

발효콩 유지의 3T3-L1 지방전구세포와 고지방식이를 급여한 C57BL/6J 생쥐에 대한 항비만 효과

김선웅¹ · 김남석¹ · 오미진² · 김하림¹ · 김민선¹ · 이다영¹ · 윤석후¹
정문웅³ · 김훈중⁴ · 이창현⁵ · 오찬호¹

¹우석대학교 식품생명공학과, ²한국식품연구원
³우석대학교 외식산업조리학과, ⁴(주)농심, ⁵우석대학교 한의예과

Anti-Obesity Effects of Fermented Soybean Oils in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and High Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice

Seon-Woong Kim¹, Nam-Seok Kim¹, Mi-Jin Oh², Ha-Rim Kim¹, Min-Sun Kim¹, Da-Young Lee¹,
Suk-Hoo Yoon¹, Mun-Yhung Jung³, Hun-Jung Kim⁴, Chang-Hyun Lee⁵, and Chan-Ho Oh¹

¹Department of Food & Biotechnology, ³Department of Food Science and Culinary Arts,
and ⁵Department of Korean Medicine, Woosuk University
²Korea Food Research Institute, ⁴Nongshim Co., Ltd.

ABSTRACT This study investigated the manufacturing of fermented soybean oil using a fermenting strain commonly processed for soybeans [*Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus subtilis* (BS), *Lactobacillus acidophilus* (LBA), and *B. subtilis*+*L. acidophilus* (BLO)] and evaluated its anti-obesity activities. Cytotoxicity of four kinds of fermented soybean oils was not observed in 3T3-L1 preadipocytes at 10 and 50 µg/mL. Triglyceride content was reduced by 20.6% in the BLO group at a treatment concentration of 50 µg/mL. The simultaneous treatment of fermented soybean oil and differentiation induction medium decreased PPAR γ and C/EBP α gene expression at a concentration of 50 µg/mL and blocked adipocyte differentiation by increasing adiponectin gene expression. The inhibitory effect of adipocyte differentiation was greatest in the BLO group. C57BL/6J mice were examined for 4 weeks after being separated into seven groups [normal diet group (N), high fat diet group (C), group fed high fat diet combined with regular soybean oil (SO), group fed non-fermented soybean oil (NF), and groups fed high fat diet combined with 5% fermented soybean oil (BA, BS, LBA, and BLO)] to identify the effects of soybean oil on body weight, serum lipid, adiponectin, insulin, and leptin levels in mice with high fat diet-induced obesity. The body weight and serum lipid level of the C group increased drastically compared to those of the N group. In contrast, the group fed a diet combined with fermented soybean oil showed decreases in weight, serum total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglyceride levels compared to those of the C group. Moreover, soybean oil was found to be effective in the BLO group. In conclusion, fermented soybean oil has positive effects in prohibiting adipocyte differentiation increased by high fat diet and improving serum lipid composition. Therefore, fermented soybean oil can be used as a functional food material with anti-obesity activity.

Key words: 3T3-L1, anti-obesity activity, fermented soybean oil, differentiation

서 론

오늘날 현대사회는 식생활의 서구화, 생활환경의 변화 및 가공식품 증가에 따른 과다 영양 섭취와 신체활동량의 감소로 인해 비만 인구가 급증하고 있다. 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 체내에 지방이 과도하게 축적되는 상태를 의미하며 당뇨, 고지혈증, 심혈관계 질환 및 동맥경화증

등 각종 질환의 원인으로 알려지면서 전 세계적으로 심각한 질환으로 부각되고 있다(1). 일반적으로 비만은 전구지방세포의 분화과정에 의하여 새롭게 생성되는 지방세포의 수와 크기가 과도하게 증가함에 따른 지방조직의 축적에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다(2,3). 지방전구세포는 분화를 거쳐 지방세포로 되는 과정에서 세포의 형태적 변화와 유전자 발현 등의 생화학적 변화를 통해 체내에 지방을 축적하게 된다(4). 지방세포의 크기 증가는 열량 섭취로 인한 triglyceride의 축적에 의하여 유발되며, 지방세포 수의 증가는 세포증식 및 분화에 의해서 유발되는 것으로 알려져 있다(5). 최근에는 다양한 대사질환을 야기하는 비만을 예방하는

차원으로 천연물에서 지방전구세포 분화과정을 조절하는 연구가 활발히 진행되고 있다(6). 지방전구세포는 insulin, dexamethasone(DEX) 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 등의 분화유도인자를 첨가하였을 때 지방세포로 분화하게 되는데(7), 이러한 분화과정은 분화유도인자에 의해 분화초기 전사인자인 C/EBP β , C/EBP δ 의 발현이 활성화되어 분화 후기과정의 핵심 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 유도하게 되고 지방세포로의 지방세포형성 분화조절이 이루어지게 된다(8,9). 분화 후기과정에서 발현되는 PPAR γ 는 분화조절 최종 전사인자로서 PPAR γ 발현의 증가에 따라 adiponectin(ADIPOQ), APOE, resistin, Scd1과 같은 유전자의 발현을 유도하며(10), 특히 APOE, Scd1 등은 지방조직에 저장되는 지질 생성에 중요한 기능을 하며 지방세포로의 분화가 시작되면 지방세포 내에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(11).

대두(*Glycine max* L.)는 대표적인 식물성 단백질원으로 단백질과 지방질을 보충하는 데 좋은 공급원 역할을 해왔다. 장류의 주재료로서 한국, 일본, 중국 등에서는 대두 자체로 이용한 식품인 두부, 된장, 청국장, 고추장, 간장 및 기타 대두가공식품 등으로 대량 소비되고 있다. 대두는 동남아시아에서 재배되는 아열대 식물이지만 현재 아시아뿐만 아니라 미국, 브라질, 아르헨티나 등지에서도 많이 재배되고 있고, 전 세계의 대두 생산 중 50% 이상이 미국에서 생산되고 있으며(12,13), 영양적 우수성 이외에도 isoflavones, saponins, lecithin, oligosaccharides 등 여러 기능성 성분이 밝혀지면서 기능성 소재로서 연구가 활발히 진행되고 있다. 대두는 phytic acid, triterpene, flavonoid, lignan 등 14종류 이상의 phytochemical이 항암효능이 있는 것으로 밝혀졌으며(14), 구성성분 중 protease inhibitors, oligosaccharide 및 식이섬유 등 생리활성 효과와 연관 지어 성인병 예방과의 밀접한 관련성이 알려져 있다. 최근에는 대두의 섭취가 비만, 당뇨, 골다공증, 난소 및 전립선 암 등과 심혈관계 질환 등과 같은 만성 퇴행성 질환을 예방하여 체내에서의 생물학적 효능 및 그 작용 기전과 관련된 많은 관심이 집중되고 있음을 알 수 있다(15,16). 또한, 대두가 발효되면서 생성되는 성분들은 사용하는 균주에 따라 성분의 함량이나 생리활성에 차이가 난다고 보고되어 있다(17). 이처럼 대두에는 다양한 활성물질들이 함유되어 있으나, 발효콩 유지에 대한 연구는 미약한 편이고 균주를 접종하여 발효시킨 콩 유지에 대한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 발효콩을 이용한 발효식품 개발의 일환으로 다양한 균주(*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*)를 이용한 발효콩 유지 및 *B. subtilis*와 *L. acidophilus* 균주를 혼합하여 만든 유지의 항비만 효과에 미치는 영향을 살펴보기 위해 3T3-L1 지방전구 세포에서 triglyceride 함량 측정 및 분화 관련 전사인자 및 각종 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고 고지방식을 유도한 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 체중, 식이효율,

혈중 콜레스테롤 및 지질 농도 등에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

본 연구에 사용된 시료는 시판되는 콩기름 1종(soybean oil; SO), (주)농심(Seoul, Korea)에서 공급받은 비발효 콩기름 1종(non-fermented soybean oil; NF), 그리고 발효 조건을 달리하여 자체 개발한 4종의 유지 [*B. amyloliquefaciens*(BA), *B. subtilis*(BS), *L. acidophilus*(LBA), *B. subtilis*+*L. acidophilus*(BLO)]를 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 포함한 PBS에 녹여 사용하였다. 동물실험에서는 고지방사료(high fat diet)에 5%씩 첨가한 사료를 (주)피드랩(Gyeonggi, Korea)에서 제조하여 급여하였다. 실험에 사용한 DMEM 배지, fetal bovine serum(FBS), bovine calf serum(BCS)은 Gibco(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, insulin, IBMX, DEX, DMSO 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 중성지방 측정시액, HDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤 측정시액은 아산제약(Gyeonggi, Korea)에서 구입하였고, RNA to cDNA Ecodry™ premix는 Clontech(Mountain View, CA, USA), Emerald Amp GT PCR Master Mix는 Takara(Shiga, Japan)에서 구입하였다. 사용기기는 도립 현미경(Axiovert-25C, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), UV-분광광도계(OPTIZEN, Mecasys, Daejeon, Korea), microplate reader(VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), PCR 기기(TP-600, Takara)를 사용하였다.

세포주 및 실험동물

실험에 사용한 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 배양하였으며, 70~80% confluent 상태에서 계대배양 하여 실험에 사용하였다. C57BL/6J 생쥐(18±2 g, ♂)는 (주)샘타코(Gyeonggi, Korea)에서 분양받아 항온항습(22±2°C, 55±5% RH, 12 h/12 h light/dark cycles) 조건에서 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험은 우석대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다(동물실험 승인번호: WS 2013-010).

시료

본 실험에 사용한 콩은 2013년에 재배한 국내산 콩을 구입하였으며, 실험 기간 중 부패 및 산패를 방지하기 위하여 저온 냉장고에 보관하였다.

균주의 분리 및 확보

시중에 판매되는 평창 낫또(부일 F&B, 강원도 평창군) 제품으로부터 *B. subtilis* 균주를 분리하였다. 평창 낫또 제품 2 g을 멸균수 10 mL에 현탁시킨 후, 30°C, 200 rpm 조건에서 1시간 배양(Shaking incubator SI-600R, JEIO TECH, Daejeon, Korea)한 후 배양된 균주 중 50 µL를 제조된 고체 영양 배지(Nutrient broth, REF234000, Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37°C에서 18~24시간, 200 rpm 조건에서 배양하였다. 분리된 균주는 균주 동정 의뢰를 하여 균주 여부를 확인하였으며, 그 외의 isoflavone glycoside를 isoflavone aglycon으로 전환하는 효소를 생산할 수 있는 능력이 있는 균주의 확보를 위해 *B. amyloliquefaciens*(KCCM 40764), *L. acidophilus*(KCCM 32820)는 한국미생물보존센터(Seoul, Korea)에 분양받아 사용하였다.

균주의 배양

평창 낫또에서 분리된 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*는 Luria Bertani media broth 2 mL에 접종하여 각 37°C와 28°C, 200 rpm 조건에서 전 배양한 균주는 Luria Bertani media broth 200 mL에 모두 접종 후 동일한 조건에서 본 배양하였다. *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*는 콩에 2.5×10^6 CFU/g으로 생균수를 맞추어 접종하였다. *Lactobacillus plantarum*은 MRS broth 2 mL에 접종하여 28°C, 200 rpm 조건에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양한 균주는 MRS broth 200 mL에 모두 접종 후 동일한 조건에서 본 배양하였다. *L. acidophilus*는 MRS broth 2 mL에 접종하여 37°C, 200 rpm 조건에서 24시간 전 배양한 후, MRS broth 200 mL에 모두 접종 후 동일한 조건에서 본 배양하였다. *L. plantarum*과 *L. acidophilus*는 콩에 접종 시에 7.0×10^5 CFU/g으로 생균수를 맞추어 접종하였다.

생균수 측정

발효된 콩 10 g에 90 mL의 멸균수를 넣고 bag mixer를 사용하여 균일하게 섞은 후 *Bacillus* 속은 LB agar 배지에, *Lactobacillus* 속은 MRS agar의 평판배지에 각각 BS 균주를 활용한 발효콩은 37°C, BA 균주를 활용한 발효콩은 28°C, LBA 균주를 활용한 발효콩은 37°C, LBP를 활용한 발효콩은 28°C에 18~24시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

발효콩 분말의 전처리 방법

발효 전처리 및 발효방법: 국산 콩을 믹서(후드믹서 HMF, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 2~3 mm 크기로 분쇄한 후 체눈(testing sieve, 2.8 mm, Chung Gye Sang Gong, Seoul, Korea)으로 걸러 일정한 사이즈의 콩만을 선별하였다. 선별된 콩은 100 g씩 계량하여 멸균된 밀폐 용기(Lock & Lock, Seoul, Korea)에 담았고, 물을 2배 첨가하여 121°C에서 20분간 살균 후 그 위에 본 배양된 균주를 접종하였다. 접종한 콩은 정치 배양기 안에서 균주별 최적 조건 및

시간에 따라 배양하였다. BA+LBA 혼합발효는 동일한 조건에서 살균 후 증자된 콩에 *B. amyloliquefaciens*를 접종하여 42°C, 72시간 동안 1차 발효한 후 *L. acidophilus*를 접종하여 37°C, 72시간 동안 2차 발효하여 발효콩을 제조하였다.

발효콩의 건조방법: 발효된 콩은 건조를 위하여 freeze dryer(Ilshin, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 건조하였다. 이때 샘플 건조 plate 온도는 35°C, 콜드트랩 온도는 -70°C 이하로 설정하고 건조하였다.

발효콩의 유지 추출

발효콩 분말의 유지 추출은 각 샘플 50 g을 잘게 분쇄한 후 1차 추출용매(hexane : acetone=85:15) 150 mL와 함께 혼합하여 50°C가 유지된 이중 자켓 플라스크에 넣어 교반기(EYELA, Tokyo, Japan)를 활용하여 300 rpm으로 1시간 30분 동안 추출한 후 1차 추출용매를 제거하고, 2차 추출용매(100% acetone) 150 mL와 1차 추출용매가 제거된 발효콩 분말을 50°C가 유지된 이중 자켓 플라스크에 넣고 교반기(EYELA NZ)를 활용하여 300 rpm으로 1시간 30분 동안 추출하였다. 1차 추출용매와 2차 추출용매를 합하여 sodium sulfate를 통과하여 여분의 수분을 제거한 후 회전 진공 농축기에서 용매를 제거하여 추출 유지를 얻었다. 추출한 유지는 -18°C 냉동고에 넣어 보관하면서 분석 시료로 사용하였다.

발효 유지 및 사료 조제

실험에 사용된 시료는 일반 해바라기씨유(sunflower oil; SO), 비발효 콩유지(non-fermented oil), *B. amyloliquefaciens*를 접종하여 조제한 발효콩 유지(BA), *B. subtilis*를 접종하여 조제한 발효콩 유지(BS), *L. acidophilus*를 접종하여 조제한 발효콩 유지(LBA), 그리고 BA+LBA 혼합 발효콩 유지(BLO)를 (주)농심에서 공급받아 세포실험에 사용하였으며 조제사료는 고지방사료에 일반 식용유, 비발효 및 각 발효콩 분말을 5% 첨가하여 (주)피드랩에서 제조하여 동물실험에 사용하였다.

3T3-L1 pre-adipocyte를 이용한 항비만 효과

3T3-L1 지방전구세포는 분화를 유도하기 위해 Harmon과 Harp(18)의 방법을 변형하여 실험하였다. 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 6-well plate에 1.2×10^5 cells/well 농도로 세포수를 조정하여 48시간 동안 배양하고 배지를 교환하여 48시간을 추가로 배양하여 confluent 상태에서 분화유도배지(10% FBS, 0.5 mM IBMX, 0.5 µM DEX, 5 µg/mL insulin)로 교환한 후 48시간 동안 배양하였다. 분화유도 후에 세포배양액을 IBMX와 DEX를 제외한 5 µg/mL insulin과 10% FBS를 포함하는 분화유지 배지로 교환하여 48시간 배양한 후, 10% FBS만을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 세포분화 과정 동안 시료의

효과를 확인하기 위해서 MDI와 함께 시료를 처리하였고, 분화여부는 유도 8일 후에 확인하였다.

세포생존율을 알아보기 위해 배양 중인 3T3-L1 지방전구세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 세포수를 조정된 다음, 시료를 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 처리한 후 24시간 동안 37°C의 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. MTT(5 mg/mL in PBS) 용액을 배양종료 4시간 전에 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ 처리한 후 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μL 로 용해시켜 18시간 동안 차광하였다. 발색된 각 well의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

분화 유도시킨 3T3-L1의 세포 lysate 내 중성지방량을 알아보기 위해 중성지방 측정시액(Asan Pharm., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며, 실험방법은 제조회사의 지시에 준하였다. 세포를 분리하여 homogenizer로 분쇄하고 sonication 한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액을 분리하였다. 상층액 20 μL 와 효소시액 3 mL를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식을 이용하여 산정하였으며 표준액으로 글리세린을 사용하였다.

$$\text{중성지방(mg/dL)} = \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 100$$

전체 RNA 분리 및 RT-PCR(Reverse Transcription-PCR): 분화를 유도한 3T3-L1 세포(1.2×10^5 cells/well)에 시료를 첨가한 다음 8일 후에 RNA를 분리하였다. 전체 RNA 분리는 TRIzol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다(20). cDNA는 RNA to cDNA Ecodry™ premix를 이용하여 합성하였고, EmeraldAmp GT PCR Master Mix를 이용하여 PCR 기기(TP-600, Takara)에서 30 cycles 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 98°C에서 20초간 denaturation 시킨 후 56.3°C에서 30초간 annealing 시키고, 72°C에서 30초간 extension 시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 Loading STAR (DYNE Bio Co., Gyeonggi, Korea)로 염색하여 UV trans-illuminator(OPTIMA, Tokyo, Japan)로 관찰하였으며, 각 band별 density는 image J software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량하였다. PCR 증폭을 위해 사용된 primer는 다음과 같다; ADIPOQ sense(5'-ACCCAAGGG AACTTGTGCAG-3'), ADIPOQ anti-sense(5'-GAGTCC CGGAATGTTGCAGT-3'), C/EBP α sense(5'-CCCCAC TTGCAGTTCCAGAT-3'), C/EBP α anti-sense(5'-CACC TTCTGTTGCGTCTCCA-3'), PPAR γ sense(5'-TCAGA AGTGCCTTGCTGTGG-3'), PPAR γ anti-sense(5'-CGG CTTCTACGGATCGAAAC-3').

고지방식을 유도한 C57BL/6J mice에서의 항비만 효과

실험동물 설계 및 식이: C57BL/6J(4 wks, ♂) 생쥐를 1주 일간 기본식으로 적응시킨 후, 난괴법에 따라 각 군당 6마리

씩 7군[정상식이군(N), 고지방식이군(C), NF군, BA군, BS군, LBA군, BLO]으로 나누어 실시하였다. 정상군(N)은 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 판매하는 AIN-93G purified rodent diet를 자유 급여시켰으며, 정상군을 제외한 모든 실험군은 고지방 사료로 lard를 첨가하여 열량을 45% kcal fat 증가시킨 Modified AIN 76A purified rodent diet(45% kcal fat)를 사용하였으며, 고지방사료에 각각의 발효분말을 5% 첨가하여 (주)피드랩에서 제조하여 급여하였다(Table 1).

체중증가율 및 식이효율: 사육기간에 주 1회 간격으로 체중을 측정하여 최종 체중에서 실험 개시 체중을 감한 후 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였고 식이 섭취량도 주 1회 간격으로 측정하였으며, 체중증가량을 동일 기간의 식이 섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 구하였다.

혈청 지질 함량 측정: 실험종료 후 각 군의 생쥐에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 중성지방, HDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤을 아산키트(Asan Pharm.)로 측정하였으며 LDL-콜레스테롤 농도와 동맥경화 지수(atherogenic index, AI)는 다음과 같은 식을 이용하여 구하였다(21,22).

$$\text{LDL-cholesterol (mg/dL)} = \text{total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol} - (\text{triglyceride}/5)$$

$$\text{AI} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}}{\text{HDL-cholesterol}}$$

혈청 내 비만관련 호르몬(adiponectin, leptin, insulin)

측정: 혈청 내 adiponectin 측정은 mouse/rat HMW adiponectin ELISA kit(Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan)을 이용하여 측정하였다. Anti-mouse adiponectin antibody로 코팅된 microplate의 각 well을 혈청 시료 50 μL 를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 wash buffer(300 $\mu\text{L}/\text{well}$)로 3회 세척한 다음, HRP-conjugated anti-adi-

Table 1. The components of experimental diets

Ingredients	AIN-93G (g)	HFD 45 cal% (g)	Soybean powder+HFD 45 cal% (g)
Casein	200	239	239
Corn starch	397.486	185.096	185.096
Sucrose	100	60	60
Dextrose	132	158	158
Cellulose	50	12.33	12.33
Soybean oil	70	68.92	68.92
Lard	0	209	209
Soybean powder	0	0	50
Mineral mix ¹⁾	35	42	42
Vitamin mix ²⁾	10	12	10
TBHQ	0.014	0.017	0.017
L-Cystine	3	4	3
Choline bitartrate	2.5	3.0	3.0

¹⁾The compositions of mineral mixture were based on AIN-93G.

²⁾The compositions of vitamin mixture were based on AIN-93G.

ponectin antibody(50 µL/well)를 첨가한 후 실온에서 90 분간 반응시켰다. 동일한 방법으로 3회 세척 후 50 µL/well 씩 chromogenic substrate 용액을 가하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 다음 50 µL의 stop solution을 가하여 반응을 정지시키고, ELISA reader로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 leptin과 insulin 농도의 측정은 동일한 방법으로 시행하였다(23).

통계처리

통계처리는 Student's *t*-test로 시행하였으며, *P*<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

세포생존율에 미치는 영향

3T3-L1 지방전구세포에서 발효콩 유지의 처리에 따른 세포독성을 알아보기 위해서 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 측정된 결과, 발효콩 유지 10, 50, 100 µg/mL를 처리한 모든 실험군에서 90% 이상의 높은 생존율을 나타내었으나, 지방세포 분화 억제 활성이 있는 100 µg/mL에서 NF군이 대조군과 유의적인 차이(*P*<0.05)를 나타내어 세포 독성이 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 유의적으로 세포독성을 나타내지 않는 50 µg/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

최근 비만 인구가 증가하는 추세에 있으며 이러한 비만 현상은 다른 질병과 관련지어 건강상에 있어 많은 문제를 일으킨다. 내장과 복부지방의 축적에 따른 체형의 변화뿐만 아니라 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환, 당뇨 등 심각한 성인병을 유발하며, 각종 암 발생을 증가시키므로 비만은 수명단축의 중요지표가 될 수 있다(24). 대두는 우리나라 콩 발효식품의 주된 원료 및 식물유래 기능성 소재로서 다양하게 이용되었

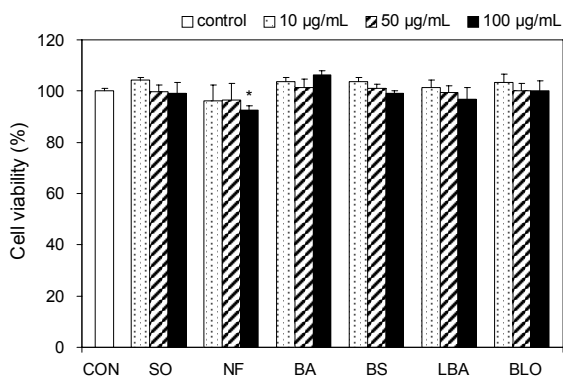


Fig. 1. Effect of fermented oils on the cell viability of 3T3-L1 pre-adipocytes. 3T3-L1 cells were treated with several fermented soybean oils and incubated for 24 h, and the cell viability was determined by MTT method. The optical density of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Significant differences were determined by Student's *t*-test. **P*<0.05 compared with control group (CON).

으며, 단백질과 지방이 풍부한 식물성 식품으로 오랜 세월 동안 한국인의 식생활에서 장, 청국장 등의 발효식품의 형태로 널리 이용되었다. 특히 청국장은 골다공증 억제, 동맥경화, 심장병, 당뇨병 예방 효과 및 항암 효과가 있다고 알려져 있다(25,26). 근래에는 대두 유래의 saponin, phytic acid, 각종 섬유소 등을 통하여 혈중 콜레스테롤 함량을 낮추며, 특히 LDL-콜레스테롤 저하에 크게 기여를 하는 것으로 보고되고 있다(27,28).

또한, 발효를 통한 콩 추출물, 두유, 대두가공부산물들의 항산화, 항암 활성, 항비만 활성 등 기능성에 대한 연구가 보고되어 있다(29,30). 이러한 다양한 기능성 때문에 콩에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 이를 이용한 발효식품에 대한 연구도 증가하고 있다. 하지만 발효 균주를 달리하여 콩을 발효시킨 후 제조한 유지에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다.

3T3-L1 세포 내 triglyceride 함량 측정

3T3-L1 지방전구세포를 분화유도 시킨 후 세포 내 triglyceride 함량을 측정된 결과, 모든 실험군에서 양성대조군 control(+)에 비하여 세포 내 triglyceride 함량이 감소하였다(Fig. 2). Control(+)은 75.4 mg/dL로 control(-)군에 비하여 유의적으로 증가하였고 실험군은 모두 유의적으로 감소하였으며, 특히 50 µg/mL의 BS, LBA, BLO군에서 control(+)에 비해 각 16.6%, 15.4%, 20.6%로 triglyceride 함량이 유의적으로 감소하였다(*P*<0.001).

3T3-L1 지방전구세포는 분화가 진행되면서 지방생성에 관여하는 여러 효소와 전사인자 및 호르몬 등이 발현되어 지방구 형성이 증가하며, 지방구 내에 존재하는 중성지방과 지방 축적에 관여하는 효소들의 활성이 증가하여 세포 내 지방 축적이 일어나게 된다(31,32).

중성지방은 1분자의 글리세롤에 3분자의 지방산이 에스테르 결합한 것으로서 음식물로 섭취하는 지방의 95% 이상을 차지하며, 동물의 경우 중성지방 형태로 저장된다(33). 이러한 에너지원으로 사용되고 남은 중성지방의 경우에는

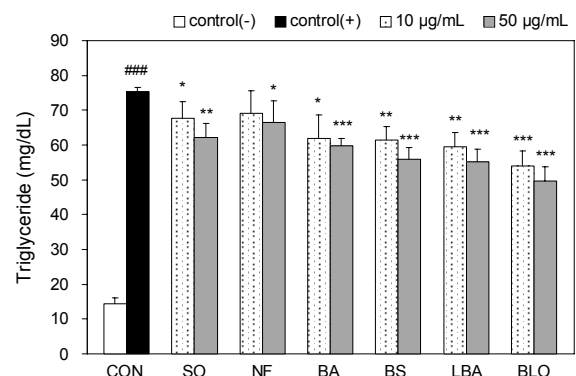


Fig. 2. Inhibitory effects of fermented soybean oils on triglyceride in differentiated 3T3-L1 cells. Data are expressed as the mean±SD in triplicate. ###*P*<0.001 compared with control(-); **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, compared to control(+).

지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인이 된다고 알려져 있다(34).

3T3-L1 세포 내 PPAR γ , C/EBP α mRNA 발현 억제 및 ADIPOQ mRNA 발현 촉진에 미치는 영향

발효 유지의 3T3-L1 세포 내 PPAR γ mRNA 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, 분화를 유도한 대조군인 C(+)군에서 발현이 증가하였고, 분화과정에서 SO군과 NF군에서 최대 10.9%, 9.8% 감소하였으나, BS, LBA, BLO군에서 최대 31.5%, 26.1%, 54.3%로 mRNA 발현이 감소하였음을 확인하였다(Fig. 3).

발효 유지의 C/EBP α mRNA 발현에 미치는 영향은 C(+)군에서 C/EBP α 유전자 발현이 증가하였으며, 실험군 간의 차이는 크게 나타나지 않았으나 SO군보다 NF군에서 조금 더 감소하였으며, BA, BS, LBA, BLO군에서 감소하였다(Fig. 3). 이는 C/EBP α 유전자 발현을 감소시켜 PPAR γ 의 발현에 영향을 주었음을 의미한다.

C(+)군에 비하여 ADIPOQ mRNA 발현이 BA, BS, LBA, BS 그리고 BLO군에서 발현이 각각 72.5%, 58.8%, 78.4%,

86.3%로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3).

지방세포분화 관련인자들의 발현 조절에 미치는 영향을 보기 위해 각 시료를 10, 50 μ g/mL 농도로 처리한 후 지방세포 분화와 관련된 유전자들의 mRNA 발현을 분석하였다. 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정에는 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다. 특히 이러한 adipogenic transcription factor 중에서 C/EBP 및 PPAR family가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 먼저 분화유도인자에 자극을 받게 되면 C/EBP β 의 발현이 유발되면서 분화가 시작되며, C/EBP β 는 insulin-sensitive glucose uptake와 같은 성숙한 비만세포의 특징을 증가시키는데 관여하는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 촉진함으로써 최종적으로 분화과정을 완성하게 된다(35,36). 분화된 세포는 지방구 생성 및 세포의 크기가 증가되는 형태적 변화와 더불어 특이적인 유전자의 발현을 유발함으로써 지방세포의 특징을 지니게 된다. 따라서 본 연구의 발효 유지가 adipogenic transcription factor들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 mRNA 수준에서 확인하였다.

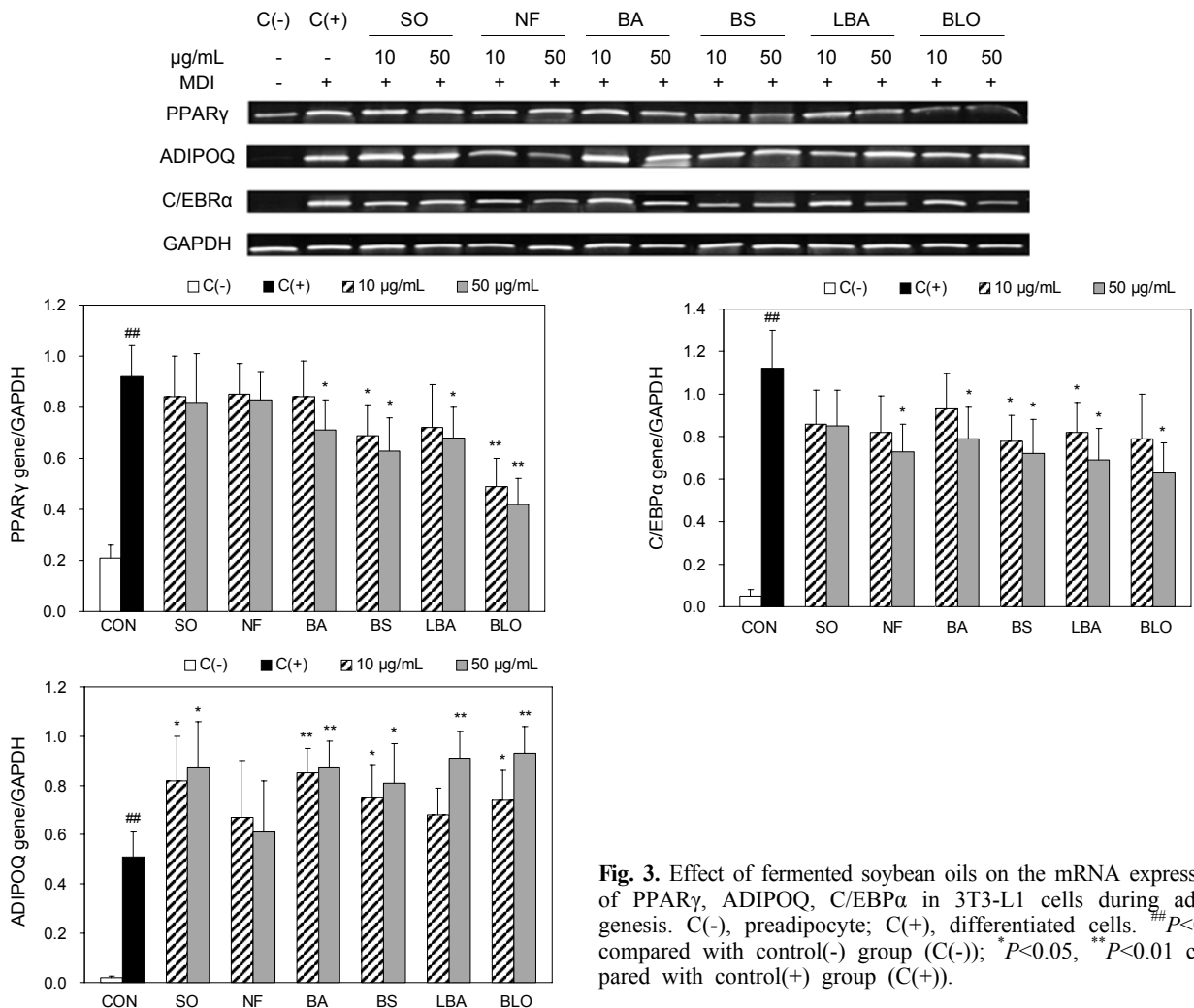


Fig. 3. Effect of fermented soybean oils on the mRNA expressions of PPAR γ , ADIPOQ, C/EBP α in 3T3-L1 cells during adipogenesis. C(-), preadipocyte; C(+), differentiated cells. ##*P*<0.01 compared with control(-) group (C(-)); **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control(+) group (C(+)).

C/EBP α 는 PPAR γ 와의 강한 상호 작용을 통해 지방세포로의 분화 후기 과정을 촉진한다고 알려져 있다(37). C(+)에서 발현이 가장 증가하였으며, 실험군 간의 발현 차이는 크게 나타나지 않았으나 C(+)군에 비해 농도 의존적으로 감소하였다. Adiponectin은 지방세포 분화 후기에 특이적으로 발현되어 분비되는 adipocytokine으로서 인슐린 감수성을 증가시켜 에너지대사를 활성화하고 지방산화를 촉진하여 동맥경화와 당뇨병 등과 같은 비만과 관련된 질환을 예방한다고 알려져 있다(38). 지방세포 분화 후기에 특이적으로 발현되어 분비되는 adiponectin은 BA, LBA, BS 그리고 BLO군에서 발현이 증가하였다. 위의 결과로 3T3-L1 세포에서 발효콩 유지가 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 BLO, BS, LBA군 순으로 효과가 높게 나타난 것으로 확인하였다.

고지방식을 유도한 C57BL/6J 생쥐의 총체중 감소에 미치는 영향

발효콩 유지 함유 고지방식을 섭취한 마우스의 체중을 측정한 결과, 4주 동안의 체중증가량은 고지방 사료를 섭취한 C군이 N군에 비해 약 80% 이상 유의적으로 증가하여 고지방식으로 인하여 비만이 유도되었음을 알 수 있었다. BS, LBA, BLO군에서는 C군에 비해 각각 9.9%, 10.6%, 12.8%로 유의적으로 감소하였다($P<0.05$)(Fig. 4).

체중증가량 및 식이 섭취량 감소에 미치는 영향

4주간의 실험기간 동안 마리당 일일 체중증가량과 일일 식이 섭취량의 변화는 Table 2에 나타내었으며, 일일 식이 섭취량은 C군이 N군에 비해 34%로 유의적으로 증가하였다. SO, NF군에서는 C군에 비해 각각 4.9%와 1.6% 감소하였다. BS, LBA, BLO군은 C군에 비해 각각 10.5%, 12.3%, 11.5%로 유의적으로 감소하였다. 4주간의 실험기간 동안의 생쥐 마리당 식이효율은 N군이 0.20, C군은 0.28로 C군이 N군보다 높았으며, NF, BLO군은 0.27, SO, BA, BS, LBA군은 0.28로 C군과 큰 차이를 나타내지 않았다.

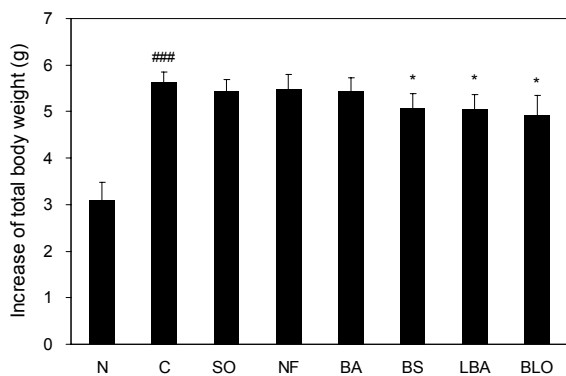


Fig. 4. Effect of fermented oils on increase of total body weight in high fat diet-fed C57BL/6J mice for 4 weeks. Results represent the mean \pm SD (n=6). ### $P<0.001$ compared with normal group (N); * $P<0.05$ compared with control group (C).

Table 2. The effect of fermented oils on body weight gain, daily food intake, and food efficiency ratio in high fat diet-fed mice

Group ¹⁾	Body weight gain (g/week)	Daily food intake (g/day)	FER ²⁾
N	0.77 \pm 0.10	3.82 \pm 0.14	0.20 \pm 0.01
C	1.41 \pm 0.19 ^{##}	5.12 \pm 0.45 ^{##}	0.28 \pm 0.03
SO	1.36 \pm 0.21	4.87 \pm 0.42	0.28 \pm 0.03
NF	1.37 \pm 0.19	5.04 \pm 0.51	0.27 \pm 0.04
BA	1.36 \pm 0.16	4.83 \pm 0.24	0.28 \pm 0.02
BS	1.27 \pm 0.18	4.58 \pm 0.22*	0.28 \pm 0.02
LBA	1.26 \pm 0.18	4.49 \pm 0.34*	0.28 \pm 0.03
BLO	1.23 \pm 0.15	4.53 \pm 0.28*	0.27 \pm 0.02

¹⁾N: Normal diet, C: high fat diet, SO: high fat diet-soybean oil, NF: high fat diet-non-fermented soybean oil, BA: high fat diet-*Bacillus amyloliquefaciens*, BS: high fat diet-*Bacillus subtilis*, LBA: high fat diet-*Lactobacillus acidophilus*, BLO: high fat diet-*Bacillus subtilis*+*Lactobacillus acidophilus* oil.

²⁾FER: Food efficiency ratio=body weight gain/food intake. Values are mean \pm SD.

Significant differences were determined by Student's *t*-test. # $P<0.01$ compared with normal group (N); * $P<0.05$ compared with control (C) group.

혈청 내 지질(중성지방, 총콜레스테롤, HDL-, LDL-콜레스테롤) 함량에 미치는 영향

혈액 내 중성지방인 triglyceride의 농도를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 혈액 내 중성지방은 고지방식에 의해 가장 큰 영향을 받는데 N군에 비해 C군의 중성지방 농도가 86.8% 증가하여 유의적으로 높아졌음을 확인할 수 있었다. C군(111.7 mg/dL)에 비해 SO군(98.2 mg/dL), LBA군(92.2 mg/dL), BLO군(86.3 mg/dL)에서 각각 12.1%, 17.5%, 22.7% 감소하여 혈중 중성지방 농도가 유의하게 낮음을 확인할 수 있었다($P<0.05$). 혈중 총콜레스테롤의 증가는 관상 동맥질환이나 지방대사에 이상이 생겼다는 신호가 된다. LBA군(174.9 mg/dL)의 혈중 총콜레스테롤의 함량이 C군(198.0 mg/dL)에서보다 유의하게 감소하였으며, 특히 BLO군에서 170.8 mg/dL로 C군에 비해 13.7% 감소하였다($P<0.05$)(Table 3). HDL-콜레스테롤은 모든 실험군에서 증가하였으나 C군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 3). HDL-콜레스테롤은 말초조직 및 혈관벽에 축적된 콜레스테롤을 제거하여 간 조직으로 운반하며 혈청과 조직의 콜레스테롤을 재분산함으로써 혈중 콜레스테롤의 양을 저하시키므로 동맥경화에 대한 방어인자로 작용한다. 혈액 내 LDL-콜레스테롤의 농도는 C군에 비해 BA, BS 그리고 LBA군은 각각 23.5%, 33.9%, 35.2%가 감소하였으며, 특히 BLO군에서 C군에 비해 43.4%로 유의하게 감소하였다($P<0.05$)(Table 3). LDL-콜레스테롤은 주로 동맥 혈관벽에 붙어 동맥경화를 일으키거나 심장질환의 원인이 되는 인자로서 혈중 LDL-콜레스테롤 수치가 높아질수록 그 위험성이 커진다.

본 실험 결과에서는 다른 연구와 동일하게 고지방식이 정상군에 비해 총콜레스테롤과 중성지방의 함량을 증가시켰으며(39-41), LDL-콜레스테롤의 함량이 C군보다 LBA

Table 3. The lipid levels in serum of mice fed high fat diet containing fermented oils for 4 weeks

Group	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	AI ¹⁾
N	59.8±9.6	162.2±13.8	116.7±8.4	33.5±3.5	0.4±0.7
C	111.7±8.2 ^{##}	198.0±15.0 [#]	94.4±9.7 [#]	81.3±3.7 ^{##}	1.1±0.5 [#]
SO	98.2±3.1*	184.0±10.4	98.9±8.6	65.5±1.2	0.9±0.2
NF	108.9±4.8	187.0±14.6	94.1±9.0	71.2±4.7	1.0±0.6
BA	105.5±2.7	184.2±11.3	100.9±8.0	62.2±2.8	0.8±0.4
BS	101.0±1.2	176.3±8.6	102.4±6.3	53.7±2.0	0.7±0.4*
LBA	92.2±1.1*	174.9±7.5*	103.8±6.2	52.7±1.1*	0.7±0.2*
BLO	86.3±1.4*	170.8±9.4*	107.5±7.8	46.1±1.2*	0.6±0.2*

¹⁾AI=(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/ HDL-cholesterol.

Values are mean±SD (n=6).

Significant differences were determined by Student's *t*-test. [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 compared with normal (N) group; **P*<0.05 compared with control (C) group.

군, BLO군에서 유의적으로 감소함을 볼 수 있었으며, 동맥경화반 형성에 중요한 원인으로 작용한다고 밝혀진 LDL-콜레스테롤은 동맥경화증의 위험인자로서는 총콜레스테롤의 수치보다 LDL-콜레스테롤의 수치가 더 중요하다는 연구가 보고되어 있다(42). 따라서 LBA, BLO군에서 동맥경화증의 억제효능이 보인다고 할 수 있다.

혈청 내 동맥경화지수(AI) 분석

LDL-콜레스테롤의 증가와 HDL-콜레스테롤의 감소로 인해 동맥질량이 촉진되는데 이러한 상태를 관찰할 수 있는 수치가 AI이다.

모든 실험군에서의 AI 수치는 C군보다 낮은 결과가 나왔으며, 특히 BS, LBA, BLO군에서 C군보다 유의적으로 낮은 결과를 보였다(*P*<0.05).

고지방식이 급여가 정상식이 급여군과 비교하여 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 함량을 증가, 그리고 동맥경화지수를 감소시키는 다른 연구와 본 연구 결과가 일치하였다(40-42).

혈청 내 adiponectin 증가에 미치는 영향

혈청 내 adiponectin 농도는 C군이 N군에 비해 유의적으로 36.8%가 감소하였다(*P*<0.01). BA군은 C군에 비해 15.7% 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 보이지 않았다. BS군, LBA군 그리고 BLO군은 C군에 비해 유의성 있게 각각 24.1%, 32.4%, 35.2% 증가하였다(Table 4).

혈청 중 adiponectin 농도는 비만인에서 비비만인보다 감소하는 결과를 보였는데, 수준은 염증반응 지표 및 공복 인슐린 농도와 음의 상관관계가 있다고 보고되어 있다(43). 본 연구에서도 C군이 N군보다 유의적으로 감소하였으며(*P*<0.01), 실험군 간 차이는 크지 않았으나 C군보다 유의적으로 감소하였다(*P*<0.05).

혈청 중 leptin 함량 증가에 미치는 영향

혈청 렙틴 농도는 N군이 276.5 pg/mL이고, C군이 505.9 ng/mL로 유의적으로 약 83%가 증가하였다(*P*<0.05). NF군

은 557.4 pg/mL로 C군보다 증가하였고 모든 실험군에서는 감소하는 경향을 보였는데, 특히 BS, BLO군에서 C군에 비해 17%, 17.9% 감소하였다(Table 4).

렙틴은 지방 세포에서 분비하는 사이토카인으로 식욕을 억제하고 포만감을 느끼게 하는 호르몬으로 식욕과 에너지 대사를 조절하며 체지방량과 상관관계가 있다. Friedman과 Halaas(44) 및 Galic 등(45)은 비만환자를 비롯하여 고지방식이 섭취에 따라 실험동물의 leptin 농도가 증가하였다고 보고하였다.

혈청 중 insulin 감소에 미치는 영향

혈청 인슐린 농도는 대조군이 67.7 ng/mL로 정상군 32.5 ng/mL보다 유의적으로 증가하였다(*P*<0.01). NF군을 제외한 나머지 SO군, BA군, BS군, LBA군, BLO군에서 각각 53.8, 53.5, 53.0, 51.6, 51.0 ng/mL로 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다(*P*<0.05).

혈청 중 인슐린 함량은 체중 및 내장지방 증가에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다(46). 혈청 인슐린 농도는 C군이 67.7 ng/mL로 N군의 32.5 ng/mL보다 유의적으로 증가하였으며(*P*<0.01), NF군을 제외한 SO, BA, BS, LBA, BLO군에서 각각 53.8, 53.5, 53.0, 51.6, 51.0 ng/mL로 C군에 비해 각각 20.5%, 21.0%, 21.7%, 23.8%, 24.7%가 유의적

Table 4. Effects of fermented oils on adiponectin, leptin, and insulin levels in serum

Group	Adiponectin (µg/mL)	Leptin (pg/mL)	Insulin (ng/mL)
N	17.1±0.4	276.5±10.2	32.5±2.8
C	10.8±0.8 ^{##}	505.9±13.2 [#]	67.7±7.5 ^{##}
SO	13.8±0.4*	489.3±10.3	53.8±4.0*
NF	10.8±0.6	557.4±12.8	64.3±3.8
BA	12.5±0.4	479.3±9.5*	53.5±4.2*
BS	13.4±0.6*	419.7±10.8*	53.0±4.3*
LBA	14.3±0.6*	454.1±11.1*	51.6±3.9*
BLO	14.6±0.4*	415.2±10.3*	51.0±3.8*

Values are mean±SD (n=6).

[#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 compared with normal group (N); **P*<0.05 compared with control group (C).

으로 감소하였다($P<0.05$).

요 약

본 연구에서는 발효콩 유지가 비만 억제 및 예방, 3T3-L1 지방전구세포의 성장 및 분화 억제 효과를 관찰하기 위해 실험을 실시하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 발효콩 유지를 처리하여 세포생존율을 측정된 결과, NF군 100 µg/mL에서 3T3-L1 지방전구세포의 생존율을 유의적으로 감소시켜 세포독성이 나타났다. 분화를 유도한 다음 세포 내 triglyceride 함량을 측정된 결과, 비발효콩 유지(NF) 처리군보다 발효콩 유지처리군에서 triglyceride 함량 저해 효과가 높게 나타났으며, 특히 BS, LBA, BLO군 순으로 높게 나타났다. 또한, BS군, LBA군, BLO군 순으로 지방세포분화 관련 유전자인 PPAR γ 의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, PPAR γ 유전자와 상관관계에 있는 C/EBP α 유전자도 농도 의존적으로 감소시켰다. 그리고 adiponectin 유전자의 발현은 농도 의존적으로 증가시켰다. 고지방식으로 비만을 유도한 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 항비만 활성을 관찰한 결과, 총 체중증가량은 대조군에 비해 4주째에 감소하는 경향이 나타났다. 혈액 내 지질농도를 측정된 결과 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 함량은 LBA, BLO군에서 유의적으로 낮게 나타났으며($P<0.05$), HDL-콜레스테롤 함량은 대조군보다 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 동맥경화 지수인 AI(atherogenic index)는 대조군보다 감소시키는 경향을 보였다. 비만관련 호르몬인 adiponectin의 농도는 SO, BS, LBA, BLO군에서 유의적으로 증가하였고($P<0.05$), insulin 농도는 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). Leptin은 대조군보다 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 이러한 결과를 종합하여 볼 때 발효콩 유지가 3T3-L1 지방전구세포의 mRNA 단계에서부터 지방분화를 억제하여 항비만 활성을 가지고 있는 것으로 추정되고, 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6J 생쥐에서 총체중을 감소시키고, 혈액 내 지질농도인 triglyceride와 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤과 비만관련 호르몬인 adiponectin, insulin, leptin을 조절하여 항비만 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이 결과로 발효콩 유지가 항비만 생리활성을 나타내는 새로운 식품 소재로서 이를 활용한 기능성 식품 개발의 가능성이 있다고 생각된다.

REFERENCES

1. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
2. Alessi MC, Lijnen HR, Bastelica D, Juhan-Vague I. 2003. Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33: 290-297.
3. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
4. Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 885-896.
5. Roncari DAK, Lau DCW, Kindler S. 1981. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism* 30: 425-427.
6. Hsu CL, Yen GC. 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 52: 53-61.
7. Huo H, Guo X, Hong S, Jiang M, Liu X, Liao K. 2003. Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J Biol Chem* 278: 11561-11569.
8. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
9. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307.
10. Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Körber E, Kolb HJ. 1986. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 367: 905-912.
11. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmilko PE, Verma S. 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2031-H2041.
12. Kim SH, Yang JL, Song YS. 1999. Physiological functions of *Chungkukjang*. *Food Industry and Nutrition* 4(2): 40-46.
13. Holt S. 1999. The food of the next millennium. In *The Soy Revolution*. M. Evans and Company, Inc., New York, NY, USA. p 4-6.
14. Kim CH, Park JS, Sohn HS, Chung CW. 2002. Determination of isoflavone, total saponin, dietary fiber, soy oligosaccharides and lecithins from commercial soy products based on the one serving size: Some bioactive compounds from commercialized soy products. *Korean J Food Sci Technol* 34: 96-102.
15. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 156-162.
16. Chung KS, Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Choi SY. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cell using MTT assay. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 477-482.
17. Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. 2001. Some biological activities and isoflavone content of *chungkugiang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 662-667.
18. Harmon AW, Harp JB. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C807-C813.
19. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
20. Birch DE. 1996. Simplified hot start PCR. *Nature* 381: 445-446.
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
22. Lauer RM, Lee J, Clarke WR. 1988. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* 82: 309-318.
23. Engvall E, Perlmann P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent

- assay, Elisa III. Quantitation of specific antibodies of enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109: 129-135.
24. Lew EA. 1985. Mortality and weight: insured lives and the American Cancer Society studies. *Ann Intern Med* 103: 1024-1029.
 25. Kim JS. 1996. Current research trends on bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest* 13(2): 17-24.
 26. Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH. 2005. Industrial application and physiological functions of *Chungkukjang*. *Food Science and Industry* 38(2): 69-78.
 27. Velasquez MT, Bhathena SJ. 2007. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 4: 72-82.
 28. Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int* 40: 661-667.
 29. Lee SI, Lee YK, Kim SD, Lee IA, Choi J, Suh JW. 2013. Dietary effects of fermented soybean curd residue (Biji) on body weight, serum lipid profiles, and antioxidation-related enzymes activity of mice fed a high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1043-1053.
 30. Kim JY, Jeong JE, Moon SH, Park KY. 2010. Antiobesity effect of the *Bacillus subtilis* KC-3 fermented soymilk in 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1126-1131.
 31. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 875-888.
 32. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
 33. Chen HC, Farese RV Jr. 2000. DGAT and triglyceride synthesis: a new target for obesity treatment?. *Trends Cardiovasc Med* 10: 188-192.
 34. Yano T, Kobori S, Sakai M, Anami Y, Matsumura T, Matsuda H, Kasho M, Shichiri M. 1997. β -Very low density lipoprotein induces triglyceride accumulation through receptor mediated endocytotic pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Atherosclerosis* 135: 57-64.
 35. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. 1999. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR γ and C/EBP α . *J Biol Chem* 274: 7946-7951.
 36. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. 2001. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 276: 18464-18471.
 37. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
 38. Glomset JA. 1970. Physiological role of lecithin cholesterol acyltransferase. *Am J Clin Nutr* 23: 1129-1136.
 39. Bae GJ, Son JH, Lee JH, Jeong NO, Ha BJ. 2014. Effects of *Cladosiphon okamuranus* dietary fiber on cholesterol in high fat diet-fed rats. *J Food Hyg Safety* 29: 370-375.
 40. Han SH, Kim HY. 2013. Effects of Jebikong (*Dolichos lablab*) extract on serum lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Korean J Food Culture* 28: 409-414.
 41. Um MY, Choi WH, Ahn J, Ha TY. 2013. Effects of ethanolic extract of *Ulmus davidiana* root on lipid metabolism in high-fat diet fed mice. *Korean J Food Nutr* 26: 8-14.
 42. Gotto AM Jr, Farmer JA. 2006. Drug insight: the role of statins in combination with ezetimibe to lower LDL cholesterol. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 664-672.
 43. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 29-33.
 44. Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
 45. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316: 129-139.
 46. Lee S, So S, Hwang E, Koo B, Han G, Ko S, Kim N. 2008. Effects of ginseng and herbal plant mixtures on anti-obesity in obese SD rat induced by high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 437-444.