 보이지 않았다. 따라서 발효된 DSG는 원료인 DSG 보다 항혈전 및 콜레스테롤 개선 효과가 더 우수한 것으로 생각되었다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업 및 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

## 문 헌

1. NSOK. Annual Report on the Cause of Death Statistics. Natl. Stat. Office Korea, Seoul, Korea (2003)
2. NSOK. The Expectancy of Future Population. Natl. Stat. Office Korea, Seoul, Korea (2002)
3. Lim SS, Lee JH. Effect *Atemisa Princeps* var Orientals and *Ceirctium japonicum* var ussuiense on serum lipid of hyperlipidemic rat. Korean J. Nutr. 30: 12-18 (1997)
4. Mckenny JA. Lipid management: tools for getting to the goal. Am. J. Manag. Care 7: 299-306 (2001)
5. Gang MS, Lim SS, Lee JH. A study on the chemical composition an hypocholesterilemic effect of nostoc commune. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 468-472 (1997)
6. Choi HS, Ha JO, Choo MH, Na MS, Lee MY. Effect of bambusa caulis in liquamen on lipid metabolism in rats fed high fat diet. Korean J. Food Preserve 11: 373-382 (2004)
7. Kang JA, Kang JS. Effect of garlic and onion on plasma an liver cholesterol and triglyceride and platelet aggregation in rate casual or cholesterol supplemented diets. Korean J. Nutr. 32: 132-138 (1997)
8. Sitory CR. Pharmacology and mechanism of action of the new HMG-CoA reductase inhibitors. Pharm. Res. 22: 555-562 (1990)
9. Qureshi AA, Abuimeileh N, Din ZZ, Elson CE, Burger WC. Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. Lipids 18: 343-348 (1983)
10. Qureshi AA, Burger WC, Peterson DM, Elson C.E. Suppression of cholesterolgenesis by plant constituents: review of wisconsin contributions to NC-167. Lipids 20: 817-824 (1985)
11. Stryer WH. Biochemistry, 4th ed. Freeman & Company, New York, USA. pp. 685-712 (1995)
12. Huff MW, Carrol KK. Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. J. Nutr. 110: 1676-1685 (1980)
13. Park MS, Liepa GU. Effects of dietary protein and amino acids on the metabolism of cholesterol-carring lipoproteins in rats. J. Nutr. 112: 1892-1898 (1982)
14. Sautier C, Doucet C, Flament C, Lemonnier D. Effect of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rats. Atherosclerosis 34: 233-241. (1979)
15. Sirtori CR, Agra E, Conti F, Gatti E, Mantero O, Tremili E, Sirtori M, Fraterrigo L, Tavazzi L, Kritshevsky D. Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. Am. J. Clin. Nutr. 32: 1645-1658 (1979)
16. Choi YB, Sohn HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 745-750 (1998)
17. Hso S, Lee SK, Joo HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *chugkookjang*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 119-124 (1998)
18. Kwon EY. Standardization of Chungkookjang preparation and its cancer preventive effect. MS thesis, Pusan National University, Pusan, Korea (2000)
19. Yang JL. Antiatherogenic effect of chonkukjang. PhD thesis, Pusan National University, Pusan, Korea (2000)
20. Kang MJ. Antibabetic effect of soy pinito and Chongkukjang: Animal studies and clinical trials. PhD thesis, Inje University, Gimhae, Korea (2004)
21. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some ciological activities and isoflavone content of *Chungkugjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 662-667 (2001)
22. Byun MW, Son JH, Yook HS, Jo C, Kim DH. Effect of gamma irradiation on the physiological activity of Korean soybean fermented foods, *Chungkookjang* and *Doenjang*. Radiation Physics. and Chemistry 64: 245-248 (2002)
23. Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40: 346-351 (1952)
24. Durand P, Bloy C, Peltier-Pujol F, Blache D. *In-vitro* and *ex-vivo* inhibition of blood platelet aggregation by naftazone. J. Pharm. Pharmacol. 48: 566-572 (1996)
25. Hulcher FH, Oleson WH. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. J. Lipid Res. 14: 625-631 (1973)
26. Park SC, Noh YH, Koo J. Effects of ginseng components on content of cholesterol and activity of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in HepG2 cells cultured in cholesterol rich medium. Korean J. Ginseng. Sci. 19: 212-218 (1995)
27. Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
28. Soh HS, Kim CS, Lee SP. A new *in vitro* assay of cholesterol adsorption by food and microbial polysaccharides. J. Med. Food 6: 225-230 (2003)
29. Miwa K, Kambara H, Kawai C. Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. Am. Heart. J. 105: 351-355 (1983)
30. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
31. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito T, Asada A, Nishimura S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 197: 1340-1347 (1993)
32. Oh HS, Park YH, Kim JH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice spycceans. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 498-504 (2002)
33. Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi YJ, Lee YS, Oh HI, Kwon IB, Lee SY. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* Strain CK 11-4 screened from Chungguk-jang. Applied and Environmental Microbiology 62: 2482-2488 (1996)
34. Bainy EM, Tosh SM, Corredig M, Poysa V, Woodrow L. Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. Carbohydrate Polymers 72: 664-672 (2008)
35. Armstrong RA. Platelet prostanoid receptors. Pharmacol. Ther. 72: 171-191 (1996)
36. Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. Physiol. Rev. 69: 58-178 (1989)
37. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J. Lipid Res. 33: 1569-1582 (1992)
38. Chen JR, Chiou SF, Suteuna K, Yang HY, Yang SC. Lipid metabolism in hypocholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non dialyzed soybean protein fraction. Nutrition 19: 676-680 (2003)
39. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones : their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 68: 1375-1379 (1998)
40. Kim HJ, Lee SG, Ji YJ, Hwangbo MH, Lee EJ, Lee SP, Lee IS. Quality Characteristics of Defatted Soybean Grits Fermented by *Bacillus Subtilis* NUC1. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr. 37: 1479-1484 (2008)
41. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibinolytic bacterial strain from Chongkukjang. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
42. Kil JO, Kom GN, Park IS. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme produced from *Bacillus sp.* KP-6408 isolated from Chongkukjang. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1998)