

장내 유용세균 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216의 성장을 촉진시키는 항산화 천연산물의 조합구성

†김 종 덕 · ¹김 민 용 · ²안 창 범 · 서 효 진 · ³김 봉 조 · ³서 재 관 · 김 점 순 · ³공 재 열
여수대학교 생명 · 화학공학부, ¹냉동공학과, ²식품영양학과, ³부경대학교 식품생명공학부
(접수 : 2002. 7. 2., 게재승인 : 2002. 8. 19.)

The Growth Promotion Effect of Useful Enterobacteria *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216 by Combination of Natural Products Bearing Antioxidative Capacity

Jong-Deog Kim†, Min-Yong Kim¹, Chang-Bum Ahn², Hyo-Jin Seo, Bong-Jo Kim³, Jae-Kwan Seo³
Jeom-Soon Kim, and Jai-Yul Kong³

Department of Biotechnology, ¹Department of Refrigeration Engineering

²Department of Food Science and Nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

³Department of Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

(Received : 2002. 7. 2., Accepted : 2002. 8. 19.)

The growth of enterobacteria, *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216 was promoted by natural products bearing antioxidative capacity and combined two, three and four kinds of them. *B. adolescentis* was showed a good growth by *Sophorae flos*, *Phellodendri cortex*, *Mori cortex radidis*, *Aurantii nobilis pericarpium*, *Angelicae gigantis radix*, alone, and two mixed combinations were composed of *Paeonia japonica* and *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Angelicae gigantis radix*, *Paeonia japonica* and *epimedii herba*, *Atractylodis rhizoma alba* and *angelicae gigantis radix*, and three mixed combinations were oraganized with *Theae folium*, *Paeonia japonica* and *epimedii herba*, *Theae folium*, *Beiamcanda chinensis* and *Paeonia japonica*, *Theae folium*, *Astragali radix* and *Mori cortex radidis*, and four mixed combinations were formed with *Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Theae folium*, and *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Theae folium*, and *Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, *Theae folium*. The best four mixed combination for the growth of *B. adolescentis* was mixture of *Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Theae folium*, which promoted 2.6 times than that of control, and its antioxidative capacity was also 5.6 times higher, and the ratio of elimination of hydroxyl radical was more than 80% in each dilution rate. As these combinations of natural products will activate some parts of body, they may be applied to pharmaceutical applications, functional foods, antiaging tea, also expected to promote useful entero bacterial growth for fermentative beverage bearing multifunction.

Key Words : Antioxidative capacity, natural product, combination, growth promotion, *B.adolescentis*

서 론

생체내에서 생산되는 부대전자(unpaired electron)를 가지고

있는 어떠한 원자 또는 분자를 활성산소 (free radical)라고 하며, 아주 반응성이 높아 생체의 어떠한 구성성분으로부터라도 전자를 빼어냄으로써 Figure 1에서 보듯이 다양한 활성산소(ROS: Reactive Oxygen Species)를 생성하며 이 ROS는 상대 세포의 기능을 저하시키거나 괴사시킴으로써 노화 및 질병의 과정을 밝게 되며(1-3), alcoxyl radical (RO), singlet oxygen (¹O₂), peroxy nitrite anion (ONOO⁻), peroxy radical (ROO[·]), nitric oxide (NO), semiquinone radical, hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻), hypochlorous acid (HOCl) 등

† Corresponding Author : Lab. for Production of Useful Substance, Dept. of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea,

Tel : +82-61-659-3305, Fax : +82-61-659-3305

E-mail : pasteur@yosu.ac.kr

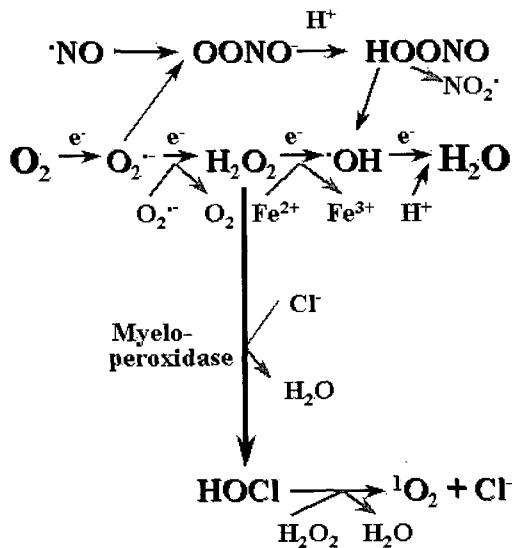


Figure 1. Origin of ROS generation in mammalian organism.

을 예로 들 수 있다(4-9). Free radical에 의하여 일어날 수 있는 질병으로서는 만성기관지염, 천식등의 기관지 질환, 위궤양 등의 소화기 질환, 국소빈혈, 동맥경화, 고혈압 등의 심장질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머 병 등의 뇌 및 신경 질환, 빈혈 등의 혈액 질환, Fe²⁺ 이온, Cu²⁺ 이온의 축적에 의한 간장 질환, 신우염 등의 신장질환, 심이지장염, 당뇨병, 백내장, 아트로피성 피부염 및 여러 가지의 암, 근육질환, 장염 등이 있다(10-13). 이러한 free radical을 제거할 수 있는 항산화제는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 나눌 수 있으며(14-16), 전자의 예로서는, SOD(superoxide dismutase), Glutathion, Catalase 등을 들 수 있으며, 후자는 BHA(tert-butylhydroxyanisol), BHT(tert-butyl-hydroxytoluene) 등의 합성 항산화제와 vitamine C, vitamine E, carotenoid, flavonoid 등을 구성 성분으로 하는 천연 항산화제로 나눌 수 있으며(14-16), 생체에 존재하는 효소적 항산화제 만으로는 생산되는 free radical을 모두 소거하기 어려우므로 비효소적인 항산화제를 투여하여 free radical의 소거 활성을 높일 필요가 있다. 본 연구에서는 합성 항산화제의 활성과 비슷한 효과를 지닌 항산화제를 천연산물로 부터 탐색(17-22)하여 그 응용도를 높이고자 하며, 이런 천연 항산화제의 장점으로는 1) 합성 항산화제보다 부작용이 적다. 2)주위에서 쉽게 구할 수 있다. 3) 각각의 천연산물이 고유의 약리 활성을 가지고 있다. 4) 이들의 조합으로써 생체의 필요한 부분의 활성을 도울 수 있는 기능을 가지고 있다. 이러한 항산화 천연산물을 이용함으로써 free radical을 소거함과 동시에 생체에 필요한 부분의 활성을 향상시킬 수 있는 다기능성을 갖는 우수한 신소재를 개발할 수 있다. *Bifidobacterium* 속은 *Lactobacillus* 속(23)과 더불어 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Clostridium perfringens* 등과 같은 병원성 미생물의 성장시 길항효과(antagonistic effects)를 발휘하며, 프로바이오틱 미생물은 항미생물 기작(anti-microbial mechanisms)을 경유하여 장내 서식하고 있는 병원성 미생물에 대한 저항성을 증진시켜 주며, 또한, 장내 감염에 대한 면역성 증진시키고, 설사성 질환 및 결장암(colon cancer), 그리고 고콜레스테

롤 혈중(hypercholesterolaemia) 등을 예방할 수 있으며, 유당(lactose)의 이용성 개선하고, 장점막벽(gut mucosal barrier)의 안정화를 이룰 수 있다고 알려져 있다(24-26). 따라서 본 연구에서는 *B. adolescentis*의 성장을 촉진함으로써 장내의 프로바이오틱 효과를 증진시키고, 장의 활성화를 도모함과 동시에 항산화력을 가지는 천연산물의 장에 대한 약리적 효과를 응용함으로써 장의 기능을 활성화 시킬 수 있는 천연산물의 조합을 구성하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

장내 유용 균주로는 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216을 KTCC로부터 분양 받아 사용하였다.

재료 및 시약

균주의 성장에 필요한 배지로서는 *Bifidobacterium*배지(Casein peptone 10.0 g, Meat extract 5.0 g, Yeast extract 5.0 g, Glucose 10.0 g, K₂HPO₄ 3.0 g, Tween 80 1.0 mL, Tap water 1000.0 mL, Adjust pH to 6.8)를 사용하였고, 250 mL의 flask에 100 mL의 배양액을 넣고 37°C에서 150 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

유용천연산물의 선별

천연산물의 선별은 동의보감(東醫寶鑑)(18), 증맥·방약합편(證脈·方藥合編)(19), 한방처방의 구성과 적용(韓方處方の構成과 適用)(20), 도해상용한방처방(圖解 常用漢方處方)(17), 현대한방강좌(現代韓方講座)(21), 현대생약학(現代生藥學)(22) 등의 여러 고서에 수록된 고처방으로 부터 소화기계에 많이 사용되는 처방 중에서 생체를 보호하는 기능, 해독작용, 수렴, 조혈 작용, 항근작용을 가지는 천연산물의 역할을 바탕으로 30 종류를 선택하여 사용하였다.

천연산물의 추출 및 조합

천연산물의 시료는 각각의 천연산물 300 g에 3차 증류수 1,500 mL를 넣어 1시간 동안 열수 추출한 여액을 500 mL로 농축하여 사용하였다. 한가지의 천연산물을 사용할 때는 각 천연산물 추출액을 사용하였고, 두가지의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1로 조합한 혼합액을, 세가지의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1:1로 조합한 혼합한 액을, 네가지의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1:1:1로 조합한 혼합액을 실험의 시료로 하고 필요한 양에 따라 사용하였다.

장내 유용세균 *Bifidobacterium adolescentis* 활성을 증가시키는 천연산물군의 탐색

*Bifidobacterium adolescentis*의 배양은 250 mL 삼각 플라스크에 한가지, 두가지, 세가지 및 네가지 종류의 천연산물의 조합 시료 3 mL와 *Bifidobacterium*배지를 97 mL 첨가하여 전체량을 100 mL로 하여 멸균한 후, 질소 가스로 충전된 glove box(Jisco, J-926)내에서, 제균 필터가 부착된 needle 로 배양액 내로 질소를 불어 넣어 공기를 탈기시키고, 전배양한 균주

를 0.1% 접종하여 37°C에서 혐기 배양하면서 6시간 간격으로 질소 가스가 충전된 glove box 내에서 시료를 채취한 후 20 배 희석하여 spectrophotometer(UV-2101PC Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세균의 성장 정도가 천연산물을 넣지 않은 대조군보다 높은 천연산물을 선택하였다.

용존산소분석법(D.O. analysis method)에 의한 항산화 활성의 측정

용존산소분석법에 의한 항산화력의 측정(11)은 100 mL의 flask에 linoleic acid 1 g과 Tween 40 용액 2 mL 및 천연산물의 조합 시료 3 mL를 첨가하고 증류수로써 최종량을 30 mL로 조정된 후, 37°C의 항온조에서 Fe^{2+} 를 첨가하고 D.O. meter (TPS, Model WP-82, Australia)를 사용하여 시간에 대한 D.O.의 감소를 측정하여 곡선의 AUC(Area Under Curve)를 구하여 항산화력을 비교하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical은 생체의 대사과정에서 생산되는 지질의 과산화물이나 H_2O_2 가 Fe^{2+} 혹은 Cu^{2+} 의 존재하에서 생산되는 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거 활성은 2-deoxyribose oxidation method(3,14,15), 즉, 시험관에 0.1 mM $FeSO_4/EDTA$ 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 항산화 추출 시료액 0.2 mL와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL, 10 mM H_2O_2 0.2 mL를 가하고 37°C의 항온조에서 4시간 반응시킨 후, 2.8%의 TCA(trichloroacetic acid) 용액 1 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 생성되는 malondialdehyde를 1.0%의 TBA(thiobarbituric acid) 용액 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 phenol 함량 및 방향족 화합물의 측정

항산화력은 phenol성 화합물에서 강하며 방향족 화합물의 양에 의하여 결정되므로 추출물 일정량을 분광 광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도 측정하여 방향족 화합물의 함량을 측정하고, 총 phenol 함량의 분석은 Folin-Denis법(27)을 개량하여 측정하였다. 즉 제조한 시료 용액 0.5 mL에 증류수 2.5 mL를 넣고 Folin-Denis시약 2 mL를 가한 후 다시 포화 sodium carbonate 5 mL를 가하여 1시간 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정된 흡광도는 tannic acid의 검량 곡선에 의하여 총 phenol 량을 구하였다.

결과 및 고찰

30종류의 천연산물을 용존산소 분석법으로 의하여 분석한 AUC를 기존의 합성 항산화제와 비교해보면 0.02%의 BHA 및 0.02%의 BHT는 각각 1656.80 및 1516.58이었으며, 천연산물의 AUC는 승마(*Cimicifugae rhizoma*: 1045.24), 산수유(*Corni fructus*: 984.50), 현초(*Geranii herba*: 941.58), 백작약(*Paeonia japonica*: 788.73), 천문동(*Asparagi tuber*: 787.92), 음양곽(*Epimedii herba*: 783.20) 등은 높은 항산화력을 보여 합성 항

산화제를 대용 할 수 있을 것으로 사료되었으며, 상백피(*Mori cortex radices*: 723.28), 연자육(*Nelumbo nucifera gaertner*: 695.86), 백굴채(*Chelidonium majus L.*: 695.86), 황련(*Coptidis rhizoma*: 682.05), 백출(*Atractylodis rhizoma alba*: 665.05), 진피(*Aurantii nobilis pericarpium*: 658.23), 오배자(*Galla rhois*: 652.36), 두충(*Eucommiae cortex*: 640.47), 황백(*Phellodendri cortex*: 601.10), 계피(*Cinnamomi cortex*: 592.23), 구기자(*Lycii fructus*: 568.86), 녹차(*Theae folium*: 557.93), 오가피(*Acanthodanacis cortex*: 555.90), 사간(*Beiamcanda chinensis*: 539.44), 고삼(*Sophorae radix*: 537.52) 및 당귀(*Angelicae gigantis radix*: 532.32) 등은 0.02%의 β -Carotene(485.28) 보다 나은 항산화력을 나타내었다. 천연산물 중에서도 항산화력이 0.02%의 β -carotene 보다 강한 제재들이 많아 합성 항산화제의 대용뿐만 아니라, ROS 제거를 위한 생체투여가 가능한 물질도 많음을 알 수 있었으며, 유산균 발효유, 식품보존제 및 항노화제 등의 다방면으로 사용이 가능할 것으로 판단되며 구체적인 30종류의 천연산물 AUC는 전보에 수록하였다(28).

천연산물들의 *B. adolescentis*의 성장 촉진 효과

B. adolescentis 균주를 *Bifidobacterium Medium*에 30 종류의 천연산물을 첨가하여 배양하였을 때 오가피(五加皮), 구기자(枸杞子), 괴화(槐花), 황백(黃柏), 상백피(桑白皮), 진피(陳皮), 당귀(當歸) 등의 천연산물에 의하여 성장이 촉진되었으며, 대조군에 비교하여 이 균주의 성장정도를 Figure 2에 나타내었다. *B. adolescentis* 균주의 성장을 촉진하는 각각의 천연산물들의 장에 대한 기능은 오가피(五加皮)는 간 및 신장의 기능을 도우는(滋補肝腎) 작용을, 구기자(枸杞子)는 간과 신장 그리고 정력을 도우고(益精), 계피(桂皮)는 혈액을 잘 돌게하며(活血), 괴화(槐花)는 오장의 기생충을 죽이고(殺五臟蟲), 혈루성 치질(痔血)을 치료하며, 황백(黃柏)은 해독(解毒), 살충(殺蟲), 황달(黃疸) 및 여성의 대하(帶下)를 치료하고, 진피(陳皮)는 체한 증상(導滯)을 내리며, 위암(反胃)에도 효과가 있고, 당귀(當歸)는 장의 활성화(活腸)를 기하고, 여성들의 생리 불순(生理不順)을 치료하며, 상백피(桑白皮)는 토하고 설사하며 위의 경련(權亂吐瀉)에 각각 효과가 있는 것으로 알려져 있다(17-22). 이 천연산물들의 공통작용은 신체의 간, 심장, 비장, 폐 신장의 오장(五臟)에 작용하여 그 활력을 도우는 것이며 기능을 상승시키는 작용을 한다(18-20). 따라서 이들 천연산물이 적어도 장내 유용세균 *B. adolescentis*의 성장에 도움을 주며 이에 따라 장의 활성화에도 기여하는 것으로 사료된다.

Figure 2에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군 보다 3배 이상 성장이 촉진된 것을 볼 수 있으며, 한가지의 천연산물 중 괴화, 황백, 상백피, 진피 및 당귀 등은 아주 현저하게 촉진시키는 것을 볼 수 있는데 사람에게 있어 나쁜 열기를 없애주거나(清熱)(18), 혈액의 증진시키는 효과(養血)를 갖는 공통점이 있는 것(18-20)을 볼 때 *B. adolescentis*에서도 membrane 내의 삼입 및 주변단백질의 활성화에 영향을 주거나, 항산화력에 의한 phospholipid의 산화 방지 효과, 혹은 receptor에서의 신호 전달 촉진 등에 의하여 membrane transport system을 촉진되는 것으로 추정된다(29,30).

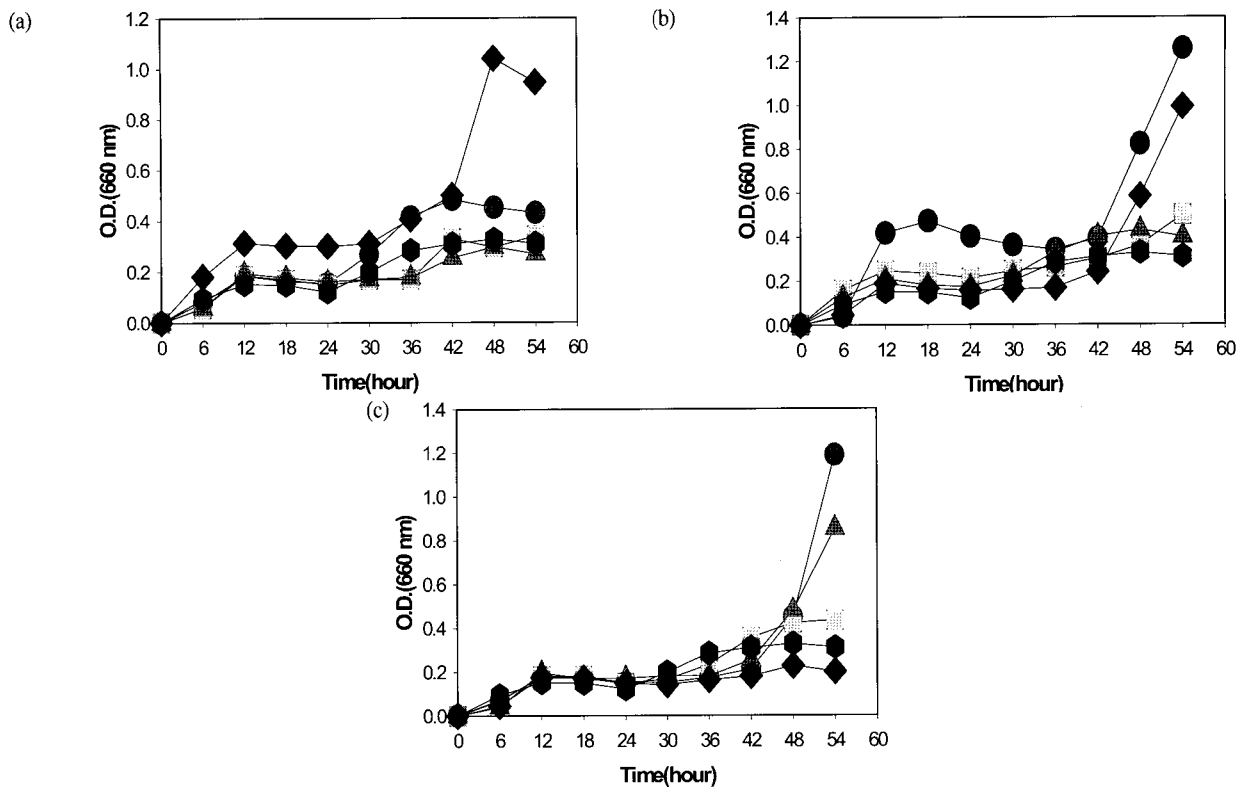


Figure 2. The effect of each natural product for the growth of *B. adolescentis* designated pannel (a), (b) and (c). Pannel (a), ●: *Acanthodanacis cortex*, ■: *Lycii fructus*, ▲: *Cinnamomi cortex*, ◆: *Sophorae flos*, ●: control. Pannel (b), ●: *Phellodendri cortex*, ■: *Nelumbo nucifera gaertner*, ▲: *Asparagi tuber*, ◆: *Mori cortex radicis*. Pannel (c), ●: *Aurantii nobilis pericarpium*, ■: *Puerariae radix*, ▲: *Angelicae gigantis radix*, ◆: *Scutellaria baicalensis george*.

Table 1. The promotion effect of two combined natural products for the growth of *B. adolescentis*

combination of natural products	maximum O.D. (660 nm) of <i>B. adolescentis</i>
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Theae folium</i>	0.72
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Epimedii herba</i>	0.65
<i>Epimedii herba</i> , <i>Angelicae gigantis radix</i>	0.63
<i>Atractylodis rhizoma alba</i> , <i>Epimedii herba</i>	0.60
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Mori cortex radicis</i>	0.52
<i>Atractylodis rhizoma alba</i> , <i>Beiamcanda chinensis</i>	0.50
<i>Epimedii herba</i> , <i>Phellodendri cortex</i>	0.40
<i>Epimedii herba</i> , <i>Sophorae radix</i>	0.40
<i>Atractylodis rhizoma alba</i> , <i>Epimedii herba</i>	0.38
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Atractylodis rhizoma alba</i>	0.38
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Astragali radix</i>	0.38
<i>Atractylodis rhizoma alba</i> , <i>Sophorae flos</i>	0.37
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Angelicae gigantis radix</i>	0.37
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Phellodendri cortex</i>	0.36
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Sophorae flos</i>	0.36
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Beiamcanda chinensis</i>	0.35
Control	0.32

두가지 천연산물 혼합물의 *B. adolescentis*의 성장 촉진 효과

*B. adolescentis*는 두가지의 배합 천연산물인 백작약과 녹차, 백작약과 상백피, 백작약과 음양곽, 음양곽과 당귀, 백출과 사간, 백출과 당귀 등의 천연산물 조합에 의하여 성장이 대조군에 비교하여 2.2배 성장을 촉진하였고, 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

*B. adolescentis*의 성장을 촉진시켰던 각각의 천연산물을 중

심으로 2종류씩 조합하여 성장 촉진 효과를 검토한 결과 조합되는 2 번째의 천연산물에 의하여 성장 촉진 효과가 현저히 달라짐을 보였으며, 한 종류를 사용하였을 때 현저히 촉진효과를 보였던 괴화, 황백, 상백피, 진피, 당귀 등의 조합에서는 오히려 성장 저해의 효과를 나타내었고, Table 1에서 조합 작용을 하는 백작약을 중심으로 한 조합에서 성장의 효과가 좋았으며, 이 조합의 O.D.는 0.72 및 0.65이고, 당귀, 괴화, 황백 등으로 조합된 것의 O.D.는 각각 0.37, 0.36, 0.4로써 이

Table 2. The promotion effect of three combined natural products for the growth of *B. adolescentis*

combination of natural products	maximum O.D.(660 nm) of <i>B. adolescentis</i>
<i>Theae folium, Paeonia japonica, Epimedii herba</i>	0.65
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Astragali radix</i>	0.65
<i>Theae folium, Mori cortex radidis, Astragali radix</i>	0.64
<i>Beiamcanda chinensis, Angelicae gigantis radix, Mori cortex radidis</i>	0.62
<i>Theae folium, Mori cortex radidis, Sophorae flos</i>	0.62
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Angelicae gigantis radix</i>	0.61
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Mori cortex radidis</i>	0.60
<i>Theae folium, Mori cortex radidis, Paeonia japonica</i>	0.60
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Sophorae flos</i>	0.60
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Epimedii herba</i>	0.59
<i>Theae folium, Angelicae gigantis radix, Astragali radix</i>	0.59
<i>Theae folium, Angelicae gigantis radix, Mori cortex radidis</i>	0.59
<i>Theae folium, Beiamcanda chinensis, Paeonia japonica</i>	0.58
<i>Beiamcanda chinensis, Angelicae gigantis radix, Sophorae flos</i>	0.50
<i>Beiamcanda chinensis, Angelicae gigantis radix, Paeonia japonica</i>	0.50
<i>Beiamcanda chinensis, Angelicae gigantis radix, Astragali radix</i>	0.48
Control	0.24

사실로부터 알 수 있다. 이것은 천연산물이 비슷한 효과를 가지고 있더라도 그 배합에 따라 성질이 달라짐을 나타내며 배합의 구성에 따라 균체의 성장 제어가 가능한 것으로 판단된다.

세가지 천연산물의 혼합물에 의한 *B. adolescentis*의 성장 촉진 효과

*B. adolescentis*는 세가지 천연산물 조합인 녹차와 사간 및 당귀, 녹차와 사간 및 황기, 녹차와 사간 및 상백피, 녹차와 사간 및 백작약, 녹차와 사간 및 괴화, 녹차와 사간 및 음양곽, 녹차와 사간 및 상백피, 녹차와 상백피 및 백작약, 녹차와 상백피 및 괴화, 녹차와 황기 및 상백피, 녹차와 백작약 및 음양곽, 사간과 당귀 및 황기, 사간과 당귀 및 상백피 등의 조합에 의하여 대조군 보다 2.7배 이상 촉진되었으며 균주의 성장 정도를 Table 2에 나타내었다. 녹차와 사간의 공통 조합에 제3의 천연산물이 조합된 것과, 녹차와 상백피에 제3의 천연산물이 배합된 조합의 O.D.는 각각 0.65 및 0.64이었고, 사간과 백작약에 제 3의 천연산물이 조합된 것의 O.D.는 0.50 및 0.48로써 녹차, 사간 및 상백피의 공통 조합이 *B. adolescentis*의 성장 촉진 효과가 좋은 것으로 나타났다. 조합된 그룹마다의 특징을 갖고 있으며 주된 역할을 하는 천연산물(君藥)의 선택에 따라 성장 촉진 효과도 달라지며 이에 따른 생체의 적용 가능성이 달라질 수 있을 것으로 사료된다.

네가지 천연산물 혼합물의 *B. adolescentis*에 대한 성장 촉진 효과

*B. adolescentis*는 네가지의 천연산물 조합인 사간, 당귀, 음양곽 및 백작약의 조합, 사간, 당귀, 음양곽 및 괴화의 조합, 사간, 당귀, 음양곽 및 녹차의 조합, 사간, 당귀, 음양곽 및 황기의 조합, 사간, 당귀, 음양곽 및 상백피의 조합, 당귀, 음양곽, 백작약 및 괴화의 조합, 당귀, 음양곽, 백작약 및 녹차의 조합, 당귀, 음양곽, 백작약 및 황기의 조합, 당귀, 음양곽, 백작약 및 상백피의 조합, 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차의 조합, 음양곽, 백작약, 괴화 및 황기의 조합, 음양곽, 백작약, 괴화 및 상백피의 조합, 백작약, 괴화, 녹차 및 황기의 조합, 백작약, 괴화, 녹차 및 상백피의 조합, 괴화, 녹차, 황기 및

상백피 등의 조합에 의하여 대조군 보다 3배 정도 성장이 촉진된 것을 볼 수 있으며 성장정도를 Figure 3에 나타내었다.

사간과 당귀 및 음양곽에 제4의 천연산물을 조합한 것, 당귀와 음양곽 및 백작약에 제4의 천연산물을 조합한 것, 음양곽과 백작약 및 괴화에 제4의 천연산물을 조합한 것 등으로 나누어 볼 수 있으며, 각 조합이 기능에 따라 성장을 촉진하는 효과도 다르게 나타나 이를 응용하고자 함에 따라 그 범위 및 천연산물의 종류는 달라질 수 있을 것으로 판단되며 조합의 구성에 따라 *B. adolescentis*의 성장을 촉진하는 조합 뿐만 아니라 필요에 따라서 제어할 수 있는 방법의 개발도 가능하리라 사료된다.

*B. adolescentis*의 성장 촉진 효과를 갖는 4 가지조합의 항산화력

*B. adolescentis*의 성장을 촉진하는 4차 배합 조성물의 항산화력을 용존산소 분석법(D.O. analysis method)에 의하여 측정하였을 때 당귀, 음양곽, 백작약 및 녹차가 665.55로써 가장 강한 것으로 나타났고, 이 조합의 성장촉진효과는 대조군 보다 2.1의 성장률을 보였고 대조군의 AUC(116.61)보다 5.7 배 정도 항산화력이 강한 것으로 나타났다. 다음으로 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차의 조합(659.88), 작약, 괴화, 녹차 및 상백피의 조합(644.90), 사간, 당귀, 음양곽 및 녹차의 조합(608.22)의 순서였으며(Figure 4), *B. adolescentis*의 성장 촉진 효과가 가장 나았던 조합은 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차의 조합으로 대조군보다 2.6배의 성장 촉진효과를 나타내었고, 대조군의 AUC 116.61보다 5.6배 정도 항산화력이 강한 것으로 나타났다. 항산화력이 큰 조합이라고 해서 세균의 성장 성장 촉진 효과와 일치하는 것은 아닌 것으로 나타났으나 조합의 약리적 효과에 따라 다양하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Hydroxyl radical 소거 활성

*B. adolescentis*의 성장을 촉진시키는 천연산물의 hydroxyl radical의 소거활성은 각 조합의 추출물을 50, 100, 200 및 300 배로 희석하여 측정하였으며(Figure 5), 항산화 활성이 강하게 나타난 당귀, 음양곽, 백작약 및 녹차의 조합이 100배의 희

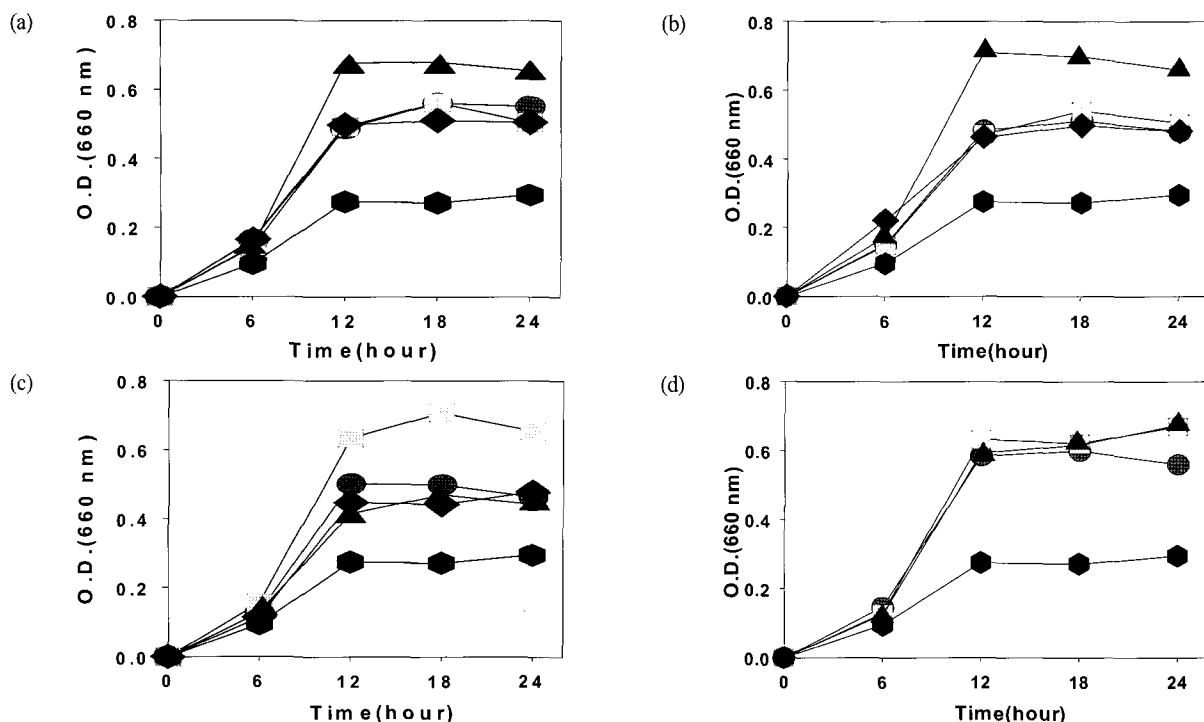


Figure 3. The promotion effect of four combined natural products for the growth of *B. adolescentis* designated pannel (a), (b), (c), and (d). Pannel (a), ●:combination of *Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Paeonia japonica*, ■:*Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Sophorae flos*, ▲:*Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Theae folium*, ◆:*Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Astragali radix*, ●:control. Pannel (b), ●:combination of *Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Mori cortex radicis*, ■:*Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Sophorae flos*, ▲:*Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*, ◆:*Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Astragali radix*, ●:control. Pannel (c), ●:combination of *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Mori cortex radicis*, ■:*Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Theae folium*, ▲:*Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Astragali radix*, ◆:*Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Mori cortex radicis*, ●:control. Pannel (d), ●:combination of *Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, *Theae folium* and *Astragali radix*, ■:*Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, *Theae folium* and *Mori cortex radicis*, ▲:*Sophorae flos*, *Theae folium*, *Astragali radix* and *Mori cortex radicis*, ●:control.

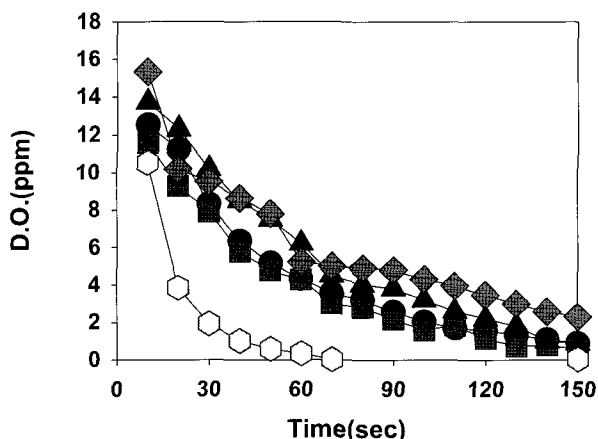


Figure 4. Comparison of antioxidative capacity with AUC of four combinations of natural antioxidants used for coultring *B. adolescentis*. ●:combination of *Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, *Theae folium* and *Mori cortex radicis*(644.90), ■:*Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba* and *Theae folium*(608.22), ▲:*Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Theae folium*(665.55), ◆:*Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*(659.88), ●:control(116.61). Numerics in brackets are designated as AUC of each combination.

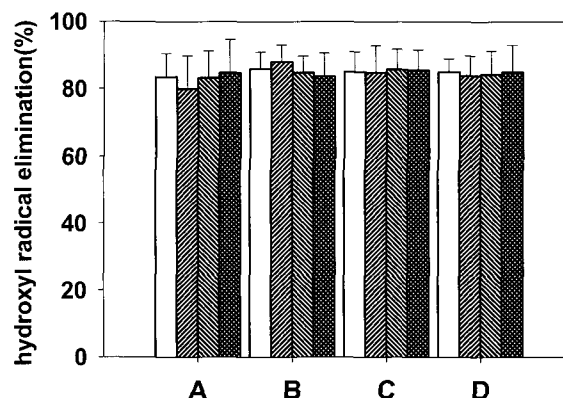


Figure 5. The ratio of OH[·] radical elimination by four combinations of natural antioxidants used for coultring *B. adolescentis*. □ :1/50, ▨ :1/100, ▩ :1/200, ▪ :1/300. A: combination of *Beiamcanda chinensis*, *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, and *Theae folium*, B: combination of *Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, and *Theae folium*, C: combination of *Angelicae gigantis radix*, *Epimedii herba*, *Paeonia japonica*, and *Theae folium*, D: combination of *Paeonia japonica*, *Sophorae flos*, *Theae folium*, and *Mori cortex radicis*.

Table 3. Amounts of aromatic compounds and total phenols of four combinations of natural products used for culturing *B. adolescentis*

Combination	Absorbance at	Amounts of total phenols
	280 nm	($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
<i>Beiamcanda chinensis</i> , <i>Angelicae gigantis radix</i> , <i>Epimedii herba</i> , and <i>Theae folium</i>	1.81	49.67
<i>Epimedii herba</i> , <i>Paeonia japonica</i> , <i>Sophorae flos</i> , and <i>Theae folium</i>	1.84	52.67
<i>Angelicae gigantis radix</i> , <i>Epimedii herba</i> , <i>Paeonia japonica</i> , and <i>Theae folium</i>	1.88	54.67
<i>Paeonia japonica</i> , <i>Sophorae flos</i> , <i>Theae folium</i> , and <i>Mori cortex radicis</i>	1.82	51.67

석액에서 87.99%의 소거 활성을 보였고, 사간, 당귀, 음양곽 및 녹차의 조합, 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차의 조합, 백작약, 괴화, 녹차 및 상백피의 조합도 희석 배수에 무관하게 모두 80% 이상의 hydroxyl radical의 소거 활성을 보여 이상의 4가지 조합은 *B. adolescentis*의 성장을 촉진할 뿐 아니라 free radical의 소거 활성이 좋아 희석율이 필요한 음료 제제의 개발을 위한 좋은 적응성을 보였다.

총 phenol 함량 및 방향족의 측정

*B. adolescentis*의 성장을 촉진시키는 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol 함량을 Table 3에 나타내었다. Yeو 등(31)은 본보와 같은 방법으로 측정된 증제차, 볶음차, 오롱차 및 홍차의 수용성 추출물의 총 phenol 량을 각각 1.71, 1.54, 0.96, 0.89 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 보고하였으며, 본 실험에 사용한 4가지 종류의 조합은 녹차 중의 증제차나 볶음차의 비발효 차 보다 30 배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오롱차 보다는 32~35배, 발효차인 홍차보다는 55~60 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 4 종류의 조합을 구성하는 천연산물의 성분 내에는 녹차보다 다양한 종류의 phenols, phenolic acid 및 polyphenol 등을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

요 약

장내 유용세균인 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216은 천연산물 한가지 단독으로서도 성장이 촉진되었으며, 두가지, 세가지 및 네가지의 조합에 의하여도 특징적으로 성장이 촉진되었다.

그리고 이 균주는 천연산물의 배합 중에서 한가지의 천연산물로서는 괴화, 황백, 상백피, 진피, 당귀 등이 좋은 효과를 보였고, 두가지 천연산물의 배합에서는 백작약과 녹차, 음양곽과 당귀, 백작약과 음양곽, 백출과 당귀 등의 조합이, 세가지의 천연산물 배합에서는 녹차와 백작약 및 음양곽, 녹차와 사간 및 백작약, 녹차와 황기 및 상백피 등의 조합이, 그리고 4가지 천연산물 배합에서는 사간, 당귀, 음양곽 및 녹차의 조합, 당귀, 음양곽, 백작약 및 녹차의 조합, 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차 등의 조합에서 잘 성장함을 보였으며, 음양곽, 백작약, 괴화 및 녹차의 조합이 대조군 보다 2.6배의 성장 촉진 효과를 나타내었고, AUC는 659.88로써 대조군의 AUC보다 5.6배 높은 것으로 나타났다. 또한 4종류의 조합 중 당귀, 음양곽, 백작약 및 녹차의 조합의 AUC가 665.55로써 강한 것으로 나타났으며, 이 조합의 성장촉진효과는 대조군보다 2.1배의 성장률을 보였고 대조군의 AUC(116.61)보다 5.7배 정도 항산화력이 강한 것으로 나타났다. 또한 4가지 종류 조합의 총

phenol 량은 녹차 중의 증제차나 볶음차 등의 비발효 차보다 30배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오롱차보다는 32~35배, 발효차인 홍차보다는 55~60 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 항산화력이 강한 천연산물들을 이용하여 free radical의 제거와 동시에 *B. adolescentis*의 성장 촉진 물질로 사용할 수 있으며, 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 기능성 제제로의 응용 가능성을 보였다.

감사의 말

본 연구는 농림기술연구센터에서 지원한 농림기술개발과제(관리번호200005-2) 결과의 일부이며, 이에 감사합니다.

REFERENCES

- Lunec, J. (1995), Oxygen Radical Activity-Detection and Measurement *in vivo*, In *Encyclopedia of Analytical Science*, Vol. 6, Townshend, A. Ed., p3679, Academic Press, U.S.
- Nakada, C. (1997), Talk for Free Radical, p56, Koudansya, Japan.
- Yosikawa, M., W. Kawano, and I. Yano. (2000), All of reactive oxygen and Free Radical, p8, Marusen L.T.D., Japan.
- Chung, H. Y., H. J. Kim, K. J. Jung, J. S. Yoon, M. A. Yoo, K. W. Kim, and B. P. Yu. (2000), The inflammatory process in aging, *Clin. Gerontol.* **10**, 202-222.
- Harman, D. (1978), Free radical theory of aging-nutritional implications. *Age*, **1**, 143-150.
- Kim, H. J., K. W. Kim, B. P. Yu, and H. Y. Chung (2000), The Effect of Age on Cyclooxygenase-2 gene Expression : NF- κ B Activation and I κ B α Dgradation, *Free Radical Biol. Med.* **28**, 683-692.
- Kwon, H. J., M. J. Kang, H. J. Kim, J. S. Choi, K. J. Paik, and H. Y. Chung (2000), Inhibition of NF- κ B by Methyl Chlorogenate from *Eriobotrya japonica*, *Mol. Cell.* **10**, 241-246.
- Yu B. P. (1996), Aging and oxidative stress-modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 651-668.
- Zoubi, H. (1998), Methods for not to lose against free radicals, p13, Noubunkyo, Japan.
- Li, H. C., S. Yashiki, J. Sonoda, H. Lou, S. K. Ghosh, J. J. Byrnes, C. Lema, T. Fujiyoshi, M. Karasuyama, and S. Sonoda (2000), Green tea polyphenols induce apoptosis *in vitro* in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 34-40.
- Outa. S. (1987), Food and Antioxidant, p38, Syokuhinzairyokenkyukai, Japan.
- Peter T. P. (1998), The skin's Antioxidant Systems.

- Dermatol. Nurs.* **10**, 401-406.
13. Serafini, M., A. Ghiselli, and A. Ferro-Luzzi (1994), Red wine, tea, and antioxidants. *Lancet*, **344**, 626-629.
 14. Kawagan, S. (1996), Protocol for control of body functional material in food, p15, Kakuen Press Center, Japan.
 15. Kogukuchi, N. (1999), Protocol for free radical experiments, p45, Suiyoonsa, Japan.
 16. Torizaki, K. (1995), Protocol for lipid peroxide and free radical, p145, Kakuen Press Center, Japan.
 17. Gan, K. K. (1982), Zugai Zouyou Kanbou Syohou, p190. Yakukyosihosya, Japan.
 18. Huh, J. (1999), Dongeuibogam, p21, Bobinmunwhasa, Korea.
 19. Kawhudo, Y. (1989), Proof of Pulse-Bangyakhappyeon, p15, Namsandang, Korea.
 20. Mori, Y. Z. (1986), KanbouSyohounoKouseitoTekiyou, p20, Hakubustusyokan, Japan.
 21. Yeom, T. H. and S. S. Park (1975), Lecture of modern Hanbang, p101, Haenglimseowon.
 22. Yuk, C. S. and H. S. Yang (1999), Hyundai Saengyakhak, p133, Hakchangsa.
 23. Ahrné, S., S. Nobaek, B. Jeppsson, and I. Adlerberth (1998), The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 88-94.
 24. Gusils, C., A. P. Chaia, S. Gonzalez, and G. Oliver (1999), *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. *J. Food Prot.* **62**, 252-256.
 25. Naidu, A. S., W. R. Bidlack, and R. A. Clemens (1999), Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**, 13-126.
 26. Nemcova, R. (1997), Criteria for selection of *Lactobacilli* for probiotic use. *Vet. Med. (Praha)*. **42**, 19-27.
 27. A.O.A.C. (1990), Official methods of analysis. 15th ed, p703, Association of official analytical chemists, Washington, D. C.
 28. Kim, J. D., M. Y. Kim, H. J. Seo, B. J. Kim, D. H. Kim, E. O. Kim, H. Y. Chung, and J. Y. Kong (2002), Combination of Natural Products Removing ROS for Growth Promoting Effects of the Useful Enterobacteria *Lacobacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**. (in press)
 29. Yuan, C. and L. J. Johnston (2000), Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoyl- phosphatidylcholine/ cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys. J.* **79**, 2768-2781.
 30. Yuan, C. and L. J. Johnston (2001), Atomic force microscopy studies of ganglioside GM1 domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys. J.* **81**, 1059-1069.
 31. Yeo, S. G., Y. B. Park, I. S. Kim, S. B. Kim, and Y. H. Park (1995), Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 154-159.