



Improvement effect of cooked soybeans on HFD-deteriorated large intestinal health in rat model

Jae Ho Choi¹ · Taekyun Shin³ · Myeong Seon Ryu⁴ · Hee-Jong Yang⁴ ·
Do-Youn Jeong⁴ · Tatsuya Unno^{1,2}

쥐 모델에서 고지방사료로 악화된 대장 건강에 대한 콩의 개선 효과

최재호¹ · 신태균³ · 류명선⁴ · 양희종⁴ · 정도연⁴ · 윤노타쯔야^{1,2}

Received: 3 September 2021 / Accepted: 15 October 2021 / Published Online: 31 December 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract Obesity is associated with impaired intestinal epithelial barrier function, which contribute to host systemic inflammation and metabolic dysfunction. Korean traditional foods, fiber-rich bean products, have been various biological activities in anti-inflammatory responses, but has not reported the large intestinal health. In this study, we investigated the intestinal health promoting effect of cooked soybeans (CSB) on high fat diet (HFD)-induced obesity model. SD rat were fed either a HFD or HFD supplemented with 10.6% CSB (HFD+CSB) for animal experimental period. CSB treatment significantly decreased the HFD-induced weights of body and fat. Also, CSB treatment improved HFD-reduced tight junction components (ZO-1, Claudin-1, and Occludin-1) mRNA expression in large intestine

tissue. Additionally, histopathological evaluation showed that CSB treatment attenuated the HFD-increased inflammatory cells infiltration and epithelial damages in large intestine tissue. At the genus level, effects of CSB supplement not yet clear, while dietary effects showed differential abundance of several genera including *Lactobacillus*, *Duncaniella*, and *Alloprevotella*. NMDS analysis showed significant microbial shifts by HFD, while CSB did not shift gut microbiota. CSB increased the abundance of the genera *Anaerostignum*, *Enterococcus*, *Clostridium sensu stricto*, and *Escherichia/Shigella* by linear discriminant analysis effect size analysis, while reduced the abundance of *Longicatena* and *Ligilactobacillus*. These findings indicate that CSB supplement improves HFD-deteriorated large intestinal health by the amelioration of tight junction component, while CSB did not shift gut microbiotas.

Tatsuya Unno (✉)
E-mail: tatsu@jejunu.ac.kr

¹Subtropical/Tropical Organism Gene Bank, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

³Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

⁴Department of Research and Development, Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Keywords Cooked soybeans · Gut microbiota · High fat diet · Large intestinal health · Tight junction components

서 론

콩(Soybean)은 단백질, 지질, 탄수화물, 비타민 및 기타 무기질로 구성된 식물로서, 단백질, 올리고당, 식이섬유, 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 피틴산, 단백질 분해효소 억제제, 피니톨 등 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 심혈관계 질환, 소화기계 질환, 당뇨병, 고혈압, 체중조절, 항암, 항염증 등 다양한 질환에 효능이 알려져 있다[1].

식품 원료로서 콩은 펙틴(Pectin)과 검류(Gum) 등 수용성 식

이섬유는 장내미생물의 주요 에너지원인 아세트산(Acetic acid), 프로피오닉산(Propionic acid), 부틸릭산(Butyric acid) 등 단쇄지방산의 생성하고 장내 유익균의 생육을 촉진하며, 셀룰로오스(Cellulose)와 리그닌(Lignin) 등 불용성식이섬유는 소화와 흡수를 촉진하고 장의 연동운동을 증진하여 변비를 개선한다[2-5]. 또한, 콩에 함유된 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐과 구조적으로 유사하고, 생물학적 작용이 유사하기 때문에 조골세포(Osteoblast)의 증식을 촉진하고 파골세포(Osteoclast)의 활성을 저해하여 여성의 폐경과 노화로 인한 골다공증의 예방 및 개선에 유용하다는 연구 결과가 있다[6-8]. 이소플라본은 3-phenylchrome 골격을 갖고 있는 화합물로서 genistein과 daidzein은 항암과 더불어 각종 성인병의 예방과 치료 효능이 보고되어 있다[9].

식습관의 변화로 인한 장내 환경 변화는 장내미생물의 군집 변화를 유발하고, 염증성 장 질환의 발생 뿐만 아니라 최근에는 자가면역질환, 비만, 당뇨 등 대사성질환은 새로운 사회문제로 대두되었다. 특히, 동물모델에서 고지방식이 체내 존재하는 장내미생물의 불균형 유발, 변화 및 만성화로 인한 장 상피장벽의 결합력을 감소시키고, 유해 장내 세균의 감염 증가로 인한 장 누수 증후군(Leaky Gut)을 비롯한 장 질환의 유발을 증가시키는 것으로 알려져 있다[10]. 비만으로 인한 장 질환 유발과 관련된 임상적인 중요성에도 불구하고, 비만인 사람들의 장 건강측면에서 대장의 세포 결합력(Tight Junctions) 연구는 명확하지 않다. 콩의 다양한 효능으로 인해 식품, 화장품, 의약품 등 다양한 기능성 소재로서 다양한 연구가 이루어져 왔으나, 장 건강측면에서 대장의 세포 결합력(Tight Junctions) 연구는 많지 않다[11]. 그럼으로, 본 연구에서는 고지방사료를 만성으로 섭취하여 비만 유도에 의한 장의 불균형을 유발하고, 장 건강 개선 효능을 지닌 기능성식품 소재로서 콩의 효능을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

콩 제조

실험에 사용된 대두는 전라북도 순창군에서 수확되는 백태를 사용하였다. 대두는 24시간 동안 물에 담가 충분히 불린 후 체에 걸러 수분을 제거하고 121 °C에서 30분간 삶았다. 삶은 대두는 40 °C 이하로 식힌 후 발효미생물진흥원(35°22'02.5"N, 127°06'20.9"E)의 항온항습기 조건(80% 습도, 37 °C 온도, 36시간)에서 제조하였다. 제조된 콩은 60 °C에서 24시간 동안 건조하고 파쇄하여 동물실험에 사용하였다.

동물실험

SPF 6주령 수컷 SD rat은 (주)대한바이오링크(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 제주대학교 실험동물센터에 도착 후 (주)오리엔트바이오의 설치류 식이(Gyeonggi-do, Korea)와 음용수는 자유롭게 공급하고, 온도 22±2 °C, 상대습도 50±5% 및 밤낮이 12시간 간격의 조절되는 사육환경에서 1주일 동안 적응시켰다. 고지방식이사료(HFD, DooYeol Biotech, Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 구성은 Table 1에 자세히 설명하였다. 제조된 콩 분말은 식이의 약 10.6%를 차지하도록 배합하였다. Rat은 1일 체중 대비 약 5%의 사료를 섭취하므로, 콩이 함유된 고지방식은 1일 15-20 g을 rat에 제공하였다. 고지방식이 내 콩의 함유량은 10.6%이며, cage 내 식이는 rat이 모두 섭취하였다. 그럼으로, rat이 1일간 섭취한 콩의 양은 약 1.6-2.2 g입니다. 쥐를 무작위로 다음 3개 그룹으로 나누었다(N=8 쥐/그룹): (1) 정상식이 그룹(ND), (2) HFD 그룹(HFD) 및 (3) HFD + CSB 그룹(CSB). 실험 종료 후 대장은 적출하여 조직병리학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액(DaeJung Chemicals & Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)에 고정하고, 나머지 대장 조직은 분석이 필요할 때까지 -80 °C 초저온냉동고(Nihon, Tokyo, Japan)에 보

Table 1 The compositions and formulas of HFD

Class description	Ingredients	HFD			HFD + CSB		
		g/Kg	%	Kcal	g/Kg	%	Kcal
Protein	Casein	265.0	28.4	1,060.0	224.2	23.7	896.9
Protein	L-Cystine	4.0	0.4	16.0	4.0	0.4	16.0
Carbohydrate	Maltodextrin	160.0	17.1	640.0	142.8	15.1	571.2
Carbohydrate	Sucrose	90.0	9.6	360.0	80.3	8.5	321.3
Fat	Lard	310.0	33.2	2,790.0	291.4	30.8	2,623.0
Fat	Soybean Oil	30.0	3.2	270.0	28.2	3.0	253.8
Fiber	Cellulose	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mineral	Mineral Mix	48.0	5.1	0.0	48.0	5.1	0.0
Vitamin	Vitamin Mix	21.0	2.2	84.0	21.0	2.2	84.0
Vitamin	Choline Bitartrate	3.0	0.3	0.0	3.0	0.3	0.0
Food additive	Calcium Phosphate	3.4	0.4	0.0	3.4	0.4	0.0
Food additive	Cooked Soybeans	0.0	0.0	0.0	100	10.6	453.8
Total		934.4	100.0	5,220.0	946.4	100.0	5,220.0

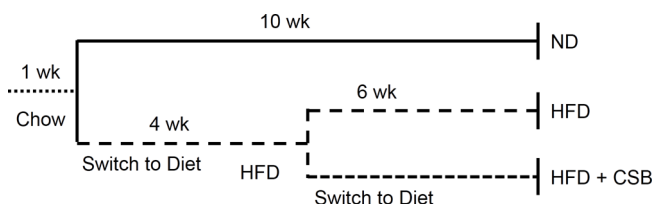


Fig. 1 Experimental design. SD rats fed the normal chow diet (ND) were changed to a high fat diet (HFD) for 4 weeks for acclimatization. After acclimatization to the HFD, 8 rats were fed with previous HFD and 8 rats were fed with cooked soybeans (CSB) for 6 weeks. On the last day, the large intestine was removed for histopathological analysis and stored at -80°C deepfreezer until needed for analysis

관하였다. 모든 실험 프로토콜은 제주대학교 동물실험윤리위원회 규칙 및 규정(제주대학교 동물실험윤리위원회, 승인번호 2020-0027)에 따라 수행되었습니다. 동물실험 계획은 Fig. 1에 명기하였다.

조직병리학적 염색

10% 포르말린 용액으로 고정된 대장 조직은 파라핀 블록을 제작하고 hematoxylin과 eosin 용액으로 염색하였다(Histoire, Seoul, Korea). 각 슬라이드의 조직병리학적 관찰은 제주대학교 수의과대학에서 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다.

RNA 분리, cDNA 합성 및 qPCR 수행

RNAiso Plus reagent (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea)을 사용하여 대장 조직에서 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 농도는 분광광도계 DS-11 plus (DENOVIX Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하여 정량 하였다. cDNA 합성은 BioFACT™ RT Kit (BioFACT Inc., Daejeon, Korea)를 사용하여 1 µg의 RNA로부터 합성하였다. ZO-1, Claudin-1, Occludin-1 및 β-actin과 같은 표적 유전자는 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul)을 이용한 qPCR을 수행하였다. PCR 반응은 Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 수행되었다. 연구에 사용된 PCR primer는 Macrogen, Inc (Seoul, Korea)에서 합성했으며, primer sequences는 Table 2에 표기하였다.

Table 2 Primer sequences for qPCR

Gene		Sequences	NCBI Number
ZO-1	F	CTGCCTCGAACCTCTACTC	NM_001106266.1
	R	TAACCTCGTGGGTACTGGTCAA	
Claudin-1	F	TGCAGCTTCTGGGTTTCA	NM_031699.3
	R	AAACGCAGGACATCCACA	
Occludin-1	F	ATCCTGTCTATGCTCGTCA	NM_031329.3
	R	GTAACCTCGAAGCCACC	
β-actin	F	TGGCACCACCATGTACC	NM_031144.3
	R	CCACCAATCCACACAGAGT	

Gut microbiome analysis

장내미생물생태 분석은 개별적으로 채취한 SD rat 분변 200 mg 으로부터 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA)을 이용하여 추출한 DNA를 사용하여 수행하였다. 모든 DNA 농도는 5 ng/µL으로 맞춰서 사용하였고, 16S rRNA 유전자 내 V3-4 region을 대상으로 primer set을 사용한 two-step PCR 방법으로 증폭을 시행하였다[12]. Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) 라이브러리 제작은 제조사에서 제공하고 있는 프로토콜에 따라 수행하였으며, 최종적으로 제작한 MiSeq 라이브러리는 마크로젠(Seoul, Korea)으로 보내 시퀀싱을 수행하였다.

16S rRNA 유전자의 시퀀싱 데이터는 Mothur을 이용하여 분석하였다[13]. 간략히 설명하면 ‘make.contigs’ Mothur 서브루틴을 이용하여 paired-end 형태의 염기서열을 합치는 과정을 수행하였고, ‘align.seqs’ 서브루틴을 이용하여 SILVA database version 138를 기반으로 alignment를 수행하였다[14]. 시퀀싱 과정 중 발생하는 기계적인 오류로 생성된 염기서열을 수정하기 위해서 ‘pre.cluster’ 서브루틴을 사용하였고, ‘chimera.vsearch’ 서브루틴은 chimeric sequences를 검출하기 위해서 수행하였다. Taxonomic classification은 RDP database를 이용하여 수행하였고[15], α-diversity 지표인 species richness (Chao I)와 species evenness (Shannon)을 계산하기 위해 ‘summary.single’ 서브루틴을 사용하였고, β-diversity는 ‘dist.shared’ 서브루틴을 사용하여 Bray-Curtis distance를 기반으로 비교하여 non-metric multi-dimensional scaling (NMDS)로 나타냈다.

통계처리

모든 통계 분석은 GraphPad Software (San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성 평가는 일원 분산 분석 (ANOVA)에 의한 Tukey-Kramer test를 사용하여 결정되었으며, 통계학적 유의 수준은 $p < 0.01$ 와 $p < 0.001$ 이었다. α-diversity 지표는 분산 분석(analysis of variance, ANOVA)을 사용하여 비교 분석하였고, 미생물생태 간 차이는 분자 분산 분석 (analysis of molecular variance, AMOVA)을 사용하여 측정하였다. 그룹 간 미생물의 abundance 차이는 linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 계산하였으며, LEfSe > 3이고, p value < 0.05을 기준으로 유의적으로 차이를 나타내는 미생물을 조사하였다[16]. Heatmap은 R software에서 pheatmap package를 사용하여 나타냈다.

Table 3 Effects of CSB on the HFD-induced body weight gain in rat

Group	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Body Weight Change (g)	Fat Weight (g)
ND	205.2±5.1	261.6±7.6	56.4±8.9	5.1±0.4
HFD	204.9±3.9	424.9±4.7 ^{###}	220.0±4.0 ^{###}	27.9±1.6 ^{###}
HFD + CSB	201.4±6.8	375.1±9.8 ^{***}	173.8±8.2 ^{***}	19.8±1.8 ^{***}

Results were indicated as mean±standard deviation (N =8). Compared with ND, ^{###}*p* <0.001, compared with HFD, ^{***}*p* <0.001. ND, HFD, and CSB represented the normal diet group, the 60% HFD group, and the HFD + CSB group, respectively

결과 및 고찰

체중 변화 및 지방 축적에 대한 CSB의 개선 효과

대두 및 그 변형 제품의 섭취는 비만유도모델에서 식이에 의해 증가된 체중과 지방 무게의 감소 효과는 과학적으로 입증되었다[17-20]. 본 연구에서는 고지방식이에 유도된 비만 모델에서 삶은 콩(CSB)에 대한 체중 변화 및 지방 축적에 대한 개선 효과를 조사하였다. 6주령 수컷 SD 쥐를 새로운 환경에 일주일 동안 적응 후, 정상군은 일반 사료(ND)를 제공하고, 실험군은 60% 고지방 사료(HFD)를 4주간 제공하였다. 그 후 실험군 중 일부는 콩이 혼합된 고지방 사료(HFD + CSB)로 전환하고 6주간 제공하였다. 일반 사료에 비해 고지방 사료를 10주간 섭취하면 체중 증가는 지방 축적을 통해 유의하게 증가되었다. 그러나 10.6% 콩이 혼합된 고지방 사료(HFD + CSB)의 섭취는 고지방 사료(HFD)만을 섭취한 쥐에 비해 체중 증가와 지방 축적

이 현저히 감소됨을 확인하였다(Table 3).

콩은 단백질, 이소플라본, 식이섬유가 풍부한 식물로서 항비만 효과와 더불어 지방축적 감소와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다[21,22]. 최근 CSB의 이소플라본을 측정된 결과, Genistin (153±8.9 mg/g), Daidzin (93.3±6.4 mg/g) 및 Glycitin (23.2±1.8 mg/g) 등으로 높게 측정되었다.[23]. 이러한 기존 연구들은 콩 제품의 섭취는 식이에 의해 유발된 비만모델에서 체중 증가와 지방 축적을 개선한다는 본 연구의 결과와 동일한 것이다. 따라서, 콩 (CSB)의 섭취는 고지방식이에 의해 증가된 체중 변화와 지방 축적 개선에 효과적임을 확인할 수 있다.

대장 상피 장벽 파괴에 대한 CSB의 개선 효과

장은 필수 영양소를 흡수할 뿐만 아니라 다양한 섭취 독소와 장내 미생물로부터 숙주를 보호한다. 대장 상피 장벽은 점액층, 장 상피 세포 및 밀착 연결 단백질로 구성되어 있으며, 섭취하

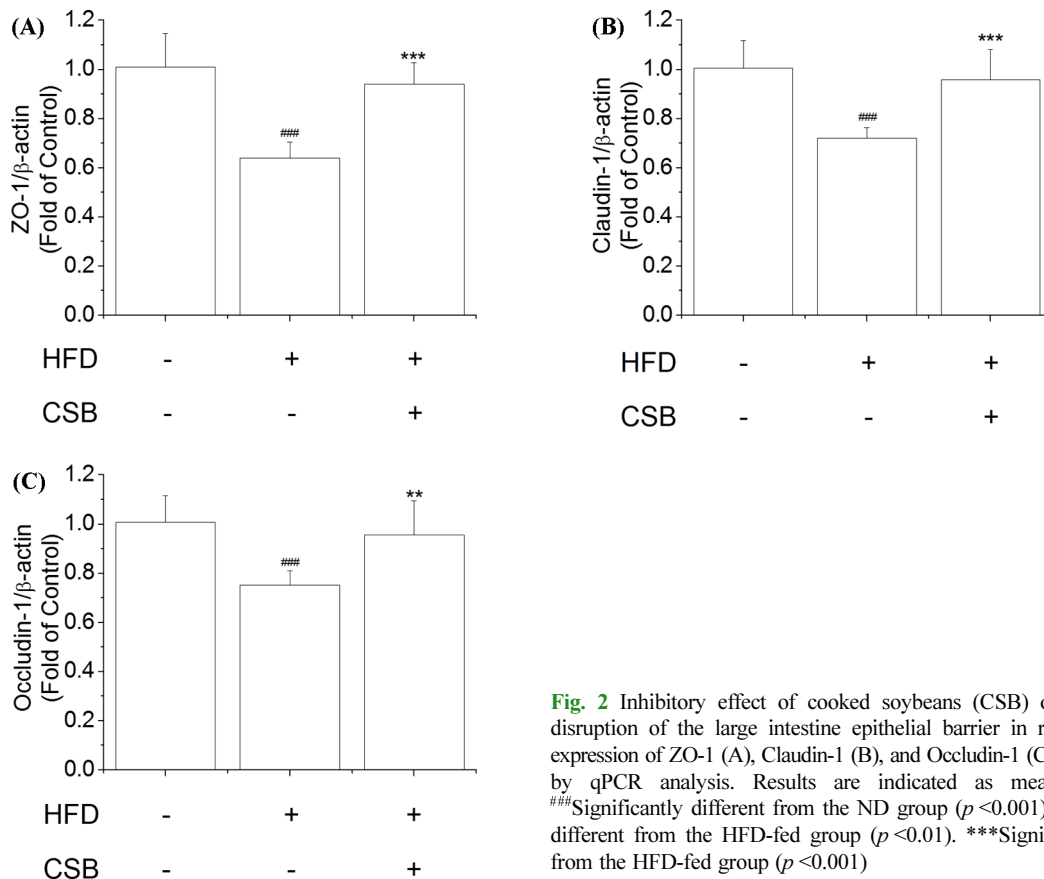
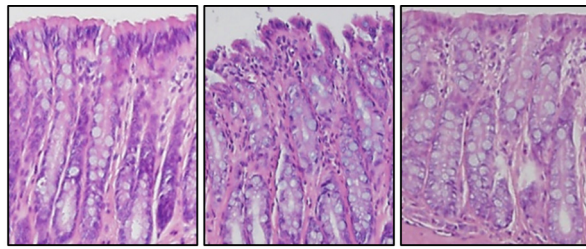


Fig. 2 Inhibitory effect of cooked soybeans (CSB) on HFD-induced disruption of the large intestine epithelial barrier in rats. The mRNA expression of ZO-1 (A), Claudin-1 (B), and Occludin-1 (C) was determined by qPCR analysis. Results are indicated as means ± SD (n =8). ^{###}Significantly different from the ND group (*p* <0.001). ^{**}Significantly different from the HFD-fed group (*p* <0.01). ^{***}Significantly different from the HFD-fed group (*p* <0.001)



HFD	-	+	+
CSB	-	-	+

Fig. 3 Inhibitory effect of cooked soybeans (CSB) on HFD-induced histopathological changes in large intestine. Large intestine tissue was stained by H&E stain and representative H&E-stained large intestine tissues were photographed at 100× magnification under the microscope for histopathological analysis

는 식이 종류에 대장 장벽이 쉽게 붕괴된다. 대장 장벽 구성 요소가 붕괴되면, 장내 내용물에 대한 장 투과성이 증가하여 염증성 장 질환, 괴사성 장염, 셀리악병과 같은 장 질환을 유발한다고 알려져 있다[24]. 여러 연구에 따르면 과도한 지방 섭취는 장 상피 장벽을 파괴하고 긴밀한 접합부의 견고성을 감소시켜 장내 세균에 의한 장 누수를 증가시킨다고 알려져 있다[11,25]. 본 연구에서는 비만과 관련된 장 상피 장벽의 결합 정도를 기능적으로 평가하기 위해 대장 조직에서 밀착 결합 지표(Tight Junctions marker)에 대한 mRNA 발현을 조사하였다. ZO-1, Claudin-1 및 Occludin-1을 포함하는 상피 장벽 완전성을 조절하는 밀착 결합 지표의 mRNA 발현은 만성 고지방 사료(HFD) 섭취에 의해 감소하였다. 그러나, 콩이 혼합된 고지방 사료(HFD + CSB)를 섭취하면 고지방 사료(HFD)에 의해 감소된 밀착 결합 지표의 mRNA 발현이 회복되었다(Fig. 2).

최근, 12주간 고지방 사료를 섭취한 C57BL/6 마우스에서 대장의 장내 장벽 기능 강화와 관련된 밀착 결합 지표(ZO-1, Claudin-1 및 Occludin-1)들이 감소되었으나, 15.7% navy beans 이 혼합된 고지방 사료를 섭취한 그룹은 밀착 결합 지표의 mRNA 발현이 고지방 사료(HFD)로부터 보호되는 것을 확인하였다[11]. 이러한 보고는 콩 제품의 섭취가 식이에 의한 대장의 장내 장벽 기능을 강화시킨다는 본 연구의 결과와 동일한 것이다. 따라서, 콩(CSB)의 섭취는 고지방식에 의해 대장 상피 장벽 개선에 효과적임을 확인할 수 있다.

조직병리학적 변화에 대한 CSB의 개선 효과

다음으로, 고지방 사료를 섭취한 대장 상피 조직의 붕괴 정도를 평가하기 위해 조직병리학적 분석을 수행하였다. 본 실험에서 고지방 사료(HFD)를 만성으로 섭취한 모델의 대장 상피 조직에서 염증 세포의 침윤과 상피 조직의 손상이 나타나는 것을 확인하였다. 고지방 사료(HFD)만을 섭취한 모델에서 심각한 염증 세포의 침윤과 상피 조직의 붕괴가 나타났으나, 콩이 혼합된 고지방 사료(HFD + CSB)를 섭취함으로써 개선되었다(Fig. 3). 우리의 결과는 콩 제품의 섭취가 대장 상피 장벽의 완전성과 염증 세포의 침윤을 개선한다는 이전의 연구들과 동일하다[26-28]. 본 연구를 기반으로 장 건강을 위해 1일 기준 33.8-

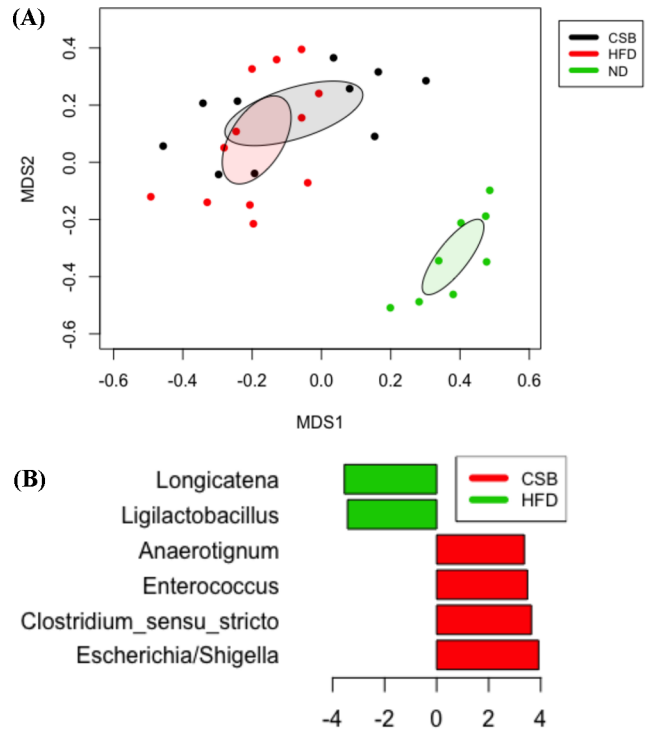


Fig. 4 Beta-diversity analysis. Beta-diversity analysis using non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis (A) and differential abundance analysis at the genus level between HFD and ND groups (B) and HFD and CSB groups (C)

46.5g의 콩을 섭취할 것을 권장한다. 따라서, 우리는 콩(CSB)의 섭취는 대장 건강에 유익한 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

장내미생물의 변화에 대한 CSB의 영향

본 연구에서 사용한 시퀀스 데이터는 Erroneous sequence removal 과정을 거쳐 총 1,586,264 reads를 얻었으며, 모든 샘플에서 최저 reads수는 31,429 reads로 확인되었다. Figure S1은 HFD 섭취가 species richness를 감소시키고 evenness에는 영향을 미치지 않았지만, CSB는 α-diversity에 영향이 없었다는 것을 나타낸다. Figure S2는 식이 변화(ND vs HFD)나 첨가 변화(HFD vs CSB) 모두 phylum 수준에서 미생물생태에 대한 명확한 차이를 보이지 않았지만, ND와 HFD 간 차이는 family 수준에서 유의적인 차이가 확인되었다. 또한, HFD 섭취는 대부분 Lactobacillaceae에 속하는 미생물이 감소하는 반면 family 수준에서 Bacteroidaceae와 Lachnospiraceae가 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나, CSB 첨가는 heatmap으로 나타낸 genus 수준의 장내미생물생태에서 차이가 없었으나 고지방식이 섭취 여부에 따라 Lactobacillus, Duncaniella, Alloprevotella 등을 포함한 미생물 중에 대해 abundance 차이가 확인되었다. NMDS 분석은 고지방식이 섭취에 의해 장내미생물생태가 유의적으로 변화하지만(p < 0.01) CSB 첨가는 차이가 없었다는 것을 나타낸다(Fig. 4A). LEfSe는 HFD와 CSB 간 유의적으로 차이가 나타나는 genera를 조사하기 위해 수행하였는데, CSB 첨가는 Anaerotignum, Enterococcus, Clostridium sensu stricto,

*Escherichia/Shigella*의 abundance가 증가시켰으나 *Longicatena*와 *Ligilactobacillus*를 감소시켰다(Fig. 4B). *Longicatena*는 family Erysipelotrichaceae에 속하는 미생물 종으로 장 염증과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[29]. *Ligilactobacillus*는 lactic acid를 생산하는 미생물 중 하나로 probiotics로 알려져 있다[30]. 또한, *Anaerotignum*는 short-chain fatty acid (SCFA) 생성균으로 알려져 있으나[30], *Escherichia coli*의 증가는 건강하지 못한 장내 환경을 갖고 있다는 것을 나타낸다[31]. 장내미생물 기반 대사 활성도를 조사하기 위해 수행한 PICRUSt 분석에서도 HFD와 CSB 간 차이를 확인할 수 없어(Data not shown), 고지방식이 섭취 시 CSB 첨가가 장내 미생물 생태에 긍정적인 효과를 미치는지에 대해서는 명확하지 않았다.

결론적으로, 장내미생물은 SCFA 생성을 증가시키고 tight junctions의 견고성 강화와 관련되어 있으며, 실험동물에서 프로바이오틱스의 투여가 tight junctions의 결합력을 강화시킨다고 알려져 있다[24]. 그러나, 본 연구에서 고지방식이에 비해 CSB를 투여한 그룹에서 두드러진 장내미생물의 변화를 확인할 수 없어, 고지방식이에 의해 악화된 장 세포의 결합력 개선과 관련된 장내미생물의 긍정적인 영향은 명확히 설명할 수 없다.

초 록

비만은 숙주의 전신 염증 및 대사 기능 장애에 기여하는 장 상피 장벽 기능 저하와 관련이 있다. 한국의 전통 식품으로 식이 섬유가 풍부한 콩 제품은 항염증 반응을 비롯한 다양한 생물학적 활성을 나타내어 왔으나 대장 건강에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 고지방 식이(HFD)를 섭취한 비만 모델에서 콩(CSB)에 대한 장 건강 증진 효과를 조사하였다. SD 쥐에게 동물 실험 기간 동안 HFD 또는 10.6% CSB가 함유된 HFD (HFD + CSB)를 제공하였다. CSB의 섭취는 HFD로 유발된 체중과 지방 축적 증가를 현저하게 감소시켰다. 또한, CSB의 섭취는 대장 조직에서 HFD에 의해 감소된 밀착 결합 지표(ZO-1, Claudin-1 및 Occludin-1)의 mRNA 발현을 개선시켰다. 또한, 조직병리학적 평가에서도 CSB 섭취는 대장 조직에서 HFD에 의해 증가된 염증 세포 침윤과 대장 상피 조직 붕괴를 개선하는 것으로 나타났다.

Genus 수준에서 HFD 섭취에 의해 *Lactobacillus*, *Duncanella*, *Alloprevotella* 등 미생물 종의 abundance 차이는 확인되었으나, CSB 섭취로 인한 영향은 명확하게 나타나지 않았다. NMDS 분석에서 HFD 섭취에 의해 유의적인 장내미생물 생태 이동을 보여주었지만 CSB 섭취는 차이가 없었다. HFD와 CSB 간 유의적으로 차이가 나타나는 genera를 조사하기 위해 LEfSe를 수행한 결과, CSB는 *Anaerotignum*, *Enterococcus*, *Clostridium sensu stricto* 및 *Escherichia/Shigella* 속의 풍부함을 증가시킨 반면 *Longicatena* 및 *Ligilactobacillus*의 풍부함을 감소시켰다.

이러한 결과는 CSB 섭취는 긴밀한 접합 성분을 개선하여 HFD로 악화된 대장 건강을 개선하는 반면 장내미생물생태에 긍정적인 효과를 미치는지에 대해서는 명확하지 않았다.

Keywords 고지방 식이 · 밀착 결합 성분 · 장 건강 증진 효과 · 장내미생물 · 콩

감사의 글 이 연구는 교육부 및 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단(NRF)의 지원을 받아 수행된 기초과학연구 프로그램(2016R1A6A1A03012862) 및 전통문화융합연구사업(NRF-2016M3C1B5907152)입니다. 실험 시설 및 실험 장비를 제공해주신 제주대학교 친환경농업연구소(SARI)에 감사드립니다.

References

- Kim IS, Kim CH, Yang WS (2021) Physiologically Active Molecules and Functional Properties of Soybeans in Human Health-A Current Perspective. *Int J Mol Sci* 22: 4054. doi: 10.3390/ijms22084054
- Ashaolu TJ, Ashaolu JO, Adeyeye SAO (2021) Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota in vitro and short-chain fatty acids production: a critical review. *J Appl Microbiol* 130: 677–687. doi: 10.1111/jam.14843
- Markowiak-Kopec P, Slizewska K (2020) The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* 12: 1107. doi: 10.3390/nu12041107
- Lattimer JM, Haub MD (2010) Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2: 1266–1289. doi: 10.3390/nu2121266
- Muller M, Canfora EE, Blaak EE (2018) Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. *Nutrients* 10: 275. doi: 10.3390/nu10030275
- Chen LR, Ko NY, Chen KH (2019) Isoflavone Supplements for Menopausal Women: A Systematic Review. *Nutrients* 11: 2649. doi: 10.3390/nu11112649
- Abdel-Daim MM, El-Tawil OS, Bungau SG, Atanasov AG (2019) Applications of Antioxidants in Metabolic Disorders and Degenerative Diseases: Mechanistic Approach. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 4179676. doi: 10.1155/2019/4179676
- Lanou AJ (2011) Soy foods: are they useful for optimal bone health? *Ther Adv Musculoskelet Dis* 3: 293–300. doi: 10.1177/1759720X11417749
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5: e47. doi:10.1017/jns.2016.41
- Ahmad R, Rah B, Bastola D, Dhawan P, Singh AB (2017) Obesity-induced Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. *Sci Rep* 7: 5125. doi: 10.1038/s41598-017-04989-8
- Monk JM, Wu W, Lepp D, Wellings HR, Hutchinson AL, Liddle DM, Graf D, Pauls KP, Robinson LE, Power KA (2019) Navy bean supplemented high-fat diet improves intestinal health, epithelial barrier integrity and critical aspects of the obese inflammatory phenotype. *J Nutr Biochem* 70: 91–104. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.04.009
- Singh V, Muthuramalingam K, Kim YM, Park S, Kim SH, Lee J, Hyun C, Unno T, Cho M (2021) Synbiotic supplementation with prebiotic *Schizophyllum commune* derived β -(1,3/1,6)-glucan and probiotic coconction benefits gut microbiota and its associated metabolic activities. *Appl Biol Chem* 64: 1–10. doi: 10.1186/s13765-020-00572-4
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07

16. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12: R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
17. Lee JY, Aravinthan A, Park YS, Hwang KY, Seong SI, Hwang K (2016) Supplementation of a Fermented Soybean Extract Reduces Body Mass and Prevents Obesity in High Fat Diet-Induced C57BL/6J Obese Mice. *Prev Nutr Food Sci* 21: 187–196. doi: 10.3746/pnf.2016.21.3.187
18. Choi JH, Pichiah PB, Kim MJ, Cha YS (2016) Cheonggukjang, a soybean paste fermented with *B. licheniformis*-67 prevents weight gain and improves glycemic control in high fat diet induced obese mice. *J Clin Biochem Nutr* 59: 31–38. doi: 10.3164/jcfn.15-30
19. Nam YR, Won SB, Chung YS, Kwak CS, Kwon YH (2015) Inhibitory effects of Doenjang, Korean traditional fermented soybean paste, on oxidative stress and inflammation in adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *Nutr Res Pract* 9: 235–241. doi: 10.4162/nrp.2015.9.3.235
20. Oh HG, Kang YR, Lee HY, Kim JH, Shin EH, Lee BG, Park SH, Moon DI, Kim OJ, Lee IA, Choi J, Lee JE, Park KH, Suh JW (2014) Ameliorative effects of *Monascus pilosus*-fermented black soybean (*Glycine max* L. Merrill) on high-fat diet-induced obesity. *J Med Food* 17: 972–978. doi: 10.1089/jmf.2012.2740
21. Velasquez MT, Bhathena SJ (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 4: 72–82. doi: 10.7150/ijms.4.72
22. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS (2003) The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144: 3315–3320. doi: 10.1210/en.2003-0076
23. Jeong DY, Daily JW, Lee GH, Ryu MS, Yang HJ, Jeong SY, Qiu JY, Zhang T, Park S (2020) Short-Term Fermented Soybeans with *Bacillus amyloliquefaciens* Potentiated Insulin Secretion Capacity and Improved Gut Microbiome Diversity and Intestinal Integrity To Alleviate Asian Type 2 Diabetic Symptoms. *J Agric Food Chem* 68: 13168–13178. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07962
24. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S (2020) Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr* 11: 77–91. doi: 10.1093/advances/nmz061
25. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S (2020) Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr* 11: 77–91. doi: 10.1093/advances/nmz061
26. Woo JK, Choi S, Kang JH, Kim DE, Hurh BS, Jeon JE, Kim SY, Oh SH (2016) Fermented barley and soybean (BS) mixture enhances intestinal barrier function in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mouse model. *BMC Complement Altern Med* 16: 498. doi: 10.1186/s12906-016-1479-0
27. Catalan N, Villasante A, Wacyk J, Ramirez C, Romero J (2018) Fermented Soybean Meal Increases Lactic Acid Bacteria in Gut Microbiota of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Probiotics Antimicrob Proteins* 10: 566–576. doi: 10.1007/s12602-017-9366-7
28. Kim JH, Won YS, Cho HD, Hong SM, Moon KD, Seo KI (2020) Protective Effect of *Prunus mume* Fermented with Mixed Lactic Acid Bacteria in Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *Foods* 10: 58. doi: 10.3390/foods10010058
29. Kaakoush NO (2015) Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 84. doi: 10.3389/fcimb.2015.00084
30. Ueki A, Goto K, Ohtaki Y, Kaku N, Ueki K (2017) Description of *Anaerotignum aminivorans* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, amino-acid-decomposing bacterium isolated from a methanogenic reactor, and reclassification of *Clostridium propionicum*, *Clostridium neopropionicum* and *Clostridium lactatifermentans* as species of the genus *Anaerotignum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 4146–4153. doi:10.1099/ijsem.0.002268
31. Baldelli V, Scaldaferrri F, Putignani L, Del Chierico F (2021) The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms* 9: 10.3390/microorganisms9040697