

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2024.10.3.873>

JCCT 2024-5-99

과채복합추출물의 장내 마이크로바이옴 변화 분석

Analysis of Intestinal Microbiome Changes in Fruit and Vegetable Complex Extracts

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 우리는 Loperamide로 유도한 변비 Sprague-Dawley 랫드 모델에서 프락토올리고당 및 과채류복합 추출물을 2 주간 경구 투여 한 후 랫트 분변의 그룹 기간별로 수집 한 후 장내 마이크로바이옴 변화 경향을 분석하였다. 프락토올리고당 및 과채복합추출물(FVCE)에 대한 미생물 군집 분석을 16S rDNA 클로닝 및 pyrosequencing을 통해 수행하여 표준화 및 체계화를 위한 기초 데이터를 얻었다. 과채복합추출물(FVCE) 제조 공정은 원핵생물 군집에 대한 미생물 분석을 통해 문 수준에서 미생물 *verrucomicrobiota*의 약간의 차이가 우세한 것으로 나타났다. 속 수준에서는 *prevotella*와 *muribaculaceae*가 중 수준에서 더 많은 차이를 보였다. 이러한 결과는 사용된 미생물 군집이 생산되는 과일 및 채소 복합 추출물(FVCE)의 품질에 영향을 미친다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 따라서, 일관된 품질의 과일 및 채소 복합 추출물(FVCE)을 생산하기 위해서는 안정적인 미생물 군집이 유지되어야 한다.

주요어 : 마이크로바이옴, 과채복합추출물, 분석, 문, 속

Abstract We collected rat feces by group period after oral administration of fructooligosaccharides and fruit and vegetable complex extracts for 2 weeks in the Sprague-Dawley rat model of loperamide-induced constipation and analyzed trends in changes in the intestinal microbiome. Microbial composition analysis was performed on Fractooligosaccharide and fruit and vegetable complex extracts(FVCE), by 16S rDNA cloning and pyrosequencing to obtain basic data for the standardization and systematization of the FVCE manufacturing process. Microbial analysis of the prokaryotic community revealed a slight difference in microbial *verrucomicrobiota* was dominant at the phylum level. At the genus level, *prevotella* and *muribaculaceae* showed further differences at the species level. These results suggest that the microbial community used affects the quality of fruit and vegetable complex extracts(FVCE) produced. Thus, a stable microbial community must be maintained for the production of fruit and vegetable complex extracts(FVCE) with consistent quality.

Key words : Microbiome, Fruit and vegetable complex extract, Analysis, Phylum, Genus

1. 서론

현대인의 장건강은 매우 큰 위협에 처해 있다. 특히 현대 한국인들은 맵고 짠 음식을 선호하는 자극적인 식습관과 급격히 서구화된 식문화로 인해 많은 장 질환 문

제를 가지고 있다. 국민의 30% 정도가 변비와 소화불량 등을 앓고 있고, 궤양성 대장염, 크론병 등 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD) 환자 수도 매년 급속히 증가하고 있다. 특히 젊은 층에서 염증성 장질환 환자가 급속히 늘어가는 추세이다. 이를 토대로 볼 때 앞

*정회원, 서원대학교 식품공학과 조교수(제1저자,교신저자)

접수일: 2024년 3월 30일, 수정완료일: 2024년 4월 10일
게재확정일: 2024년 04월 15일

Received: March 30, 2024 / Revised: April 10, 2024

Accepted: April 15, 2024

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

으로 우리나라에서 장 건강의 중요성은 점차 더 커질 것으로 예상된다. 식품에서 미생물의 중요성은 매우 크다. 미생물은 식품을 발효해서 생기는 대사산물에 의해서 인체 건강에 도움이 되는 물질을 생성하기도 하고 부패를 일으켜 고약한 냄새를 풍기며 인체에 해로운 독소를 생성하기도 한다. 과거 식품에서의 미생물 산업은 생화학적인 특성에만 의존하여 미생물을 식품에 적용하였으나, 분자생물학적 기술의 발달에 따라 생화학적 특성 이외에도 유전자 수준에서의 미생물의 특성을 확인할 수 있게 되었으며, 더 나아가 차세대 염기 서열 분석(next-generation sequencing, NGS) 기술의 발달에 따라 메타게놈(metagenome) 수준에서의 분석이 가능해지면서, 미생물 하나가 아닌 특정 환경에서 존재하는 미생물 군집, 즉 마이크로바이옴(microbiome) 분석이 가능해졌다. 이러한 마이크로바이옴 분석 기술은 다양한 연구분야에서 활용되고 있으며, 특히 식품 산업에 적용되어 발효식품의 제조나 식중독균의 제어 등에 적용되어 식품산업 발전에 이바지 하고 있으며, 식품 미생물 산업에서 메타게놈 분석 기술은 절대 없어서는 안될 기술로 변모하고 있다[1,2].

따라서 본 실험에서는 Loperamide로 유도한 변비 Sprague-Dawley 랫드 모델에서 프락토올리고당 및 과채류복합 추출물을 2주간 경구투여 한 후 랫트 분변의 그룹 기간별로 수집 한 후 장내 마크로바이옴 변화 경향을 분석하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 시험군의 구성

본실험에 사용한 시료는 Loperamide로 유도한 변비 Sprague-Dawley 랫드 모델에서 프락토올리고당 및 과채류복합 추출물을 2주간 경구투여 한 후, 랫 샘플링한 랫분변 15 샘플을 수집하여 초저온냉동고에 보관하며 실험에 필요한 양만 털어 DNA를 추출하였다[3]. 샘플정도는 다음과 같다(Table 1).

표 1. 샘플 리스트

Table 1. Sample Group.

Experimental substance	Experimental substance	Day
1. Normal Saline(NS) + Sterilized distilled water (SDW); NSS	G1(NS + S Normal group)	10 Days
2. Normal Saline(NS) + Sterilized distilled water (SDW); NSS	G1(NS + S Normal group)	14 Days
3. Loperamide(Lop) + SDW; LS	G2(Lop + Control group)	10 Days
4. Loperamide(Lop) + SDW; LS	G2(Lop + Control group)	14 Days
5. Lop + Dulcolax-S(DS) ; LD	G3(Lop + Positive control group)	10 Days
6. Lop + Dulcolax-S(DS) ; LD	G3(Lop + Positive control group)	14 Days
7. Lop + Fructooligosaccharide(FOS); LF	G4(Lop + FOS group)	10 Days
8. Lop + Fructooligosaccharide(FOS); LF	G4(Lop + FOS group)	14 Days
9. Lop + TL(Test Low); LTL	G5(Lop + Test Low Dosage)	10 Days
10. Lop + TL(Test Low); LTL	G5(Lop + Test Low Dosage)	14 Days
11. Lop + TH(Test High); LTH	G6(Lop + Test High Dosage)	10 Days
12. Lop + TH(Test High); LTH	G6(Lop + Test High Dosage)	14 Days

T : Fructooligosaccharide and Fruit & Vegetable complex Extracts

2. 시약 및 기기

Maxwell RSC PureFood GMO and Authentication Kit, GloMax Discover, AMpure XP beads, Nextera XT index Kit, PhiX control, Miseq Reagent v3, Miseq.

3. 마이크로옴 분석방법

3.1. NGS 실험

Maxwell RSC PureFood GMO and Authentication Kit를 이용하여 랫 분변 0.2 g에 CTAB Buffer를 1ml 섞어 전체적으로 균질화를 진행한 후 70℃ (그람 음성균) 또는 95℃ (그람 양성균)에서 5분간 반응한 다음 원심 분

리한다. 상층액 200ul를 새 튜브로 옮겨 proteinase K를 30ul, Lysis Buffer 300ul 추가하여 56°C에서 30분 간 반응시킨다. 자동화 키트에 위 솔루션을 옮겨 담고 Maxwell 장비에서 위상하여 DNA를 추출한다. 추출한 미생물 DNA를 GloMax Fluorometer 장비로 농도 측정하여 샘플 ul당 5ng으로 맞춰 진행한다. 16S metagenomics primer를 이용하여 미생물 DNA의 16S ribosomal RNA gene V3-V4 region을 PCR로 증폭한 후 Bioanalyzer DNA 1000 kit를 이용하여 정확한 DNA amplicon size를 측정한다. 증폭 산물에서 primer와 primer dimer를 제거하기 위해 AMPure XP beads를 사용하여 정제한 후 Nextera XT index Kit를 사용하여 dual indices와 illumina seq. adapter를 PCR products에 붙이는 단계를 PCR로 수행한다. 동일하게 증폭 산물에서 primer와 primer dimer를 제거하기 위해 AMPure XP beads를 사용하여 정제한다.

정제한 PCR products는 GloMax Fluorometer 장비로 농도를 정확히 다시 측정한다. DNA 사이즈에 기초하여 DNA 농도를 몰 농도로 변환하여 각각 PCR products를 4nM로 계산하여 희석한 후 동일한 농도의 각각 PCR products를 같은 양을 모두 섞어 준비한다. 희석한 4nM의 샘플 5ul를 0.2 N NaOH 5ul과 섞어 준 다음 DNA가 denaturation되도록 실온에 5분 간 둔 후, 10ul의 denatured DNA에 990ul의 pre-chilled HT1을 섞어 준다. 결과적으로 1mM NaOH용액에 20pM denatured library가 만들어 진다. 동일하게 PhiX control library 또한 NaOH와 섞어 20pM의 농도로 준비한다. 동일하게 20pM로 준비된 DNA와 PhiX library를 pre-chilled HT1 용액과 섞어 8 또는 9pM이 되게 희석한 후 30%의 PhiX control을 만들기 위해 총 600ul중 9pM PhiX library를 180ul, 9pM DNA amplicon library를 420ul 섞어 준다. 이렇게 만들어진 600ul의 샘플은 MiSeq Reagent v3 cartridge에 loading하여 MiSeq NGS 장비에서 염기 서열 분석을 진행한다[4-6].

3.2. 데이터 분석 방법

NGS 장비에서 얻어진 데이터는 우선적으로 MiSeq NGS 장비에서 장내 미생물 분석이 이루어진다. 추가적으로 비교분석 가능한 free software인 Mothur나 QIIME2 program을 통하여 데이터 분석을 수행한다. 위

분석 프로그램은 각각 샘플에 대해 양방향에서 읽힌 서열은 하나로 통합하여 contig를 형성하고 서열 screening 통하여 버려질 서열을 분석하여 제거한다. 다음으로 unique한 서열을 선별하여 reference 서열에 alignment를 수행한 다음 서열 별로 cluster를 형성한다. 마지막으로 cluster를 형성한 서열들을 분류하는 작업을 수행하여 장내 미생물 분류군을 분석하게 된다. 이렇게 분류된 서열들은 reference없이 데이터 내의 서열들만 가지고 서열 분석을 하여 operational taxonomic units; OTUs를 형성한 후 분류하여 장내 미생물 분류군을 분석한다.

4. 통계

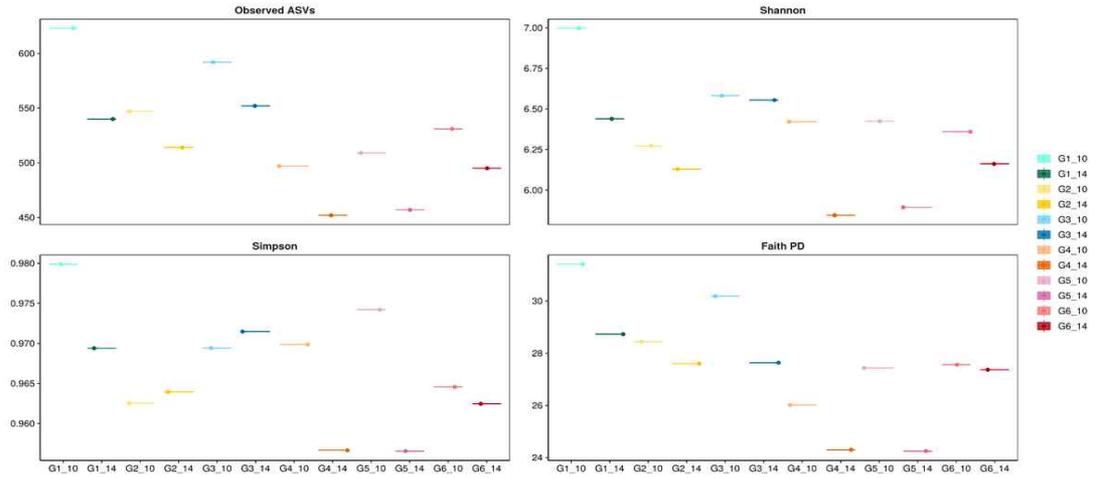
R software를 주로 이용한다. T-test: 두 그룹 간의 평균 차이를 판단하는 통계적 검정방법, 정규성 검정을 우선 수행하고 검정한다. ANOVA(Analysis of variance): 3개 이상의 그룹 간의 평균의 차이를 검증할 때 사용할 분산 기반 분석이다. 상관분석(Correlation Analysis): 특정 변수들 간에 서로 관계가 있는지, 있다면 얼마나 큰지를 확인하는 방법으로, 상관계수는 스피어만(spearman) 또는 피어슨(pearson)을 사용한다. Alpha & beta diversity 분석은 QIIME 과 Mothur 프로그램을 이용할 것이며 시각화 tool로서 R software를 사용한다.

III. 연구결과

1. 개체별 알파 다양성

알파 다양성은 한개체가 얼마나 다양한 미생물 분포를 가지는것에 대한 척도를 알아 보는 것이다[7]. 그림 1에서 보는 바와 같이 그룹별로 10일에서 14일로 진행함에 따라 alpha diversity가 감소하는 경향을 보이고 있다는 것을 확인하였다(Figure 1).

그림 1. 그룹별 알파 다양성(Observed ASVs, Shannon, Simpson, Faith PD)
Figure 1. Alpha diversity



2. 베타다양성

베타다양성은 개체간 장내 마이크로바이옴이 얼마나 다른지를 알아보는 척도이다[8]. 그림 2에서 살펴보는 것처럼 아래 plot에서 점 하나가 개체를 의미하며 가까운 점들은 서로 마이크로바이옴 유사하다는 의미이며, 거리가 먼 점들은 마이크로바이옴 구성의 차이가 크다는 것을 의미한다. 그룹별로 가깝게 위치하고 있지만, 전체적으로 봤을 때 어떤 한 부분도 모여 있지 않고 흩뿌려져 있는 양상이므로 그룹마다 다른 마이크로바이옴 구성을 가지고 있었다(Figure 2).

3. 장내 마이크로바이옴 구성 분석

3.1. Phylum level에서 장내 마이크로바이옴 구성

하나가 개체를 의미하며 가까운점들은 서로 마이크로바이옴이 유사하다는 의미이며, 거리가 먼점들은 마이크로바이옴 구성의 차이가 크다는 것을 의미한다고 할 수 있다[9,10].

장내 마이크로바이옴 구성 분석을 우선 phylum(문) level에서 분석해 볼 결과 그림 3에서 보다 구체적으로 살펴보면 Phylum level에서 그룹 간 미생물 군집의 분포가 서로 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다(Figure 3).

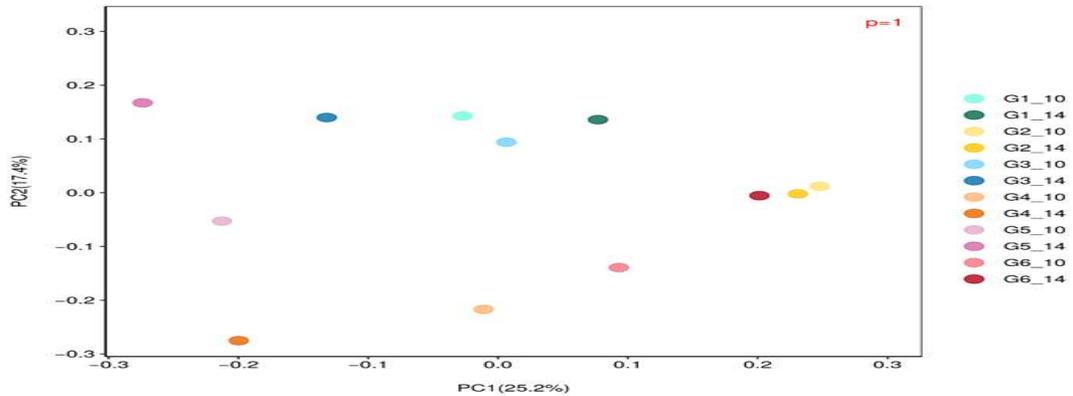


그림 2. 개체간 베타 다양성을 나타낸 PCA plot.

Figure 2. PCoA(Principal Coordinates Analysis) plot showing inter-individual beta diversity.

개체별 알파 다양성은 한 개체가 얼마나 다양한 미생물 분포를 가지는것에 대한 척도이다. 그룹별로 10일에서 14일로 진행함에 따라 alpha diversity가 감소하는 경향을 보이고 있다. 베타다양성은 개체간 장내 마이크로바이옴이 얼마나 다른지를 알아보는 척도이다. 점 하나가 개체를 의미하며 가까운 점들은 서로 마이크로바이옴 유사하다는 의미이며, 거리가 먼 점들은 마이크로바이옴 구성의 차이가 크다는 것을 의미한다. 그룹별로 가깝게 위치하고 있지만, 전체적으로 봤을 때 어떤 한 부분도 모여 있지 않고 흩뿌려져 있는 양상이므로 그룹마다 다른 마이크로바이옴 구성을 가지고 있다. 장내 마이크로바이옴 구성 분석을 Phylum level에서 그룹별로 시간이 지남에 따라 Verrucomicrobiota가 증가하는 양상이 보이지만 그룹 간 미생물 군집의 분포가 서로 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다. Genus level에서 그룹간 *prevotella*와 *Muribaculaceae*의 비율이 차이 나는 그룹도 있지만 전반적으로 미생물 군집의 분포가 서로 크게 다르지 않음을 확인할 수 있었다.

References

- [1] H. K. Kim, "Evaluation of intestinal immunity activity by steam-heat treatment and fermentation of lactic acid bacteria of fruit and vegetable complex extracts containing red ginseng," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 8(6), pp. 935-941, 2022. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.6.935>.
- [2] H. K. Kim, "Effects of ginseng saponin metabolites and intestinal health active ingredients of vegetables extracts and fermented lactic acid bacteria," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 8(6), pp. 943-951, 2022. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.6.943>.
- [3] I. Takio et al., "Effects of probiotics on loperamide induced constipation in rats," *Scientific Reports*, 11:24098, 2021.
- [4] K. B. Gayathri et al., "Ebselen prevents cigarette smoke-induced gastrointestinal dysfunction in mice," *Clinical Science*, Vol. 134(22), pp. 2943-2957, 2020. <http://dx.doi.org/10.1042/cs.20200886>.
- [5] L. Zili et al., "Loperamide induces excessive accumulation of bile acids in the liver of mice with different diets," *Toxicology*, Vol. 447(153278), 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2022.153278>. Epub.2022 Aug.
- [6] NTP(National toxicology program) Noneo- plastic lesion atlas: a guide for standardizing terminology in toxicologic pathology for rodent. <https://ntp.niehs.nih.gov/>.
- [7] T. S. Kim, H. S. Kim, S. D. Kwon and H. D. Park, "Analysis of bacterial community composition in wastewater treatment bioreactors using 16S rRNA gene-based pyrosequencing," *Korean J Microbiol*, Vol. 46, pp. 352-358, 2010.
- [8] G. S. Lim, K. S. Lee, H. J. Jaang, J. K. Jung, J. Y. Lim, T. H. Chun, Y. S. Han and S. W. Oh, "Microbial community analysis of Tarak, a fermented milk product. J Korean Soc Food Sci Nutr Vol. 42(7), pp. 1109-1114. 2013. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.7.1109>.
- [9] E. J. Park, J. Chun, C. J. Cha, W. S. Park, C. O. Jeon and J. W. Bae, "Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing," *Food Microbiol*, Vol. 30, pp. 197-204. 2011.
- [10] Y. S. Kim, D. Y. Jung, Y. T. Hwang and T. B. Uhm, "Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method," *Korean J Microbiol*, Vol. 47, pp. 275-280. 2011. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1401.01009>.

※ 본 과제(결과물)는 2023년도 중소기업진흥원의 지원을 받아 수행된 산학연 Collabo R&D 기술개발사업화의 결과입니다.(연구과제명: 진생사포닌 대사산물과 비저터블 활성성분을 활용한 장건강 소재개발 및 상용화(사업화) S3301480). 이에 감사 드립니다.