

## 비피더스균(*Bifidobacterium bifidum*)에 의해 발효된 우유가 고지방식을 섭취한 흰쥐의 혈청 지질대사에 미치는 효과에 관한 연구

원향례<sup>†</sup> · 박영주 · 최석호\* · 고준수\*\*

삼지대학교 식품영양학과

\*삼지대학교 응용동물과학부

\*\*강원대학교 축산가공학과

## The Effect of Fermented Milk by *Bifidobacterium bifidum* on Serum Lipid Metabolism in Rats Treated High Fat Diet

Hyang-Rye Won<sup>†</sup>, Young-Ju Park, Suk-Ho Choi\* and Jun-Su Goh\*\*

Dept. of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

\*Division of Applied Animal Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

\*\*Dept. of Animal Products Science, Kangwon University, Chuncheon 200-709, Korea

### Abstract

Selecting *B. bifidum* K-7 out of the bifidobacteria separated from healthy adults in the age of 20s, which shows high degree of acid tolerance and bile tolerance, as the main bacterium, this study aims to find how the bifidobacteria cause hypocholesterolemic effect in the high fat diet. In order to do this Sprague-Dawley male rats with the initial weight of 200 g in average were assigned to four experimental groups: 1) high fat diet & milk, 2) high fat diet & the milk added with bifidobacteria, 3) high fat diet & the milk added with microencapsulated bifidobacteria, 4) high fat diet & the fermented milk by bifidobacteria. The numbers of bifidobacteria ingested daily per rat through each type of the above mentioned milk are  $10^9$  CFU,  $10^9$  CFU and  $10^{10}$  CFU respectively. Hypocholesterolemic effect and high level of serum phospholipid were observed in the group fed with fermented milk being compared with the group fed with no bacterium but not in the groups fed with the milk with bifidobacteria and microencapsulated bifidobacteria. Thus, it was confirmed that the hypocholesterolemic effect is not due to the bifidobacterium itself but to the fermentation of milk.

**Key words:** *Bifidobacterium bifidus*, fermented milk, hypocholesterolemic effect

### 서 론

인간에게 있어 고지혈증, 특히 혈청 콜레스테롤 수준이 높은 것은 심장순환계 질환의 위험인자로 알려져 있다(1-4). 최근 우리 나라에서도 동물성 식품과 지방의 섭취가 증가하는 등의 식생활의 변화로 인해(5-7) 심장순환계 질환으로 인한 사망률이 높아지고 있다(8). 따라서 이와 같은 만성질환의 예방과 치료가 기대되는 기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이 중에서 현재 폭넓게 이용되고 있는 식품 중의 하나가 발효유이다. 발효유가 건강에 미치는 유익한 작용을 보면 발효유에 포함된 젖산균이 장내에서 박테리아성 암을 생성하는 효소활성을 방해한다는 보고가 있다(9). 사람에게 발효유를 먹었을 때 혈청콜레스테롤을 저하한다는 내용의 연구가 보고되었고(10-12), Harrison과 Peat(13)는 인공수유를 하는 신생아의 변에서 *L. acidophilus*의 수가 증가함에 따라 혈

청콜레스테롤이 감소하였다고 하였다. Grunewald(14)는 쥐에게 *L. acidophilus* 발효유를 먹었을 때 혈청콜레스테롤이 낮아진다는 보고를 하였고 Rao 등(15)은 *S. thermophilus* 발효유에서 추출한 메탄을 용해물을 쥐에게 먹었을 때 혈청콜레스테롤이 낮아진다는 보고를 하였다. Gilliland 등(16)과 Rasic 등(17)은 *Lactobacillus* 균종을 담즙의 존재하에 배양되는 능력과 콜레스테롤 흡착능력을 비교하였고 Gilliland 등(16)은 돼지에게 이 균종들을 투여한 결과 *in vitro*에서 콜레스테롤 흡착은 균의 배양조건이 혐기적이고 담즙이 있을 때에만 일어났고 *in vitro*에서 콜레스테롤 흡착능력이 높을수록 돼지의 혈청콜레스테롤을 낮추는 효과가 큰 것으로 나타났다. 위의 연구에서는 *L. acidophilus*의 몇몇 종이 소화관의 콜레스테롤에 직접 작용해서 콜레스테롤에 직접 흡착함으로써 혈청의 콜레스테롤을 떨어뜨린다고 하였고 Mott 등(18)도 장내 무균상태인 돼지에게 *L. acidophilus*를 투여하였을 때 혈

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: hrwon@mail.sangji.ac.kr  
Phone: 82-33-730-0496. Fax: 82-33-730-0403

청콜레스테롤이 낮아짐을 보고하였다. 발효유가 혈청콜레스테롤 낮추는 또 하나의 기전은 우유의 발효과정 중에 콜레스테롤 합성을 저해하는 대사물질이 생성됨으로서 일어난다는 보고도 있다(15,19).

본 연구는 우유속에 포함된 비피더스균 그 자체와 발효유의 혈청 콜레스테롤 저하 효과를 알아보기 위하여 내산성과 내담즙산성이 높은 비피더스 K-7을 건강한 20대 우리나라 사람의 장에서 분리하여 첨가한 우유와 경구로 섭취했을 때 낮은 PH에서 급격히 감소하는 비피더스균의 생존율을 높이기 위해(20) 비피더스균을 캡슐화하여 첨가한 우유, 또한 그 비피더스균으로 발효시킨 발효유를 흰쥐에게 급여하여 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 효과를 알아보고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 대변으로부터의 비피더스균의 분리

본 실험에 사용된 사용 균주의 분리동정 및 배양조건은 다음과 같다.

**공시 균주:** 20대의 건강한 성인으로부터 BSI agar(21)와 Beerens' agar(22,23)를 이용하여(Table 1) 비피더스균을 분리하였으며 이 중 *Bifidobacterium bifidum*으로 동정된 7균주 중에서 내산성과 내담즙성이 높은 *B. bifidum* K-7(24)을 공시 비피더스 균주로 선발하여 실험에 사용하였다.

**경구투여용 균주의 제조:** 대조군 CO와 처리군 MB, MM 및 FM은 각각 우유, 비피더스균이 첨가된 우유, 캡슐화된 비피더스균이 첨가된 우유 및 비피더스 발효유를 매일 2 mL씩 21일간 경구투여하였다. 처리군 MB와 MM의 시료를 제조하기 위하여 TPY broth에 계대 배양된 비피더스균을 0.2%를 접종하여 37°C에서 24시간 혐기 배양하였다. 처리군 MB는 배양액을 원심분리하여 얻은 비피더스균을 20% 탈지유에 분산시켜 -20°C에서 냉동 보관된 비피더스균을 우유에 분산시켜 흰쥐에게 경구투여하였다. 처리군 MM의 캡슐화된 비피더

스균을 제조하기 위하여 배양액을 원심분리한 후 0.4% yeast extract와 5% 탈지유를 함유한 생리식염수 용액에 분산하였다. 분산액을 칼슘-alginate법으로 캡슐화한 후 poly-L-lysine으로 coating하였다(20). 캡슐화된 비피더스균우유에 분산시킨 후 경구투여하였다. 처리군 MM의 비피더스 발효유를 제조하기 위하여 TPY broth에 계대 배양된 비피더스균을 우유에 0.5% 접종하여 37°C에서 24시간 혐기배양하였다. 발효유 커드를 분산시킨 후 경구투여하였다. 발효된 우유의 pH는  $4.3 \pm 0.2$ 이었다. 발효유는 5일에 한번씩 제조하였다.

**쥐에 투여된 비피더스 균수 측정:** 쥐에 투여된 균수를 계수하기 위하여 처리군 MB와 처리군 FM은 1% peptone 용액에 십진 희석하였다. 처리군 MM은 캡슐화된 비피더스균 0.5 g을 100 mL의 인공장액(0.5 M phosphate buffer; pH 6.8)에 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 용출시킨 후 용출액을 1% peptone 용액으로 십진 희석하였다. 적절한 배수로 희석된 시료는 TPY agar(25) 평판에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후에 생성된 colony를 계수하였다. 균수는 시료 1 mL(g)당 colony forming unit(CFU)로 계산하였다. 처리군 MB, MM 및 FM에서 매일 쥐 1마리 당 투여된 비피더스 균수는 각각 약  $10^9$  CFU,  $10^9$  CFU 및  $10^{10}$  CFU이었다

### 실험식이조성과 동물 사육

생후 21일된 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 32마리를 체중 200 g 정도로 성장할 때까지 pellet 고형사료(삼양식품)로 적응시킨 후 평균 체중(200 g)이 유사하도록 각 군마다 8마리씩 4군으로 나누어 완전임의 배치하고 개별 사육하였으며 3주간 대조군(control: CO)에는 실험 식이와 우유 2 mL/일, 비피더스균을 첨가한 우유군(milk added with bifidobacteria: MB)에는 실험 식이와 비피더스균을 첨가한 우유 2 mL/일, 캡슐화된 비피더스균(milk added with microencapsulated bifidobacteria: MM)을 첨가한 우유군에는 실험 식이와 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유 2 mL/일, 발효유군(fermented milk by bifidobacteria: FM)에는 실험 식이와 비피더스균으로 발효된 발효유 2 mL/일을 급여하였다. 실험 식이 조성은 Table 2와 같다. 실험 식이는 ad libitum으로 급여하고 우유, 비피더스균을 녹인 우유, 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유와 비피더스 발효유는 매일 일정한 시간에 2 mL씩 oral jonde로 경구 투여하였다.

### 시료 수집

3주간의 실험식이를 급여한 후 18시간 절식시킨 후 ether로 마취시킨 후에 경동맥 방혈로 채혈하였으며 채혈된 혈액은 냉장고에 24시간 방치 후 3000rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리 후 즉시 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤을 측정하고 나머지는 냉동 보관하여 분석에 사용하였다.

### 시료 분석

혈청의 총 지질은 Fringe와 Dunn의 방법(26)으로 측정하였고 혈청 중성지질, 인지질, 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테

Table 1. Composition of the selective media used to isolate wild strains from feces

<b>BSI agar</b>	
BL agar (Difco)	60.0 g
Sodium propionate	10.0 g
BS solution	15.0 mL
lithium chloride	15.0 g per 100 mL
paramomycin sulphate	0.25 g per 100 mL
neomycin sulphate	1.0 g per 100 mL
Distilled water	1,000 mL
<b>Beerens' agar</b>	
Columbia broth (Difco)	35 g
Glucose	5.0 g
Cysteine hydrochloride	0.5 g
Agar (final concentration $15 \text{ g l}^{-1}$ )	15 g
Propionic acid	5.0 mL
pH adjusted to 5.0 with NaOH	
Distilled water	1,000 mL

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredient	g/kg	Ingredient	g/kg
Casein	200	Cholesterol	10
Corn starch	460	DL-methionine	3
Cellulose	100	Mineral mixture <sup>1)</sup>	35
Corn oil	50	Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10
Beef-tallow	130	Choline-bitartrate	2

<sup>1)</sup>Mineral mixture: AIN-93.

<sup>2)</sup>Vitamin mixture: AIN-93.

물은 효소법(아산제약 kit)을 이용해 측정하였다.

통계 분석

실험 결과는 SPSS program을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었으며 각 실험군의 평균치간의 통계적 유의성은 F-test와 Duncan's multiple range test로 5% 유의수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

증체량, 식이 섭취량, 사료효율

고지방증 유발식이인 고지방식이(beef tallow 13%+corn oil 5%+cholesterol 1%)를 먹인 실험동물에게 우유, 비피더스균을 첨가한 우유, 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유와 비피더스균으로 발효시킨 발효유를 먹였을 때의 실험 동물의 체중증가량, 식이 섭취량, 사료효율은 Table 3과 같다.

본 실험에서는 증체량, 사료 섭취량, FER은 각 실험군간 유의한 차이를 나타내지 않았다. Rao 등(15)은 탈지유를 준 군

Table 3. Body weights, food intakes and feed efficiency ratios of four experimental groups

Group <sup>1)</sup>	Initial body weight (g)	Weight gain (g)	Feed intake (g)	FER <sup>2)</sup>
CO	201.1±3.3 <sup>3)</sup>	86.7±12.3	370.2±7.8	0.23±0.03
MB	201.0±3.2	94.9± 6.7	371.7±7.0	0.25±0.02
MM	201.6±3.4	94.3± 9.2	372.2±7.8	0.25±0.02
FM	201.0±3.4	92.2± 9.2	369.5±7.7	0.24±0.02

<sup>1)</sup>CO: milk only, MB: milk added with bifidobacteria, MM: milk added with microencapsulated bifidobacteria FM: fermented milk by bifidobacteria.

<sup>2)</sup>FER: Weight gain/food intake.

<sup>3)</sup>Values are expressed as mean±SD.

Table 4. Total lipid, total and HDL-cholesterol, phospholipid and triglyceride concentration in serum of four experimental groups (mg/dL)

Group <sup>1)</sup>	Total lipid	Total cholesterol	HDL-cholesterol	Phospholipid	Triglyceride
CO	324.0±38.9 <sup>2)</sup>	118.8±12.3 <sup>3)</sup>	30.3±21.6	63.2±2.8 <sup>a</sup>	34.1± 9.1
MB	291.6±49.1	137.3±14.5 <sup>b</sup>	22.7± 7.4	64.9±4.6 <sup>a</sup>	36.0± 2.6
MM	220.7±54.6	123.0±11.0 <sup>b</sup>	41.4± 11.8	67.1±3.6 <sup>ab</sup>	36.0± 5.4
FM	256.6±69.2	92.1±18.3 <sup>c</sup>	25.4±18.1	69.8±3.2 <sup>b</sup>	36.7±10.6

<sup>1)</sup>See the legend of Table 3.

<sup>2)</sup>Values are expressed as mean±SD.

<sup>3)</sup>Values with different letters with in a same column experimental groups are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

이 Thermophilus 발효유를 준 군보다 증체량이 높았으나 동시에 고형사료의 섭취량도 동시에 높았다. Grunewald(14)는 *L. acidophilus*군으로 발효시킨 skim milk를 실험동물에게 급여했을 때 증체량이나 식이 섭취량에는 유의차가 발견되지 않았다고 보고하였다.

혈청의 지질 농도

각 실험군 별 혈청의 총 지질, 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 인지질과 중성지질 함량은 Table 4와 같다.

혈청의 지질 농도는 총 콜레스테롤과 인지질 농도가 실험군 간의 유의한 차이를 나타내고 있다. 즉 발효유군이 혈청 총 콜레스테롤 농도가 다른 실험군보다 낮게 나타났다. Mann 등(10,12)과 Hepner 등(11)은 사람에게 상업용 요구르트와 *L. acidophilus* 발효유를 먹였을 때 혈청 콜레스테롤 효과가 있음을 보고하였고 Nair와 Mann(27)은 이 효과가 우유에서 젖산균에 의해 생성된 대사물질일 가능성을 제시하였다.

본 실험에서도 대조군과 비피더스균을 첨가한 우유와 캡슐화된 젖산균을 첨가한 우유를 먹인 군에서는 혈청 콜레스테롤 저하 효과가 나타나지 않았는데 이는 발효유의 혈청 콜레스테롤을 낮추는 효과가 젖산균 그 자체보다는 우유가 발효되는 과정에서 생성된 대사물질일 가능성을 확인해 주고 있다.

Rao 등(15)도 전유와 발효유의 메탄올 용해 물질을 취에게 투입하여 혈청 콜레스테롤을 측정한 결과 발효유에서 추출한 메탄올 용해물질이 혈청 콜레스테롤을 낮추는데 가장 효과적이었다. 또한 이 실험에서는 *in vitro* 실험도 병행되었는데 간조직 균질액의 콜레스테롤 합성을 측정한 결과 발효유의 경우 콜레스테롤 흡착이 많아 간조직의 콜레스테롤 수준은 발효유군이 탈지유군보다 낮았다. 이 결과는 발효유에서 나온 메탄올 용해물질이 콜레스테롤 합성을 저해하는 작용을 우유가 발효되는 동안 생성된 메탄올 용해물질이 원인이라고 설명하고 있다.

Gilliland 등(16)은 *in vitro*에서 콜레스테롤 흡착 효과가 높은 *L. acidophilus*를 돼지에게 입으로 투여했을 때 혈청 콜레스테롤의 효과가 있다는 보고를 했는데, 본 실험에서 비피더스균을 첨가한 우유와 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유는 효과가 나타나지 않았다.

인지질의 경우 발효유군과 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유군간의 경우 높게 나타났다. HDL과 중성지질의 경우는

실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

따라서 본 실험의 결과는 발효유의 혈청 콜레스테롤을 낮추는 효과는 발효유 속의 비피더스균 자체보다는 발효유가 더 효과적이라는 결과를 얻었다. 따라서 발효 중 생성되는 대사물질의 정확한 성분 규명을 위한 지속적인 연구의 필요성이 앞으로의 과제로 남아 있다.

## 요 약

본 연구는 건강한 20대 한국 성인의 장에서 내산성과 내담즙성이 강한 비피더스균을 분리하여 비피더스균의 혈청 콜레스테롤 저하 효과를 알아보기 위하여 체중 200 g 정도 되는 Sprague-Dawley종 흰쥐 숫컷을 대상으로 우유, 비피더스균을 첨가한 우유, 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유와 비피더스균에 의해 발효된 발효유를 투여한 결과 우유, 비피더스균을 첨가한 우유와 캡슐화된 비피더스균을 첨가한 우유를 투여한 실험군에서는 혈청 콜레스테롤 저하 효과가 나타나지 않았으나 비피더스 발효유를 먹인 실험군에서는 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 효과를 볼 수 있었으므로 혈청 콜레스테롤 저하 효과를 나타내는 것은 발효유에 있는 젖산균 자체가 아니라 발효유라는 결과를 얻었다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 농림부 특정연구사업비 지원에 의하여 수행된 결과로서 이에 감사드리며 본 실험에 사용된 마이크로캡슐화 비피더스균을 제공해 주신 강원대학교 약학대학 이법진 교수님께 감사드립니다.

## 문 헌

- Atherosclerosis study group : Optimal resources for primary prevention of atherosclerotic disease. *Circulation*, **70**, 157-205 (1984)
- Hauner, H., Stangl, D., Schmatz, C., Burger, K., Blomer, H. and Pfeiffer, E.F. : Body fat distribution in men with angiographically confirmed coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **85**, 203-210 (1990)
- Law, M.R., Wald, N.J., Wu, T., Hackshaw, A. and Bailey, A. : Systematic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischaemic heart disease in observational studies: data from the BUPA study. *British Medical Journal*, **308**, 363-366 (1994)
- Fernandez, M.L. and Macnamara, D.J. : Dietary fat saturation and chain length modulate guinea pig hepatic cholesterol metabolism. *J. Nutr.*, **124**, 331-339 (1994)
- National Nutrition Survey Report Ministration of Health and Welfare (1994)
- Lee, J.H. : The effect of Korean dietary life changes on health and diseases. *Korean J. Dietary Culture*, **8**, 359-372 (1993)
- Kwon, T.W. and Kang, S.K. : Development of food engineering and our dietary life. *Korean J. Dietary Culture*, **8**, 351-357 (1993)
- The Bureau Statistics (a). Annual statistical report on the causes of death in 1998 (1999)
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. : The effect of milk and *Lactobacillus* milk feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 756-761 (1984)
- Mann, G.V. and Spoerry, A. : Studies of surfactant and cholesterolemia in Maasai. *Am. J. Clin.*, **27**, 464-469 (1974)
- Hepner, G., Fried, R., Jeor, S.st., Fusetti, L. and Morin, R. : Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 19-24 (1979)
- Mann, G.V. : A factor in yogurt which lowers cholesterol in man. *Atherosclerosis*, **26**, 335-340 (1997)
- Harrison, V.C. and Peat, G. : Serum cholesterol and bowel flora in the new born. *Am. J. Clin. Nutr.*, **28**, 1351-1355 (1975)
- Grunewald, K.K. : Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.*, **47**, 2078-2079 (1982)
- Rao, D.R., Chawan, C.B. and Pulusani, S.R. : Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterologenesis in rats. *J. Food Sci.*, **46**, 1339-1341 (1981)
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. : Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 377-381 (1985)
- Rasic, J.L., Vujicic, I.F., Skinger, M. and Vulic, M. : Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnology Letters*, **14**, 39-44 (1992)
- Mott, G.E., Moore, R.W., Redmond, H.E. and Reiser, R. : Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol fed piglets. *Lipids*, **8**, 428-431 (1973)
- Thakur, C.P. and JHA, A.N. : Influence of milk, yoghurt and calcium on cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, **39**, 211-215 (1981)
- Cui, J.H., Goh, J.S., Kim, B.H., Choi, S.H. and Lee, B.J. : Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate polylysine microparticles. *Int. J. Pharmaceutics*, **210**, 51-59 (2000)
- Mitsuok, T., Sega, T. and Yamamoto, S. : Eine verbesserte methodik der gualitative and guantitative a nalyse der darmlflora von menschen und tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 1 Orig. Reiche.*, **195**, 455-469 (1965)
- Beerens, H. : An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Appl. Microbiol.*, **11**, 155-157 (1990)
- Beerens, H. : Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2418-2419 (1991)
- Kwon, W.H. : Molecular genetical identification and physiological characterization of probiotic *Bifidobacterium* spp. *M.S. Thesis*, Sangji University (1999)
- Scardovi, V. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, London, p.1418 (1986)
- Fringe, C.S. and Dunn, R.T. : A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfphosovanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.*, **53**, 89-91 (1970)
- Nair, C.R. and Mann, G.V. : A factor in milk which influences hypocholesteremia in rats. *Atherosclerosis*, **26**, 363-367 (1977)

(2001년 4월 6일 접수)