



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0111701  
(43) 공개일자 2012년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23C 9/123 (2006.01) A23C 9/13 (2006.01)  
A23C 11/10 (2006.01) A61P 1/10 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0030353  
(22) 출원일자 2011년04월01일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)  
인하대학교 산학협력단  
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)  
(72) 발명자  
윤선  
경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 306동 502호 (일산동, 후곡마을)  
최혜정  
서울특별시 강서구 등촌로 163, 현대I-PARK 125동 1804호 (등촌동)  
김정호  
인천광역시 연수구 독배로 58, 현대아파트 203동 702호 (옥련동)  
(74) 대리인  
김문재, 이종승, 권형중

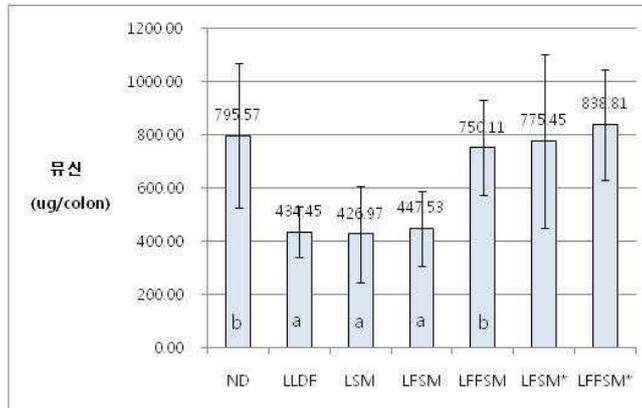
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 김치유산균을 이용한 기능성 대두 요구르트 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 김치유산균을 접종하여 발효시킨 다음, 친수성 섬유질을 첨가하여 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 변비 개선용 대두 요구르트는 변비 예방 및 치료 효과가 있으며, 장기적으로 대장 질환을 예방하는 효과가 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100017249

부처명 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원(여성과학자)

연구과제명 김치 유산균을 이용한 기능성 대두 요구르트 개발과 건강 기능성 규명-고지혈증과 변비 개  
선 효능을 중심으로

주관기관 한국과학재단

연구기간 2008.05.01 ~ 2012.04.30

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

두유에 김치유산균을 접종하여 10 내지 30℃에서 발효시킨 다음, 친수성 섬유질을 첨가하여 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 김치유산균은 바이셀라 김치아이(*Weissella kimchii*)인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 김치유산균은 *Weissella kimchii* H022(KCTC 18205P)인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루 및 볶은 보리가루로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 1-5%의 저항전분, 0.5-1.5%의 쌀겨 식이섬유, 0.2-0.7%의 차전자피가루 및 0.2-0.7%의 볶은 보리가루인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법.

### 청구항 6

발효온도 10 내지 30℃에서 김치유산균으로 발효시킨 두유 및 친수성 섬유질을 포함하는 변비 개선용 대두 요구르트.

### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 김치유산균은 바이셀라 김치아이(*Weissella kimchii*)인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트.

### 청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 김치유산균은 *Weissella kimchii* H022(KCTC 18205P)인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트.

#### 청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루 및 볶은 보리가루로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트.

#### 청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 1-5%의 저항전분, 0.5-1.5%의 쌀겨 식이섬유, 0.2-0.7%의 차전자피가루 및 0.2-0.7%의 볶은 보리가루인 것을 특징으로 하는 변비 개선용 대두 요구르트.

#### 청구항 11

발효온도 10 내지 30℃에서 김치유산균으로 발효시킨 두유 및 친수성 섬유질을 포함하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

#### 청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 김치유산균은 바이셀라 김치아이(*Weissella kimchii*)인 것을 특징으로 하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

#### 청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 김치유산균은 *Weissella kimchii* H022(KCTC 18205P)인 것을 특징으로 하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

#### 청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루 및 볶은 보리가루로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

#### 청구항 15

제 11항에 있어서,

상기 친수성 섬유질은 1-5%의 저항전분, 0.5-1.5%의 쌀겨 식이섬유, 0.2-0.7%의 차전자피가루 및 0.2-0.7%의 볶은 보리가루인 것을 특징으로 하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

**청구항 16**

제 11항에 있어서,

상기 대장 질환은 대장암, 대장 용종증, 과민성대장증후군, 궤양성 대장염 및 크론병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대장 질환 예방용 대두 요구르트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 김치유산균을 이용한 기능성 대두 요구르트에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 대두는 뛰어난 영양성분 및 다양한 생리활성물질들이 함유되어 있는 대표적인 건강 식품이다. 대두 요구르트는 두유를 유산균으로 발효시켜 대두의 건강 기능성을 높이고 기호성을 향상시키기 위해 시도된 것으로, 특히 프로바이오틱스(probiotics)와 프리바이오틱스(prebiotics)를 동시에 함유하는 신바이오틱스(synbiotics)로서 각광 받고 있다.

[0003] 두유에 유산균 접종시 산생성능과 균체 생육이 우유에 비해 떨어지는 연구결과들이 있는데 이를 보완하기 위해 지금까지 두유 요구르트 제조에 있어서 두유를 단독 발효시키기보다 우유나 혹은 유청분말을 혼합시켜서 발효시킨 연구들이 이루어지고 있다. 그러나, 대두 요구르트의 생리활성에 관한 연구는 많지 않으며 특히 국내연구는 대두 요구르트의 제조 및 관능에 관한 연구가 중점적으로 이루어져 있다. 대두 요구르트의 생리활성에 관한 연구로는 두유가 발효되어 두유 요구르트의 형태가 되면 아글리콘(aglycone)인 제니스테인(genistein)이나 다이드제인(daidzein)의 비율이 증가되어 유방암에 효과적이라는 연구가 있었고(Ohta, T et al., *Carcinogenesis* 21(5): 937), 콜레스테롤 저하효과, 항암효과(Yang, HL et al., *Cancer letters* 231(2): 215-227) 등이 있다는 연구가 있다.

[0004] 최근 우리나라는 식생활의 서구화로 채소, 과일을 섭취하는 빈도가 낮아졌고, 이에 따라 만성 변비로 고통 받는 인구가 점차 늘어가고 있다. 식이섬유의 섭취는 변비의 예방 및 치료에 적합한 것으로 알려져 있으나, 경제성장과 더불어 점차 서구화되어 가는 식생활 습관상 섬유질 섭취는 점점 줄어가고 하루 권장되는 25-30g의 섬유질 섭취는 어려워지고 있다. 이에 따라 변비증과 대장암, 고지혈증 등의 생활습관병으로 주요 질병의 양상도 변화하게 되었다. 최근에는 식이섬유의 기능성을 감안하여 식이섬유를 이용한 기능성식품과 식이섬유를 가공식품에 첨가한 보강식품 등의 개발이 증가하고 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 김치유산균을 이용하여 변비 개선효과를 가지는 새로운 발효식품을 개발하고자 노력한 결과, 마이셀라 김치아이(*Weissella kimchii*)를 이용하여 두유를 발효시키고, 친수성 섬유질을 첨가하여 제조된 대두 요구르트가 변비 개선에 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 본 발명의 목적은 두유에 김치유산균을 접종하여 대두 요구르트를 제조한 후, 저항 전분, 쌀겨 식이섬유, 차전 자피가루 및 볶은 보리가루와 같은 친수성 섬유질을 첨가하여 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 두유에 김치유산균을 접종하여 10 내지 30℃에서 발효시킨 다음, 친수성 섬유질을 첨가하여 변비 개선용 대두 요구르트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 다른 구체예에서, 발효온도 10 내지 30℃에서 김치유산균으로 발효시킨 두유 및 친수성 섬유질을 포

함하는 변비 개선용 대두 요구르트 및 대장 질환 예방용 대두 요구르트를 제공한다.

- [0009] 본 발명에 있어서, 상기 김치유산균은 바이셀라 김치아이(*Weissella kimchii*)인 것을 특징으로 할 수 있고, *Weissella kimchii* H022(KCTC 18205P)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 상기 친수성 섬유질은 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루 및 볶은 보리가루로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 1-5%의 저항전분, 0.5-1.5%의 쌀겨 식이섬유, 0.2-0.7%의 차전자피가루 및 0.2-0.7%의 볶은 보리가루인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 대장 질환은 대장암, 대장 용종증, 과민성대장증후군, 궤양성 대장염 및 크론병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0012] 단쇄지방산은 장내의 pH를 저하시킴으로써 유익균의 증식을 촉진하고, 대장 내 질소를 세균의 단백질합성에 이용되게 함으로써 결과적으로 대장 내 질소를 감소 시킨다. 세균들은 장내에서 식이섬유를 발효시켜 단쇄지방산들, 주로 아세트산, 프로피온산, 뷰티르산을 생성하며 단쇄지방산은 장 점막으로부터 빨리 흡수되어 대장점막세포의 주요한 에너지원으로 이용되는 것으로 알려져 있다(Thompson, *Trends in Food Science & Technology* 11(7): 245-253). 또한, 면역 조절기능이 확인되어 알레르기 및 염증성 장 질환에 대한 예방 및 치료 효과가 있으며, 단쇄지방산의 생산 증가는 장내 pH 저하에 영향을 주어 발암물질의 생성을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 뷰티르산은 항종양(antineoplastic) 효과를 가지고 있어서 대장암 발생에서 보호적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.
- [0013] 소화기관 점액질은 물리적, 화학적 자극으로부터 장내표면을 보호하고 소화 운동에 있어서 윤활제의 역할을 한다. 장 점막 (colonic mucosa)은 점액질인 점액(mucus)으로 덮여 있고 점액소인 뮤신(mucin)은 점액질의 특성을 나타내는데 가장 중요한 역할을 하는 것으로서, 각종 장 질환은 뮤신의 부족과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0014] 본 발명에서 사용된 용어 "친수성 섬유질"은 물과 친화력을 가진 물질로서 혈당이나 지질에 좋은 영향을 주는 섬유질을 의미하고, 본 발명에서는 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루, 볶은보리가루를 사용하였다.
- [0015] 본 발명에서 사용된 용어 "기능성 대두 요구르트"는 본 발명에 따라 제조된 김치유산균을 이용하여 발효시킨 대두 요구르트에 저항전분, 쌀겨 식이섬유, 차전자피가루, 볶은보리가루와 같은 친수성 섬유질을 넣은 변비의 예방 및 치료에 효과가 있는 대두 요구르트를 의미한다.
- [0016] 본 발명에서 사용된 용어 "대장 질환"은 대장암, 대장 용종증(APC: adenomatous polyposis coli), 과민성대장증후군, 궤양성 대장염, 크론병 등을 의미한다.

[0017]

**발명의 효과**

- [0018] 본 발명에 따른 변비 개선용 대두 요구르트는 변비 예방 및 치료 효과가 있으며, 장기적으로 대장 질환을 예방하는 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 도 1은 대두 요구르트의 발효시간에 따른 균체의 증식을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 대두 요구르트의 발효시간에 따른 pH 및 적정 산도 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 실험 식이군에 따른 뮤신 함량을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 하기의 모든 실험은 2번 이상 반복 실험하여 평균값을 구하여 표시하였다. 자료 분석은 SPSS (18.0) 프로그램을 이용하여 통계분석을 시행하였으며 one-way ANOVA의 Duncan법을 실시하여 p<0.05의 수준에서 유의적 차이를 비

교하였다.

### 실시예 1

#### [0022] 균주의 배양

[0023] 본 실험에서는 김치에서 분리해 낸 젖산 박테리아(Lactic Acid Bacteria, LAB)인 바이셀라 김치아이 HO22(*Weissella kimchii* HO22, KCTC 18205P)를 인하대학교 생명과학과에서 분양받아 사용하였다. *Weissella kimchii* HO22를 분리하기 위하여, CJ 주식회사에서 제조한 김치(pH 3.86, 총산도 0.92%)를 구입하여 김치 발효가 거의 끝난 상태의 김치에 존재하는 유산균을 MRS 배지에서 키워 분리하였다. 바이셀라 속에 특이적인 프라이머를 이용하여 16S rDNA를 증폭시킨 후, MnlI, MseI, BceI 제한효소를 이용하여 절단하고 제한효소 패턴 분석을 하여 동정하였다 (Jang et al, 2002. FEMS Microbiology Letters 212:29-34). 이를 *Weissella kimchii*로 동정, 명명하고 보관하였다(김봉준, 2003년, 박사학위 논문). 16S rDNA 서열분석 결과, 서열이 분석된 1,452개의 DNA 염기 모두 *Weissella cibaria*의 16S rDNA 서열과 100% 일치한 것을 확인하였고, *Weissella cibaria*는 *Weissella kimchii*의 다른 명칭으로 사용된다(Ennahar & Cai, 2004, Int J SystEvol Microbiol 54:463-465).

[0024] *Weissella. kimchii* HO22는 25℃, MRS Broth (Difco MRS Broth, Becton, Dickinson and Co., Sparks, USA)에서 24시간씩 2회 계대배양 후, 정지기 초기(12h)의 균체를 사용하였다. 실험에 대조군으로 사용한 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 와 *Lactobacillus rhamnosus* GG 는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 구입하였고 37℃, MRS Broth에서 18~24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

[0025] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 접종 시  $7.8 \times 10^6$  CFU/mL 이었던 생균수가 발효 종료 시점인 20시간에는  $3.4 \times 10^8$  CFU/mL까지 증가했다. 발효 종료 시점의 생균수  $3.4 \times 10^8$  CFU/mL는 식품공전상의 농후 발효유 유산균 수인  $10^8$  CFU/mL을 만족하였다.

### 실시예 2

#### [0026] 2-1: 대두 요구르트의 제조

[0027] 대두 요구르트 제조에 사용한 두유[수분 91.28%, 조단백 3.63%(d.w), 조지방 10.79%(d.w), 조회분 6.21%(d.w)]는 (주) 연세우유(한국, 충청남도, 아산)에서 공급받았고, 121℃에서 15분간 멸균하여 냉각한 후 사용하였다. 돌 등의 이물이 제거된 대두를 200℃에서 6분간 볶은 뒤 껍질을 벗기고 반으로 절단시켜 스팀을 사용하여 110℃로 40초간 가열 처리한 후 콩 1kg당 85℃의 정수 8kg을 혼합하였다. 정수와 혼합된 대두를 마쇄기로 미세하게 분쇄한 뒤 3,500rpm으로 원심 분리하여 비지를 제거하여 두유액을 제조하였다. 두유액에 2%의 설탕을 첨가하고 121℃에서 15분간 멸균 후 상온에서 냉각하였다. 최대 활성이 된 균체를 원심분리하여 (8,000g, 4℃, 10분) 회수하고 두유에 1%(v/v) 접종하여 25℃에서 발효하여, pH 5.2가 될 때에 발효를 종결하였다.

#### [0028] 2-2: 대두 요구르트의 pH 및 적정 산도분석

[0029] pH는 시료를 균질화한 후 pH meter (300 series, Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정산도는 AOAC 방법을 수정하여 적용하였다. 시료 10mL에 3차 증류수 20mL을 가하여 잘 혼합하여 균질화한 후 페놀프탈레인(phenolphthalein) 지시약을 사용하여 0.1N NaOH 표준용액으로 중화 적정하였다. 적정 산도는 % 젖산으로 표기하였다.

[0030] 그 결과, 발효 시작 전 7.0 이었던 pH는 발효 시간이 경과함에 따라 감소하여 발효 20시간 만에 발효 종료 시점인 pH 5.2에 도달하였다. 적정 산도의 경우, 배양 시간이 경과함에 따라 증가했다. 발효 0시간일 때 0.09%에서 발효 20 시간 때 0.44% 로 산도가 증가하였다(도 2).

#### [0031] 2-3: 변비 개선용 대두 요구르트의 제조

[0032] 상기 실시예2-1에서 제조한 대두 요구르트에 친수성 섬유질, 2% 저항전분 DS-RStar80(대상, 대한민국), 1% 쌀겨 식이섬유(rice bran fiber, CJ, 대한민국), 0.5% 차전자피가루(백장생, 대한민국), 0.5% 볶은보리가루(태광식품, 대한민국)을 첨가하여 변비 예방 및 치료에 효과가 있는 기능성 대두 요구르트를 제조하였다.

**실시예 3**

[0033] **대두 요구르트의 변비 개선 효과**

[0034] 3-1: 실험 동물 및 실험 식이의 준비

[0035] 실험동물로 SD계 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley, 생후 4주령, 나라바이오텍)에게 일주일 동안 일반 고체사료(Halan, USA)를 먹여 새로운 환경에 적응시켰다. 케이지 내에서 물과 사료는 자유롭게 먹을 수 있도록 하였고 사육실 온도는 25℃ 습도는 55%로 조정하였다.

[0036] 실험 식이는 표 1과 같이 4개의 군으로 나누어 제조하였다. 저식이섬유소군(Low Dietary Fiber; LDF)은 셀룰로오스를 2%로 조정하였다. 두유(Soy Milk; SM), 대두 요구르트(Fermented Soy Milk; FSM), 기능성 대두 요구르트(Functional Fermented Soy Milk; FFSM) 군은 셀룰로오스를 2%로 조정하고 총 열량의 10%를 각각 동결건조 두유(SM), 동결건조 대두 요구르트(FSM), 동결건조 기능성 대두 요구르트(FFSM)로 대체하였다.

**표 1**

[0037]

	실험 식이			
	LDF <sup>1</sup>	SM <sup>2</sup>	FSM <sup>3</sup>	FFSM <sup>4</sup>
카제인	200.00	157.00	154.00	148.00
옥수수 전분	427.00	377.00	373.00	366.00
수크로즈	100.00	100.00	100.00	100.00
셀룰로오스(Dyets, #401850)	20.00	20.00	20.00	20.00
콩기름	70.00	58.00	57.00	55.00
광물질 혼합제(mineral mixture)*	35.00	35.00	35.00	35.00
비타민 혼합제(vitamin mixture)**	10.00	10.00	10.00	10.00
덱스트로오스	132.00	132.00	132.00	132.00
L-시스테인	3.00	3.00	3.00	3.00
타타르산수소콜린 (Choline Bitartrate)	3.00	3.00	3.00	3.00
두유 (SM)	-	111.08	-	-
대두 요구르트 (FSM)	-	-	120.3	-
기능성 대두 요구르트(FFSM)	-	-	-	141.87
전체	1000.00	1006.85	1007.57	1014.38

[0038] <sup>1</sup>저식이섬유소군(LDF); 2% 셀룰로오스

[0039] <sup>2</sup>두유(SM); 2% 셀룰로오스 + 동결건조 두유

[0040] <sup>3</sup>대두 요구르트(FSM); 2% 셀룰로오스 + 동결건조 발효 두유

[0041] <sup>4</sup>기능성 대두 요구르트(FFSM); 2% 셀룰로오스 + 동결건조 기능성 발효 두유

[0042] 3-2: 동물 실험

[0043] 기능성 대두 요구르트 섭취 시 변비개선 및 정장작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 4주령 SD계통의 수컷 흰쥐(나라바이오텍, Korea)를 일주일간의 적응기간이 끝난 후 총 7일 동안 실험식이를 급여하며 동시에 강력한

지사제인 로페라마이드(Loperamide hydrochloride, Sigma-Aldrich, USA)를 1.5mg/kg의 농도로 주사용 생리식염수에 녹여 매일 아침, 저녁 2회 피하주사 하여 변비를 유발시켰다. 대조군에게는 일반 고체사료 (5% 셀룰로오스)를 급여하면서 로페라마이드(loperamide) 대신 동량의 주사용 생리식염수만 같은 시간에 주사하여 주사에 따른 스트레스로 인해 발생할 수 있는 변수를 보정하였다. 실험식이 기간 동안 식이 처방 및 개체수는 표2와 같다.

표 2

	처방	식이	개체수
ND <sup>1</sup>	살린(saline) 주사*	5% 셀룰로오스	n=8
LLDF <sup>2</sup>	로페라마이드(Loperamide) 주사**	2% 셀룰로오스	n=8
LSM <sup>3</sup>	로페라마이드 주사**	2% 셀룰로오스 + SM	n=8
LFSM <sup>4</sup>	로페라마이드 주사**	2% 셀룰로오스 + FSM	n=8
LFFSM <sup>5</sup>	로페라마이드 주사**	2% 셀룰로오스 + FFSM	n=8

\* 0.1mL saline solution (2times/day)

\*\* 1.5mg looperamide/kg/0.1mL saline solution (2times/day)

<sup>1</sup>Normal Diet

<sup>2</sup> 로페라마이드 저식이섬유소군(Loperamide Low Dietary Fiber)

<sup>3</sup> 로페라마이드 두유(Loperamide Soy Milk)

<sup>4</sup> 로페라마이드 대두 요구르트(Loperamide Fermented Soy Milk)

<sup>5</sup> 로페라마이드 기능성 대두 요구르트(Loperamide Functional Fermented Soy Milk)

3-3: 시료 채취 및 보관

실험동물을 12시간 동안 절식시킨 후 흰쥐를 CO<sub>2</sub> 기체로 질식사시키고 해부한 후 맹장과 결장을 각각 분리하였다. 맹장은 분리 직후 내용물을 분리하여 조직무게와 내용물 무게를 측정하였고, 맹장 내용물은 -80℃ 초저온 냉동고(deep freezer)에 보관해 두었다가 단쇄지방산 (short chain fatty acid, SCFA) 함량과 pH 측정에 사용하였다. 결장은 세로로 절개하여 뒤집은 후 ice-cold 0.15M NaCl로 장 내용물을 씻어내고, 슬라이드 글라스를 이용하여 결장 점막을 긁어내고 결장조직 및 내용물 무게와 결장 길이 (length of the colon)를 측정하였다. 분리한 결장 점막은 -80℃ 초저온냉동고에 보관해 두었다가 뮤신(mucin) 함량 측정에 사용하였다.

3-4: 생리활성 분석

식이 섭취량은 잔반량을 기준으로 일주일에 세 번, 체중은 일주일에 한번씩 측정하였으며 식이효율 (Feed Efficiency Ratio; F.E.R)은 다음의 방법에 따라 구하였다.

식이효율(F.E.R) = 실험기간 동안 증가한 체중(g) / 실험기간 동안의 섭취량(g)

각 기간별 식이 섭취량 및 체중 증가량, 이를 통해 얻어진 식이 효율은 표 3에 나타내었다.

표 3

	분석 아이템	적용 기간	실험 식이 기간
ND	최종 체중 (g)	125.11 ± 10.41	181.68 ± 14.90
	F.E.R**	0.53 ± 0.04	0.49 ± 0.04
LLDF	최종 체중 (g)	125.07 ± 8.33	176.02 ± 13.28
	F.E.R**	0.53 ± 0.03	0.48 ± 0.03
LSM	최종 체중 (g)	125.27 ± 7.14	177.55 ± 11.78
	F.E.R**	0.54 ± 0.05	0.47 ± 0.04
LFSM	최종 체중 (g)	124.98 ± 5.51	179.15 ± 12.07
	F.E.R**	0.51 ± 0.04	0.46 ± 0.03
LFFSM	최종 체중 (g)	125.47 ± 5.52	183.97 ± 10.30
	F.E.R**	0.55 ± 0.06	0.53 ± 0.03
LFSM*	최종 체중 (g)	126.01 ± 5.10	185.18 ± 5.48
	F.E.R**	0.54 ± 0.02	0.42 ± 0.03
LFFSM*	최종 체중 (g)	126.14 ± 3.79	188.86 ± 6.01
	F.E.R**	0.55 ± 0.02	0.46 ± 0.01

[0059] \*는 감마선을 조사하지 않은 군을 의미함.

[0060] \*\*는 식이 효율을 의미함.

[0061] 변의 수거 및 중량 측정을 위해서는, 각 기간별 2일, 3일 매일 일정시간 (아침 10시) 에 분변을 수거 한 후 바로 냉동해 두었다가 한꺼번에 모아서 동결건조 후 건조량을 측정하였다. 수분함량은 기간별 2일, 3일 인위적으로 항문을 자극하여 3~5 pellet을 수거한 후 105℃ 상압가열건조법으로 측정하였다.

[0062] 그 결과, 각 기간별 분변량의 변화는 표 4와 같다. 적용기간이 지나고 7일 동안 로페라마이드와 실험 식이를 병행하면서 인위적으로 변비를 유발하였다. 로페라마이드 대신 동량의 생리 식염수를 투여한 ND 군을 제외하고 나머지 모든 군은 총 분변량이 감소하는 것으로 보아 로페라마이드가 변비 유발에 효과적인 억제임을 확인하였다. 실험 식이 7일째의 총 분변량을 보면 ND 군은 4.17±0.46g, LLDF 군은 0.93±0.15g, LSM 군은 1.04±0.21g, LFSM 군은 1.12±0.18g, LFFSM 군은 1.42±0.11g 으로 변비 유발을 하지 않고 5% 셀룰로오스를 급여한 ND군의 분변량이 가장 높게 나타났고 그 다음이 로페라마이드를 주사하고 기능성 대두 요구르트를 급여한 LFFSM 군이었으며, 로페라마이드를 주사하고 저섬유소 식이를 급여한 LDF의 분변량이 가장 적었다. 대두요구르트 식이를 제공한 LFSM군의 분변량이 LLDF군, LSM 군의 분변량과 유의적 차이가 없는 것으로 나왔는데, 이는 실험식이 제조 과정의 감마선 조사에 의해 *Weissella kimchii* H022가 죽어서 프로바이오틱스로 작용하지 못했기 때문인 것으로 판단되어, LFSM군과 LFFSM군은 감마선 조사를 하지 않은 식이로 추가 실험을 진행하였다. 표 4의 감마선을 조사하지 않은 추가실험 결과를 보면 감마선 조사를 했을 때보다 전체적으로 분변량은 감소했고, LFFSM\*군이 LFSM\*군보다 더 많은 분변량을 보였다.

표 4

	총 분변량 (g)/day				
	적용 기간		실험 식이 기간		
	2일	4일	3일	5일	7일
ND	2.27 <sup>a</sup> ± 0.16	2.52 <sup>a</sup> ± 0.36	2.97 <sup>a</sup> ± 0.42	3.45 <sup>a</sup> ± 0.45	4.17 <sup>a</sup> ± 0.46
LLDF	2.24 <sup>a</sup> ± 0.27	2.53 <sup>a</sup> ± 0.29	0.62 <sup>b</sup> ± 0.10	0.63 <sup>b</sup> ± 0.18	0.93 <sup>b</sup> ± 0.15
LSM	2.20 <sup>a</sup> ± 0.18	2.29 <sup>a</sup> ± 0.35	0.66 <sup>b</sup> ± 0.09	0.68 <sup>b</sup> ± 0.24	1.04 <sup>b</sup> ± 0.21

[0063]

LFSM	2.26 <sup>a</sup> ± 0.29	2.50 <sup>a</sup> ± 0.17	0.69 <sup>b</sup> ± 0.09	0.73 <sup>b</sup> ± 0.14	1.12 <sup>bc</sup> ± 0.18
LFFSM	2.20 <sup>a</sup> ± 0.30	2.26 <sup>a</sup> ± 0.11	0.99 <sup>c</sup> ± 0.17	1.18 <sup>c</sup> ± 0.37	1.42 <sup>c</sup> ± 0.11
LFSM*	2.14 ± 0.30	2.91 ± 0.44	0.71 ± 0.18	0.86 ± 0.11	0.89 ± 0.14
LFFSM*	2.16 ± 0.12	2.77 ± 0.31	1.03 ± 0.25	1.17 ± 0.22	1.22 ± 0.11

[0064] \*는 감마선을 조사하지 않은 군을 의미함.

[0065] 각 기간별 수분함량의 변화는 표 5와 같다. 수분함량의 경우 적응기간 7일째와 실험식이 기간 4일째를 비교해보면 LLDF 군은 유의적 감소를 보였고, LFFSM 군은 유의적인 증가를 보였다. 실험식이 7일째의 수분함량을 보면 ND 군은 64.33±2.83%, LLDF 군은 55.73±2.89%, LSM 군은 61.43±2.65 %, LFSM 군은 61.01±3.43%, LFFSM 군은 66.01±4.23%로 LFFSM 군이 가장 높았고 그 다음으로 ND 군, LSM 군, LFSM군, LLDF군의 순서였다. 저섬유소 식이를 급여한 LLDF군을 제외하고 나머지 군들은 적응기간 7일째의 수분함량을 회복하였다. 이를 통해 기능성 대두 요구르트가 로페라마이드 투여로 유발된 수분함량의 감소를 회복시켜 주는 것을 확인 할 수 있었다. 표 5의 감마선을 조사하지 않은 추가실험 결과를 보면 실험식이 기간 7일째와 적응기간 7일째를 비교할 때, 적응기간 7일째보다 LFSM\* 군은 수분함량이 9.43% 감소했고, LFFSM\* 군은 수분함량이 2.56% 감소하여, LFFSM\* 군이 LFSM\* 군 보다 변의 수분함량 개선에 효과적임을 확인할 수 있었다. 추가 실험군의 수분함량이 이전 실험 결과와 차이를 보였는데, 이는 래트의 항문을 자극하여 펠렛(pellet)을 얻는 과정에서의 실험 조작 차이가 결과에 영향을 준 것으로 생각된다.

표 5

[0066]

	분변 수분 함량 (%)				
	적응 기간		실험 식이 기간		
	3일	7일	4일	5일	7일
ND	63.48 <sup>a</sup> ± 3.89	62.71 <sup>a</sup> ± 3.26	60.57 <sup>ac</sup> ± 3.33	60.86 <sup>ac</sup> ± 2.41	64.33 <sup>ac</sup> ± 2.83
LLDF	61.94 <sup>a</sup> ± 2.98	61.57 <sup>a</sup> ± 4.02	53.28 <sup>b</sup> ± 4.83	54.40 <sup>b</sup> ± 2.28	55.73 <sup>b</sup> ± 2.89
LSM	63.43 <sup>a</sup> ± 4.01	60.89 <sup>a</sup> ± 3.33	56.97 <sup>ab</sup> ± 3.57	57.65 <sup>ab</sup> ± 5.30	61.43 <sup>a</sup> ± 2.65
LFSM	62.56 <sup>a</sup> ± 2.05	60.29 <sup>a</sup> ± 2.37	60.31 <sup>ac</sup> ± 1.76	60.97 <sup>ac</sup> ± 2.40	61.01 <sup>a</sup> ± 3.43
LFFSM	64.97 <sup>a</sup> ± 2.47	61.90 <sup>a</sup> ± 4.86	62.98 <sup>c</sup> ± 4.80	62.85 <sup>c</sup> ± 2.82	66.01 <sup>c</sup> ± 4.23
LFSM*		58.81 ± 2.25	60.23 ± 5.58	55.26 ± 5.21	53.26 ± 6.03
LFFSM*		57.60 ± 4.61	61.33 ± 6.07	59.91 ± 2.82	56.12 ± 6.00

[0067] \*는 감마선을 조사하지 않은 군을 의미함.

[0068] 3-5: 단쇄지방산 함량과 pH 측정

[0069] 맹장 내용물 0.3g에 4배의 3차 증류수를 가하여 균질화한 후 1mL을 취하고, 여기에 0.01M의 황산 1mL를 첨가하였다. 4℃, 17,000g에서 10분 동안 원심 분리한 후 회수한 상등액을 0.2µm Acrodisc syringe filter (Pall Co., Ann Arbor, USA)로 여과한 후 HPLC (Agilent 1100 HPLC, Agilent Technologies, USA) 로 분석하였다. 컬럼은 Aminex HPX-87P column (300 X 7.8mm, Bio-rad, USA )를 사용하였고, 0.01N 황산을 이동상으로 하여

0.5mL/min의 유속으로 25℃에서 분리하였으며 RI 디텍터로 측정하였다. 각 피크는 표준 유기산의 체류시간과 비교하여 동정 및 정량하였다. 맹장 내용물의 pH는 내용물을 0.3g 채취한 후 10배의 3차 증류수로 희석하고 원심 분리 (3,000rpm, 4℃, 10분)하여 상등액의 pH를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 변비를 유발하지 않은 ND군의 단쇄지방산 함량은 다른 군에 비해 전체 단쇄지방산 함량이 유의적으로 높게 나왔다. 변비를 유발한 군들 중에서는 LFFSM군의 전체 단쇄지방산 함량이 유의적으로 높게 나왔다(표 6). LLDF에 비해 2.49배, LSM군에 비해 2.43배, LFSM에 비해 2.35배 높은 수치였다. 특히 프로피온산의 경우는 LLDF군과 LSM군, LFSM군에 비해 각각 2.84배, 2.88배, 2.51배 높았다. 이 결과로부터 LFFSM군에 첨가한 저항전분 등의 식이섬유가 대장에서의 단쇄지방산의 생산을 촉진하여 다른 변비 유발군들보다 높은 단쇄지방산 함량을 나타낸 것으로 보인다. 맹장 내용물의 pH는 단쇄지방산의 생산과 유사한 경향을 보였다. 표 6의 감마선을 조사하지 않은 추가실험 결과를 보면 이전 실험 결과 보다 각 군의 pH는 더 낮아지고, 단쇄지방산 함량은 증가한 것을 확인할 수 있고, 뷰티르산이 추가 실험에서 검출되었다.

표 6

[0071]

	pH	아세트산 (mg/ cecum)	프로피온산 (mg/ cecum)	뷰티르산 (mg/ cecum)
ND	7.41 <sup>a</sup> ± 0.05	10.09 <sup>a</sup> ± 1.99	2.39 <sup>a</sup> ± 0.74	Not detected
LLDF	7.60 <sup>c</sup> ± 0.09	2.80 <sup>c</sup> ± 0.89	0.77 <sup>b</sup> ± 0.27	Not detected
LSM	7.55 <sup>abc</sup> ± 0.13	2.90 <sup>c</sup> ± 0.85	0.76 <sup>b</sup> ± 0.16	Not detected
LFSM	7.57 <sup>bc</sup> ± 0.14	2.91 <sup>c</sup> ± 0.77	0.87 <sup>b</sup> ± 0.19	Not detected
LFFSM	7.46 <sup>ab</sup> ± 0.14	6.72 <sup>b</sup> ± 1.81	2.19 <sup>a</sup> ± 0.71	Not detected
LFSM*	7.46 ± 0.16	7.22 ± 1.48	1.71 ± 0.38	2.94 ± 0.79
LFFSM*	7.31 ± 0.10	7.97 ± 2.02	2.43 ± 0.67	3.10 ± 1.36

[0072]

\*는 감마선을 조사하지 않은 군을 의미함.

[0073]

3-6: 뮤신 함량 측정

[0074]

뮤신 함량은 총 핵소오스의 양으로 장내 뮤신 함량을 상대적으로 비교하였다. 결장 점막을 5mL의 3차 증류수와 잘 혼합한 후 sonicator (Sonifier 250, Branson, USA) 를 이용하여 1분 30초 동안 세포를 잘 파괴하였다. 분해된 조직은 원심분리(17,000g, 4℃, 10분) 한 후 상등액을 취하여 뮤신 함량 측정에 사용하였다. 원심분리하여 얻은 상등액 400μl 와 2.5% (w/v) 오르시놀(orsinol)(Sigma-Aldrich, USA) 용액 400μl를 잘 혼합한 후 여기에 60% (v/v)의 황산 3mL를 넣고 80℃에서 30분간 반응시켰다. 반응이 종료된 후 실온에서 식힌 다음 425nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 갈락토스(galactose)를 사용하였고 측정 범위는 25~200μg/ml로 하여 스탠다드 커브를 작성하여 정량하였다.

[0075]

그 결과, 뮤신 함량은 ND군에서 가장 높게 나타났고(795.57±270.28 ug/colon), LFFSM군은 750.11±178.10 ug/colon으로 ND군과 유의적 차이가 없었다(도 3). 이는 로페라마이드로 변비를 유발시킨 4군(LLDF, LSM, LFSM, LFFSM)중 다른 3군과 비교할 때 유의적으로 높게 나온 결과로, 나머지 3군의 뮤신 함량은 426.97~447.53 ug/colon 정도인 것을 볼 때 변비 유발 후 LLDF, LSM, LFSM군은 로페라마이드 투여에 의해 점액질의 두께가 얇아진 것이 회복되지 않았지만 LFFSM군은 기능성 대두 요구르트 섭취에 의해 뮤신 함량이 회복된 것으로 볼 수 있다.

수탁번호

[0076]

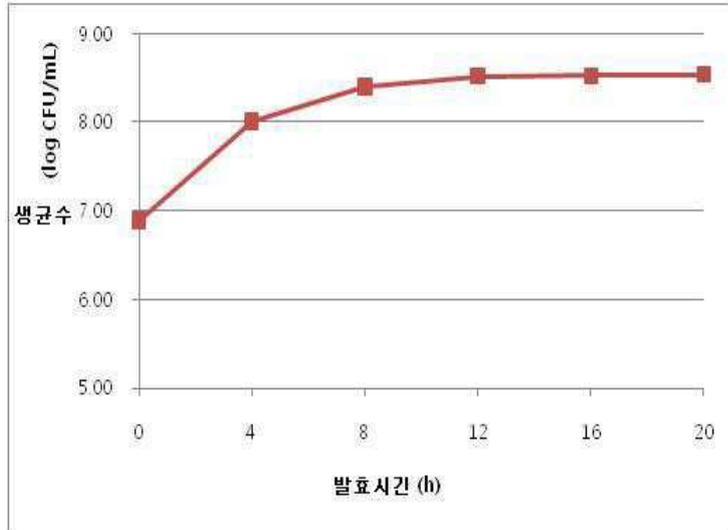
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18205P

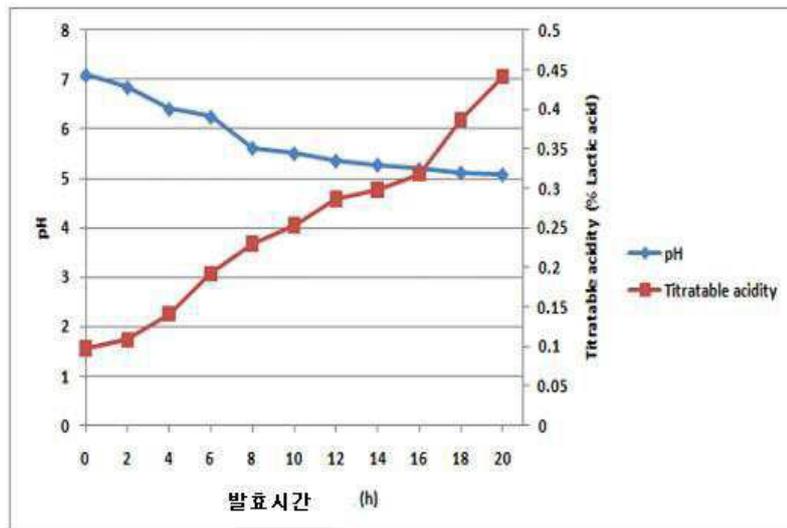
수탁일자 : 20110321

도면

도면1



도면2



도면3

