

황국곡자 투여가 지방질 대사에 미치는 영향

장지은 · 최혜란 · 이정현 · 인재평¹ · 이정미¹ · 김성필¹ · 진중현¹ · 박탁현¹ · 최명준¹ · 이태범*
(재)베리&바이오식품연구소, ¹대상(주)

The Effect of Rice with *Aspergillus terreus* on Lipid Metabolism in Rats

Ji Eun Jang, Hye Ran Choi, Jung-Hyun Lee, Jae Pyung In¹, Jeong Mi Lee¹, Sung Pil Kim¹,
Joong Hyun Jin¹, Tack Hyun Park¹, Myeong Jun Choi¹, and Tae Bum Lee*

Berry & Biofood Research Institute
¹Daesang

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of rice containing *Aspergillus terreus* (Hwangkuk, HK) on lipid metabolism in male Sprague-Dawley (SD) rats fed a high-cholesterol diet (HCD) for 8 weeks. SD rats were divided into five groups: Normal, [Negative Control (HCD), Positive Control (lovastatin)], [HK 0.5 g/kg and HK 2 g/kg]. Hepatic total lipids significantly decreased following treatment with rice containing *Asp. terreus*. Furthermore, this treatment led to higher expression levels of HMG-CoA reductase, LDL receptor and SREBP2 mRNA in the liver compared with the HCD group. In addition, histopathologic evaluation showed that feeding rats with rice containing *Asp. terreus* suppressed hepatic steatosis. These results suggest that rice containing *Asp. terreus* may be able to regulate of cholesterol synthesis and prevent hyperlipidemia.

Keywords: *Aspergillus terreus*, high cholesterol diet, lovastatin, cholesterol synthesis, hyperlipidemia

서 론

최근 우리나라는 생활수준이 향상되고 식생활이 서구화되면서 가공식품, 동물성 식품의 소비증가로 인하여 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심근경색 등과 같은 순환기계 질환의 발생이 증가하고 있다. 2008년 통계청의 자료에 의하면 사망원인이 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환 순으로 나타났다. 심혈관계 질환은 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연, 스트레스 등이 위험요인으로 보고되고 있으며 특히 심혈관계 질환의 발병률은 지난 수 십 년간 계속 증가하여 주요 사망 원인 중 하나가 되었다(1-2).

심혈관계 질환 중 고지혈증은 관상동맥질환, 뇌혈관질환의 공통되는 위험인자로서 현대의 식생활 습관의 변화에 따라 발생하는 대표적인 질환으로 혈중 콜레스테롤 또는 중성지방의 수치가 높은 상태를 일컫는다. 콜레스테롤이나 중성지방이 비정상적으로 증가하여 동맥 내벽에 죽종의 반점을 형성하여 허혈성 심장 질환을 일으키게 된다. 일반적으로 혈중 콜레스테롤, 중성지방질의 증가 및 지단백질 함량의 변화와 같은 비정상적인 지방질대사 문제가 되고 있으며(3-5), 최근 국민들의 생활환경과 식생활 양식의 급격한 변화와 관련성이 큰 것으로 의학 및 영양학적 측면에서 심각한 사회문제로 제기되고 있다.

고콜레스테롤혈증은 혈중 콜레스테롤 농도가 정상수준 이상인

경우를 말하며 콜레스테롤 과잉 섭취 또는 간에서의 콜레스테롤 대사 이상이 원인이 된다. 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL) 콜레스테롤의 증가가 주원인으로 고콜레스테롤혈증이 지속 되면 동맥벽에 산화된 LDL 콜레스테롤이 침착해서 죽상경화증을 일으키고 심근경색이나 뇌졸중과 같은 질병이 발생한다(6).

동맥경화증은 심혈관계 질환 중 대표적인 것으로, 심혈관계 질환은 현재 국내 질병 중에서 가장 주요한 사망원인 중 하나로 알려져 있다. 지금까지 밝혀진 위험 인자 중에 죽상동맥경화(atherosclerosis)가 주요한 위험 인자로 작용하고 있으며 죽상동맥경화의 위험인자로는 고지혈증, 고혈압, 흡연, 그리고 당뇨병 등이 알려져 있는데 특히 LDL이 고밀도 지단백질(high density lipoprotein, HDL)에 비해 고지단백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질환 및 죽상동맥경화증의 발생과 연관성이 매우 깊다. 따라서, 동맥경화를 예방하거나 치료하기 위해 혈중 콜레스테롤을 억제하고 LDL 수치를 낮추기 위한 연구가 많이 수행되고 있다(7).

콜레스테롤의 생합성은 25개 이상의 효소가 작용하는 복잡한 과정으로 콜레스테롤 생합성 경로의 율속 단계 중 초기 율속 단계에서 HMG-CoA (3-hydroxy-3-glutaryl-coenzyme A)로부터 메발론산(mevalonate)로 전환시키는 효소인 HMG-CoA 환원효소는 콜레스테롤 생합성 과정에 중요하게 작용하는 효소이다. 간 내에 HMG-CoA 환원효소의 활성이 억제되면 LDL receptor의 활성이 증가되어 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 보고되고 있다(8-9). 현재 HMG-CoA 환원효소 억제제로 스타틴계 약물들을 사용하고 있으며 기능기의 종류에 따라 4가지(lovastatin, mevastatin, simvastatin, pravastatin)가 알려져 있다. 스타틴계 약물의 예방 효과는 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시키고 염증반응, 산화, 응고과정 등을 조절하는 효과를 나타내기도 한다. 이 중 로바스타틴(lovastatin)이 가장 강한 콜레스테롤 저하효과를 가지고 있으며 고

*Corresponding author: Tae Bum Lee, Berry & Biofood Research Institute, Gochang, Jeonbuk 56417, Korea
Tel: 82-63-560-5170
Fax: 82-63-563-6680
E-mail: tblee01@gbri.re.kr
Received April 16, 2015; revised July 1, 2015;
accepted August 5, 2015

콜레스테롤혈증 환자의 치료에 선호되고 있다(10-11).

고지혈증 치료제인 lovastatin은 HMG-CoA reductase에 매우 효과적인 competitive inhibitor로 작용한다(12-13). Lovastatin의 구조는 HMG-CoA와 유사하며 HMG-CoA 대신 HMG-CoA reductase와 미리 결합하여 mevalonate의 합성을 저해함으로써 콜레스테롤 생합성 속도를 제한하여 혈중 콜레스테롤 수치를 감소시킨다. 또한 LDL-receptor를 증가시켜 콜레스테롤로 전환될 수 있는 LDL을 줄여 콜레스테롤의 양을 줄일 수 있다고 알려져 있다(14).

아스페르길루스 테레우스(*Aspergillus terreus*)는 균사 형성 곰팡이로 칼럼형 효소를 형성하여 황갈색을 띠며 열대와 아열대 지방 같은 온난한 기후에서 널리 발견되며 주로 시트린산(citrinin), 글리오톡신(gliotoxin), 피툴린(patulin), 테레인(terrein) 등 다양한 2차 대사산물과 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춰주는 강력한 물질인 lovastatin을 생산하며 산업에서 주로 사용된다(15-17).

연구보고에 의하면, *Asp. terreus*균주는 세포에서 HMG-CoA 환원효소를 억제하고, 동물에서 콜레스테롤 생합성을 억제하여 콜레스테롤을 조절한다고 알려져 있다(18). 최근에는 *Asp. terreus*균주를 이용하여 발효한 마와 쌀의 항산화 활성을 확인한 결과, DPPH 라디칼 제거 활성 및 polyphenol의 함량을 증가시켜, 항산화 식품 소재로 이용될 수 있음을 제시하였고(19) 고지방식이로 유도한 동물모델에 누룩곰팡이(*Aspergillus*) 속 미생물로 발효시킨 발효비지를 섭취하여 항비만 효과를 본 결과, 체중이 감소됨을 확인하였다(20).

따라서 본 연구에서는 *Asp. terreus*를 접종하여 제조한 황국곡자를 이용하여 지질대사와 관련된 조절유전자 및 심혈관질환에 미치는 효능을 확인함으로써, 고지혈증 개선에 미치는 황국곡자의 효능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

황국곡자 제조과정

백미를 수세 후 실온에서 3시간 동안 침지 처리하여 침지된 쌀은 30분간 물 빼기를 실시하였다. 물 빼기가 완료된 침지 쌀에 탄소원(glucose) 및 질소원(yeast extract)을 영양원으로 첨가 혼합한 후 고압증기살균기(autoclave)를 활용하여 121°C, 10분간 가열 하였다. 종균 접종이 가능하도록 35°C까지 냉각을 진행한 후 미리 제조된 *Asp. terreus* MKDS01 종균을 0.2-2% 내외로 클린벤치에서 접종하였다. *Asp. terreus* MKDS01의 최적 배양온도는 27±3°C, 로 항온실에서 배양을 실시하였다. 배양기간은 모나콜린 생산량에 따라 4-10일 동안 실시하였으며 배양이 완료된 황국곡자의 보존성 및 안정성 확보를 위해서 수분함량 8±2% 수준이 되도록 건조를 시킨 후 냉장 보관하여 사용 하였다.

실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 5주령 된 SD 쥐(rat)를 코사바이오에서 구입하여 사용하였다. 1주간 예비 사육기간을 거친 뒤 각 실험군마다 평균 체중이 약 200-250 g이 되도록 각 군당 6마리씩 3개 군으로 나누어 스테인리스강 케이지(stainless steel bottomed cage)에 3마리씩 분리하여 사육하였다. 실험동물 사육실의 온도는 22±2°C, 상대습도는 50±5%로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(7:00-19:00)로 조절하였다.

본 실험동물은 (재)고창북분자연연구소 효능평가센터 실험동물실 동물실험윤리위원회의 허가(GBRI-IACUC-14004)를 받아 시행하였다.

실험에 사용된 황국곡자는 투여군에 맞추어 1.5 mg/g 당 lovas-

tatin 함량으로 조제하였으며, 황국곡자의 투여량에 따라 0.75-3.0 mg 수준의 crude lovastatin으로 섭취되도록 제조하였다.

실험군은 정상대조군(Normal chow diet: normal), 고콜레스테롤 대조군(high-cholesterol diet: CTL), 양성대조군(high-cholesterol diet +lovastatin 10 mg/kg: POSI), 황국곡자 0.5 g 투여군(high-cholesterol diet+황국곡자 0.5 g/kg: HK 0.5 g), 황국곡자 2 g 투여군(high-cholesterol diet+황국곡자 2.0 g/kg: HK 2 g)으로 나누고, 각 6마리씩 8주간 경구투여를 하였다. 실험에 사용한 lovastatin은 statin계의 약물로 HMG-CoA 환원효소에 대해 효과적인 억제제로 작용한다. 이는 LDL receptor를 증가시킴으로써 콜레스테롤로 전환될 수 있는 LDL을 억제하여 고지혈증 환자의 치료에 선호되고 있다.

사료는 정상식이(AIN 76: 카세인(casein), DL-메싸이오닌(DL-methionine), 옥수수녹말(cornstarch), 슈크로스(sucrose), 셀룰로오스(cellulose), 옥수수오일(corn oil))를 사용하고, 고콜레스테롤을 유도하기 위하여 1% cholesterol과 0.5% 콜산(cholic acid)를 첨가하였다. 고콜레스테롤이 함유된 고형사료와 필터 및 자외선살균기로 여과 살균된 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 8주간 식이와 물을 자유롭게 먹을 수 있게 하고, 주 1회 각 그룹의 식이, 음수 섭취량, 체중을 측정하였다.

체혈 및 조직의 채취

8주간 식이 후 희생 전 12시간 절식시켰으며 각 시험군의 동물 처치는 에테르(ether) 마취하에 개복한 후 복부대동맥으로부터 채혈하였다. 채혈한 전혈을 EDTA 튜브에 받아 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하는 방법으로 혈청(serum)을 분리하였다. 채혈 후 실험사한 쥐에서 간조직을 적출하였다. 채취한 간조직의 일부는 10% 중성 포르말린에 고정하여 병리조직 제작과정을 거쳐 헤마토실린과 에오신(hematoxylin & eosin) 염색 후 간조직의 지질 침착 정도를 확인하였고, 나머지 조직은 -80°C에 냉동 보관하였다가 분석에 사용하였다.

혈중 지질분석

혈중 내 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 농도는 생화학 측정기기(FUJI DRI-CHEM 4000, Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

혈중 CETP (cholesterol ester transfer protein) activity 측정

혈청 내 CETP 활성은 CETP 활성 분석 키트(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였으며 혈청과 시약을 섞어 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 Excitation 465 nm, Emission 535 nm에서 ELISA 판독기(Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다.

간조직 중의 지질 조성 분석

간조직 중 총 지질은 Folch 방법에 의해 추출하였다. 간조직 20 mg과 클로로폼(chloroform):아이소프로판올(isopropanol):NP-40 (7:11:0.1, v/v) 용매를 200 µL를 취하여 균질기로 마쇄한 후 분액 깔대기로 분리시킨 지질분획을 질소가스 하에 건조한 후 칭량하였다. 총 콜레스테롤(Cholesterol/cholesterol ester quantitation kit, BioVision, Mountain View, CA, USA)은 측정용 ELISA kit로 확인하였다.

대변에서 콜레스테롤 배출 효과 측정

각 군별로 3일 동안 배설되는 분변을 수집하여 건조시키고 분쇄하여 균질기로 균질화한 후 측정하였다. 콜레스테롤의 총 양은

콜레스테롤 정량 키트(Cholesterol/cholesterol ester quantitation kit, BioVision)를 사용하였다. 시료와 시약 섞어 빛을 차단 후 37°C에서 1시간 동안 배양하여 530/590 nm ELISA reader (Synergy HT, Bio-Tek)를 이용하여 측정하였다.

RNA 분리

간조직으로부터 RNA를 추출하기 위하여 실험동물의 간 20 mg을 tri reagent (RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan) 1 mL에 넣고, 균질기로 균질화한 후 5분 동안 상온에 방치하였다. 5분 후 클로로포름 200 μ L를 넣어 20초간 vortexing하였고 15,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 상층액과 동량으로 이소프로판올을 첨가한 후 10분 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 RNA 침전물을 획득하였다. RNA 침전물을 0.1% 디에틸피로카보네이트(diethyl pyrocarbonate, DEPC)와 혼합한 70% 에탄올을 넣어 세척한 후 15,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 에탄올을 제거한 후 수분 간 침전물을 건조시켜 0.1% DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1 OD=40 μ g/mL)는 DU[®]730 분광광도계(Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

실시간 역전사 증합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR quantification)

First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U/ μ L RNasin (Invitrogen), 1 mM each dNTP, oligo (dT)₂₀ 100 ng과 MMLV 역전사효소(reverse transcriptase) (Invitrogen) 200U가 함유된 20 μ L의 용액에서 총 RNA 2 μ g으로부터 합성하였다. Real-time PCR은 Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0에서 증폭하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1과 같으며 유전자의 정량분석은 Light Cycler Software 4.0 (Roche)을 이용하였다.

간의 병리조직학적 관찰(H&E stain)

간조직 내 지방질의 축적을 확인하기 위해서 적출된 간조직의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀으로 고정한 후, 4 μ m 두께로 절편을 만들고 슬라이드 제작한 후 일반적인 hematoxylin & eosin 염색을 실시하고 Nikon Eclipse E200 (Nikon Eclipse E2000, Nikon, Tokyo, Japan) 현미경을 이용하여 NASH (nonalcoholic steatohepatitis) score를 측정하였다. NASH란 비알코올성 지방간염으로 거대수포성 지방증, 간세포 손상과 혼합 염증반응이라는 3지 병변이 주로 3구역, 중심 소엽에 분포하는 것을 특징으로 한다. NASH score 측정은 H&E 염색을 한 슬라이드를 광학현미경으로 조사하여 지방증, 풍선변성, 소엽 염증 정도의 점

수를 합산하여 5점 이상이면 NASH로, 2점 이하이면 NASH가 아닌 것으로 판정하였다. 본 NASH score는 200배에서 측정되었다.

통계처리

모든 분석 자료는 평균±표준편차 형태로 나타내었으며, 실험결과는 SPSS (SPSS Inc., version 12.0, Chocago, IL, USA)를 이용하여 다중검정은 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

체중증가량, 음수섭취량 및 식이섭취량

5주령 SD rat에 8주간 실험 식이를 급여한 후의 체중 변화량은 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 것처럼 8주 후 모든 군에서 체중이 증가하였다. 고콜레스테롤군이 정상대조군과 비교 시 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 황국곡자 섭취군은 고콜레스테롤군과 비교 시 통계적으로 유의적인 차이가 없었다. 홍국쌀 분말을 8주간 투여한 실험에서 실험군간 식이섭취량과 체중이 있어 유의적인 차이가 없었다고 보고된 바 있으며(21) 홍국쌀을 14주간 실험동물에 투여한 결과에서도 대조군과 차이가 없는 것으로 보고된 연구결과가 있다(22).

음수섭취량과 식이섭취량을 확인해 본 결과(Table 2), 일반적으로 고콜레스테롤군은 정상대조군에 비해 식이와 음수 섭취량이 감소되는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서 식이섭취량은 유의적 차이를 보이지 않았으나 음수섭취량에서는 정상대조군에 비해 양성대조군과 홍국 2g에서 낮은 경향을 나타내었다. 본 실험과 같은 연구 결과로 *Aspergillus*로 발효한 비지를 섭취한 마우스가 정상식이군에 비해 발효비지를 섭취한 군에서 음수섭취량이 낮은 경향을 나타내었다고 보고하였다(20).

혈장 지질 농도 변화

Fig. 1에 혈청내의 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤의 함량을 나타내었다. 먼저 총 콜레스테롤 함량은 정상대조군에 비해 고콜레스테롤군에서 유의적으로 증가하였고, 양성대조군과 황국 0.5g 및 황국 2g은 고콜레스테롤군에 비해 각각 30, 10, 5% 감소하였다. 혈 중의 중성지방은 콜레스테롤 합성을 촉진시켜 혈중 콜레스테롤을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 혈중 중성지방의 농도 역시 정상대조군에 비해 고콜레스테롤군이 35% 증가하였으며 양성대조군과 황국곡자에서 고콜레스테롤군보다 각각 34, 21, 11% 감소하였다. *Aspergillus*로 발효한 감귤박 추출물의 경우 혈중 총콜레스테롤과 중성지방의 함량을 감소시켜 지질개선 효과를 증가시킨다고 보고하였으며(23) *Aspergillus*로 발효된 비지메주도 혈중 내 총 콜레스테롤과 중성

Table 1. Sequence of primers for real-time PCR

Gene		Nucleotide sequences	Length of PCR products
LDL receptor	S	GAGTACACCAGCCTCATCC	188 bp
	AS	GCTGATGACGGTGTCATAG	
SREBP2	S	AGACTTGGTCATGGGGACAG	239 bp
	AS	GGGGAGACATCAGAAGGACA	
HMG-CoA reductase	S	TACCATGTCAGGGGTACGTC	195 bp
	AS	GAAGCCTAGAGACATAATCATC	
β -actin	S	GGAAATCGTGCCTGACATTA	152 bp
	AS	ATCGGAACCGCTCATTG	

Table 2. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on body weight gain, water intake and food intake in SD rat fed a HCD for 8 weeks

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/56 days)	Water intake (g)	Food intake (g)
Normal	229.87±9.56	422.90±38.82	193.03±32.72	21.33±0.31 ^a	39.15±1.45 ^{ab}
CTL	230.89±7.20	434.48±26.64	203.59±28.73	20.98±0.35 ^{ab}	40.58±0.92 ^b
POSI	225.48±10.16	432.12±22.73	206.64±21.60	20.62±0.36 ^b	39.58±0.91 ^b
HK0.5 g	222.01±12.87	453.19±36.07	220.22±20.75	21.23±0.46 ^a	39.18±1.93 ^{ab}
HK2 g	217.61±7.20	434.82±28.25	217.21±27.13	20.61±0.46 ^b	37.91±1.36 ^b

Values are expressed as mean±SD (n=6). Different superscripts in the same column indicate significant differences among groups at p<0.05 by Duncan's multiple comparison test. Normal: normal group, CTL: high cholesterol diet, HK 0.5 g: high cholesterol diet+rice with *Asp. terreus* 0.5 g/kg, HK 2 g: high cholesterol diet+rice with *Asp. terreus* 2 g/kg, POSI: high cholesterol diet+positive control (lovastatin 10 mg/kg).

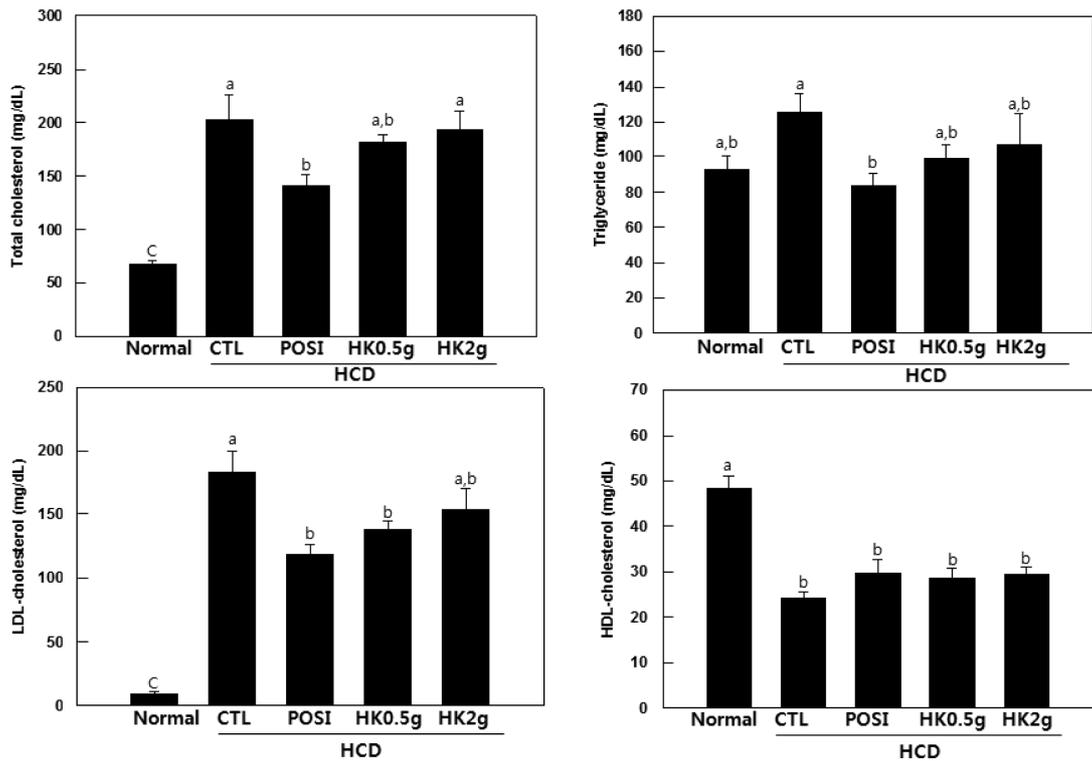


Fig. 1. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on plasma lipid profiles in SD rat fed a HCD for 8 weeks (n=6). Values are expressed as mean±SD. Different superscripts in the same column indicate significant differences among groups at p<0.05 by Duncan's multiple comparison test.

지방의 함량을 낮춰 항비만 및 지질개선이 된다는 연구가 보고된 바 있다(20). 또한 *Asp. terreus* 균주를 함유한 누룩 섭취 시 혈청 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과도 보고되었다(24). 고콜레스테롤군과 비교하였을 때, 황국곡자 투여군의 혈액 내 총 콜레스테롤, 중성지방이 감소하였고 저밀도 콜레스테롤은 고콜레스테롤군에 비해 양성대조군과 황국 0.5 g은 각각 35, 25% 유의적으로 감소하였다. 고밀도 콜레스테롤은 항동맥경화의 지표로 동맥경화를 진행시키지 않는 방향으로 콜레스테롤을 운반하여 관상성 심장질환에 대한 방어 작용을 지니고 있다. 고밀도 콜레스테롤은 정상대조군과 고콜레스테롤군을 비교하였을 때 51% 감소하였고 양성대조군과 황국곡자 0.5와 2.0 g은 고콜레스테롤군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 없었다. 황국을 첨가한 김치의 경우 고밀도 콜레스테롤이 김치를 투여한 군에서 유의적인 차이가 없었다는 연구가 보고된 바 있다.(25) 황국쌀 0.03, 0.1, 0.3% 첨가 식이를 공급한 실험동물에서 혈중 총 콜레스테롤, LDL 콜

레스테롤, HDL 콜레스테롤 모두 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였으며(21), 일반 식이에 황국쌀 2, 4%를 각각 첨가하여 한 달 동안 투여한 동물에서 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL, HDL 콜레스테롤이 황국쌀 섭취로 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다(26). 본 실험에서는 황국 2 g에서 감소하는 경향을 보였으나 오히려 낮은 황국 0.5 g 군에서 혈중 지질 농도가 개선되는 결과를 보여 농도의 존적이 많은 결과를 나타내었다. 이는 황국쌀을 0.2, 1, 5% 첨가한 고콜레스테롤 식이를 흰쥐에 투여하였을 때 1%와 5% 첨가군에서 감소하였으나 오히려 농도가 낮은 0.2% 군에서 유의성 있게 혈액 지질 농도가 개선되는 결과(27)를 나타낸 것으로 보아 낮은 농도에서도 지질 개선 효과가 있는지에 대해서는 여러 범위의 농도에서 확인해 볼 필요성이 있는 것으로 사료된다.

Apolipoprotein A1 (ApoA1)은 HDL의 주요 입자로 ApoA1의 농도는 혈장 HDL-콜레스테롤 수준에 따라 늘어나게 된다. ApoB

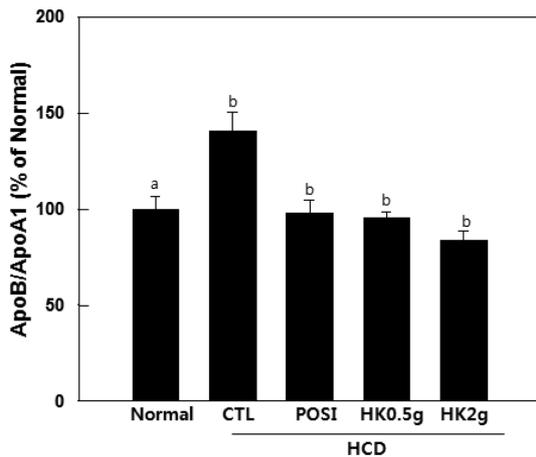


Fig. 2. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on ApoB/ApoA1 ratio in SD rats fed a HCD for 8 weeks ($n=6$).

는 키로미크론과 LDL의 주요 아폴리포 단백질로서 지질 대사에 중요한 역할을 하며 중성지방이 풍부한 초저밀도지질단백과 저밀도지질단백의 체내 양을 반영한다. ApoB와 ApoA1의 비율 (ApoB/ApoA1 ratio)이 인슐린저항성과 지방대사이상을 평가하는 지표일 수 있으며 심혈관계 질환의 발생을 예측하는데 있어 콜레스테롤보다도 유용하다는 연구결과가 있다(28). 심혈관질환의 위험도를 예측하는데 중요한 인자인 ApoB/ApoA1 ratio를 Fig. 2에 나타내었다. 고콜레스테롤군은 정상대조군에 비해 40% 증가하였으며 고콜레스테롤군과 비교하여 양성대조군은 30% 유의적으로 감소하였고 황국 0.5와 2g은 각각 32, 40% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 황국곡자가 ApoB/ApoA1 ratio를 현저히 감소시키는 것으로 보아 체내의 지질대사에 영향을 주는 것으로 판단된다.

CETP activity assay

CETP에 의해 LDL의 cholesteryl ester가 중성지방과 교환되면, 지방분해 효소에 의한 중성지방의 분해가 일어나고, LDL 입자의 크기가 감소된다. 이러한 변형된 LDL은 쉽게 산화되고 염증반응과 심혈관 질환의 위험요소로 작용하게 된다(29). CETP의 작용에 의해 초저밀도 지단백질(very low density lipoprotein, VLDL) 내 중성지방과 HDL cholesteryl ester사이에도 교환이 일어나고, 이러한 중성지방은 지방분해효소에 의해 빠르게 분화되며 그 결과 작은 크기의 HDL은 쉽게 제거되어, HDL 콜레스테롤의 감소

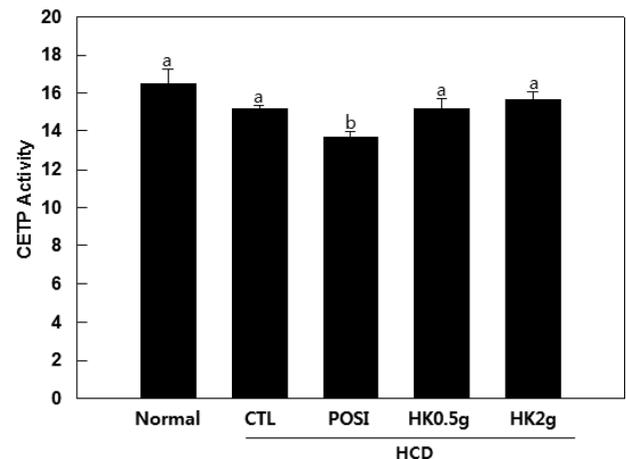


Fig. 3. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on CETP levels in SD rats fed a HCD for 8 weeks ($n=6$).

를 가져온다. 따라서, CETP 활성이 증가하게 되면 HDL이 감소한다(30). 혈중 CETP 활성을 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 정상대조군과 고콜레스테롤군 간의 차이가 나타나지 않았으며 고콜레스테롤군에 비교하여 양성대조군은 유의적으로 감소하였으나 황국 0.5와 2g 투여군에서도 차이를 보이지 않았다. Chadli 등은 정상대조군과 고콜레스테롤군간의 CETP의 활성이 크게 차이가 나지 않았다는 연구 결과를 보고하였다(31). 따라서 황국곡자는 CETP 활성에 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.

간조직 내 지질 함량 확인

각 실험군들의 간조직 내 총지질, 총콜레스테롤 함량은 Fig. 4와 같다. 간조직 중 총지질의 함량은 고콜레스테롤군에서 정상대조군에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 그러나 고콜레스테롤식을 먹인 그룹들 중에서 양성대조군은 유의적인 차이를 나타내지 않았고 황국곡자를 0.5와 2g 농도로 투여한 그룹은 각각, 33, 30% 유의적인 감소를 보였다. 또한, 간조직 내 총콜레스테롤 함량은 정상대조군에 비해 고콜레스테롤군에서 유의적으로 크게 증가하는 것을 확인하였고 고콜레스테롤군과 비교하였을 때, 양성대조군과 황국곡자 2g 투여군에서 각각 22, 17% 감소하는 것을 확인하였다. 일반 식이에 홍국쌀 분말을 2, 4, 8, 12% 첨가하여 동물에 투여한 경우 12% 첨가군에서 대조군에 비해 총콜레스테롤과 중성지방이 간에서 각각 38%와 25% 감소하였다고 보고하였다(22). 콜레스테롤의 섭취는 간조직에서 지질대사의 이

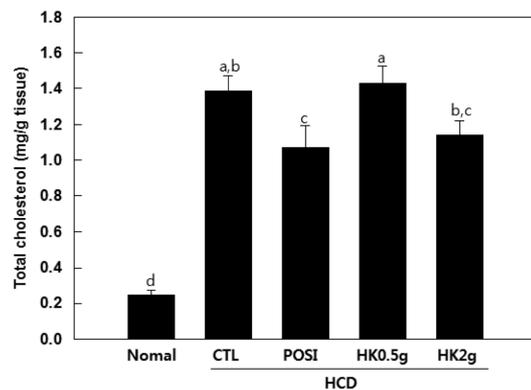
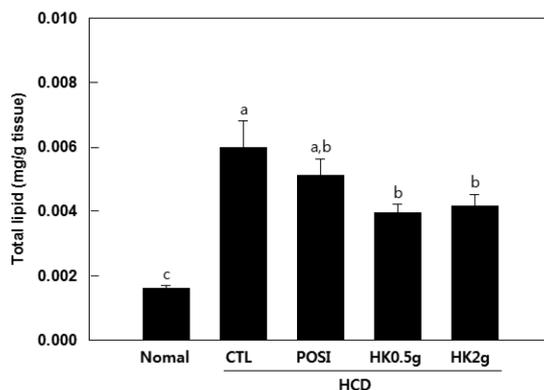


Fig. 4. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on hepatic total lipid and total cholesterol in SD rats fed a HCD for 8 weeks ($n=6$).

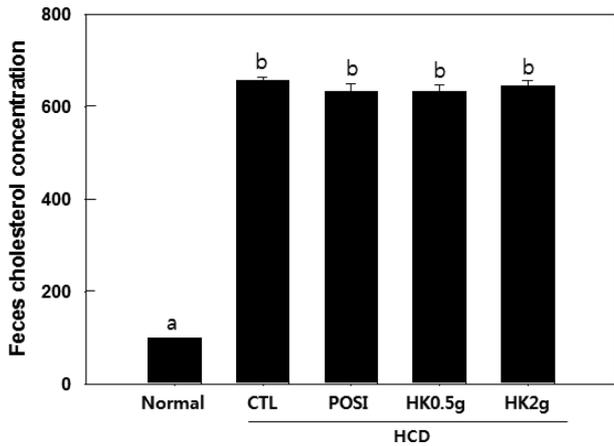


Fig. 5. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on cholesterol excretion in SD rats fed a HCD for 8 weeks (n=6).

상이 초래되어 지질이 침착되고 그로 인해 무게가 증가하여 간의 콜레스테롤 함량이 증가한다는(32) 보고가 있으며 *Asp. terreus*에 의해 발효된 황곡곡자의 섭취는 간조직에서 지질의 흡수를 억제하거나 지연시켜 지질대사 개선에 작용했을 것으로 판단된다.

대변에서 콜레스테롤 배출 효과 확인

대변에서 분변으로 배출되는 콜레스테롤 함량을 확인하였다(Fig. 5). 고콜레스테롤혈증을 억제하기 위해 생체 내에서는 두 가지 대사가 이루어지는데(33) 체내 콜레스테롤 합성이 감소되고 간에서는 콜레스테롤이 담즙산으로 바뀌어 변으로 배설되어 혈중 콜레스테롤의 함량을 감소시킨다. 정상대조군에 비해 고콜레스테롤군이 콜레스테롤 배출이 6배 이상 많았지만, 고콜레스테롤

군과 황곡곡자 투여군 간의 차이는 보이지 않았다. 이는 황곡곡자가 콜레스테롤 배출에는 관여하지 않는 것으로 판단된다.

간조직 내 LDL 및 HDL 관련 유전자 확인

5주령 SD rat에 황곡곡자와 양성대조군인 lovastatin을 8주간 경구 투여한 후에 간조직 내에서 콜레스테롤 관련 유전자 발현을 조사하였다.

간에서는 혈중 콜레스테롤 합성을 조절하며 지질과 콜레스테롤 대사에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다. 콜레스테롤 합성은 많은 연구들에 의하면 최종산물에 의한 피드백으로 조절되며 이 조절에 가장 중요한 인자로 HMG-CoA 환원효소와 LDL receptor가 있다. HMG-CoA 환원효소는 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 조절효소이며(34) HMG-CoA 환원효소 억제제인 스타틴(statin) 계열의 약물들은 HMG-CoA 환원효소의 활성은 감소시키지만, 감소된 콜레스테롤에 대한 항상성 유지를 위해 HMG-CoA 환원효소 유전자의 발현은 증가하게 된다(35). 일반적으로 세포내 콜레스테롤 농도가 높아지면 HMG-CoA 환원효소 활성이 감소되어 간에서 콜레스테롤 생성을 낮추고 콜레스테롤 대사에 관여하는 sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2)를 활성화하여 LDL receptor가 증가되어 세포내로 LDL 콜레스테롤 흡수를 촉진하여 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는 역할을 한다. 또한, SREBP2는 HMG-CoA 환원효소 활성 감소에 의해 줄어든 콜레스테롤의 항상성을 유지하기 위하여 HMG-CoA 환원효소 mRNA의 양을 증가시킨다고 알려져 있다(36). 간조직에서 HMG-CoA 환원효소 발현을 확인해 본 결과 고콜레스테롤군에 비해 황곡곡자 2g 투여군에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 6). LDL 관련 유전자인 LDL receptor와 SREBP2를 확인해본 결과, 고콜레스테롤군에 비해 황곡곡자 투여군에서 유의적 증가를 보였으며, 이는 양성대조군보다 높은 발현능을 보였다. 황곡쌀에는

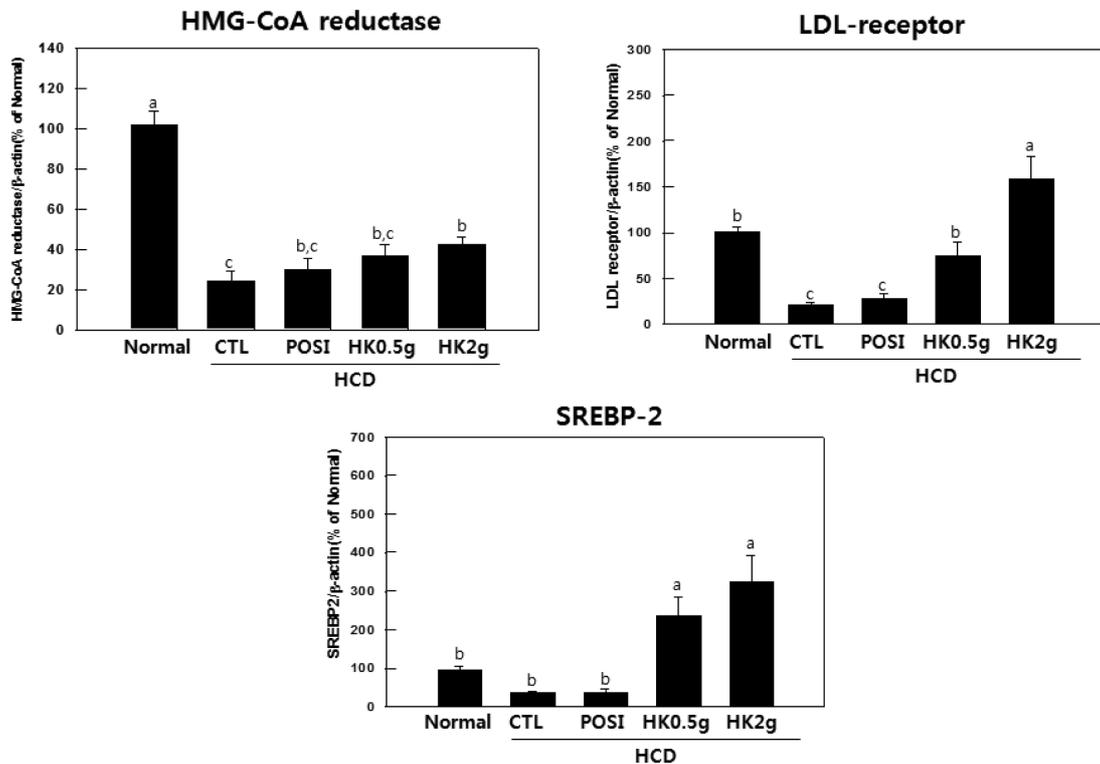


Fig. 6. Effects of rice with *Asp. terreus* supplementation on hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase, LDL receptor and SREBP2 genes in HCD-fed rats for 8 weeks (n=6).

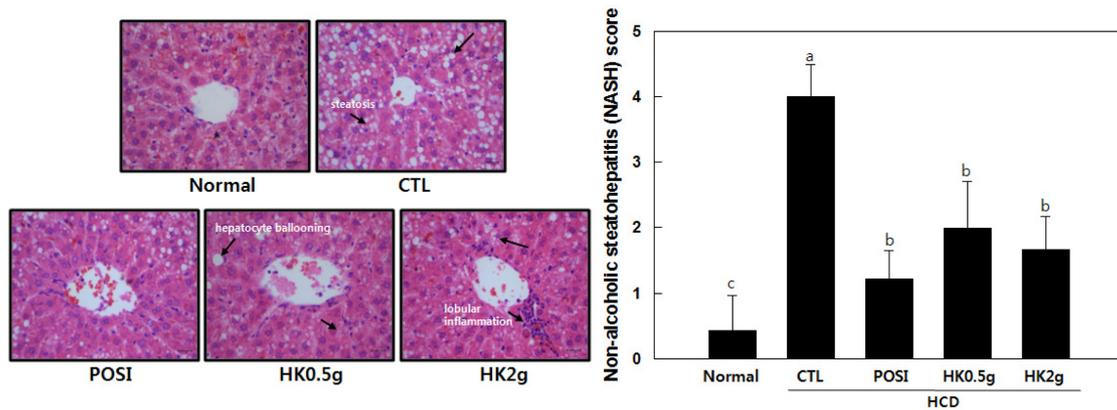


Fig. 7. NASH score and histopathological findings of liver tissue by extracts of *Asp. terreus* treatment in hyperlipidemic SD rat fed the HCD for 8 weeks. NASH, non-alcoholic steatohepatitis. Values are expressed as mean±SD (random field, $n=5$). H&E stain, $\times 400$. Scale bar=20 mm.

모나콜린(monacolin K (lovastatin))인 콜레스테롤 합성 억제 물질이 함유되어 있어 고지혈증 유발 동물에서 콜레스테롤 농도를 감소시키는 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다(37-39). Monacolin K는 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 뿐 아니라 LDL-콜레스테롤을 우선적으로 낮추고 혈중 콜레스테롤 농도가 정상인 경우에도 VLDL과 LDL의 생성을 함께 저하시키는 것으로 보고되고 있다(40). 또한 *Asp. terreus*를 이용하여 발효한 쌀의 경우 monacolin K의 생산능이 더 우수하다는 보고가 있다(41). 따라서 황국곡자는 *Asp. terreus*의 이차대사산물인 monacolin K의 생성에 의해 HMG-CoA 환원효소를 저해함으로써 활성을 감소시키고 결과적으로 간에 공급되는 콜레스테롤의 양이 감소하는 현상을 보상하기 위해 HMG-CoA 환원효소 발현이 증가되는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 콜레스테롤 및 중성지방 합성에 관여하는 전사인자는 SREBPs 유전자를 활성화하고 LDL receptor와 HMG-CoA 환원효소 유전자 양을 증가시켜 콜레스테롤 항상성을 유지한다고 볼 수 있다.

간조직의 형태학적 특징(H&E 염색)

병리조직학적 검사를 위하여 통상적 병리 제작 후 H&E stain 염색을 실시한 후 병리조직학 검사로 먼저 NASH score를 실시하였다. NASH score는 비알콜성 지방간염을 말하며 음주 경력이 없는 환자에서 알코올성 간질환과 유사한 간세포 내에 지방질이 축적된 상태인 지방증(steatosis), 간세포 팽창(hepatocyte ballooning), 소엽의 염증(lobular inflammation)등의 다양한 조직학적 소견을 보이는 질환이다. 백혈구가 간에 침윤하여 염증이 악화되고 간세포가 팽창하여 정상크기의 두 배가 되면 서서히 섬유화가 진행되어 간암을 초래할 수 있다(42). Fig. 7은 비알코올성 간질환에서 보이는 병리학적 특징을 채점해 그래프로 나타낸 결과이며 NASH score는 200배에서 측정하였으나 확실한 구별을 위해 400배의 사진을 제시하였다(Fig. 7). 그 결과 정상대조군에 비해 고콜레스테롤군에서 유의적인 증가를 확인하였다. 고콜레스테롤군 중 황국 0.5와 2g 및 양성대조군은 각각 50, 58, 69%로 고콜레스테롤군보다 유의성 있게 비알코올성 지방축적이 낮음을 확인하였다. 실험군들의 간조직을 조직으로 만들어 실시한 병리조직학적 검사결과는 Fig. 7에 나타내었다. 일반 식이를 먹은 정상대조군은 모든 개체에서 간에 유의한 병변과 지방축적 및 간세포 팽창이나 염증이 관찰되지 않았다. 반면 고콜레스테롤군은 간세포 내에 작은 공포모양의 지방구가 침착되어 간 손상이 관찰

되었다. 황국 0.5와 2g 투여군 및 양성대조군은 고콜레스테롤군에 비해 지방 축적 및 간세포 팽창의 정도가 현저히 감소되어 있으며 간세포 내 작은 공포 모양의 지방구가 현저히 줄어들어 있는 것을 확인할 수 있었다. 병리조직학적 검사 결과 고콜레스테롤군에서 지방간 병변이 유의하게 유발되어 있는 것을 확인하였으며, 황국곡자를 투여한 군 모두 지방축적이 감소한 것으로 판단된다. 그 중에서 황국 2g 투여군은 고콜레스테롤군보다 간세포 내 지방구가 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었고, 양성대조군보다도 지방축적이 감소한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 *Asp. terreus*를 접종하여 제조한 황국곡자를 이용하여 지질대사와 관련 조절유전자 및 심혈관질환에 미치는 효능을 확인하고, 고지혈증 개선에 미치는 황국곡자의 효능을 검증하고자 하였다. SD rat을 사용하여 8주 동안 고콜레스테롤 식이와 황국곡자 0.5, 2g을 경구투여 하였다. 그 결과 간조직에서 황국곡자 투여군은 총 지질의 함량이 감소하였으나 황국곡자가 콜레스테롤 배출에는 크게 영향을 주지 않음을 확인하였다. 간조직 내 LDL 및 HDL 관련 유전자 발현 확인 결과, 콜레스테롤 합성의 가장 중요한 기작인 HMG-CoA reductase, LDL receptor와 SREBP2 발현에서는 고콜레스테롤군보다 유의적으로 모두 증가하여 체내의 콜레스테롤을 낮추는 것으로 판단된다. 또한 간조직의 형태학적 특징을 관찰해본 결과 황국곡자 투여군이 고콜레스테롤군에 비해 간 손상의 정도가 현저히 감소되어 있으며 간세포 내 작은 공포 모양의 지방구가 현저히 줄어들어 있는 것을 확인하였으며 황국곡자를 투여한 군 모두 지방세포 침윤과 같은 지방간 병변의 치료효과를 확인하였다. 결과적으로 황국곡자는 체내의 지질대사에 영향을 끼침에 따라 고지혈증의 개선을 위한 소재로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2012년 호남광역경제권 선도산업 R&D 사업(과제번호 R0001455)의 일환으로 진행된 과제 중 동물 기능성 용역과제로 수행되었습니다. 이 연구에 사용된 황국곡자를 공급해 준 대상(주)에 감사드립니다.

References

- Lee JJ, Park MR, Kim AR, Lee MY. Effects of ramie leaves on improvement of lipid metabolism and anti-obesity effect in rats fed high fat/high cholesterol diet. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 43: 83-90 (2011)
- Kim MS, Chun SS, Kim SH, Choi JH. Effect of Tumeric (*Curcuma longa*) on bile acid and UDP-glucuronyl transferase activity in rats fed a high-fat and -cholesterol diet. *J. Life Sci.* 22: 1064-1070 (2012)
- Manninen V, Tenkanen L, Kostinen P, Huttunen JK, Manttari M, Heinonen OP, Frick MH. Joint effects of serum triglyceride LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki heart study. *Circulation* 85: 37-45 (1992)
- Al-Muhtaseb N, Hayat N, Al-Khafaji M. Lipoproteins and apolipoproteins in young male survivors of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 77: 131-138 (1989)
- Rifkind BM. Diet, plasma cholesterol and coronary heart disease. *J. Nutr.* 116: 1578-1580 (1986)
- Kim YH, Han KI, Jeon MA, Hwang SG, Jung EG, Kwon HJ, Han MD. Antihyperlipidemic activities of a chemically engineered sulfated mushroom β -glucan on high fat dietary-induced hyperlipidemia in sprague-dawley rats. *J. Life Sci.* 24: 1209-1216 (2014)
- Kullo IJ, Gau GT, Tajik AJ. Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin. Proc.* 75: 369-380 (2000)
- Tobert JA. New developments in lipid-lowering therapy: The role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation* 76: 534-538 (1987)
- Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am. J. Cardiol.* 62: J10-J15 (1988)
- Finkelstein D, Ball C. In *Biotechnology of filamentous fungi*. Butterworth-Heinemann London, UK. pp. 194-202 (1992)
- Huichinson CR, Fujii I. Polyketide synthase gene manipulation: A structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 201-238 (1995)
- Cho JJ, Lee SH. A comparison of lovastatin and simvastatin in treatment of hyperlipidemia. *Korean J. Clin. Pharm.* 12: 39-50 (2002)
- Xia X, Ma Y, Xing X, Huang C, Li L, Gui G, Liu Q, Xue S. Antioxidant and hepatoprotective effect of different extracts of Guizhencao (*Herba bidentis Bipinnatae*) against liver injury in hyperlipidemia rats. *J. Tradit. Chin. Med.* 33: 518-523 (2013)
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirschfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. Mevinolin; A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *P Natl. A. Sci. Usa.* 77: 3957-3961 (1980)
- Bizukojc M, Pawlak M, Boruta T, Gonciarz J. Effect of pH on biosynthesis of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.* 162: 253-261 (2012)
- Willke T, Vorlop KD. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl. Microbiol. Biot.* 56: 289-295 (2001)
- Lin YH, Li YF, Huang MC, Tsai YC. Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin in *Aspergillus terreus* alleviate the effect of a short break in aeration during culture. *Biotechnol. Lett.* 26: 1067-1072 (2004)
- Albers-Schönberg G, Joshua H, Lopez MB, Hensens OD, Springer JP, Chen J, Ostrove S, Hoffman CH, Alberts AW, Patchett AA. Dihydromevinolin, a potent hypocholesterolemic metabolite produced by *Aspergillus terreus*. *J. Antibiot.* 34: 507-512 (1981)
- Lee JG. Antioxidant activities and monacolin K production on solid-state fermentation of diverse yam by *Aspergillus* species strain. *Korea J. Microbiol.* 59: 53-59 (2014)
- Lee SI, Lee YK, Kim SD, Lim JH, Suh JW, Lee IA. Anti-obesity effect of soybean curd residue fermented by genus *Aspergillus*. *J. Korea Acad. Industrial Coop. Soc.* 14: 5800-5808 (2013)
- Rhyu MR, Kim EY, Han JS. Effect of *Monascus koji* on blood pressure and serum cholesterol composition of SHR by chronic dietary administration. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 464-468 (2003)
- Mohan Kumari HP, Akhilender Naidu K, Vishwanatha S, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. *Food. Chem. Toxicol.* 47: 1739-1746 (2009)
- Jeon HJ, Yu SN, Kim SH, Park SK, Choi HD, Kim KY, Lee SY, Chun SS, Ahn SC. Antiobesity Effect of citrus peel extract fermented with *Aspergillus oryzae*. *J. Life Sci.* 24: 827-836 (2014)
- Yoon CG, Chae SN, Huh NE, Kim HS, Yu TS. Effects of *muruk* or wheat bran supplemented diet on the serum levels of cholesterol and activities of hepatic oxygen free radical metabolizing enzymes in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 212-217 (1999)
- Yu MH, Lee HJ, Im HG, Hwang BMH, Kim HJ, Lee IS. The effects of kimch with *Monascus purpureus* on the body weight gain and lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Life Sci.* 15: 536-541 (2005)
- Yu TS, Kim HH, Yoon CG. Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 244-249 (2003)
- Kwon CS. Effect of red yeast (*Monascus purpureus*) rice supplemented on lipid profiles and antioxidant activity in hypercholesterolemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 16-23 (2014)
- Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: A strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *J. Intern. Med.* 259: 493-519 (2006)
- Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 12: 287-293 (2002)
- Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Engl. J. Med.* 323: 1234-1238 (1990)
- Kasbi Chadli F, Nazih H, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. Omega 3 fatty acids promote macrophage reverse cholesterol transport in hamster fed high fat diet. *Plos One.* 8: e61109 (2013)
- Kim MS, Chun SS, Kim SH, Choi JH. Effect of tumeric (*Curcuma longa*) on bile acid and UDP-glucuronyl transferase activity in rats fed a high-fat and cholesterol diet. *J. Life Sci.* 22: 1064-1070 (2012)
- McNamara DJ. The impact of egg limitations on coronary heart disease risk: Do the numbers add up? *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 540S-548S (2000)
- 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)
- Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.* 133: 700-706 (2003)
- Choi HR, Lee SJ, Lee JH, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. Cholesterol-lowering effects of unripe black raspberry water extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1899-1907 (2013)
- Li C, Zhu Y, Wang Y, Zhu JS, Chang J, Kritchevsky D. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18: 71-81 (1998)
- Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VLW. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 231-236 (1999)
- Journoud M, Jones PJH. Red yeast rice: A new hypolipidemic drug. *Life Sci.* 74: 2675-2683 (2004)
- Arad Y, Ramakrishnan R, Gingsberg HN. Lovastatin therapy reduces low density lipoprotein apoB levels in subjects with combined hyperlipidemia by reducing the production of apoB-containing lipoproteins: Implications for the pathophysiology of apoB

- production. J. Lipid Res. 31: 567-582 (1990)
41. Park JY, Han SI, Seo WD, Ra JE, Sim EY, Nam MH. Study on *Monascus* Strains and characteristic for manufacturing red yeast rice with high production of monacolin K. Korean J. Crop Sci. 59: 167-173 (2014)
42. Lee HS, Lim WC, Choi JH, Yu HJ, Kim KH, Lee SH, Cho HY. Ameliorating effects of lactic acid-fermented garlic extracts on oleic acid-induced hepatic steatosis. Korean J. Food. Sci. Technol. 46: 762-768 (2014)