

식이 뽕잎이 흰쥐의 장내균총 구성에 미치는 영향

이희삼 · 전호정* · 이상덕* · 문재유* · 김애정** · 류강선
농업과학기술원 잠사곤충부, 서울대학교 농업생명과학대학*, 해전대학**

Effect of Dietary Mulberry leaf on the Composition of Intestinal Microflora in SD Rats

Heui Sam Lee, Ho Jung Jeon, Sang Duk Lee, Jae Yu Moon,
Ae-Jung Kim and Kang Sun Ryu

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA
*College of Agriculture and Life Science, Seoul National University
**Department of Food & Nutrition, Hyejeon College

This study was performed to investigate the influence of dietary mulberry leaf on the intestinal microflora in rats. Rats were fed each experimental diets containing 1%, 10% of mulberry leaf powder for 4 weeks. Total viable counts and the numbers of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *E. coli* and *Staphylococcus* were determined by nonselective media and various selective media. A decrease in the intestinal population of *Clostridium* was shown in dietary mulberry leaf group. The *E. coli* and *Staphylococcus* populations decreased in dietary mulberry leaf group compared with control group. Methanol extract and fractions of mulberry leaf were subjected to an in vitro screening test for their growth-inhibitory activity. Methanol extract and Water fraction of Mulberry leaves showed weak growth-inhibition of *Clostridium perfringens*. These results indicate that the composition of gastrointestinal microflora was improved by treatment of mulberry leaves in SD rats and was very effective for growth inhibition of the intestinal harmful bacteria in intestine. Therefore, the mulberry leaves as a newly bio-material can be a useful material for physiologically functional food.

Key words : mulberry leaf, intestinal microflora

서 론

뽕나무는 뽕나무과(Moraceae)의 뽕나무 속(*Morus*)에 속하는 식물로 세계 각지에 널리 분포하고, 우리 나라의 재배되는 뽕나무는 대부분 산상, 백상, 노상에 속하는 육성품종들이다.⁽¹⁾

한편 장내세균은 인체의 장내에서 상호공생 또는 길항 관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체성분을 이용하여 증식 및 배설되고 있다. 이러한 장내미생물 균총은 사람의 나이와 식이 등에 따라 크게 영향을 받으며, 이들 균총의 조성은 노화, 변비, 장관련 질환발생 등과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다.^(2,3) 인간이 노쇠하면 소화흡수, 장운동, 면역기능 저하 등에 의해 *Bifidobacterium* 등은 급격히 감소하고, *Clostridium perfringens*, *Clostridium paraputricum* 등은 급격히 증가된다고 하였다.⁽⁴⁾

*Bifidobacterium*은 어린이와 성인의 분변 중에 존재하는 총 균수의 5-10%를 차지하는데, 이들 균수가 25%를 넘으면 부패산물의 생성이 현저히 줄어드는 것으로 보고되고 있다.^(5,6)

*Bifidobacterium*의 장내에서의 생리적인 역할은 lactic acid와 acetic acid를 분비하여 장내 부패미생물의 생육을 억제함으로써 유해물질 생성을 억제한다. 또한 이 균은 변비, 암, 혈압, 노인성 질환, 항생제 관련 설사 등을 막아주고 면역기능을 향상시키는 것으로 보고되어 있다.^(7,8)

병원성 미생물로는 *Clostridium perfringens*가 장에서 흔히 발견되는 균이고 독성이 강한 균의 하나로 알려져 있다. 이 균은 여러 가지 다양한 독소를 생산하여 신생아의 괴사성 장염, Pigbel질환, 담석증, 류마치스, 간염 및 바이러스 감염 등에 깊이 관여한다.⁽⁹⁾

장내세균은 인체의 장내에서 많은 상호공생 또는 길항 관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체성분을 이용하여 증식 및 배설되고 있다. 이러한 장내미생물 균총은 사람의 나이와 식이 등에 따라 크게 영향을 받는다.

이들 장내 세균들은 숙주인 인간에 대하여 유익한 작용을 하는 것들과 유해 작용을 하는 것으로 나누어 볼 수 있으며

Corresponding author : Lee Heui Sam, Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon, 441-853, Korea
Tel : 82-31-290-8462
Fax : 82-31-295-2176
E-mail : Lhsam@rda.go.kr

Table 1. List of intestinal bacteria used in this study

<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15073
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775

대표적인 유익균인 *Bifidus*균에 대하여 증식인자로서 N-acetylglucosamine, peptide 및 pantotheine⁽¹⁰⁾, fruco-oligosaccharide⁽¹¹⁻¹³⁾ 그리고 lactulose 및 raffinose⁽¹⁴⁾ 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

한편, 생약 및 식품 소재 중에는 장내세균에 영향을 미칠 수 있는 방기의 추출물⁽¹⁵⁾과 감자단백질⁽¹⁶⁾, 녹차추출물과 인삼추출물⁽¹⁷⁾ 등이 유해균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제한다고 보고하였다.

또한, 한국인들이 섭취하고 있는 식품 소재 162종 중에 알가지, 된장, 양파, 겨자 감자 등의 추출물이 *Clostridium perfringens*의 생육을 강하게 억제하였고 유익한 장내미생물의 생육에는 영향을 주지 않았다고 하였다.⁽¹⁸⁾

그러나, 이 유해균의 생육을 억제시킬 수 있는 소재에 대해서는 연구가 별로 진행되어 있지 않다. 최근 누에의 유일한 사료식물이었던 팥잎은 콜레스테롤 저하, 항세균 등의 특성이 알려져 이제 기능성 천연식품 소재로서 고부가가치를 지니게 되었다.⁽¹⁹⁾ 그러므로 본 연구에서는 팥잎 분말 함유사료(1%, 10%)를 실험용 흰쥐에게 투여하여 장내세균에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 대표적인 장내 유익균으로 *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15073, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Lactobacillus casei* ATCC 7469를 택하였고, 병원성 및 유해세균으로 알려진 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Escherichia coli* ATCC 11755를 선정하였다(Table 1).

균주배양

모든 장내세균의 Stock culture는 Deep freezer -80°C에서 EGLF medium으로 보관하면서 *Bifidobacterium*은 5% horse blood를 가진 BL medium으로, 다른 세균은 EG medium (EIKEN Chemical Co. Ltd, Tokyo)으로 계대하면서 실험하였다. 모든 plates는 100% CO₂, 37°C에서 이틀동안 배양하였다. 다음날 *Bifidobacterium*은 100% CO₂와 Briggs liver broth에 계대하여 자라게 하고, 다른 장내세균들은 80% N₂, 15% CO₂, 5% H₂ 상태로 EGF broth(pH 7.2)에서 배양하였다.^(20,21)

팽잎 추출물 및 분획 제조

팽잎은 청일팽을 1998년 5-6월중에 줄기 상부에 5-10 cm의 길이의 연한 잎을 채취하여 세척한 후에 실내에서 24시간 음

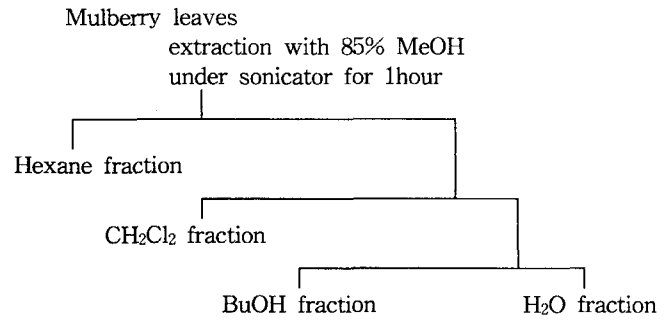


Fig. 1. Fractions of mulberry leaves

건한 후에 열풍건조기로 60°C에서 24시간 완전 건조시켰다. 팥잎 100 g를 취하여 85% MeOH를 가하여 1시간동안 초음파 추출기로 5회 추출하였다. 추출액은 여과지(입자크기 200-500 μm)를 사용하여 여과한 후 여액을 감압농축한 후 냉동건조기를 이용하여 24시간 동안 냉동건조하였다.

팽잎의 추출물을 20배의 증류수에 현탁시킨 후 분액여두에 넣고 증류수와 동량의 hexane, CH₂Cl₂, BuOH 등을 가하여 진탕시켜 방치시킨 후 분획하였다. 각 층을 진공감압농축기를 사용하여 농축시킨 다음 냉동건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

팽잎추출물 및 분획물의 장내세균 생장억제효과 측정

장내세균에 대한 팥잎 추출물 및 분획물의 생장억제효과를 조사하기 위하여, 장내세균들을 1 mL 생리식염수에 현탁시켰으며, 0.1 mL의 현탁된 장내세균 용액을 5% horse blood가 첨가된 Brucellar agar(Difco)에 옮겼다. 팥잎 추출물 및 분획물(10 mg)은 메탄올이나 물에(100 mL) 녹여 Paper disc (ADVANTEC φ8 mm, Tokyo Roshi, Japan)에 Drummond glass microcapillary로 용액이 포화될 때까지 투여한 후에 Paper disc를 agar 표면에 놓았다. 모든 plates는 80% N₂, 15% CO₂, 5% H₂의 대기상태에서 48시간 37°C에서 배양하였다.

대조는 메탄올과 물로 하였고, 모든 생육억제효과는 2반복 이상 실험하여 평균하였으며, 생장억제 반응의 표시는 강(+++; zone diameter >20 mm), 보통(++; 16-20 mm), 약(+; 10-15 mm), 무반응(-; <10 mm)으로 표시하였다.⁽⁹⁾

실험동물 및 팥잎투여

생후 4주령된 수컷 SD계 흰쥐를 삼육실험동물(주)로부터 구입하여 1주일간 적응시켜 체중이 170±15 g인 여섯 마리를 한 실험군으로 하여 4주간 사육하였다.

사육실의 환경조건은 실내온도 23±1°C, 상대습도 60±5%, 명암 12시간으로 유지하였으며 사료와 물은 제한없이 먹을 수 있도록 하였다.

실험에 사용한 사료는 NAS-NRC 흰쥐 사양표준량에 근거하여 정제된 원료를 사용하여 팥잎분말을 저 수준으로 1.0% 높은 수준으로 10%가 되도록 하였다.

주요 장내세균의 생균수 측정

4주간 사육한 흰쥐로부터 장내용물을 분리하여 이를 잘 균

질화하고, Mitsuoka의 방법⁽³⁾에 따라 이 중을 1g를 취하여 9 mL 희석액으로 10-8까지 10배씩 순차적으로 희석하였다.

이중 적당한 배수의 희석액에서 0.05 mL씩을 취하여 선택 배지인 BL(selective medium for *Bifidobacterium*), LBS(selective medium for *Lactobacillus*), PNC(selective medium for *Clostridium*), NN(selective medium for *Clostridium perfringens*), DHL(selective medium for *E. coli*), PEES(selective medium for *Staphylococcus aureus*) 등의 배지에 각각 도말하였다. 이중 DHL과 PEES는 37°C에서 하루동안 호기 배양하였고, 나머지는 사흘동안 혐기배양하였다.

그후 배지에 나타난 집락들에 대하여 Mitsuoka의 방법에 따라 집락 모양과 균의 형태 등을 조사함으로써 속(genus)을 동정하였고 각각의 균수를 측정하였다.

균수는 logCFU(colony forming unit)/g feces(wet weight)로서 표시하였다. 한천배지의 혐기배양은 Steel wool을 $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 Tween 80이 첨가된 pH 1.5-2.0의 산성 황산구리 용액에 침지한 후 여분의 산소를 제거하도록 Vacuum desiccator에 배양접시와 함께 넣고 CO_2 가스와 진공펌프를 이용하여 desiccator내의 공기를 CO_2 로 치환해 줌으로써 혐기상태를 유지하며 배양하는 Steel wool 방법을 사용하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 SAS를 이용하여 ANOVA test를 하였고 유의성 검정은 Duncan's multiple range test($p < 0.05$)를 사용하였다.

결과 및 고찰

뽕잎 추출물 및 분획물의 장내세균 성장억제효과

뽕잎 추출물과 분획물의 대표적인 장내 세균 5종에 대하여 대한 성장억제효과를 측정하였다(Table 2).

뽕잎 추출물을 극성에 따라 분획한 후에 장내세균의 억제 활성을 알아본 결과, 성인의 대표적인 장내세균인 *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus caei* 및 *E. coli*에 대해 성장억제효과를 보이지 않았다. 뽕잎 핵산분획물과 물분획물에서 *Clostridium perfringens*에 대해 약한 성장억제효과(10 mg/disc)를 보였다.

한편 *B. bifidum*은 유해세균의 장관내 정착을 억제할 뿐만 아니라, 발암물질 제거하여 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추

어주는 등의 역할을 함으로써 최근 장내에 존재하는 유익한 균으로 인정되고 있다.⁽²²⁾ 잠상산물의 추출물 및 분획물의 *B. bifidum*과 *Lactobacillus casei*에 대한 성장억제 효과는 관찰되지 않았다. 여러 가지 독소, ammonia, H_2S , amine, phenol, indole 등의 부패산물과 2차 담즙산, toxin, 발암물질 생산을 유발시키는 균으로 알려진⁽²³⁾ *Clostridium perfringens*에 대한 잠상산물의 성장억제 효과를 보면, 뽕잎 매탄을 추출물, 뽕잎 물층에서 약한 활성(+)을 보였지만, *E. coli*에 대해서는 활성을 보이지 않았다. 이는 녹차의 추출물과 인삼추출물^(17,24)이 *Clostridium perfringens*에 대하여 억제효과를 보인 것과 일치하였다. 또한 *in vivo* 실험에서 인삼과 녹차^(21,24)가 장내 균총에 영향을 미친다고 하였다.

뽕잎투여가 장내세균에 미치는 영향

뽕잎분말을 1%, 10%가 되도록 식이 내에 첨가시켜 제조한 흰쥐에게 4주간 급여한 후, 이들의 대장내용물로부터 총균수를 비롯하여 주요 장내 세균의 생균수를 배지를 이용하여 조사한 결과는 다음과 같다(Table 3).

총균수는 뽕잎을 섭취함에 따라 무첨가군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 이는 대장내용물의 단위중량당 균수의 비교로 인하여 장내용물의 부피를 증가, 희석시키는 작용을 갖는 뽕잎 섭취군에서 상대적으로 균수가 적게 나타난 것으로 여겨진다.

Table 3에서 보면, 장내 대표적인 유익균인 *Lactobacillus*는 균총 조성 중 장내 최우선균으로 나타났다. *Lactobacillus*는 뽕잎을 섭취함에 따라 유의성 있는 감소는 보이지 않았다.

*Lactobacillus*와 함께 가장 대표적인 유익균인 *Bifidobacterium*은 뽕잎을 섭취함에 따라 유의성 있는 증가는 보이지 않았다. 한편 장내 대표적인 유해균인 *Clostridium*은 각 실험군 간에 5% 수준에서 유의적인 감소를 나타내었다. *Clostridium perfringens*는 쥐의 장내에서 검출되지 않았으므로 이에 대한 영향은 알 수 없었다. 또한 사람과 동물의 장내에서 일부 균주가 설사 등의 장질환을 일으키는 것으로 알려진 *E. coli*에서는 뽕잎을 섭취함에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다. 유해균의 하나인 *Staphylococcus*의 수는 뽕잎 무첨취군에서 가장 높게 나타났고, 뽕잎을 투여함에 따라 감소하는 경향을 보였다.

뽕잎 1g중에는 epicatechins과 epigallocatechingallate의 함량이 각각 $1.21 \pm 0.05 \mu\text{g}$ 과 $3.56 \pm 0.12 \mu\text{g}$ 이 함유되어 있고, 5.0

Table 2. Growth inhibitory effects of mulberry leaves extract and fractions on various intestinal bacteria¹⁾

	Mulberry leaves				
	MeOH	Hex	CH_2Cl_2	BuOH	Water
<i>B. adolescentis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-
<i>Cl. perfringens</i>	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

¹⁾Inhibition responses; strong(zone diameter>20 mm): +++; moderate(zone diameter>16~20 mm): ++; weak(zone diameter>10~15 mm): +; no response(zone diameter<10 mm): -

Table 3. Effect of Mulberry leaves on intestinal microflora in rats¹⁾

	Control	1%	10%
<i>Lactobacillus</i>	8.2±0.1	8.0±0.2	8.2±0.1
<i>Bifidobacterium</i>	6.4±0.2	6.3±0.2	6.6±0.3
<i>Clostridium</i>	6.0±0.3	4.9±0.1*	4.6±0.2*
<i>Cl. perfringens</i>	<2.0	<0.2	<0.2
<i>E. coli</i>	6.6±0.4	6.3±0.2	6.4±0.1
<i>Staphylococcus</i>	3.3±0.3	2.8±0.1	2.9±0.2
total viable counts	8.4±0.3	8.2±0.1	8.2±0.2

¹⁾Means±SE(log CFU/g feces)

*Significantly different from the control, $p < 0.5$

µg/disc 농도에서 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제한다고 하였다.⁽²⁵⁾ 뽕잎에서 분리된 카테킨 또한 인삼과 녹차추출물^(21,23) 중에 함유된 폴리페놀계 화합물과 같은 구조를 갖는 것으로 보아, 이들 성분에 의하여 유해세균의 생육이 억제되는 것으로 생각된다.

식이섭유는 종류에 따라 세균에 의해 발효되거나 이용되는 정도가 다르고 장내균총의 대사활동과 균총의 구성에도 영향을 미친다고 하였다.⁽²⁶⁾ 장내균총은 식이 이외에도 다양한 환경과 생리조건에 의하여 영향을 받아 온도, 가스조성, 산도, 삼투압과 이온작용, 표면장력과 액체흐름, 저해물질, 세균과의 상호작용과 경쟁, 장내운동에 의해 영향을 받는다고 하였다.⁽²⁷⁾ 뽕잎은 *in vivo* 실험에서 가장 대표적인 유해균인 *Clostridium*을 억제하였는데 이는 N-nitroso화합물, aromatic steroid같은 유해산물의 생성을 막고 장내균총을 변화시켜 건강한 신체를 유지하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

따라서, 뽕잎은 기능성 식품을 선호하는 현대인들에게 유해균인 *Clostridium*, *E. coli*와 *Staphylococcus*는 감소시켜 장내균총 개선시키는 식품으로서 가능성 있기 때문에 소비층을 확대시키기 위하여 구체적이고 광범위한 많은 연구들이 앞으로 수행되어야 한다.

요 약

뽕잎 분말이 1, 10%가 되도록 사료에 첨가시켜 4주동안 SD 흰쥐에게 급여한 후 이들의 대장 내용물로부터 총균수와 주요장내미생물의 생균수를 배지를 이용하여 혐기배양한 후 측정된 결과 총균수는 뽕잎 투여군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 그리고 유해균으로 분류할 수 있는 *Clostridium*은 대조군보다 뽕잎투여군에서 유의성있게 감소하였고, *E. coli*와 *Staphylococcus*도 감소하는 경향을 보였다. 뽕잎 테탄을 추출물과 분획물들의 미생물의 생장억제효과를 측정된 결과, 핵산분획과 물분획물이 *Clostridium perfringens*에 대하여 억제효과를 보였다. 장내균총의 개선 측면에서 뽕잎은 기능성 식품소재로서의 이용가능성이 있는 것으로 나타났다.

문 헌

1. Kim, M.H. Mulberry culture science. pp. 67. Hyangmoon Publishing Co, Seoul, Korea (1970)
2. Mitsuoka, T. Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria Microflora 1: 3-24 (1982)
3. Mitsuoka T. A color atlas of anaerobic bacteria. pp. 51. Shobunsha, Tokyo, Japan (1990)
4. Park, J.H., Yoo, J.Y., Shin, O.H., Shin, H.K., Lee, S.J. and Park, K.H. Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 237-242 (1992)
5. Mitsuoka, T. Bifidobacteria and their role in human health. J. of Industrial Microbiology 6: 263-267 (1990)
6. Fujikawa, S., Okazaki, M. and Matsumoto, N. Effect of xylooligosaccharide on growth of intestinal bacteria and putrefaction products. J. of Japanese Society of Nutr. and Food Sci. 44: 37-41 (1991)
7. Ishinashi, N. and Shimamura, S. Bifidobacteria: Research and development in Japan. Food Technology 6:126-129 (1993)
8. Molder, H.W., McKeller, R.C. and Yaguchi, M. Bifidobacteria and

- bifidogenic factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23: 29-41 (1990)
9. Smith, L.D.S. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. Reviews of infectious disease 1: 254-262 (1979)
10. Yazawa, K., Nakajima, A. and Tamura, Z. Growth of *Bifidobacterium* in adults, intestines on oral administration of sugar source, panthethine and riboflavin. Bifidobacteria Microflora 3: 43-49 (1984)
11. Mitsuoka, T., Hidaka, H. and Eida, T. Effects of fructooligosaccharides on intestinal microflora. Die Naharung 31: 427-436 (1986)
12. McKeller, R.C. and Modler, H.W. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 537-541 (1989)
13. Yazawa, T. and Dilawri, N. Measurement of growth of Bifidobacteria on inulofructooligosaccharides. Letters in applied Microbiol. 10: 229-232 (1990)
14. Yazawa, K. and Tamura, Z. Search for sugar source for selective increase of Bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora 1: 39-44 (1982)
15. Shin, O.H., Yoo, S.S., Lee, W.K. and Shin, H.K. Effects of the water-extract of *Sinomeniacuti Radix*(*Sinomenium acutum*) on the growth of some intestinal microorganism. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 491-497 (1992)
16. Shin, H.K., Shin, O.H. and Koo, Y.J. Effects of potato protein on the growth of *Clostridium perfringens* and other intestinal microorganism. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 249-256 (1992)
17. Ahn, Y.J., Kim, M., Yamamoto, T. and Mitsuoka, T. Selective Growth Response of Human Intestinal Bacteria to *Araliaceae* plants extracts. Microbial Ecology in Health and disease 3: 223-229 (1990)
18. Park, J.H., Han, N.S., Yoo, J.Y., Kwon, D.J., Shin, H.K. and Koo, Y.J. Screening of the food stuffs influencing the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Clostridium perfringens*. Kor. J. Food. Sci. Technol. 25: 582-588 (1993)
19. Kor. Society of. Sericultural Sci. The prospect for the utilization as food of the mulberry leaves-included bioactive substances (1999)
20. Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T. and Mitsuoka, T. Tea Phenols: Selective Growth inhibitors of *Clostridium* spp. Agric. Biol. Chem. 55: 1425-1426 (1991)
21. Ahn, Y.J., Kim, M., Kawamura, T., Yamamoto, T., Fuisawa, T. and Mitsuoka, T. Effects of *Panax ginseng* extract on growth responses of human intestinal bacteria and bacterial metabolism. Kor. J. of Ginseng Sci. 14: 253-264 (1990)
22. Loria, S. and Martin, J.H. Bifidobacteria as potential dietary adjuncts in cultured dairy products. Cultured dairy products Journal November: 18-22 (1990)
23. McDonel, J.L. *Clostridium perfringens* toxins(Type A, B, C, D, E). Pharmc. Ther. 10: 617-655 (1980)
24. Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T., Fuisawa, T. and Mitsuoka, T. Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. Microbial Ecology in Health and disease 3: 335-338 (1990)
25. Lee, H.S., Kim, S.Y., Jeon, H.J., Lee, S.D., Moon, J.Y., Kim, A.J., Lee, W.C. and Ryu, K.S. Growth inhibitory effect of *Clostridium perfringens* for catechins separated from mulberry leaves. Kor. K. of Seric. Sci. 42: 6-9 (2000)
26. Titgemeyer, E.C., Bourguin, L.D., Fahey, G.C. and Garleb, K.A. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria *in vitro*. Am. J. Clin. Nutri. 53: 1418-1424 (1991)
27. Woods, M.N. and Gorbach, S.L. Influence fiber on the ecology of the intestinal flora; Handbook of dietary fiber in human nutrition, 2th Edition, pp. 361-363, Boca Raton, CRC Press Inc. (1993)