

## 오미자 효소가수분해물에 의한 장내 세균총 개선 및 장관 염증 억제 효과의 효소학적 평가

류일환<sup>1</sup> · 권태오<sup>1</sup> · 이강수<sup>2</sup> · 윤용갑<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 생명자원과학대학, <sup>2</sup>전북대학교 농업생명과학대학, <sup>3</sup>원광대학교 한의과대학

### Enzymological Evaluation of Bowel Inflammation Inhibitory Activity and Intestinal Microbial Flora Improvement by Enzymatic Hydrolysate of Schizandrae Fructus

Il-Hwan Ryu<sup>1</sup>, Tae-Oh Kwon<sup>1</sup>, Kang-Soo Lee<sup>2</sup> and Yong-gab Yun<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Biological Resources Science, Jeonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

<sup>3</sup>Department of Prescription, Wonkwang University School of Oriental Medicine, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

**Abstract** – *Schizandrae* Fruits has been used as a traditional Oriental medicine for treatment of many stress-induced diseases. In the present study, we investigated inhibitory activity of enzymatic hydrolysate of *Schizandrae* fructus (SC-EX) in growth of tested intestinal microorganism and activity of bowel inflammation related enzyme. SC-EX was added to the proteose peptone-yeast extract-fildes (PYF) media to investigation the effect on the growth of type culture of intestinal microorganism. The growth of lactic acid bacteria such as *Bifidobacterium* species and *Lactobacillus* species was accelerated by more than 3% concentration of SC-EX. But, growth of harmfulness bacteria such as *E.coli*, *Clostridium* sp. *Staphylococcus* sp. *Streptococcus* sp. was inhibited by more than 3% concentration of SC-EX. Also, SC-EX was exhibited a concentration-dependent inhibitory activity of the bowel inflammation related enzymes. The SC-EX was showed 76% and 92% inhibitory activity of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase at 5% additional concentration respectively. Our results indicated that SC-EX may possess improvement effect on the intestinal flora and Anti-inflammatory effect on the bowel.

**Key words** – *Schizandrae* fructus, intestinal microbial flora, enzymological evaluation

인간과 동물의 장관 내에는 400종 이상의 세균들이 길항 관계를 유지하면서 장내균 총을 유지하고 있다. 이들이 생산하는 다양한 대사산물이 인간과 동물의 건강과 질병에 직접적인 영향을 미친다.<sup>1)</sup> 장내 세균 총을 구성하는 세균들은 유익 및 유해세균으로 구분된다. *Lactobacilli* 등의 유익세균은 외부로부터 유입되는 병원성 미생물의 침입을 막는 장벽으로 작용하게 되고 이를 colonization resistant라 한다<sup>2)</sup>. 그러나 이 ecosystem은 항생제와 같은 약물 및 식이 등의 변화에 의해 쉽게 붕괴되어 원하지 않는 유해 미생물의 생육을 촉진시키게 된다.

특정 세균 종의 증가는 세균성 항체의 흡착을 증가시키고 이 항체가 류마티스 관절염, 장염 등 염증성 질환을 증가시

킨다.<sup>3)</sup>

Severijnen 등<sup>4)</sup>은 *Eubacterium aerofaciens*를 쥐에 주입 시 류마티스 관절염이 증가하였다고 보고하였다. 또한, Sator 등<sup>5)</sup>은 궤양성 대장염과 크론병을 포함한 염증성 장질환의 발생에 있어서 장내 세균이 중심적 역할을 한다고 보고하였다. 그 근거로는 첫째, 장내세균이 많은 위치에서 염증성 장질환이 발생하고, 둘째, 병변의 부위가 지속적으로 대변에 노출시 질환의 활성이 증가하고, 셋째, 실험동물의 이용 시 장내세균이 없으면 염증반응이 시작되지 않는다는 점이다. 장관 내에서 염증을 유발하는 유해균의 증식은 유익균의 축소에 의해 가장 빈번하게 나타난다. Payne 등<sup>6)</sup>은 *in vitro* gut model을 이용한 실험에서 tetracycline 처리시 정상적인 균형상태에서는 생육이 되지 않던 *Candida albicans* 의 생육이 급격하게 증가 하였으며, 이는 *Lactobacillus plantarum*

\*교신저자 (E-mail): yunyg@wonkwang.ac.kr  
(FAX): 063-850-6834

의 첨가 시 생육이 저하되었다고 보고하였다. 이러한 현상은 Lactobacilli의 첨가에 의한 colonization resistant의 회복 및 Lactobacilli의 직접적인 항균작용에 의한 것이라고 보고하였다. Bruno<sup>7)</sup>는 다양한 장내 유해균과 Bifidobacteria를 동시 배양 시 유해균의 생육이 저해되었으나, 배양배지의 pH를 7.0으로 조정 시 항균활성이 급격히 저해되었다고 보고하였다. 이 같은 현상은 bifidobacteria가 lactate, acetate 같은 유기산을 생성하여 주변을 산성화 시키고 이로 인해 병원균의 생육을 저해시키며,<sup>8)</sup> 항균성 peptide의 생산에 의한 것이다.<sup>9)</sup>

따라서, 염증성 장질환의 개선은 일차적으로 장내 미생물총의 개선에 의해 이루어 질 수 있다. 본 연구는 장관 내 미생물총 및 염증성 질환의 개선에 대한 오미자 추출물의 유효성을 분석, 검증하기 위하여 *in vitro* 배양 실험을 시행하였다. 그러나, 동물의 장관 내 세균들은 상호 유기적으로 공생의 관계를 유지하고 있고, 일부의 균종은 단독배양이 어렵고, 일부 종은 단독 배양 시 특정 선택배지를 사용하여야 하는 등의 *in vitro* 배양 실험의 단점을 인체 분변의 미생물총의 변화실험을 병행하여 보완하였다. 또한 인체 백혈구를 이용하여 염증 매개 물질 LTB<sub>4</sub> 및 기염 물질인 PGs의 생성 효소 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase 및 조직 파괴 효소인 collagenase의 활성 저해 효과를 통하여 효소학적으로 규명하였다.

## 재료 및 방법

**오미자의 효소가수분해 및 성분분석** - 전북 장수에서 구입한 신선한 *Schizandra fructus*(SC-EX) 100 g을 분쇄하여 당 연구실에서 분리 보관중인 *Aspergillus oryzae* 유래의 pectinase를 첨가하여 40°C 12시간 반응 하여 상등액을 분리하고, 동결 건조 분말화하여 시료로 사용하였다. 추출의 수율은 고품분 및 슈잔드린의 함량으로 측정하였다.

pH는 pH측정기를 사용하여 측정하였고, 산도는 소비된 0.1 N NaOH 적정량으로 계측하였으며, 당의 함량은 페놀황산법을 이용하여 측정하였다. 조단백질 및 조지방의 함량은 기품공전 일반 시험법에 준하여 측정하였으며, 색도는 색도계를 이용하여 L,a,b값을 측정하였다. 슈잔드린의 함량은 Waters High Performance Carbohydrate Column(4 µm Nova-pak, 44.6 × 250 mm, WAT044355) 및 RI Detector (Shodex RI 71)를 이용하여 HPLC(Jasco Co, Japan)로 측정하였다. 고품분의 함량은 감압농축기를 이용하여 감압 농축 후 동결 건조하여 무게를 측정하였다. 또한 유기산의 분석은 동결 건조된 시료 1 g을 정확히 취하여 Bio-Rad Aminex HPX-87H(Ion-Exclusion, 7.8 × 300 mm, # 125-0140) column 및 UV Detector를 이용하여 HPLC (Spectra SYSTEM(TSP)) 로 분석하였다. 내부 표준품으로 사용한

citric acid와 유기산 표준품은 ester화 시켜 사용하였다.

**주요 장내 미생물의 단독배양에 미치는 영향** - SC-EX의 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향을 측정하기 위하여 *Bifidobacterium* 4종(*B. animalis* ATCC 11209, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 11207, *B. longum* ATCC 11963), *Clostridium* 4종(*C. butyricum* ATCC 19398, *C. paraputricum* ATCC 25780, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. ramosum* ATCC 25582), *Lactobacillus* 3종 (*L. acidophilus* ATCC 32820, *L. brevis* ATCC 3102, *L. plantarum* ATCC 14917) 및 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12800, *Streptococcus faecalis* ATCC 18433 등을 표준 균주로 사용하여 Yeast extract 10 g, Proteose peptone 5 g, Trypticase peptone 5 g, filds solution(MIX 150 ml of saline, 6 ml c-HCl, 50 ml serum and pepsin, overnight at 55°C, Fix pH 7.6 with 20% NaOH solution and filtrate it) 40 ml, salt solution(Dissolve CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.204 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.48 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, NaHCO<sub>3</sub> 10 g, NaCl 2 g in 1000 ml distilled water)40 ml L-Cystain HCl.H<sub>2</sub>O 0.5 g, glucose 10 g, D.W 920 ml)이 함유된 액체배지에 SC-EX (0~5%)를 접종하고 표준 균주를 각각 4%씩 접종한 후 37에서 48시간 동안 혐기 배양하면서 12시간 간격으로 생균수와 pH를 측정하면서 균의 성장 정도와 산의 생성 정도를 판정하여 장내 세균에 대한 오미자 추출물의 활성도를 측정하였다.

**장내 미생물의 혼합배양에 미치는 영향** - SC-EX의 장내 미생물의 혼합 배양에 미치는 영향을 측정하기 위하여 PYF 액체배지를 혐기성 희석액으로 사용하여, 분변을 1/10 배로 희석한 후, 이 혼합액을 종균으로 사용하여 SC-EX (0~5%)가 첨가된 배지에 각각 4% 접종하고, 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양하면서 12시간 간격으로 시료를 채취하여 주요 미생물의 선택배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 이때 사용된 주요 미생물의 선택배지는 *E. coli*는 Endo agar, *Lactobacillus* sp.는 MRS agar를 사용하였으며, *Clostridium* sp.는 Clostridial Differential agar를 사용하였다. 또한 *Staphylococcus* sp.는 selective agar를 사용하였으며, *Bifidobacterium* sp.는 Nebra & Blanch 등<sup>10)</sup>이 보고한 선택 배지를 사용하였다.

**장내세균 기인성 β-Glucuronidase와 Nitroreductase 저해효과** - 장관내 염증 및 암의 발생은 장내세균총에 의해 생성되는 β-Glucuronidase의 활성화에 의해 기인한다고 알려져있다.<sup>11)</sup> 다수의 연구자들이 장관내 염증 및 암병소에 β-Glucuronidase의 활성이 급격히 증가되었다는 보고와 같이 장관의 각종 질환에 필수적인 효소이다.<sup>12)</sup>

β-Glucuronidase의 활성 측정은 Fluor beta-glucuronidase

reporter assay kit를 사용하여 측정하였다.<sup>13)</sup> 앞에서 만든 분변 회석액을 4°C에서 30초간 초음파 처리후 원심분리하여 (10,000×g, 10 min) 상등액 1 ml를 취하여 여러 농도의 SC-EX와 37°C 10분간 전반응 시킨후 kit를 이용하여 잔존 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성은 1시간동안 1 mg의 phenolphthalein을 방출 하는 효소단백질의 양으로 하였다.

Nitroreductase는  $\beta$ -Glucuronidase와 같이 장내 세균에 의해 생성 되는 효소로 장관내 각종 질환에 핵심적 역할을 하는 알려져있다. 이 효소는 혐기적 상태에서 활성을 나타내는 효소로 분변 채취 후 4시간 이내에 Rowland의 방법에 준하여 측정하였다.<sup>14)</sup> nitroreductase반응액(1.5 mM m-nitrobenzoic acid)은 측정직전에 제조하여 혐기상태로 냉장 보관하여 사용 하였다. 효소의 활성은 생성된 aminobenzoic acid의 양으로 측정하였으며 시간당 1  $\mu$ g의 aminobenzoic acid를 생산하는 효소의 양으로 표시하였다.

**5-lipoxygenase와 Cyclooxygenase-2 저해효과** - 5-lipoxygenase와 Cyclooxygenase-2 저해효과의 측정에 사용된 사람의 백혈구는Garcia 등<sup>15)</sup>의 방법에 준하여 추출하였다. 사람의 말초혈 5 ml에 6%의 dextran이 포함된 생리식염수 1.5 ml를 첨가하여 조심스럽게 혼합한 후, 37°C, 30분간 정치하여 침전물을 침강시켰다. 다형핵 백혈구가 풍부한 상등액을 모으고, 500×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 침전물에 포함된 적혈구를 제거하기 위하여 0.8% NH<sub>4</sub>Cl 용액 1 ml를 첨가하여 용해시키고, 동일 조건에서 다시 원심 분리하여 백혈구를 모으고 phosphate-buffered saline(PBS)에 재현탁하여 보관하면서, 사용 직전 세포 농도를 5×10<sup>6</sup> cell/ml로 조절하여 사용하였다. SC-EX의 백혈구 균질화 세포의 5-lipoxygenase (EC 1,13,11,34)활성에 미치는 저해 효과를 Hernandez 등의 방법에 준하여 측정하였다. 사람의 전혈에서 추출한 백혈구 세포(2×10<sup>7</sup> cell/ml)는 냉장 반응조 내에서 온도의 상승을 방지하면서 초음파 분쇄(3 time×5 sec)시켜 균체를 파쇄 하였다. 파쇄 시킨 세포를 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 세포 파쇄물을 제거하고 상등액을 20,000×g에서 30분간 재 원심 분리하여 상등액을 모았다. 이렇게 준비한 백혈구 homogenate를 1 mM EDTA가 포함된 PBS 960  $\mu$ l에 각각 현탁시킨 후, 100 mM ATP 20  $\mu$ l와 180 mM Ca<sup>2+</sup> 20  $\mu$ l를 첨가하여 최종 양을 1 ml로 조정하고 37°C에서 5분간 예온 시켰다. 예온 후 다양한 농도의 SC-EX를 첨가하고 37°C에서 5분간 전 반응시켰다. 전 반응 후 20  $\mu$ M의 arachidonic acid를 첨가하고 5분간 반응 후, 생성되는 과산화수소의 양을 500 nm에서 비색 정량 후, 표준곡선으로부터 구하였다. 또한Cyclooxygenase-2(EC 1,14,99,1)의 활성은 Collier<sup>16)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 100  $\mu$ l의 백혈구파쇄액, 10  $\mu$ l의 20  $\mu$ M hematin, 100  $\mu$ l의 시료 및 0.1 M Tris 완충액(pH 8.0)을 넣어 총 액량이 1 ml가 되도록 하였다. 다양한 농도(0.5~5%)의 SC-

**Table I.** Physical Properties of Enzymatic Hydrolysate of Schizandrae Fructus

Property	value
pH	3.05
Acidity	6.67(% citrate)
Total Sugar content (%)	5
Total lipid content (%)	1.56
Total protein content (%)	0.06
Total solid content (%)	24
Lignin content (%)	0.453
Chromaticity	L56.84, a32.28 b9.57

EX를 첨가하고 37°C, 5분간 방치한 후 여기에 10  $\mu$ l의 20 mM *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 및 10  $\mu$ l의 arachidonic acid를 넣고 610 nm에서 흡광도의 변화 속도를 측정하였다. 비 특이적인 흡광도 변화는 위의 반응 혼합물 중에서 arachidonate를 제외한 효소 반응으로 측정하여 이것을 보정해 주었다.

Cyclooxygenase-2의 활성은 1분 동안 1  $\mu$ M의 *NNN'*-tetramethyl-*p*-Phenylenediamine dichloride를 산화시키는데 필요한 효소양으로 정하고 흡광도 변화에서 unit 산출은 다음과 같은 공식을 사용하였다.

$$\text{Unit(s)} = (\Delta A_{610} / \text{min}) / 13.5$$

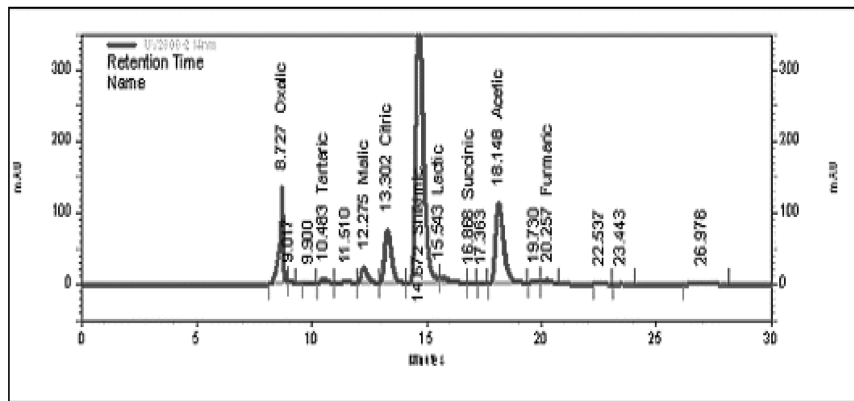
$\Delta A_{610}$ : 파장 610 nm에서 흡광도 변화

13.5: *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 산화형과 환원형간의 millimolar extinction coefficient

Cyclooxygenase-2의 specific activity는 단백질 mg당 unit 수로 나타 내었으며, 단백질량은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**오미자 효소가수분해물의 성분 분석** - SC-EX의 pH, 산도, 당함량, 조지방 함량, 조단백질함량, 고형분 함량 및 lignan의 함량을 측정한 결과 Table I과 같다. 슈잔드린을 포함하는 총 lignan의 함량은 0.453%였으며, 산도는 6.67(% citrate)였고 색도는 L56.84, a32.28 b9.57으로 밝은 적색을 나타내었다. 이 결과는 오미자의 물추출을 행한 홍 등<sup>17)</sup>의 결과인 산도 2.79%, 당도 1.10%에 비해 월등히 우수한 추출 수율을 나타내어 보다 효율적인 추출방법임을 확인하였다. 또한, SC-EX의 유기산을 분석한 결과, Fig. 1과 같이 주된 유기산은 citric acid, lactic acid, malic acid 및 shikimic acid로 그 함량은 각각 36.35, 14.17, 9.84, 4.50 (g/kg)이었으며, 소량의 tartaric acid (1.83 g/kg)이 함유되어있는 반면, acetic acid 및 succinic acid와 maleic acid 과 같이 직접적으로 맛에 영향을 미치는 유기산의 함량이 상대적으로 낮은 특성



Organic acids	Content(mg/g of extract)
Citric acid	36.35
Tartaric acid	1.83
Malic acid	14.17
Lactic acid	9.84
Shikimic acid	4.50

Fig. 1. Organic acid component and GC chromatogram of enzymatic hydrolysate of Schizandrae fructus.

을 나타내었다.

또한 당함량은 4% 였으며, 유리당의 조성은 Fructose, Glucose, Sucrose 및 Maltose가 주성분으로 각각 5.83, 4.30, 0.35 및 0.90 ppm이 함유되어 있었다. 이 결과로부터 오미자의 단맛을 나타내는 주성분은 fructose임을 확인 할 수 있었다(data not shown).

**주요 장내 미생물의 단독배양에 미치는 영향** - SC-EX의 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향을 측정하기 위하여 *Bifidobacterium* sp. *Clostridium* sp. *Staphylococcus*, *Lactobacillus* sp. 및 *E.coli*등 표준균주들을 대조구와 SC-EX (0~5%) 이 첨가된 PYF 액체 배지에 각각 4%씩 접종하고 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양하면서 12시간 간격으로 생균수를 측정한 결과 Fig. 2와 3에 나타내었다.

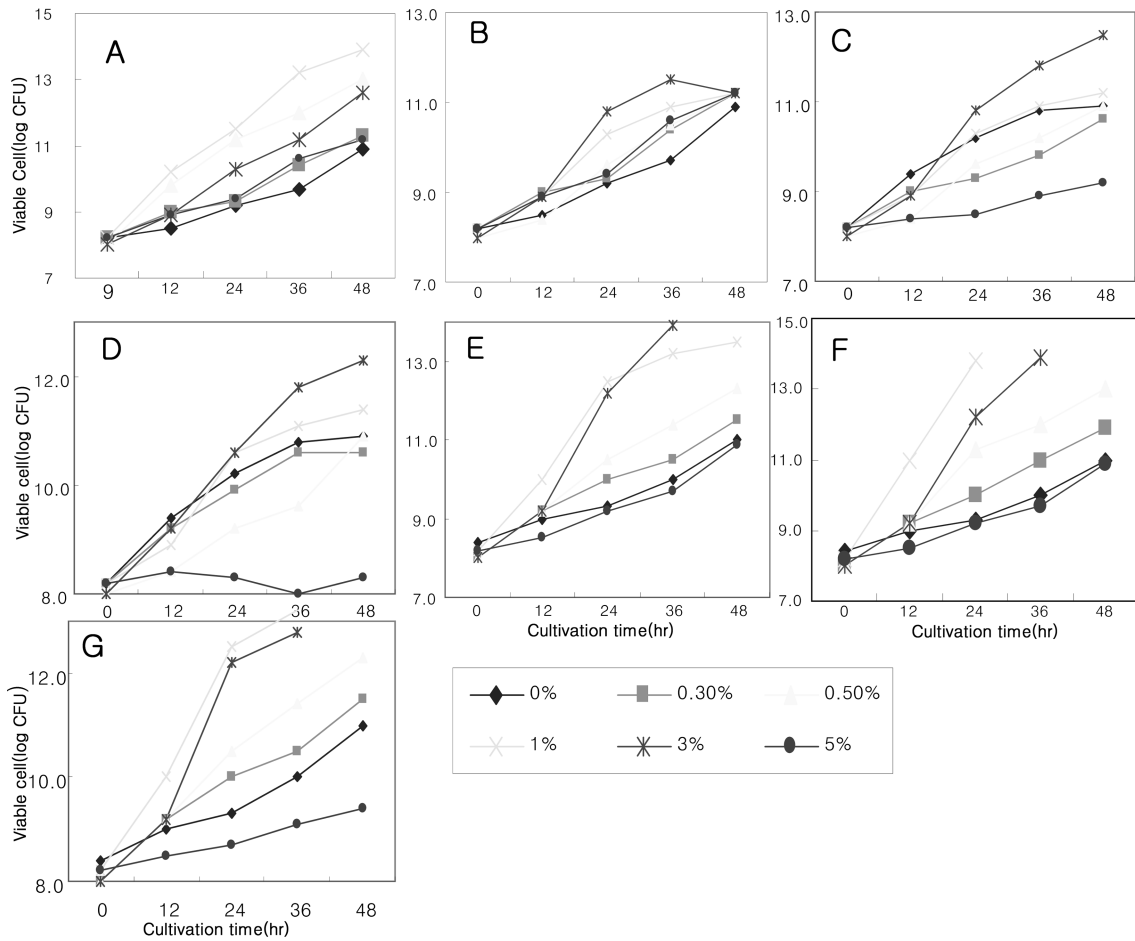
그림에서 보는 바와 같이 *Clostridium* sp. *Streptococcus faecalis* *Staphylococcus aureus*, *pedicoccus cerevisiae*, *Bacteroid fragilis*, *Eubacterium limosum*, *Enterococcus faecalis* 및 *E. coli* 모두 SC-EX의 첨가 농도에 따라 균의 생육이 확연히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 3% 및 5%의 첨가시 균의 생육이 급격히 감소하여 배양 48시간 후 거의 사멸하는 것을 확인하였다. 그 중 *Clostridium* sp. 및 *E.coli*같은 gram (-) 세균의 생육 저해 폭이 큰 것으로 나타났다. 또한, *Bifidobacterium* sp. 와 *Lactobacillus* sp. 의

lactic acid 생성 미생물의 성장은 저농도의 SC-EX의 첨가 시 촉진시키는 것으로 나타났다. 첨가농도에 비례하여 lactic acid 생성 미생물의 생장이 증가하여, 균중에 따라 1%~3%의 첨가시 생육이 급격히 증가함을 보였다. 반면 5%의 고농도 첨가시 오히려 균의 생장이 저해되는 결과를 보였다. 이 결과로부터 SC-EX는 균중에 따라 선택적 증식 및 저해 효과가 있는 것으로 판단된다.

이러한 결과는 오미자 중에 함유되어있는 유기산에 의한 것으로 판단된다. 이는 유기산의 첨가시 coliform 세균의 생장이 억제되고, 젖산균은 낮은 pH와 첨가된 유기산에 저항성을 갖으며 이로 인해 젖산균의 영양 소화성과 생장이 증대된다는 Russell 등<sup>18)</sup>의 보고와 잘 일치하는 결과를 보였다.

유기산의 항세균효과는 pH의 저하와 직접적으로 관련이 있다. 통상적으로 pH가 저하되면 항균활성이 증가된다. 이는 유기산이 지용성의 비해리형으로 세포내로 유입되거나, 막수송 단백질을 통하여 세포내로 유입되어 세포내 pH를 저하 시키는 것으로 알려져있다.<sup>19)</sup>

따라서, SC-EX는 *E.coli*를 비롯한 G(-) 유해세균에 대하여 항균활성을 나타내는 과량의 malic acid, lactic acid, tartaric acid 및 succinic acid를 함유하고 있으며, 젖산균의 성장에 직접적 영향을 미치는 citric acid를 함유하고 있음으



**Fig. 2.** The effect of enzymatic hydrolysate of Schizandrae fructus on the growth of intestinal microorganism *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp.

A: *Bifidobacterium animalis* ATCC 11209, B: *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, C: *Bifidobacterium infantis* ATCC 11207, D: *Bifidobacterium longum* ATCC 11963, E: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 32820, F: *Lactobacillus brevis* ATCC 3102, G: *Lactobacillus L. plantarum* ATCC 14917

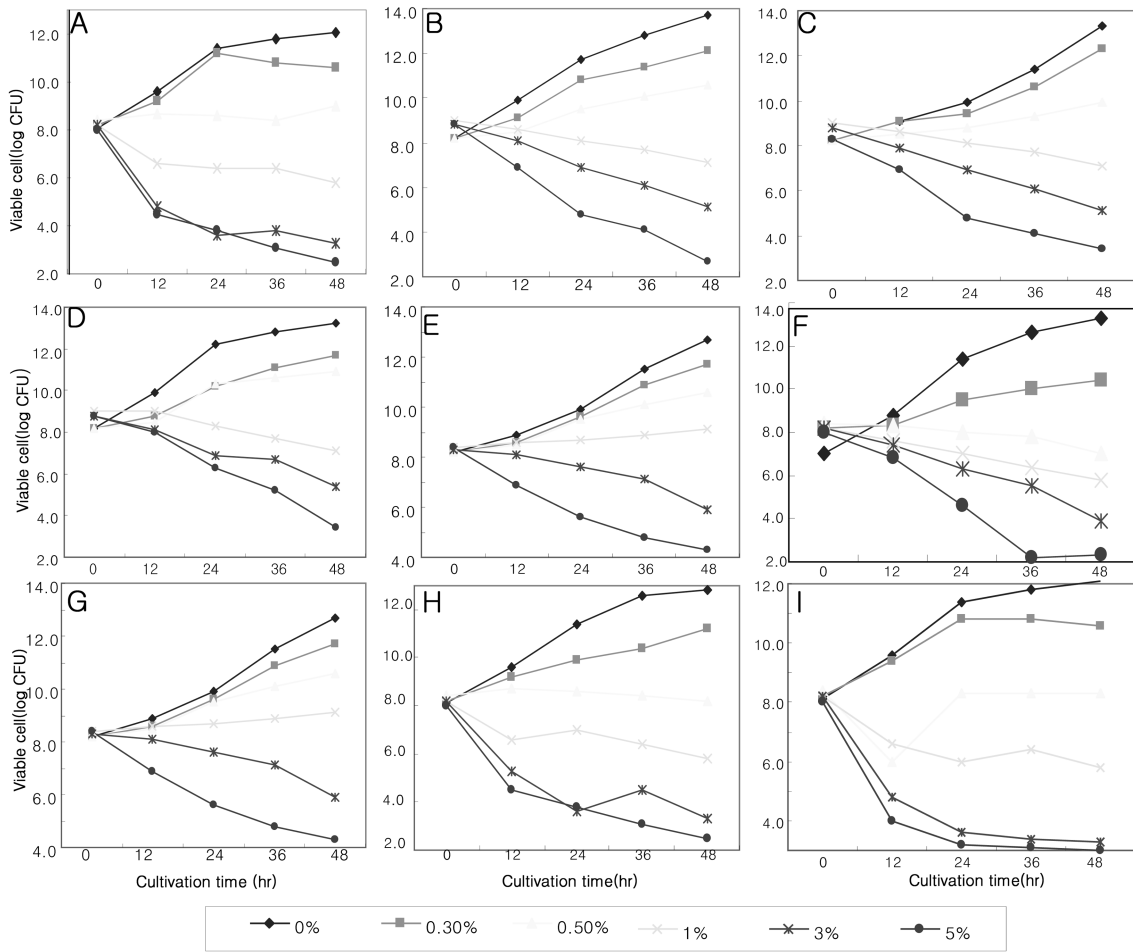
로써 장관 미생물에 대하여 선택적 생육저해 및 생육 증식 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

**장내 미생물의 혼합배양에 미치는 영향** - *E.coli*는 Endo agar, *Lactobacillus* sp.는 MRS agar를 사용하였으며, *Clostridium* sp.는 Clostridial Differential agar, *Staphylococcus* sp.는 selective agar를 사용하였으며, *Bifidobacterium* sp.는 Nebra & Blanch등이 보고한 선택배지를 사용하여 SC-EX의 장내 미생물의 혼합 배양에 미치는 영향을 측정 한 결과 Table II와 같다. *E.coli*는 0.5% 첨가시 균의 생육이 정지 되었 으며, *staphylococcus* sp.의 경우 추출물의 첨가농도에 따라 균의 생육이 저해되었 으며, 3% 첨가시 균의 생육이 정지되었음을 확인 하였다. 또한, *Clostridium* sp. 또한 5% 첨가 시 균의 생육이 저하되었다. 반면, *Lactobacillus* sp. 및 *Bifidobacterium* sp.의 경우 3% 첨가 시 균의 생육이 급격히 증가하였다. 이 결과는 단독 배양시 1%농도에서 가장 우수한 생육을 보인 결과에 비해 고

농도의 추출물에서 균의 생육이 증가됨을 확인 할 수 있었 으며, 이는 균주 상호간의 작용에 의한 것으로 판단된다. 그러나 *Bifidobacterium* sp.의 경우 피검자의 영양상태 및 연령 등 다양한 요인이 균의 존재 여부와 균수에 직접적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

**장내세균 기인성  $\beta$ -Glucuronidase 와 Nitroreductase 저해효과** -  $\beta$ -Glucuronidase는 간에서 benzopyrene등의 유독성 물질이 glucuronic acid conjugate로 무독화되어 장으로 유입시 이를 절단함으로써 발암성 물질을 생성 하게 하는 역할을 하는 효소로 주로 *Clostridium* sp. *bacteroides* sp. *Eubacterium* sp. *peptostreptococcus* sp. 등이 생산을 하며 *Bifidobacterium* sp. 등 젖산균은 이효소를 생산하지 않는 것으로 알려져있다.<sup>20,21)</sup>

Nitroreductase 또한 장내 유해 세균에 의해 생성되는 효소로 장내 염증 및 암의 진전에 영향을 미치는 효소이다. 암의 진전 및 다양한 carcinogen을 의 생성에 직접적 영향을



**Fig. 3.** The effect of enzymatic hydrolysate of Schizandrae fructus on the growth of intestinal microorganism *Clostridium* sp., *Escherichia coli* and other harmfulness microorganism. A: *Clostridium butyricum* ATCC 19398, B: *Clostridium paraputricum* ATCC 25780, C: *Clostridium perfringens* ATCC 13124, D: *Clostridium ramosum* ATCC 25582, E: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, F: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, G: *Staphylococcus aureus* ATCC 12800, H: *Streptococcus faecalis* ATCC18433, I: *Escherichia coli* ATCC 11775,

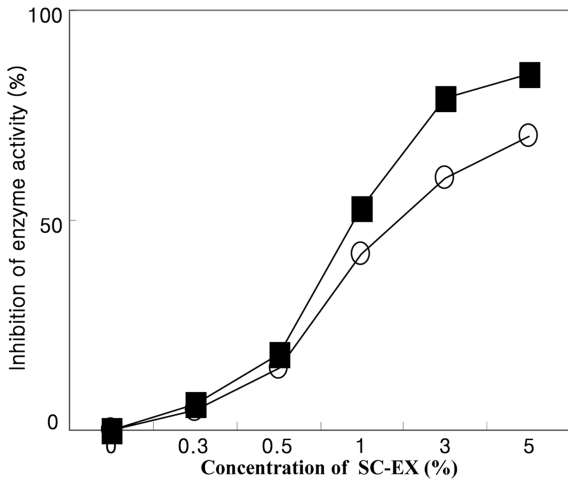
**Table II.** Effect of Enzymatic Hydrolysate of Schizandrae Fructus on the Growth of Human Feces' Bacteria in Selective Meia cultivation

Strain spp.	0	Cultivation time (hrs)				
		24				
		Concentration of Omija extract (%)				
		0.3	0.5	1	3	5
<i>Lactobacillus</i> sp.	7.3 <sup>1)</sup>	9.4	11.2	12.7	14.6	14.3
<i>Clostridium</i> sp.	10.7	8.9	8.3	7.2	6.0	3.2
<i>E.coli</i>	7.7	5.3	1.3	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	10.5	8.9	6.3	2.6	-	-
<i>Bifidobacterium</i> sp.	5.6	7.2	9.4	11.8	12.5	10.9

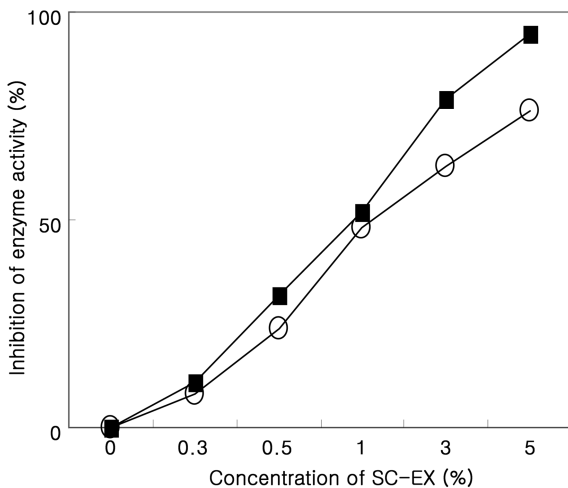
<sup>1)</sup>Mean (log CFU/g feces)

미치는<sup>22,23)</sup> 이 효소들의 활성에 SC-EX이 미치는 영향을 측정하기 위하여 분변 희석액을 조효소로 사용하여 측정한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이, 분변 현탁액에 5%의 추출물

을 첨가 시 각각 70% 및 85%의 활성이 저해되었다. 이는 SC-EX이 효소의 활성에 직접 관여하여 저해 활성을 나타내는 것이 아니라, 이 효소들을 생산하는 세균총에 대한 항



**Fig. 4.** Inhibitory Effect of enzymatic hydrolysate of *Schizandrae fructus* on the  $\beta$ -glucuronidase and Nitroreductase.  
 -■- $\beta$ -glucuronidase -○-Nitroreductase



**Fig. 5.** Inhibitory effect of enzymatic hydrolysate of *Schizandrae fructus* on 5-lipoxygenase and Cyclooxygenase-2 activity.  
 -■-Cyclooxygenase-2 -○-5-lipoxygenase

균활성에 기인한 것으로 판단된다. 이는 장내 환경의 pH는 장내 세균에 의해 생성되는  $\beta$ -glucuronidase의 활성에 직접적인 영향을 미친다는 Hawksworth 등,<sup>24)</sup> Cole 등,<sup>25)</sup> Gadelle 등<sup>26)</sup> 및 Fusisawa 등<sup>27)</sup>의 보고와 일치하는 것으로 판단된다.

**5-lipoxygenase 및 cyclooxygenase-2 활성 저해** - 균 질화된 사람의 PMNL 5-lipoxygenase 및 cyclooxygenase-2 활성에 대한 SC-EX의 저해효과를 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 5-lipoxygenase pathway의 효소 복합체중 5-lipoxygenase에 직접적으로 저해하여 3% 첨가 시 63% 효소활성이 저해되었으며, 5% 첨가 시 76%의 효소활성이 저해되었다. 이 결과로부터 SC-EX이 arachidonic acid 대사를 길항 저해함으로써 염증성 매개 물질인 LTB<sub>4</sub>의 생합성을 저해하는 것으로 판단된다.

또한, PGs 합성의 율속 단계를 촉매 하는 효소로 arachidonic acid를 PGs H<sub>1</sub>으로 전환하는 효소인 cyclooxygenase(COX, EC 1,14,99,1)활성에 대한 SC-EX의 5% 첨가 시 각각 95%의 효소 활성이 저해되었다. 이 결과는 앞의 5-LOX의 결과와 일치하는 것으로 오미자 추출물이 arachidonic acid 대사 경로의 길항 작용하는 것을 반증하는 것이다. 이는 저분자의 유기산이 COX와 LOX의 활성 모두를 저해하였다는 Whitehouse의 보고와 같은 결과를 나타내었다.<sup>28)</sup>

따라서 SC-EX는 지방산 대사에서 생성되는 PGs의 양을 효과적으로 저하 시킴으로써 염증의 예방 및 치료에 효과적이라고 판단된다.

또한 최근 인체 암의 발병과 진전에 5-lipoxygenase 활성이 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀져 많은 관심을 받고 있다.<sup>29)</sup> Gunning 등<sup>30)</sup> 및 Ghosh-Myers 등<sup>31)</sup>은 5-lipoxygenase의 활성 저해 물질이 폐암 및 전립선암 세포의 성장을 저해하였다고 보고하는 등, 다양한 보고를 기준으로 본 연구에 이용된 SC-EX는 염증의 진전은 물론 암의 진전에도 유용한 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

## 결 론

*Schizandra chinensis* 열매는 다양한 스트레스성 질환의 치료에 사용되어온 전통 약재이다. 본 연구는 장관 내 미생물총 및 염증성 질환의 개선에 대한 오미자(*Schizandrae fructus*) 효소 가수분해물(SC-EX)의 유효성을 분석, 검증하기 위하여 *in vitro* 실험을 시행하였다. 효소 추출물의 총 lignan의 함량은 0.453%였으며, 산도는 6.67(% citrate)였고 색도는 L56.84, a32.28 b9.57으로 밝은 적색을 나타내었다. 표준균주를 proteose peptone-yeast extract-fildes (PYF)배지에서 단독 및 혼합배양 시 3% 및 5%의 SC-EX 첨가 시 유해균의 생육이 급격히 감소하여 배양 48시간 후 거의 사멸하는 반면, *Bifidobacterium* sp. 와 *Lactobacillus* sp.의 성장은 1~3% 첨가 시 촉진되었다. 또한, 장관내 염증 및 암의 발생에 관여하는  $\beta$ -Glucuronidase 및 Nitroreductase 5%의 SC-EX을 첨가 시 각각 70% 및 85%의 활성이 저해되었다.

염증유발효소인 사람의 PMNL 5-lipoxygenase 및 cyclooxygenase-2 활성은 3% 첨가 시 63% 효소활성이 저해되었으며, 5% 첨가 시 76%의 효소활성이 저해되었다. 이상의 결과로부터 *Schizandra chinensis* 효소추출물은 장내세균총의 선택적 개선 효과 및 염증 발병 및 진전의 저해효과를 확인하였다. 이를 통하여 장 기능 개선 효과를 갖는 다양한 기능성 소재의 개발에 이용 할 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 2007년도 RDA의 Regional joint Agricultrayal

Research Project (LS0205)의 지원에 의해서 수행된 것입니다.

## 인 용 문 헌

1. Savage D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* **31**: 107-133. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543.
2. Smith H.W. (1975) Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of man. *Nature.* **255**: 500-502.
3. Bradley S.M, Neumann V.C, Barr K, Troughton P.R, Astbury C, Bird HA, Gooi H.C and Wrightsequential V. (1993) Study of bacterial antibody levels and faecal flora in rheumatoid arthritis patientis taking sulphasalazine. *Rheumatology.* **32**: 683-688.
4. Severijnen A.J, Kool J, Swaak A.J.G and Hazenberg M.P. (1990) International flora of patients with rheumatoid arthritis: induction of chronic arthritis in rats by cell wall fragments from isolated *Eubacterium aerofaciens* strains. *Rheumatology.* **29**: 433-439.
5. Sator R.B. (1997) Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **92**: 5-11.
6. Samantha P, Glenn G Anthony W, Barry H, Jonathan B and Kieran T. (2003) In Vitro Studies on Colonization Resistance of the Human Gut Microbiota to *Candida albicans* and the Effects of Tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **4**: 1-8.
7. Bruno F.A, Lankaputhra W.E.V and Shah N.O. (2002) Growth, Viability and Activity of *Bifidobacterium* spp. in Skim Milk Containing Prebiotics. *J. Food Scie.* **67**: 2740-2744.
8. Gwen F, Angeliki V, Kristof V and Vuyst L.D. (2006). Cross-Feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and Acetate-Converting, Butyrate-Producing Colon Bacteria during Growth on Oligofructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7835-7841.
9. Collado M.C, González A, González R, Hernández M, Ferrús M.A and Sanz Y. (2005) Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Inter. J. Antimicro. Agents.* **25**: 385-391.
10. Nebra Y and Blanch A.R.A (1999) New Selective Medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5173-5176.
11. Donaldson Jr, R.M. (1978) The relation of enteric bacterial population to gastrointestinal function and disease. In: Sleisenger, M. H., Fordtran, J. S. (eds.): *Gastrointestinal disease.* W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 79-92.
12. Donaldson Jr R.M. (1964) Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *N. Engl. J. Med.* **270**: 938-945, 994-1001, 1050-1056.
13. Clark J.A and el-Shaarawi A.H. (1993) Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, *Escherichia coli*, and other indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 380-388.
14. Hughes R and Rowland I. (2003) Nutritional and microbial modulation of carcinogenesis. In: *Gut flora, nutrition, immunity and health.* R. Fuller and G Perdigón Eds. London: Blackwell Publishing, UK, pp. 208-220.
15. Garcia A, NiuBo J, Benitez M.A, Viqueira M and Perez J.L. (1996) Comparison of two leukocyte extraction methods for cytomegalovirus Antigenemia Assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 182-184.
16. Collier J.G and Flower R.J. (1971) Effect of aspirin on human seminal prostaglandin. *Lancet.*, 852-853.
17. Hong K.H, Nam E.S and Park S.I. (2004) Preparation and Characteristics of Drinkable Yoghurt Added Water Extract of *Omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) *Korean J. Food Nutr.* **17**: 111-119.
18. Russell J.B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J Appl. Bacteriol.* **73**: 363-370.
19. Cherrington C, Hiton M, Mead GC and Choppa I. (1991) Organic acid: chemistry, antibacterial activity and practical application. *Advan. Microbial Physiol.* **32**: 87-107.
20. Rhee Y.K, Kim D.H and Han M.J. (1998) Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on  $\beta$ -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. *korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 199-205.
21. Murai K, Hisamitsu K, Imamura L and Kobaashi K. (1994) Effect of oral administration to rats of various undigestible saccharide on fecal pH, water contents and enzyme activity. *Bifidobacteria and Microflora* **13**: 91-98.
22. Bauer H.G, Asp N.G, Oste R, Dahlqvist A and Fredlund P.E. (1979) Effect of dietary fiber on the induction of colorectal tumors and fecal  $\beta$ -glucuronidase activity in the rat. *Cancer Research.* **39**: 3752-3756.
23. Takada H, Hirooka Y and Yamamoto M. (1982) Effect of  $\beta$ -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonis carcinogenesis in rat, *Cancer Research.* **42**: 331-334.
24. Hawksworth G, Drasar B.S and Hill M.J. (1971) Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bond, *J. Med. microbiol.* **4**: 451-459.
25. Cole C.B, Fuller A.K and Rowland I.R. (1985) The influence of the host on expression of intestinal microbial enzyme activity involved in metabolism of foreign compound. *J. Appl. Bactriol.* **59**: 549-553.
26. Gadelle D, Raibud P and Sacquet E. (1985)  $\beta$ -glucuronidase activities of intestinal bacteria determined both in vitro and in vivo in gnotobiotic rat. *App. Envir. Microbiol.* **49**: 682-685.
27. Fujisawa T and Mori M. (1996) Influence of bile salts on  $\beta$ -glucuronidase activity of intestinal bacteria. *Letter in Appl. Microbiol.* **22**: 271-274.



28. Whitehouse M.W, Macrides T.A, Kalafatis N, Betts W.H, Haynes D.R and Broadbent J. (1997) Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ Green-lipped Mussel. *Inflammopharmacology*. **5**: 237-246.
29. Steele V.E, Holmes C.A, Hawk E.T, Kopelovich L, Lubet R.A, Crowell J.A, Sigman C.C and Kelloff G.J. (1999) Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **8**: 467-483.
30. Gunning W.T, Kramer P.M, Steele V.E and Pereira M.A. (2002) Chemoprevention by lipoxygenase and leukotriene pathway inhibitors of vinyl carbamate-induced lung tumors in mice. *Cancer Res.* **62**: 4199-4201.
31. Ghosh J and Myers C.E. (1999) Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **469**: 577-582.

(2007년 11월 2일 접수)