

In Vitro 법에 의한 식이섬유의 혐기적 발효 및 수화 잔여물의 무게

이 경 숙 · 이 서 래

이화여자대학교 식품영양학과

Anaerobic Fermentation and Weight of Hydrated Residue of Dietary Fibers *in vitro*

Lee, Kyung-Sook · Lee, Su-Rae

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul, Korea

ABSTRACT

This study was conducted in order to establish an *in vitro* method simulating the physiological function of fibers along the large intestine of humans. Commercial fibers including guar gum, apple pectin, citrus pectin, CM-cellulose, alginic acid and *a*-cellulose, and dietary fiber residues obtained from rice bran, barley, soybean, Korean cabbage, apple, tangerine and sea mustard were employed to determine the water-holding capacity, weight of hydrated residue and fiber content after anaerobic fermentation using human fecal inoculum for 24 hours, followed by dialysis under osmotic suction pressure.

The weight of hydrated residue in commercial fibers was in the decreasing order of CM-cellulose > alginic acid, *a*-cellulose > apple pectin, citrus pectin > guar gum and that in food fiber residues was in the decreasing order of rice bran, sea mustard > soybean > tangerine, Korean cabbage > barley > apple. It was demonstrated that the larger the weight of hydrated residue was, the more the weight of human stool increased. Consequently this *in vitro* method can be used as a preceding test before undertaking animal or human experiment to predict the physiological effects of fiber residues from diverse food samples as well as commercially refined fibers.

KEY WORDS : dietary fiber · anaerobic fermentation · weight of hydrated residue · *in vitro*.

서 론

식이섬유는 그의 종류에 따라 대장내 혐기성 발효 정도가 달라 대장을 통과할 때 생리적 기능이 달라질 수 있다. 특히 불용성 식이섬유는 대장내 미생물의 작용을

채택일: 1995년 10월 4일

적게 받아 비발효 잔사로 남게 되며 대장내에서 식이섬유의 matrix가 그대로 유지되어 대변의 부피를 증가시키는 데 효과적인 것으로 보고되고 있다¹⁾. 그 외에도 식이섬유는 장내세균의 기질로 이용되어 휘발성 지방산을 생성하고 장의 pH를 저하시킴으로써 발암물질 생성을 저하시키며 세균의 증식으로 인한 대변 무게의 증가, 대

변의 통과시간 단축, 그리고 변비 예방과 같은 생리적 효과가 보고되고 있다²⁻⁷⁾.

식이섬유의 함량 분석에서 효소중량법⁸⁻¹⁰⁾은 널리 이용되고 있지만 영양소의 소화흡수 및 대사작용에 미치는 식이섬유의 생리적 기능을 나타내는 지표로 이용되지는 못하고 있다. 따라서 식이섬유의 함량을 알기 위한 분석 방법과 아울러 생리적 기능을 예측할 수 있는 *in vitro*법의 확립이 요구되고 있다. 그러나 *in vitro*법의 연구는 매우 미진한 상태이며 실제적인 인체내 생리적 효과를 정확하게 설명하기 어렵거나 일치하지 않는 경우가 흔히 있다¹¹⁻¹³⁾.

본 연구에서는 대장관내 식이섬유의 생리적 기능을 예측하기 위하여 지금까지 여러 연구자에 의하여 실시되어 왔던 *in vitro* 조건을 다음과 같이 보완하였다. 첫째, 식이섬유의 수분 보유력(water-holding capacity)을 측정하기 위해 AACC에서 추천한 원심분리법¹⁴⁾은 불용성 식이섬유에만 적용되는 단점이 있으므로 생리적 조건과 유사한 반투막을 이용함으로써 불용성 뿐만 아니라 수용성 식이섬유의 수분 보유력까지 측정할 수 있도록 하였다. 둘째, 일반적인 투석막의 투과구멍(pore size: M.W. cut-off)은 12,000이어서 고분자 물질도 통과시키므로 M.W. cut-off가 1,200인 특수한 투석막을 사용하였

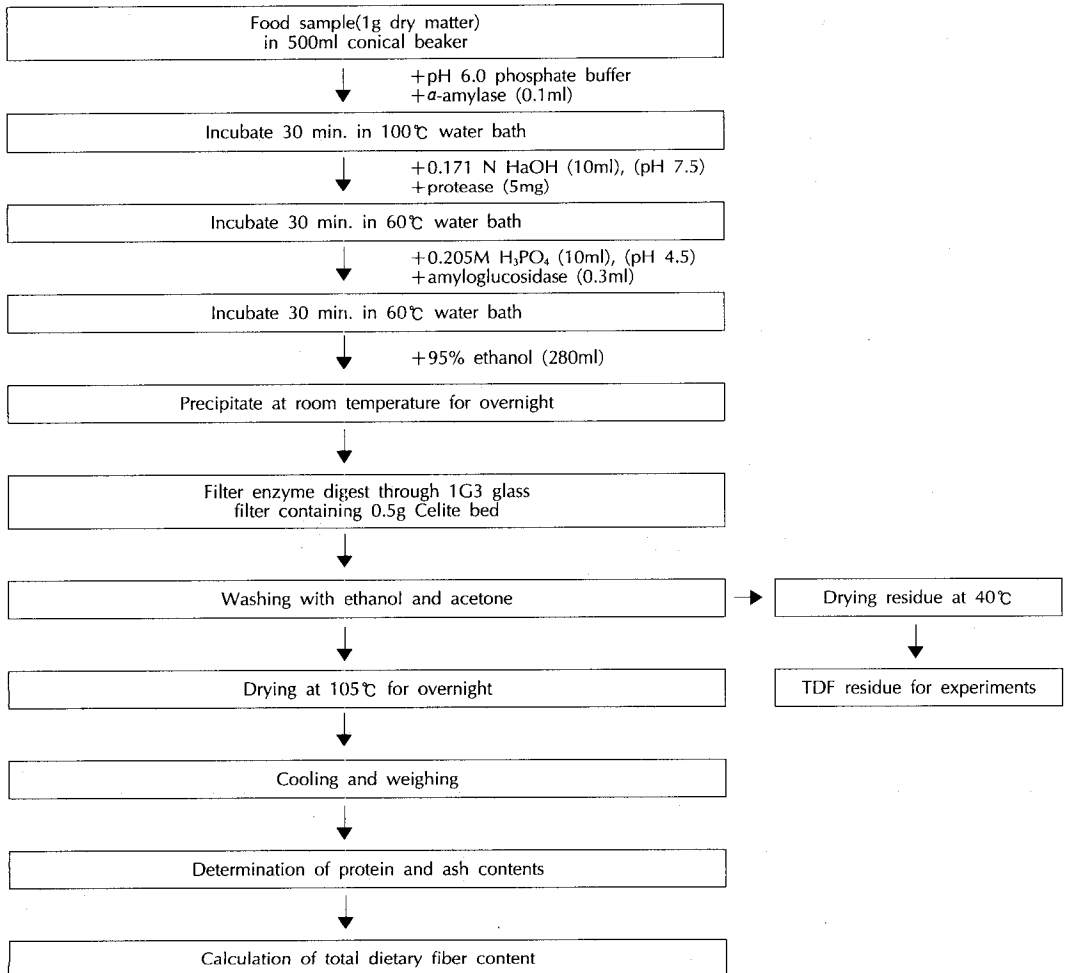


Fig. 1. Schematic diagram for the extraction and determination of total dietary fiber(TDF) from food samples by AOAC method^{9,10)}.

식이섬유의 혐기적 발효 및 수화

다. 세째, 식이섬유 자체의 수분 보유력과 대변 무게가 일치하지 않는 점을 보완하기 위하여 대장내 미생물상 (fecal microflora)을 이용한 혐기성 발효를 시도하였다. 네째, 일상적으로 섭취하고 있는 천연 식품중 식이섬유의 효과를 알기 위하여 시판용 정제 식이섬유 뿐만 아니라 식품에서 추출한 식이섬유를 이용하였다.

따라서 본 실험은 대장관 통과시 식이섬유의 생리적 효과를 예측하기 위하여 시판용 식이섬유와 천연 식품에서 추출한 식이섬유에 대하여 투석(dialysis)과 발효(fermentation)에 기초한 *in vitro*법을 구사하여 식이섬유의 수분 보유력, 혐기성 발효후 수화 잔여물의 무게, 비발효 식이섬유 함량 및 분해율을 조사하였다. 이와 아울러 여기에서 얻은 *in vitro* 실험 결과를 다른 연구자들의 동물실험 또는 인체실험 결과와 비교함으로써 선행실험으로써의 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 식이섬유 시료

식이섬유의 생리적 기능을 측정하기 위해 사용된 시판용 식이섬유로는 guar gum(Sigma G-4129), apple pectin(Sigma P-2157), citrus pectin(Sigma P-9135), carboxymethyl cellulose(Sigma C-4888, so-

dium salts), alginic acid(Sigma A-2033, sodium salts)를 사용하였다.

천연 식품 중 식이섬유는 각 식품군의 대표적인 쌀겨, 보리쌀, 대두, 배추, 사과, 굴, 미역을 냉동건조, 탈지과정(대두) 또는 탈당과정(사과, 굴)을 거친 분말시료에 대하여 AOAC에서 공인된 Prosky 방법⁸⁾⁹⁾을 통해 효소 처리 후 total dietary fiber residue를 얻었다(Fig. 1). 이것을 40℃에서 건조시킨 후 수분, 조회분, 조단백질 함량을 분석한 다음 식이섬유 함량을 계산하였다(Table 1).

2. 수분 보유력 측정법

식이섬유의 수분 보유력(water-holding capacity: WHC)은 장관내의 조건을 모방하여 투석막을 통해 2기압의 삼투압 조건하에서 수화시키는 방법으로 측정하였다¹³⁾. 즉 투석막(Sigma D-7884)을 10cm 길이로 자른 후 0.1% sodium azide 용액에 하룻밤 담근 뒤 한 쪽 끝을 실로 단단하게 묶은 후 투석막 내부에 40℃에서 하룻밤 재건조시킨 섬유 시료 0.1g을 넣고 시료를 수화시키기 위해 0.1% sodium azide 용액 5ml를 가하였다. 나머지 투석막 끝도 단단히 묶은 후 뚜껑이 있는 150ml 용량의 용기에 넣어 24시간 동안 수화시켰다. 여기에 대장내에서 나타나는 약 2기압¹⁵⁾의 삼투압을 맞추기 위하여 0.1% sodium azide 용액 1L 당 95g의 polyethylene glycol(PEG: 분자량 3350, Sigma P-3640)을 넣어 만든 용액 100ml을 첨가한 후 37℃ water bath에서 용기가 잠기게 하여 25 rpm으로 72시간 동안 shaking하였다. 그 다음 용기의 뚜껑을 열어 투석막 외부의 수분을 가볍게 닦아낸 후 무게 달은 aluminium dish에 옮겼다. 수화된 시료는 즉시 무게를 재었으며(W₁), 이것을 100℃에서 하룻밤 건조시킨 후 다시 무게를 재었다(W₂). Control의 경우는 섬유 시료를 제외하고 0.1% sodium azide 용액 5 ml만을 더한 후 모든 절차를 동일하게 하였다(W_{c1}, W_{c2}). 식이섬유의 수분 보유력은 다음과 같이 계산한 다음 건조 시료 1g 당 보유된 수분의 g수로 표현하였다.

$$\text{WHC} = \frac{\text{g water (fiber)} - \text{g water (control)}}{\text{g dry material}}$$

$$= \frac{(W_1 - W_2) - (W_{c1} - W_{c2})}{\text{g dry material}}$$

Table 1. Composition of commercial fibers and total dietary fiber(TDF) residues from food sources* (unit : %)

Fiber sample	TDF	Moisture	Ash	Protein
Guar gum	90.0	7.8	1.3	0.9
Apple pectin	85.3	8.8	5.4	0.5
Citrus pectin	88.5	7.2	4.0	0.3
CM-cellulose	75.0	8.8	16.3	Tr
Alginic acid	69.7	10.9	19.4	Tr
α -Cellulose	96.9	2.7	0.4	Tr
Rice bran	70.3	7.1	19.9	2.7
Barley	86.4	6.1	4.6	3.0
Soybean	78.8	7.2	11.2	2.9
Korean cabbage	73.0	6.7	18.7	1.6
Apple	87.1	6.9	5.3	0.7
Tangerine	79.9	7.5	11.7	1.0
Sea mustard	68.2	7.9	21.5	2.4

*Mean of triplicate determinations. Tr : trace

3. 장내 세균에 의한 혐기성 발효방법

대장내 미생물 급원으로 인체의 대변을 이용하여 식이 섬유를 혐기적으로 발효시킨 후 수화 잔여물의 무게 (weight of hydrated residue) 및 수용성(soluble dietary fiber: SDF), 불용성(insoluble dietary fiber: IDF), 총 식이섬유(total dietary fiber: TDF) 함량을 분석함으로써 식이섬유의 종류에 따른 분해율을 살펴 보았다(Fig. 2).

1) Inoculum의 제조

신선한 대변 40g을 pH 7 anaerobic dilution 용액¹⁶⁾ 360 ml에 분산시킨 다음 섬유질 분해 미생물군 (cellulolytic microbiota)을 대변내 섬유질층(fecal fiber matrix)으로 부터 분리시키기 위해 분쇄기에서 30초간 갈았다. 그 후 섬유질을 제거하기 위하여 두겹

의 무명천을 통과시킨 다음 여과액을 inoculum으로 사용하였다.

대변 제공자는 지난 1년간 항생제를 먹지 않은 한 사람을 선정하였으며 실험 1주일 전부터 식이 섬유가 1일 20g 이상 섭취되도록 한국인의 전통식사인 한식을 중심으로 식사하도록 조치하였으며 현미, 보리쌀, 과일, 채소의 충분한 섭취를 권장하였다.

2) 혐기성 배지의 조제 및 배양

Titgemeyer 등이 사용한 혐기성 배지²⁾는 cysteine을 제외한 모든 재료를 함께 섞어 가압 살균하였다. 식이 섬유를 수화시키기 위해 배양 하루전에 50ml 원심분리관에 40℃에서 하루밤 재건조시킨 섬유 시료 0.35g과 혐기성 배지 30ml를 더한 후 냉장고에 보관하였다. 이것을 다음날 다시 가압 살균시킨 후 37℃로 냉각되었을때

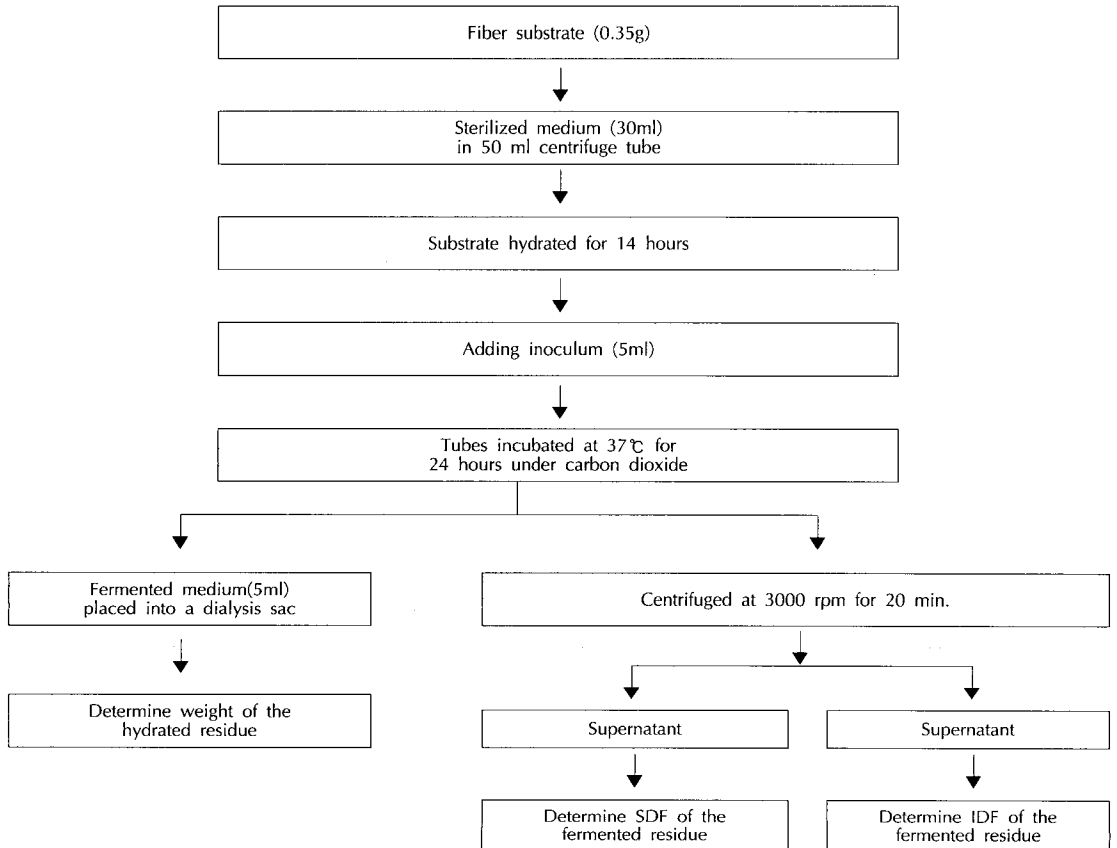


Fig. 2. *In vitro* fermentation scheme for the determination of hydrated residue weight and dietary fiber contents.

CO₂ 97%, H₂ 3%의 혼합가스하에서 cysteine을 첨가한 후 inoculum 5 ml를 첨가시켰다. 이때 배지에 첨가된 혐기 조건의 지시약인 resazurin의 색이 없어지는 것을 관찰할 수 있었다. 모든 실험 기구 및 용기는 가압 살균 후 사용하였다.

혐기성 상자안에서 resazurin의 색이 무색을 유지하도록 CO₂, H₂ 혼합가스를 흘려 보내면서 혐기 상태를 유지시켰으며 원심 분리관을 37℃ water bath에 위치시킨 후 가끔 흔들어 주면서 24시간 동안 배양시켰다. 혐기성 배양은 원심분리관을 혐기성 상자에서 꺼내어 냉장고(4℃)에 보관시키는 것으로 정지시켰다.

3) 혐기성 발효후 수분 보유력 측정

식이섬유의 혐기성 발효후 배양액 5 ml를 투석막 (Sigma D-7884)에 넣고 단단히 묶었다. 이것을 0.1% sodium azide 용액 1 L당 95 g의 polyethylene glycol을 넣은 용액 100 ml가 들어있는 뚜껑 있는 150 ml 용기에 넣어 37℃ water bath 안에서 25 rpm으로 72시간 동안 shaking하였다. 나머지 조작은 앞에서 언급된 식이섬유의 수분 보유력에서와 동일하게 실시하였다.

4. 혐기성 발효후 식이섬유 성분의 정량방법

식이섬유중 수용성, 불용성, 총 식이섬유의 함량은 AOAC에서 승인된 Lee 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 정량하였다.

1) 비발효 불용성 식이섬유의 함량

원심분리관에서 식이섬유의 혐기성 배양을 24시간 실시한 후 수분 보유력을 측정하기 위하여 배양액 5 ml를 취한 다음 이 원심분리관을 Sorvall RT 6000B refrigerated centrifuge로 3000 rpm에서 20분간 원심분리시켰다.

무게를 제어둔 1G3 여과용 유리도가니에 Celite 545 1 g을 넣고 H₂O를 흘려 보내어 도가니 안의 Celite를 적셔 가라앉게 하였다. 여기에 원심분리시킨 상정액을 옮겨 미리 무게 달아둔 비커에 모이도록 흡인, 여과하고 다시 70℃ H₂O 10 ml씩 2번으로 침전물을 씻어내었다. 여과액 및 행굼액은 모아 무게 및 부피를 재고 500 ml 코니칼 비커에 옮겨 비발효 수용성 식이섬유의 측정용으로

사용되었다.

위의 1G3 여과용 유리도가니에 남은 침전물은 78% ethanol 15 ml씩으로 2번, 95% ethanol 15 ml씩으로 2번, acetone 15 ml씩으로 2번 씻어내었다. 그 다음 침전물이 들어있는 도가니를 105℃ 전기 오븐에서 하룻밤 건조시키고 130℃에서 2시간 방치 후 desiccator에 옮겨서 15분 방냉시켜 0.1 mg까지 무게를 재었다. 여기에서 도가니와 Celite의 무게를 빼어 침전물의 무게를 계산하였다.

6개의 시료중 3개는 micro-Kjeldahl법¹⁷⁾으로 단백질량을 측정하였으며 질소계수는 6.25를 적용하였다. 나머지 3개의 시료는 회분 정량을 위해 사용되었으며, 그 절차는 525℃에서 5시간 회화시킨 다음 회화로를 끄고 하룻밤 방치시키고 130℃에서 2시간 방치 후 desiccator에서 15분 방냉시켜 무게를 잴으로써 회분량을 계산하였다. Blank량은 시료를 첨가하지 않고 혐기성 배양부터 모든 과정을 동일하게 거쳐 구하였다.

2) 비발효 수용성 식이섬유의 함량

위 과정에서 1G3 여과용 유리도가니를 통해 얻은 여과액 및 행굼액에 그 부피의 4배에 해당하는 미리 60℃로 맞추어 둔 95% ethanol을 더하여 실온에서 하룻밤 동안 침전물이 형성되도록 하였다.

무게를 제어둔 1G3 여과용 유리도가니에 Celite 545 1 g을 깔고 여기에 위에서 얻은 침전물을 옮겨 흡인, 여과하고 78% ethanol 15 ml씩으로 2번, 95% ethanol 15 ml씩으로 2번, acetone 15 ml씩으로 2번 씻어내었다. 그 다음 절차는 비발효 불용성 식이섬유 정량방법과 동일하게 수행하였다.

식이섬유 함량은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Blank(B)} = R - P - A$$

$$\text{Dietary fiber(\%)} = (R - P - A - B) / M \times 100$$

여기에서 R는 발효물중 침전물의 무게, P는 단백질량, A는 회분량, B는 blank량이고 M은 시료의 무게이다.

3) 비발효 총 식이섬유의 함량

비발효 총 식이섬유의 함량은 위에서 정량된 수용성 식이섬유와 불용성 식이섬유의 함량을 더하여 구하였다.

5. 통계처리

발효전 수분 보유력 및 발효후 수화 잔여물의 무게 자료들의 경우 SAS(Statistical Analysis System)¹⁸⁾ package를 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 식이섬유 시료들에 대하여 실험조건간의 차이를 배제하기 위하여 각 반복은 동시에 실시하였다. 식이섬유의 첨가 유무 및 급원에 따른 차이를 살펴보기 위하여 각 실험반복들은 쌍(pairs)으로 설정하였으며 두 group을 비교하는 paired t-test를 이용하여 각 군 평균치들간의 유의성을 검증하였다. 검정시 p값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의하다고 보았다.

결과 및 고찰

1. 발효전 수분 보유력

투석막을 이용한 식이섬유의 수분 보유력(water-holding capacity)은 식이섬유를 첨가하지 않은 control과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보이지 않은 guar gum, α -cellulose, 보리쌀을 제외하고($p > 0.05$) 대부분의 경우 높게 나타났다($p < 0.0001$). 시판용 식이섬유의 수분 보유력은 Fig. 3과 같다. 수용성 식이섬유 중 alginic acid와 CM-cellulose는 수분 보유력이 건조

물 1 g당 28 g 이상으로 가장 높게 나타났고 apple pectin, citrus pectin은 이 보다 낮은 11~15g의 수분보유력을 나타냈다. Guar gum의 경우는 오히려 negative값을 보였는데 이는 control로 사용된 0.1% sodium azide 용액 보다 더 많은 수분이 투석막으로 부터 제거되었기 때문이다. 따라서 guar gum은 점성이 매우 높은 식이섬유이지만 수분 보유력에 있어서는 효과가 없는 것으로 나타났다. 불용성 식이섬유인 α -cellulose의 경우에도 수분 보유력이 거의 없는 것으로 나타났다.

식품에서 얻은 식이섬유의 수분 보유력은 Fig. 4와 같다. 대두, 미역의 경우 건조물 1 g당 14g 이상의 수분을 보유함으로써 높게 나타났으며 굴, 배추, 0쌀겨, 사과 의 경우 7-10g, 보리쌀의 경우 1g 이내로 낮게 나타났다.

식이섬유의 섭취량을 증가시키면 대변의 무게가 증가된다는 보고가 있으며³⁻⁶⁾¹⁹⁾ 식이섬유의 수분 보유력이 클수록 대변의 무게가 증가될 것으로 추정하였다²⁰⁾. 그러나 인체실험의 경우 대변의 무게는 일반적으로 수분 보유력이 큰 수용성 식이섬유에 비해 수분 보유력이 낮은 cellulose, bran 등의 불용성 식이섬유에 의해 훨씬 더 증가한 것으로 보고되었다³⁻⁶⁾¹⁹⁾. 따라서 식이섬유의 수분 보유력은 대변의 무게와는 상관성이 적은 것으로

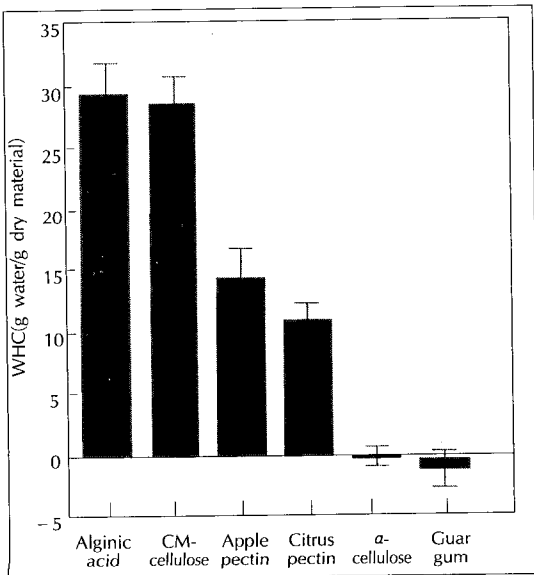


Fig. 3. Water-holding capacity by dialysis method of commercial fibers (Mean \pm SD of 6 replications).

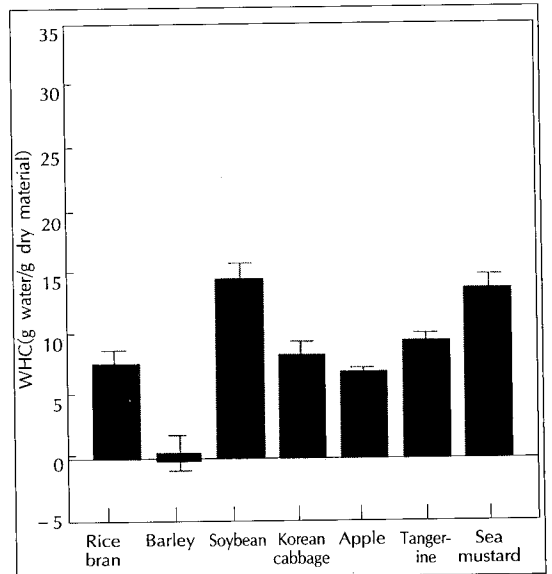


Fig. 4. Water-holding capacity by dialysis method of food TDF residues (Mean \pm SD of 6 replications).

식이섬유의 혐기적 발효 및 수화

Table 2. Water-holding capacity of residue after fermentation of commercial fibers and food TDF residues

Samples	WHC before fermentation(g/g)	WHC after fermentation(g/g)	Weight of hydrated residue(g)	Dry-weight of residue(g)
Control(ferment. medium)	—	10.00±0.47	2.27±0.08 ^e	0.206±0.008
CM-cellulose	28.77±2.11 ^{e+}	11.80±0.84	3.02±0.12 ^f	0.236±0.015
Alginic acid	9.49±2.46 ^e	10.34±0.57	2.30±0.14 ^e	0.207±0.020
α -Cellulose	0.23±0.76 ^a	8.08±0.62	2.25±0.11 ^e	0.248±0.017
Apple pectin	14.72±2.34 ^d	9.20±0.41	1.57±0.08 ^b	0.155±0.012
Citrus pectin	11.32±1.37 ^c	8.68±0.38	1.52±0.11 ^b	0.157±0.008
Guar gum	-0.77±1.42 ^a	8.48±0.56	1.43±0.13 ^a	0.151±0.010
Rice bran	7.97±1.15 ^b	8.87±0.29	2.37±0.20 ^e	0.240±0.019
Barley	0.65±1.45 ^a	8.60±0.44	1.67±0.12 ^{bc}	0.174±0.008
Soybean	14.91±1.29 ^d	8.91±0.51	2.13±0.10 ^d	0.216±0.009
Korean cabbage	8.78±1.06 ^b	8.93±0.61	1.89±0.16 ^c	0.191±0.015
Apple	7.39±0.31 ^b	9.08±0.71	1.55±0.22 ^a	0.150±0.019
Tangerine	9.96±0.62 ^c	9.84±0.69	1.95±0.19 ^c	0.180±0.017
Sea mustard	14.25±1.13 ^d	9.62±0.81	2.32±0.24 ^e	0.218±0.013

⁺Mean±SD of 6 determinations

Means with different superscript letters within the same row are significantly different at p<0.05 by paired t-test.

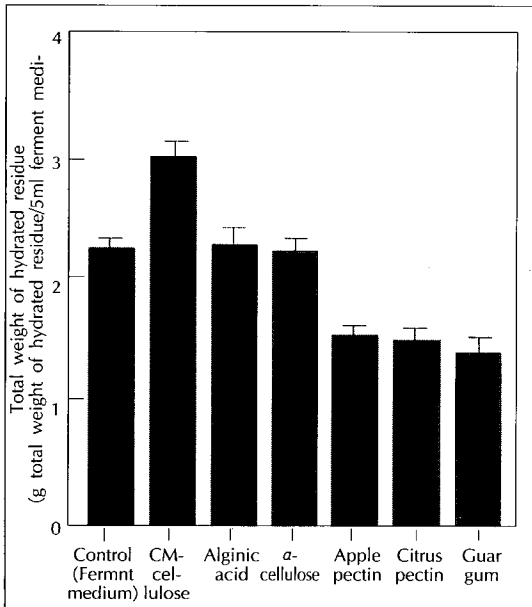


Fig. 5. Weight of hydrated residue by dialysis method of the fermentation residues from commercial fibers (Mean±SD of 6 replications).

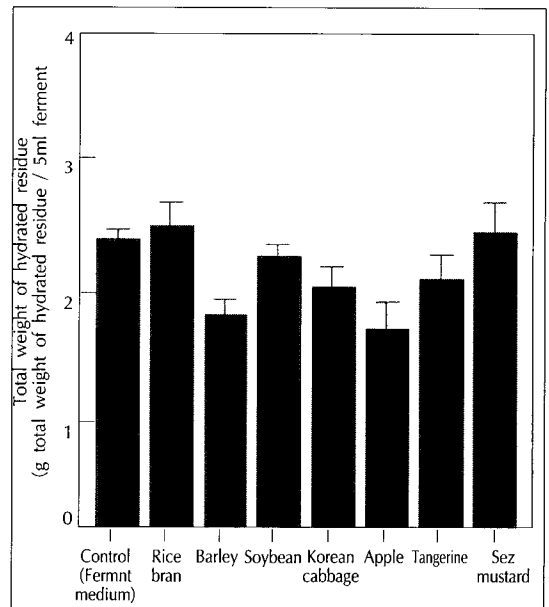


Fig. 6. Weight of hydrated residue by dialysis method of the fermentation residues from food TDF residues (Mean±SD of 6 replications).

나타났으며 이와 같은 사실은 이미 지적된 바도 있다²¹⁾. 그 이유로서는 대변의 형성 과정중 식이섬유가 대장내의 미생물에 의해 분해과정을 거치기 때문이라 생각되며 본 연구에서 시도한 바와 같이 혐기성 발효를 거친 후 식이섬유의 수화 잔여물의 무게를 측정하는 것이 타당할 것

으로 판단된다.

2. 혐기성 발효후 수화 잔여물의 무게

대장내 미생물 급원으로 대변을 이용한 식이섬유의 혐기성 발효후 수분 보유력 및 수화 잔여물의 무게

Table 3. Comparison between weight of hydrated residue by dialysis method and stool weight in human trials for some dietary fibers

Samples	Weight of hydrated residue (g/5 ml ferment medium)	Stool weight in human trials ^{3,6,19)}				Reference
		No dietary fiber (g/day)	Dietary fiber (g/day)	Fiber/no fiber ratio	Feeding conditions ^a (g/days/subjects)	
<i>α</i> -Cellulose	2.25	132.6	207.8	1.56	15/28/10	(3)
Citrus pectin	1.52	107.3	137.9	1.29	30.8/·/15	(4)
Guar gum	1.43	67.9	76.2	1.21	5.7/14/6	(5)
Rice bran	2.37	120	183	1.53	16/21/8	(19)
		95.5	197.0	2.06	18.0/21/6	(6)
Korean cabbage	1.89	(cf : wheat bran)				
		88.2	142.5	1.62	18.3/21/6	(6)
		(cf: cabbage)				
Apple	1.55	141.0	203.2	1.44	21.9/21/6	(6)

^a Daily dietary fiber supplemented / duration of study / number of subjects

Table 4. Contents of soluble, insoluble, and total dietary fibers in the commercial fibers and food TDF residues after in vitro anaerobic fermentation (Unit : %)

Fiber sample	Soluble	Insoluble	Total
Guar gum	4.91 ± 0.04 ^a	4.61 ± 0.25	9.52
Apple pectin	5.74 ± 0.40	2.80 ± 0.43	8.54
Citrus pectin	4.79 ± 0.72	4.01 ± 1.08	8.80
Rice bran	0.49 ± 0.07	36.31 ± 1.17	36.80
Barley	7.25 ± 0.65	13.43 ± 0.71	20.68
Soybean	6.43 ± 1.06	16.33 ± 0.95	22.76
Korean cabbage	7.04 ± 0.51	7.44 ± 0.43	14.48
Apple	5.90 ± 1.01	6.76 ± 1.47	12.66
Tangerine	5.41 ± 0.92	13.97 ± 1.32	19.38
Sea mustard	7.90 ± 0.80	12.06 ± 0.52	19.96

^aMean ± SD of triplicate determinations

(weight of hydrated residue)를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 식이섬유의 혐기성 발효후 잔여물의 수분 보유력은 발효전 수분 보유력의 경우에서와 같이 대변의 무게와 상관성이 적은 것으로 나타났다. 그 이유는 발효과정중 식이섬유의 분해로 인한 수분 보유력의 감소와 더불어 혐기성 미생물체의 증식에 따른 것으로 추정된다. 반면 수화 잔여물의 무게와 대변 무게와의 관련성을 6개 식이성분에 대하여 살펴본 결과 Table 3에서 볼 수 있는 바와 같이 높은 상관성이 관찰되었다. 이는 여러 논문에서 식이섬유의 발효전 수분 보유력과 체내 대변의 무게가 일치하지 않았던 문제점을 설명할 수 있게 되었다고 생각된다.

Table 5. Degradation of commercial and food dietary fibers by in vitro anaerobic fermentation (Unit : %)

Fiber sample and source	TDF of original substrate	TDF of fermented residue	Substrate degradation ^a
Guar gum	90.0	9.5	89.4
Apple pectin	85.3	8.5	90.0
Citrus pectin	88.5	8.8	90.1
CM-cellulose	75.0	73.8	1.5
Alginate acid	69.7	9.0	87.1
<i>α</i> -Cellulose			
Rice bran	70.3	36.8	47.7
Barley	86.4	20.7	76.1
Soybean	78.8	22.8	71.1
Korean cabbage	73.0	14.5	80.2
Apple	87.1	12.7	85.5
Tangerine	79.9	19.4	75.7
Sea mustard	68.2	20.0	70.8

^aSubstrate degradation(%) = $\frac{\text{TDF of original substrate}(\%) - \text{TDF of fermented residue}(\%)}{\text{original substrate}(\%)}$

식이섬유의 혐기성 발효후 수화 잔여물의 무게는 식이섬유를 첨가하지 않은 control과 비교하였을때 control(0.1% sodium azide 용액)보다는 모든 식이섬유 급원에서 높게 나타났으나(p<0.0001) control(혐기성 배양액)의 경우는 수화잔여물의 무게가 매우 높게 나타났다. 그 이유로는 식이섬유가 존재하지 않는 경우도 대장내 혐기성 미생물의 배양이 억제되는 것과 더불어 대

식이섬유의 혐기적 발효 및 수화

장내 혐기성 배양액의 무기질 및 영양물질의 분해가 적게 일어나게 되고 이와 더불어 비교적 대장내 삼투압이 높게 유지되는 것으로 추정된다. 식이섬유의 혐기성 발효 후 수화 잔여물의 무게는 발효 이전의 수화잔여물의 무게 보다 전체적으로 높아진 것으로 나타났다. 그 원인으로는 polyethylene glycol을 사용하여 투석막 내액과 외액의 삼투압 차이를 대장내 삼투압인 약 2기압으로 맞추었으나¹⁵⁾ 혐기성 발효과정중 사용된 배지 및 대변 희석액으로 인하여 2기압보다 낮아진 때문으로 보인다. 또한 인체내에서 대변내 수분(fecal water)의 삼투압이 8.3 기압(370 mosmol/L)²²⁾, 심지어 10.7 기압(475 mosmol/L)이나 된다는 보고²³⁾도 있어 실험 조건으로는 2기압 보다 훨씬 높은 삼투압 조정이 필요할 것으로 생각된다. 따라서 대장내 대변의무게와 삼투압과의 관련성에 대한 보다 많은 연구가 이루어져야 될 것이다.

식이섬유의 혐기성 발효 후 수화 잔여물의 무게는 시판용 식이섬유의 경우 Fig. 5와 같다. 불용성인 cellulose에 carboxymethyl기를 도입하여 수용성이 된 CM-cellulose의 경우 3.0 g으로 가장 높게 나타났으며 alginic acid, α -cellulose의 경우도 비교적 높게 나타났다. 반면 수용성 식이섬유중 발효전 수분 보유력이 높게 나타났던 apple pectin, citrus pectin의 경우 낮게 나타났으며 guar gum의 경우는 발효전과 마찬가지로 낮게 나타났다.

식품에서 얻은 식이섬유의 혐기성 발효 후 수화 잔여물의 무게는 Fig. 6과 같다. 쌀겨, 미역, 대두의 경우 2.3 g 정도로 높게 나타났으며 굴, 배추, 보리쌀, 사과와 순으로 낮게 나타나서 사과의 식이섬유 추출물이 가장 낮은 것으로 나타났다.

식이섬유의 혐기성 발효 후 수분 보유력과 인체실험에서의 대변의 무게^{3,6,19)}와의 관련성을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 시판용 식이섬유중 불용성인 α -cellulose의 경우 발효전 수분 보유력은 매우 낮았으나 발효 후 수화물의 무게는 매우 높게 나타났고 실제 대변 무게도 크게 증가³⁾시키는 것으로 나타났다. 반면 pectin의 경우 발효전 수분 보유력은 α -cellulose에 비해 높았으나 발효 후 수화물의 무게는 낮아졌고 대변 무게도 α -cellulose에 비해 적게 증가⁴⁾한 것으로 나타났다. 그리고 guar gum의 경우는 발효 전후 모두 수분 보유력 및

수화물의 무게가 낮은 것으로 나타났으며 대변 무게도 가장 적게 증가⁵⁾시킨 것으로 나타났다.

식품에서 얻은 식이섬유에 있어서는 쌀겨의 경우 발효 전 수분 보유력은 비교적 낮은 편이었으나 발효 후 수화물의 무게는 매우 높게 나타났으며 밀기울의 경우 대변 무게도 매우 크게 증가^{6,19)}시키는 것으로 나타났다. 또한 배추류, 사과의 경우도 발효 후 수화물의 무게와 대변 무게를 증가⁶⁾시키는 경향이 유사한 것으로 나타났다.

전체적으로 보아 불용성 식이섬유의 함량이 높은 α -cellulose와 쌀겨의 발효전 수분 보유력은 낮았으나 발효 후 수화물의 무게는 높게 나타났고 대변 무게도 크게 증가시키는 것으로 나타났다. 결국 *in vitro*법에 의한 혐기성 발효 후 식이섬유의 수화물 무게는 대변 무게와 관련성이 매우 높게 나타나므로 식이섬유의 대변 증가 효과를 예측하는데 좋은 지표가 될 것으로 판단된다.

3. 혐기성 발효 후 식이섬유 함량

식이섬유의 혐기성 발효 후 잔여물의 수용성, 불용성 및 총 식이섬유의 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 시판용 식이섬유에서 수용성 식이섬유 함량은 guar gum, apple pectin, citrus pectin, alginic acid에서 4~6% 수준으로 많은 양이 감소되었으며 반면 CM-cellulose는 발효 후 그 함량이 거의 감소되지 않은 것으로 나타났다. 불용성 식이섬유인 α -cellulose의 경우는 1% 수준으로 매우 낮게 나타났다. 불용성 식이섬유 함량은 guar gum, apple pectin, citrus pectin, CM-cellulose, alginic acid의 경우 2-5% 수준으로 낮았으며 α -cellulose의 경우는 발효 과정 중 불용성 식이섬유가 거의 감소하지 않은 것으로 나타났다.

식품에서 얻은 식이섬유에서 수용성 식이섬유 함량은 쌀겨의 경우 1% 미만으로 가장 적게 나타났으며 보리쌀, 대두, 배추, 사과, 굴, 미역의 경우는 5~8% 수준으로 나타났다.

불용성 식이섬유 함량은 쌀겨의 경우 36%로 가장 크게 나타났으며 보리쌀, 대두, 굴, 미역의 경우 12-17% 수준으로 나타났고 배추, 사과의 경우는 5~8% 수준으로 가장 낮게 나타났다.

따라서 수용성 식이섬유와 불용성 식이섬유를 더하여 구한 총 식이섬유 함량은 발효과정중 α -cellulose와

CM-cellulose의 경우 가장 높게 나타났고 쌀겨의 식이 섬유 추출물이 37%로 비교적 높게 나타났다. 보리쌀, 대두, 꿀, 미역의 경우 19~23% 수준으로 나타났으며 배추, 사과와의 경우 12~15% 수준으로 나타났고 수용성 식이섬유인 guar gum, apple pectin, citrus pectin, alginic acid의 경우 8~10% 수준으로 가장 낮게 나타났다.

4. 혐기성 발효에 의한 식이섬유의 분해율

식이섬유의 혐기성 발효 후 식이섬유의 분해율을 살펴본 결과는 Table 5와 같다. 식이섬유의 분해율은 시판용 식이섬유의 경우 주성분이 cellulose로 구성된 α -cellulose, CM-cellulose에서 0~2% 수준으로 가장 낮게 나타났고 수용성 식이섬유중 alginic acid는 87% 수준으로 비교적 높게 나타났으며 guar gum, apple pectin, citrus pectin의 경우는 90% 내외로 가장 높게 나타났다.

식품에서 얻은 식이섬유의 경우 분해율은 쌀겨에서 48% 수준으로 가장 낮게 나타났고 미역, 대두, 꿀, 보리쌀에서 71~76% 수준으로 나타났으며 배추, 사과에서는 80~85% 수준으로 높게 나타났다.

식이섬유의 분해율과 발효 후 수화 잔여물의 무게와 비교해 보면 반드시 일치하는 것은 아니나 일반적으로 식이섬유의 분해율이 낮을 수록 수화물의 무게는 높은 경향을 보이며 식이섬유의 분해율이 높을 수록 수화물의 무게는 낮은 경향을 보여 주었다. 그 원인으로는 대장내 수분 자체가 높은 삼투압을 가진다고 보고한²²⁾²³⁾ 바에 비추어 보면 대장내 미생물이 식이섬유를 이용하여 발효 과정을 거치는 동안 대장내 여러 성분을 동시에 이용하여 대장내 성분의 삼투압이 감소하였기 때문에 추측되나 이에 대해서는 앞으로 많은 연구가 이루어져야 되리라고 생각된다.

또한 식이섬유의 주요 생리 기능으로서 대장내 배설물의 통과시간 감소, 대변의 배설량 증가, bile acid 나 중금속 등 유해 성분의 배설, 변비 예방, 대장암 예방 효과 등 대장내의 기능성이 지적되고 있는 점을 고려할 때 대장내 미생물에 의한 식이섬유의 혐기성 발효가 반드시 고려되어야 하리라고 생각된다. 앞으로 식이섬유의 대장내 혐기성 발효와 더불어 발효과정중 휘발성 저급 지

방산의 종류 및 생성량, 식이섬유의 성질에 따른 주요 미생물의 관여, gas 성분의 발생 등과 관련된 보다 많은 연구들이 이루어져야 할 것이다.

식이섬유의 생리적 기능에 있어 cellulose에 carboxymethyl기를 통해 수용화 시킨 CM-cellulose는 혐기성 발효 후 수화물의 무게가 높게 나타나서 대장내 생리적 효과가 클 것으로 기대된다. 다만 이 물질은 합성 식이섬유에 속하므로 안전성과 관련된 소비자 우려에 대하여 신중을 기해야 될 것이다. 또한 해조류에서 얻은 alginic acid 및 미역의 식이섬유 추출물도 식이섬유에서 기대할 수 있는 생리적 효과가 클 것으로 기대된다. 그러나 해조류의 섭취가 구미지역에서는 매우 적고²⁴⁾ 일본, 홍콩, 싱가포르, 한국 등 동남아 지역에서만 주로 이루어지고 있어 연구가 부족한 상태이므로 해조류에 대한 보다 체계적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

요약 및 결론

식이섬유의 대장관내 생리적 기능을 예측할 수 있는 간이 시험법을 확립하기 위하여 투석막 및 혐기성 발효에 기초한 *in vitro*법을 이용하여 식이섬유의 수분 보유력 및 혐기성 발효 후 수화물의 무게, 비발효 식이섬유 함량 및 분해율을 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 투석막을 이용한 시판용 식이섬유의 수분 보유력은 alginic acid와 CM-cellulose에서 가장 높게 나타났고 apple pectin, citrus pectin에서는 비교적 높게, guar gum과 α -cellulose의 경우는 거의 나타나지 않았다. 식품에서 얻은 식이섬유에서는 대두, 미역의 경우 상당히 높게, 꿀, 배추, 쌀겨, 사과와의 경우 비교적 높게, 보리쌀의 경우는 매우 낮게 나타났다. 식이섬유의 수분 보유력은 대변의 무게와 상관성이 떨어지는 것으로 나타났다.

2) 혐기성 발효 후 시판용 식이섬유의 수화물 무게는 CM-cellulose의 경우 가장 높게 나타났고 alginic acid와 α -cellulose의 경우 매우 높게 나타난 반면 apple pectin, citrus pectin, gur gum의 경우는 낮게 나타났다. 식품에서 얻은 식이섬유에서는 쌀겨, 미역, 대두의 경우 높게 나타났으며 꿀, 배추, 보리쌀, 사과와의 순

서로 낮게 나타났다. 혐기성 발효후 식이섬유의 수화물 무게가 높을수록 체내 대변의 무게가 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 혐기성 발효후 식이섬유의 수화 잔여물 무게는 대변의 증가 효과를 예측하는데 좋은 지표가 될 수 있을 것이다.

3) 혐기성 발효후 수용성 식이섬유는 많은 양이 감소되었으며 불용성 식이섬유는 거의 감소하지 않았다. 즉 시판용 식이섬유의 경우 α -cellulose, CM-cellulose는 0-2%로 가장 낮게 나타났고 alginate는 87% 수준으로 비교적 높게 나타났으며 guar gum, apple pectin, citrus pectin은 90% 수준으로 가장 높게 나타났다. 식품에서 얻은 식이섬유의 경우는 쌀겨의 경우 48%로 가장 낮게 나타났고 미역, 대두, 꿀, 보리쌀의 경우 71-76%, 배추, 사과와의 경우 80-85%로 높게 나타났다.

본 실험에서 실시된 투석 및 혐기성 발효에 기초한 *in vitro*법을 이용한 식이섬유의 생리적 효과와 다른 인체실험 및 동물실험 결과와 비교해 보았을때 혐기성 발효후 수화 잔여물의 무게가 높을수록 체내 대변 무게가 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에서 실시된 *in vitro*법에 의한 생리적 기능 시험법은 정제된 식이섬유 제품뿐만 아니라 다양한 천연 식품의 식이섬유에 대해서도 그들의 생리적 효과를 예측하는데 크게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Literature cited

- 1) Schneeman BO. Soluble vs insoluble fiber-different physiological responses. *Food Technol* 41(2) : 88-99, 1987
- 2) Titgemeyer EC, Bourguin LD, Fahey GC, Garleb KA. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria *in vitro*. *Am J Clin Nutr* 53 : 1418-1424, 1991
- 3) Hillman L, Peters S, Fisher A, Pomare EW. Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr* 50 : 189-195, 1983
- 4) Cummings JH, Southgate DAT, Branch WJ, Wiggins HS, Houston H, Jenkins DJA, Jivraj T, Hill MJ. The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br J Nutr* 41 : 477-485, 1979
- 5) Penagini R, Velio P, Bianchi PA. Intestinal transit times and stool output during intake of a hypocholesterolaemic dose of guar in man. *Br Soc Gastroenterol* 26 : A115(abstr.), 1985
- 6) Cummings JH, Southgate DAT, Branch W, Houston H, Jenkins DJA, James WPT. Colonic response to dietary fibre from carrot, cabbage, apple, bran, and guar gum. *Lancet* 1 : 5-8, 1978
- 7) Wrick KL, Robertson JB, Van Soest PJ, Lewis BA, Rivers JM, Roe DA, Hackler LR. The influence of dietary fiber source on human intestinal transit and stool output. *J Nutr* 113 : 1464-1479, 1983
- 8) Prosky L, Asp N-G, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: Interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 67 : 1044-1052, 1984
- 9) Prosky L, Asp N-G, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 68 : 677-679, 1985
- 10) Lee SC, Prosky L, DeVries JW. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-Tris buffer : Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 75 : 395-416, 1992
- 11) Gallaher D, Schneeman BO. Intestinal interaction of bile acids, phospholipids, dietary fibers, and cholestyramine. *Am Physiol Soc* 250 : G420-G426, 1986
- 12) Adiotomre J, Eastwood MA, Edwards CA, Brydon WG. Dietary fiber : *in vitro* methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *Am J Clin Nutr* 52 : 128-134, 1990
- 13) Mcburney MI, Horvath PJ, Jeraci JL, Van Soest PJ. Effect of *in vitro* fermentation using human faecal inoculum on the water-holding capacity of dietary fibre. *Br J Nutr* 53 : 17-24, 1985
- 14) AACC : Approved Methods. Insoluble dietary fiber. AACC method 32-20, Water hydration capa-

- city of protein materials. AACC method 88-04, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 1982
- 15) Phillips SF, Giller J. The contribution of the colon to electrolyte and water conservation in man. *J Lab Clin Med* 81 : 733-746, 1973
 - 16) Bryant MP, Burkey LA. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J Dairy Sci* 36 : 205-217, 1953
 - 17) AOAC : *Official Methods of Analysis*, 14th ed. p.160, p.988, Assotation of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1984
 - 18) SAS/STAT *Guide for Personal Computers, Version 6, 3rd Edition*, SAS Institute Inc. 1988
 - 19) Eastwood MA, Brydon WG, Anderson DMW. The effect of the polysaccharide composition and structure of dietary fibers on cecal fermentation and fecal excretion. *Am J Clin Nutr* 44 : 51-55, 1986
 - 20) Robertson JA, Eastwood MA. An investigation of the experimental conditions which could affect water holding capacity of dietary fibre. *J Sci Food Agric* 32 : 819-825, 1981
 - 21) Stasse-Wolthuis M, Albers HFF, van Jeveren JGC, de Jong JW, Hautvast JGAJ, Hermus RJJ, Katan MB, Brydon WG, Eastwood MA. Influence of dietary fiber from vegetables and fruits, bran or citrus pectin on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. *Am J Clin Nutr* 33 : 1745-1756, 1980
 - 22) Wrong O, Metcalfe-Gibson A, Morrison RBI, Ng ST, Howard AV. *In vivo* dialysis of faeces as a method of stool analysis, I. Technique and results in normal subjects. *Clin Sci* 28 : 357-375, 1965
 - 23) Tarlow MJ, Thom H. A comparison of stool fluid and stool dialysate obtained *in vivo*. *Gut* 15 : 608-613, 1974
 - 24) Bright-See E, McKeown-Eyssen GE. Estimation of per capita crude and dietary fiber supply in 38 countries. *Am J Clin Nutr* 39 : 821-829, 1984