

## 장내 유용세균 *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270의 성장 촉진을 위한 항산화 천연산물의 조합구성

김종덕<sup>†</sup> · 김민용\* · 공재열\*\*

여수대학교 생명·화학공학부

\*여수대학교 냉동공학과

\*\*부경대학교 식품생명공학부

### The Growth Promoting Effect of Enterobacteria *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270 by Combination of Natural Products Bearing Antioxidative Capacity

Jong-Deog Kim<sup>†</sup>, Min-Yong Kim\* and Jai-Yul Kong\*\*

Dept. of Biotechnology, and \*Dept. of Refrigeration Engineering,  
Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

\*\*Dept. of Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

#### Abstract

The growth of enterobacteria, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270, was promoted by natural products bearing antioxidative capacity and mixed combinations of two, three and four kinds of them. *B. infantis* was expressed a good growth by *Aurantii nobilis pericarpium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix*, *Epimedii herba*, alone, and two mixed combinations of *Epimedii herba* and *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Crataegi fructus*, *Epimedii herba* and *Eucommiae cortex*, and three mixed combinations of *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Chelidonium majus* L., *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, *Theae folium*, *Chelidonium majus* L. and *Aurantii nobilis pericarpium*, *Theae folium*, *Chelidonium majus* L. and *Astragali radix*, *Theae folium*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, *Epimedii herba*, *Chelidonium majus* L. and *Aurantii nobilis pericarpium*, and four mixed combinations of *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix* and *Epimedii herba*, and *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix* and *Puerariae radix*, and *Theae folium*, *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, and *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*. The best four mixed combination for the growth of *B. infantis* was *Theae folium*, *Chelidonium majus* L. *Astragali radix* and *Epimedii herba*, which promoted 2.1 times than that of control, and its antioxidative capacity was also 5 times higher, and the ratio of elimination of hydroxyl radical was more than 80 % in each dilution rate. As these combinations of natural products might activate some parts of body, they could be applied to pharmaceutical applications, functional foods, antiaging tea, also expected to promote useful bacterial growth for fermentative beverage bearing multifunction.

**Key words:** antioxidative capacity, natural product, combination, growth promotion, *Bifidobacterium infantis*

#### 서 론

*Bifidobacterium infantis*는 유아의 장으로부터 분리되며, 특이적으로 대장에 거주하고, 또한 모유를 먹이는 아기의 변에 탁월하게 존재한다. 다른 *bifidobacteria*와 같이 산을 생산하여 어떤 외부의 세균이나 유해균에 의하여 생성되는 장내의 colonization을 저지하며, 소아의 설사 발병률을 줄이기도 한다. 뿐만 아니라 lactose의 내성 및 우유제품의 소화를 향상시키며, Ca<sup>2+</sup>의 흡수를 촉진하며, 독소를 생산하는 병원균의 성장을 제어하여 항암 활성을 향상시킨다. 이와 같이 생체에 도움을 주는 세균을 "Friendly bacteria"라고 하며, 기능이 다양하여 probiotics라고도 한다. 혐기적 조건을 요구하며 장에

있어 초산, 젖산 및 개미산 등을 생산하여 pH를 낮추어 우호적이지 못한 세균의 성장을 제어하며, 면역 시스템을 강화시키고, 암을 예방하며, *Candida albicans* 등의 감염과 yeast의 성장을 저해한다(1-3). 또한 변비, 설사, 가스가 차서 부풀어 오르는 것을 예방하고, 골다공증과 류마치스성 관절염을 예방하며, 피부질환을 극복하게 하고, 콜레스테롤의 낮추어 주며, 음식의 소화를 도우며 생체에 필요한 vitamin을 합성하여 영양상태를 강화시켜 주는 역할을 한다(4,5). 더불어 *Bifidobacterium* 속은 *Lactobacillus* 속과 더불어 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Clostridium perfringens* 등과 같은 병원성 미생물의 성장 시 길항효과(antagonistic effects)를 발휘하며, 프로바이오

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: pasteur@yosu.ac.kr  
Phone: 82-61-659-3305. Fax: 82-61-659-3305

텍 미생물은 항미생물 기작(anti-microbial mechanisms)을 경유하여 장내 서식하고 있는 병원성 미생물에 대한 저항성을 증진시키기도 한다(6). 따라서 장내의 유용세균인 *B. infantis*의 성장을 촉진시켜 장의 활성화를 기할 수 있는 방법을 찾는 것은 생체방어를 위하여 중요한 일이 될 수 있다.

또한 생체 내에 대량으로 존재하는 활성산소(free radical)는 아주 반응성이 높아 생체의 어떠한 구성성분으로부터 전자를 뺏어냄으로써 상대방 세포의 기능을 저하시키거나 괴사시킴으로써 조직의 기능 저하 및 질병의 과정을 밝게 되며(7-9), alcoxyl radical(RO), singlet oxygen( $^1O_2$ ), peroxy-nitrite anion(ONOO<sup>-</sup>), peroxy radical(ROO), nitric oxide(NO), semiquinone radical, hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hypochlorous acid(HOCl) 등의 free radical을 예로 들 수 있다(10-15). Fig. 1에서 볼 수 있듯이 free radical은 다양하게 발생하며, 이들에 의하여 일어날 수 있는 질병으로서는 만성기관지염, 천식 등의 기관지 질환, 위궤양 등의 소화기 질환, 국소빈혈, 동맥경화, 고혈압 등의 심장 질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머 병 등의 뇌 및 신경 질환, 빈혈 등의 혈액 질환, Fe<sup>2+</sup> 이온, Cu<sup>2+</sup> 이온의 축적에 의한 간장 질환, 신우염 등의 신장 질환, 심이지장염, 당뇨병, 백내장, 아토피성 피부염 및 여러 종류의 암, 근육질환, 장염 등 아주 다양하다(16-19). 이러한 free radical을 제거할 수 있는 항산화제는 효소적 항산화제와 비효소적 항산화제로 나눌 수 있으며(20-22), 전자의 예로서는, SOD(superoxide dismutase), glutathion, catalase 등을 들 수 있으며, 후자는 BHA(tert-butylhydroxy-anisol) 및 BHT(tert-butylhydroxytoluene) 등의 합성 항산화제와 vitamin C, vitamin E, carotenoid, flavonoid 등을 구성 성분으로 하는 천연 항산화제로 나눌 수 있으며, 생체에 존재하는 효소적 항산화제만으로는 생산되는 free radical을 모두 소거하기 어려우므로 비효소적인 항산화제를 투여하여 free radical의 소거 활성을 높일 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 자연에 존재하는 승마(*Cimicifugae rhizoma*), 음양곽(*Epimedii herba*) 등 30종류의 천연산물로부터 항산화력이 강한 제제를 선별하여(23-28) free radical을 소거함과

동시에 *Bifidobacterium infantis*의 성장을 촉진시키는 천연산물의 조합을 구성하여 free radical의 소거 기능과 더불어 생체의 필요한 부분의 활성을 향상시킬 수 있는 다기능성을 갖는 우수한 제제를 개발하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

장내 유용 균주로는 *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270를 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, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.0 g, tween 80 1.0 mL, tap water 1000.0 mL, pH 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)(24), 증맥·방약합편(證脈·方藥合編)(25), 한방처방의 구성과 적용(韓方處方的構成과適用)(26), 도해상용한방처방(圖解常用漢方處方)(23), 현대한방강좌(現代韓方講座)(27), 현대생약학(現代生藥學)(28) 등의 여러 고서에 수록된 고처방으로부터 소화기계에 많이 사용되는 처방 중에서 생체를 보호하는 기능, 해독작용, 수렴, 조혈 작용, 항균작용을 가지는 천연산물의 역할을 바탕으로 30종류를 선별하여 사용하였다.

### 천연산물의 추출 및 조합

천연산물의 시료는 각각의 천연산물 300 g에 3차 증류수 1500 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 *B. infantis*의 활성을 증가시키는 천연산물군의 탐색

*B. infantis*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 needle로 배양액 내로 질소를 불어 넣어 탈기시키고, 전배양한 균주를 0.1% 접종하여 37°C에서 혐기 배양하면서 6시간 간격으로 질소 가스가

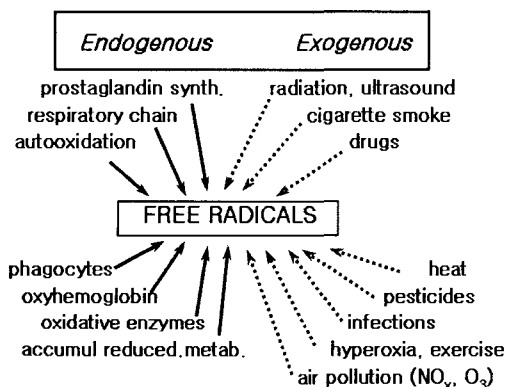


Fig. 1. Free radical sources from endogenous and exogenous causes.

충진된 glove box 내에서 시료를 채취한 후 20배 희석하여 spectrophotometer(Shimadzu, UV-2101PC)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(17)은 100 mL의 flask에 linoleic acid 1 g과 Tween40 용액을 2 mL 넣고 천연산물을 열수 추출한 시료 3 mL를 첨가하고 증류수로 최종량을 30 mL로 조정 후, 37°C의 항온조에서  $Fe^{2+}$ 를 첨가하고 D.O. meter(TPS, Model WP-82)를 사용하여 D.O.의 감소에 따른 AUC(area under curve)를 구하여 항산화력을 비교하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical 소거 활성(9,20,21)은 2-deoxyribose oxidation method, 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 phenol함량 및 방향족 측정

항산화력은 phenol성 화합물에서 강하며, 또한 방향족 화합물의 양에 의하여 결정되므로 추출물 일정량을 분광 광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도 측정하여 방향족 화합물의 함량을 측정하고, 총 phenol함량의 분석은 Folin-Denis법(29)을 개량하여 측정 후 tannic acid의 검량선으로부터 구하였다.

## 결과 및 고찰

용존산소분석법(D.O. analysis method)에 의한 천연산물의 항산화 활성

용존산소 분석법에 의하여 30종류의 천연산물을 분석한 후 AUC를 계산하여 기존의 합성 항산화제인 0.02%의 BHA 및 0.02%의 BHT 등과 비교하였을 때 승마(*Cimicifugae rhizoma*), 음양곽(*Epimedii herba*)은 항산화력이 비슷함을 보였으며, 현초(*Geranii herba*), 백작약(*Paeonia japonica*), 천문동(*Asparagi tuber*), 상백피(*Mori cortex radices*), 연자육(*Nelumbo nucifera gaertner*), 백굴채(*Chelidonium majus L.*), 황련(*Coptidis rhizoma*), 백출(*Atractylodis rhizoma alba*), 진피(*Aurantii nobilis pericarpium*), 오배자(*Galla rhois*), 두충(*Eucommiae cortex*), 황백(*Phellodendri cortex*), 계피(*Cinnamomi cortex*), 구기자(*Lycii fructus*), 녹차(*Theae folium*), 오가피(*Acanthodanacis cortex*), 사간(*Beiamcanda*

*chinensis*), 고삼(*Sophorae radix*) 및 당귀(*Angelicae gigantis radix*) 등은 0.02%의  $\beta$ -carotene보다 나은 항산화력을 나타내었다. 그리고 괴화(*Sophorae flos*), 석창포(*Acori graminei rhizoma*), 황기(*Astragali radix*) 등은  $\beta$ -carotene의 항산화력과 비슷한 효과를 나타내었으며, 오미자(*Schizandrae fructus*), 감초(*Glycyrrhizae radix*), 갈근(*Puerariae radix*), 황금(*Scutellaria baicalensis george*) 및 산사자(*Crataegi fructus*) 등은 0.02%의  $\beta$ -carotene보다 약한 항산화력을 나타내었다. 천연산물 중에서도 항산화력이 0.02%의  $\beta$ -carotene보다 강한 제제들이 많아 합성 항산화제의 대용뿐만 아니라, ROS 제거를 위한 생체투여가 가능한 물질도 많음을 알 수 있었으며, 유산균 발효유, 식품 보존제 및 항노화 제제 등의 다방면으로 사용이 가능할 것으로 판단되며 구체적인 30종류의 천연산물 AUC는 전보(30)에 수록하였다.

한 종류의 천연산물로부터 *B. infantis*의 성장 촉진

*B. infantis* 균주는 진피(陳皮), 오가피(五加皮), 산수유(山茱萸), 녹차(綠茶), 두충(杜仲), 오배자(五倍子), 현초(玄草), 백굴채(白屈菜), 황기(黃芪) 등의 천연산물에 의하여 성장이 촉진되었으며, 나머지의 천연산물은 이 균의 성장을 저해하여 천연산물로서 이 세균의 제어가 가능한 것으로 나타났으며, 대조군에 비교하여 이 균주의 성장정도를 Fig. 2에 나타내었다. *B. infantis* 균주의 성장을 촉진하는 각각의 천연산물들을 장에 대한 기능을 살펴보면 진피(陳皮)는 음식을 먹고 체한증상(導滯)을 내리며, 위암(反胃)에도 효과가 있으며, 오가피(五加皮)는 간 및 신장의 기능을 도우는(滋補肝腎) 작용을, 산수유(山茱萸)는 정액을 고이게 하고(滋精), 장과 위의 나쁜 기운을 제거(腸胃風邪)하는 역할을 하며, 녹차(綠茶)는 열을 사하고 정신을 맑게 하며(瀉熱清神), 소변이 잘 나오게(利尿)하는 작용이 있고, 두충(杜仲)은 정력과 기를 왕성(益精氣)하게 하고, 오배자(五倍子)는 해독작용을, 현초(玄草)는 이질을 치료하며, 백굴채(白屈菜)는 위암 및 궤양을 치료하고, 황기(黃芪)는 폐를 보하며(補肺), 여성의 대하 및 소변閉塞을 치료하는 것으로 알려져 있다(23-28).

Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 panel(a)의 진피는 대조군보다 2.5배 이상, panel(c)의 백굴채, 황기는 2배 이상 성장이 촉진된 것을 볼 수 있으며, 사람에게 있어 기(氣)을 이행시키고, 해독(解毒)하는 공통점을 갖고 있으며 *B. infantis*에서도 천연산물의 성분 중에서 분열을 촉진시키거나, membrane 내의 삼입 및 주변단백질의 활성화에 영향을 주거나, 항산화력에 의한 phospholipid의 산화 방지 효과 등에 의하여 membrane transport system을 촉진되는 것으로 추정된다(31,32).

두 종류의 천연산물로부터 *B. infantis*의 성장 촉진

*B. infantis* 균주는 음양곽과 녹차, 음양곽과 산사자, 음양곽과 두충 등의 천연산물의 조합에 의하여 성장이 촉진되었으며, 대조군에 비교하여 이 균주의 성장정도를 Fig. 3에 나타내었다.

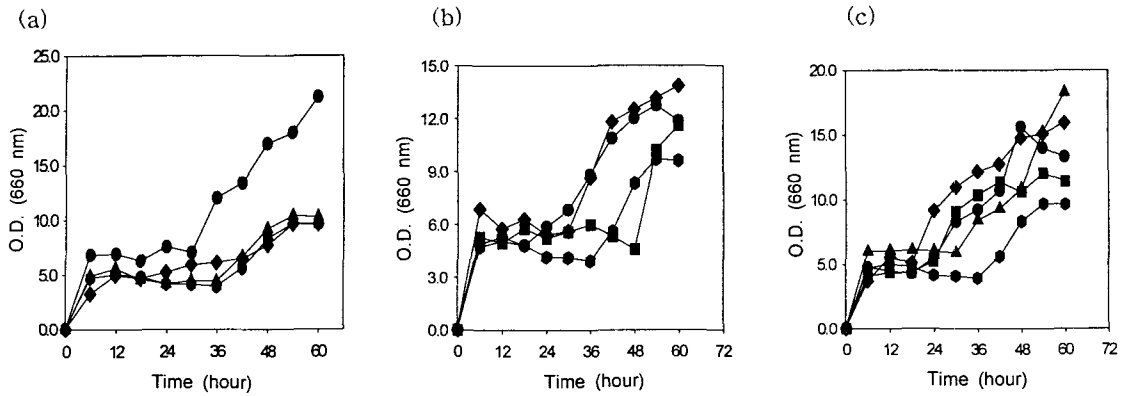


Fig. 2. The effect of each natural product for the growth of *B. infantis* designated panel (a) to (c). Panel (a): ●: *Aurantii nobilis pericarpium*, ▲: *Acanthodanacis cortex*, ◆: *Cimicifugae rhizoma*, ○: control, panel (b): ●: *Corni fructus*, ■: *Theae folium*, ◆: *Eucommiae cortex*, ○: control, panel (c): ●: *Galla rhois*, ■: *Geranii herba*, ▲: *Chelidonium majus L.*, ◆: *Astragali radix*, ○: control.

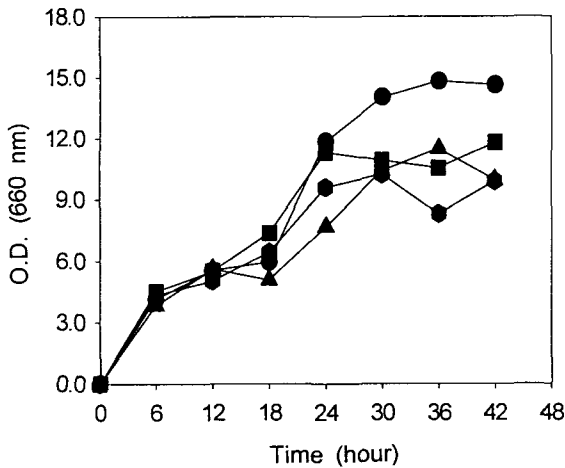


Fig. 3. The growth of *B. infantis* by addition of two mixed combinations of natural products. ●: *Epimedii herba* and *Theae folium*, ■: *Epimedii herba* and *Crataegi fructus*, ▲: *Epimedii herba* and *Eucommiae cortex*, ○: control.

*B. infantis*의 성장을 촉진시켰던 한 종류의 천연산물을 중심으로 두 종류씩 조합을 하여 성장 촉진 효과를 검토한 결과 조합되는 2번째의 천연산물에 의하여 성장 촉진 효과가 현저히 달라짐을 보였으며, 한 종류를 사용하였을 때 현저히 촉진 효과를 보였던 진피, 백굴채, 황기 등의 조합에서는 오히려 성장 저해의 효과를 나타내었고, 사탕에 있어 기를 일으키게 하는(益氣) 작용을 지닌 음양곽 중심으로 한 배합에서 대조군에 비교하여 1.5배 이상의 좋은 성장효과를 보였다. 이것은 천연산물이 비슷한 효과를 가지고 있더라도 그 배합에 따라 성질이 달라짐을 나타내며 배합의 구성에 따라 균체의 성장이 영향을 받을 것으로 사료된다.

세 종류의 천연산물로부터 *B. infantis*의 성장 촉진

*B. infantis* 균주는 녹차와 음양곽 및 백굴채, 녹차와 음양곽 및 진피, 녹차와 음양곽 및 갈근, 녹차와 음양곽 및 황기, 녹차

와 백굴채 및 진피, 녹차와 백굴채 및 황기, 녹차와 진피 및 갈근, 녹차와 진피 및 황기, 녹차와 갈근 및 황기, 음양곽과 백굴채 및 진피, 음양곽과 백굴채 및 갈근, 음양곽과 백굴채 및 황기, 음양곽과 진피 및 갈근, 음양곽과 진피 및 황기, 음양곽과 갈근 및 황기, 백굴채와 진피 및 갈근 등의 천연산물에 의하여 대조군보다 성장이 촉진되었으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

녹차와 음양곽, 녹차와 백굴채, 녹차와 진피, 음양곽과 백굴채, 음양곽과 진피 등의 공통 조합에 제 3의 천연산물이 조합된 것이 대조군보다 2배 이상의 성장 촉진 효과를 보였다. 녹차 및 음양곽이 들어 있는 조합에서 성장의 촉진 효과가 좋은 것으로 나타나 녹차가 정상 작용의 기능이 있는 것을 뒷받침할 수 있는 것으로 사료된다.

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.

네 종류의 천연산물로부터 *B. infantis*의 성장 촉진

*B. infantis* 균주는 녹차, 백굴채, 황기 및 음양곽의 조합, 녹차, 백굴채, 황기 및 진피의 조합, 녹차, 백굴채, 황기 및 갈근의 조합, 백굴채, 황기, 음양곽 및 진피의 조합, 백굴채, 황기, 음양곽 및 갈근의 조합, 황기, 음양곽, 갈근 및 진피의 조합, 녹차, 황기, 음양곽 및 갈근의 조합, 녹차, 음양곽, 진피 및 갈근의 조합, 녹차, 백굴채, 음양곽 및 진피의 조합, 녹차, 백굴채, 진피 및 갈근의 조합, 녹차, 황기, 음양곽 및 진피의 조합, 녹차, 황기, 진피 및 갈근의 조합, 백굴채, 음양곽, 진피 및 갈근 등의 천연산물의 조합에 의하여 성장이 촉진되었으며, 대조군에 비교하여 이 균주의 성장정도를 Fig. 5에 나타내었다.

녹차와 백굴채 및 황기, 백굴채와 황기 및 음양곽, 녹차와 백굴채 및 음양곽, 녹차와 음양곽 및 진피, 녹차와 황기 및 음양곽 등의 공통 조합에 제 4의 천연산물이 조합되어 대조군보다 2.1배의 성장 촉진 효과를 보였으며, 각 조합이 기능에 따라

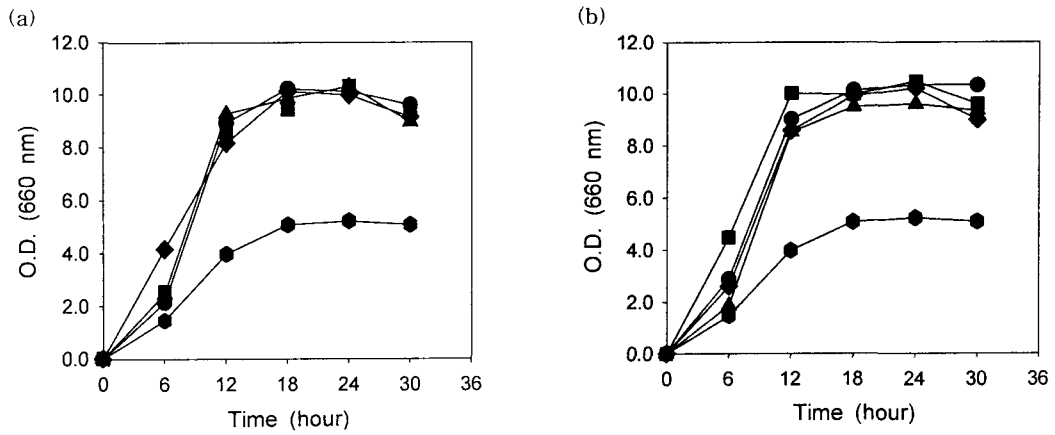


Fig. 4. The growth of *B. infantis* by addition of three mixed combinations of natural products designated panel (a) and (b). Panel (a): ●: *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Chelidonium majus* L., ■: *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ▲: *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Puerariae radix*, ◆: *Theae folium*, *Epimedii herba* and *Astragali radix*, ○: control, panel (b): ●: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L. and *Aurantii nobilis pericarpium*, ■: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L. and *Astragali radix*, ▲: *Theae folium*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ◆: *Theae folium*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Astragali radix*, ○: control.

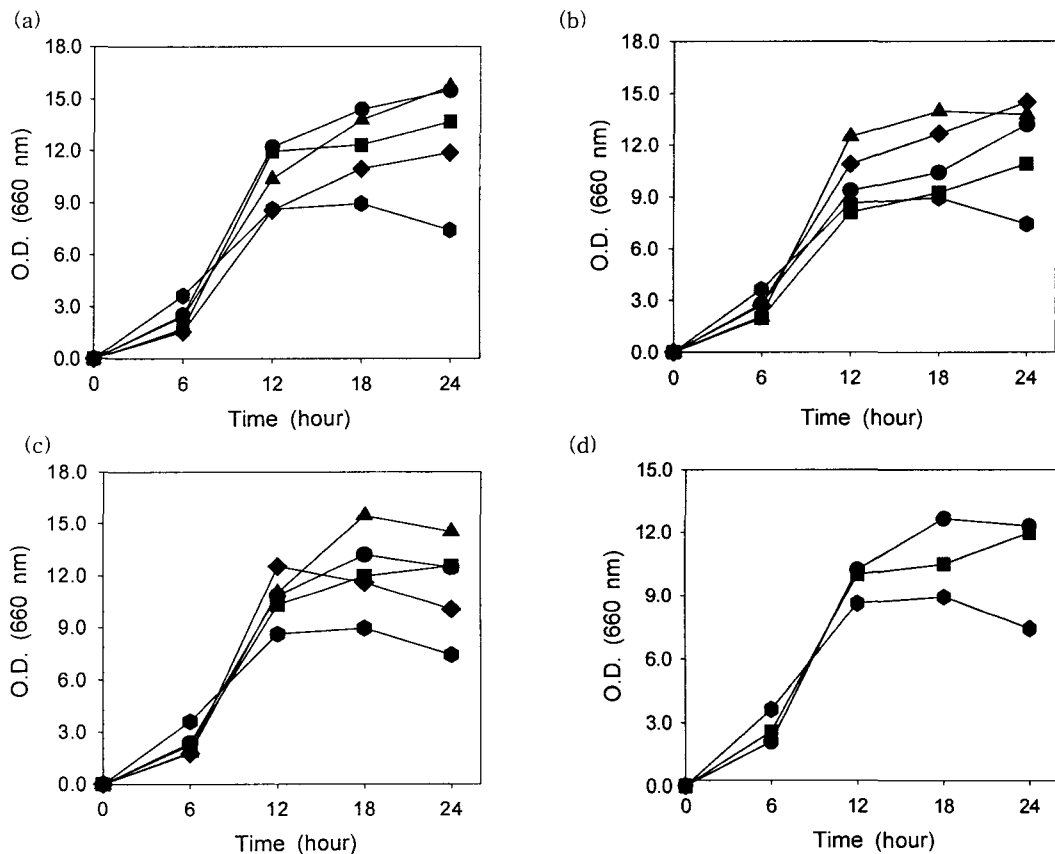


Fig. 5. The growth of *B. infantis* by addition of four mixed combinations of natural products described panel (a), (b), (c) and (d). Panel (a): ●: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix* and *Epimedii herba*, ■: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ▲: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Astragali radix* and *Puerariae radix*, ◆: *Chelidonium majus* L., *Astragali radix*, *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ○: control, panel (b): ●: *Chelidonium majus* L., *Astragali radix*, *Epimedii herba* and *Puerariae radix*, ■: *Astragali radix*, *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ▲: *Theae folium*, *Astragali radix*, *Epimedii herba* and *Puerariae radix*, ◆: *Theae folium*, *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ○: control, panel (c): ●: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ■: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Epimedii herba* and *Puerariae radix*, ▲: *Theae folium*, *Chelidonium majus* L., *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ◆: *Theae folium*, *Astragali radix*, *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ○: control, panel (d): ●: *Theae folium*, *Astragali radix*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ■: *Chelidonium majus* L., *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, ○: control.

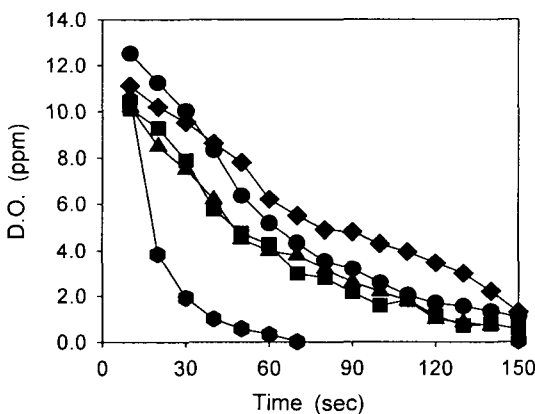
성장을 촉진하는 효과도 다르게 나타나 이를 응용하고자 함에 따라 그 범위 및 천연산물의 종류는 달라질 수 있을 것으로 판단되며 조합의 구성에 따라 *B. infantis*의 성장을 촉진하는 조합뿐만 아니라 필요에 따라서 제어할 수 있는 방법의 개발도 가능하리라 사료된다.

***B. infantis*의 성장 촉진 효과를 갖는 4종류 조합의 항산화력**

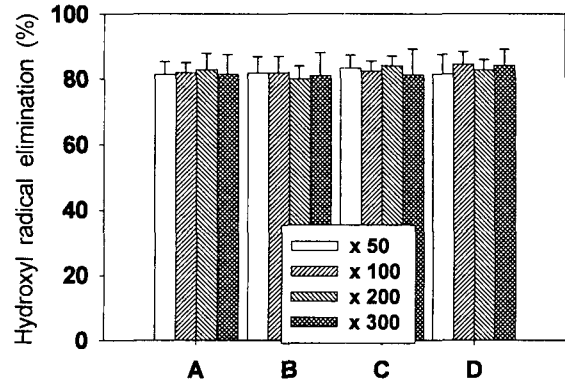
*B. infantis*의 성장을 현저하게 촉진시킨 4종류의 천연산물의 조합으로 이루어진 4종류의 조합의 항산화력을 용존 산소 분석법에 의하여 분석한 결과 녹차, 백굴채, 황기 및 음양곽 조합의 AUC가 632.49로써 가장 높았으며 이 때의 성장촉진 효과는 2.1배로 나타났다. 다음으로 녹차, 음양곽, 진피 및 갈근의 조합(623.64), 녹차, 백굴채, 진피 및 갈근의 조합(601.81), 녹차, 백굴채, 황기 및 갈근의 조합(560.49) 순서로 나타났다 (Fig. 6). 이들의 항산화력은 대조군의 AUC 116.61보다 5배 정도 강한 것으로 나타났으며, *B. bifidum*는 항산화력이 강한 조합일수록 성장의 효과가 좋은 것으로 나타나, free radical의 소거와 동시에 장의 기능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

**Hydroxyl radical 소거 활성**

*B. bifidum*의 성장을 촉진하는 4 종류의 조합에 대하여 hydroxyl radical의 소거활성을 50, 100, 200 및 300배로 희석하여 검토하였으며(Fig. 7), 녹차, 백굴채, 진피 및 갈근의 조합을 100배 희석한 추출물의 소거율이 84.36%로 가장 높은 소거율을 보였으며, 녹차, 음양곽, 진피 및 갈근의 조합, 녹차, 백굴채, 진피 및 갈근의 조합, 녹차, 백굴채, 황기 및 갈근의 조합 등의 4종류의 조합 모두 높은 희석율에도 80% 이상의 높은



**Fig. 6. Comparison of antioxidative capacity with AUC of four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *B. infantis*.**  
 ●: combination of *Theae folium*, *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix* (623.64), ■: *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Astragali radix* and *Puerariae radix* (560.49), ▲: *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix* (601.81), ◆: *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Astragali radix* and *Epimedii herba* (632.49), ○: control (116.61). Numerics in brackets are designated as AUC of the each combination.



**Fig. 7. The ratio of OH· radical elimination by four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *B. infantis*.**  
 A: combination of *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Astragali radix* and *Epimedii herba*, B: *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Astragali radix* and *Puerariae radix*, C: *Theae folium*, *Epimedii herba*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*, D: *Theae folium*, *Chelidonium majus L.*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Puerariae radix*. All values are mean±SE (n=3).

소거율을 보여 *B. bifidum*의 성장을 촉진할 뿐만 아니라 free radical 소거활성이 좋은 것으로 나타나 희석률이 높은 음료 제제로서의 사용 가능성을 보였다.

**총 phenol 함량 및 방향족의 측정**

*B. bifidum*의 성장을 촉진하는 4종류의 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol 함량을 Table 1에 나타내었으며, Yeo 등(33)의 논문에서 본보와 같은 방법으로 측정된 증제차, 볶음차, 오롱차 및 홍차의 수용성 추출물의 총 phenol량은 각각 1.71, 1.54, 0.96 및 0.89 µg/100 g으로 보고하였으며, 본

**Table 1. Amounts of aromatic compounds and total phenols of four mixed combinations of natural products used for culturing *B. infantis***

Combination	Absorbance at 280 nm	Amounts of total phenols (µg/100 g)
<i>Theae folium</i> , <i>Chelidonium majus L.</i> , <i>Astragali radix</i> and <i>Epimedii herba</i>	1.81	52.10
<i>Theae folium</i> , <i>Chelidonium majus L.</i> , <i>Astragali radix</i> and <i>Puerariae radix</i>	1.79	49.03
<i>Theae folium</i> , <i>Epimedii herba</i> , <i>Aurantii nobilis pericarpium</i> and <i>Puerariae radix</i>	1.81	51.10
<i>Theae folium</i> , <i>Chelidonium majus L.</i> , <i>Aurantii nobilis pericarpium</i> and <i>Puerariae radix</i>	1.80	50.07

실험에 사용한 4종류의 조합은 녹차 중의 증제차나 볶음차의 비발효차보다 28~30배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반발효차인 오롱차보다는 32~33배, 발효차인 홍차보다는 55~58배 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 4종류의 조합을 구성하는 천연산물의 성분내에는 녹차보다 다양한 종류의 phenols, phenolic acid 및 polyphenol 등을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

## 요 약

유용세균인 *B. infantis*은 선택되어진 천연산물의 한 종류 단독으로서도 촉진되었으며, 또한 두 종류, 세 종류, 네 종류의 배합에 의하여 특징적으로 성장이 촉진되었으며, 이것은 항산화력이 강한 천연산물들을 free radical의 제거와 동시에 *B. infantis*의 성장촉진물질로 사용할 수 있고 이를 이용하여 기능성 항산화 제제의 제조가 가능함을 의미하며 이들 천연산물의 배합 중에서 한 종류의 천연산물로서는 진피, 두충, 산수유 그리고 황기 등이 좋은 효과를 보였고, 두 종류 천연산물의 배합에서는 음양곽과 녹차, 음양곽과 산사자, 음양곽과 두충 등의 조합이, 세 종류의 천연산물 배합에서는 녹차와 음양곽 및 백굴채, 녹차와 음양곽 및 진피, 녹차와 백굴채 및 황기, 녹차와 진피 및 갈근 등의 조합이, 4종류 천연산물 배합에서는 녹차, 황기 및 음양곽 그리고 갈근의 조합, 녹차, 황기 및 진피 그리고 갈근의 조합, 녹차, 백굴채 및 황기 그리고 음양곽 등의 조합에서 *B. infantis*가 잘 성장함을 보였고, 녹차, 백굴채 및 황기 그리고 음양곽의 조합이 대조군보다 2.1배 이상의 성장률을 보였다. 4종류의 조합의 항산화력을 용존산소 분석법에 의하여 분석한 결과 녹차, 백굴채 및 황기 그리고 음양곽의 조합이 632.49로써 가장 높았고, 다음으로 녹차, 음양곽 및 진피 그리고 갈근의 조합(623.64), 녹차, 백굴채 및 진피 그리고 갈근의 조합(601.81), 녹차, 백굴채 및 황기 그리고 갈근의 조합(560.49) 순서로 나타났으며, 항산화력이 강한 조합에서 성장이 촉진되는 것으로 나타났다. *B. infantis*의 성장을 촉진하는 4종류의 조합에 대한 hydroxyl radical의 소거활성은 50, 100, 200 및 300 배로 희석하여 검토했을 때 녹차, 백굴채 및 진피 그리고 갈근의 조합을 100배로 희석한 소거율이 84.36%로 가장 높은 소거율을 보였으며, 4종류의 조합 모두 높은 희석율에도 80% 이상의 높은 소거율을 보여 높은 희석률을 필요로 하는 음료 제제로서의 탁월함을 보였다. 또한, 4종류의 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol 함량은 녹차 중의 증제차나 볶음차의 비발효 차보다 28~30배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오롱차보다는 32~33배, 발효차인 홍차보다는 55~58배 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 항산화력이 강한 천연산물들을 이용하여 free radical의 제거와 동시에 *B. infantis*의 성장촉진물질로 사용할 수 있으며, 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 기능성 제제로의 응용 가능성을 보였다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

- Gusils C, Chaia AP, Gonzalez S, Oliver G. 1999. *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. *J Food Prot* 62: 252-256.
- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr* 39: 13-126.
- Nemcova R. 1997. Criteria for selection of *lactobacilli* for probiotic use. *Vet Med (Praha)* 42: 19-27.
- Kazue U. 1982. Procedures for isolation and identification of anaerobic bacteria, nanesyutpan, Japan, p 2-103.
- Noda H, Akasaka N, Ohsugi M. 1994. Biotin production by *bifidobacteria*. *Nutr Sci Vitaminol* 40: 181-188.
- Saavedra JM. 1999. Probiotics plus antibiotics. *The Journal of Pediatrics* 135: 535-537.
- Lunec J. 1995. Oxygen radical activity-detection and measurement in vivo. In *Encyclopedia of analytical science*. Townshend A. ed. Academic Press, New York, U.S. Vol 6, p 3679-3688.
- Nakada C. 1997. *Talk for Free Radical*. Koudansya, Tokyo, Japan. p 56-102.
- Yosikawa M, Kawano W, Yano I. 2000. *All of reactive oxygen and free radical*. Marusen LTD, Tokyo, Japan. p 8-75.
- Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, Yu BP. 2000. The inflammatory process in aging. *Clinical Gerontology* 10: 202-222.
- Harman D. 1978. Free radical theory of aging-nutritional implications. *Age* 1: 143-150.
- Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. 2000. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 683-692.
- Kwon HJ, Kang MJ, Kim HJ, Choi JS, Paik KJ, Chung HY. 2000. Inhibition of NF- $\kappa$ B by methyl chlorogenate from *Eriobotrya japonica*. *Mol Cell* 10: 241-246.
- Yu BP. 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*. Noubunkyo, Tokyo, Japan. p 13-52.
- Li HC, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M, Sonoda S. 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.
- Ota S. 1987. *Food and Antioxidant*. Syokuhinzairyokenkyukai, Japan. p 1-38.
- Peter TP. 1998. The skin's antioxidant systems. *Dermatology Nursing* 10: 401-406.
- Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. 1994. Red wine, tea, and antioxidants. *The Lancet* 344: 626-629.
- Kawagan S. 1996. *Protocol for control of body functional material in food*. Kakuen press center, Tokyo, Japan. p 8-15.
- Kogukuchi N. 1999. *Protocol for free radical experiments*. Suiyoonsa, Tokyo, Japan. p 40-45.
- Torizaki K. 1995. *Protocol for lipid peroxide and free radical*. Kakuen press center, Tokyo, Japan. p 145-147.

23. Gan KK. 1982. *Zugai ZouyouKanbouSyohou*. Yakukyosihosya, Tokyo, Japan. p 15-190.
24. Huh J. 1999. *Dongeuibogam*. Bobinmunwhasa, Seoul. p 21-164.
25. Kawhudo Y. 1989. *Proof of Pulse-Bangyakhappyeon*. Nam-sandang, Seoul. p 15-70.
26. Mori YZ. 1986. *KanbouSyohounoKouseitoTekiyoun*. Hakubustusyokan, Tokyo, Japan. p 20-140.
27. Yeom TH, Park SS. 1975. *Lecture of modern Hanbang*. Haeng-limseowon. p 101-300.
28. Yuk CS, Yang HS. 1999. *Hyundai Saengyakhak*. Hakchang-sa, Seoul. p 133-581.
29. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p 703.
30. Kim JD, Kim MY, Seo HJ, Kim BJ, Kim DH, Kim EO, Chung HY, Kong JY. 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.
31. Yuan C, Johnston LJ. 2000. Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoyl-phosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys J* 79: 2768-2781.
32. Yuan C, Johnston LJ. 2001. Atomic force microscopy studies of ganglioside GM1 domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys J* 81: 1059-1069.
33. Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH. 1995. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 154-159.

(2002년 7월 3일 접수; 2002년 9월 3일 채택)