

Bacillus polyfermenticus SCD의 항산화 및 콜레스테롤 저하효과

정 황 영 · ¹김 태 훈 · ¹박 준 석 · ²김 기 태 · [†]백 현 동
경남대학교 생명과학부, ¹건국대학교 동물생명과학부, ²(주)프로코바이오테크
(접수 : 2003. 6. 20. 게재승인 : 2003. 10. 25.)

Antioxidative and Cholesterol-reducing Activity of *Bacillus polyfermenticus* SCD

Hwang-Yeong Jeong, Tae-Hoon Kim¹, Jun-Seok Park¹, Kee-Tae Kim², and Hyun-Dong Paik[†]
Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea
¹Division of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
²Proco Biotech Co., Seoul 138-160, Korea
(Received : 2003. 6. 20. Accepted : 2003. 10. 25.)

Antioxidative and cholesterol-reducing activity of *Bacillus polyfermenticus* SCD were measured to characterize its probiotic properties. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical scavenging activity of the culture supernatant of *B. polyfermenticus* SCD was estimated to be 48%. The culture supernatant on the peroxidation of linoleic acid were investigated and the value was shown to be about 45%. The inhibition of TBA (2-thiobarbituric acid) formation of the culture supernatant was revealed 60% when stimulator was presented. The SOD-like activity of the culture supernatant was about 15%, which is similar to BHT (butylated hydroxytoluene) and α -tocopherol. After cultured in TSB broth added soluble cholesterol either 0.1% or 0.3% of oxgall in 37°C for 24 h aerobically, cholesterol-reducing activities were revealed about 67% or 64%, respectively. To test whether the products are cholesterol-related or not, residual activity was determined. The cholesterol activity was rarely changed. In addition, when the cell extracts recovered after cultivation, was tested in absence of cholesterol, cholesterol activity was not detected. However, cholesterol activity was detected in the presence of cholesterol. Thus, it was assumed that *B. polyfermenticus* SCD could reduce cholesterol by conjugating with it, rather than by digesting the cholesterol using cholesterol-hydrolyzing enzymes.

Key Words : *Bacillus polyfermenticus* SCD, antioxidative activity, cholesterol-reducing activity

서 론

인체는 기본적으로 과산화물 (peroxidants)로 인한 손상으로부터 자체적으로 방어하기 위한 항산화 시스템을 갖고 있으며, 생체는 정상적인 생리상태에서는 자유라디칼 (free radical)의 생성계와 제거계인 항산화 방어계 (antioxidant defense system) 사이가 균형을 이루고 있다(1). 그러나 내인적 혹은 외인적 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 자유라디칼이 과다 생산되거나 혹은 항산화계의 활성이 감소되어 문제가 된다. 여러 요인에 의해 이런 항산화계와 같은 유리기 제거계와 생성계의 사이에 그 균형이 깨뜨려

졌을 때, 조직은 과산화적 손상이 초래된다(2). 이러한 독성이 강한 자유라디칼에 의한 반응의 결과로 암 (cancer), 동맥경화증 (atherosclerosis), 고혈압 (hypertension), 기종 (emphysema), 간경변 (cirrhosis) 그리고 관절염 (arthritis) 등의 여러 조직의 손상을 가져온다는 보고가 있다(3). 그러므로 조직을 과산화물로부터 보호하기 위해서는 생체의 항산화 방어계를 강화시켜야 한다. 하지만 화학적 물질의 사용은 식품의 안전성과 독성에 대한 의문을 제기해 왔기 때문에, 식품에서 항산화물질을 섭취하는 것이 가장 이상적이라 할 수 있다. 이러한 연구의 일환으로 최근에는 천연물질을 이용하여 항산화 방어계 강화에 관련된 연구가 진전되고 있고, 그 중에서도 특히 체내 항산화물질이 부족한 동물실험에서 유산균의 항산화 효과에 대해 연구가 활발히 이루어지고 있다(4).

한편, 식생활이 서구화되고 외식의 기회가 찾아짐에 따라 지방 함량이 많고 식이섬유 함량은 적은 가공 식품의 섭취가

[†] Corresponding Author : Division of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-2049-6011, Fax : +82-2-455-1044
E-mail : hdpaik@konkuk.ac.kr

증가하게 되었다. 성인성 질환을 유발시키는 요인 중에서 가장 중요한 것은 동물성 지방의 과다한 섭취로 인한 고 콜레스테롤 혈증이다(5). 한편, 유산균 및 발효유 제품의 섭취가 과연 콜레스테롤 수준을 저하시킬 수 있는가에 대한 의구심도 있었다. 그러나 인공 영양아의 장내 균총과 혈청 콜레스테롤 함량과의 관계를 조사한 연구에서 혈청 콜레스테롤 함량이 낮을 때 장내 유산균이 가장 우세한 것으로 밝혀짐에 따라 장내세균 중의 유산균총이 인체의 콜레스테롤 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다(5). 또한 미생물 균주 중에서 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로는 *Arthrobacter* 속, *Bacillus* 속, *Brevibacterium* 속, *Corynebacterium* 속, *Mycobacterium* 속, *Nocardia* 속, *Serratia* 속 등이 있다(6).

유산균은 일찍이 메치니코프를 비롯한 많은 연구자들에게 의해 건강효과가 알려져 왔다. 이런 유산균은 오래 전부터 우리들의 식생활과 밀접한 관계를 유지하여 왔으며, 최근에는 프로바이오틱 생균제로서 더 많이 이용되고 있다(7, 8). 이러한 프로바이오틱 생균제로서는 *Lactobacillus* 속, *Streptococcus* 속, *Bifidobacterium* 속, *Enterococcus* 속, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis* 등이 있다.

그러나 최근 들어 *Bacillus* 속 프로바이오틱 생균에 대한 산업적인 유용성이 증대되고 있으며(9, 10), 그 중에서도 *B. polyfermenticus* SCD는 식품용 프로바이오틱 생균제로 주목받고 있다. *B. polyfermenticus* SCD는 1933년 일본에서 분리한 아포성 (spore-forming) 간균으로서, 20여종의 효소를 분비하여 영양소를 재활용하게 하며, 비타민 B₁, B₂, K를 합성하여 영양을 보급시킨다. 또한 인체의 3대 영양소인 탄수화물, 단백질, 지방 및 섬유소를 소화·흡수시키며, 병원성균들인 티프스균, 파라티프스균, 적리균, 콜레라균 등을 용균시켜 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다. 특히, 시판 중인 유산균 제제나 비피더스균 제제 등은 장까지 도달하기 위해서는 위산이나 여러 효소를 때문에 특별한 코팅이나 캡슐 제품 등을 생각해야 되지만, 이 생균은 아포를 형성하기 때문에 장에 도달할 때까지 활성을 거의 잃지 않아 장질환의 치료에 탁월한 효과를 보이고 있다(11).

최근 식품산업은 소득 수준의 향상과 식생활 방식의 변화로 여러 형태의 건강식품에 대한 수요가 증가하고 있는 추세이며, 이에 따라 인체에 무해하며 건강증진 기능이 있는 식품소재를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있는 상황이다. 따라서 본 연구는 산업적으로 인정받고 있는 식품용 프로바이오틱 생균제인 *B. polyfermenticus* SCD의 항산화 효과와 콜레스테롤 저하효과를 검정하여, 향후 고부가가치 기능성 식품 개발에 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 1,1-diphenyl-2-picryryl hydrazyl (DPPH), α -tocopherolb (α -Toc), FeCl₂, butylated hydroxytoluene (BHT), trichloroacetic acid (TCA), 콜레스테롤 등을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 본 연구실에서 보존 중인 *B. polyfermenticus* SCD는 3~4회에 걸친 계

대배양으로 활성화하였으며 glycerol stock법으로 -70℃에서 보존하였고, working culture는 한달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다(11). *B. polyfermenticus* SCD의 배양 배지로는 TSB 배지 (Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였다.

배양조건 및 방법

B. polyfermenticus SCD를 10 mL 시험관의 TSB broth에 접종하여 37℃에서 교반속도 150 rpm으로 12시간 동안 전배양한 다음 다시 500 mL baffle flask (working volume: 100 mL)에 접종하여 12시간 본배양하였다.

DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

DPPH에 대한 수소공여능은 100 mM DPPH 용액 (DPPH 6 mg을 100 mL 에탄올에 완전히 용해시킨 후 100 mL 증류수를 가한 액) 1000 μ L에 *B. polyfermenticus* SCD 배양상등액을 200 μ L를 가하여 10초 동안 진탕한 후 10분간 방치하고, 528 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Thiocyanate법에 의한 항산화 활성 측정

Linoleic acid (25 mg/mL in ethanol), ferrous chloride (20 mM in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate (30% in H₂O), 40 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 조제하여 이들을 stock 용액으로 사용하였다. 혼합용액은 각 시료 용액 0.1 mL과 linoleic acid 0.2 mL를 시험관에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 0.4 mL와 증류수 0.2 mL를 가하여 37℃에서 72시간 후 측정하였다. 측정방법은 혼합용액에서 0.1 mL를 취하여 시험관에 넣고 70% ethanol 4.0 mL와 ammonium thiocyanate 용액 0.1 mL, ferrous chloride 용액 0.1 mL를 혼합한 후 정확히 3분간 진탕하고 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성을 비교하기 위하여 합성항산화제인 BHT와 α -tocopherol을 각각 1%의 농도로 사용하였다.

TBARS법에 의한 항산화 활성 측정

Linoleic acid (25 mg/mL in ethanol) 1 mL와 각 시료용액 0.1 mL를 시험관에 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer pH(7.0) 2 mL와 증류수 1 mL를 가하여 37℃에서 약 1시간 반응시켰다. 그리고 7.2% BHT 용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 완전히 정지시킨 후 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉, 반응액 0.5 mL를 취하여 원심분리관에 넣고 20% (인산용액에 녹임) trichloroacetic acid(TCA) 0.25 mL와 0.67%(0.025 N HCl에 녹임) 수용성 TBA (2-thiobarbituric acid) 0.1 mL를 가하여 혼합한 후 100℃에서 가끔씩 흔들며 주면서 15분간 처리하여 냉각시켰다. 그리고 70% TCA 0.5 mL를 가한 다음 20분 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 그 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 산화반응을 빠르게 하기 위해서 산화촉진제인 ferrous chloride를 50 μ L를 첨가하였다.

Pyrogallol법에 의한 SOD 활성 측정

SOD (superoxide dismutase) 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와

Marklund의 방법에 따라 측정하였다. Tris-HCl buffer (1 mM Tris/5 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 mL에 효소용액 0.1 mL를 넣고 7.2 mM pyrogallol 0.1 mL를 가함으로서 반응을 시작 시켰다. 그리고 25°C에서 정확히 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1.0 mL를 가해 반응을 정지시킨 다음 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다.

콜레스테롤의 저하효과 검증

콜레스테롤 저하 효과에 대한 실험으로 우선 0.1% 콜레스테롤이 첨가된 TSB broth (Difco Laboratories, Detroit, USA)에 *B. polyfermenticus* SCD를 접종하여 0, 2, 4, 6, 12, 24시간째에 시료를 취하여 배지 내의 남은 콜레스테롤의 양과 이때의 *B. polyfermenticus* SCD 균수를 측정하였다.

콜레스테롤 측정법

콜레스테롤 잔존량은 배양액 1 mL를 4000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 배양 상등액에 있는 콜레스테롤의 잔존량을 효소적 방법 (BCS total cholesterol kit, Korea)으로 측정하였다.

균수 측정

균수는 TS agar (Difco)에서 12시간 호기적으로 배양한 후 표준평판계수법으로 37°C에서 측정하였다.

콜레스테롤 저하에 대한 담즙산의 영향

콜레스테롤 저하에 대한 담즙산의 영향에 관한 실험으로 0.0%, 0.3% oxgall (Difco)이 첨가된 TSB 배지에 0.1% 콜레스테롤을 첨가하여 37°C에서 24시간 호기적으로 실시하였다. 배양 후 4,000×g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하였다. 상등액이 제거된 균체에 동량의 phosphate buffer 용액 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄: 0.1 M, pH 7)을 넣어 현탁시켰다. 다시 이 현탁액을 4,000 ×g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 균체와 세척액 (washing buffer)을 확보하였다. 각각 얻어진 균체, 배양 상등액, 세척액의 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

콜레스테롤 관련 효소 생산 확인

콜레스테롤 관련 효소 확인을 위해 콜레스테롤이 첨가되지 않은 TSB broth에서 37°C에서 호기적인 배양을 실시하여 0, 2, 4, 6, 12, 24시간째의 배양액을 취한 다음, 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액을 얻었다. 이 상등액 1.0 mL에 0.1% 콜레스테롤을 첨가하여 37°C에서 24시간 이후 콜레스테롤 잔존량을 측정하였으며, 콜레스테롤을 유일한 탄소원으로 하는 증식배지(0.1% cholesterol, 0.5% yeast extract, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 0.025% K₂HPO₄, and 0.1% NH₄NO₃)에서 37°C에서 24시간 배양시켰다.

결과 및 고찰

DPPH 법에 의한 항산화 활성

항산화성 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복

합체를 만들고, DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능 (electron donating ability)으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다(12, 13).

B. polyfermenticus SCD 배양액의 항산화력을 DPPH법에 의한 전자공여능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 본 실험에서 비록 *B. polyfermenticus* SCD 배양액의 항산화력이 기존의 항산화제보다는 낮은 수치를 보였으나, 비교하는 농도가 다르기 때문일 수 있으며, 배양 상등액에 존재하는 항산화 물질로도 45% 이상의 뚜렷한 활성을 나타내었기 때문에 천연 항산화제로서의 가능성을 분명히 보여주고 있다. 이러한 수치는 최적화 실험을 통해 높일 수 있고 산업적으로 높은 천연 항산화물질을 확보할 수 있기 때문이다.

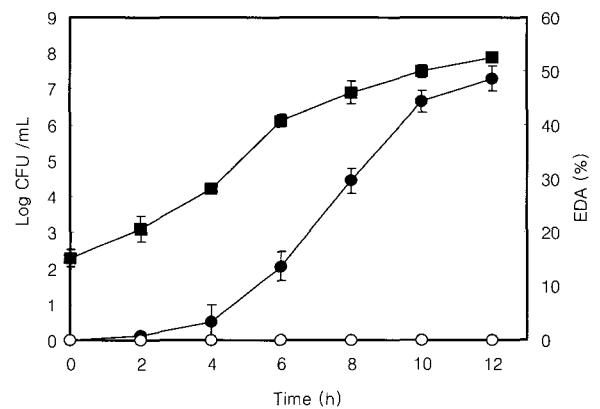


Figure 1. Radical scavenging effects of the *B. polyfermenticus* SCD on DPPH. -○-, EDA(%) without cell; -●-, EDA(%) with cell; -■-, cell growth

TCA 법에 의한 항산화 활성

Linoleic acid를 이용한 thiocyanate 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 본 실험에서 *B. polyfermenticus* SCD의 배양 상등액의 항산화 효과는 합성 항산화제인 BHT 보다 높은 수준을 나타내었다. 따라서 TCA법을 통해서 *B. polyfermenticus* SCD의 배양액이 활성을 나타냄으로써 천연 항산화제로서 가능성을 뚜렷이 보여주고 있다.

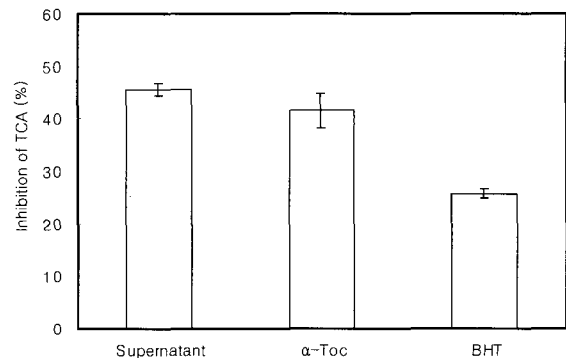


Figure 2. Antioxidative activity of culture supernatant of *B. polyfermenticus* SCD measured by thiocyanate method.

TBARS 법에 의한 항산화 활성

식품 중에 함유된 지방질, 특히 불포화 지방산은 산패가 진행됨에 따라 과산화물과 carbonyl 화합물을 생성하며, TBARS법은 이때 생성된 malonaldehyde와 2-thiobarbituric acid 사이의 적색복합물을 생성하는 정색반응으로 지방질의 산패도를 알아보는 방법이다(14). 산화촉진제 첨가 시, *B. polyfermenticus* SCD 배양액은 BHT와 더불어 60%의 높은 활성을 보였다. 이때 α -tocopherol은 약 48%의 활성을 나타내었다. 그리고 산화촉진제인 ferrous chloride를 첨가하지 않고 자연 산화시켰을 때, α -tocopherol은 50% 이상의 활성을 보였으며 BHT는 31%, *B. polyfermenticus* SCD 배양액은 24%의 활성을 각각 보였다(Fig. 3).

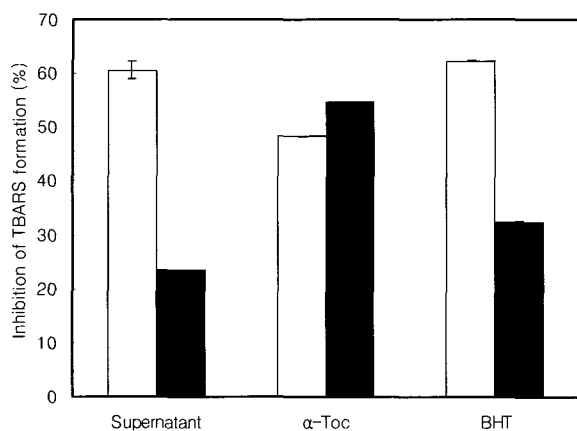


Figure 3. Antioxidative activity of culture supernatant of *B. polyfermenticus* SCD measured by TBARS method.

-□-, with stimulator; -■-, without stimulator

보통 체내의 생체막은 지질 과산화로 진행되는데, 이는 불포화 지방산이 고농도 함량으로 구성되어 있기 때문이다. 이러한 생체막 지방산의 활성산소와 같은 자유라디칼에 의하여 과산화 반응이 개시되면서 연쇄적으로 진행되므로 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상 및 이에 따른 여러 가지 병리현상을 유도하는 것으로 알려져 있다(15).

이처럼 지질 과산화물 생성을 억제시키는 것은 산화적 손상을 일으키는 원인 물질인 자유라디칼 생성을 억제시킬 수 있는 가능성이 있기 때문에, 이와 밀접하게 관련되어 있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성 물질로서 작용할 가능성이 높다.

Pyrogallol법에 의한 SOD 활성 측정

생체내의 항산화 방어기구 중 효소적 방어계 하나로서 superoxide radical을 환원시켜서 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성을 pyrogallol 자동산화로 생성되는 superoxide anion radical을 소거하는 여부로 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *B. polyfermenticus* SCD 배양액은 15%, BHT는 10%, α -tocopherol은 12%의 항산화 활성을 보였다.

Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 여러가지 생화학적 반응으로 생성되며, 주로 세포막 지질의 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화물을 생성하므로 세포손상을 초래한다고 알려져 있다. 생체는 이러한 지질 과산화에 대한 반응체계로서 SOD에 의하여 superoxide radical을 H_2O_2 로 바꾸며, 다시 H_2O_2 는 catalase와 glutathion peroxidase의 작용에 의해 H_2O 로 환원되므로 이들 효소계의 반응에 의해서 자유라디칼로부터 생체를 보호할 수 있다(16).

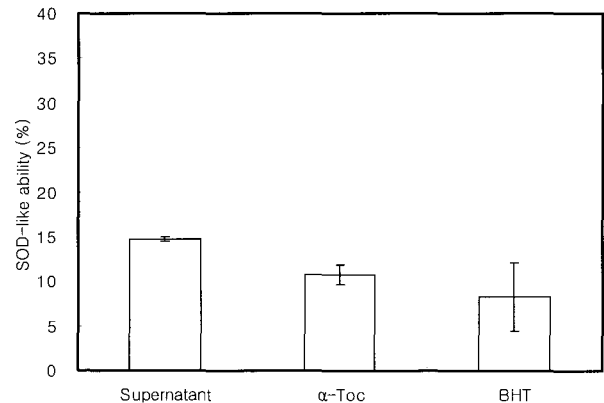


Figure 4. SOD-like activity of *B. polyfermenticus* SCD

실제로 일본의 Niwa 등은 새로운 산화방지제를 발굴하고 임상실험을 통하여 효능을 평가하고 식품을 개발하여 상품화하였고, 이들이 활성산소의 시발물질이라고 할 수 있는 superoxide anion을 scavenging함으로써 생체에 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하여 유용한 생리활성을 나타낸다고 보고하였다. 이는 산화방지제의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라고 불린다. 이와는 별도로 식물체를 대상으로 SOD 유사활성 물질을 탐색하고 효능을 평가하는 연구가 보고된 바 있다(2).

본 실험에서 대부분이 20% 미만의 낮은 활성을 보였으나, *B. polyfermenticus* SCD 배양액은 α -tocopherol과 BHT에 비해서는 다소 높은 결과를 나타내었다.

상기의 여러 항산화 활성 측정으로부터 얻어진 결과에 따르면, 비록 *B. polyfermenticus* SCD 배양액이 1% 농도의 BHT, α -tocopherol보다는 전반적으로 비슷하거나 낮은 항산화 활성을 나타내었지만, *B. polyfermenticus* SCD 배양액의 항산화력이 뚜렷이 확인되었다. 또한 항산화 물질을 정제하여 특성을 검토하여야 하며, 이 물질의 1% 용액과 1% 농도의 기존 항산화제의 활성을 비교하여야 할 것이다. 향후 이와 같은 *B. polyfermenticus* SCD의 항산화력을 바탕으로 천연 항산화제 개발이 가능하다고 생각되며, 최적화 생산을 통해 항산화 활성을 높일 수 있으며, 경제적인 항산화물질을 확보할 수 있게 될 것이다.

콜레스테롤 저하에 대한 담즙산의 영향

호기적으로 균을 배양시켰을 때 *B. polyfermenticus* SCD

의 증식이 이루어졌으며, 배양액에 존재하는 콜레스테롤의 양이 시간 경과에 따라 감소되는 결과를 나타내었다(Fig. 5). 그러나, *B. polyfermenticus* SCD를 접종하지 않은 대조구에서는 콜레스테롤의 감소가 나타나지 않았으므로 콜레스테롤 감소에 *B. polyfermenticus* SCD가 관여했으리라 판단되며, 또한 *B. polyfermenticus* SCD가 콜레스테롤을 감소시키는 능력이 있음을 알 수 있었다. 이러한 프로바이오틱 생균(주로 유산균)의 콜레스테롤을 저하시키는 작용기작에 대해서는 복합 담즙산의 분해에 따른 담즙산의 재흡수 억제, 담즙산의 영향, 장내 콜레스테롤의 흡수 억제, 콜레스테롤 산화효소(cholesterol oxidase)에 의한 콜레스테롤의 생체 내 분해, 콜레스테롤의 동화(assimilation), 콜레스테롤의 유산균 세포벽 흡착으로 콜레스테롤의 침전 등으로 알려져 있다(17).

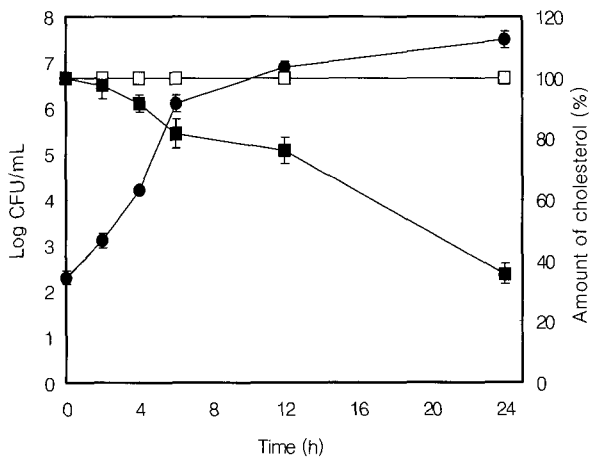


Figure 5. Changes in cholesterol by of *B. polyfermenticus* SCD. -●-, cholesterol change with cell; -□-, cholesterol change without cell; -■-, cell growth

한편 콜레스테롤을 저하시키는 *B. polyfermenticus* SCD의 메커니즘을 확인하고자 하였다. 우선 콜레스테롤의 감소에 대한 담즙산의 영향을 알아보기 위해 0.0%, 0.3% oxgall을 첨가하여 실시한 결과를 Table 1에 나타내었다. 초기 콜레스테롤의 양보다 oxgall 무첨가구에서 67.08%, 0.3% 첨가구에서 64.14%의 감소율을 각각 나타냈다. 이와 비슷한 실험에서 유산균이 콜레스테롤을 감소시킬 때 담즙산 농도에 따라 감소율이 달라져 담즙산에 영향을 받는다는 보고가 있는 반면, 존재하는 담즙산에 상관없이 유산균은 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고도 있다(18, 19). 그러나 본 실험에서는 *B. polyfermenticus* SCD는 oxgall 농도 0.0% 및 0.3%에 큰 상관없이 직접 콜레스테롤의 잔류 함량을 저하시켜 담즙산의 영향을 받지 않은 것으로 확인되었다.

콜레스테롤을 첨가하여 배양된 배지에서 원심분리하여 배양 상등액 및 균체 세척액 그리고 균체를 회수하여 콜레스테롤 양을 측정된 결과, 대조구와 비교했을 때, 대조구의 균체 및 균체 세척액에서는 콜레스테롤이 발견되지 않았다(결과 미제시). 그리고 실험구에서는 균체 세척액에서는 콜레스테롤이 발견되지 않은 반면, 회수된 균체에서 대부분의 콜레스테롤이 발견되었다. 따라서 위 실험의 결

과에 따르면, *B. polyfermenticus* SCD의 콜레스테롤 저하 기작은 세포벽 흡착에 의한 콜레스테롤의 침전인 것으로 판단하였다.

Table 1. Comparison of cholesterol removal after *in vitro* incubation of *B. polyfermenticus* SCD in TSB broth containing cholesterol with and without 0.3% oxgall

<i>B. polyfermenticus</i> SCD	Oxgall concentration	
	0.0%	0.3%
Cholesterol removal (%)	67.08±0.29	64.14±0.34

콜레스테롤 관련 효소 생산 확인

B. polyfermenticus SCD의 콜레스테롤 관련 효소(예: cholesterol oxidase)의 생산을 조사하기 위하여 실시한 결과, 시간별 얻어진 배양 상등액에서의 콜레스테롤의 감소는 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 뿐만 아니라 콜레스테롤을 유일한 탄소원으로 한 영양 배지에서 *B. polyfermenticus* SCD는 증식하지도 않았다(결과 미제시). 따라서 콜레스테롤 관련 효소는 생성되지 않는 것으로 판단되며, 이와 더불어 콜레스테롤의 감소에 아무런 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. Klaver와 Van der Meer는 *in vitro* 배양액 중의 콜레스테롤이 감소하는 이유로써 유산균이 담즙산을 탈포합시켜 콜레스테롤과 담즙산을 침전시키기 때문이라고 보고한 바 있다(20). 본 실험에서는 *B. polyfermenticus* SCD는 담즙산에 영향을 받지 않고 균체가 세포벽에 흡착시켜 콜레스테롤이 침전됨으로 저하시키는 것으로 확인되었다. 하지만 향후 보다 자세한 메커니즘 규명을 위한 실험이 필요하며, 이와 같은 콜레스테롤 저하 기작이 장내에서도 작용하는 지에 대해서도 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

요약

프로바이오틱 생균인 *B. polyfermenticus* SCD의 유용성을 확인하기 위해 항산화 및 콜레스테롤 저하 효과를 검증하였다. DPPH법에 의한 항산화 활성은 48% 정도였으며, TCA법에 의한 활성은 45%로 측정되었다. 그리고 TBARS법에 의해 측정된 활성은 stimulator가 존재할 때 60%에 달하였으며, SOD 유사활성은 15% 정도였다. 이러한 활성은 기존의 항산화제인 BHT나 α -tocopherol의 1% 용액과 비교할 때, 비슷하거나 약간 낮은 수치를 보여 준다. 향후 항산화 물질이 정제되어 이 물질의 1% 용액과 1% 농도의 기존 항산화제의 활성을 비교하여야 한다. 그러나 이 같은 뚜렷한 *B. polyfermenticus* SCD의 항산화력을 바탕으로 천연 항산화제 개발이 가능하다고 판단된다. 한편 *B. polyfermenticus* SCD의 콜레스테롤 저하 효과는 0.3% oxgall이 존재할 때, 64% 정도였다. 이 수치는 oxgall이 존재하지 않을 때 수치(67%)와 비교할 때, 큰 변화가 없었다. 그리고 콜레스테롤 저하 기작은 세포내 흡착에 의한 것으로 판단되었다.

감사

본 연구는 바이오그린 21사업의 연구비 지원(과제명: 비스판균 및 비스판 펩타이드를 이용한 기능성 식품 개발)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Büyükokurođlu, M. E., İ. Gülçin, and Ö. İ. Küfreviođlu (2001), In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium, *Pharm. Res.* **44**, 491-494.
- Han, D. S., J. H. Kwak, S. H. Kim, and S. J. Kim (1996), Effect of plant extracts with superoxide dismutase-like activity on survival of fruit flies under oxidative stress, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 865-869.
- Rhee, S. J. and J. H. Choi (2001), Effects of green tea catechin on the superoxide dismutase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase activities of kidney in diabetic rats, *Kor. Nutr. Soc.* **34**, 734-740.
- Hiroe, K., S. Masahiro, N. Hajime, and S. Yutaka (1993), Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient I vitamin E, *J. Dairy Sci.* **76**, 2493-2499.
- Kang, H. J. and Y. S. Song (1997), Dietary fiber and cholesterol metabolism, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 181-188.
- Arima, K., N. Michitaro, B. Moo, and T. Gakuzo (1969), Microbial transformation of sterols: Part I. decomposition of cholesterol by microorganisms, *Agric. Biol. Chem.* **33**, 1636-1643.
- Klaver, F. A. M. and van der R. Meer (1993), The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1120-1124.
- Lin, M. Y. and C. L. Yen (1999), Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1460-1466.
- Green, D. H., P. R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca, and S. M. Cutting (1999), Characterization of two *Bacillus* probiotics, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4288-4291.
- Hoa, N. T., L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P. H. Van, S. Ammendola, E. Ricca, and S. M. Cutting (2000), Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5241-5247.
- Jun, K. D., K. H. Lee, W. S. Kim, and H. D. Paik (2000), Microbiological identification of medical probiotic Bispan strain, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 124-127.
- Chung, Y. C., C. T. Chang, W. W. Chao, and S. T. Chou (2002), Antioxidative activity and safety of the 50% ethanol extract from red bean fermented *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2454-2458.
- Seo, Y. H., I. J. Kim, H. K. Min, and S. U. Park (1999), Fatty acid composition and antioxidative activity in wax corn (*Zea mays L.*) Fls, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1415-1420.
- Park, B. H., H. K. Choi, and H. S. Cho (2001), Antioxidant effect of aqueous green tea on soybean oil, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 552-556.
- Cha J. Y. and Y. S. Cho (2001), Antioxidative activity of extracts from fruit of *Cudranis tricuspidata*, *Kor. J. Food Sci. Nutr.* **30**, 547-551.
- Kim, S. W., S. O. Lee, and T. H. Lee (1991), Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 101-108.
- Dora, I., A. Pereira, and R. G. Glenn (2002), Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4689-4693.
- Tahiri, K., J. P. Grill, and F. Schneider (1996), Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salt and assimilation, *Curr. Microbiol.* **33**, 187-193.
- Tahiri, K., J. P. Grill, and F. Schneider (1997), Involvement of trihydroxy conjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria, *Curr. Microbiol.* **34**, 79-84.
- Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell (1985), Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 377-381.