

청국장 및 녹차, 쑥이 첨가된 청국장의 항혈전 활성

이경애¹ · 장정옥² · 윤혜경² · 김무성^{3*}

¹한국식품연구원, ²경원대학교 식품영양학과, ³(주)마크로케어

청국장 및 기능성분이 첨가된 청국장 추출물이 가지는 항혈전 관련 활성을 검정하였다. 흰 콩(*Glycine max*)과 검은 쥐눈이콩(*Rhynchosia nulubilis*) 청국장과 여기에 각각 녹차, 쑥이 첨가되어 제조된 청국장에 대해 *in vitro*에서 항산화 및 아질산염 소거 활성, 혈소판응집 억제 및 fibrin 분해활성을 측정하였고, 가장 우수한 시료에 대해 *in vivo*에서 혈전억제능을 시험하였다. 항산화 활성에 있어서 흰 콩이나 검은 콩 청국장 모두 녹차의 첨가량 증가에 따라 활성이 급격히 증가하는 경향을 나타내었으며, 쑥을 첨가한 경우에는 활성 증가율이 녹차에 비해 다소 적었다. 아질산염 소거 작용은 모든 시료에서 90% 이상 매우 높았으나 기능성분 첨가에 의한 영향은 크지 않았다. 혈소판응집 억제 활성을 조사한 결과, 녹차나 쑥을 첨가함에 따라 그 활성이 상당히 증가되었다. 특히 흰 콩이나 검은 콩 청국장 모두 0.3~1.0%의 낮은 농도에서도 녹차나 쑥의 첨가량 증가에 따라 활성이 크게 증가하였다. 청국장 추출물의 fibrin 분해활성을 plasmin unit으로 환산한 결과, 흰 콩보다는 검은 콩 청국장의 혈전용해 활성이 약간 좋았으나, 기능성분 첨가에 따른 활성증가는 크지 않았으며 특히 쑥을 첨가한 경우는 저농도에서 활성이 상당히 감소하다가 농도상승에 따라 활성이 약간 회복되는 현상을 나타내었다. 시험군중 *in vitro* 혈전억제 작용이 가장 우수한 녹차 첨가 검은 콩 청국장에 대해 마우스를 이용한 *in vivo* 혈전유발 억제능을 조사하여, 녹차를 첨가하지 않은 것에 비해 1.5배 정도 억제능이 높음을 확인하였다. 청국장은 혈전용해뿐 아니라 혈소판응집 억제 및 항산화 기능 등에 의해서 혈전을 억제하는 것으로 나타났으며, 녹차나 쑥 등 기능성분 첨가시 소량 첨가에도 매우 향상된 혈전억제 활성을 가진 청국장 제조가 가능함을 확인하였다.

Key words □ antiplatelet, antithrombotic, cheongkookjang, fibrinolytic, green tea, mugwort

혈전은 심장 또는 혈관내에 굳어진 혈액 덩어리로서 혈액순환 장애, 혈류속도감소, 혈액점도 이상 등의 현상을 나타내어 조직, 기관의 각종 병리 증상을 야기한다(4). 혈전증을 완화시키기 위하여 streptokinase, urokinase 및 tPA (tissue plasminogen activator) 등의 혈전용해제가 개발되었으며, 혈전 용해 이외에 혈관내 혈소판의 응집을 조절하는 것이 중요하다는 연구에 따라 aspirin 등이 혈전억제제로서 사용되고 있다(13, 15, 17). 심혈관 질환 (ischemic cardiovascular disorders)의 예방에 가장 널리 사용되는 아스피린은 경우에 따라 위장관내에 출혈 등의 부작용이 있어, 최근에는 다양한 천연물질로부터 보다 안전하고 저렴한 혈전억제 또는 혈전예방 성분을 개발하고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다(2, 7, 19)

청국장은 삶은 콩을 *Bacillus* 속 균주에 의해 자연 발효시킨 전통 식품으로 독특한 풍미와 함께 고혈압 및 혈중지질개선, 혈전용해, 항암작용 등 콩 자체가 가지는 기능과 발효에 의해 생성된 성분이 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 최근에는 발효 장류의 기능을 더욱 다양화시키고자 콩의 종류에 따라 제조하여 사용하거나 천연물 중 기능성을 가지는 원료를 혼합하여 발효시킴으로써 풍미나 기능을 강화하는 연구가 진행되고 있

다(3, 5, 6). 청국장이 가지는 기능 중 혈전억제 기능은 혈전용해 효소에 의한 것이 주로 연구되어 있으나 본 연구에서는 혈전용해 이외에 청국장의 혈소판응집 억제기능 등 혈전억제와 관련된 기능을 확인하고, 또한 식품으로서 손쉽게 사용할 수 있으면서 혈압강하, 항산화 등(3, 12, 18) 혈액 개선과 관련된 기능이 있는 것으로 알려진 녹차와 쑥을 첨가한 경우의 혈전억제 활성을 조사하여 청국장의 다양한 적용을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 균주

청국장 제조를 위한 흰 콩(대두, *Glycine max*, 2004년 산)과 검은색 쥐눈이콩(서목태, *Rhynchosia nulubilis*, 2004년 산)은 강원도 영월에서 2005년 3월에 구입하였다. 청국장 제조시 첨가한 쑥(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)은 국내산을 경동시장에서, 녹차(*Camellia sinensis*)는 (주)태평양 제품을 구입하여 사용하였다. 청국장 제조를 위한 종균으로는 (주)마크로케어에서 *Bacillus subtilis* C3 균주를 분양받아 사용하였다. 종균 배양은 탈지대두분 3%, glucose 0.5%의 배지(pH 6.0)에서 37°C, 24시간 배양하여 사용하였다.

청국장 제조 및 추출

콩(흰 콩 또는 검은색 쥐눈이콩) 500 g을 수세하여 불순물을

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-214-3655, Fax: 82-43-214-3658
E-mail: mosukim@naver.com

제거하고, 3배(1,500 ml) 정도의 물을 가하여 12시간 동안 상온에서 불렸다. 이를 110°C에서 1시간동안 멸균한 후 50°C로 식힌 다음 미리 배양된 종균을 5×10^4 cells/g 정도가 되도록 접종하고 상업용 발효기(NUC 전자)에서 35-40°C를 유지하면서 24시간 동안 발효시켰다. 발효된 콩은 밀폐용기에 담아 24시간 동안 4°C 냉장실에서 숙성시킨 후 동결건조하여 보관하면서 사용하였다. 기능성분의 추가는, 별도로 30분 정도 110°C에서 멸균한 썬과 녹차를 건조, 분쇄하고 각각 마른 콩 대비 0, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0% 중량으로 첨가하여 발효시에 사용하였다.

각각의 건조된 청국장을 분쇄한 청국장 분말은 0.2 g/ml 농도로 증류수에 현탁시켜 80°C에서 4시간 추출한 후 원심분리(3,000 rpm, Vision scientific co. Vs-5000)하여 상등액을 회수하고 0.45 µm로 여과하여 기본 시료로 사용하였다.

총 페놀 성분(Total phenol) 함량 측정

총 페놀 함량은 AOAC 방법(8)으로 측정하였다. 추출조건에 따라 제조된 추출물을 1/25로 희석한 후, 희석액 5 ml에 folin reagent 5 ml를 가하고 5분간 정치시킨 다음 5 ml의 10% sodium carbonate 용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 다음 분광광도계(UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하고 (+)catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 페놀 성분의 함량을 구하였다.

항산화 활성 측정

항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 전자 공여능(electron donating ability, EDA)을 Blois 등(10)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시료 0.2 ml에 4×10^{-4} M DPPH 용액을 첨가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 10분 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 효과는 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도 차이를 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1-A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도(공시험)

아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거작용(nitrite scavenging effect)은 Gray와 Dugan의 방법(16)에 의하여 측정하였다. 즉 1 mM NaNO₂ 용액 1 ml에 일정농도의 추출물 시료 2 ml를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정하고 최종 부피를 10 ml로 하였다. 이 혼합액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 ml씩 취하여 2% 초산 용액 5 ml, Griess 시약 0.4 ml를 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산 양을 산출하였다. 이 때 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 ml 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였으며, 아질산염 소거작용

은 추출물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

혈소판응집 억제능 측정(in vitro)

항혈전능으로서 혈소판응집 억제효과는 Aggregometer (Chronolog, Model No. 490, Havertown, PA, USA)를 사용하여 측정하였다(11). 즉 Rat (Sprague-Dawley male, 한림실험동물)을 diethylether로 마취하여 개복한 후, 항응고제인 ACD 용액(12.5 g trisodium citrate dihydrate, 7.5 g citric acid monohydrate, 10 g glucose)을 미리 넣어놓은 syringe로 혈액:ACD 용액의 비율이 1:6 (v/v)이 되도록 채혈하여, 상온에서 1,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상층의 PRP (Platelet-rich plasma)를 취한 후에 다시 1,800 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 platelet에 washing buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% bovine serum albumin, pH 7.4)를 넣고 1,800 rpm으로 10분간 원심분리하여 분리된 washed platelet을 suspension buffer (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 16.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.1 mM α-D-Glucose, pH 7.4)에 현탁시켜 hemacytometer (Superior, Germany)로 platelet의 수를 5×10^8 /ml로 조정하였다. 준비한 platelet suspension 470 µl를 37°C로 맞춘 aggregometer의 hole에 꽂아 1,000 rpm으로 5분간 preincubation 시킨 후에 CaCl₂ 용액(최종농도 1.0 mM)을 첨가하여 2분간 반응시키고, 시료 또는 물(control)을 10 µl 첨가하여 2분 동안 반응을 시킨다음, 혈소판 응집 유도물질인 ADP (final concentration 10 µM) 용액을 넣어 7분간 반응시키면서 transmittance를 측정하였다. 시험물질의 혈소판 응집 억제율(inhibition of platelet aggregation, %)은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition of platelet aggregation}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: change in transparency of control, %

B: change in transparency of sample, %

혈전용해 작용 측정

혈전 용해 활성은 Astrup 등(9)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 우선 0.6% fibrinogen을 0.1 M borate buffer (pH 7.8)에 용해시킨 후 petri dish에 9 ml를 가하고 thrombin (Sigma, USA) 20 unit를 가하여 균일한 평판을 제조한 후 실온에서 30분 방치 후 사용하였다. 하얗게 응고가 생긴 후 효소액 50 µl를 원형 paper disk (Toyo Roshi, Japan)에 흡수시켜, 35°C에서 4시간 반응시켰다. 그리고 반응 후에 생긴 clear zone의 직경을 측정하였다. 생성된 효소의 활성은 표준 plasmin 용액 (Sigma, USA)을 0.5, 1, 2 unit/ml로 다양하게 조제하여 fibrin plate에 50 µl를 가한 후 형성된 clear zone의 직경을 측정하여 작성한 plasmin 효소 활성의 표준 곡선을 이용하여 plasmin unit로 환산하였다.

마우스에서의 *in vivo* 혈전증 억제

가장 활성이 우수한 시료에 대하여 *in vivo*에서의 혈전 유발 억제에 대한 실험을 DiMinno와 Silver의 방법(14)을 사용하여 진행하였다. 즉 미리 3시간 절식시킨 ICR 마우스에 청국장 시료용액을 경구투여하고 collagen과 epinephrin 혼합용액(650 µg collagen+65 µg epinephrin/10 ml saline/kg)을 꼬리정맥에 주사한 후 15분간 마비의 지속, 사망 또는 마비로부터의 회복여부를 관찰하였다. 시료의 농도는 기능성분 무첨가 청국장의 경우에, 사용된 mouse (20±2 g)의 50%가 생존하는 LD₅₀의 농도인 10 mg/mouse (500 mg/kg body weight)로 하였다.

통계 처리

모든 실험 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS Inc. USA) 통계 프로그램을 사용하여 분석하였으며 그 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

항산화활성 측정

흰 콩과 검은 콩으로 만든 청국장에 따른 기능의 차이와 함께 기능을 증진시킬 수 있는 성분 첨가가 미치는 영향을 조사하였다. 녹차나 쑥을 항산화, 혈액개선 등과 관련된 다양한 생리활성을 가지고 있어(12, 18) 청국장 제조에 크게 영향을 미치지 않는 농도(0.3~3.0%)로 첨가하여 발효시켰다. 기능 성분이 첨가된 청국장의 phenol 성분 함량은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 첨가전후에 약간의 차이만을 나타내었다. 제조된 청국장 종류별 열수 추출물의 항산화 활성을 전자 공여능 측정방법에 의해 조사한 결

과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 흰 콩이나 검은 콩으로 제조된 청국장 모두 발효시 녹차 또는 쑥 첨가에 따라 항산화 활성이 크게 증가하였다. 특히 0.3~1.0% 농도의 녹차 첨가량 증가에 따라 항산화 활성이 급격히 증가하는 경향을 나타내었으며, 쑥을 첨가한 경우에도 활성이 증가하였으나 그 증가율이 녹차에 비해 다소 적었다. 별도로 양성 대조군으로서 L-ascorbic acid를 1.0% 농도로 처리한 경우 항산화 활성은 약 85%를 나타내었다. 항산화 활성의 주성분으로 추정되는 phenol성 물질의 함량이 큰 차이를 보이지 않음에도 녹차 등을 첨가한 청국장의 항산화 활성이 급격히 증가한 것은 이들 기능성분에 의해 phenol성 물질의 종류 또는 발효산물 생성이 변화된 때문으로 추정되나 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 보인다.

아질산염 소거작용

일반적으로 아질산염의 소거, 특히 phenol성 물질에 의한 소거는 중성보다 사람의 위장내 pH와 같은 낮은 pH에서 아질산염 소거율이 높은 것으로 알려져 있다(1). 본 연구에서 사용한 청국장 추출물에 대하여 산성인 pH 1.2에서 아질산염 소거효과를 비교 검토한 결과, 양성 대조군으로서 L-ascorbic acid를 1.0% 농도로 처리한 경우의 소거율이 82.1%를 나타내는데 반해 검은 콩이나 흰 콩 청국장 모두 90% 이상의 매우 높은 소거율을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 항산화 활성과는 달리 녹차나 쑥을 첨가한 청국장의 경우 약간의 소거율 상승만을 나타내었다.

혈소판응집 억제능 측정(*in vitro*)

식물의 phenol성 화합물은 항산화 활성과 함께 혈소판 응집을 억제할 수 있는 것으로 보고된 바 있으며(21), 이를 근거로 제조된 청국장의 종류별 열수 추출물의 혈소판응집 억제 활성을 조

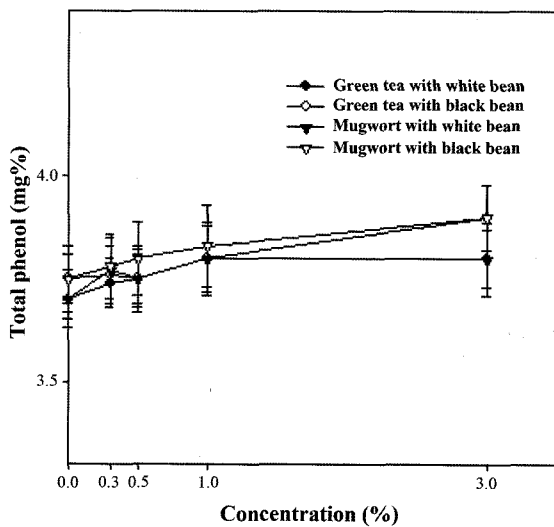


Fig. 1. Total phenol content of various cheongkookjang extracts. Total phenolic content was analyzed by AOAC official method (Folin-Denis method). Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

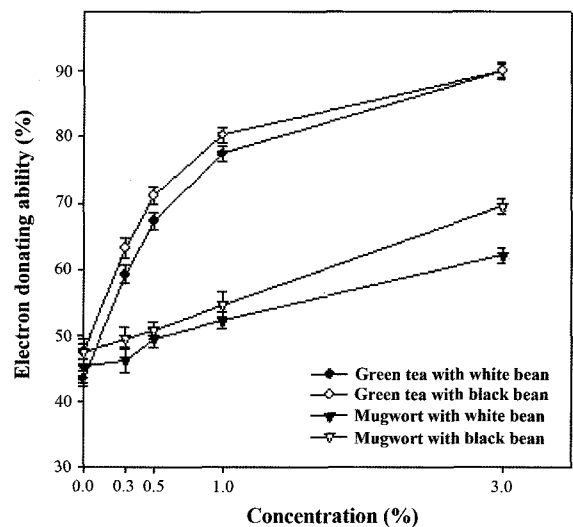


Fig. 2. Antioxidative activities of various cheongkookjang extracts. The antioxidative activity of L-ascorbic acid (1.0%) as positive control was 85%. Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

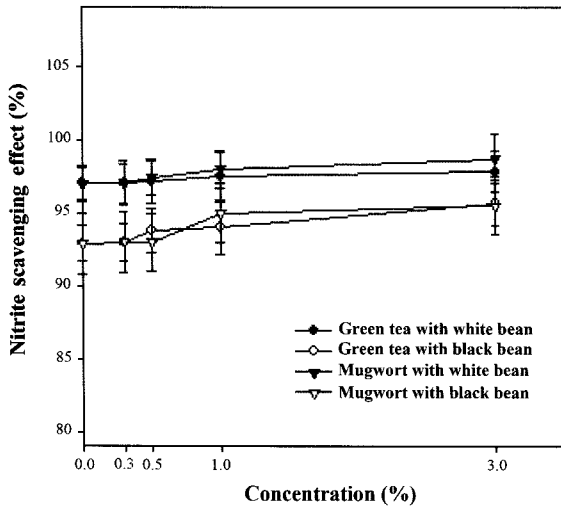


Fig. 3. Nitrite scavenging effect of various cheongkookjang extracts. Nitrite scavenging effect of L-ascorbic acid(1.0%) as positive control was 82.1%. Each value is expressed as mean±SD in triplicate experiments.

사하였다. Figure 4에 나타난 바와 같이, 흰 콩이나 검은 콩 청국장 모두 혈소판응집 억제 활성을 보였으며, 이 때 녹차나 쪽을 첨가할 경우는 비교적 낮은 농도인 0.3~1.0%에서 억제 활성이 급격히 증가하였고 이후의 농도에서도 완만하게 증가하였다. 별도로 양성 대조군으로서 L-ascorbic acid를 1.0% 농도로 처리한 경우 혈소판응집 억제능은 약 93%를 나타내었다. 본 실험에 사용한 청국장 추출물이 정제되지 않은 추출물 상태임을 감안하면 청국장류의 혈소판응집 억제활성은 매우 높은 것으로 사료된다. 또 녹차 및 쪽은 polyphenols, essential oils 등 다양한 생리활성

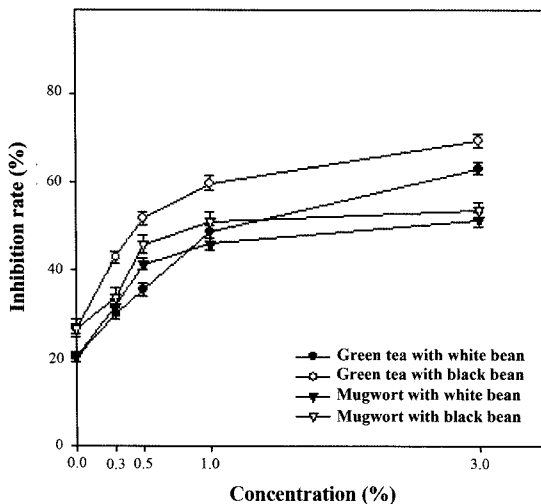


Fig. 4. Inhibitory effects of various cheongkookjang extracts on platelet aggregation. The inhibition rate of L-ascorbic acid (1.0%) as positive control on platelet aggregation activity was 93%. Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

성분을 포함하고 있어(12, 17), 이들에 의해 혈소판응집 억제활성이 더욱 증가되는 것으로 추정할 수 있으나, 3% 이내의 소량을 첨가하였음에도 활성이 상당히 증가하는 현상은 특이한 것으로서 특정 성분의 첨가가 청국장의 기능성 강화에 매우 도움을 줄 수 있는 것으로 기대된다.

혈전용해 작용 측정

청국장, 낫또 등 콩을 이용한 발효물들은 효소의 작용 등에 의해 혈전용해 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(20). 흰 콩, 검은 콩 청국장 및 기능성분을 첨가한 청국장 분말의 열수 추출물의 혈전용해 활성을 조사한 결과, 모두에서 투명환을 관찰할 수 있었으며, 그 중에서 녹차를 첨가한 청국장에서 가장 넓은 투명환이 관찰되어 혈전용해 활성이 가장 강력함을 알 수 있었다. 혈전용해 활성(%)은 plasmin unit으로 환산한 fibrin 분해 활성으로 나타낼 수 있으며, 이들 종류별 청국장의 혈전용해 활성을 plasmin unit으로 환산한 결과는 Fig. 5와 같다. 흰 콩보다는 검은콩 청국장의 혈전용해 활성이 다소 좋았으며, 녹차를 첨가한 경우는 활성이 약간 증가 하였으나, 쪽의 경우는 저농도(0.3, 0.5%) 첨가시 활성이 감소하다가 3.0% 농도로 첨가시 다시 약간 증가하는 현상을 나타내어, 저농도에서의 활성감소가 쪽의 항균 작용에 의한 발효억제에 의한 것은 아닌 것으로 판단되었다. 본 실험에서 혈전용해 활성 측정에는 청국장 분말의 추출액을 그대로 사용하였으므로 혈전용해 성분을 분리정제하는 경우에는 더 높은 혈전용해 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

마우스에서의 in vivo 혈전증 억제

혈소판 응집 억제효과가 가장 좋은 것으로 확인된 3.0%의 녹차를 첨가한 검은 콩 청국장 시료를 가지고 in vivo에서의 혈전 유발 억제 작용을 검토하였다. 시료를 마우스에 경구투여하고 항

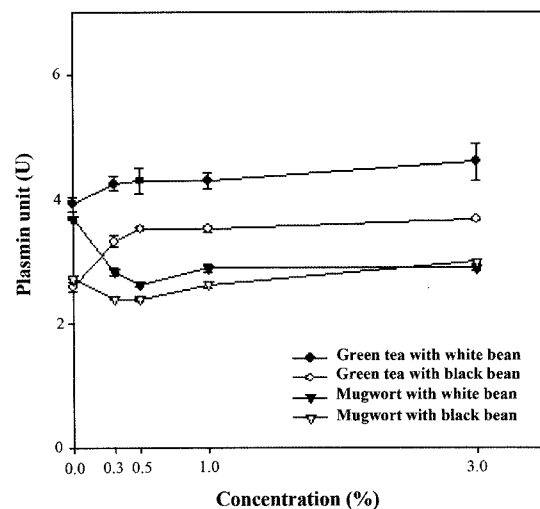


Fig. 5. Fibrinolytic activities of various cheongkookjang extracts. Fibrinolytic activity was expressed as plasmin unit. Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

Table 1. Inhibitory effect of samples on collagen/epinephrine thrombotic death in mouse

Samples	Dosage (mg dry wt /kg body wt)	No. killed /No. tested	% protected
Control	-	9/11	18.0
Cheongkookjang extracts	0% green tea w/ black bean	4/8 ^a	50.0
	3.0% green tea w/ black bean	2/8 ^b	75.0
Aspirin	50	0/8 ^b	100
	25	1/8 ^b	87.5

Each sample or aspirin was administered orally one hour prior to the thrombotic challenge. The χ^2 -test was used to determine whether there were significant differences in effects between mice that received anti-thrombotic agents and the controls which did not. ^aSignificantly different from the control ($P < 0.01$), ^bSignificantly different from the control ($P < 0.001$).

혈전 작용을 검색한 결과, 15분 이내에 회복되는 비율이 75%였으며 5분 이내의 사망률은 10%였다(Table 1). 녹차를 첨가하지 않은 검은 콩 청국장에는 15분 이내에 회복율이 50%, 5분 이내 사망률이 30%로 나타나 대조군인 아스피린 투여군보다는 약하나 증상개선 효과가 있는 것으로 나타났다. 양성대조군인 aspirin은 농도에 따라 작용강도의 차이는 있으나 사용한 농도에서 효과가 우수한 것이 관찰되었다. 본 시료가 아스피린과 같은 약물이 아니고 또한 아스피린이 갖는 사용상의 제한점인 소화성 궤양 또는 신장에 환자들은 사용하기 어려운 점 등을 고려하면 본 청국장 추출물이 우수한 항혈전 또는 혈전 예방 소재로서 개발 가능성이 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- 강윤한, 박용곤, 이기동. 1996. phenol성 화합물의 아질산염소기 및 전자공여 작용. 한국식품과학회지 28, 232-239.
- 류근호, 이주영, 정진호. 1994. 자연식품에 의한 혈소판 응집 억제능의 효율적 검색. 한국식품위생안전성학회지 9, 23-30.
- 박진희, 하에화, 조정순. 2005. 녹차 된장이 고지방식을 급여한 흰쥐의 체중 및 혈중 지질성분에 미치는 영향. 한국식품과학회지 37, 806-811.
- 손태중. 1979. 병리학개념, p. 84-86. 고문사, 서울.
- 유형재, 이동석, 김한복. 2004. 보리, 쑥, 다시마, 대두

혼합물의 청국장 발효. 한국미생물학회지 40, 49-53.

- 이시경, 주현규, 윤세억, 최병달. 1998. 청국장제조시 대두원료의 동결과 쑥추출물의 첨가가 품질 및 이화학적 성분변화에 미치는 영향. 한국농화학회지 41, 510-515.
- Antiplatelet Trialist Collaboration. 1994. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-1: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br. Med. J.* 308, 81-106.
- AOAC official method of analysis. 1985. Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington D.C., USA.
- Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* 40, 346-350.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1194-1204.
- Born, G.V.R. and M.J. Cross. 1963. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 168, 178-195.
- Chung, M.J., A.Y. Kang, S.O. Park, K.W. Park, H.J. Jun, and S.J. Lee. 2007. The effect of essential oils of dietary wormwood (*Artemisia princeps*), with and without added vitamin E, on oxidative stress and some genes involved in cholesterol metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1400-1409.
- Davies, M.J. and A.C. Thomas. 1985. Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br. Heart J.* 53, 363-373.
- DiMinno, G. and M.J. Silver. 1983. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 57-60.
- Gorden, J.L. 1981. Platelets in perspective, pp. 1-17. In J.L. Gorden (ed.), Platelets in biology and pathology. Elsevier, North-Holland Press, Amsterdam, Netherland.
- Gray, J.I. and L.R. Dugan, Jr. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40, 981-984.
- Hopps, H.C. 1977. Principles of pathology, p. 47-55. NewYork Appleton Century Croft, USA.
- Kang, W.S., I.H. Lim, D.Y. Yuk, K.H. Chung, J.B. Park, H.S. Yoo, and Y.P. Yun. 1999. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb. Res.* 96, 229-237.
- Lee, K.A. and M.S. Kim. 2005. Antiplatelet and antithrombotic activities of methanol extract of *Usnea longissima*. *Phytother. Res.* 19, 1061-1064.
- Mine, Y., A.H.K. Wong, and B. Jiang. 2005. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Res. Int.* 38, 243-250.
- Pace-Asciak, C.R., S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas, and D.M. Goldberg. 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 235, 207-219.

(Received November 19, 2007/Accepted December 5, 2007)

ABSTRACT : Antithrombotic Activities of Cheongkookjang and Cheongkookjang Fermented with Green Tea or Mugwort

Kyung-Ae Lee¹, Jeong-Oak Jang², Hye-Kyung Yoon², and Moo-Sung Kim^{3*} (¹Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea, ²Department of Food & Nutrition, Kyungwon University, Songnam 461-701, Korea, ³R&D Center, Macrocare Ltd., Ochang 363-883, Korea)

Antithrombotic activities of water extract of cheongkookjang and cheongkookjang fermented with green tea or mugwort were evaluated on some antithrombosis related activities *in vitro* and thrombotic death inhibition *in vivo*. Cheongkookjang made of white soybean (*Glycine max*) or black small soybean (*Rhynchosia nulubilis*) showed potent antioxidative activities. Addition of green tea or mugwort during cheongkookjang fermentation increased the antioxidative activity, cheongkookjang with green tea showed more drastic increase compared with cheongkookjang with mugwort. Nitrite scavenging effects of the cheongkookjang extracts were prominent but the addition of green tea or mugwort seldom increased the scavenging effects. All the cheongkookjang extracts showed strong inhibitory activities on platelet aggregation. The inhibitory activities of cheongkookjang were increased considerably by addition of green tea or mugwort even with low concentration. Plasmin unit as fibrinolytic activity was not affected considerably by addition of green tea. Addition of mugwort decreased the activity transiently at low concentration (0.3~0.5%) but increased again slowly at higher concentration (1~3%). *In vivo* thrombotic death inhibition test, the antithrombotic activity of cheongkookjang made of black small bean with green tea was higher by about 1.5 times compared to that without green tea. As results, cheongkookjang might inhibit antithrombosis not only by fibrinolytic action but also by inhibition of platelet aggregation and antioxidative action. The addition of functional materials such as green tea or mugwort could increase the anti-thrombotic function, even at low concentration.