

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.4.421

JCCT 2019-11-53

초임계 열처리된 무 복합추출물의 장내세균총 및 장질환 예방 효과

The Prevention of Gut Microbiome and Intestinal Diseases from Supercritical Heat-treated Radish Complex Extracts

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 본 연구는 한국산 초임계 열처리된 무 복합 추출물을 이용하여 장내세균의 생육, 특히 식중독 및 위염, 장염 등 감염성 유해균과 정상효과를 나타내는 유익한 세균의 생육에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 흰쥐를 3개 시험구 즉 정상대조군, Loperamide 투여군, 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여군 등으로 나누어 동물실험을 수행하면서 장내 유익한 세균의 생육에는 아무런 영향을 주지 않으면서 유해균의 생육을 저해함으로써 장기능 개선 및 세균성 장질환에 효과적이고 안전한 건강기능식품 조성물로도 유용하게 사용할 수 있다는 결과를 얻었다. 특히 무는 오랫동안 복용 시에도 전혀 부작용을 나타내지 않는 안전한 식품으로 장기간 꾸준히 복용하는 것에 의해 장내 세균총 및 세균성 장질환에 효과를 얻을 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

주요어 : 장내 미생물, 장 질환, 무, 초임계, 부작용

Abstract The purpose of this study was to investigate the effects of intestinal bacteria on the growth of enteric bacteria, especially infectious harmful bacteria such as food poisoning, gastritis and enteritis, and the growth of beneficial bacteria. By dividing the rat into three test groups; normal control group, Loperamide-treated group, and supercritical heat-treated radish complex extracts(HRE)-treated group, animal experiments were performed to inhibit the growth of harmful bacteria without affecting the growth of beneficial bacteria in the intestine. It was found that it can be usefully used as an effective and safe health food composition for improving intestinal function and bacterial intestinal disease. In particular, it can be concluded that supercritical heat-treated radish complex extract is a safe food that does not show any side effects even when taken for a long time.

Key words : Gut microbiome, Intestinal disease, Radish, Supercritical, Side effects

I. 서론

인간을 포함한 모든 포유류의 장 관계내에는 수 많은 미생물 들이 살고 있다. 수정 이후 발생과 동시에 형성 되는 미생물 군집인 장내 세균총(microbiome)은 장내에

존재하는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eu-karya), 바이러스를 포함한 미생물 군집을 말한다. 다양한 환경적 노출과 숙주(host)의 영향으로 인해 그 구성이 고유 및 복잡 다양화가 되는데, 성인이 되면서 점차 안정화 된다. 하지만, 성장이 완료된 후에도 식이 습관(diet)

*정회원, 서원대학교 식품공학과 조교수
접수일: 2019년 9월 21일, 수정완료일자: 2019년 10월 18일
게재확정일자: 2019년 10월 25일

Received: September 21, 2019 / Revised: October 18, 2019
Accepted: October 25, 2019

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr
Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

과 유전적/후성유전학적 구성(genetic/epigenetic composition) 등에 의해 장내 세균총은 매우 급격한 변화를 겪을 수 있다.

세균성 장질환으로는 대장균 및 살모넬라균 등에 의한 식중독, 만성/급성위장염 등이 있다. 살모넬라 티피무리움 DT104(*Salmonella typhimurium* DT104)는 기존의 살모넬라균과는 달리 암피실린(ampicillin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 스트렙토마이신(streptomycin), 설폰나마이드(sulfonamides)와 테트라사이클린(tetracycline)에 대한 다중 항균저항 패턴(multiple antimicrobial resistance pattern: R-Type ACSSuT)을 보이며 이미 미국, 영국, 캐나다, 독일, 프랑스, 오스트리아, 덴마크 등의 선진국을 포함하여 세계 여러 나라에서 보고되고 있다. 이 균은 감염증에 대한 항생제 치료의 어려움 외에 형질 전환(transformation) 등을 통해 다른 균들로 항생제 내성에 관여하는 유전

자의 전파를 일으킬 위험성이 있으며, 영국에서는 이미 트리메토프림(trimethoprim)과 시프로플록사신(ciprofloxacin)에 대한 추가적 저항성(additional resistance)을 가지는 살모넬라 타이피무리움 DT104(*S. typhimurium* DT104)가 보고되었다. 또한, 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)은 미국과 일본에서 대량 식중독 사태를 일으킨 바 있으며, 감염시 출혈성 신증후군(hemolytic uremic syndrome) 및 출혈성 장염(hemolytic colitis) 등의 증상을 나타내고, 특히 유아나 노약자의 경우에는 치명적인 균으로 알려져 있다. 이러한 균들의 감염시 항생제의 치료가 주가 되지만 항생제 남용으로 인한 각종 항생제에 대한 내성이 증가 되고 있어 천연물에서 유용한 물질을 찾고 있으며, 천연물을 사용하여 유익한 세균총의 장내 조성을 조절 함으로써 잠재적으로 중요한 예방효과를 획득하려는 시도가 이루어지고 있는 실정이다.

무(Radish, *Raphanus sativus* L.)는 십자화과(Cruciferae) 채소로 휘발성 함황 성분을 가지고 있어 독특한 매운 맛을 지니고 있다. 무의 독특한 매운 맛은 무에 함유된 티오글루코사이드가 잘리거나 세포가 파괴되었을 때 자체 내에 있는 글루코사이다아제라는 효소에 의하여 티오시아네이트와 이소티오시아네이트로 분리되는 것에 의한다. 무에는 다른 채소에 비해 유리아미노산, 당, 칼슘 및 인 등이 많이 함유되어 있다. 뿌리에 함유된 당분은 주로 포도당, 과당이고 이외에 다수의 유기산과

아미노산이 함유되어 있다. 특히, 비타민 C의 함량이 높아 예로부터 겨울철 비타민 공급원으로 중요한 역할을 해왔다. 무 뿌리인 나복(蘿蔔)은 가래, 기침해소, 이질 등에 효과가 있고, 어패류 또는 면류의 중독을 해소하는데도 효과가 있다고 알려져 있다. 무에 함유된 디아스타제(diastase)는 소화촉진, 식중독, 숙취해소에 효과가 있으며 라핀(rapine)은 세균, 진균, 기생충 등에 대한 항균 작용이 있는 성분으로 알려져 있다. 특히, 무의 껍질과 무청은 식용으로 사용하기도 하지만, 질기고 거친 식감으로 인하여 제거 후 식용하는 경우가 많아 부산물로서 폐기되거나 가축의 사료로 이용되는 실정이다. 따라서 본 연구는 무의 생리 활성을 더욱 증가시킬 수 있는 초임계 열처리 무의 가공물이 장내세균총을 조절함으로써 질병을 치료하고자 하는 바이오 의료기술 및 현재 장내 서식하는 세균총과 이를 조절하는 다양한 요소들과 관련된 장 기능개선 및 장내 세균성 장질환 효과에 대해 알아 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 무의 열처리 추출물의 제조

농수산물 도매시장에서 한국산 무(청운무)를 구입하여 껍질과 무청을 포함하여 세척한 후 사용하였다.

열처리 장치는 10 kg/cm² 이상의 압력에서도 견딜 수 있도록 고안, 제작된 열처리장치(Jisco, Seoul, Korea)를 사용하였다. 무 시료는 통째로 용기에 담은 후, 일정량의 물이 첨가된 외부용기 안에 넣고 정해진 온도와 시간에 따라 가열하는 것에 의해 직접적인 열전달에 의한 시료의 탄화를 방지하였으며, 열처리 과정 중 수증기가 처리될 수 있도록 하였다. 열처리온도는 110, 120, 130, 140 및 150°C로 설정하였고, 열처리 시간은 6시간으로 설정하였다 [5,6].

2. 열처리된 무 초임계 복합추출물(HRE)의 제조

열처리된 무를 24시간 바람이 잘 통하는 곳에서 건조한 후 200 메쉬 이하의 크기로 분쇄하였다. 분쇄물을 초임계유체 추출기에서 넣고 40~80°C의 추출온도, 200~500 bar의 추출압력 조건하에서 보조용매로 butylene glycol을 사용하여 초임계 CO₂ 추출하였다. 포집된 추출액은 마찬가지로 동결건조하여 사용하였다.

3. 사용배지

생균수 측정을 위한 배지는 BCP agar(Eiken, Japan), NB(nutrient broth/Difco), NA(nutrient agar/Difco), MRS(Mann-Rogosa-Sharpe) broth(Difco), MRS agar : MRS agar : MRS broth + 1.2 ~ 1.5% agar을 사용하였다.[6, 7].

4. 사용균주

사용한 균주는 *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3442, *Bifidobacterium longum* KCTC 3128, *Lactobacillus casei* 160, *Lactobacillus helveticus* RF-12, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolityca*, *Klebsiella pneumonia* RF-8를 사용하였다.

5. 실험동물의 분변시료 채취

웅성 Sprague Dawley rat, 220~240g(5~8 heads/group)을 대사케이지에서 6일간 적응시킨 후 7일째 (D-day)부터 정상균을 제외하고 변비를 유도하기 위해 사료 3g당 loperamide 1mg을 혼합한 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 정상대조군과 Loperamide 대조군에는 생수만을 공급하고, 초임계 열처리 무 복합 추출물(HRE) 투여군은 생수에 HRE가 (3.2mg/ml)가 함유되도록 제조한 시료액을 공급하였다. 실험 기간 중 당일 얻어지는 분변은 케이지 아래에 미리 깔아놓은 알루미늄 호일에 받아서 18 hr 이내에 생균수를 측정하였다.

6. 생균수의 측정

각 분변시료 1g을 100ml의 생리식염수 (혐기성균의 경우에는 0.05% L-cysteine 함유)에 마쇄하여 현탁 시킨 다음 순차적으로 희석(범위 : 10)하여 NA plate에 펼치고 37°C에서 호기적 및 혐기적 조건(H₂-5% : CO₂-15% : N₂-80%/ Mart AJ9028 chamber 및 Anoxomer WS8000, Netherlands)으로 7일간 배양하면서 생육하는 콜로니를 계수하였다. 생균수(viable count)는 분변 1g당 c.f.u. (colony forming units/g wet feces)로 나타내었다.

7. 우점균의 분리

생균수 측정시 각 plate로부터 우점적으로 자라는 콜로니를 새로운 NA 및 BCP plate에 이식하고 다시 순수 정제하여 우점균을 분리하였다.

8. 분리균주의 동정

세포지방산의 종류 및 분포를 이용하는 Microbial Identification System(MIDI; Microbial ID, Inc., Network, Delaware)의 방법으로 실시하였다. MIDI의 표준실험법에 의하여 지방산의 methyl ester를 조제하고 그 추출물을 GC(Hewlett-packard, 5890A)에 methyl phenyl silicon fused silica 모세관컬럼(HP 19091B-102, 25 m x 0.2 mm)을 장착하여 분석하였으며, 지방산의 분포양상은 chromatopac C-R 4A Data Analyzer로 분석하였다.

9. 배양방법

유산균류는 MRS broth(containing 0.05% L-cysteine), 기타균주는 NB broth에서 배양하였다. 각각의 배지에 초임계 열처리 무 복합추출물(HRE)이 7,000, 700, 70, 0 (0 for blank test)µg/ml가 함유되도록 조제한 다음, 일정량의 전배양물을 접종하고 유산균류는 37°C에서 혐기적으로, 기타균주는 호기적으로 배양하면서 경시적으로 생균수를 측정. 비교하였다.

III. 실험결과

3.1. 흰쥐 분변중 생균수의 변화

초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)는 장내세균의 생육, 특히 식중독 및 위염, 장염 등 감염성 유해균과 정장효과를 나타내는 유익한 세균군의 생육에 미치는 영향을 구명할 목적으로, 흰쥐를 3개 시험구 즉 정상대조군, Loperamide 투여군, 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여군 등으로 나누어 동물실험을 수행하면서 채취한 분변중의 생균수를 측정하였다(Table 1). 초임계 열처리된 무 복합추출물의 투여에 의한 흰쥐 분변중 생균수 변화를 관찰한 결과를 Table 1에서 살펴보면, 모든 시료에서 공통적으로 호기적 조건에서는 10⁸~10⁹ cells/g, 혐기적 조건에서는 10⁹ cells/g 수준의 생균이 검출됨으로서, 호기상태보다 혐기조건에서 생균수가 높은 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 장내세균에 통성 혐기성균(facultative anaerobe)이 다수 분포되어 있다 하더라도, 실제 이들의 배양을 위하여는 혐기적 조건이 바람직하다는 것을 의미한다.

Table 2의 <A>항에서와 같이 호기적 조건에서 측정하였을 때 그 생균수의 편차가 심하여 10⁸~10⁹의 진폭을

나타내었다. 이와 같은 결과는 호기 상태에서 통성 혐기성균이 균일하게 생육하지 않는데 기인하는 것으로 해석된다. 정상대조군, Loperamide대조군, 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)투여군 간에, 또는 loperamide 투여 전후간에 총세균수의 총수에 있어서 현저한 변화경향을 찾을 수 없었다. 그러나 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여 후 2일 (D+2)에서 4일 (D+4)까지 호기적 조건에서 측정된 생균수가 다소 저하되는 현상이 관찰되었으며, 이는 호기 상태에서 자라는 일부의 세균이 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여군에 의해 억제될 수 있음을 의미하는 것이다. 이와 같은 억제현상은 D+2 day의 생균수 측정용 고체 배지상에서도 관찰되었다. 즉 콜로니의 크기가 작고 투명한 유산균류는 잘 생육하고 있었으나, 기타의 불투명한 유백색 콜로니의 숫자는 감소하였다(Figure 1). 한편 동물실험의 마지막 날 즉 D+19 day에는 배설한 분변과 흰쥐를 도살하여 채취한 장내 변종의 생균수를 비교하여 보았다. 그 결과를 Table 2에 나타내었으며, 여기에서 보는 바와 같이 배설한 분변과 대장에 머무르고 있는 분변 간에 뚜렷한 생균수의 차이는 없었다. 따라서 동물실험 기간 중에 배설한 분변을 생균수 측정용 시료로 사용하는데 따른 방법상의 문제는 없다고 판단된다.

3.2. 분변세균중 우점균주의 분리 및 동정

생균수 측정용 고체 배지상에서는 1주일이 경과하여도 직경 1 mm이하(punctiform)의 투명하게 보이는 유산균류(lactic acid bacteria)의 콜로니가 표면에 깔려서 자라고, 기타의 다양한 콜로니 즉 직경 2~5 mm의 불투명한 유백색 콜로니가 관찰되었다(Figure 1.). 유산균류의 콜로니는 작고 투명하여 사진에는 잘 들어나 보이지 않았다.



그림 1. 각 실험군에서 <D+2> 동안에 관찰한 콜로니 형태(생균수).
Figure 1. Colony morphologies of the dilution-plate counts on the day <D+2> for each experimental group.

<Left> Normal control ; <Middle> Supercritical Heat-treated radish Complex group ; <Right> Loperamide-treated group

Photographs of the 107-dilution plates (8.5 cm in diam) on the day <D+2> were taken by a digital camera.

Punctiform colonies of lactic acid bacteria are not clearly seen, however it is possible to distinguish the large size colonies of the other enteric bacteria including RF-8(*Klebsiella pneumoniae*) and RF-17(*Dermacoccus nishinomiyensis*). The apparent numbers are much lower in the plate from Supercritical Heat-treated radish Complex group <Middle> than the normal control group and Loperamide-treated group.

3.3. 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)이 장내세균의 생육에 미치는 *in vitro* 영향

초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)이 장내세균의 생육에 미치는 *in vitro* 영향을 알아보기 위해, 장내세균 중 유익한 균주로 알려진 세균류와 유해한 것으로 알려진 세균류에 대하여 일정농도의 성분을 함유한 최적배지에서 *in vitro* 배양실험을 수행하였다. NB 또는 MRS broth 10ml를 넣은 15 ml Corning culture tube에 각 균주의 전배양액 100 μ l 씩을 접종하고 37°C에서 배양하면서 24 hr 및 72 hr 후 생균수를 측정하여 억제성분을 첨가하지 않은 대조군과 비교하였다. 여기에서의 시험구는 각각 70, 700 및 7,000 μ g/ml의 성분이 함유되도록 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)를 첨가하였고, 유산균류는 MRS broth를 사용하여 Mart AJ9028 혐기상내에서 H₂-5% : CO₂-15% : N₂-80%의 혼합기체를 충전하여 배양하였다. *in vitro* 실험에 사용한 균주 목록과 그 특징에 관하여는 Table 3에 각각 정리하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)는 공시한 균주중 유익균으로 알려진 *Lactobacillus casei*, *L. helveticus* 및 *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* 등의 생육에는 아무런 영향을 주지 않았다. 공시한 균주중 유해균으로 알려진 *Salmonella typhimurium*(식중독 및 급성위염균), *Proteus vulgaris*(감염성 병원균), *Yersinia enterocolityca*(식중독 및 급성장염균), *Klebsiella pneumoniae*(감염성 병원균) 등은 KTG075 7,000 μ g/ml 농도에서 생육저해를 받았다.

3. 4. 초임계 열처리된 무 복합추출물이 장내세균총의 변화에 미치는 영향

초임계 열처리된 무 복합 추출물(HRE)이 장내 생육에 미치는 영향을 26종을 이용하여 Screening 하였으며 알아본 결과 장내 세균중 유익 균으로 알려진 젖산균 중

류인 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3151), *L.casei* 160(Wiesby), *L. gasserii*(KCTC 3162, 3181), *L. helveticus*(RF-12), *Bifido- bacterium bifidum*(KCTC 3442), *B. longum*(KCTC 3128)등의 유익균에는 초임계 열처리된 무 복합 추출물(HRE)이 생육 저해를 받지 않았다. 반면에, 장내 균주중 *Escherichia*(KCTC 2443, 2615, 2617), *Klebsiella*(KCTC 2241, 2208), *Proteus*(KCTC 2512, 2510), *Salmonella*(KCTC 2932, 2515), *Yersinia*등 유해균은 7,000 μ g/mL 농도에서 생육 저해를 받았지만, *Pseudomonas*(KCTC 1637), *Staphylococcus*(KCTC 1621), *Streptococcus*(KCTC 3289, 3208)등의 균주에는 영향이 없었다.

3.5. 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)의 생육 억제환 활성

*In vitro*에서 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 및 각 복합추출물 중 활성 분획물 및 항균작용이 있는 소재를 가지고 생육 Zone에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 2.에서 알 수 있는 바와 같이, 무 추출물과 당근 추출물중 3-10 KDa 분획물은 억제환 효과가 없었지만, 초임계 열처리된 무 복합추출물 및 무 추출물의 3-10 KDa 분획물이 억제환 Zone이 넓게 퍼져 생육함을 알 수 있었다. 이결과는 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)이 장내 세균총 개선 및 장질환 예방 효과를 준다는 연구결과에서 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 와 무 추출물 분획중 생리활성 분획인 3-10 KDa 분획물에 가장 장내 세균총 개선 및 장기능 개선과 배변증가량이 증가하였다는 결과와도 일치한다고 추측 할 수 있었다. 장내 균주중 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3151), *L.casei* 160(Wiesby), *L. gasserii*(KCTC 3162, 3181), *L. helveticus*(RF-12), *Bifidobacterium bifidum*(KCTC 3442), *B. longum*(KCTC 3128)등의 유익 균에는 초임계 열처리된 무 복합 추출물(HRE)이 생육 저해를 받지 않았다. 반면에, 장내 균주중 *Escherichia*(KCTC 2443, 2615, 2617), *Klebsiella*(KCTC 2241, 2208), *Proteus*(KCTC 2512, 2510), *Salmonella*(KCTC 2932, 2515), *Yersinia*등 유해균은 7,000 μ g/mL 농도에서 생육 저해를 받았지만, *Pseudomonas*(KCTC 1637), *Staphylococcus*(KCTC 1621), *Streptococcus* (KCTC 3289, 3208)등의 균주에는 영향이 없었다. 초임계 열처리된 무 복합 추출물(HRE)중

활성 성분을 가지고 있다고 생각되는 활성분획물에 대한 미생물 균주의 항균 효과를 살펴본 결과 차 추출물은 초기단계에서 세균을 억제시킨 반면에, 당근 추출물은 생육 배양기간동안 지속적으로 항균활성을 나타내었다. *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*(KCTC 2208)등의 균주의 활성효과는 주로 차 추출물에서 강한 효과가 있었으며 *Proteus vulgaris* (KCTC 2512), *Yersinia enterocolityca* 균주에 대해서는 당근 추출물에서 항균활성 효과가 있었다. 무 추출물의 항균효과는 무 추출물중 3-10 KDa 분획물에서 있었다. 이 결과는 무 추출물에 대한 장기능 개선 및 장질환 예방 효과 검색 결과시 활성 분획이 3-10 KDa 분획물의 생리활성 결과와 상호 연관성이 있다는 추측을 할 수 있었다.

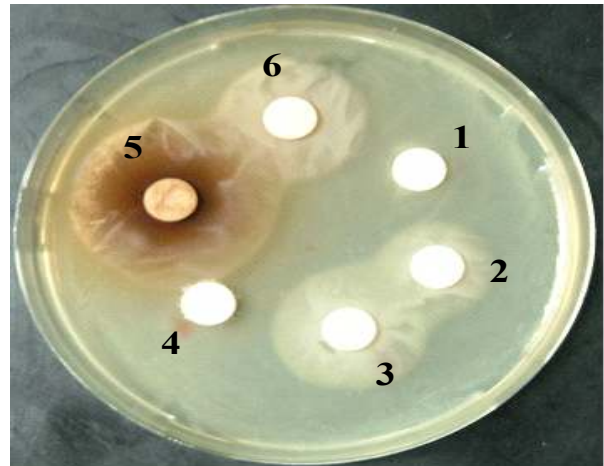


Figure 2. 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 및 활성분획물에 장내 세균 균주에 대한 생육억제환 효과

Figure. 2. Growth inhibition of yersinia enterocolityca by the ingredients of the Suercritical Heat- treated Complex radish extracts(HRE).

Which containing 80 μ l of the extracts at the concentration of 7,000 μ g/mL

1. Extract from Radish, 2. 3~10KD fraction of the extract from Radish,3. Extract from Carrot, 4. 3~10KD fraction of the extract from Carrot,5. Extract from Tea, 6. The Suercritical Heat-treated Complex radish extracts(HRE).

Table 1. 동물실험 동안의 랫트의 분변에서 관찰한 생균수

Table 1. Viable counts of microorganism in the feces of rats during the experiments

Experimental groups	Viable counts by	May 8 <D-3>	May 10 <D-1>	May 11 <D 0>	May 13 <D+2>	May 15 <D+4>	May 17 <D+6>	May 19 <D+8>	May 21 <D+10>	May 30 <D+19>
Normal	<A>	1.7×10 ⁸ ~2.9×10 ⁹	3.4×10 ⁸ ~1.6×10 ⁹	1.0×10 ⁸ ~3.0×10 ⁹	2.9×10 ⁸ ~2.7×10 ⁹	2.2×10 ⁸ ~1.3×10 ⁹	3.0×10 ⁸ ~3.8×10 ⁹	3.5×10 ⁸ ~2.6×10 ⁹	4.2×10 ⁸ ~2.8×10 ⁹	2.7×10 ⁸ 2.1×10 ⁹
		3.4 ~4.5×10 ⁹	2.3 ~5.3×10 ⁹	2.4 ~3.9×10 ⁹	2.5 ~4.2×10 ⁹	1.7 ~3.3×10 ⁹	3.9 ~6.7×10 ⁹	4.2 ~4.4×10 ⁹	3.3 ~3.9×10 ⁹	2.9 ~3.5×10 ⁹
HRE	<A>	4.4×10 ⁸ ~2.3×10 ⁹	3.6×10 ⁸ ~2.4×10 ⁹	1.4×10 ⁸ ~2.3×10 ⁹	2.2 ~7.5×10 ⁸	4.7 ~8.7×10 ⁸	1.3×10 ⁸ ~2.9×10 ⁹	2.6×10 ⁸ ~3.6×10 ⁹	9.2×10 ⁸ ~2.3×10 ⁹	5.6×10 ⁸ ~1.9×10 ⁹
		1.9 ~6.4×10 ⁹	4.5 ~5.0×10 ⁹	3.3 ~3.5×10 ⁹	3.4 ~6.9×10 ⁹	5.1 ~6.9×10 ⁹	4.7 ~7.2×10 ⁹	5.7 ~7.0×10 ⁹	2.7 ~6.8×10 ⁹	4.4 ~7.5×10 ⁹
Loperamide control	<A>	3.2×10 ⁸ ~2.6×10 ⁹	2.4×10 ⁸ ~3.4×10 ⁹	1.3×10 ⁸ ~2.5×10 ⁹	2.9×10 ⁸ ~1.2×10 ⁹	3.2×10 ⁸ ~1.5×10 ⁹	2.2×10 ⁸ HH×10 ⁹	3.6×10 ⁸ ~3.2×10 ⁹	6.1×10 ⁸ ~3.1×10 ⁹	5.9×10 ⁸ ~1.8×10 ⁹
		2.5 ~5.5×10 ⁹	3.8 ~4.8×10 ⁹	2.2 ~2.4×10 ⁹	4.3 ~4.9×10 ⁹	3.2 ~9.1×10 ⁹	3.3 ~6.7×10 ⁹	3.8 ~6.0×10 ⁹	4.9 ~5.2×10 ⁹	3.8 ~5.4×10 ⁹

1) Experimental groups refer to the text.

2) Viable counts for <A> indicated that the organism able to grow under aerobic condition were counted, whereas for under anaerobic condition(H₂-5% : CO₂-10% : N₂-85%), respectively.

3) Viable counts are presented as the number of viable cells per gram of feces.

Table 2. 동물실험 동안의 랫트의 분변에서 호기적 조건 및 혐기적 조건에서 생육한 콜로니 계수(생균수).

Table 2. Comparison of the viable counts between excreted and unexcreted feces.

Experimental groups	Viable counts by	Excreted feces	Unexcreted feces*
Normal control	<A>	2.7×10 ⁸ ~2.1×10 ⁹	5.3×10 ⁸ ~2.0×10 ⁹
		2.9~3.5×10 ⁹	2.8~6.3×10 ⁹
Suocritical Heat-treated Radish Complex group	<A>	5.6×10 ⁸ ~1.9×10 ⁹	4.1×10 ⁸ ~2.1×10 ⁹
		2.9~3.5×10 ⁹	5.0~6.1×10 ⁹
Leperamide-treated control	<A>	5.9×10 ⁸ ~1.8×10 ⁹	5.6×10 ⁸ ~2.3×10 ⁹
		2.9~3.5×10 ⁹	5.1~6.8×10 ⁹

1) Viable counts for <A> indicated that the organism able to grow under aerobic condition were counted, whereas for under anaerobic condition, respectively.

2) Viable counts are presented as the number of viable cells per gram of feces.

3) * Unexcreted feces were obtained from the intestinal feces of the rats on the final days of the experiments.

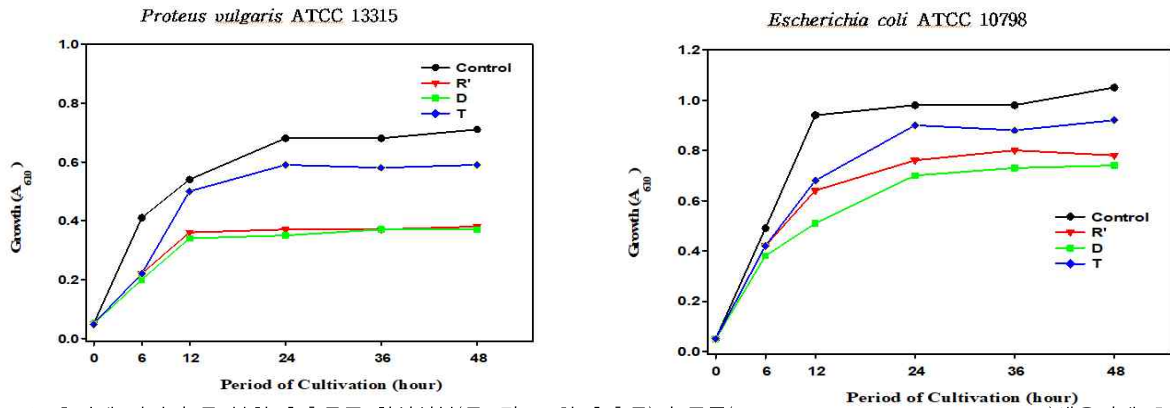


Figure 3. 초임계 열처리 무 복합 추출물중 활성성분(무, 당근, 차 추출물)의 균주(*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*)생육저해 효과
 Figure 3. Growth inhibition of by the ingredients of the supercritical heat-treated radish complex extracts the cultures were grown on NB in shake flasks containing plant extracts from Radish, carrot, Tea at the concentration of 7,000 μgml

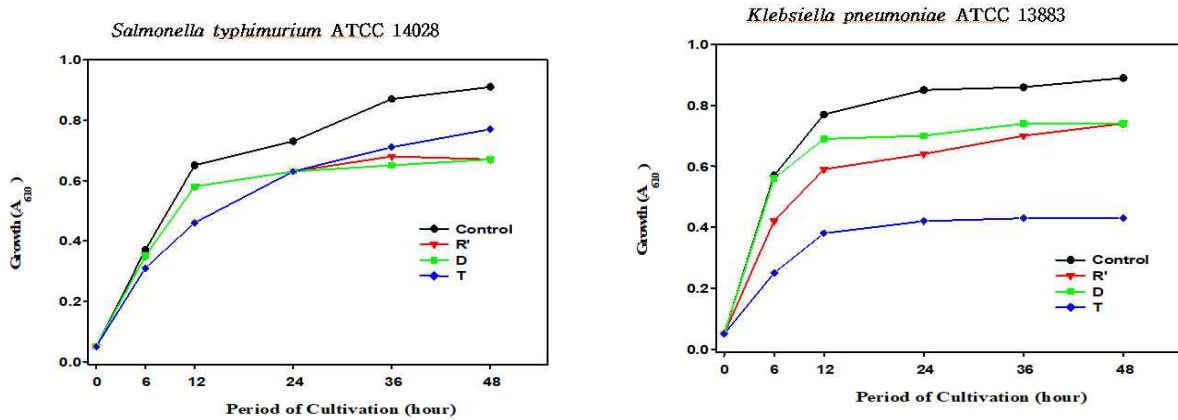


Figure 4. 초임계 열처리 무 복합 추출물중 활성성분(무, 당근, 차 추출물)의 균주(*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*)생육저해 효과
 Figure 4. Growth inhibition of by the ingredients of the supercritical heat-treated radish complex extracts the cultures were grown on NB in shake flasks containing plant extracts from Radish, carrot, Tea at the concentration of 7,000 μgml

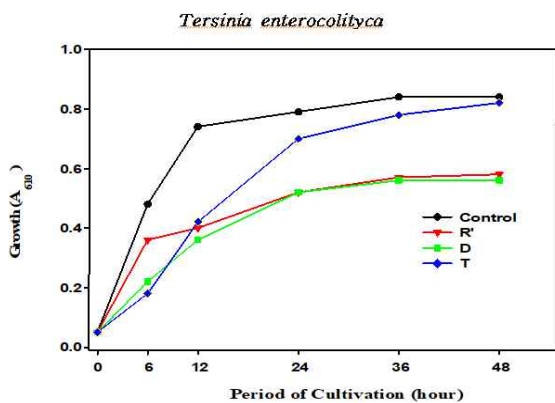


Figure 5. 초임계 열처리 무 복합 추출물중 활성성분(무, 당근, 차 추출물)의 균주(*Tersinia enterocolityca*)생육저해 효과
 Figure 5. Growth inhibition of by the ingredients of the supercritical heat-treated radish complex extracts the cultures were grown on NB in shake flasks containing plant extracts from Radish, carrot, Tea at the concentration of 7,000 μgml

Proteus vulgaris ATCC 13315에는 차 물추출물이, *Escherichia coli* ATCC 10798에는 차 물추출물과 무 물추출물 3-10KD분획물이, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 균주에는 당근 물추출물과 무 물추출물 R 3-10KD분획물이 큰 활성을 보이다, 초기에는 생육 저해 효과가 미비하다가, 차 물추출물이 생육 후반기에 큰 활성을 나타내었다. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 균주에서는 당근 물추출물이 큰 활성효과를 보였고, *Yersinia enterocolityca* 균주에 대해서는 생육 초반부에는 효과가 미비하다가, 생육 중반기 부터 차 물추출물이 활성효과를 나타내었다(Figure 3-5).

V. 결론

초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)의 투여에 의한 흰쥐 분변중 생균수의 변화를 관찰한 결과, 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여 후 2일(D+2)에서 4일(D+4)까지 얻은 분변중의 세균중 호기적 조건에서 배양하여 측정된 세균수가 loperamide대조군의 세균수보다 다소 저하되는 것을 관찰할 수 있었는 바, 이는 호기상태에서 자라는 일부의 세균이 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)에 의해 억제될 수 있음을 의미한다. 이와 같은 호기성 세균의 억제 현상은 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여 후 2일(D+2)의 생균수 측정용 고체 배지상에서도 관찰되었다. 즉 콜로니의 크기가 작고 투명한 유산균류는 잘 생육하고 있었으나, 기타 세균에 의해 생기는 불투명한 유백색 콜로니의 숫자는 감소하였다. 또한 분변세균중 우점균주의 분리 및 동정을 실시한 결과, 정상대조군, loperamide대조군 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 투여군 각각의 우점균은 유산균이었으며, 기타의 장내세균으로서는 RF-8(*Klebsiella pneumoniae*), RF-18(*Dermaococcus nishinomiyaensis*) 등이 동정되었다. *In vitro*에서 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)이 장내세균의 생육에 미치는 영향을 관찰한 결과, 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE)은 7,000 µg/ml 함유한 배지에서도 공시한 균주중 유익균으로 알려진 *Lactobacillus casei*, *L. helveticus* 및 *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* 및 *Escherichia coli* 의 생육에는 아무런 영향을 주지 않았으나, 공시한 균주중 유해균으로 알려진 *Salmonella typhimurium* (식중독 및 급성위염균), *Proteus vulgaris* (감염성 병원균),

Yersinia enterocolityca (식중독 및 급성장염균), *Klebsiella pneumoniae* (감염성 병원균)은 초임계 열처리된 무 복합추출물(HRE) 7,000µg/ml 농도에서 생육저해를 받았다.

VI. 감사의 글

본 논문은 한국연구재단 이공학 개인기초연구지원사업(과제번호 NRF-2017 R1D1A1B03033984)에 의해 수행하였기에 이에 깊은 감사드립니다.

References

- [1] Kim HY, "The effects of fruit and vegetable bark extract on learning ability and memory improvement," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(3), pp. 261-267, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.261>.
- [2] Kim DB, Ahn EY, and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [3] Kim HK, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [4] Guzik TJ, R. Korbut R, and Adamek-Guzik T, "Nitric oxide and superoxide in inflammation", *Journal physiol pharmacol*. Vol. 54(4), pp. 469-487, December 2003.
- [5] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, and Aggarwal BB, "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked", *Free radical biology and medicine*, Vol. 49(11), pp. 1603-1616, December 2010.
<http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- [6] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI, "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity," *Nature*. Vol. 444(7122), pp.1022-1023. December 2006.
<http://doi.org/10.1038/44410229>.
- [7] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG,

- Lesley SA, Peters EC, Siuzdak G, "Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites," *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.106(10), pp.3698-3703, March 2009. <http://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>.Epub2009Feb 20.
- [8] Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Makivuokko H, Rinttila T, Paulin L, Corander J, et al., "The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects," *Gastroenterology*. Vol. 133(1), pp.24-33, July 2007. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.005>.
- [9] Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, et al., "An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota," *Gut*, Vol. 61(7), pp. 997-1006, July 2012. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301501>.Epub 2011 Dec 16.
- [10] Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al., "Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome," *Gastroenterology*, Vol. 141(5), pp. 1792-1801, November 2011. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>.Epub2011 Aug 5.
- [11] Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, Diaz MA, Mandal D, Raza S, et al., "Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome," *Gastroenterology*.Vol. 141(5), pp. 1782-1791, November 2011. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.072>.
- [12] Farup PG, Jacobsen M, Ligaarden SC, Rudi K, "Probiotics, symptoms, and gut microbiota: what are the relations? A randomized controlled trial in subjects with irritable bowel syndrome," *Gastroenterol Res Pract*. Vol. 2012(2012),pp. 214102. July 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/214102>.Epub2012 Jul 31.
- [13] Lee BJ, Bak Y,T. "Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics," *J Neurogastroenterol Motil.* Vol. 17(3), pp.252-266, July 2011; <http://doi.org/10.5056/jnm.2011.17.3.252>.Epub 2011 Jul 13.
- [14] Choi CH, Jo SY, Park HJ, Chang SK, Byeon JS, Myung SJ. "A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: Effect on quality of life," *J Clin Gastroenterol*, Vol. 45(8), pp.679-683, September 2011. <http://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318204593e>.
- [15] Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K, "Screening of dairy yeast strains for probiotic applications," *J Dairy Sci*, Vol. 87(12), pp.4050-4056, September 2004. [http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73546-8](http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73546-8).
- [16] Lennard-Jones JE, "Classification of inflammatory bowel disease," *Scand J Gastroenterol.* pp.170-172. discussion 16-19. 1989. <http://doi.org/10.3109/00365528909091339>.
- [17] Ahuja V, Tandon RK, "Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: A comparison with developed countries and regional differences," *J Dig Dis*, Vol. 11(3), pp.134-147, June 2010. <http://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2010.00429.x>.
- [18] Baumgart DC, Sandborn WJ, "Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and established and evolving therapies," *Lancet*, Vol. 369(9573), pp.1641-1657, May 2007. [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60751-x](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60751-x).
- [19] Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al., "Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment," *Genome Bio.* Vol. 13(9), R79, April 2012. <http://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>.
- [20] Tubbs AL, Liu B, Rogers TD, Sartor RB, Miao EA, "Dietary salt exacerbates experimental colitis," *Journal of Immunology*, Vol. 199(3), pp.1051-1059, August 2017. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1700356>.Epub 2017 Jun 21.

※ 본 논문은 한국연구재단 이공학 개인기초연구지원 사업(과제번호 NRF-2017 R1D1A1B03033984)에 의해 수행하였기에 이에 깊은 감사드립니다.