

오미자 추출물이 비만과 관련된 장내 세균의 생육에 미치는 영향

정은지 · 이운종 · 김광엽*

충북대학교 식품공학과/생물건강산업개발연구소

Effects of *Schizandra chinensis* Extract on the Growth of Intestinal Bacteria Related with Obesity

Eun-Ji Jeong, Woon-Jong Lee, and Kwang-Yup Kim*

Department of Food Science and Technology, the Research Center for Bioresource and Health, Chungbuk National University

Abstract This study was conducted to screen for plant food materials that improve human intestinal microflora, especially microorganisms associated with obesity. Among 30 tested plant food materials, the extract of *Schizandra chinensis* inactivated *Eubacterium limosum*, *Bacteroides fragilis* and *Clostridium* spp. Additionally, *S. chinensis* extract was also found to have a growth-promoting effect on *Bifidobacterium* spp.. The antimicrobial activity and antioxidant activity of the water extract did not decrease in respond to heating. Additionally, the water extract of *S. chinensis* did not show a toxic effect on the growth of Caco-2 cells. *In vivo* feeding tests were performed to investigate the influence of extract on the intestinal microflora in rats. Although the extract did not reduce obesity induced by a high fat diet, it led to significant increase in the population of *Bifidobacterium* spp. and a decrease in the population of *Clostridium* spp. in rats. Taken together, these results indicate that *S. chinensis* could be useful as a functional food component to control intestinal microbial flora.

Key words: intestinal microflora, antimicrobial activity, obesity, *Schizandra chinensis*

서 론

포유동물의 장내에는 숙주의 면역능력을 자극하거나 감염을 방어하고 건강유지에 기여하는 세균류와 장내 부패를 일으키거나 독소, 발암물질 등을 생성해서 숙주의 노화 촉진 및 발암 등에 관여하여 유해하게 작용하는 세균류가 같이 존재한다(1). 장내균총은 유용균과 유해균으로 나눌 수 있으며 이들의 균형에 의해 건강상태가 조절된다(2). 건강하게 장수하려면 *Bifidobacterium* 등의 유익균이 많아야 하는 반면 *Clostridium perfringens* 등의 유해균이 적은 상태로 장내 균총을 유지시켜야 한다(3). 식이 조절에 의하여 유익균의 장내 증식을 촉진시키고 유해균을 억제하는 것은 실현성 있는 접근 방법 중의 하나이다(4). 한약재와 식물은 오래전부터 소화기계에 많이 사용되어지고 있고 해독작용과 항균 작용을 하는 것으로 알려지고 있다. Kim과 Shin(5)은 천연식물의 단독 또는 몇 가지 조합처리에서 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제하고 *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*의 성장을 촉진한다고 보고하였다. 따라서 장내균총 개선 인자를 천연소재에서 탐색, 이러한 영향인자들을 조절함으로써 장내균총의 균형을 이상적으로 유지시키려는 노력이 활발

하게 이루어지고 있다.

현대인의 질환 중에 많은 관심을 가지게 하는 것이 비만이다. 이러한 질환은 일반적으로 인체의 영양학적 대사의 불균형으로 발생하는 것으로 알려졌다. 그러나 최근 비만에 대한 미생물학적 접근, 특히 장내미생물에 대한 기능 분석에 대한 구체적인 연구를 통해 비만을 결정하는 장내 미생물군이 원인이라는 것을 밝혀졌다. Turnbaugh 등(6)은 비만과 관련된 원인 중의 하나가 사람의 장 속에서 서식하는 장내 미생물군이며, 장내 미생물의 종류가 달라짐에 따라 비만으로 진행되는 여부가 결정된다고 발표하였다. 12명의 비만 환자들을 대상으로 1년 동안 저지방, 저탄수화물 음식을 식이하도록 하면서 장내 미생물 군집의 대다수를 차지하는 Firmicutes문과 Bacteroidetes문의 비율을 서로 비교한 결과, Bacteroidetes의 증가세가 체중감소와 연관이 있음을 규명하였다(7). 비만 환자들의 장에 서식하는 미생물의 90% 이상이 *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* 등의 미생물이 속하는 Firmicutes문이고 *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. acidifaciens*, *B. distasonis* 등이 속하는 Bacteroidetes문은 5%에 단지 불과하였으나, 반면에 1년 동안 저지방, 저탄수화물 음식을 식이한 비만 환자의 경우 체중이 줄면서 장에 서식하는 Bacteroidetes 문이 점점 늘어나 20%에 달하여 정상 체중인 사람에서 나타나는 Bacteroidetes 분포와 유사하여 날씬한 사람들의 장내 세균총과 비슷하게 변화하였다(6). 또 Turnbaugh 등(6)은 다른 연구를 통해, 돌연변이 비만 쥐 실험을 통해 장내 미생물 종류의 변화만으로도 체중이 증가한다는 사실이 재차 확인하였다. Firmicutes에 노출된 쥐는 Bacteroidetes균에 노출된 쥐보다 실제로 실험 과정에서 지방이 늘어났다(6).

오미자는 오미자나무과(Schizandraceae)에 속하는 낙엽성 목본

*Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel: 82-43-261-2568
Fax: 82-43-271-4412
E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr
Received April 22, 2009; revised September 18, 2009; accepted September 19, 2009

인 덩굴식물이며 붉은 색의 과실은 생약재 및 식품원료로 이용하는 주요 약용식물이다(8). 오미자의 주성분은 schizandrol, schizandrin A, B, C, angeloylgomisins O, P, epigomisin, pregomisin, deoxyschizandrin 등의 lignan 화합물이며, 기름, 정유, 색소 등 다양한 성분이 함유되어 있고, 다양한 약리기능을 가지고 있어 생약재 및 식품 원료로 이용되고 있다(9). 오미자의 약리학적 작용에 관한 연구로는 Hikino 등이 간장보호작용(10)에 대하여 보고하였으며, Lee와 Lee(11)는 알콜 해독작용, Sheo 등(12)은 항당뇨 활성에 관하여 보고하였다. 또한 Moon(9)은 오미자의 혈당 저하작용이 유기산, 정유, 고질성 물질과 같은 여러 가지 성분에서 의한 것으로 주로 schizandrin 성분에서 의한 작용임을 보고하였다. Ko 등(13)은 오미자 분획물이 인슐린성 물질과 α -glucoamylase 억제제로서의 기능은 없지만 인슐린의 작용을 향상시키는 인슐린 민감성물질로서 효과가 있으며 제 2형 당뇨병 및 인슐린 저항성 증후군의 개선에 효과가 있을 것으로 보고한 바 있다. 오미자는 안토시아닌 뿐만 아니라 플라보노이드 및 유기산류 등이 풍부하여 예로부터 한방에서는 거담, 자양, 간장제 등으로 이용되었으며, 또한 간장 보호, 알콜 해독, 혈당 강화, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 완화, 면역 조절, 항암 및 항종양 등 다양한 생리적 활성을 나타낸다(14,15).

오미자는 전통적으로는 오미자차, 오미자 화채, 녹말다식 및 오미자주로 이용되어 왔으며, 최근에는 오미자를 첨가한 젤리, 스폰지 드링크, 요구르트, 김치, 소스 등이 개발되고 있어 건강기능성 측면에서 새롭게 주목받고 있다(15).

본 연구에서는 비만의 원인이 되는 *Eubacterium* spp.의 생육을 억제하고 비만 개선에 도움을 줄 수 있는 *Bacteroides* spp.을 증진시키는 소재를 탐색하였고, 이를 통해 선정된 오미자 열수 추출물을 이용하여 다른 장내 미생물에 대한 생육 저해 효과를 알아보고 동물 실험을 통해 장내 균총 변화를 확인하고자 하였다. 나아가 오미자 추출물을 첨가하여 비만과 더불어 장내 균총 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 음료를 제조하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물 제조

천연소재 30여종은 청주 인근 마트와 제천 약재시장에서 구입하여 사용하였으며, 본 실험에 사용한 천연소재 30여종은 Table 1에 나타내었다. 추출물 제조는 시료를 Blender(HALLDE MASK-INER, Kista, Sweden)를 이용하여 Standard Testing Sieve(APERTURE 1.70 mm, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)로 분쇄하였다. 15 g 분쇄시료의 20배 용매(열수, 80% ethanol)를 첨가하여 60°C에서 200 rpm에서 3시간 추출한 다음 원심분리(대용량 원심분리기, 한일 model Union55R, 3000 rpm, 10분)하여 상등액을 회전진공농축기(EYELA CCA-1110, Tokyo, Japan)로 40°C에서 농축하여 용매를 완전히 제거한 다음 초기시료와의 중량비로 추출수율을 계산하였고 일정량의 용매로 정용하여 100 mg/mL 농도로 일정하게 사용하였다.

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Eubacterium limosum* KCTC 3266, *Clostridium perfringens* KCTC 5101, *C. difficile* KCTC 5009, *Bacteroides fragilis* KCTC 3688, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3418을 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다. 사용 배지는 RCM media(Rein-

Table 1. Flora material used in study

	Scientific name
1	<i>Coix lachrymajobi</i> var. <i>mayuen</i>
2	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>
3	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver
4	<i>Sasa borealis</i> var. <i>gracilis</i>
5	<i>Hordeum vulgare</i> Linne
6	<i>Cornus officinalis</i>
7	<i>Schizandra chinensis</i>
8	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
9	<i>Perilla frutescens</i>
10	<i>Oenanthe javanica</i> Dc.
11	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>
12	<i>zingiber officinale</i>
13	<i>Cucurbita</i> spp.
14	<i>Hovenia dulcis</i>
15	<i>Zizyphus jujuba</i> var.
16	<i>Acanthopanax senticosus</i>
17	<i>Cassia obtusifolia</i>
18	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch
19	<i>Suaeda japonica</i>
20	<i>Chrysanthemum indicum</i>
21	<i>Atractylodes japonica</i>
22	<i>Carthamus tinctorius</i>
23	<i>Cinnamomum cassia</i>
24	<i>Curcuma aromatica</i>
25	<i>Brassica oleraceae</i> L.
26	<i>Massa Medicata Fermentata</i>
27	<i>Lycium chinense</i> Mill.
28	<i>Solanum melongena</i> L.
29	<i>Sinomenium acutum</i>
30	<i>Rehmannia glutinosa</i>

forced Clostridial Medium, Difco, Detroit, MI, USA), MRS Broth (DeMan, Rogosa, Sharpe broth, Difco), MRSA (DeMan, Rogosa, Sharpe Agar, Difco)를 사용하고 37°C에서 24시간 혐기 배양하였다.

항균성 소재 탐색

위에서 언급된 농축된 시료를 30% DMSO에 100 mg/mL 농도로 녹여 원심분리(Micro High speed centrifuge, Vision VS-15000CFN, 10,000 rpm, 5 min)하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 균은 한국생물자원센터에서 분양 받은 균을 활성화하여 650 nm에서 O.D. 값이 0.5가 되도록 하여 희석하여 10^2 cfu/mL 균을 사용하였다.

천연소재의 열수추출물과 80% 에탄올 추출물에 대한 96 well plate법을 이용한 미생물의 생육 저해율 측정은 96 well plate에 액체배지를 분주하고 시료를 15, 7.5, 3.75 μ L로 단계희석하고 10^2 농도로 희석된 균 100 μ L을 분주하여 0, 24 hr 배양 후 650 nm에서 O.D. 값을 측정하고 다음 식으로 생육저해율(%)을 확인하였다.

Inhibitory effect (%)

= {1 - (24 hr sample O.D. - 0 hr sample blank O.D.) /

(control O.D. - control blank O.D.)} \times 100

선정된 식품소재의 항균활성

한천배지확산법(disc plate method)을 이용한 항균활성: 천연소재 30여 종에 대한 탐색 결과 우수한 활성을 보인 오미자(경북 문경산)를 분쇄하여 냉동 보관하며 사용하였다. 소재탐색 방법과 동일한 방법으로 추출 후 농축한 오미자 시료를 각각의 추출용매로 녹여 100 mg/mL 농도로 제조하여 사용하였다. 균용 평판배지는 균을 활성 계대하여 각 배지의 3% 첨가하여 15-20 mL plate에 분주하였다.

Paper disc(ADVANTEC 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)에 100 mg/mL 농도의 샘플을 30 μ L씩 주입하여 건조한 다음 균용 평판배지에 부착 시킨 후, 혐기 배양장치(Mart Microbiology, ANOXOMAT WS80, Lichtenvoorde, The Netherlands)에서 37°C, 24 hr동안 배양한 후 paper disc 주위의 생육 저해 환 생성 유무를 확인하고 Vernier caliper(Mitutoyo, 560-110, N10, Kawasaki, Japan)로 환 크기를 측정하였다.

미생물의 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration) 측정: 미생물의 최소저해농도를 broth microdilution 방법(17)을 응용하여 다음과 같이 측정하였다. 각각의 균을 배양한 후 세균 배양액을 650 nm에서 O.D. 값이 0.4(10^6 CFU/mL)가 되게 조절한 후 96 well plate에 각 시험균 배양액을 100 μ L씩 분주하고, 각 시료를 0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/mL 농도로 100 μ L씩 처리하여 24시간 배양한 후 ELISA reader (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan)를 통해 650 nm에서 측정하여 비교 분석하였다.

선정된 식품소재의 기능성 분석

열처리에 따른 항균활성 측정: 선정된 소재로 최종적으로 기능성 음료를 만들것자 가공중의 온도변화에 따른 성분변화의 유무를 알아보기 위하여 항균활성과 동일하게 처리한 시료를 과채류 주스의 살균온도(18)인 96°C에서 15초를 기준으로 하여 고압멸균기를 이용하여 60, 70, 80, 90, 100°C에서 10분 동안 처리 하였다. 사용균주 준비 및 균용배지 제조는 항균활성실험과 동일하게 하였다. 한천배지확산법으로 항균활성과 동일하게 처리 후 열처리된 샘플을 각각 30 μ L 분주하여 말린 후 부착하여 열처리 온도별 환 생성 유무와 clear zone 크기를 측정하고 비교하였다.

열처리에 따른 총 폴리페놀 함량 측정: 총 폴리페놀 함량은 오미자 2 g에 물 40 mL를 첨가하여 60°C에서 3시간 추출한 추출물을 사용하였다. 처리 조건별 열처리 오미자 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(19)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 각 추출물 100 μ L에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL을 가한 후 3분간 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L를 가하였다. 30분 후, 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고, 표준물질로 tannic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

검량선을 작성 후 총 폴리페놀 함량은 시료의 100 g중의 mg tannic acid로 나타내었다.

열처리에 따른 DPPH에 의한 전자공여능 측정: 열처리된 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 의한 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 Choi(20) 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.00788 g을 99.9% ethanol에 용해하여 100 mL로 정용하여

60분 동안 충분히 용해 한 후 사용하였다. DPPH용액 0.8 mL에 시료 0.2 mL를 첨가한 후 실온에서 30분 방치하여 520 nm에서 흡광도 감소치를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

MTT assay에 의한 세포독성

농축된 오미자 열수추출물을 증류수에 녹여 사용하였다. MEM 배지로 희석하여 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL 농도로 제조하였다. 실험에 사용된 세포는 소장상피세포 정상세포인 Caco-2 cell을 MEM(Modified Eagle's medium, GIBCO, USA)배지에 10% FBS (Fetal bovine serum, Hyclone, USA), 1% 5 mM non-essential amino acid(NEAA, GIBCO, NY, USA), 1% Penicillin-streptomycin(GIBCO, USA)을 포함시켜 37°C, 5% CO_2 Incubator에서 배양하여 세포를 활성화시킨 다음 living cell을 mitochondria의 succinyl dehydrogenase에 의해 yellow-MTT를 비수용성인 purple formazan으로 환원시킨 후, 이 formazan의 발색을 ELISA reader로 측정하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co. USA)시약은 PBS에 5 mg/mL가 되도록 녹여 냉장 보관하면서 사용하였다.

Caco-2 cell을 2×10^5 cells/mL의 농도로 하여 96-multi well plate의 각 well에 100 μ L씩 분주하고, 48시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 새로운 배지로 교환하고 추출물을 일정농도로 처리하고 24시간 세포를 배양하였다. 각 well에 MTT시약(5 mg/mL in PBS)을 20 μ L씩 처리하고 4시간 배양하고, 상등액을 버리고 100% DMSO를 150 μ L씩 처리하여 잘 섞어준 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 측정하였다.

$$\text{Antiproliferative activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

동물 실험

동물사료는 Rodent Diet with 45%Kcal Fat을 사용하였다. 실험 동물은 5주령의 Sprague-Dawley계의 흰쥐(Charles River Laboratory Inc., USA) 24마리를 구입하여 일주일간 일반식으로 적응시킨 후, 일반식이 control 군을 제외한 나머지 군에 고지방식이(High-fat-diet)를 하였고, 고지방식을 하면서 *In vitro* test를 통하여 선발된 식품 소재인 오미자 열수추출물을 하루에 0.5 g/kg 투여하고 일주일에 2번 체중변화를 측정하였다. 6주 후 부검 12시간 전 절식을 하였다. 부검 전 최종무게를 측정하였다. 장내균총의 변화는 맹장을 취한 후 0.85% NaCl 희석액에 넣어 균질화하고 Mitsuoka 방법(2)에 따라 실험하였고 각 군 특성에 맞는 배지와 배양방법에 따라 배양하였다. 배지에 나타난 집락들에 대하여 Mitsuoka의 방법(2)에 따라 집락 모양과 균의 형태 등을 조사함으로써 속(genus)을 동정하였고 각각의 균수를 측정하여 장내균총 변화를 확인하였다.

기능성 음료 제조 및 관능검사

자작나무 수액(*Betula platyphylla* Sap)은 충북 월악산 부근의 농가에서 채취되어 냉동보관된 것을 4°C에서 완전히 해동시킨 후 사용하였다. 자작나무수액에 오미자추출물과 xylitol을 혼합하여 membrane filter kit(pore size 0.22, Corning, NY, USA)를 사용하여 여과하였다. 각 샘플은 Table 2에 나타내었다. 음료의 관능적 특성은 충분한 훈련을 거쳐 품질 차이를 식별할 수 있는 능력이 갖추어진 16명을 선발하여 실시하였다. 평가방법은 색(color), 맛(taste), 향(flavor) 그리고 전체 기호도(overall acceptance)에 대하여 9점 기호 척도법을 이용하여 실시하였으며, 관능 검사 항목에 대하여 평가하였다.

Table 2. Production of *Betula platyphylla* sap containing sugars and *Schizandra chinensis* water extracts

Sample	A	B	C	D
<i>Betula platyphylla</i> sap	100%	100%	100%	100%
<i>S. chinensis</i> water extract	5%	10%	5%	10%
xylitol	3%	3%	5%	5%

통계분석

실험결과에 대한 통계분석은 SAS program(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균값으로 나타냈으며 one-way ANOVA로 처리한 후 Duncan's multiple range test법에 의해 실험군 간의 차이를 검증하고, p 값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

항균성 소재 탐색

기존에 항균력이 있다고 보고 되어진 식품 소재를 선정하여 96 well plate법으로 80% ethanol과 열수 추출물의 항균활성 알아본 결과는 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 오미자 80% ethanol 추출물이 *Eubacterium limosum*을 46% 억제시키고, *Bacteroides fragilis*를 -89%로 증진시켰다. 그리고 오미자 열수 추출물이 *E. limo-*

*sum*을 97% 억제시키고, *B. fragilis*을 100% 억제시켰다. 그리하여 *E. limosum*을 억제시키고 *B. fragilis*를 증진시키는 소재로 오미자 (*Schizandra chinensis*)가 선정되었다. 그 밖에 오미자의 항균력을 알아보기 위해 96 well plate법을 통해 *Clostridium perfringens*와 *Bifidobacterium bifidum*에 대한 항균활성을 알아보았다. 그 결과, 장내균총 중 유해균인 *C. perfringens*를 억제하고 유익균인 유산균 *B. bifidum*을 증진시켰다.

선정된 식품소재의 항균활성

한천배지확산법(disc plate method)을 이용한 항균활성 96 well plate를 이용하여 screening한 결과 오미자가 선정되었고, 선정된 오미자로 paper disc법을 이용하여 *E. limosum*과 *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. bifidum*에 대해 항균활성을 실험한 결과, 오미자 80% ethanol, 열수 추출물 모두 *E. limosum*과 *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*에 대한 항균활성 결과로 clear zone이 생성되었고, *B. bifidum*에 대한 항균활성은 나타나지 않았다. 결과는 Fig. 3, 4에 나타내었고 clear zone의 크기는 Table 3에 나타내었다. 또한 오미자의 경우 다른 유해균의 항균성을 살펴보면, 오미자 에탄올 추출물이 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*(21) *Vibrio parahaemolyticus*, *Helicobacter pylori*(22)에 대한 항균활성이 있다고 보고되어졌다.

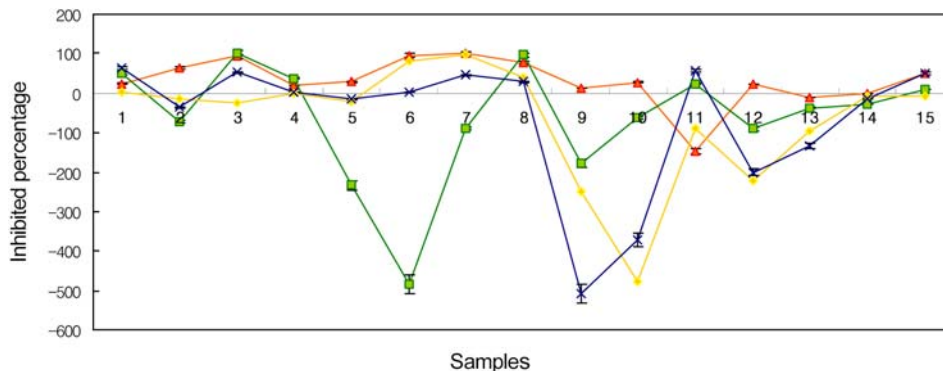


Fig. 1. Antibacterial activities of flora material extract. -▲-, Antibacterial activities of flora material water extract against *Bacteroides fragilis*; -■-, Antibacterial activities of flora material 80% ethanol extract against *Bacteroides fragilis*; -◆-, Antibacterial activities of flora material water extract against *Eubacterium limosum*; -×-, Antibacterial activities of flora material 80% ethanol extract against *Eubacterium limosum*.

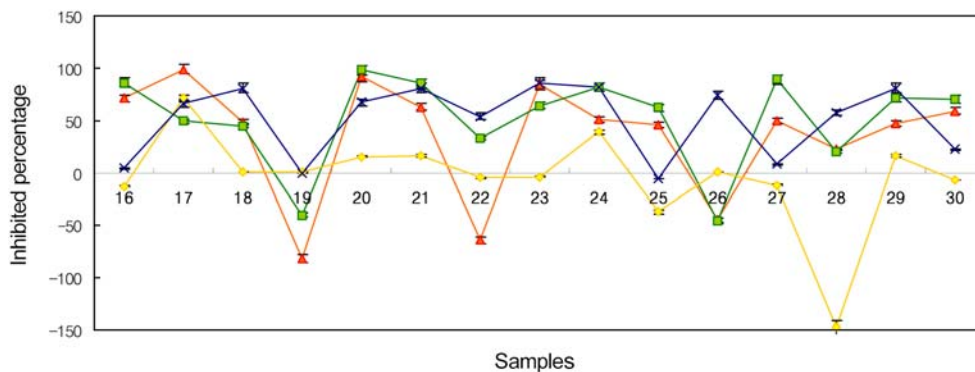


Fig. 2. Antibacterial activities of flora material extract. -▲-, Antibacterial activities of flora material water extract against *Bacteroides fragilis*; -■-, Antibacterial activities of flora material 80% ethanol extract against *Bacteroides fragilis*; -◆-, Antibacterial activities of flora material water extract against *Eubacterium limosum*; -×-, Antibacterial activities of Flora material 80% ethanol extract against *Eubacterium limosum*.

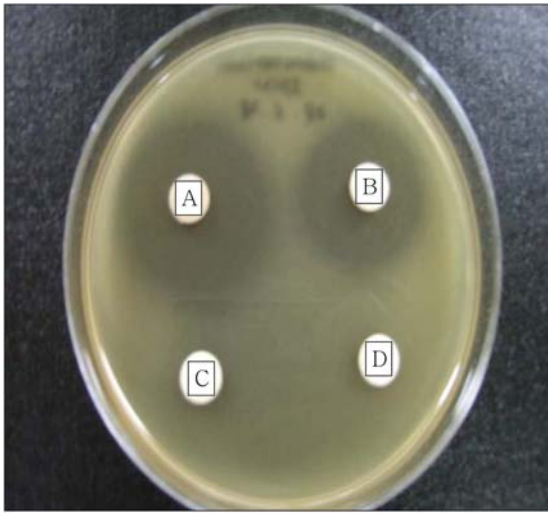


Fig. 3. Antimicrobial activities of *Schizandra chinensis* extracts against *Eubacterium limosum*. A, *S. chinensis* 80% ethanol extract; B, *S. chinensis* water extract; C, 80% ethanol Control; D, water control.

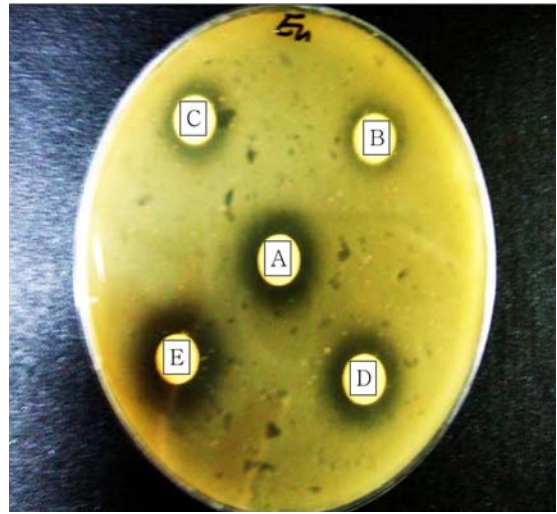


Fig. 5. Heat stability of the *Schizandra chinensis* water extracts against *Eubacterium limosum*. A, 60°C; B, 70°C; C, 80°C; D, 90°C; E, 100°C.



Fig. 4. Antimicrobial activities of *Schizandra chinensis* water extract against *Clostridium perfringens*. A, Water control.

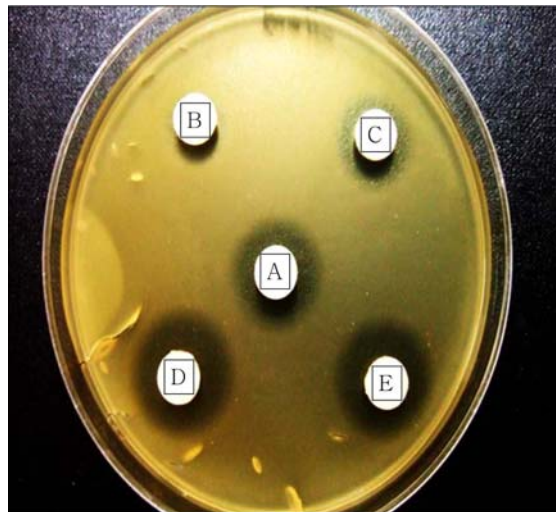


Fig. 6. Heat stability of the *Schizandra chinensis* water extracts against *Clostridium difficile*. A, 60°C; B, 70°C; C, 80°C; D, 90°C; E, 100°C.

Table 3. Antimicrobial activity of the *Schizandra chinensis* extracts

Microorganisms	Clean zone (mm)		
	80% ethanol extract	Water extract	Control ¹⁾
<i>Eubacterium limosum</i>	30.95±0.07 ³⁾	25.55±2.40	ND
<i>Bacteroides fragilis</i>	27.23±0.32	23.60±0.85	ND
<i>Clostridium perfringens</i>	13.65±1.63	16.48±1.59	ND
<i>Clostridium difficile</i>	15.85±2.05	14.40±2.26	ND
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ND ²⁾	ND	ND

Concentration of sample was 100 µg/mL.

¹⁾80% ethanol, and water control

²⁾Not detected.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

MIC(minimum inhibitory concentration) 측정

오미자 추출물의 미생물에 대한 최소화해농도(MIC) 측정은 오

미자 추출물 중 *E. limosum*, *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*에 대한 항균력을 가지고 추후에 기능성 음료화하기 유용한 오미자 열수 추출물을 가지고 하였다. 오미자 열수 추출물을 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 µg/mL의 농도로 실험한 결과, *E. limosum*, *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile* 4균주 모두 1.00 µg/mL 농도가 최소화해농도로 나타났다.

선정된 식품소재의 기능성 분석

열처리에 따른 항균활성 측정: 열처리에 따른 오미자의 열수 추출물의 항균활성은 Fig. 5, 6과 Table 4와 같이 *C. perfringens*는 높은 온도로 처리할수록 clear zone 크기가 증가하였다. *C. perfringens*를 제외한 3균주는 70°C에서 clear zone이 감소하는 추세였고 80°C 이상의 온도에서는 clear zone이 증가하였다. 그러므로 오미자의 살균처리 시 80°C 이상에서 처리할 수 록 항균활성이 좋은 것으로 사료된다. 또한 오미자 추출물의 항균활성을 보고한 Chung 등(22)의 보고에 의하면 60-120°C의 범위에서 1시간씩 처

Table 4. Heat stability of the *Schizandra chinensis* water extract

Microorganisms	Clean zone (mm)				
	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
<i>Eubacterium limosum</i>	13.85±0.78 ¹⁾	11.78±0.53	13.03±0.25	15.00±0.85	15.83±0.04
<i>Bacteroides fragilis</i>	14.20±0.57	10.43±0.18	12.90±0.57	12.25±0.35	16.23±0.04
<i>Clostridium perfringens</i>	11.15±0.71	12.28±1.52	11.88±1.03	12.53±0.04	12.70±0.42
<i>Clostridium difficile</i>	15.93±0.95	11.70±0.14	14.58±1.38	16.90±2.40	17.75±0.78

Concentration of sample was 100 µg/mL

¹⁾Values are mean±SD (n=3)

Table 5. Total polyphenol compound content of *Schizandra chinensis* extract

Extraction conditions	Content (mg/g)
60	7.57±0.00 ^a
70	7.65±0.00 ^a
80	8.02±0.01 ^b
90	7.65±0.00 ^a
100	7.84±0.01 ^{ab}

¹⁾Values are mean±S.D. of triplicate analyses (n=3).

²⁾Any means in the same column followed by the same letter are not significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test

Table 6. Antioxidant activities of water extract from *Schizandra chinensis*

Extraction conditions	EDA (%)
60	48.11±0.25 ^b
70	48.79±1.02 ^b
80	47.64±0.37 ^b
90	47.95±2.30 ^b
100	44.43±0.33 ^a

¹⁾Values are mean±SD of triplicate analyses (n=3).

²⁾Any means in the same column followed by the same letter are not significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test.

리한 후 항균력을 측정할 경우 항균력의 변화가 관찰되지 않았다. 그러므로 오미자의 추출물 중에 존재하는 항미생물 활성물질이 열에 매우 안정한 물질임을 나타내준다고 생각된다.

열처리에 따른 총 폴리페놀 함량 측정: 페놀화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화효과 등의 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있어(20), 오미자 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 조사하였다. 60-100°C에서 10°C씩 변화를 주어 실험을 한 결과, 7.50 mg/g의 이상의 폴리페놀 함량이 나타내었다. 또한 Table 5에서 보는 바와 같이 10°C씩 열처리의 변화를 주었을 때도 폴리페놀 함량이 줄어들지 않고, 비슷한 함량을 나타냈으며 약간의 총 폴리페놀 함량이 늘었는데, 이는 Lee 등(23)의 연구 결과로 미루어 볼 때 열처리에 따른 총 폴리페놀 함량의 증가는 단백질과 결합된 고분자의 페놀성화합물이 열처리에 의해 저분자의 페놀성화합물로 전환되었거나, 열처리에 의해 이들 페놀화합물이 생성되었기 때문이라 생각된다. 이 결과로 미루어 볼 때 음료 제조 시 살균 처리되는 열에 안정하다고 볼 수 있다.

열처리에 따른 DPPH에 의한 전자공여능 측정: 열처리에 따른 오미자 추출액의 DPPH 라디칼을 이용한 전자공여능(EDA %)을 측정할 결과는 Table 6과 같이 오미자 열수 추출물 10 mg/mL의 농도에서 60-90°C에서 열처리 시 비슷하게 유지되는 경향을 나타내었다(p<0.05). 100°C 처리에서는 60-90°C 처리 보다 낮은 44.43%로 감소하는 것으로 나타나 100°C의 고온으로 처리할 경우 유효성분들이 파괴되는 것으로 생각된다.

MTT assay에 의한 세포독성: 소장 정상상피세포에 대한 오미자 열수 추출물의 독성을 알아보기 위해 추출물을 일정한 농도(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL)로 처리한 결과 모두 세포 증식을 억제하지 않았다. 즉, 오미자 열수 추출물은 소장 정상상피세포에 대한 독성효과가 없다.

Table 7. Effects of *Schizandra chinensis* on body weight gain and epididymal adipose in the rats

Group	Body weight change		
	Initial weight (g)	Final weight (g)	Final/Initial
Normal ¹⁾	223.9±8.3 ^a	377.9±18.3 ^a	1.69±0.08
Control ²⁾	227.4±6.9 ^a	409.8±25.7 ^b	1.80±0.09
Extract 0.5 g/kg	239.3±9.3 ^b	408.7±35.9 ^c	1.83±0.15

Values are mean±SE of 8 rats.

Any means in the same column followed by the same letter are not significantly (p<0.05) different by Duncan's multiple range test

¹⁾Normal: commercial food

²⁾Control: high-fat-diet

동물 실험

실험동물의 체중변화는 Table 7에서 보는 바와 같이 control인 high-fat-diet rats의 체중과 오미자 추출물을 경구 투여한 rats의 체중이 거의 차이가 나타나지 않았다. 이는 경구 투여기간이 6주로 짧았기 때문에 체중 차이가 나타나지 않은 것으로 사료된다. 장내균총의 결과는 Table 8에 나타난 바와 같이 *Bifidobacterium*의 경우 오미자 열수 추출물 비투여군인 비만 control군 보다 투여군에서 균총 비율이 9.30%에서 16.92%로 확연하게 증가하였다. 한편 장내 대표적인 유해균인 *Clostridium*은 비만 control군에서 보다 투여군에서 균총 비율이 19.77%에서 7.38%로 현저히 감소하였다. 또한 *Staphylococcus*, *Streptococcus* 등의 생육을 억제하는 것으로 나타났고, 투여군에서 *Lactobacillus*의 비율이 줄어들었고 *Eubacterium*의 경우 균총 비율이 감소하였다. *Bacteroidaceae*의 비율도 줄었는데 이는 *in vitro* 실험 결과와 상응되는 결과로 억제 효과가 있으나 유익균의 비율이 감소하였는지 유해균의 비율이 감소하였는지 판단이 어렵기에 더 많은 연구가 필요하다.

따라서 오미자 열수 추출물이 *in vivo* 실험에서 가장 대표적인 유해균인 *Clostridium*의 억제와 유익균으로 널리 알려진 *Bifidobacterium*의 증진으로 장내균총을 개선시키는 효과가 있다. 따라서 유해균인 *Clostridium*의 억제와 비만의 원인균으로 밝혀진

Table 8. Analysis of intestinal microflora in the rats fed with *Schizandra chinensis* extract

(CFU/mL)

	Normal ¹⁾		Control ²⁾		Extract	
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.3×10 ⁷	(0.68) ²⁾	4.2×10 ⁸	(9.77)	3.5×10 ⁹	(53.85)
Yeast	2.8×10 ⁶	(0.15)	2.9×10 ⁸	(6.74)	1.6×10 ⁸	(2.46)
<i>Bifidobacterium</i>	4.1×10 ⁸	(21.58)	4.0×10 ⁸	(9.30)	1.1×10 ⁹	(16.92)
<i>Staphylococcus</i>	1.0×10 ⁸	(5.26)	2.1×10 ⁷	(0.49)	4.7×10 ⁵	(0.01)
<i>Clostridium</i>	6.8×10 ⁷	(3.58)	8.5×10 ⁸	(19.77)	4.8×10 ⁸	(7.38)
<i>Streptococcus</i>	5.0×10 ⁶	(0.26)	1.0×10 ⁹	(23.26)	3.0×10 ⁶	(0.05)
<i>Bacillus</i>	1.1×10 ⁸	(5.79)	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	7.6×10 ⁸	(40.00)	2.9×10 ⁸	(6.74)	2.3×10 ⁸	(3.54)
<i>Bacteroidaceae</i>	-	-	3.6×10 ⁸	(8.37)	3.8×10 ⁸	(5.85)
<i>Eubacterium</i>	-	-	2.5×10 ⁸	(5.81)	3.0×10 ⁸	(4.62)
Gram negative rods	4.2×10 ⁸	(22.11)	8×10 ⁸	(18.60)	-	-
Total	1.9×10 ⁹	(100) ³⁾	4.3×10 ⁹	(100)	6.5×10 ⁹	(100)

¹⁾Normal: commercial food

²⁾Control: high-fat-diet

³⁾Percentage about number of selected stains in test strains

Table 9. Sensory evaluation of *Betula platyphylla* sap containing sugars and *Schizandra chinensis* water extract (panel: 16)

Sample	A	B	C	D
Color	4.94±1.84 ^a	5.25±1.54 ^a	5.63±1.86 ^{ab}	6.81±1.97 ^b
Flavor	4.25±1.61 ^a	4.69±1.18 ^a	5.06±1.77 ^a	4.75±1.5 ^a
Sour	4.19±1.48 ^a	4.31±1.52 ^a	5.19±1.82 ^a	5.06±2.09 ^a
Sweet	4.44±1.41 ^a	4.31±1.21 ^a	6.44±1.71 ^b	4.81±1.87 ^a
overall	4.81±1.33 ^a	4.63±1.39 ^a	6.68±1.54 ^b	5.44±1.67 ^a

Any means in the same column followed by the same letter are not significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test

*Eubacterium*의 억제 효과, *Bacteroidaceae*의 억제 효과와 유익균으로 널리 알려진 *Bifidobacterium*의 증진으로 *in vitro* 실험과 같은 결과로 비록 비만과 관련된 균 사이의 영향에 결론을 내릴 수는 없지만, 오미자가 장내 균총을 유익한 균총으로 개선시키는 식품으로 가능성이 있다고 생각된다.

기능성 음료 제조 및 관능검사

오미자 열수 추출물을 이용하여 제조한 음료에 대한 관능평가 결과는 Table 9와 같다. 관능평가 항목인 색은 sample D가 6.81, 향은 sample C가 5.06, 신맛은 sample C가 5.19, 단맛은 sample C가 6.44로 비교적 높은 점수로 나타났으며, 전반적 기호도는 sample C가 6.68로 다른 sample에 비해 높은 점수를 받았다 ($p < 0.05$).

그러므로 5% xylitol, 5% 오미자 열수 추출물을 첨가한 sample C가 관능적으로 우수함을 보여 앞으로 맛과 기능성을 가미한 음료의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 비만의 원인 중 하나인 장내균총의 변화를 개선하고자 *in vitro* 상에서 천연소재를 탐색하였고 선발된 소재인 오미자로 항균활성과 기능성을 분석하고 세포에 대한 독성 및 동물 실험을 수행하였다. 나아가 풍미증진과 기능성 가미를 위한 오미자 열수추출물을 첨가한 음료로의 개발 가능성을 확인하고자 하였다. 96 well plate법을 이용하여 screening한 결과, 유익균

인 *B. fragilis*와 *B. spp.*의 활성을 증진시키고, 유해균인 *E. limosum*과 *C. perfringens*을 억제시키는 오미자를 선발하였다.

오미자 열수 추출물의 항균활성을 paper disc method를 이용하여 실험한 결과 *E. limosum*, *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*에 대한 항균력을 가지고 *B. bifidum*에 대한 항균력은 나타나지 않았다. 이 결과를 바탕으로 MIC를 측정된 결과, *E. limosum*, *B. fragilis*, *C. perfringens*, *C. difficile*를 오미자 열수 추출물 1 µg/mL의 농도에서 최소 저해 하였다. 기능성을 가진 오미자 열수추출물을 이용한 음료로의 제품화를 위해 과채류 주스의 살균온도인 96°C, 15초를 기준으로 60-100°C에서 10°C씩 변화를 주어 10분씩 처리하여 실험한 결과, 항균활성의 경우 대체로 안정하였고 큰 항균력을 위해서는 80°C 이상 살균 처리하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 또한 열처리에 따른 총 폴리페놀 함량과 전자공여능을 이용한 항산화력의 변화를 측정된 결과 대체로 안정하였다. 이는 음료 개발에 있어서 중요한 이점이 될 것으로 사료된다. 또한 열처리에 따른 항균활성과 항산화력을 나타내는 폴리페놀 함량과 전자공여능을 비교해봤을 때 서로 비례하는 것으로 보아 폴리페놀 함량과 전자공여능의 함량이 항균활성에 관련이 있을 것으로 사료된다. 소장상피세포에 대한 독성 유무를 확인하기 위해 소장상피 정상세포인 Caco-2에 대한 오미자 열수 추출물의 독성 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과 고농도인 5 µg/mL에서도 세포에 영향을 주지 않았다. 이 결과를 통해 미루어 볼 때 동물 실험하기 전, *in vitro* 상에서 오미자 추출물이 세포에 영향을 주는지 여부를 판단한 것으로 다음 진행되는 동물 실험에 대한 오미자 추출물의 안정성을 확인하였다. 동물 실험은 high-fat-diet rats에 오미자 열수 추출물을 0.5 mg/kg/day 투여한 경우 체중증가에 영향을 미치지 않았다. 장내미생물 균총 변화에서 control군과 extract 투여군을 비교한 결과, *in vitro* 실험결과와 같이 *Bifidobacterium spp.*를 7.62% 증진시키고 *Clostridium spp.*를 12.39% 감소시켰다. 또한 비만과 관련된 *Eubacterium*을 억제시켰다. 이는 오미자가 유익균을 증진시키고, 유해균을 감소시키는 장내 균총을 유익한 균총으로 개선시키는 식품소재로 이용이 가능할 것으로 기대된다. 오미자 추출물을 첨가한 음료의 관능평가 결과 인체 내에 부족하기 쉬운 미량 영양소를 보충해주는 자작나무수액에 장내 균총 변화에 영향을 주는 오미자 추출물과 기능성 올리고당인 자일리톨을 첨가하여 관능평가한 결과 전반적 기호도는 자작나무수액 100%, 오미자추출물 5%, 자일리톨 5%을

첨가한 sample C가 6.68로 다른 sample에 비해 높은 점수를 받았다($p < 0.05$). 그러므로 5% xylitol, 5% 오미자 열수 추출물을 첨가한 sample C가 관능적으로 우수함을 보여 앞으로 맛과 기능성, 풍미를 가미한 음료로의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부·한국산업기술진흥원의 지역혁신센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터와 농림수산식품부의 농림기술개발과제(과제번호: 107056-3)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412 (1995)
- Mitsuoka T. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1: 3-24 (1982)
- Mitsuoka T. *The Intestinal Flora and Bioherotaxis*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan (1989)
- Shin H-K, Shin O-H, Koo Y-J. Effects of potato protein on the growth of *Clostridium perfringens* and other intestinal microorganisms. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 249-256 (1992)
- Kim JD, Shin TS. The growth promoting effect of *Bifidobacterium bifidum* by combination of natural products bearing antioxidative capacity. *Korean J. Microbiol. Biotech.* 30: 388-394 (2002)
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031 (2006)
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023 (2006)
- Kim KS, Park CG, Ryu SN, Bang JK, Lee BH. Schizandrin, oli compounds, and their extraction yield in fruits of *Schizandra chinensis* Baillon. *Korean J. Crop Sci.* 45: 158-162 (2000)
- Moon KS. *Ingredients and applications of medicinal plants*, science encyclopedia. Ilwol, Co., Ltd., Seoul. pp. 247-251 (1999)
- Hikino H, Kios Y, Takuchi H, Ikeya Y. Validity of the oriental medicines 60. Liver-protective drugs II, Antihepatotoxic action of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Med.* 50: 213-216 (1984)
- Lee JS, Lee SW. Effect of water extract in fruits of *omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. *Korean J. Diet. Culture* 5: 259-262 (1990)
- Sheo HJ, Lee MY, Hwang JS. Effect of *Schizandrae fructus* extract on blood constituents of alloxan-induced diabetes rabbits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 16: 262-268 (1987)
- Ko BS, Park Sk, Choi SB, Jun DW, Choi MK, Park SM. A study of hypoglycemic effects of crude extracts of *Schizandrae fructus*. *J. Korean Soc. Appl. Bio. Chem.* 47: 258-264 (2004)
- Mok CK. Quality characteristics of instant tea prepared from spray-dred *omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) extract grape juice mixture. *Food Eng. Prog.* 9: 226-230 (2005)
- Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids, and tannins in the extracts of *L. chinensis* M, *A. acutiloba* M, *S. chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 76-81 (1990)
- Yoon SS. *Korean food (history and cooking)*. Suhak Co., Seoul, Korea. p. 372 (1982)
- Amster D. *Susceptibility Testing of Antimicrobial in Liquid Media*. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA. pp. 52-111 (1996)
- Koseoglu SS, Lawhon JT, Lusas EW. Vegetable juices produced with membrane technology. *Food Technol.* 45: 124-128 (1991)
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 50: 4959-4964 (2002)
- Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. The antioxidant activities of the some commercial teas. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727 (2003)
- Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ. Biological activity of *omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) extract. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 193-203 (2007)
- Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of *omija* (*Schizandra chinensis*) extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 127-132 (2001)
- Lee SC, Jeong SM, Kim SY, Park HR, Nam KC, Ahn DU. Effect of far-infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extracts from peanut hulls. *J. Agr. Food Chem.* 94: 489-493 (2006)