Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 30, No. 4, 388-394 (2002)

항산화 천연산물의 조합구성에 의한 *Bifidobacterium bifidum*의 성장 촉진 효과

김종덕* · 신태선[1]
여수대학교 생명 · 화학공학부, [1]식품영양학과

The Growth Promoting Effect of *Bifidobacterium bifidum* by Combination of Natural Products Bearing Antioxidative Capacity. Kim, Jong-Deog* and Tai-Sun Shin[1]. *Department of Biotechnology, [1]Department of Food Science and Nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea* – The growth of *B. bifidum* was promoted by natural products bearing antioxidative capacity and mixed combined two, three and four kinds of them. *B. bifidum* was expressed a good growth by *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Corni fructus*, *Beiamcanda chinensis*, alone, and two mixed combinations were composed of *Nelumbo nuclfera* gaertner and *Corni fructus*, *Nelumbo nuclfera gaertner* and *Beiamcanda chinensis*, *Nelumbo nuclfera gaertner* and *Theae folium*, three mixed combinations were oraganized with *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Corni fructus* and *Theae folium*, *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Corni fructus* and *Beiamcanda chinensis*, *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Theae folium* and *Beiamcanda chinensis*, and four mixed combinations were formed with *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Theae folium*, *Beiamcanda chinensis* and *Corni fructus*, *Theae folium*, *Beiamcanda chinensis*, *Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix*, *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Corni fructus*, *Theae folium* and *Glycyrrhizae radix*, and *Nelumbo nuclfera gaertner*, *Corni fructus*, *Beiamcanda chinensis* and *Glycyrrhizae radix*. These four mixed combinations promoted cell growth by 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 could activate some parts of body, they might be applied to pharmaceuitcal applications, functional foods, also expected to multifunctional fermentative beverages.

Key words: Antioxidative capacity, natural product, combination, growth promotion, *B. bifidum*.

*Bifidobacterium*속의 세균은 *Lactobacillus*속[1]과 더불어 *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Yersinia enterocolitica* 및 *Clostridium perfringens* 등과 같은 병원성 미생물의 성장시 길항효과를 발휘하고, 항미생물 기작(antimicrobial mechnisms)을 통하여 장내 서식하고 있는 병원성 미생물에 대한 저항성을 증진시켜 설사성 질환, 결장암 및 고콜레스테롤 혈증(hypercholesterolaemia) 등을 예방할 수 있다고 알려져 있다[5,17 19]. 특히, *B. bifidum*은 vitamin B group 및 vitamin K를 합성하는 중요한 역할을 하고 있으며, 이 균이 부족하면 단백질의 분해 등에 의한 암모니아의 농도가 상승하여 장을 자극하기도 하며. 혈중으로 이행된 높은 암모니아 농도는 식욕을 감소시키고, 메스꺼우며 토하는 원인이 되기도 한다. 이 균은 비이상적인 세균의 성장을 억제하고, 여드름과 같은 피부염을 치료하며 어른이나 어린이의 간의 경변증이나 간염에도 치료 기능이 있다. 뿐만 아니라 초산 및 젖산을 생산하여 장내의 pH를 저하시켜 그람 음성 균의 성장을 억제하고 장의 이상 발효를 막고, 2% 정도의 담즙산에서 생존할 정도의 내산성이 있으며, 장내에서 병원균의 집락을 저해하며, 영양분을 경쟁적으로 소모하여 장내의 저항성을 향상시키기도 한다. 그리고, *B. bifidium* 균주는 lactulose를 이용하여 장내 세균군을 재활성화 시키며 혈청내의 암모니아 및 free phenol을 감소시켜 간경변을 치료하는 해독 기능도 가지고 있다[20, 23]. 따라서 *B. bifidium*의 성장을 촉진시켜 장의 활성화를 기할 수 있는 방법을 찾는 것은 생체 방어를 위하여 중요한 일이 될 수 있다.

또한 생체 내에는 alcoxyl radical(RO), singlet oxygen ($^1O_2$), peroxynitrite anion($ONOO^-$), peroxyl radical(ROO), nitric oxide(NO), semiquinone radical, hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion(O_2^-), hypochlorous acid(HOCl) 등의 free radical[3,6,8,13,29,33]이 대량으로 존재하며 아주 반응성이 높아 생체의 어떠한 구성성분으로부터 전자를 뺏어옴으로써 상대방의 세포는 산화되어 기능이 저하되거나 괴사되어[15,18,28], 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, Fe^{2+} 이온, Cu^{2+} 이온의 축적에 의한 간장 질환, 신우염 등의 신장질환, 십이지장염, 당뇨병, 백뇌

*Corresponding author
Tel: 82-061-659-3305, Fax: 82-061-659-3305
E-mail: pasteur@yosu.ac.kr

가, 아트로피성 피부염, 여러 가지의 암, 근육질환 및 장염 등의 원인이 되고 있다[14,21,22,24]. 이러한 free radical을 제거할 수 있는 항산화제는 SOD(superoxide dismutase), glutathione, catalase 등의 효소적 항산화제와 BHA(tert-butylhydroxyanisol) 및 BHT(tert-butylhydroxytoluene)등의 비효소적 합성항산화제, 그리고 vitamin C, vitamin E, carotenoid 및 flavonoid 등의 천연항산화제로 나눌 수 있으며[8, 12, 25], 생체에 존재하는 효소적 항산화제만으로는 생성되는 free radical을 효율적으로 소거하기 어려우므로 비효소적인 항산화제를 투여하여 free radical의 소거 활성을 높일 필요가 있다. 본 연구에서는 합성 항산화제의 활성과 비슷한 효과를 지닌 항산화제를 천연산물로부터 탐색[4, 7, 9, 16, 27, 32]하여 항산화력으로써 free radical을 소거함과 동시에 생체의 필요한 부분의 활성을 향상시킬 수 있는 다기능성을 갖는 신소재의 개발을 위하여 장내에 존재하는 *Bifidobacterium* 속의 세균의 성장을 촉진시킴으로써 장내의 프로바이오틱 효과를 증진시키고[23], 항산화력을 가지는 천연산물의 장에 대한 약리적 효과를 응용함으로써 장의 기능을 활성화 시킬 수 있는 천연산물의 조합을 구성하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

균주는 *Bifidobacterium bifidum* KTCC 3202를 KTCC로부터 분양 받아 사용하였으며, 균주의 성장에 필요한 배지로서는 *Bifidobacterium* 배지(csein peptone 10.0 g, meat extract 5.0 g, yeast extract 5.0 g, glucose 10.0 g, K_2HPO_4 2.0 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)[7], 증맥·방약합편(證脈·方藥合編)[9], 한방처방의 구성과 적용(韓方處方의 構成과 適用)[16], 도해상용한방처방(圖解 常用漢方處方)[4], 현대한방강좌(現代韓方講座)[27], 현대생약학(現代生藥學)[32] 등의 여러 고서에 수록된 고처방으로 부터 소화기계에 많이 사용되는 처방 중에서 생체를 보하는 기능, 해독작용, 수렴, 조혈 작용, 항균작용을 가지는 천연산물의 역할을 바탕으로 30 종류를 선택하여 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. 한 종류의 천연산물을 사용할 때는 각 천연산물 추출액을 사용하였고, 두 종류의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1로 조합한 혼합액을, 세 종류의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1:1로 조합한 혼합액을, 네 종류의 천연산물의 조합은 각각의 천연산물을 1:1:1:1로 조합한 혼합액을 실험의 시료로 하고 필요한 량에 따라 사용하였다.

장내 유용세균 *B. bifidum*의 활성을 증가시키는 천연산물군의 탐색

*B. bifidum*의 배양은 250 mL 삼각 플라스크에 한 종류, 두 종류, 세 종류 및 네 종류의 천연산물 조합의 시료 3 mL와 *Bifidobacterium* 배지를 97 mL 첨가하여 전체량을 100 mL로 하여 멸균한 후 질소 가스로 충진된 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 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

용존산소분석법[19]에 의한 항산화력의 측정은 100 mL의 flask에 linoleic acid 1 g과 tween 40 용액을 2 mL 넣고 천연산물을 열수 추출한 시료 3 mL를 첨가한 후 증류수로써 최종 량을 30 mL로 조정하여 37°C로 항온시키며 Fe^{2+} ion을 첨가하고 D.O. meter(TPS, Model WP-82, Australia)를 사용하여 시간에 따른 D.O.의 감소를 측정하고 이로 부터 AUC(Area Under Curve)를 구한 후 항산화력을 비교하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical은 생체의 대사과정에서 생산되는 지질의 과산화물이나 H_2O_2가 Fe^{2+}나 Cu^{2+} ion의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거 활성[8, 12, 28]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 방향족의 측정

항산화력은 phenol성 화합물에서 강하며, 또한 방향족 화합물의 량에 의하여 결정되므로 추출물 일정량을 분광 광도

계를 이용하여 280 nm에서 흡광도 측정하여 방향족 화합물의 함량을 측정하고, 총 phenol함량의 분석은 Folin-Denis법[2]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, 총 phenol함량은 tannic acid의 검량선으로 부터 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) 등은 높은 항산화력을 보여 합성 항산화제를 대용 할 수 있을 것으로 사료되었으며, 상백피(*Mori cortex radicis*: 723.28), 연자육(*Nelumbo nuclfera gaertner*: 695.86) 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 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 전보에 수록하였다[11].

천연산물들의 *B. bifidum*의 성장 촉진

*B. bifidum*는 연자육(蓮子肉), 산수유(山茱萸) 및 사간(射干) 등에 의하여 성장이 촉진되었으며, 대조군에 비교하여 이 균주의 성장정도를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군보다 1.5배 이상 성장이 촉진된 것을 볼 수 있으며, 이는 천연산물의 성분 중

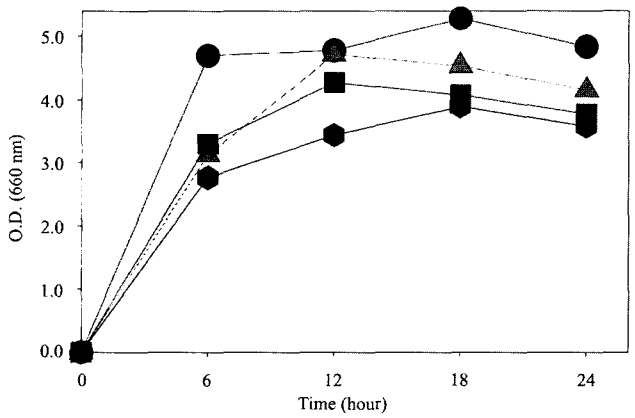

Fig. 1. The effect of each natural product for the growth of *B. bifidum*. ●: *Nelumbo nuclfera gaertner*, ■ : *Corni fructus*, ▲ : *Beiamcanda chinensis*, ⬢: control.

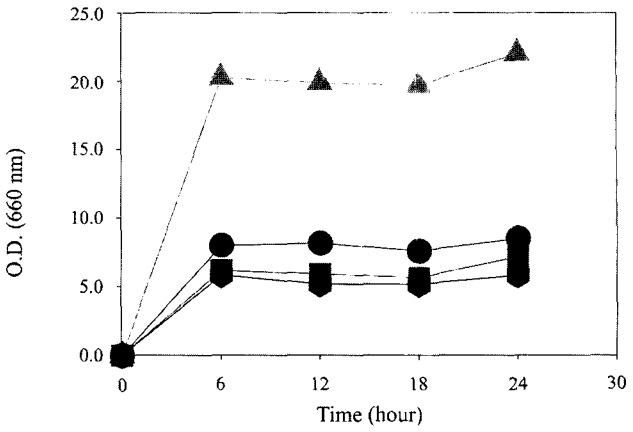

Fig. 2. The growth of *B. bifidum* by addition of two combinations of natural products. ●: *Nelumbo nuclfera gaertner* and *Corni fructus*, ■ : *Nelumbo nuclfera gaertner* and *Beiamcanda chinensis*, ▲ : *Nelumbo nuclfera gaertner* and *Theae folium*, ⬢: control.

에서 분열을 촉진시키거나, membrane 내의 삽입 및 주변단백질의 활성화에 영향을 주거나, 항산화력에 의한 phospholipid의 산화 방지 효과 등에 의하여 membrane transport system을 촉진시키는 것으로 추정된다[31,32].

두 종류의 천연산물로부터 *B. bifidum*의 성장 촉진

*B. bifidum*는 연자육과 산수유, 연자육과 사간 그리고 연자육과 녹차 등에 의하여 대조군에 비교하여 3.5배 성장이 촉진되었으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

*B. bifidum*의 성장을 촉진시켰던 한 종류의 천연산물을 중심으로 두 종류씩 조합을 하여 성장 촉진 효과를 검토한 결과 조합되는 두 번째의 천연산물에 의하여 성장 촉진 효과가 달라짐을 보였으며, 한 종류를 사용하였을 때 현저히 촉진효과를 보였던 연자육, 산수유 및 사간 등의 조합에서는 오히려 성장 저해의 효과를 나타내는 조합도 있었으며, 연자육과 녹차의 배합에서 좋은 성장효과를 보였다. 이것은 주된 역할을 하는 군약(君藥)이 천연산물의 배합에 따라 성질이 달라짐을 나타내며 배합의 조성에 따라 균체의 성장 촉진 및 제어가 가능할 것으로 판단된다.

세 종류의 천연산물로부터 *B. bifidum*의 성장 촉진

*B. bifidum*은 연자육과 산수유 및 녹차, 연자육과 산수유 및 사간, 연자육과 녹차 및 사간, 산수유와 녹차 및 사간 등의 세 종류의 천연산물 배합에 의하여 성장이 촉진되었으며, 이 균주의 성장정도를 Fig. 3에 나타내었다.

삽정(澁情)의 효과를 공통적으로 가지는 연자육과 산수유에 녹차가 조합된 것, 녹차 및 사간에 연자육이 조합된 것 모두 대조군보다 1.8배 이상의 성장 촉진 효과가 나타나 공통조합에 제3의 천연산물의 조합에 따라 성장 촉진 효과도 달라지는 것을 볼 수 있으며, 천연산물의 조합에 따라 다양

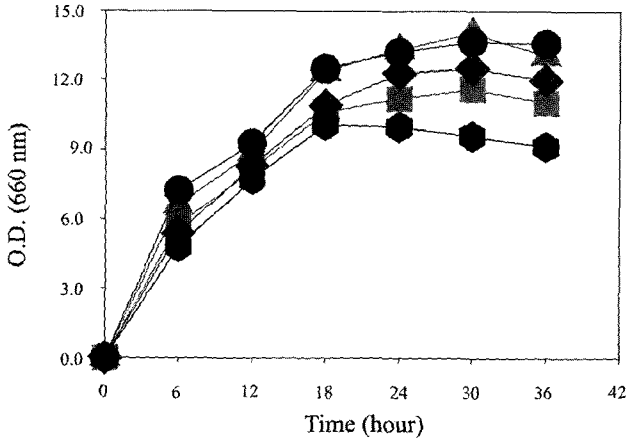

Fig. 3. The growth of *B. bifidum* by addition of three mixed combinations of natural products. ●: *Nelumbo nuclfera gaertner, Corni fructus* and *Theae folium*, ■: *Nelumbo nuclfera gaertner, Corni fructus* and *Beiamcanda chinensis*, ▲: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium* and *Beiamcanda chinensis*, ◆: *Corni fructus, Theae folium* and *Beiamcanda chinensis*, ⬢: control.

하게 응용 될 수 있을 것으로 사료된다.

네 종류의 천연산물로부터 *B. bifidum*의 성장 촉진

*B. bifidum*은 연자육, 녹차와 사간 및 산수유의 조합, 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합, 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합, 연자육, 산수유와 녹차 및 감초의 조합, 연자육, 산수유와 사간 및 감초의 조합 등의 네 종류의 천연산물 조합에 의하여 성장이 촉진되었으며, 대조군에 비교하여 2.6배 이상의 성장이 촉진 되었으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

연자육과 녹차 및 산수유의 공통조합에 제4의 천연산물, 사간 및 감초를 조합한 것과 사간과 산수유 및 감초의 공통조합에 제4의 천연산물 녹차 및 연자육을 조합한 것, 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합 모두 대조군에 비교하여 2.6배 이상의 성장 촉진 효과를 보였다. 연자육 및 산수유가 *B. bifidum*의 성장 촉진에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며, 각 조합이 기능에 따라 성장을 촉진하는 효과도 다르게 나타나 이를 응용하고자 함에 따라 그 범위 및 천연산물의 종류는 달라 질 수 있을 것으로 사료된다.

*B. bifidum*의 성장 촉진 효과를 갖는 4 종류조합의 항산화력

*B. bifidum*의 성장을 현저하게 촉진시킨 4차 배합 조성물의 항산화력을 용존산소 분석법(D.O. analysis method)에 의하여 시험한 결과 연자육, 녹차와 사간 및 산수유의 조합이 694.43로써 가장 높게 나타났고(Fig. 5), 이 때의 *B. bifidum*의 성장 촉진 효과는 2.6배 였다. 다음으로는 연자육, 산수유와 녹차 및 감초의 조합(672.14), 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합(633.03), 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합

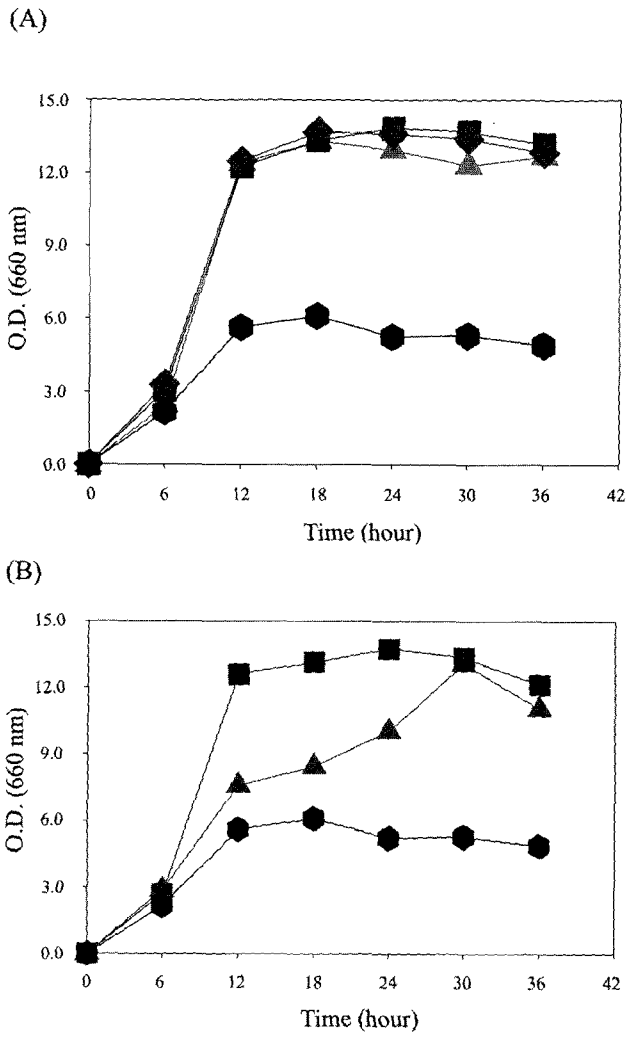

Fig. 4. The growth of *B. bifidum* by addition of four mixed combinations of natural products designated panel (a) and (b). Panel (a); ◆: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Corni fructus*, ▲: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Glycyrrhizae radix*, ■: *Theae folium, Beiamcanda chinensis, Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix*, ⬢: control, panel (b); ▲: *Nelumbo nuclfera gaertner, Beiamcanda chinensis, Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix*, ■: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix*, ⬢: control.

(560.87)의 순으로 나타났으며, 이들의 항산화력은 대조군의 AUC 116.61보다 5~6배 정도 강한 것으로 나타났으며, 항산화력이 강한 조합에서 성장이 촉진된 것으로 나타났다.

Hydroxyl radical 소거 활성

*B. bifidum*의 성장을 촉진 시키는 천연산물의 hydroxyl radical의 소거활성은 각 조합을 50, 100, 200 및 300배로 희석하여 실험하였으며(Fig. 6), 항산화 활성이 강하게 나타난 연자육, 산수유와 녹차 및 감초의 조합에서 84%의 소거활성을 보였으며, 당귀, 음양곽과 백작약 및 녹차의 조합이

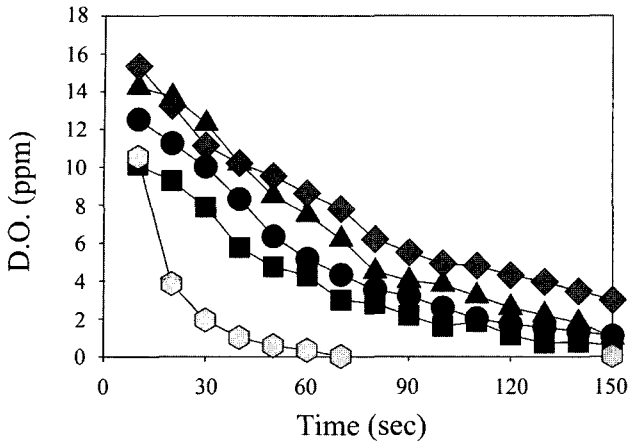

Fig. 5. Comparison of antioxidative capacity with AUC of four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *B. bifidum*. ●: combination of *Theae folium, Beiamcanda chinensis, Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix* (633.03), ■: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Glycyrrhizae radix* (560.87), ▲ : *Nelumbo nuclfera gaertner, Corni fructus, Theae folium* and *Glycyrrhizae radix* (672.14), ◆ : *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Corni fructus* (694.43), ⬢ : control (116.61). Numerics in brackets are designated as AUC of the each combination.

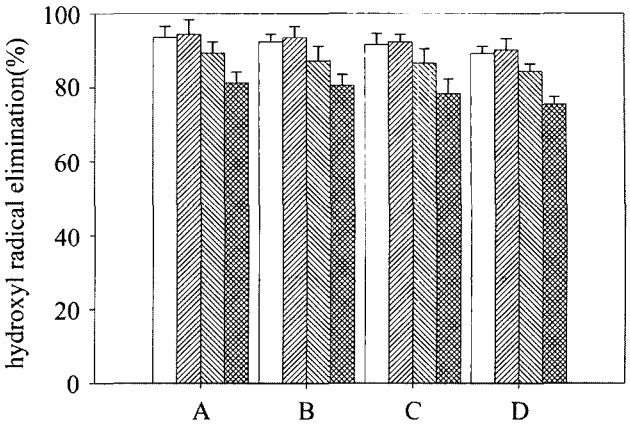

Fig. 6. The ratio of OH radical elimnation by four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *B. bifidum*. ▭: 1/50, ▨: 1/100, ▨: 1/200, ▩: 1/300. A: combination of *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Corni fructus*, B: *Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis* and *Glycyrrhizae radix*, C: *Theae folium, Beiamcanda chinensis, Corni fructus* and *Glycyrrhizae radix*, D: *Nelumbo nuclfera gaertner, Corni fructus, Theae folium* and *Glycyrrhizae radix*. All values are mean ± SE (n=3).

100배의 희석액에서 87.99%의 소거 활성을 보였고, 연자육, 녹차와 사간 및 산수유의 조합, 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합, 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합에서도 희석배수에 무관하게 모두 80% 이상의 hydroxyl radical의 소거 활성을 보여 이상의 4종류 조합은 *B. bifidum*의 성장 촉진 및 free radical의 소거 활성이 좋은 것으로 나타났다.

총 phenol함량 및 방향족의 측정

*B. bifidum*의 성장을 촉진 시키는 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol 함량을 Table 1에 나타내으며, 여 등[26]의 논문에서 본보와 같은 방법으로 측정한 증제차, 볶음차, 오룡차 및 홍차의 수용성 추출물의 총 phenol 량은 각각 1.71, 1.54, 0.96, 0.89 μg/100 g으로 보고하였으며, 본 실험에 사용한 4종류의 조합은 녹차중의 증제차나 볶음차의 비발효 차 보다 30~32배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오룡차보다는 32~35배, 발효차인 홍차보다는 55~60정도 높은 것으로나타났다. 이것은 4 종류의 조합을 구성하는 천연산물의 성분 내에는 녹차보다 다양한 종류의 phenols, phenolic acid 및 polyphenol 등을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

요 약

*B. bifidum*의 성장은 천연산물의 한 종류 단독으로서도 촉진되었으며, 또한 두 종류, 세 종류, 네 종류의 조합에 의하여 특징적으로 성장이 촉진되었으며, 이것은 항산화력이 강한 천연산물들을 free radical의 제거와 동시에 *B. bifidum*의 성장 촉진 물질로 사용할 수 있고 이를 이용하여 기능성 항산화 제제의 제조가 가능하리라 사료된다. 이 균주는 연자육 산수유 및 사간 등의 한 종류의 천연산물에 의하여 성장이 촉진되었으며, 두 종류 천연산물의 조합인 연자육과 녹차, 연자육과 산수유 등의 조합, 세 종류의 천연산물 조합인 연자육과 산수유 및 녹차, 연자육과 녹차 및 사간 등의 조합, 네 종류의 천연산물 조합인 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합, 연자육, 산수유와 녹차 및 감초 등의 조합에서 잘 성장함을 보였으며, 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합이 대조군보다 2.6배 이상의 성장을 보였다. *B. bifidum*의 성장을

Table 1. Amounts of aromatic compounds and total phenols of four mixed combination of natural products.

Combination	Absorbance (280 nm)	Amounts of total phenols (μg/100 g)
Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis and *Corni fructus*	1.90	54.53
Nelumbo nuclfera gaertner, Theae folium, Beiamcanda chinensis and *Glycyrrhizae radix*	1.80	49.67
Theae folium, Beiamcanda chinensis, Corni fructus and *glycyrrhizae radix*	1.82	52.13
Nelumbo nuclfera gaertner, Corni fructus, Theae folium and *Glycyrrhizae radix*	1.89	53.83

촉진시킨 4차 배합 조성물의 항산화력은 연자육, 녹차와 사간 및 산수유 조합의 AUC가 694.43로써 대조군의 AUC (116.61)보다 6배이상 높게 나타났으며, 이 조합의 세균성장은 대조군보다 2.6배의 성장 촉진 효과를 보였다. 다음으로는 연자육, 산수유와 녹차 및 감초의 조합(672.14), 녹차, 사간과 산수유 및 감초(633.03)의 조합, 그리고 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합(560.87)의 순으로 나타났으며, 이들의 항산화력은 대조군의 AUC 116.61보다 5~6배 정도 강한 것으로 나타났고, 항산화력이 강한 조합에서 좋은 세균의 성장 촉진을 보였다. 네 종류의 4차 조합된 천연산물의 hydroxyl radical의 소거활성은 항산화 활성이 강하게 나타난 연자육, 산수유와 녹차 및 감초의 조합에서 84%의 소거 활성을 보였으며, 당귀, 음양곽과 백작약 및 녹차의 조합이 100배의 희석액에서 87.99%의 소거 활성을 보였고, 연자육, 녹차와 사간 및 산수유의 조합, 녹차, 사간과 산수유 및 감초의 조합 그리고 연자육, 녹차와 사간 및 감초의 조합에서도 희석 배수에 무관하게 모두 80% 이상의 hydroxyl radical의 소거 활성을 보였으며, 또한 네 종류 조합의 총 phenol 량은 녹차중의 증제차나 볶음차의 비발효 차 보다 30~32배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오룡차보다는 32~35배, 발효차인 홍차보다는 55~60 정도 높은 것으로 나타났다. 이상의 4종류 조합은 B. bifidum의 성장 촉진 및 free radical의 소거 활성이 좋은 것으로 나타나 장의 활성을 도울 수 있는 다기능성 제제로서의 가능성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 농림기술연구센터에서 지원한 농림기술개발과제(관리번호 200005-2) 결과의 일부이며, 이에 감사합니다.

REFERENCES

1. Ahrné, S., S. Nobaek, B. Jeppsson, and I. Adlerberth. 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology.* **85**: 88-94.
2. A.O.A.C 1990. Official methods of analysis, pp. 703-705. 15th ed, Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
3. 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, *Clinical Gerontology*, **10**: 202-222.
4. Gan, K. 1982. *Zugai ZouyouKanbouSyohou*, pp. 15-190. Yakukyosihosya, Japan.
5. 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.
6. Harman, D. 1978. Free radical theory of aging : nutritional implications. *Age*, **1**: 143-150.
7. Huh, J. 1999, *Dongeuibogam*, pp. 21-164. Bobinmunwhasa, Korea.
8. Kawagan, S. 1996. *Protocol for control of body functional material in food*, pp. 8-15, Kakuen press center, Japan.
9. Kawhudo, Y. 1989. *Proof of Pulse-Bangyakhappyeon*, pp. 15-70. Namsandang, Korea.
10. Kim, H. J., K. W. Kim, B. P. Yu, and H. Y. Chung. 2000. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-κB activation and IαBα dgradation, *Free Radical Biology & Medicine*, **28**: 683-692.
11. 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**: 270-281.
12. Kogukuchi, N. 1999. *Protocol for free radical experiments*, pp. 40-45. Suiyoonsa, Japan.
13. Kwon, H. J., M. J. Kang, H. J. Kim, J. S. Choi, K. J. Paik, and H. Y. Chung. 2000. Inhibition of NF-B by methyl chlorogenate from *Eriobotrya japonica, Mol. Cell,* **10**: 241-246.
14. 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.
15. Lunec, J. 1995. Oxygen radical activity-detection and measurment in vivo, pp. 3679-3688, *In* Townshend, A. (ed.), *Encyclopedia of Analytical Science*, vol. 6, Academic Press, U.S.
16. Mori, Y. Z. 1986. *Kanbou Syohouno Kouseito Tekiyou*, pp. 20-140. Hakubustusyokan, Japan.
17. Naidu, A. S., W. R. Bidlack, and R. A. Clemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Food Sci. Nutr.* **39**: 13-126.
18. Nakada, C. 1997. *Talk for Free Radical*, pp. 56-102. Koudansya, Japan.
19. Nemcova, R. 1997. Criteria for selection of *Lactobacilli* for probiotic use. *Vet. Med.* **42**: 19-27.
20. Noda, H., N. Akasaka, and M. Ohsugi. 1994. Biotin production by *Bifidobacteria. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**:181-188.
21. Outa, S. 1987. *Food and Antioxidant*, pp. 1-38. Syokuhinzairyokenkyukai, Japan.
22. Peter, T. P. 1998. The skin's antioxidant systems. *Dermatology nursing.* **10**: 401-406.
23. Saavedra, J. M. 1999. Probiotics plus antibiotics. *The Journal of Pediatrics.* **135**: 535-537.
24. Serafini, M., A. Ghiselli, and A. Ferro-Luzzi. 1994. Red wine, tea, and antioxidants. *The Lancet.* **344**: 626-629.
25. Torizaki, K. 1995. Protocol for lipid peroxide and free radical, pp. 145-147. Kakuen press center, Japan.
26. 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. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 154-159.
27. Yeom, T. H. and S. S. Park. 1975. *Lecture of modern Hanbang*, pp. 101-300, Haenglimseowon.
28. Yosikawa, M., W. Kawano, and I. Yano. 2000. *All of reac-*

tive oxygen and free radical, pp. 8-75. Marusen Ltd., Japan.
29. Yu, B. P. 1996. Aging and oxidative stress-Modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.*, **21**: 651-668.
30. Yuan, C. and L. J. Johnston. 2000. Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoyl-hosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys J.* **79**: 2768-2781.
31. 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.
32. Yuk, C. S. and H. S. Yang. 1999. *Hyundai Saengyakhak,* pp. 133-581, Hakchangsa.
33. Zoubi, H. 1998. *Methods for not to lose against free radicals*, pp. 13-52. Noubunkyo, Japan.

(Received July 2, 2002/Accepted Nov. 25, 2002)