

장내 유용세균 *Clostridium butyricum* KCTC 1785의 성장을 촉진시키는 항산화 천연산물의 조합구성

김 종 덕

여수대학교 생명·화학공학부

The Growth Promoting Effect of Useful Enterobacteria *Clostridium butyricum* KCTC 1785 by Combination of Natural Products Bearing Antioxidative Capacity

Jong-Deog Kim

Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu City, Jeonnam 550-749, Korea

Abstract

The growth promoting effect of *Clostridium butyricum* KCTC 1785 was investigated with natural products bearing antioxidative capacity, and combined two, three and four kinds of them. *C. butyricum* was showed a good growth by *Lycii fructus*, *Sophorae flos*, *Chelidonium majus* L., *Atractylodis rhizoma alba*, *Paeonia japonica*, alone, and two mixed combinations were composed of *Paeonia japonica* and *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Aurantii nobilis pericarpium*, *Paeonia japonica* and *Puerariae radix*, *Paeonia japonica* and *Angelicae gigantis radix*, and three mixed combinations were organized with *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Nelumbo nucifera gaertner*, and *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Scutellaria baicalensis george*, and *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Theae folium*, and *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Angelicae gigantis radix*, and four mixed combinations were formed with *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Paeonia japonica*, and *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Theae folium*, and *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Angelicae gigantis radix*, and *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*. As these combinations of natural products could activate some parts of body, they might be applied to pharmaceutical applications, functional foods, antiaging tea, also expected to promote useful enterobacterial growth for multifunctional fermentative beverage.

Key words – Antioxidative capacity, natural product, combination, growth promotion, *C. butyricum*

서 론

생체 내의 정상적인 대사 과정으로부터 생산되는 활성

산소 (free radical)는 아주 반응성이 높아, Fig. 1에서 보는 바와 같이 세포 내적인 요소, 세포외적인 요소 그리고 세포 내·외적인 요소들로부터 조직의 손상을 가져옴으로써, 세포의 기능을 저하시키거나 괴사시켜 조직의 기능 저하 및 질병의 과정을 밝게 되며[15,17,23,14,18-20], alcoxyl radical (RO), singlet oxygen (1O_2), peroxy nitrite anion (ONOO),

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-61-659-3305, Fax : 82-61-659-3305
E-mail : pasteur@yosu.ac.kr

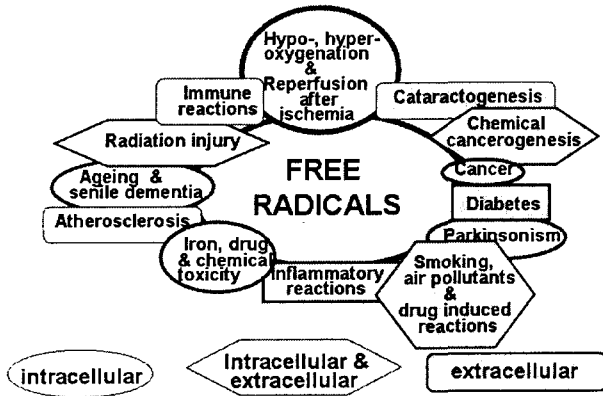


Fig. 1. Pathological conditions of a free radical component and sites of ROS actions.

peroxyl radical (ROO), nitric oxide (NO), semiquinone radical, hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻), hypochlorous acid (HOCl) 등의 free radical을 예로 들 수 있다[4,6,13,24,29].

이러한 ROS (reactive oxygen species)는 생체에 존재하는 효소적 항산화제만으로는 소거하기가 어려우므로 안전성이 높은 천연 항산화제를 투여하여 소거활성을 높일 필요가 있으며, 항산화제를 운용함에 있어 ROS 소거 기능 이외에도 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 다기능성 항산화제의 개발은 그 용도를 다양하게 할 수 있다. 그 중의 한 방향으로 생체내의 유용세균의 활성을 증가시켜 장의 기능을 향상시키기 위하여 *Clostridium butyricum*의 활성을 증가시킬 수 있는 천연산물의 조합을 구성하고자한다. *C. butyricum*은 butyric acid를 생산하고 포자를 형성하며, 사람이나 동물의 장에서 발견되는 probiotic 효과를 지니는 세균이다. 뿐만 아니라 *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp. 및 *Vibrio* sp. 에 대하여 antagonistic 효과를 나타내기도 하는 생체의 유용균이며[21], 일본의 TOA 제약회사에서는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, 및 *B. breve* 등의 유산균과 *C. butyricum* 과 같은 낙산균, *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus* 및 *B. natto* 등의 당화균의 상관관계를 이용한 BIO3를 개발하여 다방면으로 이용하고 있다. 최근에는 *C. butyricum*은 short chain fatty acids (SCFAs)을 많이 생산하며[3,2], 이 물질들은 생체의 위장병의 치료에 좋은 효과를 보인 결과도 있으

며, *Escherichia coli* O157의 균의 성장을 억제하는 것으로 나타났다[21]. 우리나라에서도 어린이들의 정장제로서도 많이 이용되고 있어 이 균주의 활성증가를 위한 천연산물의 조합 구성은 장의 활성화와 더불어 천연산물의 약효를 이용할 수 있는 장점이 있으며, 또한 천연산물의 항산화력을 이용함으로써 생체에 유해한 free radical을 소거 할 수 있음으로써 다기능성의 새로운 소재를 개발 할 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

사용균주

장내 유용 균주로는 *C. butyricum* KCTC 1785를 KTCC로부터 분양 받아 사용하였다.

재료 및 시약

균주의 성장에 필요한 배지로서는 *Clostridium acetobutylicum* (CAB)배지 (yeast extract 4.0 g, tryptone 1.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, asparagine 0.5 g, 0.2% resazurin 1.0 mL, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnSO₄ · H₂O 0.1 g, NaCl 0.1 g, glucose 30 g, distilled water 1.0 L, pH 5.4)를 사용하였고, 250 mL의 flask에 100 mL의 배양액을 넣고 37°C에서 150 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

천연산물의 선별

천연산물의 선별은 동의보감(東醫寶鑑)[7], 증맥·방약합편(證脈·方藥合編)[9], 한방처방의 구성과 적용(韓方處方的構成과 適用)[16], 도해상용한방처방(圖解 常用漢方處方)[5], 현대한방강좌(現代韓方講座)[22], 현대생약학(現代生藥學)[27] 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 1시간동안 열수 추출한 여액을 500 mL로 농축하여 사용하였다. 한가지의 천연산물을 사용할 때는 각 천연산물 추출액을 사용하였고, 두가지의 천연산

물의 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 량에 따라 사용하였다.

장내 유용세균 *C. butyricum*의 활성을 증가시키는 천연산물군의 탐색

*C. butyricum*의 배양은 250 mL 삼각 플라스크에 한가지, 두가지, 세가지 및 네가지 종류의 천연산물의 조합 시료 3 mL와 CAB 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 탈기 시키고, 전배양한 균주를 0.1% 접종하여 37°C에서 혐기 배양하면서 6시간 간격으로 질소 가스가 충전된 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[18]은 100 mL의 flask에 linoleic acid 1 g과 tween40 용액을 2 mL 넣고 천연산물을 열수 추출한 시료 3 mL를 첨가하고 증류수로 최종량을 30 mL로 조정한 후, 37°C의 항온조에서 Fe^{2+} 을 첨가하고 D.O. meter (TPS, Model WP-82, Australia)를 사용하여 D.O.의 감소에 따른 AUC (area under curve)를 구하여 항산화력을 비교하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical 소거 활성[3,8,12]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 malondialdehyde

를 1.0%의 TBA (thiobarbituric acid) 용액 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 phenol 함량 및 방향족의 측정

항산화력은 phenol성 화합물에서 강하며, 또한 방향족 화합물의 량에 의하여 결정되므로 추출물 일정량을 분광광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도 측정하여 방향족 화합물의 함량을 측정하고, 총 phenol 함량의 분석은 Folin-Denis법[1]을 개량하여 측정한 후 tannic acid의 검량선으로부터 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 대응 할 수 있을 것으로 사료되었으며, 상백피(*Mori cortex radices*: 723.28), 연자육(*Nelumbo nucifera 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 대응뿐만 아니라, ROS 제거를 위한 생체투여가 가능한 물질도 많음을 알 수 있었으며, 유산균 발효유, 식품보존제 및 항노화 제제 등의 다방면으로 사용이 가능할 것으로 판단되며 구체적인 30종류의 천연산물 AUC는 전보에 수록하였다[10].

천연산물들의 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과

한 종류의 천연산물로부터 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과를 대조군과 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. *C. butyricum*을 CAB Medium에서 배양하였을 때, 구기자, 괴화, 백굴채, 백작약, 백출, 음양곽, 석창포, 진피, 당귀, 황금 및 오가피 등의 천연산물을 첨가한 균주가 대조군보다 성장이 좋은 것으로 나타났으며, 이들의 생체에 대한 효과를 보면, 구기자(枸杞子)는 간과 신장 그리고 정력을 도우고(益精), 괴화(槐花)는 오장의 기생충을 죽이고(殺五臟蟲), 혈루성

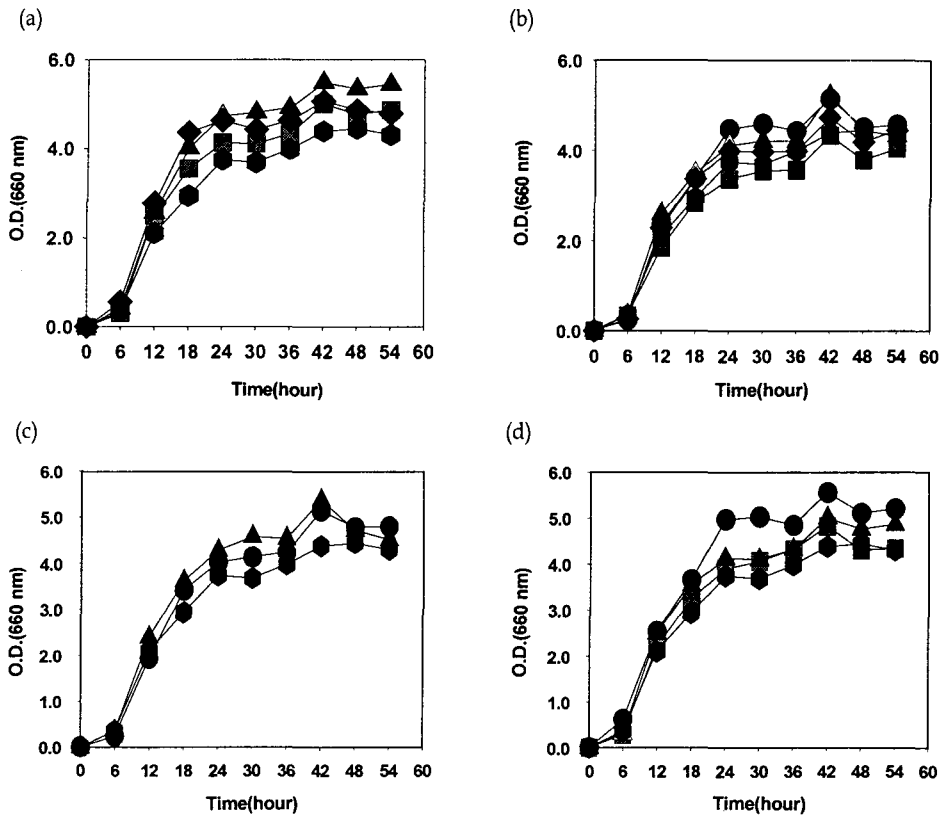


Fig. 2. The effect of each natural product for the growth of *C. butyricum* designated panel (a) to (d).

Panel (a); ■: *Lycii fructus*, ▲: *Sophorae flos*, ◆: *Chelidonium majus L.*, ●: control, panel (b); ●: *Paeonia japonica*, ■: *Atractylodis rhizoma alba*, ▲: *Epimedii herba*, ◆: *Acori graminei rhizoma*, ●: control, panel (c); ●: *Aurantii nobilis pericarpium*, ▲: *Angelicae gigantis radix*, ●: control, panel (d) ●: *Scutellaria baicalensis george*, ■: *Acanthodanacis cortex*, ▲: *Lycii fructus*, ●: control.

치질(痔血)을 치료하며, 백굴채(白屈菜)는 위암 및 궤양을 치료하고, 백작약은 해독(解毒)작용과 통증완화(止痛)작용을 하고, 백출은 소변이 잘 나오지 않는것(小便難)을 치료하며, 음양곽(淫羊藿)은 정자의 생산(益精), 건망증의 해소, 소변이 잘나오지 않음을 치료하고, 석창포는 간(肝), 심장(心), 비장(脾), 폐(肺), 신장(腎)의 오장을 도우고(補五臟), 전간, 건망증을 치료하며, 진피(陳皮)는 음식을 먹고 체한 증상(導滯)을 내리고, 위암(反胃)에도 효과가 있으며, 당귀(當歸)는 장의 활성화(活腸)를 기하고, 여성들의 생리 불순(生理不順)을 치료하며, 황금(黃芩)은 해독작용 및 방광을 튼튼하게 하고, 황달을 치료하며, 오가피(五加皮)는 사지불수, 간 및 신장의 기능을 돕는(滋補肝腎) 작용을 한다[5,7,9, 16,22,27].

두가지 천연산물 조합의 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과 두 종류의 천연산물로부터 *C. butyricum*의 성장 촉진 효

과를 대조군과 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. *C. butyricum*은 백작약과 음양곽, 백작약과 진피, 백작약과 갈근, 백작약과 당귀, 백작약과 황금, 백작약과 괴화, 백작약과 연자육, 백작약과 상백피, 백작약과 녹차, 음양곽과 진피, 음양곽과 갈근, 음양곽과 당귀, 음양곽과 황금, 음양곽과 괴화, 음양곽과 연자육 및 음양곽과 상백피 등은 대조군보다 성장이 좋은 것으로 나타났다. Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 panel (a)의 백작약과 음양곽, 백작약과 진피, 백작약과 당귀의 조합은 대조군 보다 2.0배, panel (b)의 백작약과 황금의 조합은 1.6배 이상, panel (c)의 음양곽과 갈근, 음양곽과 진피의 조합은 2.1배, panel (d)의 음양곽과 괴화의 조합은 2.0배의 성장이 촉진된 것을 볼 수 있으며, 이는 천연산물의 성분 중에서 분열을 촉진시키거나, membrane 내의 삽입 및 주변단백질의 활성화에 영향을 주거나, 항산화력에 의한 phospholipid의 산화 방지 효과 등에 의하여 membrane transport system을 촉진시키는 것으로 추정된

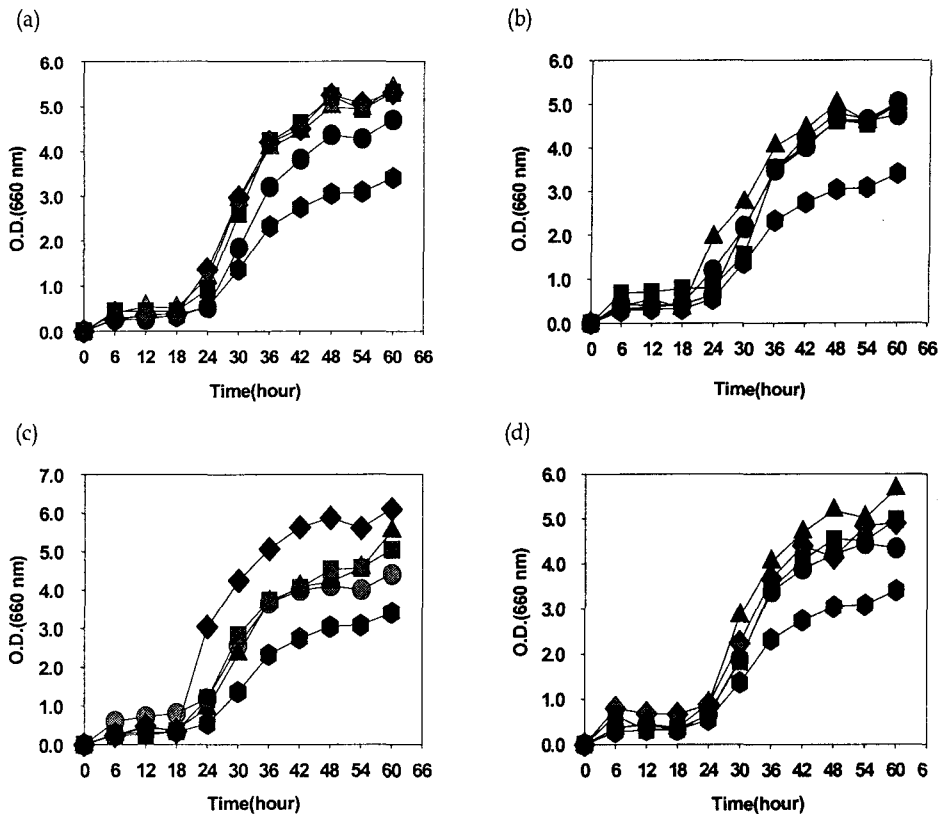


Fig. 3. The growth of *C. butyricum* by addition of two combinations of natural products showed panel (a) to (d).
 Panel (a); ●: *Paeonia japonica* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ■: *Paeonia japonica* and *Puerariae radix*, ▲: *Paeonia japonica* and *Epimedii herba*, ◆: *Paeonia japonica* and *Angelicae gigantis radix*, ●: control, panel (b); ●: *Paeonia japonica* and *Nelumbo nuclfera gaertner*, ■: *Paeonia japonica* and *Scutellaria baicalensis george*, ▲: *Paeonia japonica* and *Sophorae flos*, ◆: *Paeonia japonica* and *Mori cortex radicis*, ●: control, panel (c); ●: *Paeonia japonica* and *Theae folium*, ■: *Epimedii herba* and *Angelicae gigantis radix*, ▲: *Epimedii herba* and *Aurantii nobilis pericarpium*, ◆: *Epimedii herba* and *Puerariae radix*, ●: control, panel (d); ●: *Epimedii herba* and *Mori cortex radicis*, ■: *Epimedii herba* and *Nelumbo nuclfera gaertner*, ▲: *Epimedii herba* and *Sophorae flos*, ◆: *Epimedii herba* and *Scutellaria baicalensis george*, ●: control.

다[25,26].

세가지 천연산물의 조합에 의한 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과

세 종류의 천연산물로부터 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과를 대조군과 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. *C. butyricum*은 음양곽과 갈근 및 괴화, 음양곽과 갈근 및 백작약, 음양곽과 갈근 및 당귀, 음양곽과 갈근 및 연자육, 음양곽과 갈근 및 황금, 음양곽과 갈근 및 녹차, 음양곽과 괴화 및 백작약, 음양곽과 괴화 및 당귀, 음양곽과 괴화 및 황금, 음양곽과 괴화 및 녹차, 음양곽과 백작약 및 당귀, 음양곽과 백작약 및 연자육, 음양곽과 백작약 및 황금, 음양곽과 백작약 및 녹차, 그리고 음양곽과 당귀 및 연자육 등에 의하여

성장이 촉진 되었다. Fig. 4에 따르면 음양곽과 갈근 및 연자육의 조합은 대조군보다 1.7배의 성장 촉진 효과를 보였고, 다른 조합들도 이에 준하는 성장 촉진 효과를 나타내었다.

네가지 천연산물 조합의 *C. butyricum*에 대한 성장 촉진 효과

네 종류의 천연산물로부터 *C. butyricum*의 성장 촉진 효과를 대조군과 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. *C. butyricum*의 균주는 음양곽, 갈근, 연자육 및 백작약의 조합, 음양곽, 갈근, 연자육 및 녹차의 조합, 음양곽, 갈근, 연자육 및 괴화의 조합, 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합, 갈근, 연자육, 백작약 및 녹차의 조합, 갈근, 연자육, 백작약 및 괴

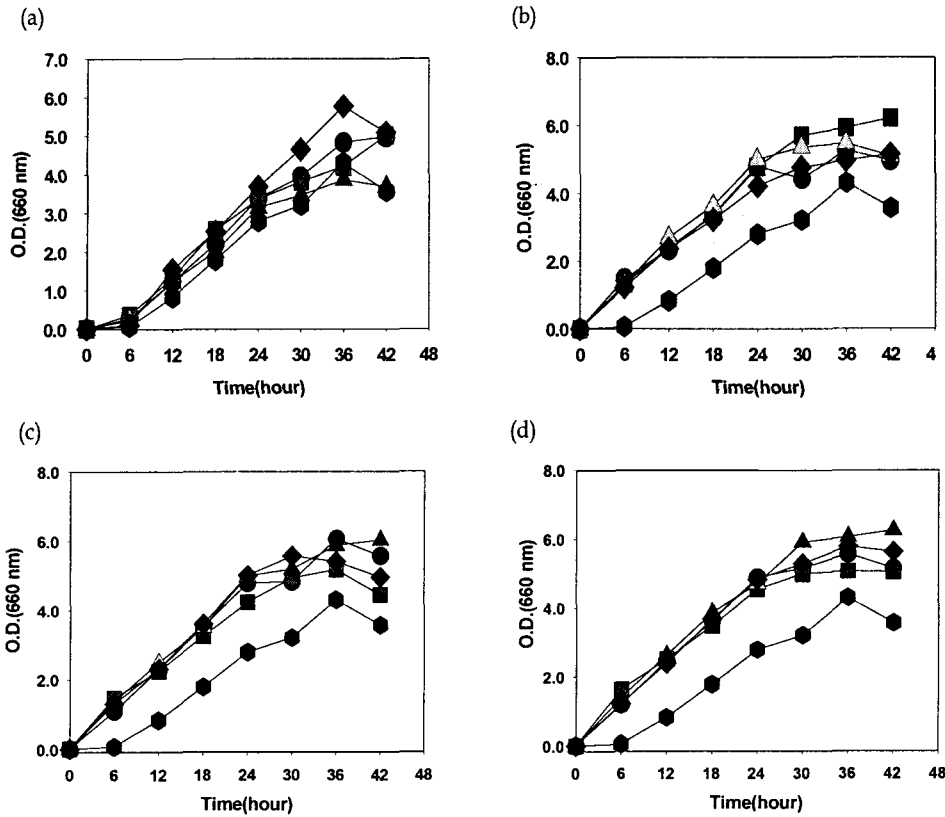


Fig. 4. The growth of *C. butyricum* by addition of three mixed combinations of natural products designated panel (a) to (d). Panel (a); ●: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Sophorae flos*, ■: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Paeonia japonica*, ▲: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Angelicae gigantis radix*, ◆: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Nelumbo nucifera gaertner*, ●: control, panel (b); ●: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Scutellaria baicalensis george*, ■: *Epimedii herba*, *Puerariae radix* and *Theae folium*, ▲: *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Paeonia japonica*, ◆: *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix*, ●: control, panel (c); ●: *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Nelumbo nucifera gaertner*, ■: *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Scutellaria baicalensis george*, ▲: *Epimedii herba*, *Sophorae flos* and *Theae folium*, ◆: *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Angelicae gigantis radix*, ●: control, panel (d); ●: *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Nelumbo nucifera gaertner*, ■: *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Scutellaria baicalensis george*, ▲: *Epimedii herba*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*, ◆: *Epimedii herba*, *Angelicae gigantis radix* and *Nelumbo nucifera gaertner*, ●: control.

화의 조합, 갈근, 연자육, 백작약 및 당귀의 조합, 연자육, 백작약, 녹차 및 괴화의 조합, 연자육, 백작약, 녹차 및 당귀의 조합, 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합, 백작약, 녹차, 괴화 및 당귀의 조합, 갈근, 연자육, 녹차 및 당귀의 조합, 음양곽, 갈근, 백작약 및 녹차의 조합, 갈근, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합, 음양곽, 연자육, 백작약 및 당귀의 조합 등은 대조군보다 성장이 좋은 것으로 나타났다. Fig. 5의 panel (a)를 보면 음양곽, 갈근, 연자육 및 괴화의 조합, 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합은 대조군의 2.2배, panel (b)의 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합, 갈근, 연자육, 백작약 및 괴화의 조합은 2.3배, panel (c)의 갈근, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합은 2.0배의 성장 촉진 효과를 보여, 천연산물의 조합에 의하여 생체에 probiotics의 역할을

하는 대부분의 유용균의 성장 향상을 위한 조합의 구성이 가능할 것으로 사료되고, 이들의 응용은 생체방어의 새로운 소재가 될 수 있을 것으로 판단된다.

*C. butyricum*의 성장촉진효과를 갖는 4 가지조합의 항산화력

*C. butyricum*의 성장을 현저하게 촉진시킨 4 종류의 천연산물의 조합으로 이루어진 4 종류의 조합의 항산화력을 용존산소 분석법에 의하여 분석한 결과 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합의 AUC가 631.45로써 가장 높았으며 이때의 성장촉진 효과는 2.3배로 나타났다. 다음으로 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합 (626.65), 갈근, 연자육, 백작약 및 괴화의 조합 (622.36), 음양곽, 갈근, 연자육 및 괴

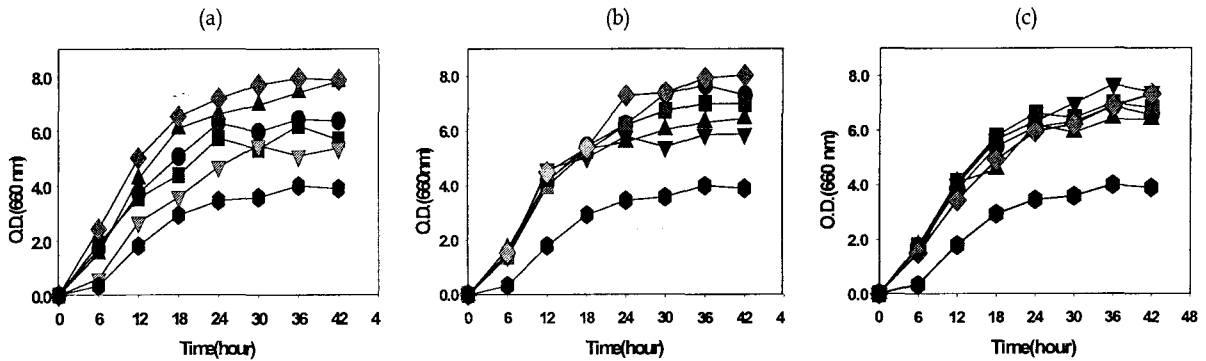


Fig. 5. The growth of *C. butyricum* by addition of four mixed combinations of natural products designated panel (a) to (c). Panel (a); ●: combination of *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Paeonia japonica*, ■: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Theae folium*, ▲: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Sophorae flos*, ◆: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Angelicae gigantis radix*, ▼: *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*, ●: control, panel (b); ●: combination of *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *Sophorae flos*, ■: *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *Angelicae gigantis radix*, ▲: *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica*, *Theae folium* and *Sophorae flos*, ▼: *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica*, *Theae folium* and *Angelicae gigantis radix*, ◆: *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica*, *Theae folium* and *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix*, ●: control, panel (c); ●: combination of *Paeonia japonica*, *Theae folium*, *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix*, ■: *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Theae folium* and *Angelicae gigantis radix*, ▲: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Paeonia japonica* and *Theae folium*, ▼: *Puerariae radix*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix*, ◆: *Epimedii herba*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *angelicae gigantis radix*, ●: control.

화의 조합 (620.99)의 순서로 나타났다(Fig. 6). 이들의 항산화력은 대조군의 AUC 116.61보다 5 배 정도 강한 것으로

나타났으며, 항산화력이 강한 조합에서 성장 촉진 효과가 좋은 것으로 나타났다.

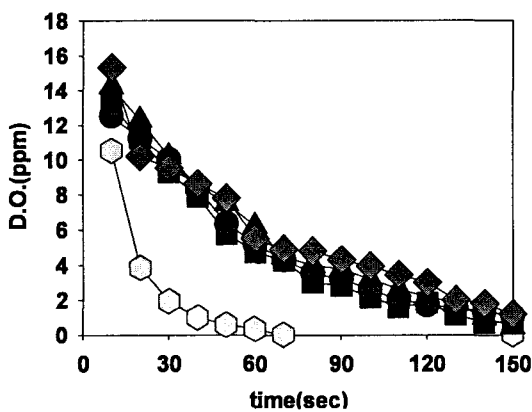


Fig. 6. Comparison of antioxidative capacity with AUC of four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *C. butyricum*.

●: combination of *Puerariae radix*, *Nelumbo Nucifera gaertner*, *Paeonia Japonica* and *Sophorae flos* (622.36), ■: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Sophorae flos* (620.99), ▲: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Angelicae gigantis radix* (626.65), ◆: *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix* (631.45). Numerics in brackets are designated as AUC of the each combination.

Hydroxyl radical 소거 활성

*C. butyricum*의 성장을 촉진시키는 4 종류의 4차 조합은 모두 hydroxyl radical의 소거 기능이 좋은 것으로 나타났다. 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합(A), 음양곽, 갈근, 연자육 및 괴화의 조합(B), 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합(C) 및 갈근, 연자육, 백작약 및 괴화(D)의 조합 등 모두 소거율이 90% 이상으로 나타났으며(Fig. 7), 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀(A)의 조합은 200 배의 희석율에서 94.63%의 소거율을 보였고 항산화력도 좋아 희석이 필요한 제품의 원료로 사용 가능한 것으로 사료된다.

총 phenol 함량 및 방향족 측정

*C. butyricum*의 성장을 촉진하는 4 종류의 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol 함량을 Table 1에 나타내었으며, Yeو 등[28]의 논문에서 본보와 같은 방법으로 측정된 증제차, 볶음차, 오롱차 및 홍차의 수용성 추출물의 총 phenol 량은 각각 1.71, 1.54, 0.96 및 0.89 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 으로 보고하였으며, 본 실험에 사용한 4종류 종류의 조합은 녹차

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

Combinations	Absorbance at 280 nm	Amounts of total phenols ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
<i>Epimedii herba</i> , <i>Puerariae radix</i> , <i>Nelumbo nucifera gaertner</i> and <i>Angelicae gigantis radix</i>	1.80	51.27
<i>Epimedii herba</i> , <i>Puerariae radix</i> , <i>Nelumbo nucifera gaertner</i> and <i>Sophorae flos</i>	1.80	50.23
<i>Nelumbo nucifera gaertner</i> , <i>Paeonia japonica</i> , <i>Sophorae flos</i> and <i>Angelicae gigantis radix</i>	1.81	50.07
<i>Puerariae radix</i> , <i>Nelumbo nucifera gaertner</i> , <i>Paeonia japonica</i> and <i>Sophorae flos</i>	1.80	51.10

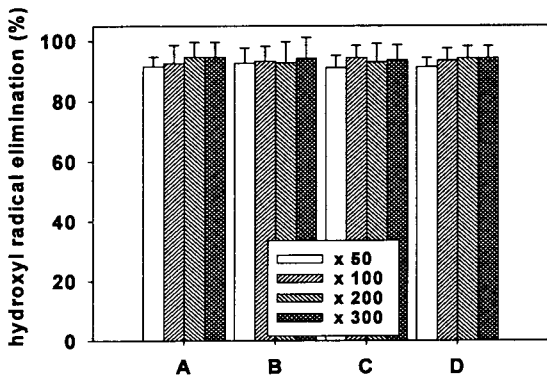


Fig. 7. The ratio of OH \cdot radical elimination by four mixed combinations of natural antioxidants used for culturing *C. butyricum*.

A: combination of *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Angelicae gigantis radix*, B: *Epimedii herba*, *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner* and *Sophorae flos*, C: *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica*, *Sophorae flos* and *Angelicae gigantis radix*, D: *Puerariae radix*, *Nelumbo nucifera gaertner*, *Paeonia japonica* and *Sophorae flos*. All values are mean \pm SE (n=3).

중의 증제차나 볶음차의 비발효차 보다 29배 이상 높은 것으로 나타났으며, 반 발효차인 오롱차 보다는 52배, 발효차인 홍차보다는 56배 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 4 종류의 조합을 구성하는 천연산물의 성분내에는 녹차보다 다양한 종류의 phenols, phenolic acid 및 polyphenol 등을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

요 약

*C. butyricum*은 선택되어진 천연산물의 한 종류 단독으로서도 성장이 촉진되었으며, 또한 두 종류, 세 종류 및 네 종류의 조합에 의하여 특징적으로 성장이 촉진되었다. 이러한 결과로부터 항산화력이 강한 천연산물들을 사용하여

free radical의 제거와 동시에 *C. butyricum*의 성장 촉진물 질로 사용할 수 있을 뿐 아니라, 생체의 기능을 향상시킬 수 있는 기능성 제제로의 응용 가능성을 보였다. *C. butyricum*을 CAB Medium에서 배양하였을 때, 구기자, 괴화, 백굴채, 백작약, 백출, 음양곽, 석창포, 진피, 당귀, 황금 및 오가피 등의 한가지의 천연산물에 의하여 성장이 촉진되었고, 두 종류 천연산물의 조합인 백작약과 음양곽, 백작약과 진피, 백작약과 갈근, 백작약과 당귀, 백작약과 황금, 백작약과 괴화, 백작약과 녹차, 음양곽과 진피, 음양곽과 갈근, 음양곽과 황금, 음양곽과 괴화 등의 조합에 의하여 성장이 촉진되었으며, 백작약과 음양곽, 백작약과 진피, 백작약과 당귀, 음양곽과 갈근, 음양곽과 진피, 음양곽과 괴화의 조합 등은 대조군보다 2.0배 이상의 성장이 촉진된 것으로 나타났다. 이는 천연산물의 성분이 membrane의 구성 성분에 영향을 주기 때문으로 추정된다. 그리고 세 종류의 천연산물 조합인 음양곽과 갈근 및 괴화, 음양곽과 갈근 및 백작약, 음양곽과 갈근 및 당귀, 음양곽과 갈근 및 연자육, 음양곽과 갈근 및 황금 등의 조합에 의하여 성장이 촉진되었고, 음양곽과 갈근 및 연자육의 조합은 대조군보다 1.7배의 성장 촉진 효과를 보였다. 4 종류 천연산물 조합인 음양곽, 갈근, 연자육 및 괴화의 조합, 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합은 대조군의 2.2배, 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합, 갈근, 연자육, 백작약 및 괴화의 조합은 2.3배, 갈근, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합은 2.0배의 성장 촉진 효과를 보여, 천연산물의 조합에 의하여 생체에 probiotics의 역할을 하는 대부분의 유용균의 성장 향상을 위한 조합의 구성이 가능할 것으로 사료되고, 이들의 응용은 생체방어의 새로운 소재가 될 수 있을 것으로 판단된다. 4 종류의 조합의 항산화력을 용존산소 분석법에 의하여 분석한 결과 연자육, 백작약, 괴화 및 당귀의 조합의

AUC가 631.45로써 가장 높았으며 이때의 성장촉진 효과는 2.3배로 나타났다. *C. butyricum*의 성장을 촉진하는 4 종류의 조합에 대한 hydroxyl radical의 소거활성은 50, 100, 200 및 300 배로 희석하여 검토하였을 때 음양곽, 갈근, 연자육 및 당귀의 조합이 200 배의 희석율에서 94.63%의 소거율을 보였고, 4 종류의 조합 모두 높은 희석율에도 90% 이상의 높은 소거율을 보여 높은 희석률을 필요로 하는 음료 제제로서의 탁월함을 보였으며, 또한, 4 종류의 각 조합에 따른 방향족의 함량 및 총 phenol도 가공된 차보다 함량이 높은 것으로 나타났다.

감사의 말

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

참고 문헌

1. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. pp. 703-710, 15th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D.C.
2. Araki, Y., A. Andoh, Y. Fujiyama, J. Takizawa, W. Takizawa and T. Bamba. 2002. Oral administration of a product derived from *Clostridium butyricum* in rats. *Int. J. Mol. Med.* **9**, 53-57.
3. Araki, Y., A. Andoh, Y. Fujiyama, J. Takizawa, W. Takizawa and T. Bamba. 2002. Short-term oral administration of a product derived from a probiotic, *Clostridium butyricum* induced no pathological effects in rats. *Int. J. Mol. Med.* **9**, 173-177.
4. Chung, H. Y., H. J. Kim, K. J. Jung, J. S. Yoon, M. A. Yoo, K. W. Kim and P. B. Yu. 2000. The inflammatory process in aging. *Clinical Gerontology* **10**, 202-222.
5. Gan, K. K. 1982. Zugai ZouyouKanbouSyohou. pp. 15-190, Yakukyosihosya, Japan.
6. Harman, D. 1978. Free radical theory of aging-nutritional implications. *Age* **1**, 143-150.
7. Huh, J. 1999. Dongeuibogam. pp. 21-164, Bobinmunwhasa.
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.
10. Kim, J. D., M. Y. Kim, H. J. Seo, B. J. Kim, D. H. Kim, E. O. Kim, H. Y. Chung and J. Y. Kong. 2002. Combination of Natural Products Removing ROS for Growth Promoting Effects of the Useful Enterobacteria *Lacobacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, in press
11. Kim, H. J., K. W. Kim, B. P. Yu and H. Y. Chung. 2000. The Effect of Age on Cyclooxygenase-2 gene Expression : NF- κ B Activation and I κ B α Dgradation. *Free Radical Biology & Medicine* **28**, 683-692.
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- κ 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 Measurement in vivo. pp. 3679-3688, In Encyclopedia of Analytical Science. Townshend A(ed), Vol. 6, Academic Press, U.S.
16. Mori, Y. Z. 1986. KanbouSyohounoKouseitoTekiyou. pp. 20-140, Hakubustusyokan, Japan.
17. Nakada, C. 1997. Talk for Free Radical. pp. 56-102, Koudansya, Japan.
18. Ota, S. 1987. Food and Antioxidant. pp. 1-38, Syokuhinzairyokenkyukai, Japan.
19. Peter, T. P. 1998. The skin's Antioxidant Systems. *Dermatology nursing* **10**, 401-406.
20. Serafini, M., A. Ghiselli and A. Ferro-Luzzi. 1994. Red wine, tea, and antioxidants. *The Lancet* **344**, 626-629.
21. Takahashi, M., H. Taguchi, H. Yamaguchi, T. Osaki, R. Sakazaki and S. Kamiya. 1999. Antagonistic interaction between *Clostridium butyricum* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Kansenshogaku Zasshi* **73**, 7-14.
22. Yeom, T. H. and S. S. Park. 1975. Lecture of modern Hanbang. pp. 101-300, Haenglimseowon.
23. Yosikawa, M., W. Kawano and I. Yano. 2000. All of

- reactive Oxygen and Free Radical, pp. 8-75, Marusen LTD. Japan.
24. Yu, B. P. 1996. Aging and oxidative stress-Modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 651-668.
25. Yuan, C. and L. J. Johnston. 2000. Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoyl-phosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys. J.* **79**, 2768-2781.
26. 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.
27. Yuk, C. S. and H. S. Yang. 1999. Hyundai Saengyakhak. pp. 133-581, Hakchangsa.
28. 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.
29. Zoubi, H. 1998. Methods for not to lose against free radicals. pp. 13-52, Noubunkyo, Japan.

(Received September 2, 2002; Accepted October 8, 2002)