

*Aspergillus Oryzae*로 발효시킨 비지메주의 항비만 및 지질개선 효과*

이상일¹ · 이예경² · 김순동² · 이지언² · 최종근³ · 박종필² · 임종환² · 서주원² · 이인에^{2§}

계명문화대학 식품영양조리학부,¹ 명지대학교 농생명바이오식의약소재개발사업단,² 청운대학교 화장품과학과³

Effect of fermented soybean curd residue (FSCR; SCR-meju) by *aspergillus oryzae* on the anti-obesity and lipids improvement[§]

Lee, Sang-Il¹ · Lee, Ye-Kyung² · Kim, Soon-Dong² · Lee, Ji-Ean² · Choi, Jongkeun³
Bak, Jong-Phil² · Lim, Jong-Hwan² · Suh, Joo-Won² · Lee, In-Ae^{2§}

¹Department of Food, Nutrition and Culinary Arts, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

²Center for Nutraceutical and Pharmaceutical Materials, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

³Department of Cosmetic Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

ABSTRACT

In this study, we designed to confirm the dietary effect of anti-obesity of fermented soybean curd residue (FSCR; SCR-Meju; Biji-meju) by *A. oryzae*, which is well known as a Korean traditional meju microbe. We observed that body weight gain, serum and hepatic lipid profile, as well as the activity of ROS generating enzyme and ROS scavenging enzyme in high-fat diet induced obese mice fed experimental diet (SCR and SCR-meju). Body weight gain and epididymal fat weight of HC (high-fat diet control) was markedly higher than that of NC (Normal control). Conversely, body weight gain and epididymal fat weight of the SCR (Biji) and SCR-meju (Biji-meju) group was significantly lower than that of HC; these of the SCR-meju group was lower than that of the SCR group. Furthermore, serum TG and total-cholesterol and LDL-cholesterol contents of SCR and SCR-meju groups were lower than that of HC, and HDL-cholesterol level of the SCR-meju group was significantly higher than that of HC. In conclusion, although precise mechanisms of the antiobese effects of SCR-meju in this study are unknown, the present study provides an experimental evidence that SCR-meju may prevent obesity and obesity related metabolic syndromes, such as hyperlipidemia, hypertension and diabetes, and liver disease by high-fat diet. Nevertheless, further study in this filed will be needed. (J Nutr Health 2013; 46(6): 493 ~ 502)

KEY WORDS: soybean curd residue (SCR, biji), *aspergillus oryzae*, SCR-meju (biji-meju), anit-obesity, antioxidant enzymes.

서 론

비만은 에너지의 과잉섭취, 유전적 감수성 및 육체적 활동성 감소 등으로 인한 에너지의 불균형으로 신체조직에 지방이 과도하게 축적되는 것으로 지난 수세기 동안 그 유병율이 꾸준히 증가^{1,2)}해왔으며, 자체적으로 혹은 다른 질병과 연계되어 심혈관계 질환, 당뇨, 비알코올성 간염, 암, 치매 등과 같은 심각한 질환들을 유발³⁻⁶⁾시키는 결정적인 위해요소로 작용하고 있다. 지난 30여 년 동안 여러 종류의 항 비만제가 개발되었으나

실제 활용되고 있는 것은 pancreatic lipase의 활성을 저해시킴으로써 장내의 지방흡수를 감소시키는 것으로 알려진 orlistat (xenical)⁷⁾가 있으며 그 외 식욕 억제제로 알려진 sibutramine (reductil)⁸⁾ 등은 심각한 부작용 때문에 사용이 제한^{9,10)}되고 있다. 항비만의 작용 기전으로는 lipase 저해,¹¹⁾ 식욕억제,¹²⁾ 에너지 소비촉진,¹³⁾ 지방세포의 분화저해,¹⁴⁾ 지방대사 조절¹⁵⁾ 및 이들의 복합작용¹⁶⁾ 등이 알려져 있으며, 본 연구의 재료인 비지에 함유된 genistein 및 L-carnitine (isoflavone)은 peroxisome-proliferator activated receptor로 지방 대사를 촉진¹⁷⁾하며, β-conglycinin 및 glycinin (globulins)의 지방산의 생합성

Received: Sep 2, 2013 / Revised: Oct 22, 2013 / Accepted: Nov 20, 2013

*This work was supported by a grant from the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ009582 & PJ009643), Rural Development Administration, Republic of Korea.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rheeinae@hanmail.net

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 억제와 동시에 β -oxidation을 촉진¹⁸⁾하며, genistein은 지방 세포의 분화를 억제¹⁹⁾함으로써 항비만 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

비지 (soybean curd residue: SCR)는 대두에 물을 넣어 파쇄한 후 끓여 두유를 얻고 남은 잔유물로 대부분이 대두의 껍질부분을 포함한 비수용성 물질로 구성되어 있다. SCR에는 내열성의 고초균 (*Bacillus subtilis*)이 부착되어 있어 40℃ 내외에서 하룻밤 띄우면 독특한 향미를 가지는 발효비지를 만들 수 있으며 우리나라 전통식품의 하나로 이용되어 왔다. 그러나 비지에 대한 과학적인 인식의 부족으로 최근에는 폐기물로 버려지는 경우가 많다. 일반적으로 대두를 비롯한 곡류의 껍질에 함유된 성분들은 소화성이 좋지 않아 주로 사료로 많이 활용되었으나 발효과학의 발달로 최근에는 활용성을 넓히거나 기능성을 더욱 증진시키고자하는 연구들이 많이 이루어지고 있다. 즉, Shi 등²⁰⁾은 *Flammulina velutipes*로 발효시킨 SCR에서 분리한 다당체가 높은 항산화 및 면역활성을 가진다고 하였고, Choi 등²¹⁾은 대두를 가공하기 위한 침지수와 순물에 껍질로 부터 우리나라 daidzein과 genistein이 비만과 관련이 있는 지방세포분화와 지방생성을 억제한다고 하였다. 또, Matsumoto 등²²⁾은 SCR을 혼합한 사료가 설치류의 체중을 감소하는 효과가 있을 뿐만 아니라 혈중지질, LDL-cholesterol 및 non-esterified fatty acid의 함량증가를 억제하여 간지방증 (steatosis)을 예방한다고 하였다.

발효 미생물 중에서 본 연구에서 사용한 *Aspergillus oryzae*는 미국 식품의약국 안정청과 WHO (World Health Organization)에서 GRAS (Generally Regarded As Safe)로 인정되고 있는 미생물로 옛날부터 간장, 된장, 발효주 및 감주제조용의 코지 또는 메주의 제조에 사용되어 왔으며, 그 원료로는

대두, 쌀, 밀 등과 같은 곡류와 밀기울 등 곡류의 부산물을 사용하여 왔다.²³⁾ 또, 최근에는 *A. oryzae* 생균이 조류나 소와 같은 동물의 장내에서 *Lactobacillus*속 미생물의 기질로 사용됨으로서 유해 세균류에 대한 항균작용을 높이고 소화를 증진하며 체내 콜레스테롤을 감소시키는 것으로 보고되고 있다.²⁴⁾ *A. oryzae*를 대두에 번식시킨 코지 또는 *A. oryzae*를 비롯한 곰팡이류와 *Bacillus*속 미생물이 함께 번식된 전통 대두메주는 된장이나 간장 제조용으로 쓰이고 있으나 두유를 분리시키고 남은 비지를 이용한 메주제조와 이의 활용에 관한 연구는 매우 적다.

본 연구에서는 오랜 세월 동안 전통적으로 이용해 온 미생물인 *A. oryzae*를 비지에 발효시켜 비지 메주를 제조하여 고지방식이 마우스의 체중과 지질개선효과를 조사하였다.

연구방법

재료 및 균주

실험용 비지는 국내산 대두(*Glycine max* Taekwang)를 이용하여 재래식 방법으로 두부를 만들고 있는 경상북도 경산시 중앙동에 위치한 재래시장 내의 한 두부제조공장에서 두부제조 후 곧 바로 채취한 비지를 3일간 건조시킨 후 믹서기를 사용하여 50 mesh의 입도로 분쇄한 것을 비지메주 제조용 시료로 사용하였으며, 발효용 균주는 Korea Food Research Institute에서 분양받은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995를 사용하였다.

비지메주의 제조

*A. oryzae*를 이용한 비지메주는 Fig. 1에서와 같이 제조하였

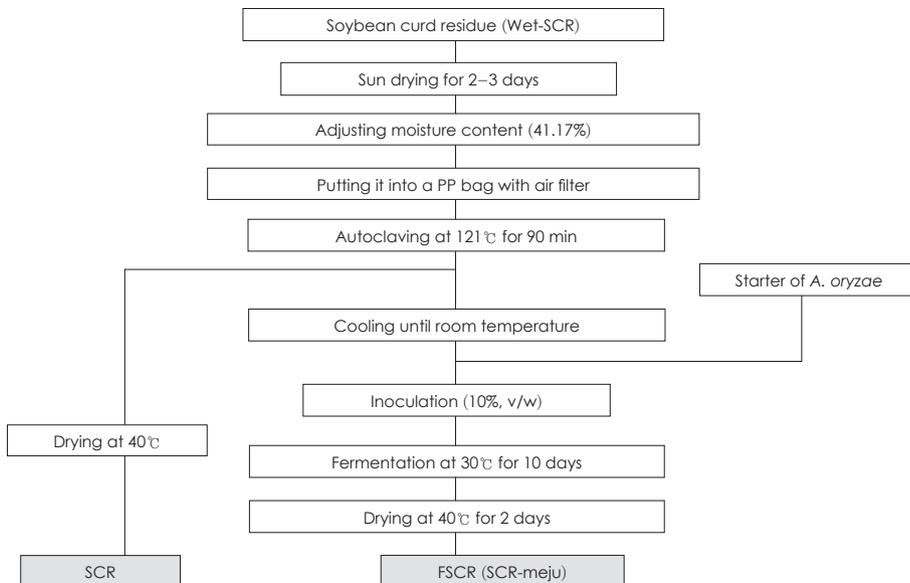


Fig. 1. Preparation procedure of fermented soybean curd residue (FSCR-mejū).

다. 건조비지 100 g에 대하여 물 70 mL의 비율로 가하여 첨가 총 수분함량을 41.17%로 조절한 다음에 2 L들이 polypropylene (PP) bag에 500 g씩 넣고 면으로 된 air filter가 부착된 뚜껑을 하여 121°C에서 90분간 살균한 후 20°C로 냉각시켰다. 종균은 *A. oryzae*를 PD-broth (Difco, Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA) 50 mL (108 cells/mL)에서 7일간 25°C의 진탕 배양기에서 배양한 다음 살균된 비지에 접종하여 25°C에서 10일간 배양하고 회수하여, 50°C에서 2일간 건조시켜 50 mesh 입도로 분말화하여 비지메주 (FSCR; SCR-meju)를 제조하였다. SCR-meju와 비교하기 위한 대조구는 121°C에서 90분간 살균한 비발효 비지를 50°C에서 2일간 건조시킨 것 (SCR)으로 하였다.

동물실험

실험동물은 4주령의 평균체중 21~24 g의 ICR (CrIjori: CD-1), SPF/VAF outbred mice (Orient Ltd., Sungnamsi, Korea)를 구입하여 기본사료 (5L79 diets: PMI Nutrition, LLC, Brentwood, MO, USA)로 1주일간 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험군별 식이조성은 Table 1과 같이 기본사료만을 급여한 정상식이 대조군 (NC), 기본사료에 lard 35% 혼합한 사료를 급여한 고지방식이 대조군 (HC), 기본사료에 lard 35%와 SCR 2% 혼합한 사료를 급여한 군 (SCR), 기본사료에 lard 35%와 SCR-meju 2% 혼합한 사료를 급여한 군 (SCR-muju) 등의 4개 군 (6마리/군)으로 나누어 8주간 사육하였다. 식이는 Feeds Lab Co (Guri-si, Gyeonggi-do, Korea)에 의뢰하여 제조하였으며, 4°C에서 보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였다. 실험동물은 stainless steel cage에 6마리씩 넣어 사육하였고, 온도 23 ± 2°C, 습도 60 ± 5%로 조정하였다. 명암주기는 12시간 간격으로 설정하였고, 실험 식이와 음용수는 자유 섭취시켰다. 본 실험은 동물실험윤리위원회의 승인 (WKU

12-15)을 받아 수행하였다.

체중 및 식이효율의 측정

실험기간 동안 매일 오전 10~11시에 체중과 식이섭취량을 측정하였으며, 식이효율 (feed efficiency ratio, FER)은 1주간의 체중증가량을 1주간의 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

효소활성 측정 시료 준비

8주간 사육한 실험동물은 물만 주고 12시간 동안 금식시킨 후 ether 마취 하에서 개복하여 하대정맥으로부터 채혈한 다음, 병냉의 생리식염수로 간을 관류하고 장기를 적출한 후 수분을 제거하고 무게를 측정하였다. 적출한 간 조직 일정량에 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 마쇄한 균질액을 10,000 × g (4°C)에서 30분간 원심분리한 다음 postmitochondrial 분획을 취해 효소 활성도 측정에 이용하였다. 채취한 혈액은 실온에서 응고시킨 다음 4°C, 2,500 × g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C에 두면서 분석용 시료로 사용하였다.

혈청 Alanine aminotransferase 활성 및 지질함량

혈청 alanine aminotransferase (ALT) 활성도는 Reitman과 Freancke²⁵⁾의 방법에 준하여 kit시약 (Asan Pharm., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며 혈청 1 mL당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit로 나타내었다. 혈청중성지질, 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량은 kit 시약 (AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤함량은 Friedewald 등²⁶⁾의 방법에 따라 계산하였다. Atherogenic index (AI)는 계산식 [(total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol]에 의하여 산출하였다.

간 조직 지질함량

Folch 등²⁷⁾의 방법에 따라 chloroform과 methanol (2 : 1) 혼합액에 간 조직 마쇄액 일정량을 가해 혼합한 다음 방치하여 분리된 유기용매 부분 일정량을 취해 질소가스 존재 하에서 휘발시킨 후 중성지방의 함량과 총콜레스테롤의 함량을 kit 시약 (AM 157S-K, Asan Pharm Co. Ltd., Korea, AM 202-K, Asan Pharm Co. Ltd., Korea)으로 각각 측정하였다.

간 조직 Glutathione 및 Lipid peroxide의 함량

간 조직 환원형 glutathione (GSH)의 함량은 Ellman²⁸⁾의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 가하여 생성되는 thiophenol의 흡광도를 측정하였으며 간 조직 g당 GSH μ mole로 나타내었다. Lipid peroxide (LPO)의 함량은 Ohkawa 등²⁹⁾의 방법에 따라 일

Table 1. Experimental groups and ingredients of diets (%)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾			
	NC	HC	SCR	SCR-meju
Pellet stew (5L79 diets) ²⁾	100	65	63	63
Lard	-	35	35	35
Soybean curd residue (SCR) ³⁾	-	-	2	-
SCR fermented by <i>A. oryzae</i> ⁴⁾	-	-	-	2

1) NC: normal control group, HC: high fat supplemented control group, SCR: soybean curd residue supplemented high fat diet group, SCR-meju: SCR fermented by *A. oryzae* supplemented high fat diet group 2) The diets for animal experiments manufactured in PMI Nutrition, LLC, Brentwood, MO, USA. Guaranteed analysis: crude protein 18%, crude fat 5%, crude fiber 5%, ash 8% 3) Moisture 3.28%, crude protein 20.34%, crude fat 8.72%, carbohydrate 23.94%, fiber 40.81%, ash 2.91% 4) moisture 3.45%, crude protein 16.55%, crude fat 7.95%, carbohydrate 29.07%, fiber 39.95%, ash 3.03%

정량의 간 조직 마쇄균질액에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 반응시킨 후 n-butanol을 가하여 이행되는 TBA-reactive substance를 흡광도 532 nm에서 측정한다. 다음 분자흡광계수 ($\epsilon = 1.5 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 함량을 산출하였으며 간 조직 g 당 malondialdehyde (MDA) nmole로 나타내었다.

간 조직 Xanthine oxidase, Superoxide dismutase, Glutathione S-transferase 및 Glutathione peroxidase 활성

간 조직 xanthine oxidase (XO)의 활성은 Stirpe와 Della Corte³⁰⁾의 방법에 따라 측정하였으며, 활성도는 분당 단백질 1 mg이 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 Martin 등³¹⁾의 방법에 따라 superoxide anion radical에 의해 hematoxylin으로부터 생성되는 hematin을 560 nm에서 측정하였으며 효소원을 가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 하여 1 mg의 단백질이 hematoxylin의 자동산화물을 억제하는 정도를 U (Unit)로 나타내었다. Glutathione S-transferase (GST)활성은 Habig 등³²⁾의 방법에 따라 효소에 의해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 GSH가 반응하여 생성되는 thioether의 흡광도를 340 nm에서 측정한다. 다음 흡광계수 ($\epsilon = 9.5 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성도를 계산하였으며 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 thioether의 μmole 로 나타내었다. Glutathione peroxidase (GPX)활성은 Paglia와 Valentine³³⁾의 방법에 따라 1 mM EDTA 함유 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 용액 일정량에 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 1 unit glutathione reductase 및 일정량의 효소원과 기질인 0.25 mM hydrogen peroxide를 가해 25°C에서 반응시키는 동안에 생성된 oxidized glutathione을 환원시키는데 소모된 NADPH를 340 nm에서 측정하고 분자흡광계수 ($\epsilon = 6.22 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 계산하였다. 효소의 활성도는 1 mg의 단백질이 1분

간 산화시킨 NADPH의 함량을 nmole로 나타내었다.

단백질 측정

간 조직의 단백질 함량은 Lowry 등³⁴⁾의 방법에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 표준용액으로 하여 측정하였다.

간 조직 검사

8주간 사육한 흰쥐 간 조직을 절취하여 10% neutral formalin에 고정시킨 다음, 알코올 탈수, 파라핀 포매하여 microtome으로 4 μm 두께로 잘라 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계 처리

실험결과는 SPSS ver. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었다. 군별 유의성 검증은 ANOVA (one-way) test 후, Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

체중, 식이섭취량 및 식이효율

SCR 및 SCR-meju 2%를 함유하는 고지방식이 실험동물의 체중과 식이효율에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같다.

체중증가량은 HC군에서 NC군에 비해 2.32배로 현저히 증가하였으며, SCR 및 SCR-meju군에서는 HC군에 비해 각각 22.41 및 51.72%로 유의하게 감소하였다. 그리고 초기증량에 대한 체중증가율을 8주간 plot한 결과 (Fig. 2). 특히 SCR-meju 군의 경우는 식이초기부터 NC군과의 뚜렷한 체중변화를 보이지 않는 상태를 유지하였으며, SCR군의 경우는 식이 3주 이후부터 차이를 보이기 시작하여 8주째는 HC군과의 유의적인 차이를 나타내었다. 식이섭취량은 모든 실험군 간에 유

Table 2. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on body weight gain and feed efficiency ratio of mouse fed for 8 weeks

Measurements	Experimental plots ¹⁾			
	NC	HC	SCR	SCR-meju
Initial body weight (g)	30.70 \pm 1.45 ^{NS3)}	30.60 \pm 1.53	32.40 \pm 1.38	31.00 \pm 1.40
Final body weight (g)	36.70 \pm 2.21 ^{b4)}	44.49 \pm 2.30 ^o	43.22 \pm 2.09 ^o	37.75 \pm 2.24 ^b
Feed intakes (g/week)	41.92 \pm 2.24 ^{NS}	40.40 \pm 2.19	41.68 \pm 2.32	40.88 \pm 2.40
Calorie intakes (kcal/week)	156.36 \pm 8.36 ^b	225.22 \pm 12.21 ^o	233.37 \pm 12.43 ^o	228.90 \pm 13.44 ^o
Weight gain (g/week)	0.75 \pm 0.04 ^c	1.74 \pm 0.09 ^o	1.35 \pm 0.07 ^b	0.84 \pm 0.05 ^c
Water intakes (mL/week)	62.00 \pm 4.96 ^o	33.20 \pm 3.21 ^b	35.24 \pm 2.98 ^b	39.20 \pm 3.75 ^b
FER ²⁾	0.02 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.01 ^o	0.03 \pm 0.005 ^o	0.02 \pm 0.00 ^b

1) See Fig. 1 and Table 1. 2) Feed efficiency ratio = Weight gain/Feed intakes 3) Values are mean \pm standard deviations (n = 6), different superscripts in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$). 4) Not significant

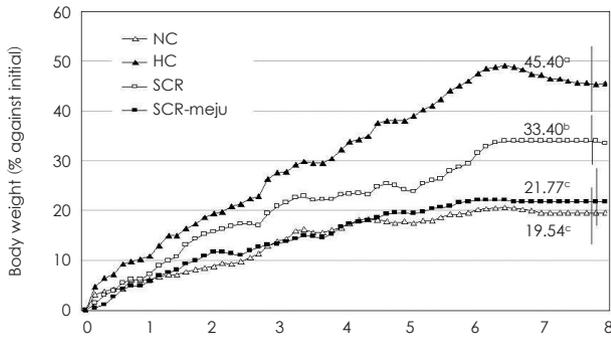


Fig. 2. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the changes in body weight gain (% against initial) of mouse fed for 8 weeks. See Fig. 1 and Table 1. Values are means (n = 6), and the values of the final week are mean ± standard deviations (n = 6). Different superscripts on the final week indicate significant differences (p < 0.05).

의적인 변동은 없었으나, calorie 섭취량은 NC군에 비해 모든 고지방식이 실험군에서 유의하게 증가 (44.04~46.64%)하였다. 또한 식이효율 (FER)은 NC군에 비해 HC 및 SCR군에서 유의하게 증가하였으나, SCR-meju군에서는 NC군 수준으로 회복되었다. 이러한 결과는 SCR 및 SCR-meju 첨가식이 체중 증가를 억제하는 효과가 있다는 것을 암시하고 있다.

상대적 장기중량 및 부고환 주변지방의 중량

SCR 및 SCR-meju를 혼합한 고지방식으로 8주간 사육한 실험동물의 체중에 대한 장기중량 %와 부고환주변지방의 함량을 조사한 결과는 Table 3 및 Fig. 3과 같다. 체중에 대한 간의 중량비율 (%)은 NC군에 비하여 HC군에서 7.67% 감소하였으나 SCR 및 SCR-meju군에서는 HC군에 비하여 각각 10.51 및 12.22% 유의하게 증가하였다. 신장의 상대적 중량은 NC군에 비해 HC군에서 24.87% 유의하게 감소하였으나, SCR 및 SCR-meju군에서는 HC군에 비해 각각 14.86 및 19.59% 유의하게 증가하였다. 고환의 상대적 중량은 NC군에 비해 HC군에서 20.83% 유의하게 감소하였으나, SCR-meju군은 HC군에 비해 12.28% 유의하게 증가하였으며, SCR군은 HC군과 유사하게 나타났다. 심장의 상대적 중량은 SCR-meju군이 HC 및 SCR군에 비해 유의하게 증가하였다.

한편, 상대적 부고환주위 지방중량은 NC군에 비해 HC군에서 약 4.2배 이상 증가하였으며, SCR-meju군은 HC군에 비해 45.11% 현저히 감소하였으나, SCR군은 HC군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 고지방 식이에서는 당대사의 불균형과 과잉으로 생성되는 포도당의 유입 및 비정상적인 RNA와 DNA의 합성으로 간을 비롯한 장기들의 중량이 증가하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 또, 고지방식을 행한 실험동물에서는 체중 당의 간 중량이 감소하는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾ 그러므로 본 실험의 결과는 SCR 및 SCR-meju 첨가식이 복부비만을 억제하는 효과가 있음을 암시하고 있다.

Table 3. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on organs weight of mouse fed for 8 weeks (relative % of body weight)

Organs	Experimental plots ¹⁾			
	NC	HC	SCR	SCR-meju
Liver	4.43 ± 0.19 ^{ab2)}	4.09 ± 0.20 ^b	4.52 ± 0.21 ^a	4.59 ± 0.22 ^a
Kidney	1.97 ± 0.11 ^a	1.48 ± 0.07 ^c	1.70 ± 0.09 ^b	1.77 ± 0.09 ^{ab}
Heart	0.58 ± 0.03 ^{ab}	0.53 ± 0.03 ^b	0.57 ± 0.04 ^b	0.64 ± 0.05 ^a
Testis	0.72 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.03 ^c	0.57 ± 0.02 ^c	0.64 ± 0.03 ^b

1) See Fig. 1 and Table 1. 2) Values are mean ± standard deviations (n = 6), different superscripts in the same row indicate significant differences (p < 0.05).

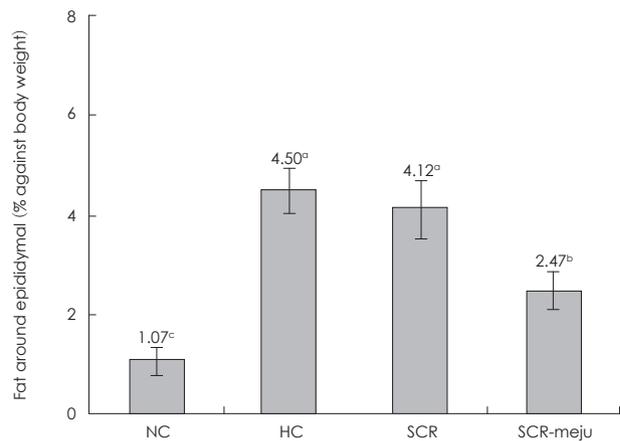


Fig. 3. Effects of FSCR supplemented diets on the weight of fat around epididymis in mouse fed for 8 weeks. See Table 1. Values are mean ± standard deviations (n = 5), different superscripts in the figures indicates significant differences (p < 0.05).

혈청 및 간 조직 지질 함량

SCR 및 SCR-meju를 혼합한 고지방식으로 8주간 사육한 실험동물의 혈청 및 간 조직 지질함량의 변동을 조사한 결과는 Table 4 및 Fig. 4와 같다. 중성지질 (TG), 총 cholesterol (TC) 및 LDL-cholesterol (LDL-C)의 함량은 NC군에 비하여 HC군에서 모두 현저하게 증가하였으며, 고지방식에 의해 HC군에서 증가되었던 지질들의 함량이 SCR 및 SCR-meju군에서 모두 유의하게 감소하였다. 즉, 중성지질의 함량은 NC군에 비해 HC군에서 31.71%가 증가하였으나, SCR 및 SCR-meju군의 경우에는 NC군 이하 수준으로 감소하였다. TC의 함량은 HC군이 NC군에 비하여 71.62%가 증가하였으나, SCR 및 SCR-meju군에서는 HC군에 비해 각각 12.99 및 20.09%가 유의하게 감소하였다. LDL-C의 함량은 NC군에 비해 HC군에서 2.59배 증가하였으나, SCR 및 SCR-meju군은 HC군에 비하여 각각 16.23 및 28.18%가 감소하였다. 그러나 혈청 HDL-cholesterol (HDL-C)의 함량은 NC군에 비해 HC군에서 19.91% 유의하게 감소한 반면 SCR-meju군은 HC군에 비해 20.63% 유의하게 증가하여 NC군 수준으로 회복되었다. 동맥경화증지수 (AI)는 LDL-C의 경우와 정도의 차이는 있으나

NC군에 비해 HC군에서 2.90배가 증가하였으나, SCR 및 SCR-meju군의 경우에는 HC군에 비하여 각각 26.94 및 41.55%가 감소하였다.

한편, 간 조직 중성지질의 함량은 혈청 중성지질의 경우와 정도의 차이는 있으나 유사하게 NC군에 비하여 36.27%가 유의하게 증가하였고, SCR 및 SCR-meju군의 경우에는 HC군에 비해 각각 21.09 및 38.41%가 감소하였다. 그리고 cholesterol의 함량도 혈청 cholesterol의 경우와 유사하게 HC군에서 NC군에 비해 71.77%가 증가하였으며, SCR 및 SCR-meju군에서는 HC군에 비해 각각 9.86 및 11.76%가 감소하였다.

간 조직 GSH, LPO 함량 및 혈청 ALT 활성

SCR 및 SCR-meju를 혼합한 고지방식으로 8주간 사육한 실험동물의 간 조직의 GSH와 LPO의 함량 및 혈청 ALT의 활성 변동을 조사한 결과는 Fig. 5 및 6과 같다. 간 조직의 GSH

의 함량은 NC군에 비해 HC군에서 33.88%가 감소하였고, SCR 및 SCR-meju군은 HC군에 비하여 27.16 및 59.26%가 증가하였다. 그리고 LPO의 함량은 NC군에 비해 HC군에서 23.07% 증가하였고, SCR 및 SCR-meju군은 각각 9.01 및 26.1% 감소하였으며, 특히 SCR-meju군은 NC군 수준 이하로 감소하였다. 한편, 혈청 ALT의 활성은 HC군에서 NC군에 비해 68.48% 현저히 증가하였으나 SCR 및 SCR-meju군은 HC군에 비해 각각 22.68 및 35.1%가 감소하였다.

간 조직에서 GSH는 ROS (reactive oxygen species)에 의한 LPO의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 체내의 각종 스트레스로 생성된 ROS는 다가불포화지방산으로부터 LPO를 생성하며, 생성된 LPO는 분해되어 aldehydes, ketones, lactones 등을 생성하여 세포조직의 손상과 노화를 촉진한다.³⁷⁾ 또, 간 조직의 GSH 함량이 감소하면 ROS에 의해 생성되는 LPO 함량이 증가함으로써 LPO의 함량은 생체막의 손상정

Table 4. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the content of serum lipid profiles in mouse fed for 8 weeks

Measurements	NC ¹⁾	HC ²⁾	SCR ³⁾	SCR-meju ⁴⁾
TG (mg/dL)	87.36 ± 2.94 ^{b7)}	115.06 ± 6.15 ^d	74.15 ± 4.33 ^{cd}	71.17 ± 3.95 ^d
TC (mg/dL)	136.20 ± 7.22 ^c	233.75 ± 9.37 ^a	203.38 ± 8.26 ^b	186.78 ± 9.75 ^b
HDL-C (mg/dL)	54.24 ± 3.18 ^a	43.44 ± 3.12 ^c	48.40 ± 2.97 ^{bc}	52.40 ± 2.88 ^{ab}
LDL-C (mg/dL) ⁵⁾	64.49 ± 3.22 ^d	167.30 ± 8.37 ^a	140.15 ± 7.01 ^b	120.15 ± 6.01 ^c
AI ⁶⁾	1.51 ± 0.09 ^d	4.38 ± 0.26 ^a	3.20 ± 0.16 ^b	2.56 ± 0.13 ^c

1-4) See Table 1. 5) LDL-cholesterol = total cholesterol - (triglyceride / 5 + HDL-cholesterol) 6) AI: atherogenic index = (Total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol 7) Values are mean ± standard deviations (n = 5), different superscripts in the same row indicate significant differences (p < 0.05).

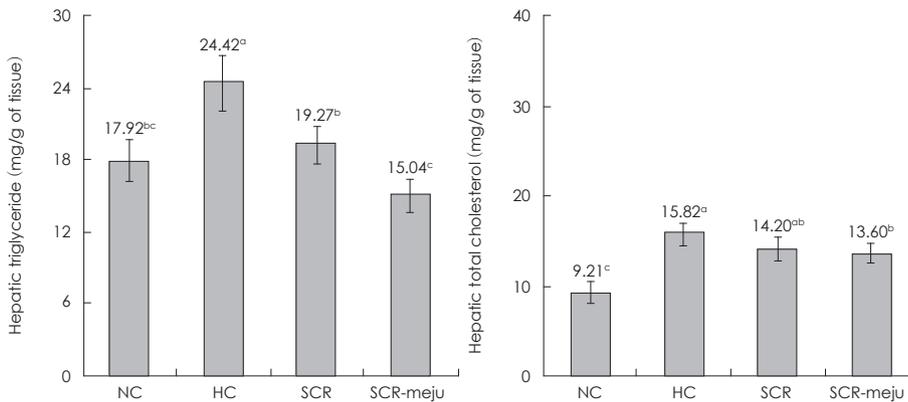


Fig. 4. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the content of hepatic TG and TC in mouse fed for 8 weeks. See Table 1. Values are mean ± standard deviations (n = 5), different superscripts in the figures indicates significant differences (p < 0.05).

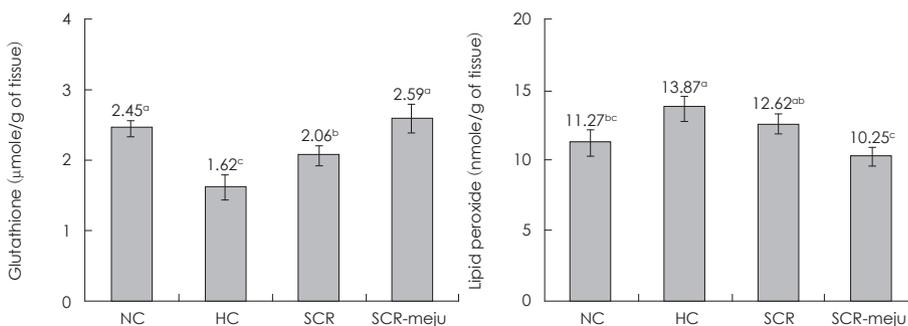


Fig. 5. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the content of glutathione total lipid peroxide in mouse fed for 8 weeks. See Table 1. Values are mean ± standard deviations (n = 5), different superscripts in the figures indicates significant differences (p < 0.05).

도를 알 수 있는 지표로 활용되고 있다.²⁹⁾

간 조직 ROS 생성계 및 소거계 효소의 활성

SCR 및 SCR-meju를 혼합한 고지방식으로 8주간 사육한 실험동물의 간 조직의 ROS 생성계 효소 (XO) 및 ROS 소거계 효소 (SOD, GPX 및 GST)의 활성 변동을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. ROS 생성계 효소의 하나인 XO의 활성은 HC군에

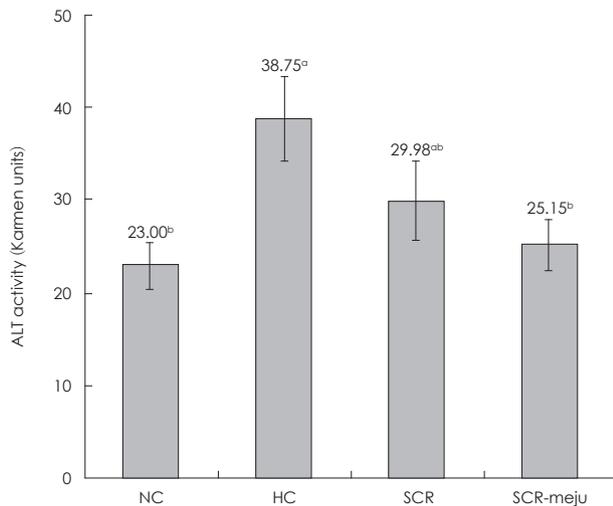


Fig. 6. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the serum ALT activity in mouse fed for 8 weeks. See Table 1. Values are mean \pm standard deviations (n = 5), different superscripts in the figures indicates significant differences (p < 0.05).

서 NC군에 비해 2.27배 증가하였으나, SCR 및 SCR-meju군의 경우 HC군에 비해 각각 20.57% 및 38.3% 현저히 감소하였다. ROS 소거계 효소인 SOD의 활성은 NC군에 비해 HC군에서 32.92% 유의하게 감소하였고, SCR 및 SCR-meju군의 경우 HC군에 비해 각각 9.74% 및 36.31%의 유의한 증가를 보였다. GPX의 활성은 HC군이 NC군에 비하여 33.6%가 감소하였으나, SCR 및 SCR-meju군의 경우 HC군에 비하여 각각 37.95% 및 60.24%의 증가를 보였으며 특히, SCR-meju군은 NC군 수준으로 회복되었다. 한편, HC군의 GST의 활성은 NC군에 비하여 37.84%가 감소하였으나, SCR 및 SCR-meju군은 HC군에 비하여 각각 34.35% 및 68.45%의 유의한 증가를 보였으며 SCR-meju군의 경우는 NC군 수준을 나타내었다.

간조직의 광학 현미경 관찰

실험식이 8주후의 실험동물의 간 조직을 검정한 결과는 Fig. 8과 같다. 정상식이군 (NC)에서는 중심정맥과 간 조직 세포, 세포막 및 동양혈관 등이 정상적인 구조를 유지하고 있다. 그러나 고지방식이 대조군인 HC군에서는 거의 모든 간 조직 세포가 소지방구의 축적에 의해 확장되어 동양혈관이 폐쇄된 상태이며, 염증성 세포들이 부분적으로 침윤되어 있는 간 조직 손상이 나타났다 (arrow). SCR을 혼합한 고지방식이군에서는 중심정맥주위의 세포들 일부는 정상적으로 회복되는 현상이 관찰되나 간 소엽의 간세포삭과 간 조직 세포 내에 소지

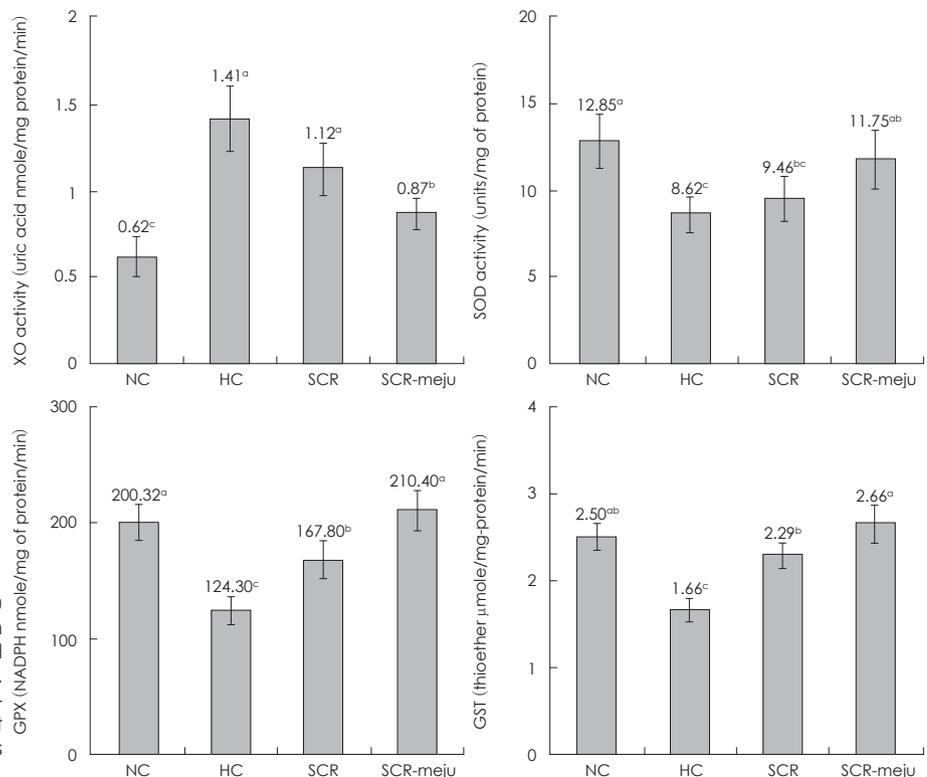


Fig. 7. Effects of SCR and SCR-meju supplemented high fat diets on the activities of XO, SOD, GPX and GST in liver of mouse fed for 8 weeks. See Table 1. Values are mean \pm standard deviations (n = 5), different superscripts in the figures indicates significant differences (p < 0.05).

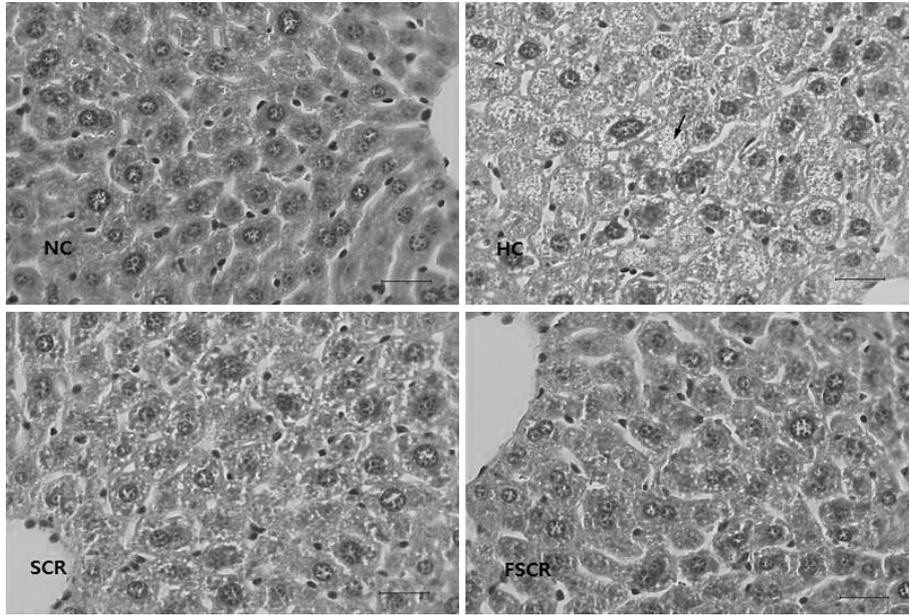


Fig. 8. Light microscopic photographs of liver tissue (bar: 25 μ m) of mouse fed with experimental diets for 8 weeks (HE stain). The hepatocytes in HC group are distorted by accumulation of multiple fat droplets and sinusoids are occluded (arrow).

방구가 상당히 많이 관찰된다. 그러나 SCR-meju를 혼합한 고지방식이군은 고지방식이로 손상된 동양혈관이나 염증성 세포들이 관찰되지 않으며 거의 정상수준으로 회복되는 것으로 보인다.

이상의 결과, *A. oryzae*로 발효시킨 SCR-meju는 고지방식이에 의한 비정상적인 생리상태 하에서 체중감소효과와 더불어 GSH의 함량과 항산화 효소들의 활성을 증가시켜 ROS에 의해 야기될 수 있는 조직의 산화적 손상을 감소시킴으로서 간 손상 예방 또는 경감효과를 나타내는 것으로 생각된다.

고 찰

본 연구에서는 한국의 전통 메주 미생물로 알려져 있는 *A. oryzae*를 이용하여 제조한 비지 메주 (SCR-meju)의 항비만 효과를 검증하기 위하여, 고지방 식이에 첨가하여 실험동물에 투여 하였을 때의 체중, 혈액 및 간 조직 지질의 함량변동과 간 조직 ROS 생성계 및 소거계 효소의 활성을 조사하였다. 체중 증가율과 부고환 주변 지방조직의 함량은 SCR에서보다 SCR-meju군에서 고지방식이 대조군인 HC군에 비해 더욱 많이 감소하였다. 혈청 TG, TC 및 LDL-C의 함량 또한 HC군에 비해 SCR 및 SCR-meju군에서 감소하였으며, HDL-C의 함량은 SCR-meju군에서 현저히 증가하였다. 그리고 간 조직 TG 함량은 혈청 TG의 경우와 유사하였으며, TC의 함량은 SCR 및 SCR-meju군이 HC군에 비하여 그리고 SCR군에 에 비하여 SCR-meju군에서 감소율이 높은 경향을 나타내었다. 간 조직 GSH의 함량은 NC군에 비하여 HC군에서 감소하였으나 SCR 및 SCR-meju군은 모두 HC군에 비하여 유의하게 증가하였

다. LPO (TBARS)의 함량은 HC군에 비해 SCR 및 SCR-meju군 모두에서 감소하였으며, 혈청 ALT 활성 또한 HC군에 비해 SCR 및 SCR-meju군에서 감소하였다. 혈청 ALT는 간장과 심장에 다량 분포하며, 아미노산의 생합성에 관여하는 효소로 약물이나 스트레스 등으로 간 조직이 손상을 받게 되면 그 활성이 증가하게 됨으로 간 손상의 지표로 활용되고 있다. 비만이 되면 간장에 지방이 축적되고 지방과산화물의 생성으로 활성산소종이 생성되며 이로 인하여 간 조직이 손상되면서 이들 효소의 활성이 증가한다. 또한 간염이나 고혈당상태에서도 이들 효소의 활성이 증가하며, 간의 상대적 중량도 증가하는 것으로 보고되고 있다.²⁵⁾ 중성지방과 혈중 cholesterol의 대부분은 lipoprotein의 형태로 LDL을 형성하며 동맥경화증 발병과 비례관계에 있다.³⁸⁾ 간은 콜레스테롤 합성의 주요 장기로 유리형 콜레스테롤 또는 ester형 콜레스테롤로서 지단백에 함유되어 순환계로 분비됨으로써 혈액 중의 콜레스테롤 농도를 조절하는 역할을 한다.³⁹⁾ 한편, 간으로 재 흡수된 콜레스테롤은 담즙산으로 산화되어 소장으로부터 분비되고, 식이로부터 섭취된 콜레스테롤 및 지질과 결합하여 재 흡수되는 과정을 거쳐 다시 간으로 회수되는 장간순환 (entro-hepatic circulation) 과정을 통하여 체내 콜레스테롤 함량이 조절된다. 본 실험의 고지방식이군에서 간의 콜레스테롤 농도가 유의적으로 증가한 것은 고지방 식이가 혈중 중성지질을 상승시켜 간에서 VLDL의 생성을 증가시키고, 이로부터 전환된 LDL이 증가함으로써 이를 간에서 제거하는 과정에서 간 조직의 콜레스테롤 농도가 높아진 것으로 사료된다. 따라서 SCR-meju군에서 고지방식이에도 불구하고 체중의 증가가 일어나지 않는 현상은 비지에 함유된 식이섬유와 발효를 통하여 새로이 생성된 성분들에 의해

여 혈청과 간 조직의 지질대사를 원활하게 하며 특히 중성지방의 함량을 감소시키는 효과가 컸기 때문이라 생각된다.

또한, ROS 생성계 효소의 하나인 XO는 체내에서 XOR (xanthine oxidoreductase)로 존재하는 비특이적인 효소로 정상적인 생리 상태에서는 NAD^+ 를 전자수용체로 이용하는 dehydrogenase (D type enzyme)로 작용하나 병리적인 상태에서는 분자상의 산소를 전자수용체로 이용하는 XO (xanthine oxidase: O type enzyme)로 작용하여 superoxide 및 과산화수소와 같은 ROS를 생성한다.⁴⁰⁾ 본 연구 결과 XO의 활성은 HC군에서 현저히 증가하였으나 SCR 및 SCR-meju군 모두에서 감소하였다. 이와는 반대로 ROS 소거계 효소인 SOD, GPX 및 GST 활성 모두 정도의 차이는 있으나 HC군에 비하여 SCR 및 SCR-meju군에서 증가하였으며 특히 SCR-meju군에서 현저하였다. SOD는 ROS 생성계에 의하여 생성된 superoxide를 반응성이 보다 낮은 hydrogen peroxide로의 전환에 관여하는 항산화 효소로 알려져 있으며, GPX는 GSH를 이용하여 hydrogen peroxide뿐만 아니라 ROS에 의해 생성된 LPO를 무독화 시키는 효소로 고지방식이하에서는 그 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾ 한편, GST는 selenium 비의존성 항산화 효소로 환원형 GSH를 이용하여 lipid hydroperoxide를 대응하는 lipid alcohol로 환원시킬 뿐만 아니라 환원형 GSH의 포함반응에 관여하는 해독효소로 고지방식이에 의한 비만상태 하에서는 그 활성이 크게 감소한다.²⁴⁾ GST는 체내에서 phase I 반응에 의해 생성된 electrophilic compounds를 GSH와 포함시켜 무독화시키는 phase II 반응에 관여할 뿐만 아니라 항산화활성도 가지는 효소로 HC군에서 감소된 활성이 SCR-meju군에서 증가하는 것은 발효과정에서 생성된 새로운 성분에 의해 나타난 결과로 생각되나, 어떤 성분에 의해 이러한 작용이 나타나는지는 현재의 실험결과만으로는 확인할 수 없으며 이에 대한 계속적인 연구 검토가 필요하다.

요약 및 결론

*A. oryzae*를 비지에 발효시켜 비지 메주를 제조하여 고지방식이 마우스의 체중과 지질개선효과를 조사한 결과를 통하여 비지 및 비지메주 첨가식은 고지방 식이로 인한 체중증가와 복부지방의 축적을 억제할 수 있는 항비만 효과와 더불어 혈액 및 간 조직 지방의 함량을 저하시켜 고지혈증으로 인해 야기될 수 있는 심혈관계 질환을 예방할 수 있을 것으로 생각되며 또한, ROS 생성계의 효소의 활성억제와 ROS 소거계 활성증가를 유도함으로써 비만상태에서 나타날 수 있는 과잉의 ROS에 의한 간 조직 손상을 예방 혹은 경감시켜줄 수 있을 것으로 생각되며, 이들 결과는 기능성 식품 개발의 기초자료로 활용할 수

있을 것이다.

Literature cited

- 1) Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635-643
- 2) Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 2007; 356(3): 213-215
- 3) Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(3 Suppl): 563S-572S
- 4) Ferraro KF, Su YP, Gretebeck RJ, Black DR, Badylak SF. Body mass index and disability in adulthood: a 20-year panel study. *Am J Public Health* 2002; 92(5): 834-840
- 5) Mukherjee M. Human digestive and metabolic lipases - a brief review. *J Mol Catal B Enzym* 2003; 22(5-6): 369-376
- 6) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114(12): 1752-1761
- 7) Drew BS, Dixon AF, Dixon JB. Obesity management: update on orlistat. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(6): 817-821
- 8) Poston WS, Foreyt JP. Sibutramine and the management of obesity. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(3): 633-642
- 9) Karamadoukis L, Shivashankar GH, Ludeman L, Williams AJ. An unusual complication of treatment with orlistat. *Clin Nephrol* 2009; 71(4): 430-432
- 10) Slovacek L, Pavlik V, Slovackova B. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18(8): e43-e44
- 11) Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today* 2007; 12(19-20): 879-889
- 12) Halford JC, Blundell JE. Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res* 2000; 54: 25-58
- 13) Redinger RN. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res* 2009; 154(2): 52-60
- 14) Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740(2): 266-286
- 15) Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 2006; 53(6): 482-491
- 16) Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 2008; 19(11): 717-726
- 17) Yang JY, Lee SJ, Park HW, Cha YS. Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. *J Med Food* 2006; 9(4): 459-467
- 18) Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M. Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(2): 352-359
- 19) Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4): C807-C813
- 20) Shi M, Yang Y, Guan D, Zhang Y, Zhang Z. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydr Polym* 2012; 89(4): 1268-1276
- 21) Choi MS, Kim JI, Jeong JB, Lee S, Jeong JN, Jeong HJ, Seo EW,

- Kim TY, Kwon OJ, Lim JH. Suppressive effects of by-product extracts from soybean on adipocyte differentiation and expression of obesity-related genes in 3T3-L1 adipocytes. *J Life Sci* 2011; 21(3): 358-367
- 22) Matsumoto K, Watanabe Y, Yokoyama S. Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(3): 720-727
- 23) Choi UK, Kim MH, Lee NH, Jeong YS, Hwang YH. Changes in quality characteristics of Meju made with germinated soybean during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 2007; 39(3): 304-308
- 24) Lee J, Jeong JY, Cho YS, Park SK, Kim K, Kim MJ, Lee MK. Effect of young *Phragmites communis* leaves powder on lipid metabolism and erythrocyte antioxidant enzyme activities in high-fat diet fed mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010; 39(5): 677-683
- 25) Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957; 28(1): 56-63
- 26) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502
- 27) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509
- 28) Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1): 70-77
- 29) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358
- 30) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244(14): 3855-3863
- 31) Martin JP Jr, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 1987; 255(2): 329-336
- 32) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130-7139
- 33) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-169
- 34) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-275
- 35) Wu YG, Xia LL, Lin H, Zhou D, Qian H, Lin ST. Prevention of early liver injury by breviscapine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med* 2007; 73(5): 433-438
- 36) Ha SK, Chae C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. *Exp Anim* 2010; 59(5): 595-604
- 37) Wang RS, Nakajima T, Honma T. Different change patterns of the isozymes of cytochrome P450 and glutathione S-transferases in chemically induced liver damage in rat. *Ind Health* 1999; 37(4): 440-448
- 38) Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med* 1981; 141(9): 1128-1131
- 39) Yao T, Sato M, Kobayashi Y, Wasa T. Amperometric assays of total and free cholesterols in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase reactors and peroxidase electrode in a flow injection system. *Anal Biochem* 1985; 149(2): 387-391
- 40) Hashim MS, Lincy S, Remya V, Teena M, Anila L. Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chem* 2005; 92(4): 653-660
- 41) Lee SI, Kim JW, Lee YK, Yang SH, Lee IA, Suh JW, Kim SD. Protective effect of *Monascus pilosus* mycelial extract on hepatic damage in high-fat diet induced-obese rats. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2011; 54(3): 206-213