

# 청국장의 암세포주에 대한 세포독성 및 에스트로겐 유사활성 검증

이동근 · 이상현\*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

## Verification of Cytotoxicity Against Cancer Cell Line and Estrogen-like Activity of Cheongkukjang

Dong Geun Lee, Sang Hyeon Lee\*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University

In order to evaluate the cancer preventive and estrogenic compounds in soybean and Cheongkukjang, MTT assay and *in vitro* test system for the evaluation of the estrogenic activity were applied. The fractions from the ethanol extract of soybean and Cheongkukjang were prepared by the systematic extraction procedure with the solvents such as hexane, ethyl ether, butanol, methanol and H<sub>2</sub>O. Ethyl ether fractions of soybean and Cheongkukjang showed the highest cytotoxicity against U937 cell line in dose dependent manner, and ethyl ether fraction of Cheongkukjang showed two times higher cytotoxicity than that of soybean. Aqueous fraction of soybean and ethyl ether fraction of Cheongkukjang revealed the highest estrogenic activity and activity was higher in the fractions of Cheongkukjang than soybean. Mixture of *Spirulina* and Cheongkukjang showed synergistic activity. These observations concerning cancer preventive and estrogen effects of soybean and Cheongkukjang suggest that these materials possess useful ingredients for the prevention of cancer and/or postmenopausal disorder.

Key words : Cheongkukjang, MTT, estrogenic activity, soybean, U937

### 서 론

암은 우리나라를 포함하여 전세계적으로 증가하고 있지만 아직 발암 기전이 명확하게 규명되어 있지 않으며, 현대 의학으로도 암에 대한 확실한 치료방법을 제시하지 못하고 있어 조기 발견이 어려울 경우 완치율이 낮은 질병이다<sup>1,2)</sup>. 또한 기존 항암제의 부작용과 적용의 한계성 때문에 천연물, 전통 식품 및 한약재를 대상으로 새로운 항암 성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다<sup>3,4)</sup>. 한편 노화에 따른 에스트로겐 부족현상으로 골다공증<sup>5)</sup>, 유방암과 전립선 질환<sup>6)</sup> 및 알츠하이머 질병<sup>7)</sup>이 생기는 것으로 보고되고 있으며 육상식물에서 많이 보고되고 있는 phytoestrogen은 여성호르몬의 일종인 에스트로겐과 구조와 기능이 유사하여<sup>7,8)</sup> 폐경기 이후의 여성에 있어 에스트로겐 분비감소에 따라 발생하는 갱년기장애를 완화시킬 수 있는 에스트로겐 대체 효과가 있

는 것으로 밝혀져 현재 많은 연구가 수행되고 있다<sup>7,9)</sup>.

콩은 '밭에서 나는 고기'라고 불릴 만큼 양질의 단백질과 지방질이 풍부하며 칼로리가 낮아 비만에 효과적인 것으로 알려져 있다. 한의학에서도 콩의 약용적 효능이 언급되어 있는데, 동의보감에 콩의 효능으로 보신, 위장의 열 제거, 장 통증 및 열독과 복부팽만 제거, 부종과 종기의 제거 등에 효과가 있으며 대소변의 배설과 배속과 장의 탁기를 다스리며, 곡물의 소화를 돕고 종기를 제거하는데 효과가 있다고 기재되어 있다<sup>10)</sup>. 특히 검은 콩은 예로부터 해독효과가 높아서 여러 가지 독성 증상을 해독하는 약으로 사용되었는데 실제로 한약 처방 중에는 '감두탕(甘豆湯)'이라 하여 감초와 검은 콩으로만 구성된 처방이 있다<sup>10)</sup>. 또한 콩에 함유되어 있는 이소플라본은 골다공증을 예방하고 항암성분으로 작용하며, 특히, 노란 콩에 이소플라본이 많이 함유되어 있어 콩을 많이 먹는 민족은 대장암, 위암, 자궁암, 유방암 등에 걸리는 빈도가 낮다고 알려져 있다. 콩발효식품은 원료인 콩속에 포함된 생리활성 물질 이외에 발효과정에서 polyglutamate 등의 새로운 생리활성물질이 생성되는데 이는 항산화작용<sup>11)</sup>, 혈압강

\* 교신저자 : 이상현, 부산시 사상구 패법동 산1-1, 신라대학교 의생명과학대학

· E-mail : slee@silla.ac.kr, · Tel : 051-999-5624

· 접수 : 2006/11/01 · 수정 : 2007/01/15 · 채택 : 2007/02/07

하와 정상 작용<sup>12)</sup> 등의 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 콩 발효식품에는 우리나라의 청국장과 된장, 일본의 미소와 낫또, 인도네시아의 탐페 등이 있다.

한편 최근에 각광받고 있는 스피루리나(*Spirulina* spp.)는 녹조류에 속하는 미세조류(microalgae)로서 항산화 작용과 장내 유산균 생장을 돕는 생리활성 물질을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>13,14)</sup>. 또한 이 등<sup>15)</sup>은 스피루리나가 에스트로겐 유사 활성을 가지고 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 청국장과 원료물질인 콩을 대상으로 여성 갱년기장애 극복에 활용될 수 있는 에스트로겐 유사활성과 인체 혈구암세포주에 대한 세포독성을 측정하고 비교한 결과를 보고하고자 한다. 그리고 스피루리나(*Spirulina* spp.) 첨가에 의한 청국장의 에스트로겐 활성 증진 여부를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 청국장 발효

청국장 발효를 위하여 백태 콩을 이용하였다. 흐르는 수돗물에 콩 1 kg을 씻고 4°C 물에 24시간 담근 후 20분간 물을 제거하였다. 콩에 함유된 고초균 등의 멸균을 위하여 121°C, 40분 멸균을 2번 수행하였다. 실온으로 냉각된 콩에 미리 배양한 *Bacillus subtilis* LSH805 배양액을 3%(v/w)로 균일하게 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 본발효 후에 4°C에서 하룻밤동안 후발효를 행하였다.

### 2. 원료 콩 및 청국장 추출분획물의 제조

콩 및 청국장 추출분획물 제조과정 모식도는 Fig. 1과 같다. 발효 후 건조시킨 청국장 분말 및 원료 콩 분말에 10배량 (w/v)의 80% ethanol로 60°C에서 8시간 동안 추출을 행하였으며, 추출액은 Whatman NO.3 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 2회 여과하여 이를 에탄올 추출시료로 하였다. 에탄올 추출시료를 다시 hexane, ethyl ether, butanol, methanol, H<sub>2</sub>O 등을 이용하여 Fig. 1에 나타난 방법으로 분획을 행한 후, 농축하여 각각의 용매에 대한 분획물을 제조하였다.

### 3. MTT 분석법을 통한 암세포에 대한 세포독성 측정

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA) 제품을 이용하였다. 인체 혈구암세포주 U937을 10%의 fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)이 포함된 RPMI 1640 배지 (BioWhittaker)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양한 후 96-well plate (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA)에 세포현탁액을 180 µl씩 분주하고, 청국장 및 콩 분획물들을 phosphate-buffered saline (PBS, BioWhittaker)로 희석하여 20 µl씩 첨가하였다 (최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 청국장 및 콩 분획물 대신 동량의 PBS (BioWhittaker)를 첨가하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 추가 배양한 후 배양액을 제거하고 MTT (5 mg/mL in PBS)용액을 100 µl씩 가하고 37°C, 5%

CO<sub>2</sub>에서 4시간 동안 배양하였다. 이 후 DMSO 100 µl를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 10~15분 동안 반응시킨 후 발색정도를 Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 측정하였다.

### 4. 에스트로겐 유사활성 측정

본 연구진에 의해 제작된 에스트로겐 유사물질 검정용 세포주 MCF7/ pDsCAT-ERE119-Ad2MLP<sup>16)</sup>를 10% dextran-coated charcoal stripped FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 세포가 약 90%의 confluence가 되었을 때, 각 시료, 표준물질인 17β-estradiol (RBI, Natick, MA, USA), 혹은 에탄올을 각각 5 µl 씩 처리하였다. 각 시료의 추출물은 최종 농도 500, 50, 5 µg/ml 농도로 사용하였고, 표준물질은 최종농도 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> M로 사용하였다. 그 후, 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하였고, -20°C에서 5분, 37°C에서 5분 동안의 처리를 4회 반복하여 cell을 lysis한 후, 14,000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 활성을 측정하였다. CAT 활성은 CAT-ELISA Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 manual에 따라 수행하였다. CAT 활성 결과는 BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용해 측정된 각 추출물의 단백질함량으로 표준화시켰다. 스피루리나(*Spirulina* spp.) 추출물 첨가에 의한 청국장 제품의 에스트로겐 활성 효과를 검증하기 위하여, 청국장과 스피루리나의 에탄올 추출시료 일부를 동결건조시켜 분말화 한 후, 이를 1:1로 혼합한 시료와 각각의 시료를 대상으로 에스트로겐 유사활성 측정하고 비교하는 실험을 수행하였다.

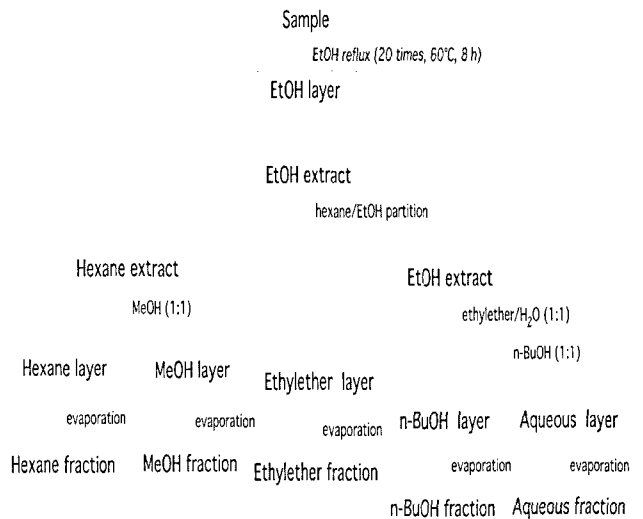


Fig. 1. Schematic diagram of sample extraction and fractionation from soybean and Cheongkukjang. Eight hundred grams of dry soybean and Cheongkukjang were extracted with 80% ethanol (60°C, 8h) and followed the systematic extraction procedure with the solvents such as hexane, ethyl ether, butanol, methanol and H<sub>2</sub>O.

## 결과 및 고찰

### 1. 콩과 청국장의 각 용매별 분획물 제조

콩과 청국장 시료 800 g에 대한 에탄올 추출을 행하고 이를 Rotary evaporator (EYELA Inc., Tokyo, Japan)로 농축을 행하여 최종적으로 3 L의 에탄올 추출시료를 얻었다. 이를 hexane, ethyl ether, butanol, methanol, H<sub>2</sub>O 등을 이용하여 분획을 행하고 (Fig. 1), 얻어진 분획물들을 Centrifugal evaporator (Sovall RC 5C+, Asheville, NC, USA)를 이용하여 용매 제거 및 농축을 행한 결과 각각의 분획물 시료들을 10 mg 전후의 비슷한 양으로 얻을 수 있었다.

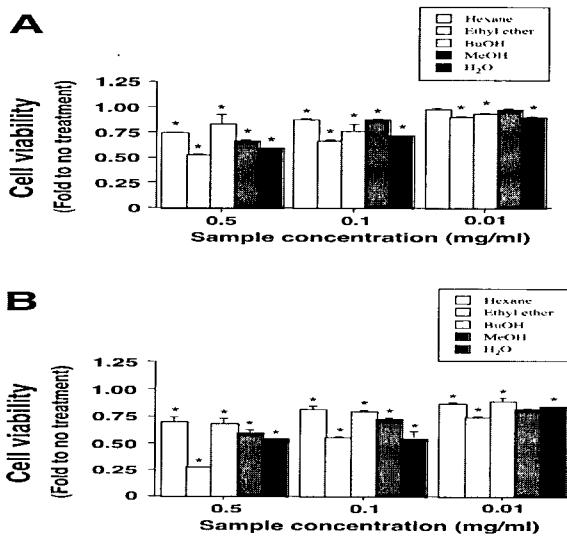


Fig. 2. Cell viability of human leukemia cell line U937 to the fractions of soybean (A) and Cheongkukjang (B) extracts. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

### 2. 함암효과

암세포에 대한 세포독성 파악을 위한 MTT 분석법은 살아있는 세포내 미토콘드리아에 함유된 dehydrogenase가 MTT를 formazan으로 변화시키는 것을 이용하는 방법으로 생성된 formazan의 양은 세포수에 비례하는 것으로 알려져 있다. 즉 발색된 formazan의 양으로 세포생존을 추정하며 측정세포에 대한 독성을 조사하는 방법으로, 실험 조작의 간편성과 우수한 재현성으로 세포독성여부 대량검색이나 초기 검색단계에 적당한 방법으로 많이 이용되고 있다<sup>17</sup>. 콩과 청국장의 각 용매별 분획물의 인체 혈구암세포주(U937)에 대한 생육저해 활성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 콩(Fig. 2A)과 청국장(Fig. 2B)의 추출분획 모두 수증과 ethyl ether 층에서 비교적 높은 생육저해 활성을 보였다. 특히 ethyl ether 층의 경우 콩에 비해 청국장의 생육저해 활성이 약 2배 증진된 것으로 나타났다. 이러한 활성들은 농도의 존성을 나타냈다. 곽 등<sup>18</sup>은 청국장의 butanol 분획이 높은 생육저해 활성을 나타내는 것을 보고하였는데 본 연구에서는 butanol 분획에 비해 ethyl ether 층의 생육저해 활성이 높게 나왔

다. 곽 등<sup>18</sup>은 ethyl ether 층을 이용하지 않았으며 또한 가정집의 청국장을 시료로 이용하였는데 반하여 본 연구에서는 청국장 발효능이 우수한 균주를 이용해 생산된 청국장을 이용하였으므로 이러한 결과들은 시료의 차이에 기인한 것으로 예상할 수 있다. 본 연구에서 콩에 비해서 향상된 청국장의 생육저해 활성의 정확한 기작을 알 수는 없었지만, 곽 등<sup>18</sup>은 aglycone isoflavone의 증가에 의한 것으로 예상하였고 청국장의 생리활성 증진은 발효과정에 참가하는 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등 세균에 의한 것으로 알려져 있다<sup>19,20</sup>. 따라서 청국장 발효과정에서 원료 콩의 유효성분이 변화하여 암세포에 대한 높은 생육저해 활성을 나타내는 물질로 변화한 것으로 예상할 수 있었으며, 청국장을 이용하여 암 예방 효과를 갖는 건강기능성 제품의 생산도 기대할 수 있다.

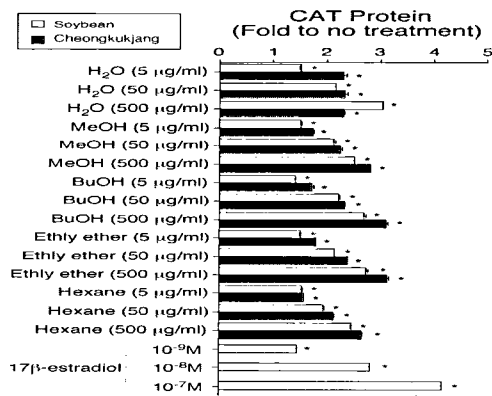


Fig. 3. Estrogenic activity of soybean and Cheongkukjang extracts. MCF7/pDsCAT-ERE119-Ad2MFP cells were treated with the fractions of soybean and Cheongkukjang, 17 $\beta$ -estradiol, or ethanol as indicated concentrations. CAT activity was measured using the CAT-ELISA kit and normalized to protein concentration of cell lysates. Means $\pm$ SEM for three plates are shown as multiples of ethanol treatment results. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with the ethanol treatment. This experiment was repeated at least twice and has yielded reproducible results.

### 3. 에스트로겐 유사활성 검증

콩과 청국장의 각 용매별 분획물의 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 에탄올만을 처리한 세포의 활성을 1로 간주하고 여러 농도의 콩 및 청국장 추출시료를 처리한 세포 혹은 표준물질인 17 $\beta$ -estradiol을 처리한 세포의 에스트로겐 유사활성을 비교하였다. 모든 분획물 층에서 에스트로겐 유사활성을 보였으며 대체로 분획물 농도에 비례하는 활성경향이 나타났다. 콩 추출물의 활성은 수증이 가장 높았으며 다음이 ethyl ether, butanol 층이었다. 청국장 추출물의 활성은 ethyl ether 층에서 가장 높았으며 butanol과 methanol 층이 다음 순서였다. 청국장이 콩에 비해 전체적인 활성이 증가하는 것으로 나타나 청국장의 유용성을 확인할 수 있었다. 콩의 수증과 청국장의 ethyl ether 층은 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 2배의 활성을 보였고, 500  $\mu$ g/ml의 농도에서는 표준물질인 17 $\beta$ -estradiol의 농도 10<sup>-8</sup> M 보다도 높은 활성을 보였으며 이는 대조군에 비해 3배 높은 활성이었다(Fig. 3). 가장 높은 활성을 보이는 층이 콩의 수증에서 청국장의 ethyl ether 층으로의 변화는 발효과정에서의 변화로 생각된다. 또

한 이러한 변화는 hexane 분획물의 경우에도 관찰되었다.

이러한 결과로 콩과 청국장 추출시료에는 에스트로젠 유사 활성을 나타내는 에스트로젠 유사물질이 포함되어 있음이 확인되었다. 식물에 존재하는 에스트로젠 유사활성을 가진 물질인 파이토에스트로젠은 폐경기 이후의 여성들의 갱년기 장애극복에 도움이 될 수 있다는 연구결과가 보고되어 있다<sup>6)</sup>. 본 연구진은 한약재로 사용되는 길경, 황기, 감초 등의 에스트로젠 유사활성을 측정하여 보고하였고<sup>9)</sup> 사포닌 함유 한약재들이 에스트로젠 유사효과를 나타낸다는 보고도 있는데<sup>21)</sup> 본 연구에서는 음식물로 섭취하는 콩과 청국장에 포함되어 있을 것으로 기대되는 파이토에스트로젠에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다.

스피루리나(*Spirulina spp.*)와 청국장의 에탄올 추출시료 대상으로 에스트로젠 유사활성을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 청국장과 스피루리나 추출시료는 500 µg/ml의 농도에서 서로 유사한 에스트로젠 유사활성을 보였다. 한편, 청국장과 스피루리나(*Spirulina spp.*) 추출시료를 1:1로 혼합한 시료는 각각 시료들이 보이는 활성보다 더 높은 에스트로젠 유사활성을 보여 혼합에 의한 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 스피루리나(*Spirulina spp.*)는 조류(algae)로서 생물학적 활성을 갖는 물질을 다량 함유하고 있어 기능성 식품으로 활용되고 있으며<sup>13,19)</sup> 하 등<sup>15)</sup>은 스피루리나의 에스트로젠 유사활성을 보고하였는데 본 연구에서는 청국장과 함께 사용하면 활성의 상승작용이 있는 것으로 나타났다. 따라서 스피루리나(*Spirulina spp.*) 첨가에 의해 콩에 부족한 미네랄 성분들의 공급과 함께 에스트로젠 유사활성의 증진으로 의약품 및 건강보조식품으로서의 가치가 높아질 것으로 생각되어진다.

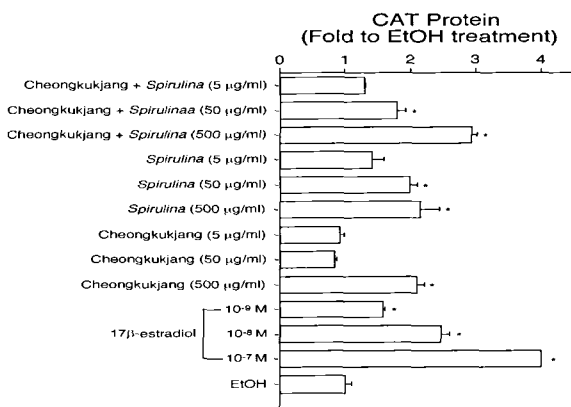
본 연구는 식품에서 갱년기 장애를 겪는 폐경기 여성들을 위한 치료제 개발의 소재를 확보하는데 참고가 될 수 있는 자료를 제공함으로써 한약재 자료와 더불어 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 청국장을 이용한 소재는 인위적인 호르몬 복용에 대한 거부감을 줄일 수 있는 좋은 소재로 받아들여질 수 있을 것으로 기대하고 있다.

## 결론

콩과 청국장의 암세포에 대한 세포독성 및 에스트로젠 유사 활성을 검출하기 위하여 MTT 법과 에스트로젠 유사활성 측정을 위해 개발된 in vitro test system을 이용하여 측정하였다. 에탄올 추출물의 각 용매별 분획물의 활성을 비교하면 암세포에 대한 세포독성의 경우는 콩과 청국장 모두 ethyl ether층에서 가장 높았으며 수층에서 다음으로 높은 활성을 나타냈고 청국장이 콩에 비해 2배 높은 세포독성을 나타냈다. 한편 에스트로젠 유사활성은 콩의 경우 수층에서, 청국장의 경우 ethyl ether 층에서 가장 높은 활성을 보였으며 청국장이 콩에 비해 전체적인 활성이 증가하였다. 그리고 스피루리나(*Spirulina spp.*)와 청국장은 에스트로젠 유사활성을 상승시키는 작용을 보였다. 이러한 결과로 콩과 청국장에 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 성분과 에스트로젠 유사물질이 포함되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 콩 발효식품인 청국장을 이용하여 폐경기 이후 여성들에 대한 암 예방 및 에스트로젠 대체 작용을 가지는 소재개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Shin, H.K. The development of functional food and research trend. Food Sci. and Industry 30:2-13, 1997.
2. Murakami, A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention, Biosci. Biotech. Biochem. 60:1-8, 1996.
3. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. Vegetabl, fruit and cancer II mechanism. Cancer Causes Control. 2:427-442, 1991.
4. Newmark, H.L. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. Adv. Exp. Med. Biol. 401:25-34, 1996.
5. Albertazzi, J.B. and Purdie, D.W. The nature and utility of the phytoestrogens: A review of the evidence. Maturitas. 42:173-185, 2002.
6. Lissin, L.W. and Cooke, J.P. Phytoestrogens and cardiovascular health. J. Am. Col. Cardiol. 35:1403-1420, 2000.
7. Simpkins, J.W., Green, P.S., Gridley, K.E., Singh, M., de Fiebre, N.C. and Rajakumar, G. Role of estrogen replacementtherapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. Am. J. Med. 103:19S-25S, 1997.
8. Song, Y.S., Jin, C., Jung, K.J. and Park, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. J. Ethnopharmacol. 82:89-95, 2002.
9. Lee, S.H. Verification of estrogenic activities in ethanol extracts of oriental herbal medicines using in vitro detection system. Kor. J. Orient. Physiol. Pathol. 17:1054-1058, 2003.
10. [http://www.dsoh.co.kr/sub/i\\_01/sub\\_i\\_03.asp?page\\_code=3&num=40&page=1&idx=8](http://www.dsoh.co.kr/sub/i_01/sub_i_03.asp?page_code=3&num=40&page=1&idx=8)
11. Ryu, S.H. Studies on antioxidative effects and antioxidative



**Fig. 4. Estrogenic activity of spirulina and Cheongkukjang extracts.** MCF7/pDsCAT-ERE119-Ad2MLP cells were treated with the ethanol extracts of spirulina and Cheongkukjang, 17β-estradiol, or ethanol as indicated concentrations. CAT activity was measured using the CAT-ELISA kit and normalized to protein concentration of cell lysates. Means±SEM for three plates are shown as multiples of ethanol treatment results. \*ANOVA p<0.0001 compared with the ethanol treatment. This experiment was repeated at least twice and has yielded reproducible results.

- components of soybean and Chongkukjang. Doctorial thesis, Inje University of Korea, 23:122, 2002.
12. Shon, M.Y., Kwon, S.H., Park, S.K. and Choi, J.S. Changes in chemical components of black bean Chungkukjang added with kiwi and radish during fermentation. Kor. J. Posthavest Sci. Technol. 8:449-455, 2001.
  13. Parada, J.L., de Caire, C.Z., de Mule, M.C.Z. and de Cano, M.M.S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. Int. J. Food Microbiol. 45:225-228, 1998.
  14. Kim, W.Y. and Park, J.Y. The effect of Spirulina on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in korean elderlies. Kor. J. Nutri. 36:287-297, 2003.
  15. Ha, J.M. and Lee, S.H. Verification of estrogenic activity in ethanol extracts of marine organisms using *in vitro* test system. J. Life. Sci. 13:799-804, 2003.
  16. Kim, O.S., Choi, J.H., Soung, Y.H., Lee, S.H., Lee, J.H., Ha, J.M., Ha, B.J., Heo, M.-S. and Lee, S.H. Establishment of *in vitro* test system for the evaluation of the estrogenic activities of natural products. Arch. Pharm. Res. 27:906-911, 2004.
  17. Michael, C.A., Dominic, A.S. and Anue, M. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Res. 48:589-595, 1998.
  18. Kwak, C.S., Kim, M.Y., Kim, S.A. and Lee, M.S. Cytotoxicity on human cancer cells and antitumorigenesis of chungkookjang, a fermented soybean product, in DMBA-treated rats. Kor. J. Nutri. 39:347-356, 2006.
  19. Kwon, H.Y., Kim, Y.S., Kwon, G.S. and Sohn, H.Y. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from chungkook-jang and fermentaional characteristics of JB-1. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 32:291-296, 2004.
  20. Wang, C.T., Ji, B.P., Li, B., Nout, R., Li, P.L., Ji, H. and Chen, L.F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33:750-758, 2006.
  21. Saeki, T and Nikaido, T. Evaluations of saponin properties of HPLC analysis of *Platycodon grandiflorum* A. DC. Yakugaku Zasshi. 123:431-441, 2003.