

몰로키아 첨가 탈지대두 grit(defatted soybean grit) 발효물의 콜레스테롤 개선 효과

김현정¹ · 이성규^{2,3} · 이삼빈^{1,2} · 이인선^{1,2*}

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

Cholesterol Improvement Effects of Fermented Defatted Soybean Grits Added to *Corchorus olitorius*

Hyun-Jeong Kim¹, Sung-Gyu Lee^{2,3}, Sam-Pin Lee^{1,2}, and In-Seon Lee^{1,2*}

¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

²Department of Food and Technology, Keimyung University

³Bio Research Institute, NUC Electronics Co. Ltd.

Abstract This study was performed to investigate cholesterol improvement effects of adding fermented defatted soybean grit (FD) and FD added to 5 or 10% *Corchorus olitorius* (FDC). Cholesterol adsorption in the FD and FDC group was more than 70%. Apolipoprotein AI and CIII improved in HepG2 cells, and a greater improvement effect was shown in FDC than that in FD. We also investigated the effect of FDC on body lipid metabolism and a high-fat diet for 4 weeks. Rats were divided into control (Con), high-fat (HF), HF treated with 20% FD (HF-FD), and HF treated with 20% FDC (HF-FDC) groups. Plasma total cholesterol and low density lipoprotein-cholesterol concentrations, hepatic total cholesterol, and triglyceride contents were significantly lower in the HF-FDC group than those in the HF group. Additionally, fecal total cholesterol and triglyceride contents increased in rats treated with FDC. Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activities were significantly lower in the HF-FDC group than those in the HF group.

Keywords: defatted soybean grit, *Corchorus olitorius*, hypercholesterol, HMG-CoA reductase

서 론

경제성장과 더불어 생활환경의 변화로 식생활이 서구화되면서 우리 국민도 동물성 식품의 섭취량 특히 지방질의 섭취량이 증가하여 비만, 뇌졸중, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨, 악성종양 등의 각종 질병이 증가되고 있다(1). 특히 지방질의 과잉섭취로 인한 유발되는 고지혈증 및 심혈관계 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 최근에는 콜레스테롤 합성을 저해하는 생리활성물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

그 중 우리나라의 전통 발효식품 중 청국장은 우수한 단백질 원인 대두를 *Bacillus subtilis*균으로 발효시킨 식품으로 soy peptides, glubulins, isoflavones, saponin 등의 물질이 생산되어 혈전용해능, 항암, 항산화 및 항동맥경화 효과, 그리고 혈당조절, 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 감소로 인한 지질대사를 개선하는 기능이 보고(2-6) 되었다. 대두의 고초균 발효과정 중에 생성되는 점질물은 gamma-poly-glutamic acid(γ -PGA)와 fructose 중합체인 레반으로 구성되며(7), γ -PGA는 칼슘이 인과 결합하여 불용성 염을 형성하는 것을 방지하여 칼슘 용해도를 증가시키며(8), 레반

은 혈중지방 감소효과(9,10)를 나타낸다고 보고되고 있다.

최근에는 대두 발효물의 제조시에 홍삼(11), 상황버섯(12), 양파(13) 등의 소재를 첨가하여 발효시키면 고지혈증 및 지질대사에 더 우수한 효능이 있음이 보고되기도 하였다. 또한 대두 대신에 대두단백제품인 탈지대두 grit(defatted soybean grit, DSG)를 *B. subtilis*균으로 발효시킨 DSG 발효물에서도 청국장과 유사한 항혈전 및 콜레스테롤 개선능이 있었으며(14), 그리고 DSG에 녹두를 첨가하여 *B. subtilis*균으로 발효시키면 DSG 발효물보다 더 큰 항혈전 및 콜레스테롤 개선능이 증가(15)하기도 하였다.

한편 몰로키아(*Corchorus olitorius* L.)는 피나무과(Tiliaceae)에 속하는 녹색 채소로 원산지는 이집트의 지중해 연안으로, 단백질 36.7%, 조섬유 29.7%, 점질성 다당류 22%, 회분 11.1%를 함유하고 있으며, 특히 β -carotene과 lutein이 풍부하다(16,17). 몰로키아는 변비개선, 항산화 작용, 콜레스테롤 저하효과 등이 있으며, 또한 몰로키아는 LDL 수용체가 결핍된(LDL receptor, LDL-R) knockout mice에서 혈중 콜레스테롤을 감소시켜 항동맥경화 활성이 있음이 최근 보고(18-20)되기도 하였다. 이에 단백질 및 점질성 다당류의 함량이 높고 콜레스테롤 개선 효과도 가지는 몰로키아를 DSG에 첨가하여 *B. subtilis*균으로 발효시키면 DSG 발효물이 가지는 콜레스테롤 개선능 보다 더 큰 콜레스테롤 개선능을 가질 것으로 여겨졌다. 나아가 지질관련 질환을 예방하기 위한 대두발효물의 제조에 몰로키아를 첨가함으로써 새로운 대두제품 개발에도 기여하리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 DSG에 몰로키아 분말을 첨가하여 발효시킨 다음, 발효물에서 콜레스테롤 개선 효과가 있는 지 *in vitro*

*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 January 21, 2011; revised March 18, 2011;
accepted March 21, 2011

및 *in vivo*에서 살펴보았으며 이때 DSG 발효물과도 비교 분석하였다.

재료 및 방법

발효물 제조

몰로키아(*Corchorus olitorius* L.)는 경기도 여주에서 수확하여 50°C에서 12시간 건조시킨 후 grind mill(M12s, Hankook Fujee Plant Co., Busan, Korea)로 분쇄한 후 가는 체(ϕ 1 mm)로 걸러 곱게 분말화한 제품을 구입하였고, 탈지대두 grit(defatted soybean grit, DSG)는 ADM사(Decatur, IL, USA)에서 구입하였으며, *B. subtilis* NUC1 균주는 (주)NUC전자 바이오연구소로부터 분주받아 사용하였다. DSG 원료에 증류수 또는 증류수에 몰로키아 분말을 5, 10% 농도로 첨가하여 용해시킨 다음 이를 각각 원료대비 2.5배 증량비로 첨가한 후 121°C에서 15분간 증자하여 냉각하여 사용하였다. 증자한 DSG 및 몰로키아 첨가 DSG 각각에 배양한 *B. subtilis* NUC1균을 2%가 되게 접종한 후, 40°C에서 24시간 발효시켜 DSG 발효물(FD) 및 몰로키아 첨가 DSG 발효물(FDC)을 제조한 다음 동결건조하여 사용하였다.

총 콜레스테롤 흡착능 측정

총 콜레스테롤 흡착능 측정은 효소법에 의한 kit(AsanPharm, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 동결건조한 발효물을 10배의 증류수에 각각 녹인 후 발효물 1 mL에 30 μ g의 콜레스테롤을 첨가하여 25°C에서 20분 동안 잘 섞어준 후, 0.1 M hexadecyl trimethylammonium bromide(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)를 50 μ L를 가하여 섞이게 한 뒤 15,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 효소액과 37°C에서 5분간 반응시켜 500 nm에서 측정하였다(21).

세포주를 이용한 apolipoprotein 분비능 측정

HepG2 세포는 human hepatoma cell line으로서 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였고, HepG2 세포는 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 1% antibiotics(Gibco-BRL)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco-BRL) 배지를 이용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2-3일에 한 번씩 계대배양하였다. Apolipoprotein의 분비능은 enzyme-linked immunosorbent 법(22)으로 검색하였다. 먼저, HepG2 세포를 high glucose DMEM 배지에 5 \times 10⁵ cells/mL로 분주하고 시료를 처리한 뒤 24시간 후에 배양액을 96-well plate(Corning, Lowell, MA, USA)에 50 μ L/well로 분주하고 4°C에 방치하였다. 12시간 후 5% skim milk에 37°C에서 1시간동안 배양한 다음 1차 항체와 2차 항체를 반응 시켰다. 마지막으로 발색시약인 1,2-phenylenediamine (100 μ L/well)에 30분간 반응시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물 및 체중증가율

실험동물은 분양받은 5주령(100-150 g)의 Sprague-Dawley계 male rat(Central Lab animal, Seoul, Korea) 32 마리를 구입하여 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. Rat은 온도 23 \pm 2°C, 습도 60 \pm 5%, 12시간 주기로 명암이 유지되는 사육실에서 사육하였다. 동물실험군은 기본식이군(C), 고지방 식이군(HF), 고지방식이에 20% 몰로키아 첨가 DSG 발효물을 첨가한 군(HF-FDC)과 20% DSG 발효물을 첨가한 군(HF-FD)으로 나누어 4주간 사육하였다. 이때 고

지방식이에 첨가한 시료량은 예비 실험을 통해 20% 첨가량으로 결정하였다. 각 군별 8 마리의 rat를 사용하였고, 고지방 식이는 10% lard, 1% cholesterol 그리고 0.25% sodium cholate(Sigma-Aldrich Co.)를 기본 식이에 첨가하여 공급하였으며, 물과 사료는 충분한 양을 공급하였다.

실험 사육기간 중 1주일 간격으로 체중을 측정하여 최종 체중에서 실험 개시 체중을 감한 후 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였고, 또한 식이섭취량도 3일 간격으로 측정하였으며, 식이효율은 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

혈액, 간 조직 및 분변 중의 지질 분석

Rat의 혈액 채취는 12시간 전에 식이 공급을 중단하여 절식시킨 rat을 마취한 후 회복하여 헤파린 처리된 주사기로 복부대동맥으로 채혈하였으며, 채혈 후 실온에서 30분 동안 방치한 뒤 600 \times g에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 취하여 얻은 혈장을 사용하였다. 간은 채혈 후 분리하여 생리식염수로 혈액을 씻은 후 무게를 측정하였으며, -70°C에 보관하면서 사용하였고, 분변은 사육기간 마지막 3일간 수집하여 건조시킨 후 냉동보관하면서 사용하였다.

혈장 중의 중성지방은 중성지방 측정용 kit(AsanPharm), 총콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit(AsanPharm), HDL-콜레스테롤 함량은 HDL-콜레스테롤 측정용 kit(AsanPharm)를 각각 사용하여 측정하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 (총 콜레스테롤-HDL-콜레스테롤-(중성지질/5))으로 계산하였다. 그리고 간 조직내의 지질의 추출 및 분석은 Folch 등의 방법(23)을 수정, 보완하여 측정하였다. 즉 간 조직 0.5 g을 잘게 자른 후 10 mL의 Folch solution(chloroform:methanol, 2:1, v/v)을 첨가하여 지질을 추출, 여과한 다음 0.5% H₂SO₄ 3 mL를 첨가하여 분별깔대기에서 분리하였다. 분리된 하층을 모아 Folch solution을 첨가하여 총량이 10 mL이 되도록 맞춘 후, 이 추출액 10 μ L를 취해 중성지방 분석에 이용하였다. 그리고 간 콜레스테롤 분석은 10 mL 추출물중 500 μ L을 새로운 tube에 넣어 하루 밤 동안 실온에서 건조시킨 후 50 μ L Triton X-100/chloroform solution(1:1, v/v)을 첨가하여 vortex하고 다시 chloroform 450 μ L을 넣어 총 500 μ L가 되게 희석하여 사용하였다. 이들 추출액 10 μ L를 각각 실온에서 건조시킨 후 enzymatic reagent 1.5 mL를 넣고 37°C water bath에서 10분간 반응시켜 발색시킨 후, 콜레스테롤은 500 nm에서, 중성지질은 550 nm에서 각각 측정하였다. 또한 분변 중의 중성지방 및 콜레스테롤도 간 조직의 지질 추출 방법과 동일한 방법(23)으로 추출한 다음 정량하였다.

간내 HMG-CoA reductase 활성 분석

적출한 간조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate(pH 7.4)을 가한 후 마쇄하여 4°C 이하에서 600 \times g로 10분간 원심분리한 다음 상등액을 취해, 이를 10,000 \times g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 다시 105,000 \times g, 4°C 1시간 동안 초원심분리하여 침전물인 microsomal 분획을 얻어 사용하였다. HMG-CoA reductase 활성 측정은 Hulcher와 Oleson의 방법(24)을 변형하여 사용하였다. 150 μ M HMG-CoA(Sigma-Aldrich Co.)와 2 mM NADPH(Sigma-Aldrich Co.)를 500 μ g microsome 분획과 잘 섞은 후 0.1 M triethanolamine(Sigma-Aldrich Co.), 0.02 M EDTA(pH 7.4, Sigma-Aldrich Co.) 완충용액으로 1 mL를 채우고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 0.01 M sodium arsenite(Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 넣고 상온에서 1분 이상 반응시킨 후 100 μ L의 2 M

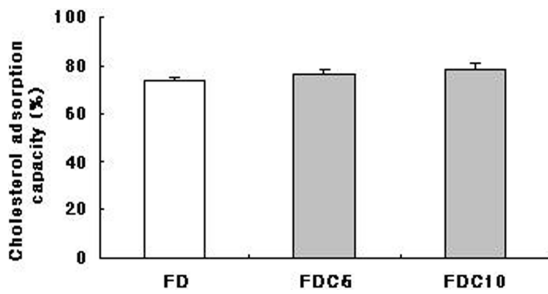


Fig. 1. In vitro cholesterol adsorption capacity of FD and FDC. Values represent means±SD. Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$). FD: Fermented DSG. FDC: Fermented DSG+ 5-10% of *C. olitorius* powder

citrate(pH 3.5, Sigma-Aldrich Co.), 3% Na-tungstate(Sigma-Aldrich Co.) 완충용액을 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응물을 13,000 rpm에서 10분간 4°C에서 원심분리한 후 상등액을 1 mL에 200 µL의 2 M Tris(pH 10.6, Sigma-Aldrich Co.)와 100 µL 2 M Tris (pH 8.0)를 섞어 실온에서 3분간 반응 시킨 후 20 µL의 3 mM 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid(DTNB, Sigma-Aldrich Co.), 0.1 M triethanolamine(Sigma-Aldrich Co.), 0.2 M EDTA (pH 7.4) 완충용액을 넣고 잘 섞은 후 412 nm에서 4분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 효소활성도는 1분간 1 mg의 microsome 단백질이 생성하는 CoA-SH의 양을 nmole로 나타내었다. 그리고 단백질 정량은 Lowry 등의 방법(25)에 의하여 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Co.)을 표준단백질 용액으로 이용한 표준 검량선을 구하여 그 양을 산출하였다.

통계분석

실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검정은 SAS version 6.12(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석 하였다.

결과 및 고찰

몰로키아 첨가 DSG 발효물의 총 콜레스테롤 흡착능

몰로키아를 5, 10%의 농도로 각각 첨가한 FDC군의 콜레스테롤 흡착정도는 Fig. 1에 나타내었다. 몰로키아를 첨가한 FDC군 모두 콜레스테롤 흡착능은 75% 이상으로 높게 나타났으나, 몰로키아 첨가량 증가에 따른 콜레스테롤 흡착능의 차이는 보이지 않았다. 또한 몰로키아를 첨가하지 않은 FD군에서도 74% 정도의 콜레스테롤 흡착능을 보여 FDC와 차이를 보이지 않았다. 탈지대두 grit(DSG)는 점질물이 없으나 DSG의 발효물에서는 20% 이상의 점질물을 함유하여(26) 3-5% 정도의 점질물을 함유하는 대두 발효물(7)보다 더 많은 양의 점질물의 생성으로 인해 FD, FDC군에서 높은 콜레스테롤 흡착능을 보인 것으로 생각된다. 또한 몰로키아를 첨가한 DSG 발효물의 콜레스테롤 흡착능은 녹두를 첨가한 DSG 발효물에서 보인 흡착능(15)과 유사하였다.

대두를 발효시키게 되면 대두에 함유되어 있는 생리활성 물질 이외에, 발효과정 중 polyglutamate, 레반 등의 새로운 생리활성 물질을 생성한다고 보고(27,28)되고 있어, 당노중세 개선, 콜레스테롤 개선, 지질대사 개선, 혈압 강하 및 항근작용 등이 기대되고 있다. 이처럼 DSG도 발효과정을 거치면서 점질물 등의 새로운 생리활성 물질들이 생성되어 콜레스테롤 개선효과를 나타낸

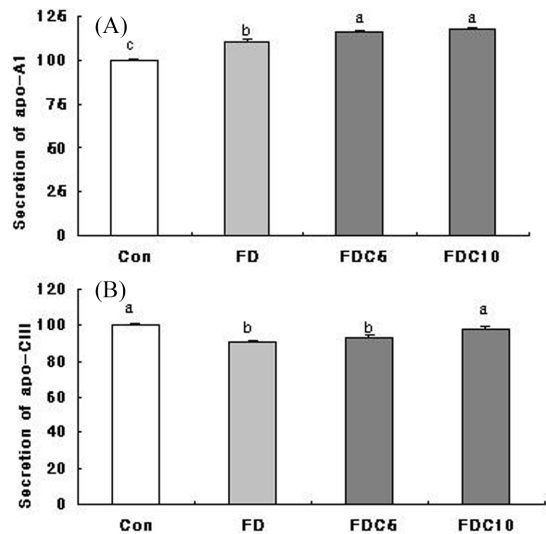


Fig. 2. Effect of FD and FDC on the secretion of apo-A I (A) and apo-CIII (B) from HepG2 cells. Cells were treated with sample at concentration of 1 mg/mL. Values represent means±SD. Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

것으로 생각되고, 또한 녹두를 첨가한 DSG 발효물(15)이나 몰로키아를 첨가한 DSG 발효물에서 DSG 발효물보다 더 큰 콜레스테롤 흡착능을 보인 것은 첨가된 소재가 가진 성분으로 인해 콜레스테롤 흡착능이 좀 더 증가된 것으로 생각된다.

몰로키아 첨가 DSG 발효물의 apolipoprotein AI 및 CIII의 분비능 검색

Apolipoprotein은 지방의 운반과 지단백 구조 유지에 관여하고, 지단백 대사에 관여하는 효소들의 활성인자가 되며, 지단백 내 지질이 간, 혈관 벽, 지방조직에 대사되는데 필요한 성분이다(29). 그 중 apolipoprotein AI(apo-AI)은 chylomicron과 HDL 콜레스테롤을 구성하는 중요한 지단백으로 lecithin:cholesterol acyltransferase(LCAT)를 활성화시키는 조효소 작용을 하고(30), 특히 apo-AI의 증가는 항동맥경화증의 역할을 하는 HDL2의 증가와 비례하는 것으로 알려져 있다(31). 반면 apolipoprotein CIII(apo-CIII)는 VLDL, IDL, HDL의 구성 단백질로서 지단백 리파제의 활성을 억제하여 혈중 중성지질을 증가시키며, 혈중의 apo-CIII 농도의 증가는 동맥경화증의 발생 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(32).

몰로키아를 5, 10%농도로 첨가한 FDC군이 apo-AI과 apo-CIII의 분비량에 미치는 영향을 검색한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저, apo-AI의 경우 대조군에 비해 FD군과 몰로키아를 첨가한 FDC군 모두 분비량이 증가하였다. 또한 FD군에 비해서는 몰로키아를 첨가한 FDC군에서 유의적으로 분비량이 증가하였으나, 몰로키아 첨가량의 증가에 의한 apo-AI 분비량의 증가는 보이지 않았다. 반면 apo-CIII의 분비량은 대조군에 비해 FD군과 FDC 첨가군에서 낮아졌으며 특히 5% 몰로키아를 첨가한 FDC군은 FD군보다 더 유의적으로 낮은 값을 보였다. 이는 녹두를 첨가한 대두단백 발효물에서도 apo-AI의 분비는 증가하고, apo-CIII의 분비는 감소시켰다는 보고(15)와 유사한 경향을 보였다.

따라서 몰로키아를 첨가한 FDC군은 항동맥경화 인자로 작용하는 HDL을 주로 구성하는 apo-AI을 증가시키고 VLDL, IDL, HDL을 구성하여 동맥경화증의 위험성을 증가시키는 apo-CIII의 분비는 저해함을 확인할 수 있었다. 따라서 몰로키아를 첨가하여

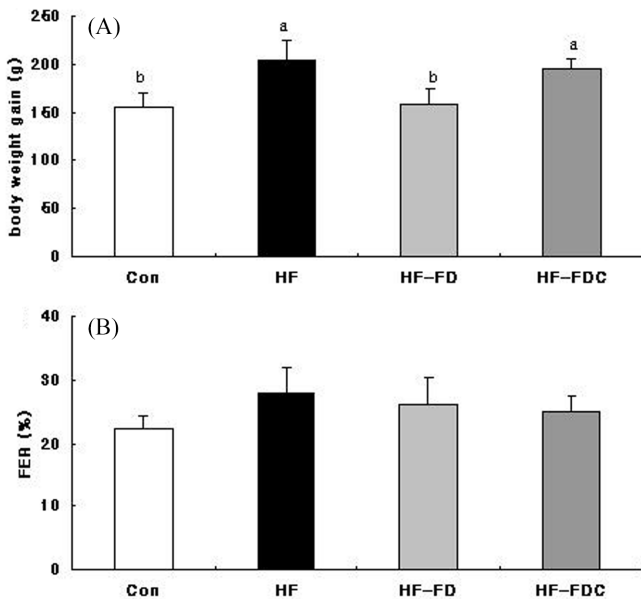


Fig. 3. Effects of supplementation of FDC on body weight gain (A) and food efficiency ratio (FER, B) in rats fed with high fat diet for 4 weeks. Con: Control, HF: High fat, HF-FD: High fat + 20% fermented defatted soybean grit (FDSG), HF-FDC: High fat + 20% FDSG added with 2.5% *C. olitorius* groups. High fat diet was comprised of standard rat chow supplemented with 10% of lard, 1% of cholesterol and 0.25% of sodium cholate. FER: Body weight gain/food intake×100. Values are expressed as mean±SD. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

발효시킨 FDC군은 *in vitro* 상에서 콜레스테롤 흡착 및 조절능을 가진 것으로 생각되었다.

FDC 투여로 인한 체중증가율 및 식이효율의 변화

고지방식이와 FDC를 섭취시킨 흰쥐에 4주간의 체중증가율은 Fig. 3과 같이, 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적인 체중증가를 보였으며, HF군에 비해 HF-FD군에서 체중이 유의적으로 감소하였고, HF-FDC 첨가군에서는 체중이 감소하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그리고 식이효율은 대조군에 비해 HF군에서 증가하다가 시료를 첨가한 군에서 감소하는 경향이었으나 각 군별 유의적인 차이는 보이지 않았다.

FDC 투여로 인한 혈장 지질 농도 변화

고지방식을 섭취시킨 흰쥐에 FDC를 첨가하여 사육한 다음 혈장 지질 농도의 변화를 살펴보았다. 먼저 혈장 중의 중성지질은 콜레스테롤로 전환하는 비율이 높으며, 특히 중성지질은 콜레스테롤의 합성을 촉진시켜 혈중 콜레스테롤을 증가시키는(33) 것으로 알려져 있다. 혈장 중 중성지질의 함량은 고지방식이군과 HF-FD군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, HF-FDC군에서는 유의적인 감소를 보였다(Table 1). 또한 혈장 중 총콜레스테롤의 함량은 대조군에 비해 고지방식이군에서 총콜레스테롤의 함량이 유의적으로 증가하였고, 고지방식이군에 비해 고지방식이와 FD, FDC 첨가군에서 총콜레스테롤 함량이 유의성 있는 감소를 보였다. 그리고 혈장 중 LDL-콜레스테롤 함량도 고지방식이군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다가, 고지방식이와 FD 및 FDC 첨가군에서 고지방식이군에 비해 LDL-콜레스테롤의 함량이 유의적으로 감소되었다. 특히 HF-FDC군은 HF-FD군에 비해 총

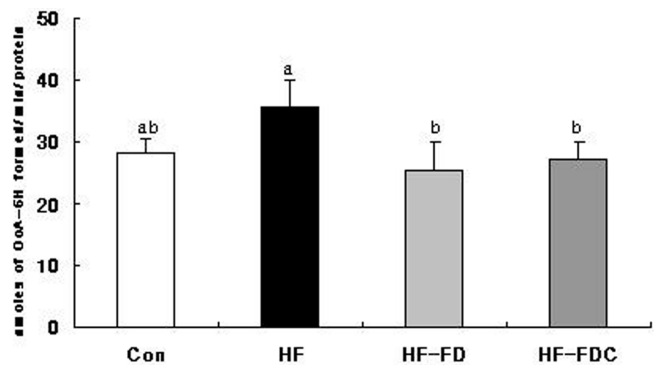


Fig. 4. Effect of supplementation of FDC on HMG-CoA reductase activity of rats fed experimental diet for 4 weeks. Con: Control, HF: High fat, HF-FD: High fat+20% fermented defatted soybean grit (FDSG), HF-FDC: High fat+20% FDSG added with 2.5% *C. olitorius* groups. Values represent means±SD. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

콜레스테롤의 함량 및 LDL-콜레스테롤 함량도 유의적인 감소를 나타내었다.

한편 HDL-콜레스테롤은 말초조직이나 혈액 중에 축적된 콜레스테롤을 콜레스테롤 에스테르로 만들어 간으로 수송하여 혈액 중 콜레스테롤 함량을 저하시켜 동맥경화증의 개선 및 예방에 효과가 있다고 알려져 있으며, LDL-콜레스테롤 함량과 역상관 관계를 유지한다(33). 그러나 혈장중 HDL-콜레스테롤 함량은 각 군별 유의성 있는 차이는 보이지 않았다.

고콜레스테롤 쥐에 콩 단백질을 투여하면 혈장 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과(34)가 있으며, 성장기 Wistar 쥐에 10% 대두단백 분획물을 급여하면 콜레스테롤이 감소하였다는 보고(35)와 유사하게, 본 연구에서도 FD, FDC 첨가군에서 혈액 콜레스테롤 함량이 감소하는 효과를 보였다. 이는 탈지대두grit의 콩 단백질 중 soy peptides, globulins, isoflavones, saponin 등이 지질 저하 효과가 크다는 보고(36,37)와 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 몰로키아 첨가에 의해 FD보다 더 큰 콜레스테롤 개선 효과를 보인 것은 몰로키아 내에 단백질 함량이 36% 정도 존재(16)하여 FD보다 FDC에서 더 우수한 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 보인 것으로 생각된다. 따라서 FDC는 FD보다 고지방식이에 의해 증가된 혈중 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 함량을 더 감소시키는 소재로 여겨져 고콜레스테롤증 예방에 관여할 것으로 기대된다.

FDC 투여로 인한 간내 지질 농도 및 HMG-CoA reductase 활성 변화

고지방 또는 콜레스테롤의 섭취에 의해 간 조직에서 지질대사 이상이 초래되어 지질의 침착에 의해 간의 무게가 증가하고 간에서의 지질과 콜레스테롤 함량이 증가한다고(33) 알려져 있다. 간 조직 내의 중성지질 및 콜레스테롤 함량의 경우 대조군에 비해 고지방식이군에서 증가하였으며, FD, FDC 첨가로 인해서 고지방식이군에 비해 이들 지질 농도가 감소하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 2).

한편 HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 과정에서 중요한 조절 효소로서, 이 효소의 저해는 세포 내에서 콜레스테롤 합성을 억제한다고 알려져, HMG-CoA reductase 저해제는 혈중 콜레스테롤 특히 LDL 콜레스테롤을 가장 효과적으로 낮출 수 있는 hypocholesterolemic 약제로 널리 사용되고 있다(38). 일반적으로 HMG-CoA reductase 저해제가 혈장 총 콜레스테롤 및 LDL-

Table 1. Effects of supplementation of FDC on plasma lipid levels in rats fed high fat diet for 4 weeks

Group ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)
Con	114.91±15.569 ^b	94.17±5.09 ^d	18.21±2.43 ^d	70.21±5.91 ^{ns}
HF	161.39±23.49 ^a	526.97±18.47 ^a	355.01±20.67 ^a	86.68±10.72
HF-FD	128.35±16.49 ^a	269.85±19.34 ^b	158.35±16.21 ^b	88.82±10.89
HF-FDC	89.21±11.17 ^b	191.43±13.21 ^c	123.78±15.99 ^c	86.42±12.13

¹⁾Con: Control group, HF: High fat, HF-FD: High fat+20% fermented defatted sobean grit (FDSG), HF-FDC: High fat+20% FDSG added with 2.5% *C. olitorius* groups. Values are expressed as mean±SD. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at *p*<0.05 by Duncan's multiple comparison tests.

Table 2. Effects of supplementation of FDC on hepatic and fecal lipid levels in rats fed high fat diet for 4 weeks

Group ¹⁾	Liver		Feces	
	Total cholesterol (mg/g tissue)	Triglyceride (mg/g tissue)	Total cholesterol (mg/g tissue)	Triglyceride (mg/g tissue)
Con	39.00±9.91 ^b	161.90±15.60 ^b	185.24±17.02 ^c	230.53±12.39 ^b
HF	170.50±18.99 ^a	353.30±28.55 ^a	231.23±17.67 ^c	322.71±15.69 ^a
HF-FD	166.10±17.44 ^a	320.40±17.27 ^a	348.84±15.95 ^b	298.56±14.05 ^a
HF-FDC	158.70±13.35 ^a	331.00±15.69 ^a	493.51±7.21 ^a	249.34±13.88 ^b

¹⁾Con: Control group, HF: High fat, HF-FD: High fat+20% fermented defatted sobean grit (FDSG), HF-FDC: High fat+20% FDSG added with 2.5% *C. olitorius* groups. Values are expressed as mean±SD. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at *p*<0.05 by Duncan's multiple comparison tests.

콜레스테롤을 낮추는 기전은 간에서 HMG-CoA reductase의 활성을 억제하여 콜레스테롤 생합성을 억제함으로써 간의 LDL 수용체의 발현을 촉진시켜 혈중의 지질농도를 저하시킨다(39,40)고 한다.

간 내 HMG-CoA reductase 활성은 대조군에 비해 고지방식이군에서 크게 증가되었다가, 고지방식사와 FD 및 FDC 첨가군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4). 고지방식이군의 HMG-CoA reductase 활성의 증가는 고콜레스테롤 식이에 의한 결과로 생각되고, FD나 FDC 첨가에 의해 혈중 콜레스테롤의 함량이 감소하는 것은 DSG 성분이 내인성 콜레스테롤 합성의 중요한 효소인 HMG-CoA reductase의 활성을 저해하여 나타난 결과로 생각된다. 따라서 FD, FDC는 HMG-CoA reductase 활성을 조절하여 간의 콜레스테롤 합성을 감소시키고, 또한 간의 중성지질 축적도 억제한다고 생각된다.

FDC 투여로 인한 분변의 지질 농도 변화

분변으로 중성지질 및 총 콜레스테롤 배설량은 고지방식이군에 비해 고지방식사와 FD, FDC 첨가군에서 증가되었다(Table 2). 즉 고지방식사에 FD, FDC를 투여함으로써 고지방식이군에 비해 분변으로의 총 콜레스테롤 및 중성지질의 배설량이 증가하였다. 특히 FDC군은 FD군에 비해 유의적인 총 중성지질 및 총 콜레스테롤 배설량이 유의적으로 증가하였다. 분리대두단백 섭취군에서 분변으로의 중성지방의 배출이 높아졌다는 보고(41)와 유사하게 FD, FDC 처리군에서 분변으로의 지질배설량이 증가함을 알 수 있었다. 특히 대두단백질이 체내에서 가수분해 될 때 생성되는 peptides가 담즙산 배설을 촉진시키며 대두 단백질의 혈청 콜레스테롤 감소 효과는 변으로의 총 콜레스테롤 배설량 증가(42)와도 관련 있을 것으로 생각된다. 또한 FD나 FDC의 경우 발효로 인해 생성된 점질물(26)로 인해 변으로의 총 콜레스테롤 배설량이 증가한 것으로 생각된다. 특히 몰로키아의 첨가로 인해 중성지질 및 총 콜레스테롤 배설량이 FD보다 더 큰 증가를 보인 것은 몰로키아 내에 22% 정도 존재(16)하는 점질성 다당류로 인해 배변 작용이 더 촉진된 결과로 여겨진다. 따라서 FDC는 체내 콜레스

테롤 및 중성지질의 함량을 조절하여 체내 지질대사 개선에 관여할 수 있는 소재로 생각된다.

요 약

DSG에 몰로키아 분말을 첨가하여 발효시킨 발효물이 콜레스테롤 개선효과를 가지는지 *in vitro* 및 *in vivo*에서 살펴보았다. *B. subtilis* NUC1균주로 발효한 탈지대두 grits 발효물인 FD와 탈지대두 grit에 몰로키아를 5, 10%로 각각 첨가하여 발효한 FDC군의 콜레스테롤 흡착능을 살펴본 결과, 모든 군에서 70% 이상의 흡착능을 보였다. HepG2 세포를 이용한 apo-AI, apo-CIII의 분비능 측정에서는 FD군에 비해 몰로키아를 첨가한 FDC군에서 더 우수한 개선효과를 보였다. 한편 FDC가 고지방식이를 급여한 흰쥐의 체내 콜레스테롤 개선에 미치는 영향을 살펴보고자, 기본식이군(Con), 고지방식이군(HF) 그리고 고지방식사와 FD첨가군(HF-FD), 고지방식사와 FDC 첨가군(HF-FDC)으로 나누어 4주간 사육하였다. 그 결과, 혈장 내 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량, 그리고 간 조직 내의 총콜레스테롤 및 중성지질 함량은 HF군에서 증가하였다가 HF-FDC 첨가군에서 유의적으로 감소하였고, 분변 내의 콜레스테롤 및 중성지질 배설량은 FDC 투여로 인해 HF군에 비해 증가하였다. 또한 간내 HMG-CoA reductase 활성은 HF군에서 증가되었다가, HF-FDC첨가군에서 유의성 있게 감소되었다. 따라서 FDC는 콜레스테롤 흡착 및 조절능을 가지며, 그리고 혈중 콜레스테롤 함량, 조직 내의 지질 및 콜레스테롤 축적을 감소시켜 체내 콜레스테롤 개선에 효과적인 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업, 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, 2011년 교육과학기술부(지역거점 연구단육성사업/노화극복·웰빙을 위한 융합의료기술개발 사업단)의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문헌

1. MHWK. Yearbook of Health and Welfare Statistics. Ministry of Health and Welfare Republic of Korea, Seoul, Korea. p. 35 (2003)
2. Choi YB, Sohn HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 745-750 (1998)
3. Hso S, Lee SK, Joo HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *cheonggukjang*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 119-124 (1998)
4. Kwon EY. Standardization of *cheonggukjang* preparation and its cancer preventive effect. MS thesis. Pusan National University, Busan, Korea (2000)
5. Yang JL. Antiatherogenic effect of *cheonggukjang*. PhD thesis. Pusan National University, Busan, Korea (2000)
6. Kang MJ. Antibabetic effect of soy pinito and *cheonggukjang* : Animal studies and clinical trials. PhD thesis. Inje University, Gimhae, Korea (2004)
7. Lee YL, Kim SH, Choung NH, Yim MH. A study on the production of viscous substance during *cheonggukjang* fermentation. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 35: 202-209 (1992)
8. Park C, Kim KS, Jung CM, Shin HJ, Kim CJ, Ashiuchi M, Soda K, Sung MH. Effect of poly- γ -glutamic acid on calcium solubility *in vitro* and *in vivo*. Deep-Sea Water Health Sci. 3: 71-75 (2003)
9. Kang SA, Hong KH, Jang KH, Kim SH, Jang EK, Kim CH, Choue RW. Effects of low level of low level of levan feeding on serum lipids, adiposity, and UCP expression in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 788-795 (2002)
10. Kang SA, Jang KH, Lee JC, Chang BI, Lim YA, Song BC. The effects of ructose polymer levan on the body fat accumulation and serum lipid profiles of Korean women. Korean J. Commun. Nutr. 8: 986-992 (2003)
11. Lee SI, Shin JG, Kim DS. Effect of red ginseng-*cheonggukjang* extracts on lipid profiles of serum in alcohol administered diabetes-induced rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1362-1366 (2005)
12. Koh JB. Effects of *cheonggukjang* added *Phellinus linteus* on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35: 140-145 (2006)
13. Park JH, Kim JM, Park EJ, Lee KH. Effects of *cheonggukjang* added with onion on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed high fat-cholesterol diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 1244-1250 (2008)
14. Lee SG, Kim HJ, Im NK, Lee EJ, Lee SP, Lee IS. Antithrombotic and cholesterol reduction effects of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 423-427 (2009)
15. Lee SG, Kim HJ, Yu MH, Lee EJ, Lee SP, Lee IS. Cholesterol improvement synergistic effects of fermented soybean grits caused by added with mung bean *in vitro*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 947-952 (2010)
16. El-Mahdy AR, El-Sebaiy LA. Preliminary studies on the mucilage extracted from okara fruits, taro tubers, Jew's mellow leaves and fenugreek seeds. Food Chem. 14: 237-249 (1984)
17. Farag RS, El-Khwas HAM, Mohamed MS. Distribution of carotenoids in some fresh and boiled foods. Adv. Food Sci. 20: 1-6 (1998)
18. Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H. Phenolic antioxidant from the leaves of *Corchorus olitorius* L. J. Agr. Food Chem. 47: 3963-3966 (1999)
19. Innami S, Tabata K, Shimizu J, Kusunoki K, Ishida H, Matsuguma M, Wada M, Sugiyama N, Kondo M. Dried green leaf powders of Jew's mellow (*Corchorus*), persimmon (*Disophyros kaki*), and sweet potato (*Ipomoea batatas*) lower hepatic cholesterol concentration and increase fecal bile acid excretion in rats fed a cholesterol-free diet. Plant Food Hum. Nutr. 52: 55-65 (1998)
20. Hwangbo MH, Kim HJ, Lee IS, Chung TH, Kim IK, Shin HM. Protective effect of *Vasopurus* on atherosclerosis induced by dietary cholesterol in LDL r/- mice. Korean J. Herbol. 24: 49-53 (2009)
21. 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)
22. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. pp.18.3-18.44 (2001)
23. Folch J, Lees M, Sloan-Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509 (1957)
24. 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)
25. Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
26. 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)
27. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *cheonggukjang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
28. 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 *cheonggukjang*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1998)
29. Durstine JL, Grandjean PW, Cox CA, Thompson PD. Lipids, lipoproteins, and exercise. J. Cardiopulm. Rehabil. 22: 385-398 (2002)
30. Kostner GM, Knipping G, Groener JE. The role of LACT and cholesterol ester transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. Adv. Exp. Med. Biol. 210: 79-86 (1987)
31. Taskinen MR, Kahri J, Koivisto V, Shepherd J, Dackard CJ. Metabolism of HDL apolipoprotein AI and AII in type I (insulindependent) diabetes mellitus. Diabetologia 35: 347-356 (1992)
32. Gotto AM, Pownall HJ, Havel RA. Introduction to the plasma lipoproteins. Methods Enzymol. 128: 3-40 (1986)
33. Lee HJ. Effects of dietary casein, soy protein and mixed protein on body lipid components of rats. MS thesis. Sung-shin Women's University, Seoul, Korea (1986)
34. Demonty I, Lamarche B, Deshaies Y, Jacques H. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. J. Nutr. Biochem. 13: 671-677 (2002)
35. Kim MJ, Lee MK, Jang JY, Kim DG. Effect of protein in diet-induced hypercholesterolemia rats. Korean J. Food Nutr. 10: 246-253 (1997)
36. Chen JR, Chiou SF, Suetsuna 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. Nutrion 19: 676-680 (2003)
37. Song YS, Kwon TW. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. Food Indus. Nutr. 5: 36-41 (2000)
38. Fujioka T, Nara F, Tsujita Y, Fukushige J, Fukami M, Kuroda M. The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. Biochim. Biophys. Acta 1254: 7-12 (1995)
39. Balmir F, Stack R, Jeffrey E, Jimenez MD, Wang L, Potter SM. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. J. Nutr. 126: 3046-3053 (1996)
40. Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y, Matsue H. Antioxidative function of *natto*, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. J. Agr. Food Chem. 50: 3597-3601 (2002)
41. Huff MW, Carrol KK. Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. J. Nutr. 110: 1676-1685 (1980)
42. Terpstra AH, van Tintelen G, West CE. The hypocholesterolemic effects of dietary soy protein in rats. J. Nutr. 112: 810-817 (1982)