

## 사과의 식이섬유질이 장내세균의 *in vitro* 생육에 미치는 영향

이현아\* · 이상선\* · 신현경

한림대학교 식품영양학과

\*한양대학교 식품영양학과

### Effect of Apple Dietary Fiber on the *in vitro* Growth of Intestinal Bacteria

Hyeon-Ah Lee\*, Sang-Sun Lee\*, Hyun-Kyung Shin

Department of Food and Nutrition, Hallym University

\*Department of Food and Nutrition, Hanyang University

#### Abstract

Various fractions of apple fibers such as crude pulp, total dietary fiber, soluble dietary fiber, and insoluble dietary fiber were prepared and added to the proteose peptone-yeast extract-fildes (PYF) media to see their effects on the growth of type cultures of intestinal bacteria. Most microbes tested in this experiment grew well in PYF media with the soluble dietary fiber of apple than with the insoluble dietary fiber. Especially *Bifidobacterium* species such as *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* showed higher growth in PYF media containing the soluble dietary fiber than other fiber fractions. However, pectin-added media didn't promote the growth of most microbes used in the experiment. In the *in vitro* mixed culture using rat feces as starter, the addition of the soluble dietary fiber or pectin to the basal medium showed larger proportion of *Bifidobacterium* species in total bacteria than that of glucose.

Key words: apple dietary fiber, pectin, intestinal bacteria, *Bifidobacterium*

#### 서 론

인간과 동물의 장관내에는 수많은 세균들이 서로 공생 또는 길항관계를 유지하며 장내균총을 구성하고 있고 이들이 장관내에서 생성해낸 여러가지 대사산물은 숙주의 영양, 생리작용, 발암, 노화, 면역 등에 크게 영향을 미친다<sup>(1,2)</sup>. 이러한 장내균총은 건강한 사람에게 있어서는 다소 안정적으로 그 균형을 유지하지만 섭취하는 식이, 약물, 생균제품, 기후, 스트레스 등의 외부 요인과 세균상호간의 관계에 의해 발생하는 내부요인에 의해 그 조성이 변경될 수 있다<sup>(3)</sup>. 따라서 이러한 영향인자들을 조절함으로써 장내균총조성을 바람직하게 변화시키려는 노력이 활발하게 이루어지고 있으며 특히 식이수단을 통하여 장내균총을 조절하려는 방법에 많은 노력이 기울여지고 있다. 그 중 oligo당은 지난 10여년동안 일본을 중심으로 활발히 연구되어 왔으며, 그 결과 다양한 종류의 oligo당에서 *Bi-*

*fidobacterium*에 대한 선택적 증식효과가 나타나 장내균총 개선소재로서 다양하게 이용되고 있다<sup>(4,5)</sup>. 최근 Ahn 등<sup>(6)</sup>과 Okubo 등<sup>(7)</sup>은 green tea extract가 유익균인 *Bifidobacterium*의 생육을 촉진시킬 뿐만 아니라 유해균인 *Clostridium*의 생육을 선택적으로 저해시킨다고 보고하였다. 한편 신 등<sup>(8)</sup>은 국내의 식품소재와 한약소재로부터 장내 대표적 유해균인 *Clostridium perfringens*의 억제소재를 광범위하게 탐색, 조사하여 감자단백질과 방기로부터 강력한 *Clostridium perfringens* 생육 억제 활성을 보고한 바 있다. 또한 Benno 등<sup>(9)</sup>은 일본의 시골지역과 도시지역에 사는 노인들의 균총조성을 비교한 연구에서 식이섬유 섭취가 높은 시골지역 노인들이 *Bifidobacteria*의 수가 보다 높고 *Lecithinase negative clostridia*는 더 적음을 보고하고 나이에 따른 장내균총의 변화는 식이섬유의 섭취로 지연시킬 수 있다고 제안하였다.

필자 등<sup>(10)</sup>은 식이섬유가 사람의 소화효소에 의해 소화흡수되지 않기 때문에 대부분 대장에 도달하여 장내세균의 생육에 주요한 기질로서 작용하게 되는 점을 고려하여 한국인의 식생활에서 식이섬유질원으

Corresponding author: Hyun-Kyung Shin, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, 1 Okchondong, Chunchon, Kangwondo 200-702, Korea

로서 중요성이 큰 배추, 무, 사과, 김, 미역, 쌀겨를 선정하여 이들이 장내균총 변화에 미치는 영향을 쥐사육실험을 통하여 조사한 것을 보고한 바 있다. 그 결과 타시험군에 비해 사과섭취군에서 장내 대표적 유익균인 *Bifidobacterium*의 수가 가장 높게 나타나고 유해균인 *E. coli*와 *Staphylococcus*의 수가 가장 낮게 나타나 장내 균총 개선의 측면에서 사과가 유효한 소재로 지적되었다.

본 논문에서는 쥐의 사육실험을 통하여 나타난 사과의 균총개선에 대한 유효성을 분석, 검증하기 위하여 여러가지 사과섬유질의 분획을 제조 또는 구입하여 *in vitro* 배양 실험을 시행하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 식이섬유질의 분리

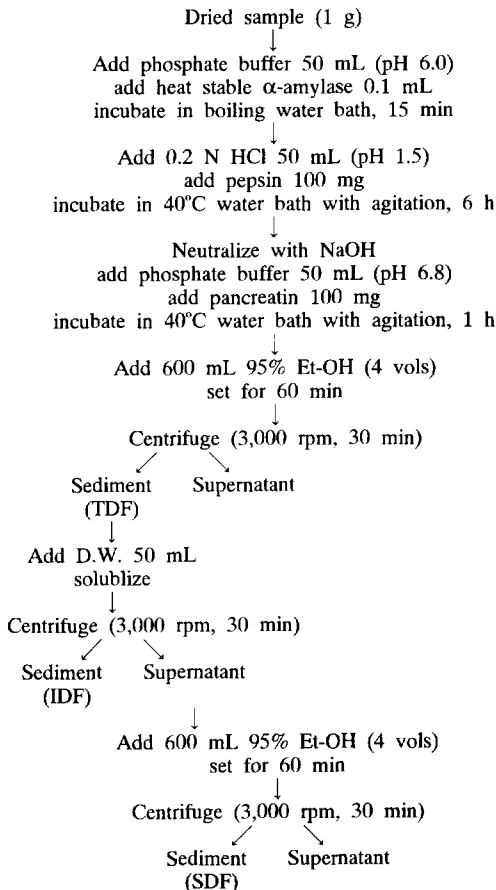


Fig. 1. Flowchart for the preparation of total dietary fiber (TDF), soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) of apples

Hellendoorn 등의 방법<sup>(1)</sup>과 Asp 등의 방법<sup>(2)</sup>을 참조하여 Fig. 1과 같이 사과로부터 여러 분획의 식이섬유질을 분리, 제조하였다. 즉, 사과를 건조시켜 분말화한 다음 체내 소화효소인 amylase, pepsin, pancreatin으로 처리하여 가수분해한 후 4배의 95% ethanol을 가하여 침전되는 물질을 분리하여 총식이섬유질(total dietary fiber: TDF)시료로 준비하였다. 그 후 증류수를 가하여 이에 녹지 않는 성분을 불용성 식이섬유질(insoluble dietary fiber: IDF)로, 그리고 다시 상징액에 4배의 95% ethanol을 가하여 침전되는 성분을 가용성 식이섬유질(soluble dietary fiber: SDF)로 분획하여 사용하였다. 또한 사과의 건조분말에 증류수를 가하여 교반한 다음 원심분리하여 가용성 성분들을 제거시킴으로써 crude pulp를 얻어 실험에 사용하였다.

### PYF배지의 제조

미생물의 당 이용성 검색배지로 이용되고 있는 합성배지인 PYF 액체배지(Table 1)에 사과로부터 분리한 crude pulp, 총식이섬유질, 가용성 섬유질, 불용성 섬유질, 그리고 사과로부터 추출한 시약용 고메톡실 펙틴(high methoxylated pectin; HMP, degree of esterification 70~76%, Fluka Co., Switzerland)과 저메톡실 펙틴(low methoxylated pectin; LMP, degree of esterification 45%, Sigma Co., U.S.A)을 유일한 탄소원으로 하여 각각 0.5%씩 첨가하였다. 또한 당이 첨가되지 않은 PYF액체배지와 포도당을 0.5% 첨가한 PYF액체배지를 대조구로 준비하였다. 그리고 press tube와 CO<sub>2</sub> gas를 사용하여 배지가 든 tube내를 혐기상태로 만든 후 사용하였다.

Table 1. Composition of PYF (proteose peptone-yeast extract-fildes solution) broth

Yeast extract	10 g
Proteose peptone No.3	5 g
Trypticase peptone	5 g
Fildes solution <sup>1)</sup>	40 mL
Salts solution <sup>2)</sup>	40 mL
L-Cysteine HCl·H <sub>2</sub> O	0.5 g
Distilled water	920 mL
Sugar <sup>3)</sup>	10 g
pH 7.5	

<sup>1)</sup>Mix 150 mL of saline, 6 mL con. HCl, 50 mL horse blood and pepsin (1:10,000), overnight at 55°C; Fix pH to 7.6 with 20% NaOH solution and filtrate it; Here horse blood was replaced with cow blood

<sup>2)</sup>Dissolve CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.204 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.48 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, NaHCO<sub>3</sub> 10 g, NaCl 2.0 g in order and make up to 1000 mL with distilled water

<sup>3)</sup>Blank, glucose, crude pulp, TDF, SDF, IDF or pectin

### 주요 장내 미생물의 단독배양에 의한 이용성 조사

주요 장내 미생물의 표준균주들을 R.C.M. (reinforced clostridial medium) 액체배지에서 활성화(activation)시킨 후 대조구와 각각의 기질이 첨가된 PYF액체배지에 각각 2.5%씩 접종하였다. 이를 37°C에서 48시간동안 혐기배양하면서 배양액의 O.D. (optical density)와 pH를 측정하여 균의 성장정도와 산의 생성정도를 판정함으로써 사과 섬유질의 장내 세균에 의한 이용성을 조사하였다. 사용된 공시균주들은 Table 2와 같다.

### 흰쥐의 장내 미생물의 혼합배양

PYF 액체배지를 혐기성 희석액으로 10<sup>2</sup>배로 희석된 분변 혼합액을 종균으로 2.5%씩 접종하여 37°C에서 24시간동안 혐기배양한 후 각 배양액으로부터 배지내 미생물 조성의 변화를 조사하였다.

### 배양액의 생균수 측정

각각의 배양액을 10<sup>7</sup>까지 희석한 후 비선택배지인 BL과 EG, 그리고 각 균의 선택배지로 사용되는 BS (*Bifidobacteria*), LBS (*Lactobacilli*), PNC (*Clostridia*), DHL (*E. coli*), PEES (*Staphylococcus*) 한천배지에 도달하여 37°C에서 1~3일간 배양한 다음 각 배지에 나타난 집락들에 대해 Mitsuoka의 방법<sup>(13)</sup>에 따라 집락 모양과 균의 형태 등을 조사함으로써 속(genus)을 동정하여 각 균수를 측정하였다.

**Table 2. List of strains used in this experiment**

<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (KCCM 11206)
<i>Bifidobacterium animalis</i> (KCCM 11209)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (ATCC 29521)
<i>Bifidobacterium infantis</i> (KCCM 11207)
<i>Bifidobacterium longum</i> (KCCM 11963)
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (ATCC 25525)
<i>Clostridium butyricum</i> (ATCC 19398)
<i>Clostridium paraputrificum</i> (ATCC 25780)
<i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124)
<i>Clostridium ramosum</i> (ATCC 25582)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)
<i>Eubacterium limosum</i> (ATCC 8486)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (KCCM 32820)
<i>Lactobacillus brevis</i> (KCTC 3102)
<i>Lactobacillus plantarum</i> (ATCC 14917)
<i>Pediococcus cerevisiae</i> (KCTC 1628)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12800)
<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 18433)

### 결과 및 고찰

#### 사과섬유질의 주요 장내 세균에 의한 이용성 조사

쥐의 사육실험에서 장내 균총 개선에 유효한 결과를 보여준 사과에 대해서 *in vitro* 배양실험을 통해 이의 유효성을 분석하고 검증하기 위하여 사과로부터 분리한 crude pulp와 총식이섬유질(TDF), 가용성 섬유질(SDF), 불용성 섬유질(IDF) 그리고 시약용 고메톡실 펙틴(HMP)과 저메톡실 펙틴(LMP)으로 주요 장내 세균의 표준균주들을 단독배양하면서 O.D.와 pH를 측정함으로써 장내 세균에 의한 사과 식이섬유질의 이용성을 조사하였고(Table 3-7), 당 무첨가구와 포도당 첨가구에 대한 이들 사과 섬유질의 상대적인 이용성을 비교하였다(Table 8).

최소한의 처리로 사과 섭취시 대장까지 도달할 수 있는 섬유질원을 얻기 위해 사과 성분 중 주로 당과 산만을 간단하게 제거하여 얻은 crude pulp는 수율 12.6% 정도로 제조할 수 있었으며 사과의 성분조성<sup>(14)</sup>을 고려해 볼 때 crude pulp의 대부분은 식이섬유질일 것으로 여겨진다. 이 crude pulp를 가지고 주요 장내세균에 의한 이용성을 측정해 본 결과(Table 3, 8) 6종의 *Bifidobacterium*과 *Clostridium paraputrificum*, 그리고 *Lactobacillus plantarum*이 당 무첨가구에 비해 약 3~20배 정도로 crude pulp첨가구에서 잘 생육하였으며, 이 중 *Bifidobacterium adolescentis*와 *B. thermophilum*은 crude pulp를 이용하여 포도당 이용시와 비교하여 각각 35%와 27% 정도의 성장을 보였다. 그러나 *Bifidobacterium bifidum*의 경우 종균이 제대로 활성화되지 못하여 포도당 첨가구를 비롯하여 모든 시험구에 서 정상적으로 생육하지 못한 결과가 나타났다.

사과를 체내 소화효소로 가수분해한 후 알콜로 침전시켜 얻은 TDF의 함량은 건중량을 기준으로 11.2%로서 김<sup>(15)</sup>이 Prosky 등의 방법으로 분석한 11.6%와는 거의 비슷하였고, 권<sup>(16)</sup>이 보고한 13.2%보다는 약간 적게 나타났다. 장내 세균에 의한 이용성을 측정된 결과는 Table 4에서 보듯이 대부분의 장내세균들이 단독 배양시 사과의 TDF를 거의 이용하지 못하는 것으로 나타났다.

사과로부터 TDF를 분리한 후 물에 대한 용해도에 따라 가용성 식이섬유질(SDF)과 불용성 식이섬유질(IDF)로 분획한 결과 그 조성이 SDF 29%와 IDF 71%로 나타났다. 이들을 PYF배지에 탄소원으로 첨가하여 *in vitro* 배양실험을 실시한 결과(Table 5, 8) 전반적으로 IDF보다는 SDF를 잘 이용하는 경향을 보여 주었다. 특히 *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*,

**Table 3. Bioavailability of the crude pulp of apple by intestinal bacteria**

Microorganisms	PYF <sup>1)</sup>		PYF+CP <sup>2)</sup>		PYF+Glucose	
	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	±	+	±	++	++
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	±	±	+	±	+++	+++
<i>B. animalis</i>	±	±	+	±	+++	+++
<i>B. bifidum</i>	±	±	+	±	+	+++
<i>B. infantis</i>	±	±	+	±	+++	+++
<i>B. longum</i>	±	±	+	±	+++	+++
<i>B. thermophilum</i>	±	±	+	+	+++	+++
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+	+	++	+++	+++
<i>Cl. paraputrificum</i>	±	±	+	+	+	++
<i>Cl. perfringens</i>	+	±	+	±	++	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	±	±	±	±	+++	+++
<i>L. brevis</i>	±	±	±	±	+	±
<i>L. plantarum</i>	+	+	++	++	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	±	+	+	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	±	++	+	++	+++
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	++	++	++	+++

Judgement of bacterial growth: ±: 0.0-0.199 (A<sub>600</sub>/5) ΔpH: ±: <0.5  
 +: 0.2-0.399 (A<sub>600</sub>/5) +: 0.5-0.99  
 ++: 0.4-0.599 (A<sub>600</sub>/5) ++: 1.0-1.99  
 +++: >0.600 (A<sub>600</sub>/5) +++: >2.0

<sup>1)</sup>PYF: proteose peptone-yeast extract-fildes broth.

<sup>2)</sup>CP: crude pulp of apple.

**Table 4. Bioavailability of total dietary fibers of apple by intestinal bacteria**

Microorganisms	PYF <sup>1)</sup>		PYF+TDF <sup>2)</sup>		PYF+Glucose	
	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	±	±	±	±	++	+++
<i>B. animalis</i>	±	±	±	±	+++	+++
<i>B. infantis</i>	±	±	±	±	++	+++
<i>B. longum</i>	±	±	±	±	+++	+++
<i>B. thermophilum</i>	±	±	±	±	+++	+++
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+	+	±	+++	+++
<i>Cl. paraputrificum</i>	±	±	+	±	+	+
<i>Cl. perfringens</i>	+	±	+	±	+++	++
<i>Cl. ramosum</i>	+	++	+	±	++	+++
<i>L. plantarum</i>	+	±	+	±	+	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	±	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	±	+	±	+	++

Judgement of bacterial growth: ±: 0.0-0.199 (A<sub>600</sub>/5) ΔpH: ±: <0.5  
 +: 0.2-0.399 (A<sub>600</sub>/5) +: 0.5-0.99  
 ++: 0.4-0.599 (A<sub>600</sub>/5) ++: 1.0-1.99  
 +++: >0.600 (A<sub>600</sub>/5) +++: >2.0

<sup>1)</sup>PYF: proteose peptone-yeast extract-fildes broth.

<sup>2)</sup>TDF: total dietary fiber.

*B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* 등 실험에 사용된 *Bifidobacterium* 모두가 사과 SDF 첨가구에서 당 무첨가구에 비해 7~20배 정도의 성장을 보였고 포도당 첨가구의 35~51%에 달하는 균체량을 보여 비교적 높은 이용성을 나타냈다. 이 중 *Bifidobacterium in-*

*fantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* 등은 사과 IDF 첨가구에서도 당 무첨가구의 4~13배, 포도당 첨가구의 25% 정도의 이용성을 보였다. 그리고 *Clostridium paraputrificum*도 사과 SDF와 IDF를 각각 포도당 이용시의 72%와 47% 정도로 이용하는 것으로 나타났

**Table 5. Bioavailability of soluble dietary fiber and insoluble dietary fiber of apple by intestinal bacteria**

Microorganisms	PYF <sup>1)</sup>		PYF+SDF <sup>2)</sup>		PYF+IDF <sup>3)</sup>		PYF+Glucose	
	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	±	++	±	+	±	+++	++
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	±	±	++	+	±	±	+++	+++
<i>B. animalis</i>	±	±	++	+	±	±	+++	+++
<i>B. infantis</i>	±	±	++	±	+	±	+++	+++
<i>B. longum</i>	±	±	++	+	+	±	+++	+++
<i>B. thermophilum</i>	±	±	++	+	+	±	+++	+++
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+	++	+	++	+	+++	++
<i>Cl. paraputrificum</i>	±	±	++	±	+	±	++	++
<i>Cl. perfringens</i>	++	±	++	±	+	±	+++	++
<i>Cl. ramosum</i>	+	±	++	+	+	+	+++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	±	++	+	+	±	+++	+++
<i>L. brevis</i>	+	±	+	±	+	±	+++	++
<i>L. plantarum</i>	+	+	++	+	+	+	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	±	++	+	+	+	+++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	++	+(±)	+	±	+++	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	±	++	±	+	±	+++	+++
<i>Streptococcus faecalis</i>	++	±	++	+	++	+	++	+++
<i>Eubacterium limosum</i>	++	±	+	±	+	±	+++	++
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+	±	++	+	+	±	+++	+++

Judgement of bacterial growth: ±: 0.0-0.199 ( $A_{600}/5$ )    ΔpH: ±: <0.5  
 +: 0.2-0.399 ( $A_{600}/5$ )    +: 0.5-0.99  
 ++: 0.4-0.599 ( $A_{600}/5$ )    ++: 1.0-1.99  
 +++: >0.600 ( $A_{600}/5$ )    +++: >2.0

<sup>1)</sup>PYF: proteose peptone-yeast extract-fildes broth.

<sup>2)</sup>SDF: soluble dietary fiber of apple.

<sup>3)</sup>IDF: insoluble dietary fiber of apple.

**Table 6. Bioavailability of high methoxylated pectins by intestinal bacteria**

Microorganisms	PYF <sup>1)</sup>		PYF+HMP <sup>2)</sup>		PYF+Glucose	
	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH
<i>Bacteroides fragilis</i>	nd <sup>3)</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>B. animalis</i>	±	±	±	±	++	++
<i>B. bifidum</i>	±	±	±	±	±	+
<i>B. infantis</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>B. longum</i>	±	±	±	±	++	+++
<i>B. thermophilum</i>	±	±	±	+	+++	+++
<i>Clostridium butyricum</i>	±	±	+	++	+++	+++
<i>Cl. paraputrificum</i>	±	±	±	±	++	++
<i>Cl. perfringens</i>	+	±	+	±	+++	++
<i>Cl. ramosum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>L. brevis</i>	±	±	±	±	+	+
<i>L. plantarum</i>	±	+	±	+	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	±	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	±	+	±	++	++
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+	+	++	++
<i>Eubacterium limosum</i>	±	±	±	±	+++	++
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+	+	+	+	+++	+++

Judgement of bacterial growth: ±: 0.0-0.199 ( $A_{600}/5$ )    ΔpH: ±: <0.5  
 +: 0.2-0.399 ( $A_{600}/5$ )    +: 0.5-0.99  
 ++: 0.4-0.599 ( $A_{600}/5$ )    ++: 1.0-1.99  
 +++: >0.600 ( $A_{600}/5$ )    +++: >2.0

<sup>1)</sup>PYF: proteose peptone-yeast extract-fildes broth.

<sup>2)</sup>HMP: high methoxylated pectin.

<sup>3)</sup>nd: not determined.

Table 7. Bioavailability of low methoxylated pectins by intestinal bacteria

Microorganisms	PYF <sup>1)</sup>		PYF+LMP <sup>2)</sup>		PYF+Glucose	
	growth	ΔpH	growth	ΔpH	growth	ΔpH
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>B. animalis</i>	±	±	±	+	+++	+++
<i>B. bifidum</i>	±	±	±	±	±	+
<i>B. infantis</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>B. longum</i>	±	±	±	+	+++	+++
<i>B. thermophilum</i>	±	±	±	+	+++	+++
<i>Clostridium butyricum</i>	±	+	+	++	+++	+++
<i>Cl. paraputrificum</i>	±	±	±	±	±	+
<i>Cl. perfringens</i>	±	±	±	±	+	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	±	±	±	+	++	+++
<i>L. brevis</i>	±	±	±	±	+	+
<i>L. plantarum</i>	+	±	+	+	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	±	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	±	+	+	++	++

Judgement of bacterial growth: ±: 0.0-0.199 (A<sub>600</sub>/5) ΔpH: ±: <0.5  
 +: 0.2-0.399 (A<sub>600</sub>/5) +: 0.5-0.99  
 ++: 0.4-0.599 (A<sub>600</sub>/5) ++: 1.0-1.99  
 +++: >0.600 (A<sub>600</sub>/5) +++: >2.0

<sup>1)</sup>PYF: proteose peptone-yeast extract-fildes broth.

<sup>2)</sup>LMP: low methoxylated pectin.

다. 그리고 사과로부터 추출한 시약용 고메톡실 펙틴(HMP)과 저메톡실 펙틴(LMP)을 가지고 장내 세균에 의한 이용성을 조사한 결과(Table 6, 7, 8), 실험에 사용된 모든 균주들이 HMP첨가구에서 당무첨가구와 비슷하게 낮은 성장을 나타냈고, 시약용 저메톡실 펙틴(LMP)역시 *Bifidobacterium thermophilum*과 *Clostridium butyricum*에 의해 약간 이용되었을 뿐 대부분의 장내 세균들이 LMP 첨가구에서 당무첨가구와 거의 비슷하게 낮은 성장을 보이고 있는 바 이는 대부분의 장내 세균들이 단독 배양시 HMP와 LMP를 거의 이용하지 못함을 나타내주고 있다.

이상과 같이 장내 주요균들의 사과 식이섬유질에 대한 이용성은 전반적으로 불용성 식이섬유질(IDF)보다는 수용성 식이섬유질(SDF)을 잘 이용하는 것으로 보인다. SDF와 IDF를 모두 포함하고 있는 TDF의 이용성이 SDF의 이용성과 비교하여 매우 미약하게 나타난 것은 TDF의 구조가 SDF 구조에 비해 더 단단하고 조밀하기 때문에 장내균들에 의한 분해가 더 어렵기 때문인 것으로 여겨진다. 그리고 TDF의 이용성에 비해 crude pulp의 이용성이 크게 나타난 것은 간단한 처리를 통해 사과 성분 중 주로 당과 산만이 제거되었기 때문에 crude pulp에는 소량의 단백질과 지질, starch, 그리고 처리후 제거되지 않은 당질 등 식이섬유질 외의 성분들이 함께 존재함으로써 장내 세균들이 이들 성분들을 이용하여 성장하였을 것으로 생각

된다. 그리고 사과의 SDF는 장내세균에 의하여 잘 이용된 반면 사과의 주요한 수용성 식이성분인 pectin은 대부분의 장내균들에 의해 이용되지 않는 것으로 나타났다는데, 이러한 결과로 볼때 사과 중 펙틴이외의 다른 수용성 식이성분의 이용 가능성을 생각해 볼 수 있다. Chen 등<sup>(17)</sup>이 사과로부터 착즙후 얻은 apple fiber의 조성을 분석한 결과를 보면 이 중 water-soluble hemicellulose가 19.2%정도 차지한 것으로 미루어 보아 사과의 SDF에 상당한 양의 hemicellulose가 존재할 것으로 여겨지며 따라서 SDF의 이용성 결과는 부분적으로 사과의 hemicellulose에 의하여 나타났을 가능성도 있다. 한편 시약용 펙틴이 실제로 실험에 사용된 사과의 펙틴과 구조나 조성에 있어서 차이가 나서 장내세균들이 이를 이용하지 못하였을 경우도 생각해 볼 수 있을 것이다.

#### 사과 섬유질을 이용한 흰쥐 분변 미생물의 혼합배양 결과

사과의 식이섬유질원이 흰쥐의 장내세균의 생육에 미치는 영향<sup>(10)</sup>을 장내 미생물의 *in vitro* 혼합배양을 통해 분석, 조사하였다. 즉, PYF broth에 당을 전혀 첨가하지 않거나 포도당을 0.5% 첨가한 두 대조구와 사과로부터 분리한 여러 종류의 식이섬유질을 0.5%씩 첨가한 각 시험구를 분변 희석액을 종균으로 접종하여 배양한 후 총균수와 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,

**Table 8. Effects of apple fiber fractions on the growth of rat feces' bacteria in PYF broth cultivation**

Microorganisms	0 hour	24 hour		
		No sugar	Glucose	CP <sup>1)</sup>
Total counts	5.9±0.3 <sup>3)</sup> (4/4) <sup>3)</sup>	8.9±0.2(4/4)	8.9±0.1(4/4)	9.2±0.2(4/4)
<i>Lactobacillus</i>	5.3±0.2 (4/4)	7.6±0.2(4/4)	8.0±0.2(4/4)	7.7±0.2(4/4)
<i>Bifidobacterium</i>	2.5±0.5 (4/4)	4.9±1.6(2/4)	4.2±0.4(4/4)	5.5±0.8(4/4)
<i>Clostridium</i>	2.5±0.1 (4/4)	5.2±0.3(4/4)	5.1±0.4(4/4)	5.2±0.4(4/4)
<i>E. coli</i>	2.9±1.8 (4/4)	8.2±0.4(4/4)	6.3±0.8(4/4)	8.1±0.3(4/4)
<i>Staphylococcus</i>	1.5±0.4 (4/4)	<2.0 (4/4)	<2.0 (4/4)	2.3 (1/4)

<sup>1)</sup>CP: crude pulp of apple.<sup>2)</sup>Mean ± SE (log CFU/g feces).<sup>3)</sup>Frequency occurrence=detected number/examined number.**Table 8. Continued**

Microorganisms	24 hour				
	TDF <sup>1)</sup>	SDF <sup>2)</sup>	IDF <sup>3)</sup>	HMP <sup>4)</sup>	LMP <sup>5)</sup>
Total counts	9.3±0.1 <sup>6)</sup> (2/2) <sup>7)</sup>	9.3±0.2(4/4)	8.9±0.1(2/2)	8.8±0.3(3/3)	9.1±0.1(4/4)
<i>Lactobacillus</i>	7.5±0.3 (2/2)	7.8±0.2(4/4)	7.6±0.5(2/2)	7.8±0.2(3/3)	8.2±0.2(4/4)
<i>Bifidobacterium</i>	<5.0 (0/2)	6.2±0.7(3/4)	7.4 (1/2)	6.7±0.3(3/3)	7.2±0.5(4/4)
<i>Clostridium</i>	4.9±0.1 (2/2)	5.1±0.3(4/4)	5.4±0.1(2/2)	5.1±0.2(3/3)	5.2±0.4(4/4)
<i>E. coli</i>	8.3±0.0 (2/2)	8.1±0.2(4/4)	8.1±0.0(2/2)	8.3±0.3(3/3)	8.0±0.2(4/4)
<i>Staphylococcus</i>	<2.0 (2/2)	3.1 (1/4)	2.3 (1/2)	<2.0 (3/3)	<2.0 (4/4)

<sup>1)</sup>TDF: total fiber of apple.<sup>2)</sup>SDF: soluble dietary fiber of apple.<sup>3)</sup>IDF: insoluble dietary fiber of apple.<sup>4)</sup>HMP: high methoxylated pectin.<sup>5)</sup>LMP: low methoxylated pectin.<sup>6)</sup>Mean ± SE (log CFU/g feces).<sup>7)</sup>Frequency occurrence=detected number/examined number.

*Clostridium*, *E. coli*, *Staphylococcus* 등 주요균들의 생균수를 측정하였다(Table 8). 분변 1g당의 총균수는 초기의  $10^{5.9}$ 에서 24시간 배양 후  $10^{8.8}$ ~ $10^{9.3}$ 으로 증가하였고 *Lactobacillus*의 수는 LMP 첨가구에서  $10^{2.0}$ 로 가장 크게 증가하였으나 모든구에서  $10^{7.5}$ ~ $10^{8.2}$ 로 나타나 시험구간에 큰 차이를 보이지 않았다. *Bifidobacterium*의 수는 포도당 첨가구, 당 무첨가구에서 각각  $10^{4.2}$ ,  $10^{4.9}$  정도로 적게 나타났으나 crude pulp 첨가구에서는 이보다 약간 많은  $10^{5.4}$ 로, 그리고 SDF 첨가구에서는  $10^{6.2}$ 으로 상당히 증가하였다. 또한 HMP 첨가구와 LMP 첨가구에서는  $10^{6.9}$ ,  $10^{7.2}$ 으로 두 대조구에 비해 각각 크게 증가하였다. *Clostridium*의 수는  $10^{4.9}$ ~ $10^{5.4}$ 정도로 나타나 *Lactobacillus*와 마찬가지로 구간에 큰 차이를 보이지 않았다. *E. coli*는 포도당 첨가구에서  $10^{6.3}$ 으로 나타났고 기타 모든 시험구와 당 무첨가구에서  $10^{8.0}$ ~ $10^{8.3}$ 정도로 나타나 초기의  $10^{2.9}$ 보다 크게 증가함을 보였다. *Staphylococcus*의 수는 초기에  $10^{1.5}$ 이었으나 배양 후 crude pulp, SDF, IDF에서 각각 1번씩 검출되었을 뿐 대부분의 시험구에서 나타나지 않았다.

Table 8에서 살펴 보면 포도당 첨가구에서는 *Lactobacillus*가 최우세균으로 나타난 반면 *Bifidobacterium*균들은 열세균으로 조사되었다. 그러나 사과섬유질의 첨가구들에서는 *E. coli*와 *Lactobacillus*가 우세균으로 나타나고 이어서 *Bifidobacterium*도 포도당 첨가구에 비하여 현저히 많은 수가 검출되었다. 특히 펙틴의 첨가구들에서는 *Bifidobacterium*이 차우세균으로 다량 검출되었다. Table 3-7에서 보면 사과의 SDF와 CP첨가구에서 일부 *Bifidobacterium*의 생육이 촉진되는 경우를 제외하고 나머지 섬유질 획분이나 펙틴 첨가구들에서 대부분의 세균들의 생육촉진이 거의 이루어지지 않고 있는데 반하여 혼합 배양시에는 조사한 대부분의 세균들의 생육이 활발하게 이루어지고 있다. 이는 혼합 배양시 각 균들의 협동작용에 의해서 사과 섬유질 또는 펙틴질들이 *E. coli*, *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium*속 균들에 의해서 선택적으로 용이하게 이용될 수 있는 형태로 전환되었기 때문으로 생각된다.

혼합 배양시 포도당 첨가구에 비하여 펙틴질 첨가구에서 *Bifidobacterium*의 수가 크게 증가한 것은 포도

문 헌

당의 경우 모든 균들이 다같이 잘 이용함으로써 *Bifidobacterium*속 균들만이 선택적으로 잘 이용하는 특성이 없는데다 일반적으로 생육속도가 느리기 때문에 균총조성에서 열세균으로 나타난 반면 사과섬유질과 펙틴질의 경우 여러 균들의 협동작용에 의해 생성된 산물이 *Bifidobacterium*속 균들에 의해 비교적 선택적으로 잘 이용되는 특성이 있었기 때문으로 해석된다.

이상의 결과에서 표준균주들의 단독배양방법은 수많은 균들이 혼합, 서식하고 있는 장내의 상황을 설명하는데 큰 한계가 있음을 알려주고 있다. 따라서 장내의 균총변화에 대한 현상을 해석하기 위한 *in vitro* 실험방법에 있어서도 엄격한 혐기상태의 유지, 장내균들의 혼합배양, *in vivo* 상태와 유사한 배지조성 등 많은 조건들이 충족되어야만 의미있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다<sup>(18-19)</sup>.

요 약

쥐의 사육실험결과 장내 균총 개선에 유효한 것으로 나타난 사과에 대하여 *in vitro* 배양실험을 통하여 이들의 유효성을 검증하였다. 사과로부터 분리한 crude pulp (CP), total dietary fiber (TDF), soluble dietary fiber (SDF), insoluble dietary fiber (IDF)와 시약용 사과 펙틴을 구입하여 PYF 액체배지에 첨가한 후 주요 장내 미생물의 표준균주들을 단독배양하여 O.D.와 pH를 측정함으로써 그 이용성을 조사하였다. 또한 이들 배지에 흰쥐의 분변 혼합액을 종균으로 접종하여 혼합배양한 후 주요 장내 미생물의 균총변화를 조사하였다.

대부분의 장내 세균들이 사과의 IDF 첨가구에서보다 SDF 첨가구에서 더 잘 생육하였으며 특히 *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* 등 Bifidus균들은 SDF 첨가구에서 비교적 높은 이용성을 나타냈으나 시약용 펙틴을 첨가한 시험구에서는 실험에 사용된 대부분의 균들이 거의 생육하지 않았다. 그러나 흰쥐의 분변 미생물들을 혼합배양하였을 때 사과의 섬유질 특히 수용성 식이섬유질(SDF)과 펙틴질 첨가구에서 포도당 첨가구에 비하여 *Bifidobacterium*의 수가 다량 검출되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정연구과제(92-5000-02-01-3)로 수행된 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

1. Mitsuoka, T.: Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 3 (1982)
2. Mitsuoka, T.: Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.*, 50, 438 (1992)
3. 박종현 : 장내미생물과 건강. *식품기술* 5, 5 (1992)
4. Yazawa, K. and Tamura, Z.: Search for sugar sources for selective increase of *Bifidobacteria*. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 39 (1982)
5. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y.: Effects of fructooligo-saccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, 5, 37 (1986)
6. Ahn, Y.J., Sakanaka, S., Kim, M.J., Kawamura, T., Fujisawa, T. and Mitsuoka, T.: Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3, 335 (1990)
7. Okubo, T., Ishihara, N., Oura, A., Serit, M., Kim, M.J., Yamamoto, T. and Mitsuoka, T.: *In vivo* effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 588 (1992)
8. 신현경 : 장내균총 개선을 위한 신소재 탐색. 식품 신소재의 개발과 이용 심포지움 논문집(한국식품과학회), p. 49 (1992)
9. Benno, Y., Endo, K., Mizutani, T., Namba, Y., Komori, T. and Mitsuoka, T.: Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microb.*, 55, 1100 (1989)
10. 이현아, 이상선, 신현경 : 주요 식이섬유질원이 흰쥐의 장내균총조성에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 27, 988 (1994)
11. Hellendoorn, E.W., Noordhoff, M.G. and Slagman, J.: Enzymatic determination of the indigestible residue (dietary fiber) content of human food. *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 1461 (1975)
12. Asp, N.G., Johansson, C.G., Hallmer, H. and Siljestrom, M.: Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 476 (1983)
13. Mitsuoka, T.: *A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*, Tokyo, Sobunsha, p.51 (1980)
14. 농촌진흥청. 농촌영양개선연수원 : 식품성분표제4개정판 (1991)
15. 김미정, 이상선 : 식이섬유질의 종류가 흰쥐의 혈청지질 농도와 장기능에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 28, 23 (1995)
16. 권혁희 : Dietary fiber의 분석방법에 관한 고찰. *한국영양학회지*, 25, 91 (1992)
17. Chen, H., Rubenthaler, G.L., Leung, H.K. and Baranowski, J.D.: Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem.*, 65, 244 (1988)
18. 김창곤 : Inulin과 돼지감자fructo올리고당이 장내미생물의 생육에 미치는 영향. 서울대학교 대학원 협동과정 농업생물공학과 석사학위논문 (1994)
19. Rumney, C.J. and Rowland, I.R.: *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 299 (1992)