

폐경기 동물 모델을 대상으로 효모 가수분해물의 안전성 평가 연구

정 은 영

전주대학교 가정교육과

Safety Study of Yeast Hydrolysate on a Postmenopausal Animal Model

Eun-Young Jung

Department of Home Economic Education, Jeonju University

ABSTRACT The objective of this study was to obtain data on safety-in-use of yeast hydrolysate with a molecular weight of 10~30 kDa as a dietary supplement by assessing its subacute oral toxicity in ovariectomized rats. Yeast hydrolysate did not produce mortality or significant changes in general behavior or gross appearance of internal organs of rats. There were no significant differences in organ weights between control and yeast hydrolysate groups. Hematological analysis and blood chemistry revealed no toxic effects of yeast hydrolysate. Neither gross abnormalities nor histopathological changes were observed. These results show that yeast hydrolysate possesses very low toxicity as indicated in a postmenopausal animal model.

Key words: yeast hydrolysate, safety study, toxicity, postmenopause

서 론

의학 기술의 발달과 경제 수준의 향상으로 노인 인구의 비율이 전 세계적으로 매년 2.4%씩 증가함에 따라 여러 연구 분야에서 노인의 건강과 삶의 질 향상을 위한 다양한 연구와 노력이 기울이고 있다(1). 노화 현상의 하나로 알려진 여성의 갱년기는 노인 수명이 연장됨으로 인해 일생의 1/3 이상을 차지한다는 점이 문제점으로 대두하고 있다(1-3). 갱년기의 시작은 폐경과 더불어 시작되고 폐경기 여성은 호르몬 불균형과 칼슘 결핍 및 체내 산화적 스트레스 증가로 여러 질병의 위험에 처해 있으며, 폐경기의 에스트로겐 변화로 관상동맥 질환, 골다공증, 알츠하이머 등 질환의 발병률은 급증하게 된다(4). 폐경기 여성을 대상으로 한 호르몬 치료 요법은 관련 질환을 감소시키는 것으로 알려졌으나 유방암 및 자궁암의 발생 위험도를 높이는 것으로 보고되고 있다(4,5).

이러한 노인 인구의 증가로 심각성과 관심이 고조되는 가운데 기초 과학과 생명 공학의 급속한 발달로 생체 활성 효능 검증이 쉬워짐에 따라 인체에 무해하면서 갱년기 질환을 완화할 수 있는 기능성 식품 소재에 관한 연구가 요구되고 있다(5). 이에 천연물로부터 새로운 활성을 갖는 물질을 찾아내고 천연물로부터 얻은 독특한 성분에 대한 화학적인 처

치를 통해 개선된 효능과 안전성을 갖는 식품 소재를 개발하며, 가능성 있는 소재에 대한 과학적인 효능을 검증하는 연구가 필요하다.

갱년기 질환 예방에 대해 최근 개발된 단백질 분해 효소로 처리하여 얻은 효모 가수분해물의 관심이 새로이 주목받고 있다. 효모 가수분해물의 원료가 되는 효모는 단세포 진균류로 가장 상업적으로 많이 이용되는 미생물 중의 하나이며, 천연 소재로 안전성이 입증되어 있어 양조, 와인 제조, 제빵 산업 등에서 유용하게 사용하고 있다(6,7). 효모는 전통적으로 양조와 제빵 산업에서 발효 특성으로 사용하였지만, 생리학적 활성에 대한 어려움 때문에 생화학적 의학 분야에서는 통상적 용도로의 사용이 제한되었다. 이에 2000년도부터 효모 가수분해물의 호르몬 관련 연구를 시발점으로 하여 효모 가수분해물에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 최근 효모 가수분해물의 항스트레스 효과(6-9)와 생식 기능 향상(10)이 증명되고 뇌에서의 신경전달물질 발현을 통해 호르몬의 조절로 생리활성 기능을 나타냄이 보고되면서(11, 12) 갱년기 증상 완화 효과에 대한 가능성이 제기되었다. 특히 장골 길이 성장 등 골대사와 관련된 연구(13)는 갱년기의 대표적인 증상인 골다공증과 관련해 효모 가수분해물의 영향에 대한 가설 설정을 가능케 하였으며, 또한 동맥경화와 지질 대사의 지표로 작용하는 혈중 지질 성분을 연구한 결과(14) 효모 가수분해물이 혈중 지질 성분을 개선하는 것으로 나타나 효모 가수분해물의 갱년기 완화 효과에 대한 가능성은 더욱 고조되었다.

본 연구는 갱년기 완화 소재로서의 효모 가수분해물 소재 개발을 위해 난소절제로 갱년기 증상을 유도한 흰쥐를 대상

으로 갱년기 증상 완화 연구에 앞서 갱년기 모델에 대한 효모 가수분해물 경구 섭취의 안전성을 평가하고자 시행되었다. 이에 난소절제로 폐경을 유도한 흰쥐를 대상으로 하여 효모 가수분해물의 아급성 섭취에 따른 임상 증상과 장기 및 혈액학적 분석, 주요 장기의 병리학적 관찰을 중심으로 안전성 평가를 통해 폐경기 대상자에 대한 효모 가수분해물 섭취의 안전성을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

효모 가수분해물

효모 가수분해물 제조에 사용된 효소 및 효소의 조건은 이전 연구를 기반으로 해서 제조되었다(15). 효모(*Saccharomyces cerevisiae* IFO 2346)를 당밀 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.2%, K_2HPO_4 0.03%, NaCl 0.1%를 함유한 배지에서 30°C로 3일간 배양하였다. 배양하여 얻은 균체를 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁한 후, 효모 현탁액 8%를 48시간 동안 5가지 효소를 이용하여 48시간 동안 가수분해를 시행하였다: Neutrased (endoprotease from *Bacillus amyloliquefaciens*), Alcalase (endoprotease from *B. licheniformis*), Protamex (*Bacillus* protease complex), Flavourzyme (endoprotease and exopeptidase from *Aspergillus oryzae*), ficin (endoprotease from *Figlatax*). 효소와 효모 기질의 비율(E/S)은 1:100으로 하여 50°C에서 가수분해를 하였다(pH 8.0 for Alcalase, pH 7.0 for Neutrased, Protamex, Flavourzyme, ficin). 가수분해물을 원심분리 하여 상정액 회수 후 Hydrosart membrane 10 kDa과 30 kDa(Sartorius AG, Goettingen, Germany)을 이용하여 10~30 kDa 분자량을 가지고 있는 펩타이드를 분리 및 건조한 것을 효모 가수분해물 시료로 사용하였다.

실험동물

실험동물은 Nara Biotech.(Seoul, Korea)에서 공급받은 10주령의 암컷 Sprague-Dawley(SD) 계열 흰쥐(250±5 g)를 이용하였다. 실험동물은 사육케이지(42×28 cm)를 이용해 실험실 온도 22~24°C, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/ 12시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 고려대학교 동물실에서 1주간 예비 사육 후 난소절제 수술을 시행하였으며 8주간 본 연구를 위해 사육되었다. 본 실험은 고려대학교 실험동물윤리위원회의 승인 하에

실험을 실시하였다(KUIACUC-20091014-1).

난소절제 기술

난소절제 기술은 Ketamine(Keara 100 mg/kg)과 2% Xylazine(Rumpun 0.15 mL/kg)으로 전신 마취하고 통법에 따라 제모 및 시술전 무균 처리(10% povidone-iodine scrub followed by 70% alcohol wipe)를 시행하였다. 실험동물 복측 중앙에 1 cm 가량의 절개를 시행한 후 봉합용 실로 난소를 결찰한 다음 난소절제를 양측으로 시행하였다. 난소절제 후 각 장기를 복강 내로 재위치시킨 다음 봉합용 실로 층별 봉합을 하고 수술 후 감염 방지를 위해 항생제(cafazolin 50 mg/kg)를 근육에 주사하였으며, 시술 1주일 후 회복 과정을 거쳐 정상 회복된 쥐에 한하여 실험하였다.

실험군

실험군은 무작위 추출법에 따라 군당 7마리씩 5개군으로 분류하였다(Table 1). 실험 대조군은 실험군과 같은 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복 시술만 한 sham 대조군(Sham), 난소절제 시술한 뒤 시료를 처치하지 않은 무처치 음성 대조군(OVX)과 복합 에스트로젠(Premina, Dalim Biotech., Seoul, Korea)을 처치한 양성 대조군(OVX+E)이 있으며 아급성 시료 처치군은 효모 가수분해물 용량에 따라 2개군으로 분류하였다(OVX+YS1, OVX+YS2). 양성 대조군(OVX+E)은 복합 에스트로젠을 0.005%, 시료 처치군은 효모 가수분해물 0.5%(OVX+YS1)와 1%(OVX+YS2) 비율로 각각 음용수에 혼합하여 8주간 공급하였으며 식이는 AIN-93 기본 식이(Samyang Co., Seoul, Korea)를 이용하였고 음용수와 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험에서 기본 식이로 사용된 AIN-93은 탄수화물 60%, 지질 3.5%, 단백질 23%, 수분 8%를 포함하고 있으며 본 실험의 시료로 사용된 효모 가수분해물은 탄수화물 23.6%, 지질 0.3%, 단백질 68.3%, 수분 4.7%를 포함하고 있고 무기질은 3.1%였으며, 단백질의 아미노산 성분으로는 glutamic acid와 aspartic acid가 각각 14.2, 5.0 mol%로 가장 많은 부분을 차지하는 주요 아미노산이었다.

임상 증상 및 생화학적 관찰

임상 증상은 투여 기간 동안 일반 증상 관찰법에 따라 이틀에 한 번 같은 시간대에 임상 증상 및 비정상적인 이상 행동을 관찰하였으며 매주 체중 및 사료 음수 섭취량을 측정하였다. 실험 종료 시점에서 12시간 절식시킨 실험동물은

Table 1. Experimental groups in this study

Experimental groups (7 rats/group)		Operation	Treatment
Control groups	Sham: sham-control	Mock-operation	Non-treatment
	OVX: negative control	Ovariectomy	Non-treatment
	OVX+E: positive control	Ovariectomy	Conjugated estrogen 0.005%
Treatment groups	OVX+YS1	Ovariectomy	Yeast hydrolysate 0.5%
	OVX+YS2	Ovariectomy	Yeast hydrolysate 1%

ethyl ether로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 혈구 분석과 혈장 분석을 위해 각각 heparin으로 처리되지 않은 시험관과 처리된 시험관에 넣어 4°C, 3,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 혈구 분석은 혈구분석기 Hematological Analyzer KN-21N(Sysmex Co., Seoul, Korea)을, 혈장 분석은 FUJI DRI-CHEM 3500 Analyzer(Fuji Photo Film Co., Osaka, Japan)를 통해 각각 이루어졌다.

병리학적 관찰

혈액 채취 후 실험동물은 체중 g당 0.1 mg의 pentobarbital을 복강 내 주사하여 마취시킨 다음 심장을 통하여 관류고정을 하였다. 먼저 heparin을 10 U/mL로 혼합한 생리식염수를 150 mL 관류시켜 혈액을 제거하고 즉시 고정액을 관류시켰다. 고정액은 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 관류시킨 후 간, 신장, 비장, 자궁 및 뇌를 적출하였다. 적출한 장기는 무게를 측정하였으며 측정된 장기 무게는 체중 100 g에 대해 상대적인 무게로 나타내었다. 적출된 주요 장기는 4% paraformaldehyde-lysine-periodate 고정액에 넣고 4°C에서 1시간 동안 고정을 실시한 후 0.1 M sodium phosphate buffer(PB)로 4°C에서 1시간 수세하고 이어서 20% phosphate buffered sucrose 용액에 12시간 또는 48시간 담가 동결보호 하였다. 동결보호가 끝난 조직은 동결박절기를 이용하여 약 40 µm 두께의 관상 연속 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 시행하였다. 통상적인 방법에 따라 에탄올과 xylene 탈수와 투명화를 거친 후 커버 글라스를 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계 분석

실험 결과는 SPSS 12.0(SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 평균의 표준오차(standard error of the mean, SEM)를 산출하였다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증을 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

결과 및 고찰

효모 가수분해물 연속투여에 의한 사망 동물은 없었으며 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았고 눈으로 관찰되는 병변 역시 없었다. 또한 모든 실험동물에서 보행 장애, 움크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등 효모 가수분해물 처치가 원인으로 의심되는 어떠한 임상 증상이나 비정상적인 이상 행동으로 인한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

난소절제 8주 후 난소절제로 인한 체중 증가가 유의하게 나타났으며($P<0.05$) 에스트로겐 처치는 sham 대조군과 유

사한 수준으로 체중 증가 억제 효과를 보였으나 효모 가수분해물 처치는 체중에 대한 영향을 미치지 않았으며 난소절제 대조군과 유사한 수준의 체중 증가를 나타내었다(Fig. 1). 8주 동안 효모 가수분해물 처치에 따른 폐경 유도 쥐의 식이 섭취는 Fig. 2에 나타내었다. 난소절제 이후 초기 4주 동안 난소절제 대조군은 sham 대조군보다 식이 섭취가 유의하게 많은 것으로 나타났으나($P<0.05$), 5주 이후에는 두 군 간의 섭취가 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 초기

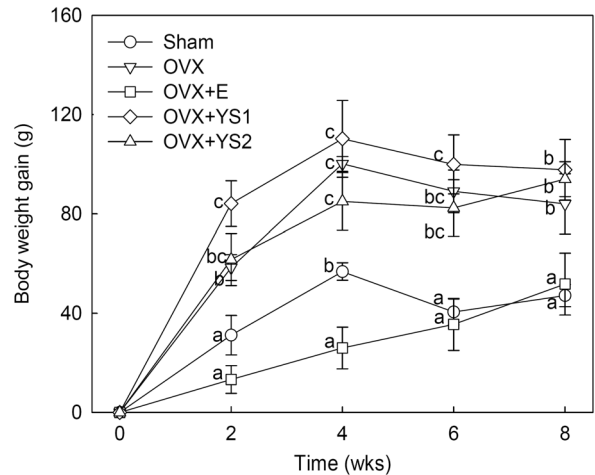


Fig. 1. Body weight gain of ovariectomized rats treated with yeast hydrolysate for 8 weeks. Values are mean±SEM for 7 rats. Means with different letters (a-c) in the same time are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range tests. Sham, sham operation; OVX, non-treatment after ovariectomy; OVX+E, conjugated estrogen treatment after ovariectomy; OVX+YS1, yeast hydrolysate 0.5% treatment after ovariectomy; OVX+YS2, yeast hydrolysate 1% treatment after ovariectomy.

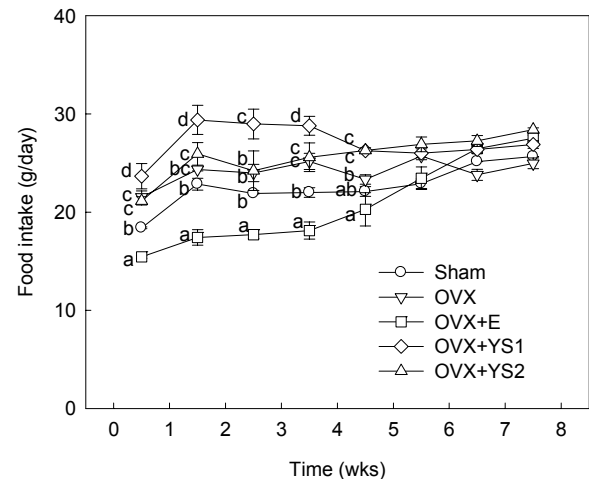


Fig. 2. Daily food intake of ovariectomized rats treated with yeast hydrolysate for 8 weeks. Values are mean±SEM for 7 rats. Means with different letters (a-d) in the same time are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range tests. Sham, sham operation; OVX, non-treatment after ovariectomy; OVX+E, conjugated estrogen treatment after ovariectomy; OVX+YS1, yeast hydrolysate 0.5% treatment after ovariectomy; OVX+YS2, yeast hydrolysate 1% treatment after ovariectomy.

의 복합 에스트로겐 처치는 식이 섭취의 감소를 유도하였으나($P<0.05$) 내성이 생긴 5주 이후부터는 식이 섭취가 증가하여 난소절제 대조군과 유사한 정도의 식이 섭취를 나타내었다. 효모 가수분해물은 오히려 처치 초기에는 식이 섭취 증가를 나타내었으나 역시 5주 이후에는 식이 섭취 증가 정도가 감소하여 난소절제 대조군과 유사한 정도를 나타내었다. 결과적으로 효모 가수분해물 투여에 의한 체중 및 식이 섭취의 변화는 관찰되지 않았다. 음용수 섭취는 8주 동안 그룹별로 적게는 40.23 mL/d(sham 대조군)에서 많게는 42.18 mL/d(난소절제 대조군)로 그룹 간 유의한 차이를 나타내지 않았으며 또한 쥐 희생 전 개별 사육을 통해 관찰한 결과 쥐별로의 음용수 섭취에 대한 유의적 차이를 보이지 않았다(데이터 미제시).

8주 동안 효모 가수분해물 처치에 따른 폐경 유도 쥐의 혈액 성분 변화를 관찰한 결과 혈구 성분은 정상범위 안에서 모든 군이 유의적 차이가 나타나지 않았으며(데이터 미제시), Fig. 3에 나타낸 것 같이 혈장 성분 중 일부 지질 성분의 약간의 변화가 관찰되었다. 즉, 난소절제 시술로 인해 총콜레스테롤(Fig. 3A)과 저밀도 콜레스테롤(Fig. 3D)이 약간 상승하였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었으며, 복합 에스트로겐의 처치로 인해 난소절제 시술로 상승한 수준이 감소한 경향을 나타냈으나 역시 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 효모 가수분해물 처치는 난소절제 대조군보다 총콜레스테롤과 저밀도 콜레스테롤이 약간 높은 경향을 나타

내었으며 동시에 유익한 콜레스테롤인 고밀도 콜레스테롤(Fig. 3C)도 함께 약간 높은 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 결론적으로 혈액 성분의 분석 결과 효모 가수분해물 처치는 난소절제 대조군과 비교해 혈액 생화학적 지표에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

장기의 육안적 소견으로 나타나는 병변과 이상은 없었다. Fig. 4에 나타낸 것과 같이 간, 신장, 비장 무게는 실험군 간에 통계적으로 유의하지 않은 것으로 보아 난소절제 시술은 간, 신장, 비장 등 장기에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4A~C). 또한 복합 에스트로겐과 효모 가수분해물 처치에 따른 차이도 나타나지 않아 처치로 인해 장기 무게의 변화가 야기되지 않는 것으로 생각되었다. 그러나 자궁은 난소절제로 인해 그 무게의 유의한 감소를 나타내었으며(Sham: 0.27 g/100 g BW vs. OVX: 0.12 g/100 g BW, $P<0.05$) 복합 에스트로겐과 효모 가수분해물 처치로 인해 자궁 무게가 약간 상승하였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다(Fig. 4D). 조직의 병리학적 관찰 결과 난소절제와 복합 에스트로겐 및 효모 가수분해물에 의한 조직학적 양성 병변은 관찰되지 않았다. Fig. 5는 H&E 염색을 한 뇌 조직을 광학현미경으로 400배 비율로 관찰한 것으로 모든 군의 조직에서는 병리학적으로 인정할 만한 괴사 및 탈락이 관찰되지 않았다.

효모 가수분해물은 천연 고단백질 식품 소재인 효모를 이용하여 효소 처리를 통해 단백질의 질을 향상하고 일부 정제

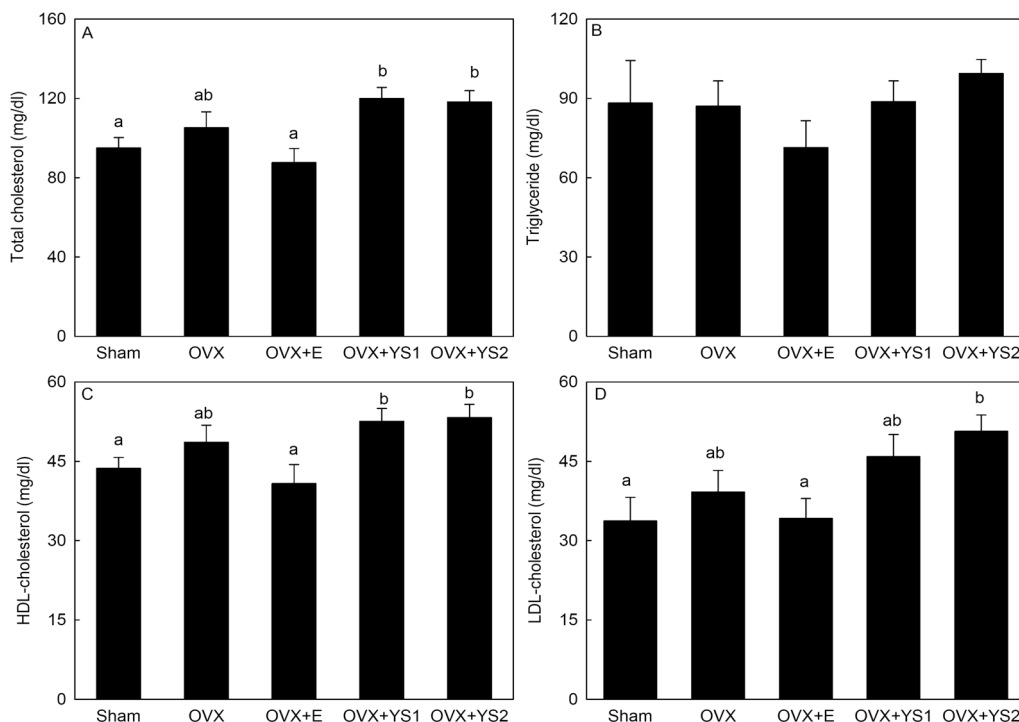


Fig. 3. Plasma lipid levels of ovariectomized rats treated with yeast hydrolysate for 8 weeks. Values are mean \pm SEM for 7 rats. Means with different letters (a,b) above bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range tests. Sham, sham operation; OVX, non-treatment after ovariectomy; OVX+E, conjugated estrogen treatment after ovariectomy; OVX+YS1, yeast hydrolysate 0.5% treatment after ovariectomy; OVX+YS2, yeast hydrolysate 1% treatment after ovariectomy.

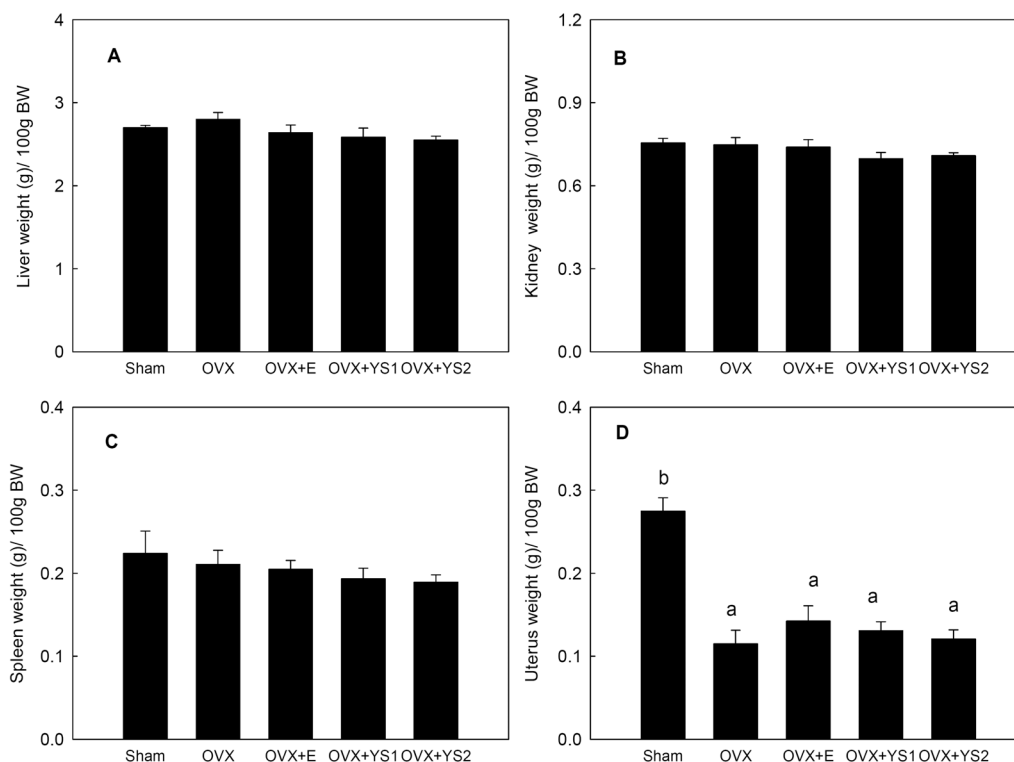


Fig. 4. Relative internal organ weights rats treated with yeast hydrolysate for 8 weeks. Values are mean±SEM for 7 rats. Means with different letters (a,b) above bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range tests. Sham, sham operation; OVX, non-treatment after ovariectomy; OVX+E, conjugated estrogen treatment after ovariectomy; OVX+YS1, yeast hydrolysate 0.5% treatment after ovariectomy; OVX+YS2, yeast hydrolysate 1% treatment after ovariectomy.

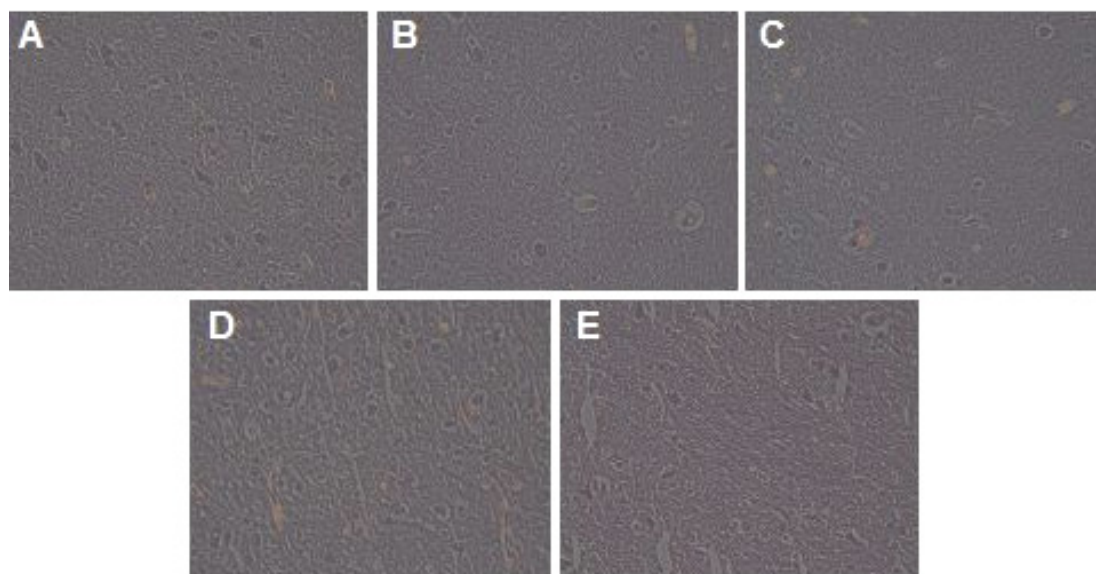


Fig. 5. Representative microscopic findings in brain of ovariectomized rats treated with yeast hydrolysate for 8 weeks (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 400$). (A) Sham, sham operation; (B) OVX, non-treatment after ovariectomy; (C) OVX+E, conjugated estrogen treatment after ovariectomy; (D) OVX+YS1, yeast hydrolysate 0.5% treatment after ovariectomy; (E) OVX+YS2, yeast hydrolysate 1% treatment after ovariectomy.

과정을 통해 기능성을 갖는 식품 소재로 개발하고자 마련되었다. 효모 가수분해물은 식품첨가물공전에 등재된 소재로 이미 안전성이 확보되어 있으며 기존의 연구를 통해 *in vitro*

와 *in vivo*에서 안전성이 이미 검토되었다(16,17). 효모 추출물의 가수분해 산물은 분자량 분획별로 다양한 생리활성을 나타내는데 분획별로 효모 가수분해물의 분자량에 따른

급성 및 아급성 안전성 평가가 시행되었다(16-18). 이 실험의 결과 효모 가수분해물은 분자량 분획과 관계없이 모두 수컷과 암컷 성인 쥐를 대상으로 5,000 mg/kg을 경구로 단회 투여 후 14일간 관찰하는 급성 실험에서 사망 또는 이상 소견이 나타나지 않았다(16). OECD 가이드라인에 따라 효모 가수분해물을 1,000 mg/kg씩 14일간 연속 투여한 후 14일간 관찰하는 아급성 실험을 한 결과 효모 가수분해물은 혈액의 혈구 및 혈액의 생화학적 지표들에서도 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 간, 신장, 비장, 폐, 심장, 생식기의 상대적인 무게에도 차이를 나타내지 않았다. 또한 간과 신장 조직을 염색하여 조직 병리학적 분석을 한 결과 병적 소견을 보이는 이상 증상을 나타내지 않았다(16,17). 이러한 안전성 평가에 대한 Lillie 등(18)의 보고를 기반으로 볼 때 실험실 내 제한된 환경에서의 형성된 조건 내에서 효모 가수분해물은 안전하고 병적 독성이 없다고 결론 내릴 수 있다(19). 그러나 효모 가수분해물은 병적 증상이 없는 건강한 대상에서 안전성이 확보되어 있으나 기능성 소재로 개발하면서 구체화한 병적 취약대상자에 대한 병적 상태에 따른 안전성의 재확보가 필요하다. 이에 본 연구는 갱년기 완화 소재로서의 효모 가수분해물 소재 개발을 위해 난소절제로 갱년기 증상을 유도한 흰쥐를 대상으로 갱년기 증상 완화 연구에 앞서 갱년기 모델에 대한 효모 가수분해물 경구 섭취의 안전성을 평가하고자 시행되었으며 실시 결과 모든 측정지표에서 독성 증상을 나타내지 않았고 안전한 것으로 나타났다. 따라서 갱년기 모델 쥐에서도 효모 가수분해물의 아급성 경구 투여는 독성을 일으키지 않으며 안전한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 갱년기 완화 연구에 앞서 처치 대상자를 폐경 이후로 한정하여 난소절제를 통해 폐경을 유도한 암컷 흰쥐를 대상으로 효모 가수분해물의 안전성 평가를 하였다. 효모 가수분해물을 8주 동안 아급성 처치한 후 관찰한 결과 갱년기 모델 쥐에서도 건강한 쥐와 마찬가지로 이전 연구와 같이 효모 가수분해물은 체중, 식이 섭취를 비롯해 임상적 소견과 혈액 생화학적 분석, 그리고 장기 무게 및 조직 병리학적 분석에서 안전한 것으로 평가되었다. 이에 효모 가수분해물은 폐경기 동물 모델에서 아급성으로 처치 시 독성을 일으키지 않는 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Imthurn B, Maurer-Major E. 2000. Climacteric syndrome. *Ther Umsch* 57: 595-599.
2. Delcominette S, Gaspard U. 2008. Female sexual dysfunction and postmenopausal androgen therapy. *Rev Med Liege* 63: 23-30.
3. Polisseni AF, de Araújo DA, Polisseni F, Mourão Junior CA, Polisseni J, Fernandes ES, Guerra Mde O. 2009. Depression and anxiety in menopausal women: associated factors. *Rev Bras Ginecol Obstet* 31: 28-34.
4. Albertazzi P. 2007. Non-estrogenic approaches for the treatment of climacteric symptoms. *Climacteric* 10(Suppl 2): 115-120.
5. Harrison RF, Bonnar J. 1980. Clinical uses of estrogens. *Pharmacol Ther* 11: 451-467.
6. Suh HJ, Kim SY, Chang UJ, Kim JM. 2008. Anti-stress effects of chewing gum prepared with yeast hydrolysate. *Eur Food Res Technol* 227: 331-336.
7. Yu KW, Oh SH, Choi YS, Hwang WJ, Suh HJ. 2001. The reduction effect of yeast hydrolysate SCP-20 premenstrual syndrome. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1000-1003.
8. Yu KW, Kim JM, Oh SH, Chang UJ, Suh HJ. 2002. Physiological effects of yeast hydrolysate SCP-20. *Food Res Int* 35: 879-884.
9. Kim JM, Lee SW, Kim KM, Chang UJ, Song JC, Suh HJ. 2003. Anti-stress effect and functionality of yeast hydrolysate SCP-20. *Eur Food Res Technol* 217: 168-172.
10. Hong JW, Kim IH, Yoo SH, Lee HS, Kwon OS, Min BJ, Lee WB, Shon KS, Kim JM. 2004. The effects of yeast hydrolysate SCP-20 on reproductive function in male mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 451-454.
11. Jung EY, Kang DH, Suh HJ, Chang UJ. 2009. Effects of yeast hydrolysate on neuropeptide Y (NPY) and tryptophan hydroxylase (TPH) immunoreactivity in rats. *Phytother Res* 23: 619-623.
12. Jung EY, Suh HJ, Kim SY, Hong YS, Kim MJ, Chang UJ. 2008. Appetite suppressive effects of yeast hydrolysate on nitric oxide synthase (NOS) expression and vasoactive intestinal peptide (VIP) immunoreactivity in hypothalamus. *Phytother Res* 22: 1417-1422.
13. Kim JM, Kim SY, Jung EY, Bae SH, Suh HJ. 2009. Yeast hydrolysate induces longitudinal bone growth and growth hormone release in rats. *Phytother Res* 23: 731-736.
14. Kim KM, Chang UJ, Kang DH, Kim JM, Choi YM, Suh HJ. 2004. Yeast hydrolysate reduces body fat of dietary obese rats. *Phytother Res* 18: 950-953.
15. Jung EY, Lee HS, Choi JW, Ra KS, Kim MR, Suh HJ. 2011. Glucose tolerance and antioxidant activity of spent brewer's yeast hydrolysate with a high content of Cyclo-His-Pro (CHP). *J Food Sci* 76: C272-C278.
16. Jung EY, Lee HS, Chang UJ, Bae SH, Kwon KH, Suh HJ. 2010. Acute and subacute toxicity of yeast hydrolysate from *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem Toxicol* 48: 1677-1681.
17. Jung EY, Park SS, Kim JH, Chang UJ, Bae SH, Choi JW, Suh HJ. 2011. Safety study of yeast hydrolysate with below 10 kDa molecular weight in animal models. *J Health Sci* 57: 532-539.
18. Lillie LE, Temple NJ, Florence LZ. 1996. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum Exp Toxicol* 15: 612-616.
19. Jung EY, Lee HS, Seo HC, Suh HJ. 2010. Safety evaluation of yeast hydrolysate (Notress). *J Microb Biochem Technol* 2: 58-63.