(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0076157
(43) 공개일자 2020년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A23L 7/104* (2017.01) *A23L 33/10* (2016.01)
*A61K 36/899* (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
*A61P 29/00* (2006.01) *C12G 3/02* (2019.01)
(52) CPC특허분류
*A23L 7/104* (2016.08)
*A23L 33/10* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0164985
(22) 출원일자 2018년12월19일
심사청구일자 2018년12월19일

(71) 출원인
**한국식품연구원**
전라북도 완주군 이서면 농생명로 245
(72) 발명자
**이은정**
서울특별시 중구 다산로46길 17, 1904호(흥인동)
**이장은**
전라북도 완주군 이서면 농생명로 245
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인충현**

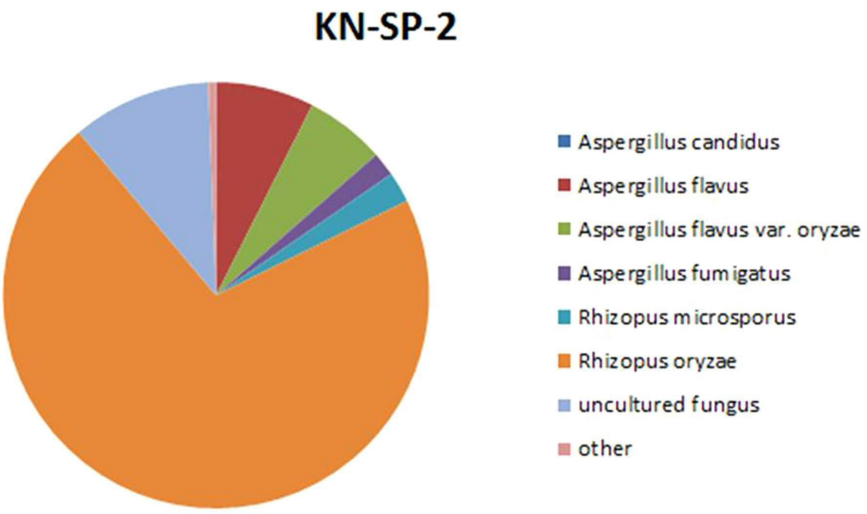
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 쌀 발효물은 장내 유익균의 생장 및 증식을 유도하고, 단쇄지방산 생산을 증가 시키며, 장내 염증성 사이코카인의 발현량을 감소시키는 효과를 나타내어 독성이 낮은 새로운 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방용 조성물에 적용할 수 있는 효과가 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61K 36/899*** (2013.01)
***A61P 1/00*** (2018.01)
***A61P 29/00*** (2018.01)
***C12G 3/02*** (2019.02)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/324* (2013.01)
*A61K 2236/19* (2013.01)
(72) 발명자
**하정수**
전라북도 전주시 완산구 메너머1길 26-6, 201호(중화산동2가)
**박호영**
전라북도 전주시 덕진구 출판로 87, 202동(장동, 호반베르디움더클래스)
**김재호**
경기도 용인시 수지구 상현로 27, 173동 1006호(상현동)
**강선희**
경기도 안산시 상록구 중보로 16, 202동 1103호(사동, 푸른마을주공2단지아파트)
**이애란**
경기도 성남시 분당구 발이봉북로24번길 7-1, B01호
**김혜련**
전라북도 전주시 덕진구 경동로 19, 105동 1202호(덕진동2가, 제일오투그란데아파트)
**김태완**
경기도 용인시 수지구 죽전로 87, 436동 801호(죽전동, 꽃메마을현대홈타운3단지아파트)
**전현정**
경기도 용인시 기흥구 구성로 105-15, 108동 1302호(언남동, 하마비마을동일하이빌1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 E0170600-02
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국식품연구원
연구사업명 한국식품연구원 주요사업
연구과제명 장내미생물 매개 대사질환 개선 식의약 연구
기 여 율 80/100
주관기관 한국식품연구원
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 E0170700-02
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국식품연구원
연구사업명 한국식품연구원 주요사업
연구과제명 전통양조기술 기반 증류주 산업화 연구
기 여 율 20/100
주관기관 한국식품연구원
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용 보리누룩.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 보리누룩은 메타지놈 분석시 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용 보리누룩.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 균류 군집은 아스퍼질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스퍼질러스 플라부스 변이주 오리제(Aspergillus flavus var. oryzae), 아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 리조푸스 마이크로스포루스(Rhizopus microsporus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하고,

상기 세균 군집은 시트로박터 프룬디(Citrobacter freundii), 판토에아 가비니에(Pantoea gaviniae), 바실러스 푸밀루스(Bacillus pumilus), 바실러스 소노렌시스(Bacillus sonorensis), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis) 및 엔테로박테리아과(Enterobacteriaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용 보리누룩.

### 청구항 4

증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하고,

상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 쌀 발효물은 상기 증자된 쌀에 보리누룩 및 물을 혼합하여 1차 발효물을 얻고, 상기 1차 발효물에 증자된 쌀과 물을 혼합하여 2차 발효시킨 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 증자된 쌀과 보리누룩의 혼합 중량비는 5:1 ~ 20:1인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

### 청구항 7

제4항에 있어서,

상기 쌀 발효물의 단쇄지방산 생성량은 0.08 ~ 0.10 ㎜/g인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**청구항 8**

제4항에 있어서,

상기 보리누룩의 발효는 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**청구항 9**

제4항에 있어서,

상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것이고,

상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**청구항 10**

제4항에 있어서,

상기 식품 조성물은 막걸리인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물.

**청구항 11**

증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하고,

상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 쌀 발효물은 상기 증자된 쌀에 보리누룩 및 물을 혼합하여 1차 발효물을 얻고, 상기 1차 발효물에 증자된 쌀과 물을 혼합하여 2차 발효시킨 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 13**

제11항에 있어서,

상기 증자된 쌀과 통보리 누룩의 중량비는 5:1 ~ 20:1인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 14**

제11항에 있어서,

상기 쌀 발효물의 단쇄지방산 생성량은 0.08 ~ 0.10 ㎜/g인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 15**

제11항에 있어서,

상기 보리누룩의 발효는 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 16**

제11항에 있어서,

상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것이고,

상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5인 것을 특징으로 하는

염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

**청구항 17**

1) 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 단계;

2) 상기 혼합보리가루를 반죽하고, 누룩 성형틀에 넣어 성형하는 단계; 및

3) 상기 누룩 성형물을 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 발효시키는 단계;를 포함하는 장기능 또는 염증성 개선용 보리누룩의 제조방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 1) 단계는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말을 모두 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 것이고,

상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 개선용 보리누룩의 제조방법.

**청구항 19**

a) 제17항에 따라 제조된 보리누룩, 증자된 쌀 및 물을 혼합하여 발효시키는 1차 발효 단계; 및

b) 상기 1차 발효물에 증자된 쌀 및 물을 넣고 발효시키는 2차 발효 단계;를 포함하는, 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서,

상기 1 차 발효 단계는 22 ~ 24 ℃에서 5 ~ 9일간 수행되는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 21**

제19항에 있어서,

상기 2 차 발효 단계는 22 ~ 24 ℃에서 10 ~ 18 일간 수행되는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 22**

제19항에 있어서,

상기 a) 단계에서 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비는 5:1 ~ 20:1인 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 23**

제19항에 있어서,

상기 1차 및 2차 발효는 정치발효 또는 50rpm 이하로 발효시키는 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 24**

제19항에 있어서,

상기 쌀 발효물은 장내 유익균의 생장 및 증식을 유도하고, 단쇄지방산 생산능을 증가 시키며, 장내 염증성 사이코카인의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 쌀 발효물의 제조방법.

**청구항 25**

제19항에 따라 제조된 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 발효주 또는 발효음료.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물, 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물, 및 장기능 또는 염증성 장질환을 개선, 치유하는 쌀 발효물의 제조방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 천연물을 발효시켜 얻은 발효 천연물은 발효에 의한 생체전환(biotransformation) 또는 프로바이오틱(probiotic) 효과에 의해 천연물의 생리활성이 증가되는 것으로 알려짐에 따라, 발효 천연물이 새로운 기능성 식품 원료 또는 천연물 신약 등의 재료로 각광받고 있다.

[0003] 특히, 식용 가능한 무해한 미생물을 발효 천연물을 발효하지 않은 원료 천연물에 비해 더 우수한 약리 효과를 내는 것으로 알려져 있다.

[0004] 쌀은 대표적인 곡물로, 시력을 좋게 하는 카로틴, 뼈를 튼튼하게 하는 칼슘 및 철분, 콜레스테롤 생합성을 저해하는 모나스커스 성분을 비롯하여 건강에 유익한 성분을 다량 함유하고 있다. 따라서 항암 및 소화관 보호 효과와 같은 항산화 작용을 기반으로 하는 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 쌀들은 도정 등의 1차 가공을 통하여 주식으로 섭취하거나 제과, 제빵 등에 소량 사용하고 있으며, 국민소득 향상에 따른 식습관의 변천과 가공식품의 부족으로 인하여 소비가 감소하고 재고가 늘고 있는 추세에 있다.

[0005] 현재까지 발효에 의한 쌀 추출물의 항산화 효과, 혈액순환 개선, 체내 노폐물이나 유해금속 배출 효과, 피부 미백 효과, 피부 영양공급 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 그러나, 쌀 추출물을 이용하여 장기능 개선하거나, 염증성 장질환을 치료하는데 적용하는 사례는 보고되지 않고 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2013-0010430호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용 보리누룩과, 이로부터 제조된 쌀 발효물을 활용하여 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공함에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 쌀 발효물을 활용하여 장기능 또는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공함에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 쌀 발효물을 제조하기 위한 보리누룩의 제조방법과 이를 활용하여 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 예방 또는 치료에 효과가 있는 쌀 발효물의 제조방법을 제공함에 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용 보리누룩에 관한 것이다.

[0012] 상기 보리누룩은 메타지놈 분석시 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유할 수 있다.

[0013] 상기 균류 군집은 아스퍼질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스퍼질러스 플라부스 변이주 오리제(Aspergillus flavus var. oryzae), 아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 리조푸스 마이크로스포루스(Rhizopus microsporus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0014] 상기 세균 군집은 시트로박터 프룬디(Citrobacter freundii), 판토에아 가비니에(Pantoea gaviniae), 바실러스 푸밀루스(Bacillus pumilus), 바실러스 소노렌시스(Bacillus sonorensis), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis) 및 엔테로박테리아과(Enterobacteriaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0015] 증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하고, 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 쌀 발효물은 상기 증자된 쌀에 보리누룩 및 물을 혼합하여 1차 발효물을 얻고, 상기 1차 발효물에 증자된 쌀과 물을 혼합하여 2차 발효시킨 것일 수 있다.

[0017] 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 혼합 중량비는 5:1 ~ 20:1일 수 있다.

[0018] 상기 쌀 발효물의 단쇄지방산 생성량은 0.08 ~ 0.10 ㎜/g일 수 있다.

[0019] 상기 보리누룩의 발효는 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 수행될 수 있다.

[0020] 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것일 수 있고, 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5일 수 있다.

[0021] 상기 식품 조성물은 막걸리일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면은 증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하고, 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0023] 상기 쌀 발효물은 상기 증자된 쌀에 보리누룩 및 물을 혼합하여 1차 발효물을 얻고, 상기 1차 발효물에 증자된 쌀과 물을 혼합하여 2차 발효시킨 것일 수 있다.

[0024] 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비는 5:1 ~ 20:1일 수 있다.

[0025] 상기 쌀 발효물의 단쇄지방산 생성량은 0.08 ~ 0.10 ㎜/g일 수 있다.

[0026] 상기 보리누룩의 발효는 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 수행될 수 있다.

[0027] 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것일 수 있고, 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 측면은 아래 단계들을 포함하는 보리누룩의 제조방법에 관한 것이다.

[0029] 1) 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 단계;

[0030] 2) 상기 혼합보리가루를 반죽하고, 누룩 성형틀에 넣어 성형하는 단계; 및

[0031] 3) 상기 누룩 성형물을 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 발효시키는 단계.

[0032] 상기 1) 단계는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말을 모두 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 것일 수 있고, 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 혼합 중량비는 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5일 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법에 관한 것이다.

[0034] a) 상기 보리누룩, 증자된 쌀 및 물을 혼합하여 발효시키는 1차 발효 단계; 및

[0035] b) 상기 1차 발효물에 증자된 쌀 및 물을 넣고 발효시키는 2차 발효 단계.

[0036] 상기 1 차 발효 단계는 22 ~ 24 ℃에서 5 ~ 9일간 수행될 수 있다.

[0037] 상기 2 차 발효 단계는 22 ~ 24 ℃에서 10 ~ 18 일간 수행될 수 있다.

[0038] 상기 a) 단계에서 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비는 5:1 ~ 20:1일 수 있다.

[0039] 상기 1차 및 2차 발효는 정치발효 또는 50rpm 이하로 발효시키는 것일 수 있다.

[0040] 상기 쌀 발효물은 장내 유익균의 생장 및 증식을 유도하고, 단쇄지방산 생산능을 증가 시키며, 장내 염증성 사이코카인의 발현량을 감소시키는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 제조방법에 따라 제조된 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 발효주 또는 발효음료에 관한 것이다.

## 발명의 효과

[0042] 본 발명의 쌀 발효물은 장내 유익균의 생장 및 증식을 유도하고, 단쇄지방산 생산을 증가 시키며, 장내 염증성 사이코카인의 발현량을 감소시키는 효과를 나타내어 독성이 낮은 새로운 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방용 조성물에 적용할 수 있는 효과가 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩의 균류(fungi(ITS))에 대한 메타지놈 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩의 균류(fungi(ITS))에 대한 메타지놈 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩의 문(phylum) level에서의 메타지놈 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩의 문(phylum) level에 대한 메타지놈 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩에 대한 Bacteria(16s) species level에서의 메타지놈 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩에 대한 Bacteria(16s) species level에서의 메타지놈 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 비교예8의 쌀 발효물(KN-SPM-9), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 4개의 군에서 0, 7일째 채취한 분변샘플에서의 단쇄지방산 생성능을 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 3개의 군에서 0, 7일째 채취한 분변샘플에서의 장내미생물 균총 변화를 분석하여 나타낸 그래프이다.

도 9는 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 비교예8의 쌀 발효물(KN-SPM-9), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 4개의 군에서 0, 7일째 채취한 혈청샘플에서의 혈청 TNF-α 생성량(pg/㎖)을 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 3개의 군에서 7일째 채취한 대장 조직에서의 염증성 사이토카인(TNF-α, IFN(interferon)-γ, IL(interleukin)-1α, IL-16, CCL17 및 IL-1RA) 생성량을 분석하여 나타낸 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0045] 본 발명은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루의 발효물을 포함하는 보리누룩에 관한 것이다. 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 혼합보리가루를 원료로하여 자연 발효시켜 제조된 전통발효 누룩

으로, 외부 균주의 접종없이 자연 발효되어 제조된 것이며, 장기능 또는 염증성 개선에 활성을 갖는 쌀발효물 제조용으로 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 보리누룩은 혼합보리가루의 자연발효과정을 통해, 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 것으로 메타지놈 분석을 통해 확인되었다. 후술하는 실험에를 통해 확인한 결과, 균류와 세균에서 우점종이 전혀 상이할 경우, 쌀 발효물 역시 단쇄지방산 함량이 전혀 상이함을 확인할 수 있었다. 특히 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 본 발명의 보리누룩으로 쌀 발효물을 제조하는 것이 가장 우수한 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방 효과를 달성함을 알 수 있다.

[0047] 바람직하게 상기 균류 군집은 아스퍼질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스퍼질러스 플라부스 변이주 오리제(Aspergillus flavus var. oryzae), 아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 리조푸스 마이크로스포루스(Rhizopus microsporus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0048] 상기 세균 군집은 시트로박터 프룬디(Citrobacter freundii), 판토에아 가비니에(Pantoea gaviniae), 바실러스 푸밀루스(Bacillus pumilus), 바실러스 소노렌시스(Bacillus sonorensis), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis) 및 엔테로박테리아과(Enterobacteriaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있고, 가장 바람직하게는 상기 균류 군집과 세균 군집을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 우점종의 균주들만을 별도로 접종하여 발효시켜 누룩을 제조하는 경우보다, 상기 균주들이 포함되어 있는 것이, 추후 쌀 발효물의 특유의 냄새와 맛에 있어서, 선호도가 더욱 높아지는 장점을 갖는다.

[0049] 본 발명은 증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하는 장기능 또는 염증성 장질환 개선 또는 예방용 식품 조성물에 관한 것이고, 본 발명은 증자된 쌀에 보리누룩을 접종하여 발효시켜 얻은 쌀 발효물을 유효성분으로 하는 염증성 장질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0050] 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 쌀 발효물은 '프리바이오틱(Prebiotic)'과 프로바이오틱(probiotic)' 효능을 통해 장건강을 개선하거나 장기능을 개선하는 효과를 갖는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 쌀 발효물은 장내 조직 또는 세포에서의 전염증성 사이토카인의 발현량을 유의하게 감소시키고, 항염증성 인자는 증가시키는 활성을 나타내는 바, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease)에 대해서도 우수한 개선, 예방 또는 치료 효과를 갖는다.

[0052] 상기 'Prebiotic 또는 프리바이오틱' 이란, 체내에서 잘 소화되지 않는 식품 구성성분으로, 위장관 상부에서 가수분해나 흡수가 이루어지지 않으면서, 제한된 특정 공생박테리아의 생육 또는 활성에 자극을 주어 장내 균총을 숙주의 건강에 유익한 방향으로 유도하는 물질로, 장내 유익균의 증식을 증진시키는 물질을 의미한다. 구체적으로 상기 장기능 개선용 조성물은 프리바이오틱 조성물 혹은 장내 미생물 개선용 조성물 혹은 장내 균총 개선용 조성물이라고도 하며, 이는 프로바이오틱스의 효능을 증감시키고 장건강을 개선하거나 장기능을 개선하는 효과를 갖는다.

[0053] 앞서 말한 바와 같이 '장기능 개선' 혹은 '장내균총 개선'이란 장내 유익균의 증식 또는 생장은 촉진하고 장내 유해균의 증식 또는 생장은 억제하되, 장내 유익균과 유해균의 균형을 유지하는 것을 의미한다.

[0054] 장내 유익균이란, 기존에 숙주의 장내에서 서식하는 유익균 및 섭취되어 장에 도달하였을 때 장내 환경에 유익한 작용을 하는 균주를 의미한다. 이들은 위산과 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달하여 장에서 증식하고 정착하며, 장관 내에서 유용한 효과를 나타내고, 독성이 없으며 비병원성인 조건을 만족하는 균을 의미한다. 즉, 프로바이오틱스(probiotics)로 이해될 수 있다. 예컨대, 장내 유익균은 프로바이오틱스를 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 장내 유익균은 이에 제한되지 않고, 비피도박테리움 속(Bifidobacterium), 락토바실러스 속(Lactobacillus), 락토코커스 속(Lactococcus), 스트렙토코커스 속(Streptococcus), 아커멘시아 속(Akkermansia), 패컬리박테리움 속(Faecalibacterium), 또는 엔테로코커스 속(Enterococcus)을 포함할 수 있다.

[0055] 장내 유해균이란, 장내에서 서식하고 있으면서 장염 등과 같이 인체에 해로운 효과를 미치는 미생물을 총칭할 수 있다. 예컨대, 상기 장내 유해균은 이에 제한되지 않고, 대장균 (Escherichia coli), 푸소박테리움 속(Fusobacterium), 클로스트리듐 속(Clostridium), 스타필로코쿠스 속(Staphylococcus), 또는 포피로모나스 속(Porphyromonas)을 포함할 수 있다. 예시적인 일 구현예에서, 상기 조성물은 장내 유익균의 증식 또는 생육을

촉진하고 장내 유해균의 증식 또는 생육을 억제하는 것일 수 있다.

[0056] 상기 쌀 발효물은 단쇄지방산 생성량 또는 함량을 증가시킬 수 있다. 단쇄지방산(Short-chain fatty acids)이란, 탄소수가 6개 이하의 탄소 원자를 포함하는 지방산을 의미한다. 상기 단쇄 지방산은 아세테이트, 프로피오네이트(propionate), 이소부티레이트(isobutyrate), 부티레이트(butyrate), 이소발레이트(isovalerate) 및 발레레이트(valerate)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 프로피오네이트(propionate) 및 부티레이트(butyrate)의 생성량 또는 함량을 현저히 증가시키며, 구체적으로 프로피오네이트(propionate) 및 부티레이트(butyrate)의 생성량이 0.08 ~ 0.10 ㎜/g로 현저함을 알 수 있다.

[0057] 따라서 상기 조성물은 프리바이오틱스일 수 있다. 다른 측면에서 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 장내 유익균의 증식 촉진 및 장내 유해균의 생육 억제용 프리바이오틱스를 제공하며, 이는 프로바이오틱스의 효과를 증강시켜 주는 시너지 효과가 있다. 이때, 상기 프리바이오틱스는 섬유질, 올리고당, 플락토올리고당 및 갈락토올리고당으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상을 더 포함할 수 있다.

[0058] 프로바이오틱스란, 체내에서 건강에 좋은 영향을 미치는 미생물을 의미할 수 있다. 프리바이오틱스란, 유익균을 포함하는 미생물에 의해 이용되어 미생물의 생육이나 활성을 촉진시킴으로써 숙주의 건강에 좋은 효과를 나타내게 하는 성분을 의미할 수 있다.

[0059] 본 명세서에 개시된 조성물은 장내 유익균의 증식 또는 생장을 촉진하고 장내 유해균의 증식 또는 생장을 억제하여 장내균총을 개선함으로써 장건강, 장 기능을 향상시켜 줄 뿐만 아니라 프리바이오틱스로 작용하여 프로바이오틱스와 병용 시 프로바이오틱스의 효능을 증강시켜 주는 시너지 효과가 있다. 이러한 쌀 발효물의 효과는, 보리누룩외에 다른 종래의 방법으로 제조된 누룩을 접종한 쌀 발효물에서는 효과가 미미하고, 오로지 보리누룩을 접종하여 발효한 쌀 발효물에서만 나타난다.

[0060] 또한 본 발명의 일 실시예에서 동물모델에 쌀 발효물을 경구투여하면, 대장 조직에서 전염증성 사이토카인의 발현량이 유의하게 감소하며, 항염증성 인자는 증가하는 것을 확인한 바, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 개선, 예방 또는 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0061] 염증성 장질환(IBD: Inflammatory Bowel Disease)는 궤양성 대장염 및 크론병으로 대표되는 대장 및 소장의 점막에 만성 염증 및/또는 궤양을 일으키는 원인 불명의 질환의 총칭으로 이에 제한되지 않으나 예를 들어, 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염(嚢炎)일 수 있다. 대부분 10대 내지 20대로 비교적 젊은 연령에서 발증하며, 설사, 발열, 복통 등의 임상 증상이나 전신적인 염증 증상을 나타내고, 경구적으로 섭취한 음식물의 영양을 효율적으로 흡수할 수 없게 될 뿐더러, 식이 제한이나 배변 회수가 많아 사회생활이 어려움을 겪는 일이 문제로 되고 있으며, 염증성 장질환의 원인으로서 자기면역 이상설이나 장내 세균설 등이 보고되고 있다.

[0062] 상기 쌀 발효물 제조시 사용되는 누룩에 따라 '장기능 개선, 염증성 장질환'효과가 상이해지는데, 이는 후술하는 실험예를 통해 확인할 수 있다. 따라서 장기능 및/또는 염증성 장질환 개선, 예방 및 치료효과들을 갖는 본 발명의 쌀 발효물을 얻기 위해서는 보리누룩을 사용하는 것이 바람직하다.

[0063] 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것이 바람직하다. 만약 일반 보리만으로 제조될 경우에는 장기능 개선 효능의 척도가 되는 단쇄지방산 생성능이 현저히 낮을 뿐만 아니라, 염증성 장질환 효과에 대해서도 유의적인 효과를 나타내지 못하므로, 상술한 바와 같이 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말 중에서 적어도 둘 이상을 포함하는 것이 바람직하고, 찐 보리분말, 볶은 보리분말 중 적어도 하나 이상이 반드시 포함되어 있는 것이 더욱 바람직하며, 가장 바람직하게는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말을 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0064] 후술하는 실험예를 통해 본 발명의 보리누룩 외에 종래 다양한 전통적 방법으로 누룩(비교예 1-9)을 사용하여 제조된 쌀 발효물의 장기능, 염증성 장질환 개선, 예방 또는 치료효과를 비교하였다. 그 결과 비교예 1-9의 쌀 발효물은 생체 외(in vitro)에서 현저히 낮은 단쇄지방산 생성능과 프로바이오틱 또는 프리바이오틱 활성을 나타내었으며, 특히 실제 동물모델에 경구투여하면 그 효과가 더욱 저하되거나 거의 나타나지 않는 문제가 있음이 확인되었다. 또한 동물모델을 통한 장내 염증성 사이코카인 발현량에서도, 본 발명의 보리누룩으로 제조된 쌀 발효물이 가장 큰 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0065] 상기 보리누룩의 제조에 사용되는 보리는, 일반적으로 식용가능한 보리라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 통보리일 수 있다.

[0066] 상기 보리누룩의 발효는 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 수행되는 것이 바람직한데 상기 발효온도가 25 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 35 ℃보다 높으면 누룩이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 20일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 25일보다 길면 누룩이 변성될 위험이 있다. 습도조건 역시 상기 조건범위를 벗어날 경우 누룩이 변성되거나 충분히 발효되지 않는 문제가 발생할 수 있다.

[0067] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 보리누룩은 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말를 모두 포함하는 혼합보리가루를 발효시켜 얻어진 것이 가장 바람직하며, 이 경우 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말은 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5로 혼합하는 것이 바람직한데, 1:0.5:0.5 미만이거나 1:1.5:1.5를 초과하면 발효되는 과정에서 생기는 균의 종류나 성분에 변화가 생길 수 있다.

[0068] 본 발명의 보리누룩은 혼합보리가루의 자연발효과정을 통해, 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 것으로 메타지놈 분석을 통해 확인되었다. 후술하는 실험예를 통해 확인한 결과, 균류와 세균에서 우점종이 전혀 상이할 경우, 쌀 발효물 역시 단쇄지방산 함량이 전혀 상이함을 확인할 수 있었다. 특히 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 본 발명의 보리누룩으로 쌀 발효물을 제조하는 것이 가장 우수한 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방 효과를 달성함을 알 수 있다.

[0069] 바람직하게 상기 균류 군집은 아스퍼질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스퍼질러스 플라부스 변이주 오리제(Aspergillus flavus var. oryzae), 아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 리조푸스 마이크로스포루스(Rhizopus microsporus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0070] 상기 세균 군집은 시트로박터 프룬디(Citrobacter freundii), 판토에아 가비니에(Pantoea gaviniae), 바실러스 푸밀루스(Bacillus pumilus), 바실러스 소노렌시스(Bacillus sonorensis), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis) 및 엔테로박테리아과(Enterobacteriaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있고, 가장 바람직하게는 상기 균류 군집과 세균 군집을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 우점종의 균주들만을 별도로 접종하여 발효시켜 누룩을 제조하는 경우보다, 상기 균주들이 포함되어 있는 것이, 추후 쌀 발효물의 특유의 냄새와 맛에 있어서, 선호도가 더욱 높아지는 장점을 갖는다.

[0071] 상기 쌀 발효물은 상기 증자된 쌀에 상기 보리누룩 및 물을 혼합하여 1차 발효물을 얻고, 상기 1차 발효물에 증자된 쌀과 물을 혼합하여 2차 발효시켜 얻은 것일 수 있다.

[0072] 본 발명은 건조된 쌀을 물에 불리고 증자하고 식힌 후, 보리누룩을 이요하여 발효시켜, 1차 발효된 쌀 발효물을 얻는다. 1차 발효는 22 ~ 24 ℃에서 5 ~ 9일이며, 발효온도가 22 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 24 ℃보다 높으면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 5일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 9일보다 길면 발효 쌀이 변성될 위험이 있다.

[0073] 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비는 장기능 개선 효과에 의한 단쇄지방산 생성능과 염증성 사이토카인 억제능을 고려하여 5:1 ~ 20:1일 수 있으며, 바람직하게는 5:1~10:1일 수 있다. 상기 중량비는 고형분 중량을 기준으로 한 것이다. 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비가 20:1 이상이면 쌀의 함량이 많아져 보리누룩의 생육이 어려워 1, 2차 발효에 의해 유래된 쌀 발효물의 기능성을 기대하기 어렵고, 5:1을 미만으로 포함하면 쌀의 함량이 낮아 이로부터 유래된 쌀 발효물의 기능성을 기대하기 어렵다.

[0074] 상기 첨가되는 물의 함량은 필요에 따라 적절히 선택하여 첨가할 수 있고, 바람직하게는 상기 증자된 쌀 1 중량부를 기준으로 0.5 내지 10 중량부 첨가될 수 있다.

[0075] 상기 2차 발효는 22 ~ 24 ℃에서 10 ~ 18 일간 수행되며, 발효온도가 22 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 24 ℃보다 높으면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 10일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 18일보다 길면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다.

[0076] 상기 1차 및 2차 발효는 정치발효 또는 50rpm 이하로 발효시키는 것이 바람직하다.

[0077] 또한 상기 쌀 발효물은 추후 활용을 염두하여 알코올을 제거하는 공정을 더 포함할 수 있다. 알코올을 제거하기 위해서는 상기 쌀 발효물을 건조하는 것이 바람직하며, 건조 단계는 위생 천이나 기타 깨끗한 천을 사용하여 쌀 발효물을 자연 바람 상태에서 실내 또는 햇볕에 노출시켜 건조하거나, 상기 쌀 발효물을 설정된 건조 장치에 넣고 온도를 가온하면서 건조하거나, 동결 건조할 수 있으며, 동결 건조가 가장 바람직하다.

[0078] 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 본 발명의 쌀 발효물의 장기능 또는 염증성 장질환 개선,

치료 또는 예방 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.

[0079] 상기 식품 조성물이란, 상기 쌀 발효물을 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리 또는 바(bar) 형태로 제제화 한 것일 수 있고, 또는 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하여 일반 식품 형태로 제조한 것으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[0080] 또한 상기 식품 조성물은 보리누룩으로 제조된 기능성 전통주를 포함할 수 있고, 상기 전통주는 막걸리, 동동주, 청주, 증류식 소주 등을 포함하며, 바람직하게는 막걸리일 수 있다.

[0081] 상기 기능성은 '장기능 개선, 장내 미생물 균총의 개선, 염증성 장질환 치료 활성'을 갖는 것을 의미한다.

[0082] 상기 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 식품 조성물에 있어서의 쌀 발효물의 첨가량은, 대상인 식품 조성물의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리 또는 바(bar) 형태의 식품 조성물의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.

[0083] 상기 식품 조성물은 유효성분으로서 쌀 발효물 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 쌀 발효물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0084] 또한 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물에서, 쌀 발효물은 예를 들어, 0.001 mg/kg 이상, 바람직하게는 0.1 mg/kg 이상, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 이상, 보다 더 바람직하게는 100 mg/kg 이상, 보다 더욱 더 바람직하게는 250 mg/kg 이상, 가장 바람직하게는 0.1 g/kg 이상 포함된다. 쌀 발효물은 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 쌀 발효물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0085] 상기 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0086] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제제화할 수 있다.

[0087] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0088] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약학 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0089] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company,

Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0090] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.

[0091] 상기 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001-10g/kg이다.

[0092] 상기 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0093] 본 발명의 또 다른 측면은 아래 단계를 포함하는 보리누룩의 제조방법에 관한 것이다.

[0094] 1) 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 단계;

[0095] 2) 상기 혼합보리가루를 반죽하고, 누룩 성형틀에 넣어 성형하는 단계; 및

[0096] 3) 상기 누룩 성형물을 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 발효시키는 단계.

[0097] 먼저 1) 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 혼합하여 혼합보리가루를 제조한다.

[0098] 상기 찐 보리분말은 보리를 세척하고 완전히 건조시킨 후, 증기에 2 내지 4 시간 바람직하게는 3 시간 찌는 과정을 통해 제조한 다음, 이를 분쇄하여 분말화한 것일 수 있다. 오토 클레이브 등을 이용하여 압력을 가하여 찌는 경우 보리를 찌는 시간은 1~2 시간으로 단축될 수 있다.

[0099] 상기 볶은 보리분말은 보리를 세척하고 완전히 건조시킨 후, 70 ~ 300 ℃를 넘지않도록 유지하면서 골고루 저어주며 볶음 처리한 다음, 이를 분쇄하여 분말화한 것일 수 있다. 온도가 70 ℃ 이하에서는 공정 시간이 오래걸리고, 고소한 향미가 없으며, 300 ℃ 이상에서는 시간은 단축되나 원재료의 균일한 볶음 처리가 되지 않고 외부 탄화가 먼저 일어나 색상과 향미가 좋지 못하여 바람직하지 못하다. 볶음지속시간은 10분 이하에서는 균일한 볶음 처리가 충분히 이뤄지지 못하고, 20분 이상이면 경제적이지 못하며 탄화면에서 바람직하지 못하다. 또한 건조를 시키지 않고 진행할 경우에는 생산 수율면에서 경제적이지 못하다. 열원은 가스, 전열, 석유 등 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0100] 상기 보리분말은 충분한 물로 세척한 후, 45 ~ 55℃에서 2 ~ 3일 건조기에서 건조하거나, 자연 건조한 다음, 이를 분쇄하여 분말화한 것일 수 있다.

[0101] 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말의 원료로는 일반적으로 식용가능한 보리라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 통보리일 수 있다.

[0102] 상기 1) 단계는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상을 혼합하여 혼합보리가루를 제조하는 것일 수 있는데, 만약 보리분말만으로 제조될 경우에는 장기능 개선 효능의 척도가 되는 단쇄지방산 생성능이 현저히 낮을 뿐만 아니라, 염증성 장질환 효과에 대해서도 유의적인 효과를 나타내지 못하므로, 상술한 바와 같이 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말 중에서 적어도 둘 이상을 포함하는 것이 바람직하다. 또한 상기 혼합보리가루 제조시에는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 중 적어도 하나 이상이 반드시 포함되어 있는 것이 더욱 바람직하며, 가장 바람직하게는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말을 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0103] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 1) 단계는 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말을 모두 혼합하여 혼합보리가루를 제조할 수 있고, 이 경우, 상기 찐 보리분말, 볶은 보리분말 및 보리분말은 1:0.5:0.5 ~ 1:1.5:1.5로 혼합하는 것이 바람직한데, 1:0.5:0.5 미만이거나 1:1.5:1.5를 초과하면 발효되는 과정에서 생기는 누룩균의 종류나 성분에 변화가 생길 수 있다.

[0104] 상기 보리는 통상의 방법에 따라서 분말화할 수 있다.

[0105] 다음으로 2) 상기 혼합보리가루를 반죽하고, 누룩 성형틀에 넣어 성형하고, 3) 상기 누룩 성형물을 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 발효시켜, 보리누룩을 얻는다.

[0106] 상기 1) 단계로부터 제조된 혼합보리가루에 적정량의 물을 첨가하여 반죽하고, 상기 반죽을 누축 성형틀에서 성형할 수 있다. 상기 첨가되는 물의 함량은 통상적으로 반죽 제조시 사용되는 양이면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0107] 최종적으로 상기 2) 단계로부터 제조된 상기 누룩 성형물을 25 ~ 35 ℃에서, 40 ~ 60% 습도조건으로 20 ~ 25 일 동안 발효시키는 것이 바람직한데 상기 발효 온도가 25 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 35 ℃보다 높으면 누룩이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 20일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 25일보다 길면 누룩이 변성될 위험이 있다. 습도조건 역시 상기 조건범위를 벗어날 경우 누룩이 변성되거나 충분히 발효되지 않는 문제가 발생할 수 있다.

[0108] 상기 과정을 통해 제조된 보리누룩은 필요에 따라서, 발효가 끝난 후, 이를 건조하여 균사를 제거하고 통상의 방법에 따라서 분말화할 수 있다. 건조는 통상의 방법에 의할 수 있고, 바람직하게는 15 ~ 20일간 자연 건조시키나, 이에 제한되지는 않는다. 건조 과정에서 보리누룩은 숙성되어 풍미가 더해진다.

[0109] 상기 보리누룩은 메타지놈 분석시 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 것을 확인되었다.

[0110] 후술하는 실험예를 통해 확인한 결과, 보리누룩과 원료 또는 제조공정이 조금이라도 상이할 경우, 균류와 세균에서 우점종이 전혀 상이하며, 이를 통해 쌀 발효물을 제조하면, 단쇄지방산 함량과 같이 쌀 발효물의 기능이 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었다. 특히 리조퍼스 오리제(Rhizopus oryzae)를 우점종으로 하는 균류 군집과 판토에아 아글로메란스(Pantoea agglomerans)을 우점종으로 하는 세균 군집을 함유하는 본 발명의 보리누룩으로 쌀 발효물을 제조하는 것이 가장 우수한 장기능 또는 염증성 장질환 개선, 치료 또는 예방 효과를 달성함을 알 수 있다.

[0111] 바람직하게 상기 균류 군집은 아스퍼질러스 플라부스(Aspergillus flavus), 아스퍼질러스 플라부스 변이주 오리제(Aspergillus flavus var. oryzae), 아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 리조푸스 마이크로스포루스(Rhizopus microsporus)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 세균 군집은 시트로박터 프룬디(Citrobacter freundii), 판토에아 가비니에(Pantoea gaviniae), 바실러스 푸밀루스(Bacillus pumilus), 바실러스 소노렌시스(Bacillus sonorensis), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis) 및 엔테로박테리아과(Enterobacteriaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 균류 군집과 세균 군집을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 우점종의 균주들만을 별도로 접종하여 발효시켜 누룩을 제조하는 경우보다, 상기 균주들이 포함되어 있는 것이, 추후 쌀 발효물의 특유의 냄새와 맛에 있어서, 선호도가 더욱 높아지는 장점을 갖는다.

[0112] 따라서, 상술한 공정을 통해 제조된 보리누룩은 후술하는 실험예에서와 같이, 쌀 발효물에 적용되면 단쇄지방산 생성능을 증가시키고, 장내 미생물 총균의 균형을 잡아주며, 장내 항염증 인자의 발현은 높이되 염증 인자의 발현은 억제시키는 효능을 나타낸다. 이에 반해 비교제조예 1과 같이 보리분말만을 사용하거나, 비교제조예9와 같이 찐 보리분말, 볶은 보리분말, 보리분말로 이루어진 혼합보리가루에 도꼬마리 잎 즙액을 넣어 반죽하여 누룩이 제조될 경우에는 상기 효능들이 생체외, 내에서 관찰되지 않거나 미미한 것으로 확인되었다.

[0113] 따라서 본 발명의 달성한 목적을 이루기 위해서 본 발명에서의 보리누룩은 상술한 단계들을 통해 얻은 것이 가장 바람직함을 알 수 있다.

[0114] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 쌀 발효물의 제조방법에 관한 것이다.

[0115] a) 보리누룩, 증자된 쌀 및 물을 혼합하여 발효시키는 1차 발효 단계; 및

[0116] b) 상기 1차 발효물에 증자된 쌀 및 물을 넣고 발효시키는 2차 발효 단계;를 포함하는, 장기능 또는 염증성 장질환 개선활성을 갖는 쌀 발효물의 제조방법.

[0117] 이때 상기 보리누룩은 앞선 제조방법에 따라 제조된 것으로, 이하 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0118] 본 발명은 건조된 쌀을 물에 불리고 증자하고 식힌 후, 보리누룩을 이용하여 발효시켜, 1차 발효된 쌀 발효물을 얻는다. 1차 발효는 22 ~ 24 ℃에서 5 ~ 9일이며, 발효온도가 22 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고,

24 ℃보다 높으면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 5일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 9일보다 길면 발효 쌀이 변성될 위험이 있다.

[0119] 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비는 장기능 개선 효과에 의한 단쇄지방산 생성능과 염증성 사이토카인 억제능을 고려하여 5:1 ~ 20:1일 수 있으며, 바람직하게는 5:1~10:1일 수 있다. 상기 중량비는 고형분 중량을 기준으로 한 것이다. 상기 증자된 쌀과 보리누룩의 중량비가 20:1 이상이면 쌀의 함량이 많아져 보리누룩의 생육이 어려워 1, 2차 발효에 의해 유래된 쌀 발효물의 기능성을 기대하기 어렵고, 5:1을 미만으로 포함하면 쌀의 함량이 낮아 이로부터 유래된 쌀 발효물의 기능성을 기대하기 어렵다.

[0120] 상기 첨가되는 물의 함량은 필요에 따라 적절히 선택하여 첨가할 수 있고, 바람직하게는 상기 증자된 쌀 1 중량부를 기준으로 0.5 내지 10 중량부 첨가될 수 있다.

[0121] 상기 b) 단계는 상기 1차 발효된 쌀 발효물에 상기 증자된 쌀 및 물을 첨가하여 2차 발효시키는 단계이다. 상기 쌀 발효물의 중량을 기준으로 1-3 배로 증자된 쌀을 첨가하는 것이 바람직하다. 상기 2차 발효는 22 ~ 24 ℃에서 10 ~ 18 일간 수행되며, 발효온도가 22 ℃보다 낮으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 24 ℃보다 높으면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다. 또한 발효 기간이 10일보다 짧으면 발효가 충분히 일어나지 않고, 18일보다 길면 쌀 발효물이 변성될 위험이 있다.

[0122] 상기 1차 및 2차 발효는 정치발효 또는 50rpm 이하로 발효시키는 것이 바람직하다.

[0123] 상기 과정을 통해 제조된 쌀 발효물을 여과포 또는 원심분리를 통해 잔사와 불순물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한 상술한 과정을 통해 제조된 쌀 발효물은 발효가 완료된 후, 110~130℃에서 10~20분간 멸균시켜 보관성을 높일 수 있다.

[0124] **실시예**

[0125] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백하다.

[0126] **제조예1: KN-SP-2 보리누룩 제조**

[0127] 통보리를 물에 깨끗이 씻어 완전히 건조하였다. 건조한 통보리를 1/3 정도 찐 후 햇볕에 건조시켰다. 나머지 건조한 통보리 1/3은 솥에 볶았고, 마지막으로 남은 1/3은 아무 처리도 하지 않고 그대로 사용하였다. 상기 찌고, 볶고, 건조한 통보리를 각각 분쇄하여 분말화하였다.

[0128] 상기 각각의 분말을 섞고(1:1:1의 혼합중량비), 여기에 물 6말(108.234 L)을 첨가하여 반죽한 후, 누룩틀에 넣어 성형하였다. 가운데 구멍을 뚫은 후 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 21 일간 배양시킴으로써 KN-SP-2 보리누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0129] **비교제조예1: KN-SP-1 누룩 제조**

[0130] 통보리를 깨끗이 씻어 말린 뒤 거칠게 분쇄하고, 체를 이용해 거친 보리분말을 선별하였다. 선별된 통보리 분말 690 g에 물 180 ㎖를 서서히 첨가하며 반죽한 다음, 상기 반죽을 면보자기가 깔린 누룩틀에 단단히 다져 넣어 성형하였다. 그 위에 다시 볏짚을 깔고, 다시 반죽을 다져 층층히 쌓은 다음 볏짚으로 덮어 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 20 일 가량 배양시킴으로써 KN-SP-1 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0131] **비교제조예2: KN-SP-3 누룩 제조**

[0132] 밀가루 3 kg, 찹쌀가루 18.04 L를 준비하고, 상기 두 가루에 물을 뿌려가며 잘 섞어 혼합보리가루를 제조하였고, 체를 이용해 상기 혼합보리가루과 물이 고루 섞이도록 하여 반죽하였다. 상기 반죽을 면보자기가 깔린 누룩틀에 단단히 다져 넣어 성형하였다. 닥나무 잎으로 상기 누룩틀 겉을 싸고, 그 위에 다시 볏짚(새끼줄)을 깔아 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 50 일간 배양시킴으로써 KN-SP-3 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0133] **비교제조예3: KN-SP-4 누룩 제조**

[0134] 밀가루 3 kg, 찹쌀가루 18.04 L를 준비하고, 상기 두 가루에 물을 뿌려가며 잘 섞어 혼합보리가루를 제조하였고, 체를 이용해 상기 혼합보리가루과 물이 고루 섞이도록 하여 반죽하였다. 상기 반죽을 면보자기가 깔린 누룩틀에 단단히 다져 넣어 성형한 후, 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 50 일간 배양시킴으로써 KN-SP-4 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0135] **비교제조예4: KN-SP-5 누룩 제조**

[0136] 멥쌀 18.04 L을 준비하였다. 먼저 멥쌀을 물에 침지하여 불린 후, 분쇄하고, 체를 이용하여 고운 멥쌀 분말을 선별하였다. 상기 멥쌀 가루에 물을 서서히 넣어주면서 반죽하고, 약 8-10 ㎝의 크기로 둥글게 뭉쳐 빚어 성형하였다. 누룩틀에 면보자기를 깔고, 볏짚과 상기 성형물을 넣은 후, 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 21일동안 발효시킴으로써 KN-SP-5 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0137] **비교제조예5: KN-SP-6 누룩 제조**

[0138] 멥쌀 54.12 L을 준비하였다. 먼저 멥쌀을 물에 침지하여 불린 후, 분쇄하고, 체를 이용하여 고운 멥쌀 분말을 선별하였다. 멥쌀 가루를 약 4-6 ㎝의 크기로 둥글게 뭉쳐 빚어 성형하였다. 상기 성형물을 각각 솔잎으로 싸서 서로 닿지 않도록 하여, 종이봉투에 넣은 후, 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 20일 동안 발효시킴으로써 KN-SP-6 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0139] **비교제조예6: KN-SP-7 누룩 제조**

[0140] 밀가루 300 g, 녹두 270 ㎖, 황미 360 ㎖, 물 280 ㎖를 준비하였다. 먼저 녹두를 분쇄하여 녹두가루와 껍질을 분리하고, 녹두껍질은 물에 침지시켜 불렸다. 황미를 분쇄하고, 황미가루와 녹두가루 및 밀가루를 섞어 혼합보리가루를 제조하였다. 상기 혼합보리가루에 녹두껍질 불린 물을 넣어 반죽하였다. 상기 반죽을 누룩틀에 넣어 성형한 후, 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 60일동안 발효시킴으로써 KN-SP-7 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0141] **비교제조예7: KN-SP-8 누룩 제조**

[0142] 찹쌀 18.04 L, 생여뀌 180.39 L를 사용하여 제조한 천연여뀌즙 및 솔잎을 준비하였다. 먼저 찹쌀을 물에 침지하여 불린 후, 분쇄하고, 체를 이용하여 고운 찹쌀 분말을 선별하였다. 상기 찹쌀 가루에 천연여뀌즙을 서서히 넣어주면서 반죽하고, 약 8-10 ㎝의 크기로 둥글게 뭉쳐 빚어 성형하였다. 누룩틀에 솔잎을 깔아, 상기 성형물들이 서로 닿지 않도록 넣은 후, 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 21일동안 발효시킴으로써 KN-SP-8 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0143] **비교제조예8: KN-SP-9 누룩 제조**

[0144] 찹쌀 54.12 L, 밀가루 5.41 L를 준비하였다. 먼저 여뀌잎 30 ㎏에 물 108.23 L를 넣어 중불로 오랜시간 가열한 후, 물의 양이 절반으로 줄어들면 찌꺼기를 제거하여 얻은 달인여뀌즙 54.12 L를 제조하였다. 찹쌀을 씻고, 달인여뀌즙에 밤새 침지하여 불린 후, 물기를 뺀다. 물기가 빠진 찹쌀에 밀가루를 골고루 입힌 후, 두겹의 종이봉투 안에 넣은 후 입구를 끈으로 봉쇄하고 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 60일동안 발효시킴으로써 KN-SP-9 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0145] **비교제조예9: KN-SP-10 누룩 제조**

[0146] 보리 2.07 ㎏, 도꼬마리잎, 제비쑥 및 볏짚을 준비하였다. 먼저 보리를 씻어 완전히 건조하였다. 건조한 보리를 1/3 정도 찐 후 식혀서 분쇄하였다. 나머지 건조한 통보리 1/3은 솥에 볶은 후 분쇄하였고, 마지막으로 남은 1/3은 아무 처리도 하지 않고 그대로 분쇄하여 분말화하였다.

[0147] 도꼬마리잎을 찧어 즙액 540 ㎖를 얻었고, 상기 찹쌀 가루에 도꼬마리 즙액을 서서히 넣어주면서 반죽하였다. 상기 반죽을 면보자기가 깔린 누룩틀에 단단히 다져 넣어 성형하였다. 상기 성형물을 제비쑥으로 위아래를 싸서 짚으로 묶어 25~35 ℃, 습도 40~60%로 유지하는 항온 항습기(배양기)에서 21 일간 배양시킴으로써 KN-SP-10 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0148] **비교제조예10: KN-SP-11 누룩 제조**

[0149] 찹쌀 90 ㎖, 생여뀌 920 ㎖를 사용하여 제조한 천연여뀌즙 및 닥나무잎을 준비하였다. 먼저 찹쌀을 물에 침지하여 불린 후, 분쇄하고, 체를 이용하여 고운 찹쌀 분말을 선별하였다. 상기 찹쌀 가루에 천연여뀌즙을 서서히 넣어주면서 반죽하고, 약 8-10 ㎝의 지름을 갖는 둥글고 납작한 형태로 빚어 성형하였다. 상기 성형물을 닥나무잎으로 싼 다음 볏짚을 깔고, 바람드는 곳에 매달아 50일 동안 발효시킴으로써 KN-SP-11 누룩을 생산하였다. 상술한 과정을 통해 완성된 누룩은 믹서로 분쇄하여 고운가루 상태로 보관하였다.

[0150] **실시예1: KN-SP-2 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0151] 쌀을 물로 세척한 다음 충분한 물을 부어 실온에서 4 시간 침지하고 30분간 물기를 제거한 다음 쌀을 100 ℃에서 1 시간동안 찐 후 냉각하여 원료로 사용하였다.

[0152] 상기 찐 쌀 300 g에 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩 100 g을 발효제로 넣고, 0.9 L의 물을 부어 23 ℃에서 7일간 배양하였다(1차 발효).

[0153] 이후 상기 1차 발효물에 상기 찐 쌀 700 g을 600 ㎖의 물과 함께 추가하여 23 ℃에서 14 일간 2차 배양하였다(2차 발효). 깨끗한 면보를 이용하여 상기 쌀 발효물로부터 균체 및 불순물을 제거하였다.

[0154] **비교예1: KN-SP-1 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0155] 쌀을 물로 세척한 다음 충분한 물을 부어 실온에서 4 시간 침지하고 30분간 물기를 제거한 다음 쌀을 100 ℃에서 1 시간동안 찐 후 냉각하여 원료로 사용하였다.

[0156] 상기 찐 쌀 300 g에 비교제조예1로부터 제조된 KN-SP-1 누룩 100 g을 발효제로 넣고, 0.9 L의 물을 부어 23 ℃에서 7일간 배양하였다(1차 발효).

[0157] 이후 상기 1차 발효물에 상기 찐 쌀 700 g을 600 ㎖의 물과 함께 추가하여 23 ℃에서 14 일간 2차 배양하였다(2차 발효). 깨끗한 면보를 이용하여 상기 쌀 발효물로부터 균체 및 불순물을 제거하였다.

[0158] **비교예2: KN-SP-3 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0159] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예2에서 제조된 KN-SP-3 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0160] **비교예3: KN-SP-4 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0161] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예3에서 제조된 KN-SP-4 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0162] **비교예4: KN-SP-5 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0163] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예4에서 제조된 KN-SP-5 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0164] **비교예5: KN-SP-6 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0165] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예5에서 제조된 KN-SP-6 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0166] **비교예6: KN-SP-7 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0167] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예6에서 제조된 KN-SP-7 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0168] **비교예7: KN-SP-8 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0169] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예7에서 제조된 KN-SP-8 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0170] **비교예8: KN-SP-9 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0171] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예8에서 제조된 KN-SP-9 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0172] **비교예9: KN-SP-10 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0173] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예9에서 제조된 KN-SP-10 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0174] **비교예10: KN-SP-11 누룩을 이용한 쌀 발효물 제조**

[0175] 비교예1과 동일한 방법으로 쌀 발효물을 제조하되, 누룩으로서 비교제조예 1 대신 비교제조예10에서 제조된 KN-SP-11 누룩을 이용하여 쌀 발효물을 제조하였다.

[0176] **실험예1-1: 누룩의 메타지놈 분석-1**

[0177] 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩과 비교제조예 7의 KN-SP-8 누룩 제조 자체에 대한 메타지놈을 분석을 수행하고자 하였고, 상기 두 시료로부터 얻은 각각 ITS 영역을 통해 메타지놈을 분석하였다. 이는 (주) 마크로젠 의뢰하여 수행하였다.

[0178] 이에 대한 결과를 도 1, 2 및 하기 표 1에 나타내었다. 도 1은 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩의 균류(fungi(ITS))에 대한 메타지놈 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 2는 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩의 균류(fungi(ITS))에 대한 메타지놈 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

*표 1*

[0179]

| Fungi (ITS) | | 제조예 1<br>KN-SP-2 | 비교제조예 7<br>KN-SP-8 |
|---|---|---|---|
| species | Aspergillus candidus | 0.04% | 0.00% |
| | Aspergillus flavus | 7.42% | 58.31% |
| | Aspergillus flavus var. oryzae | 6.08% | 22.91% |
| | Aspergillus fumigatus | 1.82% | 0.00% |
| | Rhizopus microsporus | 2.33% | 0.00% |
| | Rhizopus oryzae | 71.18% | 4.98% |
| | uncultured fungus | 10.55% | 12.49% |
| | other | 0.58% | 1.31% |

[0180] 도 1, 2 및 표 1에 나타난 바와 같이 균류(Fungi)를 종(species)별로 메타지놈 분석한 결과, 제조예1의 KN-SP-2는 Rhizopus oryzae(71.2%)를 우점종으로 가지는 것을 확인되었다. 이에 반해 비교제조예7인 KN-SP-8 누룩은 Aspergillus flavus(58.3%), Aspergillus flavus var. oryzae(22.9%)가 우점종인 것으로 확인되었다. 즉 누룩에 따라 전혀 상이한 균총을 가지고 있음을 확인하였다.

[0181] **실험예1-2: 누룩의 메타지놈 분석-2**

[0182] 1) 16S rDNA를 활용한 bacteria 분석

[0183] 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩과 비교제조예 7의 KN-SP-8 누룩 제조 자체에 대한 메타지놈을 분석을 수행하고자 하였고, 상기 두 시료로부터 각각 16s rRNA유전자를 추출한 후, 이를 바탕으로 메타지놈 분석을 수행하였다. 이는 (주)마크로젠에 의뢰하여 진행되었다.

[0184] 이에 대한 결과를 도 3, 4 및 하기 표 2에 나타내었다. 도 3은 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩의 문(phylum) level에서의 메타지놈 분석결과를 나타낸 그래프이다. 도 4는 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩의 문(phylum) level에 대한 메타지놈 분석결과를 나타낸 그래프이다.

*표 2*

[0185]

| Bacteria (16s) | 제조예 1<br>KN-SP-2 | 비교제조예 7<br>KN-SP-8 |
|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| phylum | "Proteobacteria" | 87.86% | 44.71% |
| | Cyanobacteria/Chloroplast | 0.55% | 36.42% |
| | Firmicutes | 11.59% | 18.87% |
| | other | 0.00% | 0.00% |

[0186] 도 3, 4, 및 표 2에 나타난 바와 같이, 문(phylum) level에서는 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩은 Proteobacteria phyla를 87.9%, Firmicutes를 11.6% 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이에 반해 비교제조예7의 KN-SP-8 누룩에서는 Proteobacteria 44.7%와 Cyanobacteria/Chloroplast 36.4%, Firmicutes 18.9%이 확인되었다. 이를 통해 본 발명의 제조예1의 보리누룩과 비교제조예7은 전혀 다른 균총으로 이루어진 것을 확인할 수 있다.

[0187] 2) Species level에서의 분석

[0188] 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩과 비교제조예 7의 KN-SP-8 누룩 제조 자체에 대한 메타지놈을 분석을 수행하고자 하였고, 상기 두 시료로부터 얻은 각각 ITS 영역을 통해 메타지놈을 분석하였다. 이는 (주) 마크로젠 의뢰하여 수행하였다.

[0189] 이에 대한 결과를 도 5, 6 및 하기 표 3에 나타내었다. 도 5는 제조예1로부터 제조된 KN-SP-2 보리누룩에 대한 Bacteria(16s) species level에서의 메타지놈 분석 결과를 나타낸 그래프이다. 도 6은 비교제조예 7으로부터 제조된 KN-SP-8 누룩에 대한 Bacteria(16s) species level에서의 메타지놈 분석결과를 나타낸 그래프이다.

*표 3*

[0190]

| Bacteria (16s) | | 제조예 1<br>KN-SP-2 | 비교제조예 7<br>KN-SP-8 |
|---|---|---|---|
| species | Pantoea agglomerans | 65.48% | 37.74% |
| | uncultured bacterium (Streptophyta genus) | 0.55% | 36.37% |
| | Citrobacter freundii | 2.60% | 0.79% |
| | Pantoea gaviniae | 2.50% | 0.00% |
| | Bacillus pumilus | 5.33% | 0.00% |
| | Bacillus sonorensis | 1.22% | 0.00% |
| | Bacillus subtilis | 4.69% | 0.00% |
| | uncultured bacterium (Escherichia/Shigella genus) | 6.71% | 5.72% |
| | uncultured bacterium (Pantoea genus) | 0.93% | 0.06% |
| | uncultured bacterium (Sporacetigenium genus) | 0.32% | 18.87% |
| | Other (Enterobacteriaceae family) | 8.25% | 0.26% |
| | other | 1.41% | 0.20% |

[0191] 도 5, 6 및 표 3에 나타난 바와 같이, Species level에서 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩과 비교제조예7의 KN-SP-8 누룩의 균총을 살펴보았다. 우선 제조예1의 KN-SP-2 보리누룩은 Pantoea agglomerans 65.5%를 우점종으로 가지는 것을 확인하였다. 이에 반해 비교제조예7의 KN-SP-8 누룩은 Pantoea agglomerans 37.7%와 더불어 Streptophyta genus의 uncultured bacterium을 36.4%로 가지는 것을 확인하였다. 즉, 제조예 1의 KN-SP-2 보리누룩과 비교제조예 7의 KN-SP-8 누룩을 비롯하여 이외의 누룩들에서도 미생물 분포가 전혀 상이함을 확인한 바, 제조방법과 원료의 차이에 따라, 누룩 자체에 존재하는 미생물 분포가 전혀 상이함을 알 수 있다.

[0192] **실험예2: 누룩에 따른 쌀 발효물의 혐기배양에 의한 단쇄지방산 생성능 분석**

[0193] 생체 외(*in vitro*)에서 실시예1, 비교예1 내지 비교예10으로부터 제조된 각각의 쌀 발효물의 단쇄지방산 생성능을 분석하고자 하였다. 이를 위해 실시예1, 비교예1 내지 비교예10의 쌀 발효물을 DMEM 배지에서 산화환원효소제와 함께 혐기배양하였다.

[0194] 구체적으로 혐기배양을 위하여 47 ㎖의 DMEM(GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 배지에 1 ㎖의 산소환원효소제(Oxyrase For Broth, Mansfield, OH, USA)와 쌀 발효물 2 ㎖(실시예1, 비교예1 내지 비교예10 중에서 하나)를

넣어 실링(sealing)한 후 37 ℃C 워터베스에서 24 시간 반응시켰다. 그 후 다른 미생물의 생장을 억제하기 위하여 황산동(copper sulfate, 0.25 g/L)을 넣어 발효를 완료시켰다. 혐기배양이 완료된 배양액에서 생성된 단쇄지방산(acetate, butyrate, propionate)을 분석하기 위하여 headspace SPME(Solid-phase microextractioin) 기술과 함께 GC-MS(GC6890 equipped with 5973 MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 함량을 측정하였다.

[0195] 구체적으로 상기 배양액 중에서 5 ㎖는 단쇄지방산 생성능 분석을 위하여 20 ㎖의 유리 바이알에 넣은 후, 65 ℃에서 500 rpm의 속도로 15 분간 추출하여 단쇄지방산 성분을 headspace로 휘발시킨다. 휘발된 성분을 75 ㎛ carboxen-PDMS가 코팅된 SPME fiber(Supelco, Bellefonte, PA, USA)에 노출시켜, 흡착한 다음 GC/MS의 주입구 부분에서 250 ℃의 온도로 SPME fiber에 흡착된 성분을 탈착시키고, 250 ℃, 50 분동안 GC/MS의 컬럼에 주입해 분석하였다. 이때 GC-MS 분석은 Agilent Technologies 6890A GC과 Agilent Technologies 5973 MSD를 사용하였고, DB-624 UI(30 m × 0.25 mm × 1.4 μm)로 분석하였다.

[0196] 하기 표 4는 각각의 쌀 발효물에서 단쇄지방산 생성능을 측정한 결과를 나타내었다. 즉, 실시예1, 비교예1 내지 비교예10 중에서 어느 하나의 쌀 발효물, DMEM 배지, 산화환원효소제를 통해 얻은 혐기배양물에서 생성된 단쇄지방산의 피크면적(peak area)을 측정하여 나타낸 것이다. 대조군으로 쌀 발효물을 첨가하지 않은 DMEM 배지, 산화환원효소제만으로 혐기배양한 배양물을 사용하였다.

표 4

[0197]

| 구분 | peak area | |
|---|---|---|
| | Acetate | Butyrate |
| 실시예 1을 이용한 혐기배양물 | 1,803,060 | 137,792,976 |
| 비교예 1을 이용한 혐기배양물 | ND | trace |
| 비교예 2를 이용한 혐기배양물 | trace | 1,913,562 |
| 비교예 3을 이용한 혐기배양물 | 1,991,510 | 46,258,170 |
| 비교예 4를 이용한 혐기배양물 | ND | 1,170,938 |
| 비교예 5를 이용한 혐기배양물 | 432,346 | 257,294 |
| 비교예 6을 이용한 혐기배양물 | 4,094,033 | 6,063,761 |
| 비교예 7을 이용한 혐기배양물 | 1,672,799 | 8,407,026 |
| 비교예 8을 이용한 혐기배양물 | 3,674,327 | 44,386,294 |
| 비교예 9를 이용한 혐기배양물 | 2,727,074 | 1,941,779 |
| 비교예 10을 이용한 혐기배양물 | 1,137,042 | 253,166 |

[0198] 'ND'는 검출되지 않았음을 의미하고, 'trace'는 미량 검출을 의미한다.

[0199] 표 4는 쌀을 찌고, 여기에 실시예1, 비교예1 내지 비교예10으로부터 제조된 쌀 발효물을 첨가하여 혐기배양하였을 때 생성된 단쇄지방산의 peak area를 나타낸 수치로, DMEM에서 배양시킨 해당 조건에서는 proponate 생성능이 측정되지 않았다.

[0200] KN-SP-2 누룩을 이용해 제조된 실시예 1의 쌀 발효물이 비교예 1 내지 10의 쌀 발효물에 비해 butyrate 생성능이 3~100배 이상 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0201] 한편 전체적인 단쇄지방산의 생성능을 살펴보면 KN-SP-9 누룩을 이용해 제조된 비교예 8의 쌀 발효물이 비교예 1 내지 7, 9, 10의 쌀 발효물에 비해 acetate와 butyrate의 피크 면적이 모두 높은 것으로 나타났다. 따라서, 실시예1의 쌀 발효물과 비교예8의 쌀 발효물을 후보 발효물로 선택하였다.

[0202] **실험예 3: 동물모델에서 단쇄지방산 생성능 분석**

[0203] 3-1. 실험동물

[0204] 실험예 1에서 선별된 실시예1 및 비교예 8로부터 제조된 쌀 발효물의 생체 내에서 단쇄지방산 생성능을 분석하고자 하였다. 이를 위한 실험동물로는 22 g의 8주령된 C57BL/6 수컷 마우스를 준비하였다. 상기 마우스는 Joongang Animal Lab(Seoul, Korea)으로부터 제공받았다. 상기 마우스는 실험에 사용되기 전에 7 일간 순화과정을 거쳤다. 또한 상기 마우스는 실험 내내 22±℃ 온도 및 55%±10% 습도가 조절된 사육실에서 자유식이로 사육되었으며 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였다. 모든 동물실험은 한국식품연구원 동물실험운영규정에 준하여 수행하였다.

[0205] 3-2. 실험군

[0206] 상기 실험동물을 랜덤으로 나누어 실험이 진행되었다. 실시예1의 쌀 발효물 20 g/kg/day 투여군(KN-SPM-2), 비교예8의 쌀 발효물 20 g/kg/day 투여군(KN-SPM-9), 상기 쌀 발효물과 동일한 알콜도수로 보정한 4% 에탄올 20 g/kg/day (순수 에탄올 0.8 g/kg/day) 투여군(vehicle) 및 대조군으로서 물 20 g/kg/day 투여군(Control) 총 4군으로 나누었다(표 5).

[0207] 실시예1 및 비교예8의 쌀 발효물과 에탄올 용액, 물은 총 7일간 매일 경구를 통해 강제투여하였다. 투여하기 전후 단쇄지방산 생성과 장내미생물 균총 변화 확인하기 위해. 각각 군에서 투여하기 전/후(Day 0/Day 7)의 분변 샘플을 수집하여 즉시 -80 ℃에 보관하였다.

표 5

[0208]

| 실험군 | | 실험물질 | 투여방법 |
|---|---|---|---|
| 대조군 control | 물 투여군 | 멸균 증류수 | 멸균 증류수 20 g/kg을 매일 1회씩 7일간 경구투여 |
| Vehicle | 에탄올 4% 투여군 | ethanol 4% | 에탄올 4% 용액 20 g/kg의 용량으로 매일 1회씩 7일간 경구투여 |
| KN-SPM-2 | 실시예1의 쌀 발효물 투여군 | 실시예1의 쌀 발효물 | 실시예1의 쌀 발효물 20 g/kg의 용량으로 매일 1회씩 7일간 경구투여 |
| KN-SPM-9 | 비교예8의 쌀 발효물 투여군 | 비교예8의 쌀 발효물 | 비교예8의 쌀 발효물 20 g/kg의 용량으로 매일 1회씩 7일간 경구투여 |

[0209] 실험의 통계분석을 위하여 one-way ANOVA (Dunnett's test)를 사용하여 군간 평균수치 유의차를 확인하였으며, 0.05 보다 낮은 p 값을 가질 경우에 유의미한 결과로 판단하였다.

[0210] 3-3. 단쇄지방산 분석

[0211] 보통 단쇄지방산은 장 내부가 발효상태일 때 생겨나는 것으로 장의 발효 상태란 질 좋은 탄수화물을 적정량 먹었을 때 일어나는 현상을 일컫는 것이므로 장내 환경이 매우 좋은 상태라는 것을 의미한다. 단쇄지방산은 아세트산, 프로피온산, 부티르산이라는 탄소수 6개 이하의 유기산으로 포화지방산에 속한다. 이들은 장내 유익균들에 의해 생성되며, 면역력을 높이고 건강을 유지하고 향상시키는 매우 중요한 역할을 수행하는 데 도움이되는 효과가 있으므로, 본원발명의 쌀 발효물이 단쇄지방산을 얼마나 생성하는지 측정하는지를 하기 실험을 통해 분석하고자하였다.

[0212] 수집된 분변샘플은 SPME 기술과 GC-MS을 사용하여 분석하였다(실험예 1에서 단쇄지방산 분석방법 참조). 상기 분변샘플 0.1 g과 NaCl 2.0 g 및 증류수(DW) 5.0 ㎖을 20 ㎖ 유리바이알에 넣은 후 65 ℃에서 500 rpm의 속도로 15 분간 추출하여 단쇄지방산 성분을 headspace로 휘발시킨다. 휘발된 성분을 75 ㎛ carboxen-PDMS가 코팅된 SPME fiber(Supelco, Bellefonte, PA, USA)에 노출시켜, 흡착한 다음 GC/MS의 주입구 부분에서 250 ℃의 온도로 SPME fiber에 흡착된 성분을 탈착시키고, 250 ℃, 50 분동안 GC/MS의 컬럼에 주입해 분석하였다. 이때 GC-MS 분석은 Agilent Technologies 6890A GC과 Agilent Technologies 5973 MSD를 사용하였고, DB-624 UI(30 m × 0.25 mm × 1.4 μm)로 분석하였다.

[0213] 이때 단쇄지방산의 정량분석을 위하여 3 종류의 표준물질(acetic acid, propionic acid, and butyric acid)을 Sigma-Aldrich(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 상기 표준물질은 다양한 농도(10-50 μM)로 희석하여 준비하였다. 최종 단쇄지방산 농도는 nmol/g로 환산하여 표기하였다.

[0214] 3-4. 각 군에서의 단쇄지방산 분석 결과

[0215] 도 7은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 비교예8의 쌀 발효물(KN-SPM-9), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 4개의 군에서 0, 7일째 채취한 분변샘플에서의 단쇄지방산 생성능을 정량한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 7에서 0.05 보다 낮은 p 값을 가질 경우에 *로 표시하였고, 유의미한 결과로 고려하였다. 통계 분석은 one-way ANOVA followed by Dunnett's test를 사용하였고, 투여 전(0일째)의 데이터와 비교하였다.

[0216] 도 7에 나타난 바와 같이 투여시작 전에는 모든 군에서 대조군과 유사한 단쇄지방산 함량이 나타났다. 그 후, 투여시작일로부터 7일째에 실시예1 및 비교예8의 쌀 발효물 투여군에서는 대조군, Vehicle 군에 비해 높은 단쇄지방산 함량(특히 butyrate, propionate)의 증가가 나타났다. 또한 쌀 발효물과 동등한 정도의 알콜이 투여된 Vehicle 군에 비해 실시예1의 쌀 발효물 투여군에서 단쇄지방산 증가가 가장 유의성 있는($p<0.05$) 것으로 확인되었다.

[0217] 또한 단쇄지방산 중에서 Acetate의 경우에는 butyrate와 propionate와 비교시 상대적인 생성 농도는 전반적으로 높았으나, 투여 전과 후의 유의적인 증가를 나타내는 실험군은 확인되지 않았다.

[0218] **실험예 4: 동물모델에서 메타지놈 분석**

[0219] 4-1. 실험동물 및 실험군

[0220] 비교예8의 쌀 발효물을 처리한 실험동물/실험군은 사용하지 않는 것을 제외하고는 상기 실험예 2에 따라 실험을 진행하였고, 상기 표 5에 기재된 바와 같이 각 실험군별로 규정된 실험물질 및 투여방법에 따라 투여한 다음, 0일째와 7일째 분변을 채취하여 각 실험군에서 메타지놈을 분석하였다.

[0221] 4-2 메타지놈 분석

[0222] 장내 환경에 유익한 영향을 주는지 여부를 평가하기 위하여 실시예1의 쌀 발효물을 7일간 투여하고 하기 메타지놈 분석 실험을 수행하였다.

[0223] -80 ℃에 보관한 각 군의 분변샘플을 PowerMax Soil DNA Isolation Kit(MO BIO)를 사용하여 bacterial DNA를 추출하였다. 각각의 군으로부터 분리된 DNA(sequenced sample)에서 V3와 V4 region(59F-806R)을 증폭시키기 위하여 Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library protocols에 따라 준비하였다. 10 ng의 gDNA를 PCR하기 위해, 바코드로 표지된 융합 프라이머(barcoded fusion primer)(341F: 5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3', 806R: 5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3')를 사용하여 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 qPCR Quatification protocol(KAPA Library Quantificatoin kits for Illumina Sequecing platforms)과 LabChip GX HT DNA High Sensitivity Kit(PerkinElmer, Massachusetts, USA)을 사용하여 정성 및 정량분석(quantifying/qualifying)하였다.

[0224] Paired-end(2×300 bp) 시퀀싱은 MiSeq™ 플랫폼(Illumina, San Diego, USA)을 사용하여 Macrogen에 의하여 수행되었다. 장내미생물 균총 비교를 위한 통계분석은 SIMCA-P version 14.0(Umetrics, Umeᴂ, Sweden)를 활용하여 다변량분석(mean centering scaled Principal component analysis, PCA)을 수행하였다.

[0225] 4-3. 장내미생물 균총 변화 분석

[0226] 도 8은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 3개의 군에서 0, 7일째 채취한 분변샘플에서의 장내미생물 균총 변화를 분석하여 나타낸 그래프이다.

[0227] 도 8에 기재된 바와 같이 각 실험군별로 규정된 실험물질 및 투여방법에 따라 투여한 다음, 각 실험군에서 메타지놈 분석을 통한 장내미생물 균총 변화를 관찰하였다.

[0228] 상기 도 8을 참조하면, 실시예1의 쌀 발효물 투여군은 투여 전(day 0)과 비교하여 투여시작 후 7일째(day 7)에 장내미생물 균총의 특이적 변화가 나타났다. 또한 투여기간 동안의 vehicle 군과 비교시에도 실시예1의 쌀 발효물 투여군은 특이적 장내미생물 균총의 변화가 나타남을 확인하였다. 그러나, Vehicle 투여군은 대조군과 비교하여 의미 있는 장내 미생물 균총 변화가 나타나지 않았다.

[0229] 즉, 실시예1의 쌀 발효물 투여군으로부터 유도된 상술한 효과는 알콜(vehicle)이 아닌 쌀 발효물 내에 들어 있는 다른 성분들이 장내에서 프리바이오틱(prebiotics) 또는 프로바이오틱(probiotics)로서 작용하였기 때문이라 여겨진다. 실제로 실시예1의 쌀 발효물 투여군의 분변에서 분석한 장내 미생물 균총 변화를 phylum(문) level에서 살펴보면 Bacterodetes가 Vehicle 73.4 ± 2.6 % 대비 81.3 ± 1.2%로 유의적($p=0.049$) 증가 추세를 보이며

(Control은 87.8 ± 2.2%) Firmicutes는 Vehicle 15.5 ± 1.3 % 대비 11.7 ± 0.6 %로 감소하는 경향을 보였다 (Control은 9.0 ± 2.0 %). 통상적으로 Firmicutes는 낮고, 반면에 Bacteriordes , Provotella , Ruminococcus는 풍부한 것이 건강한 장내 미생물 조성이라 여겨진다. 따라서 상술한 결과를 통해 본 발명의 실시예1로부터 제조된 쌀 발효물이 투여될 경우 대조군(에탄올, 물)에 비해 유의적으로 더 건강한 장내 미생물 조성을 형성한다는 것을 알 수 있다.

[0230] **실험예 4: 염증 개선, 예방 또는 치료 효과**

[0231] 4-1. 실험동물 및 실험군

[0232] 분변샘플이 아닌 각각의 실험동물을 마취후 복대정맥에서 혈액샘플을 얻는다는 것을 제외하고는 상기 실험예 2에 따라 실험을 진행하였고, 상기 표 2에 기재된 바와 같이 각 실험군별로 규정된 실험물질 및 투여방법에 따라 투여한 다음, 0일째와 7일째 혈액과 대장 조직 시료를 채취하여 각 실험군에서 염증 개선, 예방 또는 치료 효과를 분석하였다.

[0233] 상기 혈액샘플은 혈청만을 분리하여 실험 전까지 -80℃에 보관하였다.

[0234] 4-2. 혈청 TNF-α 분석

[0235] TNF-α(Tumor necrosis factor alpha)는 대표적인 전염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)으로 특히 염증성 장질환 환자에게서 그 생성량이 증가하는 것으로 알려져 있으므로, 하기와 같이 각 군의 혈청샘플로부터 TNF-α 발현 여부를 분석하였다.

[0236] 앞선 실험예 3을 통해 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2) 투여군에서 단쇄지방산 특히 butyrate의 생성능이 현저히 증가하였음을 확인하였다. 상기 butyrate의 증가는 대장세포(colonocyte)의 에너지원으로, 장내 환경을 개선하고 염증성 사이토카인을 감소시키는 데에 도움이 되는 것으로 알려져있다. 따라서 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2) 역시 염증성 사이토카인을 감소시킬 것으로 예상되며, 이를 비교하기 위하여 실시예1의 쌀 발효물과 비교예8의 쌀 발효물의 투여에 따른 혈청 TNF-α 생성량을 TNF-α ELISA kit(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0237] 실험에 사용한 혈청은 앞서 설명한 바와 같이, 각 군으로부터 채취한 혈액에서 분리한 후, 실험 전까지 - 80 ℃에서 보관하였다.

[0238] 도 9는 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 비교예8의 쌀 발효물(KN-SPM-9), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 4개의 군에서 0, 7일째 채취한 혈청샘플에서의 혈청 TNF-α 생성량(pg/㎖)을 정량한 결과를 나타낸 그래프이다. 통계 분석은 one-way ANOVA followed by Dunnett's test를 사용하였고, Vehicle 군의 데이터와 비교하였다.

[0239] 도 9에 나타난 바와 같이, Vehicle 군은 대조군(Control)에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었으며, 이는 알콜 투여시 혈액에서 염증성 사이토카인의 분비가 증가하는 것을 의미한다.

[0240] 한편 실시예1 및 비교예8의 쌀 발효물 투여군(KN-SPM-2, 9)은 Vehicle 군에 염증성 사이토카인이 감소하였으나, 비교예8의 쌀 발효물 투여군은 Vehicle 군과 큰 차이가 나지 않은 반면 실시예1의 쌀 발효물 투여군은 Vehicle 군에 비해 유의성 있는 감소가 확인되었다.

[0241] 4-3. 대장 내 염증성 사이토카인 분석

[0242] 실시예1의 쌀 발효물 투여가 직접적으로 대장 내 염증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 4-1에서 각 실험군에 규정된 실험물질 투여 전, 투여 시작일로부터 7일 째 대장 조직 시료에서 염증성 사이토카인의 수준을 분석하고자 하였다.

[0243] 상기 각 실험군에서 분리한 대장 조직 시료로부터 염증성 사이토카인 생성량을 분석하기 위하여, 300 ㎎ 대장 조직 시료를 용해(lysis)시켜 단백질을 분리하고, 상기 단백질에 antibody array kit (ARY006, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 분석하였다. 상기 분석된 결과를 시각화하고 정량화하기 위해 Alliance Mini HD9(UVITEC, Cambridge, UK)와 Image J software(1.49v, NIH, Bethesda, MD, USA)를 활용하였다. 실험의 통계 분석에는 one-way ANOVA를 사용하였고, Dunnett multiple comparision test를 통하여 vehicle 그룹과 비교하여 그룹간 평균수치의 유의차를 검증하였다. 0.05보다 낮은 p 값을 가지는 경우에 유의미한 결과로 고려하여 *로 표시하였다.

[0244] 도 10은 실험동물에 실시예1의 쌀 발효물(KN-SPM-2), 에탄올 용액(Vehicle) 및 물(control)을 각각 투여한 3개의 군에서 7일째 채취한 대장 조직에서의 염증성 사이토카인(TNF-α, IFN(interferon)-γ, IL(interleukin)-1α, IL-16, CCL17 및 IL-1RA) 생성량을 분석하여 나타낸 그래프이다.

[0245] 도 10에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 Vehicle 군은 오히려 전염증성 사이토카인의 생성량이 현저히 증가하였으나, 실시예1의 쌀 발효물 투여군은 Vehicle 군 및 대조군에 비해 유의성 있는 전염증성 사이토카인의 생성량 감소가 확인되었다.

[0246] 또한, IL-1RA은 항염증성 사이토카인으로, 실시예1의 쌀 발효물 투여군은 Vehicle 군 및 대조군에 비해 IL-1RA 생성량이 유의성 있게 증가하였다. 이에 반해 Vehicle 군은 오히려 감소하였다.

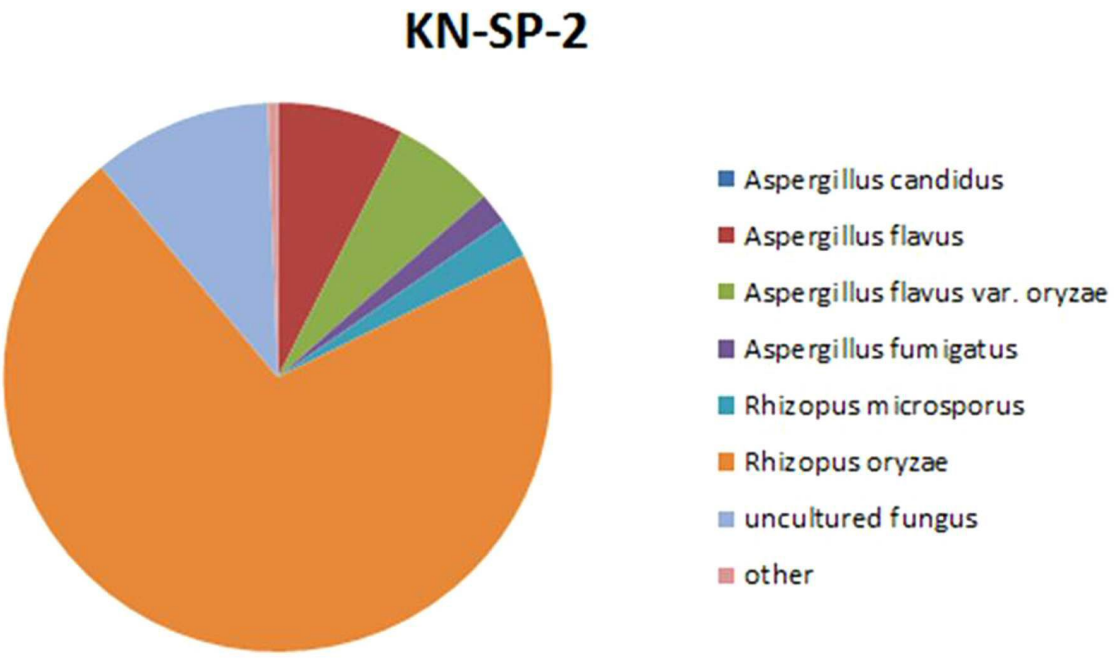
[0247] 따라서 실시예1의 쌀 발효물의 투여에 의해 대장 내 염증 반응이 Vehicle 군과 대조군에 비해 현저히 개선되는 효능이 있음을 알 수 있다.

[0248] 위에서 기재한 구현예 외에도, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 출원 당시의 기술 상식 및 본 명세서의 기재 내용에 기초하여, 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 점은 자명하다.

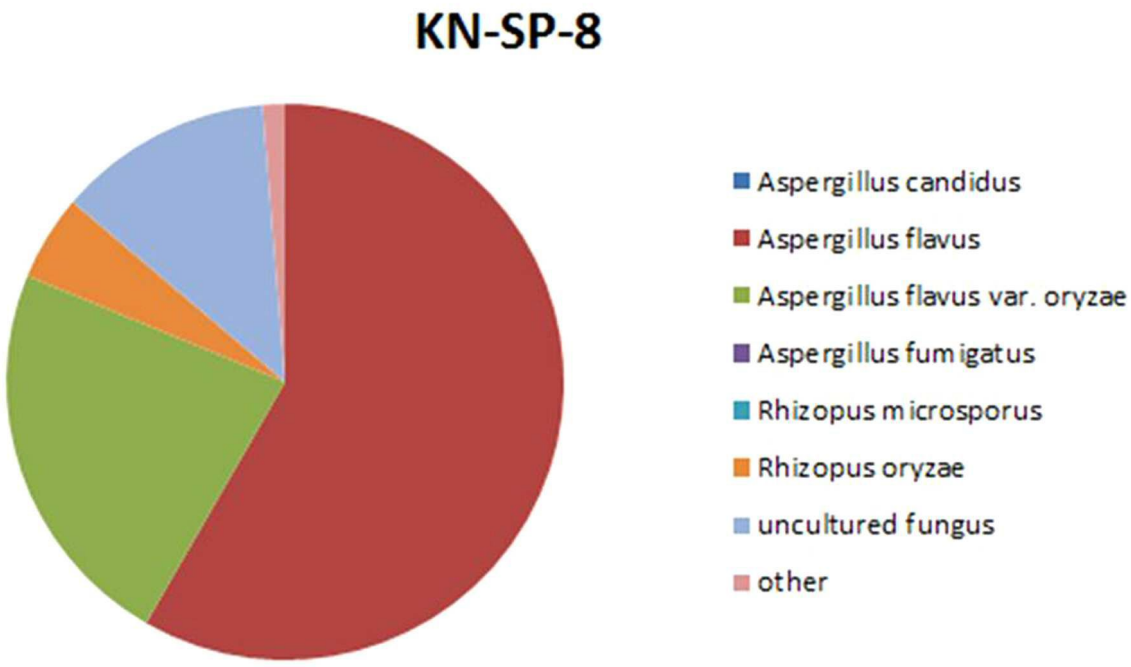
[0249] 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

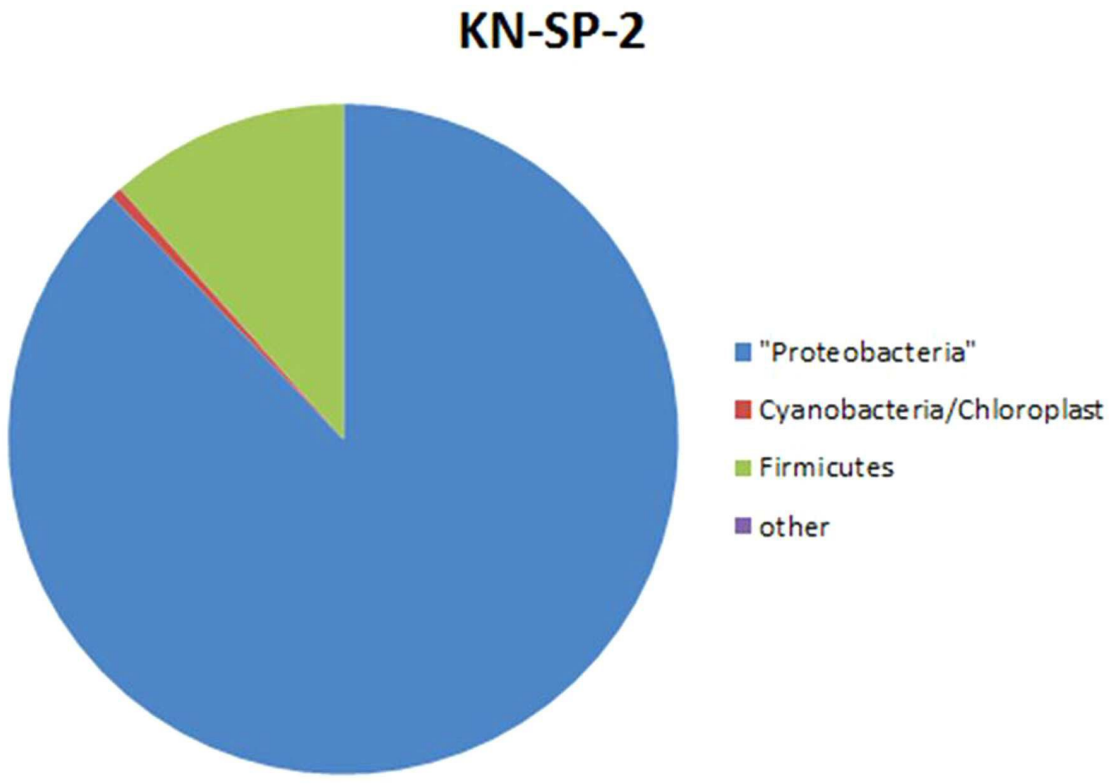
### 도면1



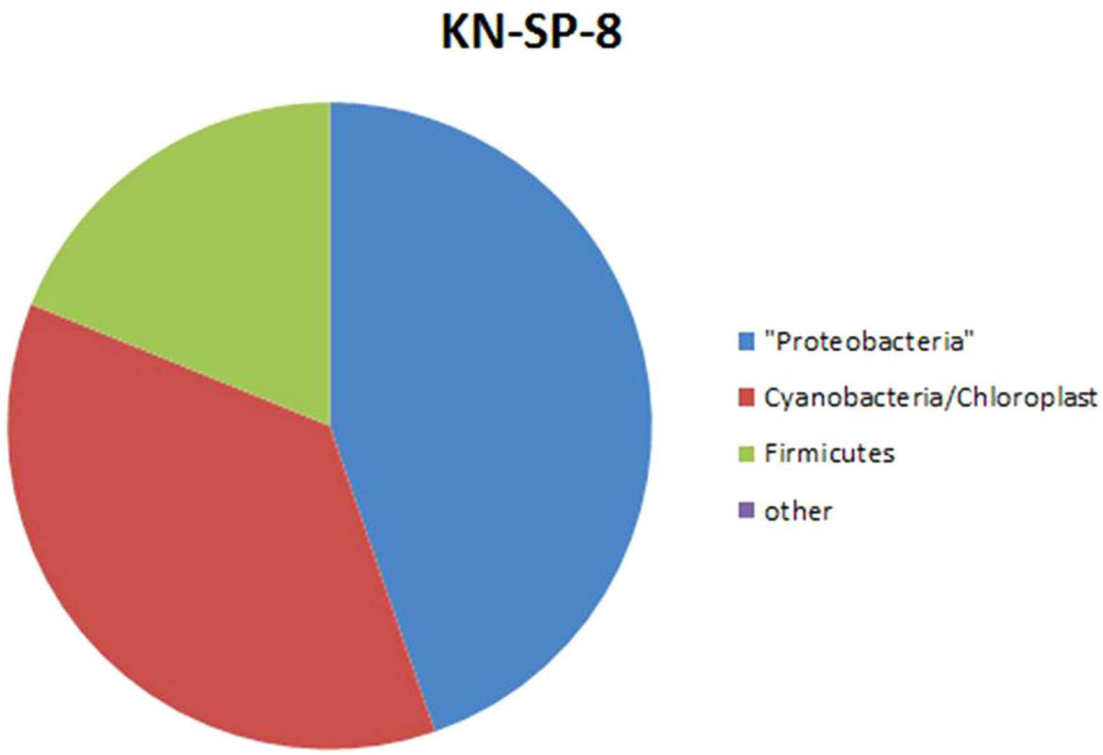
도면2


KN-SP-8
Aspergillus candidus
Aspergillus flavus
Aspergillus flavus var. oryzae
Aspergillus fumigatus
Rhizopus microsporus
Rhizopus oryzae
uncultured fungus
other

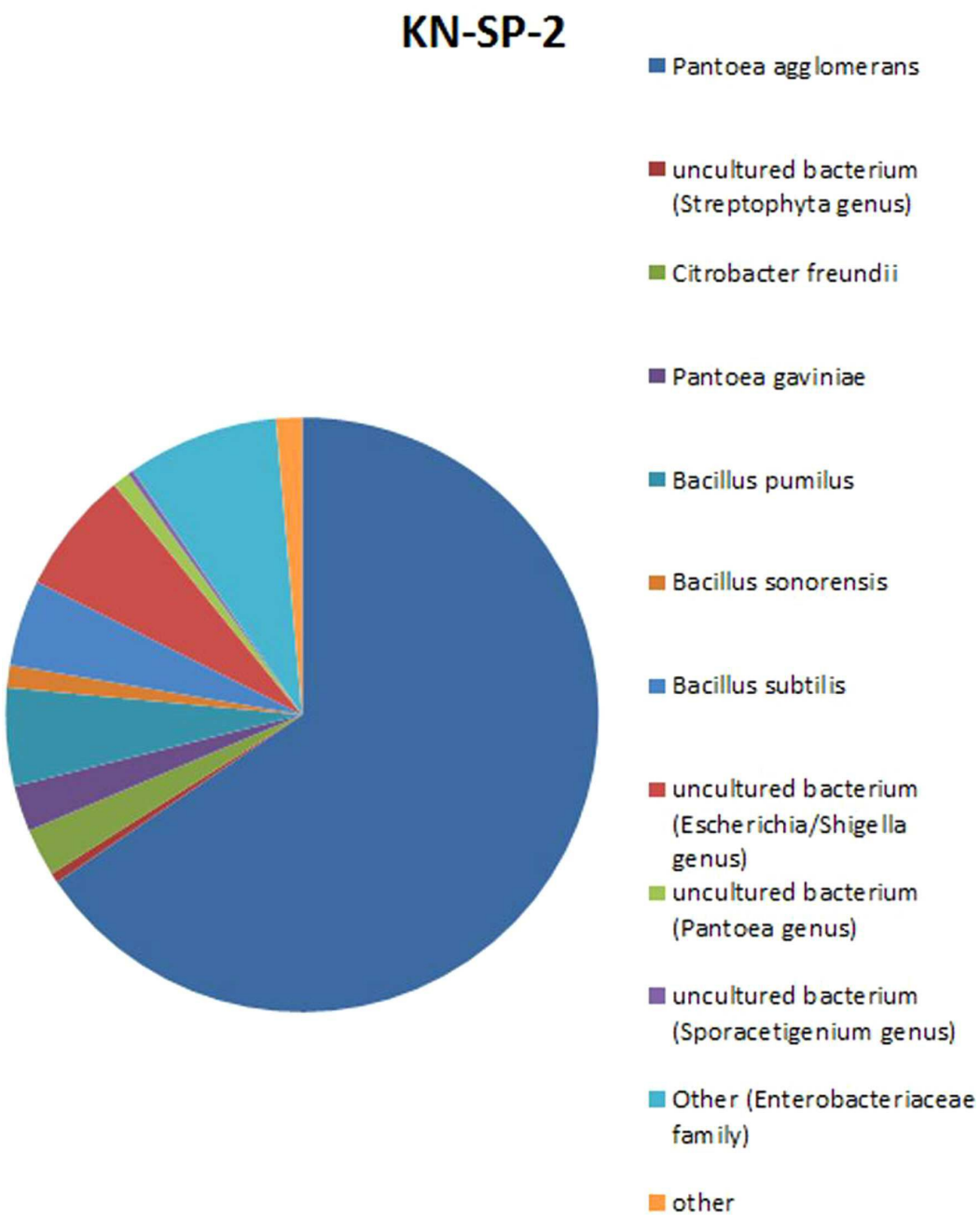
도면3


KN-SP-2
"Proteobacteria"
Cyanobacteria/Chloroplast
Firmicutes
other

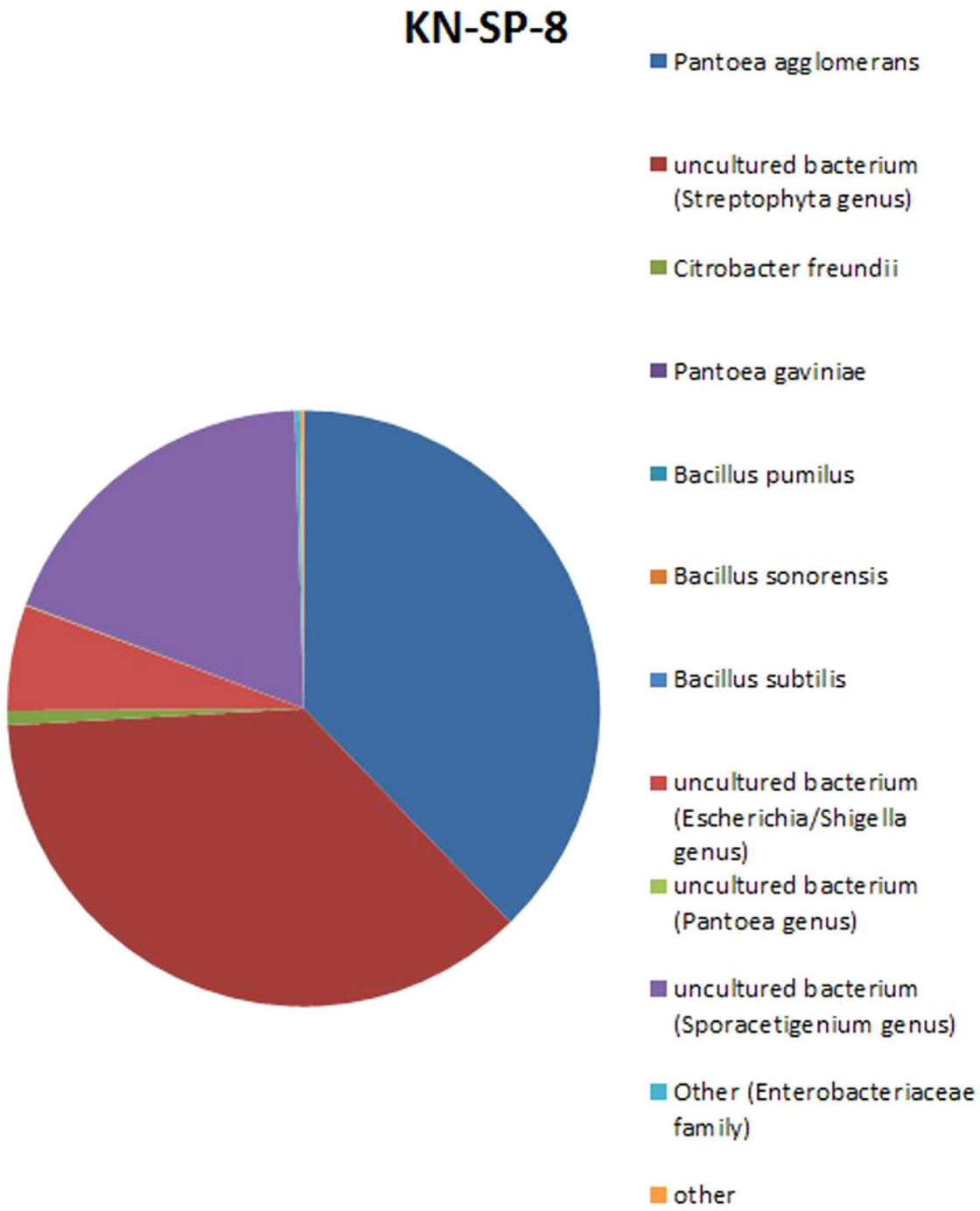
도면4


KN-SP-8
"Proteobacteria"
Cyanobacteria/Chloroplast
Firmicutes
other

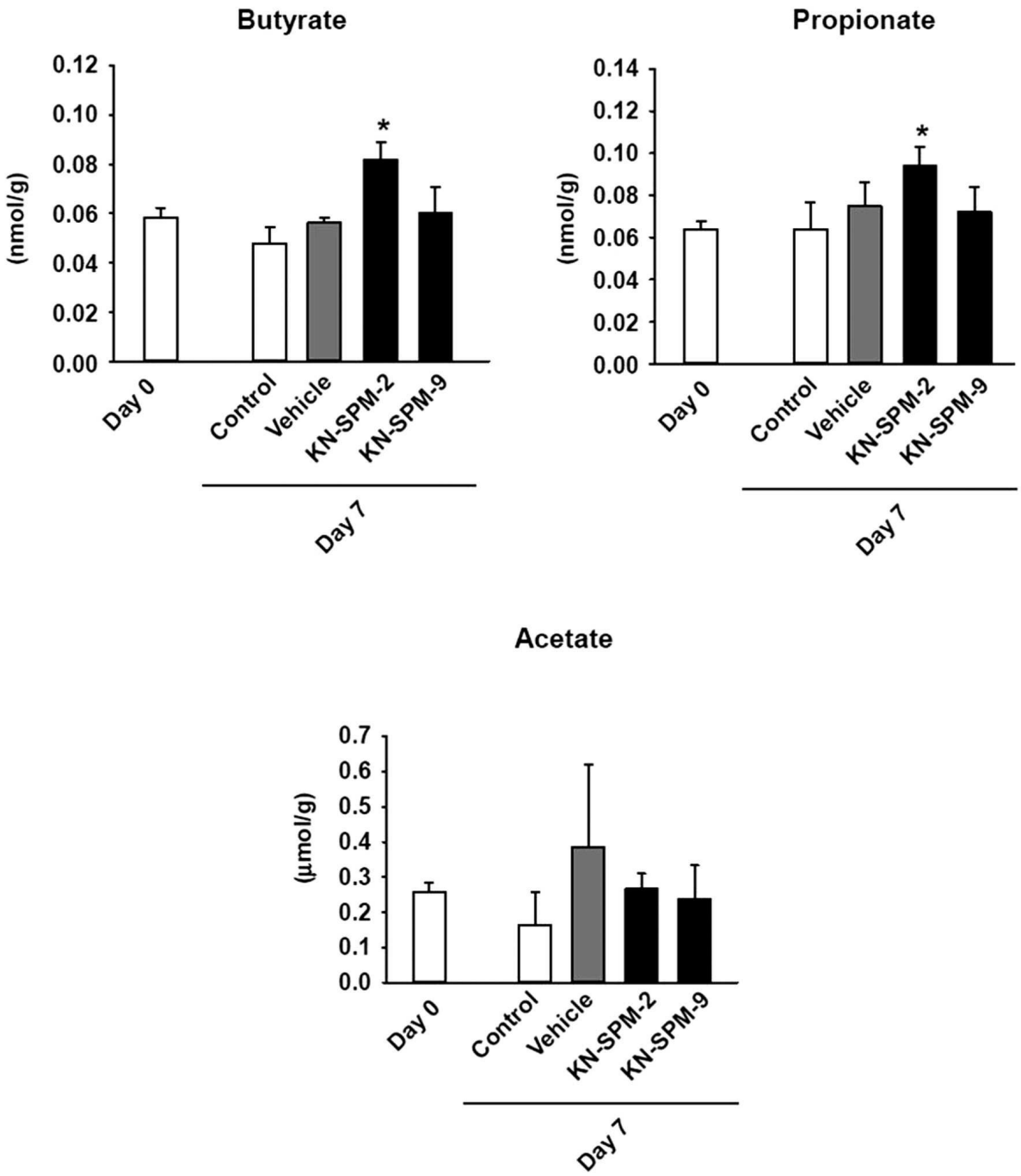
도면5


KN-SP-2
Pantoea agglomerans
uncultured bacterium (Streptophyta genus)
Citrobacter freundii
Pantoea gaviniae
Bacillus pumilus
Bacillus sonorensis
Bacillus subtilis
uncultured bacterium (Escherichia/Shigella genus)
uncultured bacterium (Pantoea genus)
uncultured bacterium (Sporacetigenium genus)
Other (Enterobacteriaceae family)
other

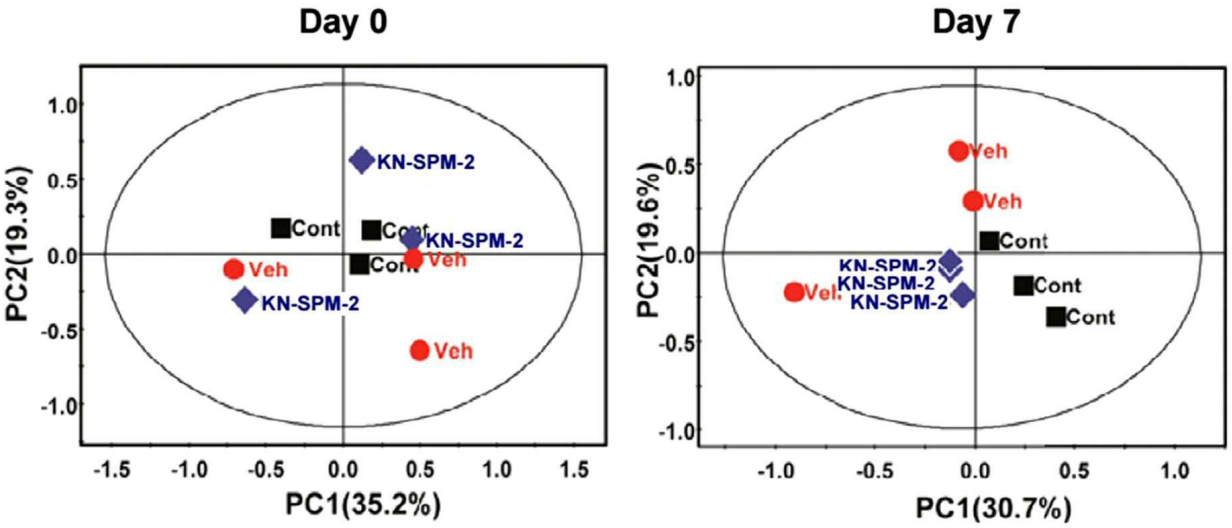
도면6


KN-SP-8
Pantoea agglomerans
uncultured bacterium (Streptophyta genus)
Citrobacter freundii
Pantoea gaviniae
Bacillus pumilus
Bacillus sonorensis
Bacillus subtilis
uncultured bacterium (Escherichia/Shigella genus)
uncultured bacterium (Pantoea genus)
uncultured bacterium (Sporacetigenium genus)
Other (Enterobacteriaceae family)
other

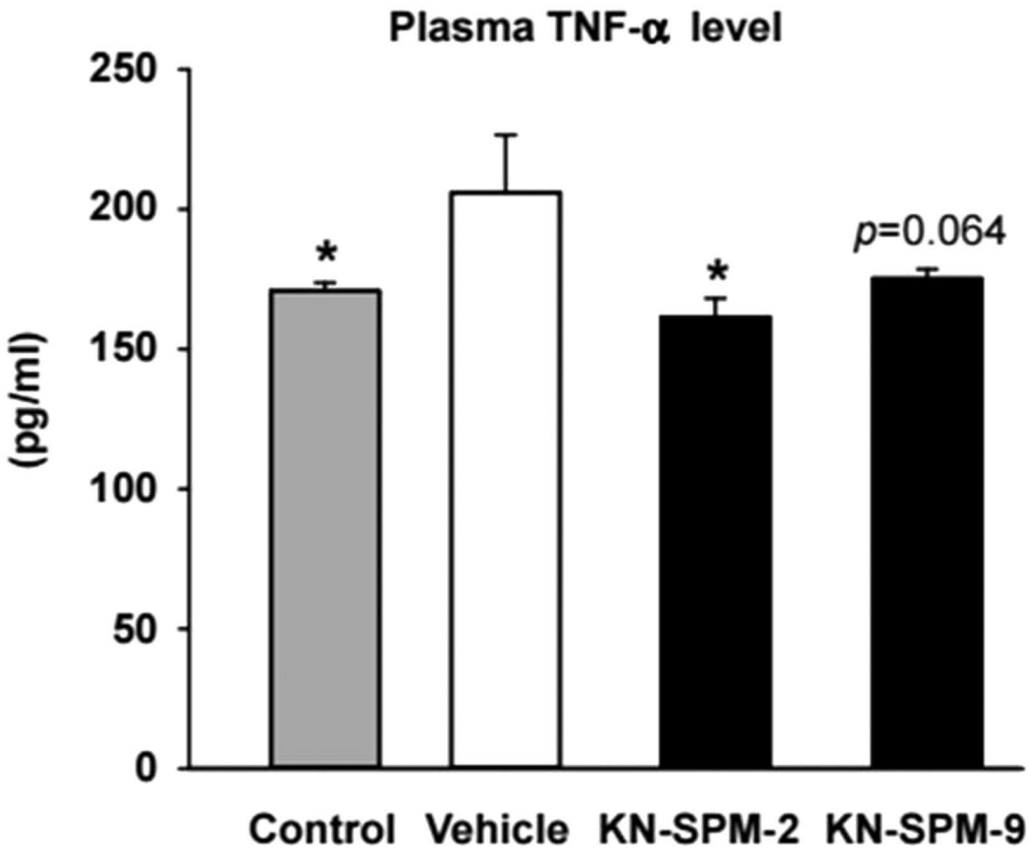
도면7


Butyrate
(nmol/g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
Day 0
Control
Vehicle
KN-SPM-2
KN-SPM-9
Day 7
Propionate
(nmol/g)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
Day 0
Control
Vehicle
KN-SPM-2
KN-SPM-9
Day 7
Acetate
(μmol/g)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Day 0
Control
Vehicle
KN-SPM-2
KN-SPM-9
Day 7

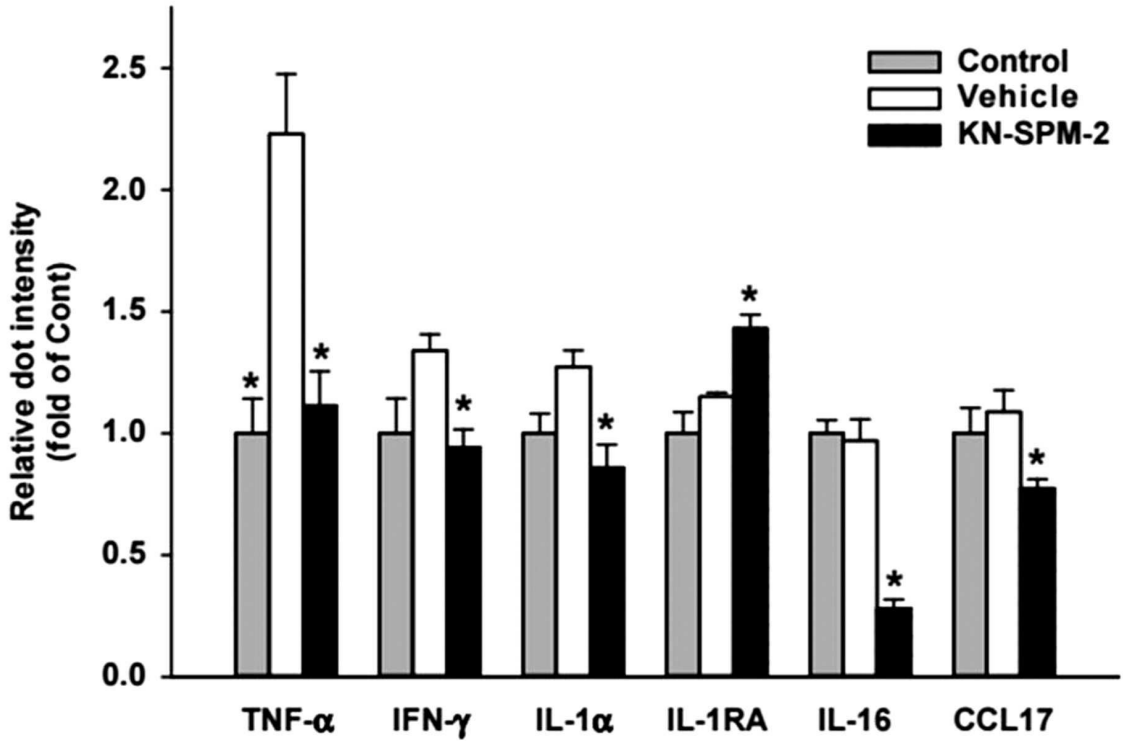
도면8


Day 0
Day 7
PC2(19.3%)
PC1(35.2%)
PC2(19.6%)
PC1(30.7%)
KN-SPM-2
Cont
Veh

도면9


Plasma TNF-α level
(pg/ml)
250
200
150
100
50
0
*
*
p=0.064
Control
Vehicle
KN-SPM-2
KN-SPM-9

도면10


Control
Vehicle
KN-SPM-2
Relative dot intensity
(fold of Cont)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
TNF-α
IFN-γ
IL-1α
IL-1RA
IL-16
CCL17