



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

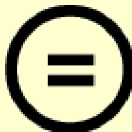
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

폴리페놀이 장내 모델 유익균과 유  
해균의 성장에 미치는 영향 연구

A Study on the effect of various  
polyphenols on the growth of  
beneficial and harmful model gut  
bacteria

2018 년 2월

서울대학교 대학원

화학생물공학부

홍 지 유

# A Study on the effect of various polyphenols on the growth of beneficial and harmful model gut bacteria

A thesis

Submitted to the Faculty of Seoul National University

By

Ji-You Hong

In partial Fulfillment of the Requirements for the Degree  
of Master of Science in Engineering degree

Advisor : Professor Byung-Gee Kim, Ph.D.

February, 2018

School of Chemical and Biological Engineering

Graduate School

Seoul National University

## 국문초록

항산화 효과가 있는 폴리페놀은 노화 방지와 염증 반응은 물론이고 심혈관계 질병, 당뇨병, 신경성 퇴행 질환 등의 다양한 질병에 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 폴리페놀을 섭취했을 때 In vivo 상에서 항미생물 효과와 더불어 유익균의 성장은 증대, 유해균의 성장은 억제되어 불균형해진 장내 미생물 군집의 비율을 맞춰지는 결과를 보여 장내 환경을 조정해주는 것으로 예상된다. 그러나 장내 미생물과 장 건강에 영향을 주는 것으로 보이는 폴리페놀에 대한 관심이 집중되고 있는 상황과는 달리, 폴리페놀의 작용 기작 및 장내 미생물에 대한 효과가 확실히 알려져 있지는 않다.

이 점에 착안해 본 논문에서는 유익균의 성장과 유해균의 성장에 영향을 주어 장내 미생물 균형을 조절해 줄 수 있는 폴리페놀의 종류와 적정 처리 농도를 찾는 연구를 중심으로 기술하고 있다.

폴리페놀의 효과를 확인하기 위한 균주는 phylum level로 보았을 때 장내에 과량으로 분포하는 *Firmicutes*에 해당하며 같은 조건 하에서 배양될 수 있는 균들로 선정하였다. 이 조건을 충족시키는 유익균은 *Lactobacillus* 속의 *Lactobacillus rhamnosus* GG이고, 유해균은 *Clostridium* 속의 *Clostridium histolyticum* 이다. 이렇게 선정한 두 균주에 13 종의 플라보노이드와 16 종의 논플라보노이드를 각각 처리한 뒤 성장 곡선과 성장률을 비교하는 실험을 진행하였다.

첫 번째로 폴리페놀 스탁을 만들 때 사용하는 DMSO가 균주 성장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. DMSO 처리 여부에 따른 균주의 성장곡선(growth curve)을 그려 그래프의 형태, 최종 배양 시간인 12시간 대의 OD<sub>600</sub>, 성장률(growth rate)을 비교했다. 그 결과 DMSO 처리 여부에 상관없이 OD<sub>600</sub>, 성장률이 동일한 값을 나타내 1% v/v의 DMSO를 처리하여도 균주 성장에 어떠한 영향도 끼치지 않음을 알아내었다.

두 번째로 균주에 처리할 폴리페놀의 최적 농도 조건을 찾기 위해 플라보노이드에 해당하는 genistein, EGCG와 논플라보노이드에 해당하는 gallic acid, phloretin의 네 종류의 폴리페놀을 0.1  $\mu$ g/mL 부터 100  $\mu$

g/mL 까지 총 여덟 농도로 테스트 하였다. 그 결과 최종 농도가 10  $\mu$  g/mL과 1  $\mu$  g/mL인 경우가 균주에 처리해야 할 폴리페놀의 최적 농도임을 알아내었다.

세 번째로 적정 농도에 맞춰 제작한 29 종의 폴리페놀을 처리한 균주를 배양해 시간 대 별로 샘플링을 진행한 뒤 생장곡선을 그리고 OD<sub>600</sub>과 생장률을 비교하였다. 또한 폴리페놀을 처리하지 않은 대조군과의 p value를 계산해 두 균주의 성장에 각 폴리페놀들이 유의미한 영향을 미치는지 확인하였다.

먼저 OD<sub>600</sub>으로 균주의 최종량을 확인해 본 결과 daidzein과 EC 1  $\mu$  g/mL, PCA 1  $\mu$  g/mL, phloretin 10  $\mu$  g/mL이 유익균 LGG의 성장은 증가시키면서 유해균 C.his의 성장은 감소시키는 좋은 폴리페놀임을 찾아냈다. 반면에 apigenin, resveratrol, chlorogenic acid과 hesperetin 10  $\mu$  g/mL, trans-stilbene 10  $\mu$  g/mL, cinnamic acid 1  $\mu$  g/mL, p-coumaric acid 1  $\mu$  g/mL는 유익균 LGG의 성장은 감소시키면서 유해균 C.his의 안 좋은 폴리페놀임을 찾아냈다.

다음으로는 생장률로 균주의 성장 속도를 비교해 본 결과 daidzein, curcumin과 EGC 10  $\mu$  g/mL, DHB 10  $\mu$  g/mL, phloretin 10  $\mu$  g/mL와 EC 1  $\mu$  g/mL, PCA 1  $\mu$  g/mL, pyrogallol 1  $\mu$  g/mL를 처리하는 경우 LGG의 성장 속도는 대조군의 성장 속도보다 증가하고 C.his의 성장 속도는 대조군의 성장 속도보다 감소했다. 반면에 apigenin, chlorogenic acid, rutin 1  $\mu$  g/mL, p-coumaric acid 1  $\mu$  g/mL을 처리하는 경우 LGG의 성장 속도는 대조군의 성장 속도보다 감소하고 C.his의 성장 속도는 대조군의 성장 속도보다 증가했다.

주요어 : 폴리페놀, 유익균, 유해균, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Clostridium histolyticum*, OD<sub>600</sub>, 생장률

학번 : 2015-21092

## 목차

국문초록.....	1
목차 .....	3
표 목차 .....	5
그림 목차.....	6
1. 서론.....	8
2. 재료 및 실험 방법.....	13
2.1 시약 및 재료.....	13
2.2 균주 생장에 DMSO 가 미치는 영향 파악.....	19
2.3 폴리페놀 농도 범위 선정 .....	19
2.4 균주의 생장 .....	19
2.5 균주의 생장 분석.....	20
3. 결과 및 토의 .....	21
3.1 DMSO 가 균주 생장에 미치는 영향 파악 .....	21
3.2 폴리페놀 최적 농도 선정 .....	25
3.3 플라보노이드 처리한 균주의 생장 분석 .....	30
3.3.1 flavone, isoflavone 처리 시 균주의 생장 .....	30
3.3.2 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주의 생장 .....	30
3.3.3 flavonol 처리 시 균주의 생장 .....	31
3.3.4 flavanone 처리 시 균주의 생장 .....	31
3.4 논플라보노이드 처리한 균주의 생장 분석 .....	43
3.4.1 phenolic acid 처리 시 균주의 생장.....	43
3.4.2 stilbene, lignan 처리 시 균주의 생장 .....	44
3.4.3 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주의 생장 .....	44

3.5 유익균과 유해균 성장에 유의미한 영향을 주는 폴리페놀.....	56
4. 결론.....	59
참고문헌.....	67
Abstract.....	71

## 표 목차

표 1.1 폴리페놀을 이용한 기존 실험 정리 표.....	12
표 1.2 폴리페놀 중 플라보노이드의 분류.....	15
표 1.3 폴리페놀 중 논플라보노이드의 분류 .....	17
표 1.4 DMSO 처리 여부에 따른 LGG, C.his 의 OD <sub>600</sub> (12h)과 생장률 .....	24
표 1.5 플라보노이드 처리 시 LGG, C.his 의 OD <sub>600</sub> (12h)의 평균값 ..	41
표 1.6 플라보노이드 처리 시 LGG, C.his 의 생장률 평균값.....	42
표 1.7 논플라보노이드 처리 시 LGG, C.his 의 OD <sub>600</sub> (12h)의 평균값	54
표 1.8 논플라보노이드 처리 시 LGG, C.his 의 생장률 평균값.....	55
표 1.9 OD <sub>600</sub> (12h)을 기준으로 각 폴리페놀이 균주의 생장에 미치는 영향을 나타낸 표 ( $p < 0.05$ ) .....	57
표 1.10 생장률을 기준으로 각 폴리페놀이 균주의 생장에 미치는 영향을 나타낸 표 ( $p < 0.05$ ) .....	58



## 그림 목차

그림 1.1 장내에서의 폴리페놀과 장내 미생물의 반응 .....	11
그림 1.2 플라보노이드의 구조.....	16
그림 1.3 논플라보노이드의 구조 .....	18
그림 1.4 DMSO 처리 여부에 따른 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG(LGG)의 생장곡선.....	22
그림 1.5 DMSO 처리 여부에 따른 <i>Clostridium histolyticum</i> (C.his)의 생장곡선.....	23
그림 1.6 최적 농도 조건 테스트 : genistein 처리 시 LGG 의 생장곡선 .....	26
그림 1.7 최적 농도 조건 테스트 : EGCG 처리 시 LGG 의 생장곡선 ..	27
그림 1.8 최적 농도 조건 테스트 : gallic acid 처리 시 LGG 의 생장곡선 .....	28
그림 1.9 최적 농도 조건 테스트 : phloretin 처리 시 LGG 의 생장곡선 .....	29
그림 1.10 flavone, isoflavone 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	33
그림 1.11 flavone, isoflavone 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	34
그림 1.12 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	35
그림 1.13 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	36
그림 1.14 flavonol 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	37
그림 1.15 flavonol 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	38
그림 1.16 flavanone 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	39
그림 1.17 flavanone 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	40
그림 1.18 phenolic acid (1) 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	46
그림 1.19 phenolic acid (2) 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선 .....	47
그림 1.20 phenolic acid (1) 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선 .....	48

그림 1.21 phenolic acid (2) 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	49
그림 1.22 stilbene, lignan 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	50
그림 1.23 stilbene, lignan 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	51
그림 1.24 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주 LGG 의 생장곡선.....	52
그림 1.25 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주 C.his 의 생장곡선.....	53
그림 1.26 daidzein 의 예상되는 catabolism pathway .....	62
그림 1.27 DHB 의 예상되는 catabolism pathway .....	63
그림 1.28 PCA 의 예상되는 catabolism pathway .....	64
그림 1.29 EGC, EC 의 예상되는 catabolism pathway .....	65
그림 1.30 phloretin 의 예상되는 catabolism pathway .....	66

## 1. 서론

인체 내에는 다양한 미생물들이 분포하는데 특히 장에는  $10^{11-12}$ /gram 만큼 많은 장내 미생물 (gut microbiota) 들이 존재한다 [1] [2]. 장내 미생물은 특히 대장에 많이 존재하며 주요 문(phylum) 단위로는 후벽균(*Firmicutes*), 의간균류(*Bacteroidetes*), 프로테오박테리아(*Proteobacteria*), 방선균(*Actinobacteria*)가 있다[3]. *Firmicutes*의 주요 속(genera)으로는 *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* 등이 있다. *Bacteroidetes*의 주요 속으로는 *Bacteroides*, *Xylanibacter*, *Prevotella*처럼 복잡한 glycan들을 분해시키는 균들이 있다. *Proteobacteria*에는 *Escherichia* 속과 *Desulfovibrio* 속이, *Actinobacteria*에는 *Bifidobacterium* 속과 *Collinsella* 속이 주를 이룬다[4].

장내 미생물의 조성은 태어날 때부터 개개인 별로 다른데, 모유를 먹고 자란 아이들의 경우 *Bifidobacteria*가 우점하며 분유를 먹고 자란 아이들의 경우 더욱 다양한 분포를 보인다[5] [6]. 3세 이상이 되면 장내 미생물의 조성이 안정화에 접어들게 되어 건강한 어른의 장내 미생물과 비슷한 조성을 이루게 된다[7]. 하지만 섭취하는 음식을 비롯해 생리학적 변화가 벌어지면 장내 미생물 조성은 다시금 변하게 된다[8]. 특히 장기간 이어진 식습관이 장내 미생물에 상당한 영향을 미치는 것으로 보이는데 일례로 다당류가 풍부한 식물을 많이 섭취하는 사람일수록 *Firmicutes*는 감소하고 *Bacteroidetes*가 증가한다[9]. 이처럼 다양한 음식물 섭취에 의해 장 환경과 장내 미생물 조성이 변하게 된다.

3대 주요 다량 영양소(macronutrient)인 다당류 (polysaccharide), 지방, 단백질 섭취에 의한 장내 변화를 살펴보면 다음과 같다. 장내 미생물에 의해 다당류는 acetate, propionate, butyrate로 분해되고 이를 통해 장내 pH가 낮아진다. 또한 생성된 SCFA(Short Chain Fatty Acid; 짧은 사슬 지방산) 중 acetate는 지질 생성(lipogenesis)에, propionate는 포도당 신생합성(gluconeogenesis)에, butyrate는 장 상피세포의 주요 에너지원으로 이용된다[10]. 지방을 많이 섭취하는 경우엔 butyrate의 농도가 감소하고 *Bifidobacteria*량이 줄어 장내 염증 반응 정도가

낮춰지는데, 이는 prebiotics의 섭취를 통해 *Bifidobacteria* 량을 증가시키면서 개선할 수 있다[11]. 단백질의 경우 SCFA, 암모니아, BCFA(Branched Chain Fatty Acids) 등으로 분해되는데, 다당류로부터 발생한 SCFA가 도달하지 못 하는 말단 결장 (distal colon)까지 SCFA를 제공하는 한편 장 내강의 pH를 6.5로 유지하는데 영향을 미친다[12][13]. 그리고 단백질을 많이 섭취할수록 아미노산을 페놀 화합물로 전환시키는 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* 등의 균주가 많아진다.

장내 미생물들은 섭취한 물질의 대사 수행을 통해 숙주에 필요한 영양분을 제공하거나 기회 감염균(opportunistic pathogen)으로부터 숙주를 지키는 면역 체계에 도움을 준다[14][15]. 또한 효소로 분해되지 않는 폴리페놀(polyphenol)이나 복잡한 다당류를 장내 미생물의 효소가 간단한 분자나 SCFA로 분해시켜 장 상피세포를 통해 흡수할 수 있게 된다[16][17].

폴리페놀은 여러 과일, 채소는 물론이고 커피나 차, 와인 등의 음료에도 들어있는 화학 물질이다[18]. 폴리페놀은 항산화 작용, 염증 반응, 신경 퇴행성 질환의 완화 등 질병 치료는 물론이고 유전자 발현의 조절, 장내 미생물 균형 조절에 도움이 되는 것으로 알려져 있어 최근 관심을 끄는 물질이다[19]. 이러한 폴리페놀은 크게 플라보노이드와 논플라보노이드로 구분할 수 있다. 플라보노이드는 2개의 페닐 고리(A ring과 B ring)와 닫힌 pyran 고리(C ring)가 선형 탄소 사슬로 이어진 탄소 15개의 골격을 기본으로 중앙의 pyran 고리의 산화 상태에 따라 flavone, isoflavone, flavanol, flavonol, flavanone, anthocyanin 등의 하위 분류로 나뉜다. 논플라보노이드는 페놀산을 기본 구조로 한 페놀산, 스틸벤, 리그난 등으로 나뉜다[20].

장내 미생물과 폴리페놀은 상호 작용을 한다. 폴리페놀은 소장에서 10% 정도만 흡수가 되고 대부분은 대장까지 이동을 하게 되는데 장관(intestinal tract)에서 미생물 효소에 의해 phenolic acid처럼 분자량이 작은 물질로 분해가 되어 장 상피 세포를 통해 흡수된다[21]. 이렇게 분해된 대사 산물과 폴리페놀은 장내 미생물 구성에 영향을 미쳐 균형을 맞춰준다[22].

장내 미생물이 폴리페놀을 흡수 가능한 대사 산물로 분해하는 작용은 크게 두 가지가 있다. 첫 번째는  $\alpha$ -rhamnosidase,  $\beta$ -glucosidase,

sulfatase, esterase 같은 효소를 통해 글리코사이드(glycoside), 황산염(sulfate), 아미드(amide), 에스터(ester), 락톤(lactone) 등을 가수분해하는 작용이다[23] [24]. 두 번째는 reductase, hydrogenase, decarboxylase, demethylase, isomerase 등의 장 미생물 효소를 통해 방향족 고리의 절단(aromatic ring cleavage), 환원(reduction), 카르복시기 이탈 반응(decarboxylation), 탈메틸화 반응(demethylation) 등의 반응을 촉진시키는 것이다[25] [26]. 이러한 두 작용에 의해 폴리페놀은 상대적으로 작은 분자량의 페놀성 화합물(phenolic compound)로 변형되어 장내 미생물 구성을 조정해준다[27] (그림 1.1).

이런 현상을 바탕으로 장내 미생물과 섭취한 음식의 상호 작용이 장내 미생물의 균형 조절 및 건강에 연결됨이 알려지면서 장내 미생물과 고분자-다당류, 폴리페놀 등-에 대한 관심이 커지고 있다. 그러나 이런 관심과는 달리 다당류가 장내에서 분해되는 과정을 통해 미생물 성장에 영향을 미치는지 알려져 있는 것에 반해, 폴리페놀이 장내에서 분해되어 장내 미생물의 성장에 영향을 미치는 것은 알려진 바가 많지 않다[28] [29]. In vitro 상에서 폴리페놀로 장내 미생물 조성을 조절한 기존 연구들의 경우 연구한 폴리페놀의 종류가 한정적인데다 처리하는 폴리페놀의 농도 조건이 정립되어 있지 않다[30] [31] [32] (표 1.1).

이 점에 착안해 체내에 유익한 균주의 성장은 증가시키고 유해한 균주의 성장을 감소시키는 폴리페놀의 종류와 적정 처리 농도에 관한 연구를 진행하게 되었다. 유익균과 유해균으로 분류될 수 있는 장내 미생물 중 대표성을 지닌 균주를 선정해 다양한 폴리페놀을 처리했을 때, 각 균주의 성장 변화를 측정해 결과적으로 장내 미생물의 균형을 맞춰주는 폴리페놀을 찾아보았다.

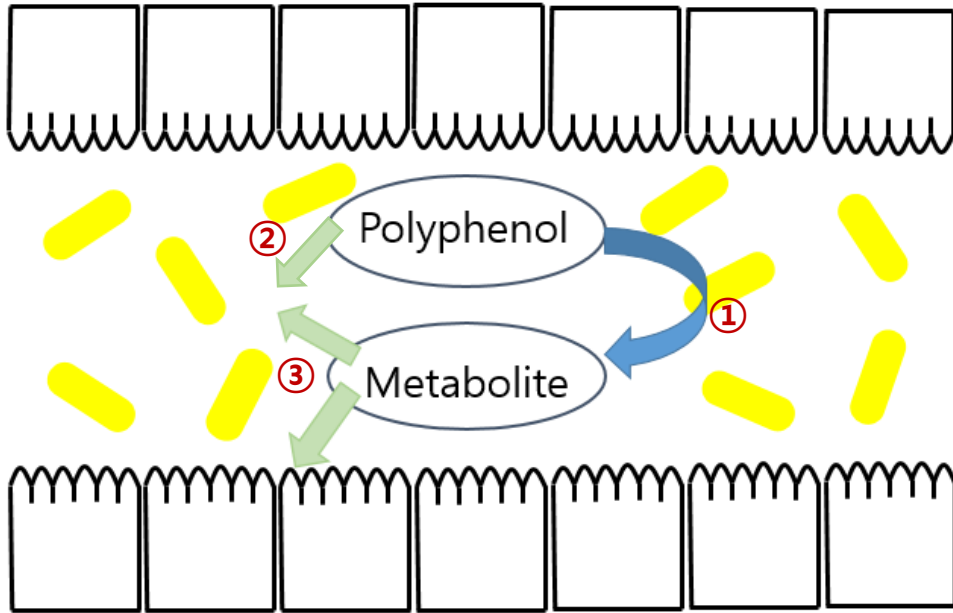


그림 1.1 장내에서의 폴리페놀과 장내 미생물의 반응

- (① 장내 미생물에 의해 폴리페놀이 작은 분자량의 대사물질로 변형, 분해되는 단계
- ② 폴리페놀과 대사물질에 의해 장내 미생물 조성이 조절되는 단계
- ③ 작은 분자량의 대사물질이 장 상피 세포 통해 흡수되는 단계)

Polyphenol	Tested Bacteria	Growth (+)/(-) effect*	Concentration	Reference
quercetin	<i>Lactobacillus spp.</i>	(-)	20µg/mL, 4µg/mL	[30]
	<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	(-)		
rutin	<i>Lactobacillus spp.</i>	(+)	100µg/mL, 20µg/mL	
	<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	(-)		
malvidin-3-glucoside	<i>Lactobacillus spp.</i>	(+)	10µg/mL, 2µg/mL	[31]
	<i>Clostridium histolyticum</i>	N.S		
gallic acid	<i>Lactobacillus spp.</i>	(+)	10µg/mL, 1.5µg/mL,	
	<i>Clostridium histolyticum</i>	(-)		
EC (Epicatechin)	<i>Lactobacillus/Enterococcus spp</i>	(+)	15µg/mL	[32]
	<i>Clostridium histolyticum</i>	(-)		
	<i>Lactobacillus/Enterococcus spp</i>	(-)	100µg/mL	
	<i>Clostridium histolyticum</i>	(-)		
catechin	<i>Lactobacillus/Enterococcus spp</i>	(+)	100µg/mL, 15µg/mL	
	<i>Clostridium histolyticum</i>	(-)		

표 1.1 폴리페놀을 이용한 기존 실험 정리 표

(\* (+) : 균주 성장 증가, (-) : 균주 성장 감소)

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1 시약 및 재료

사용한 균주는 KCTC 생물자원센터 (<http://kctc.kribb.re.kr>)로부터 분양 받은 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Clostridium histolyticum* (C.his) 이다. 균주 배양에 사용한 배지는 RCM broth로 bacto-peptone, yeast extract, dextrose, soluble starch(Becton-Dickinson and company, France), sodium chloride, sodium acetate(Junsei, Japan), beef extract, cysteine hydrochloride(Sigma, Korea) 를 각 비율에 맞춰 제조하였다.

균주 생장에 영향을 줄 것으로 예상되는 폴리페놀은 플라보노이드와 논플라보노이드를 합쳐 총 29종 선별하였고 그 종류는 다음과 같다.

균주에 대한 영향력을 확인한 플라보노이드는 다이드제인(daidzein), 제니스틴(genistein), 나린제닌(naringenin), 에피카테킨(epicatechin; EC), 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG), 케르세틴(quercetin), 아피제닌(apigenin), 헤스페리틴(hesperetin), 말비딘(malvidin), 루테올린(luteolin), 캄페롤(kaempferol), 루틴(rutin) (Sigma, Korea) 의 총 13종 이다(표 1.2, 그림 1.2).

균주에 대한 영향력을 확인한 논플라보노이드는 갈레이트(gallic acid), 플로레틴(phloretin), 페룰산(ferulic acid), 바닐린산(vanillic acid), 바닐린(vanillin), 계피산(cinnamic acid), 레스베라트롤(resveratrol), 피로갈롤(pyrogallol), 겐티스산(2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB), 프로토카테츄산(3,4-dihydroxybenzoic acid; PCA), 커큐민(curcumin), 클로로젠산(chlorogenic acid), 파라-쿠마린산(p-coumaric acid), 트랜스 스틸벤(trans-stilbene), 시스 스틸벤(cis-stilbene), 세코이소라릭시레시놀(secoisolariciresinol) (Sigma, Korea)의 총 16종 이다(표 1.3, 그림 1.3).

균주에 처리하는 폴리페놀은 dimethyl sulfoxide(DMSO) (Ducksan, Korea)에 10mg/mL 농도로 녹여 -20℃ 냉장고에 보관해 두었다가 펼



요한 농도로 희석을 시켜 사용하였다.

구분	Name	Molecular Weight
flavone	apigenin	270.24
	luteolin	286.24
isoflavone	daidzein	254.23
	genistein	270.24
anthocyanin	malvidin chloride	366.75
flavanol	EC	290.27
	EGC	306.27
	EGCG	458.37
flavonol	rutin	610.52
	quercetin	338.27
	kaempferol	286.23
flavanone	naringenin	272.26
	hesperetin	302.28

표 1.2 폴리페놀 중 플라보노이드의 분류

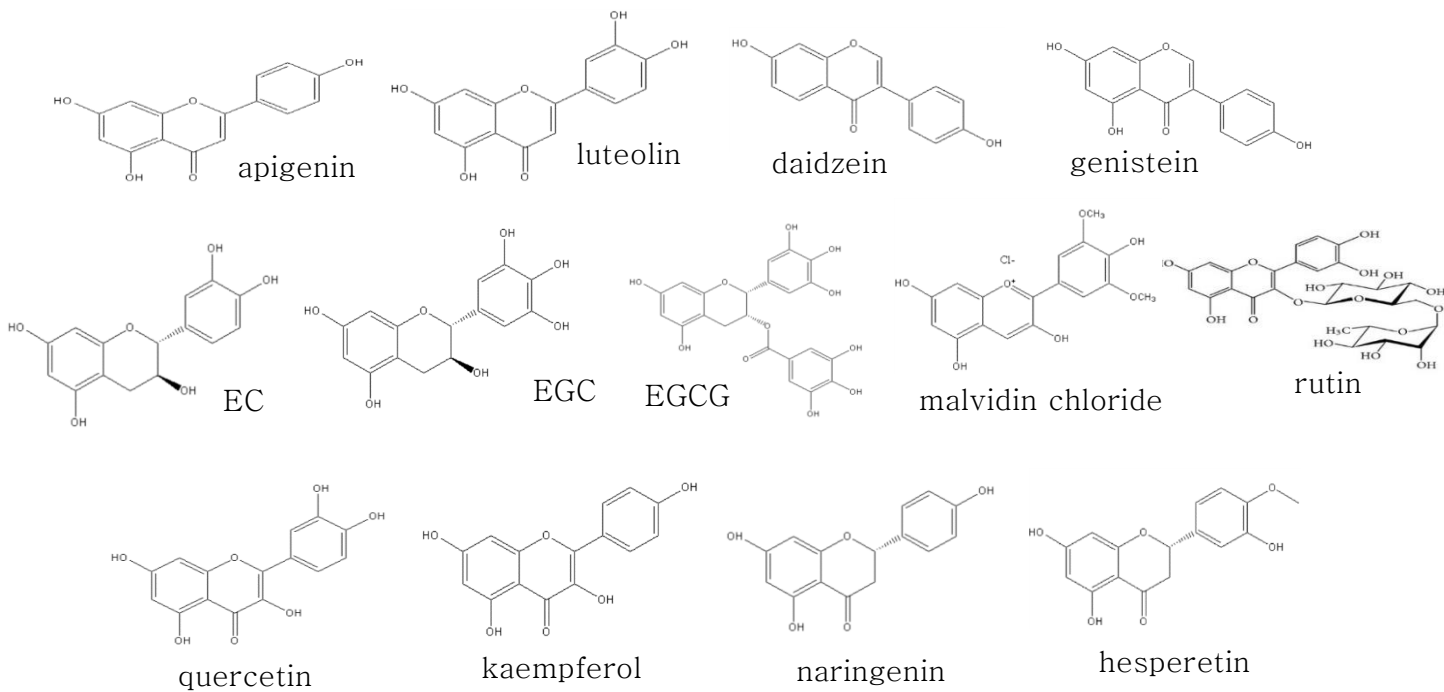


그림 1.2 플라보노이드의 구조

구분	Name	Molecular weight
phenolic acid	gallic acid	170.12
	2,5-dihydroxybenzoic acid (=DHB)	154.12
	3,4-dihydroxybenzoic acid (=PCA)	154.12
	vanillic acid	168.15
	chlorogenic acid	354.31
	cinnamic acid	148.16
	p-coumaric acid	164.16
	ferulic acid	194.18
stilbene	resveratrol	228.25
	trans-stilbene	180.25
	cis-stilbene	180.25
lignan	secoisolariciresinol	362.41
other nonflavonoid	phloretin	274.26
	curcumin	368.38
	vanillin	152.15
	pyrogallol	126.11

표 1.3 폴리페놀 중 논플라보노이드의 분류

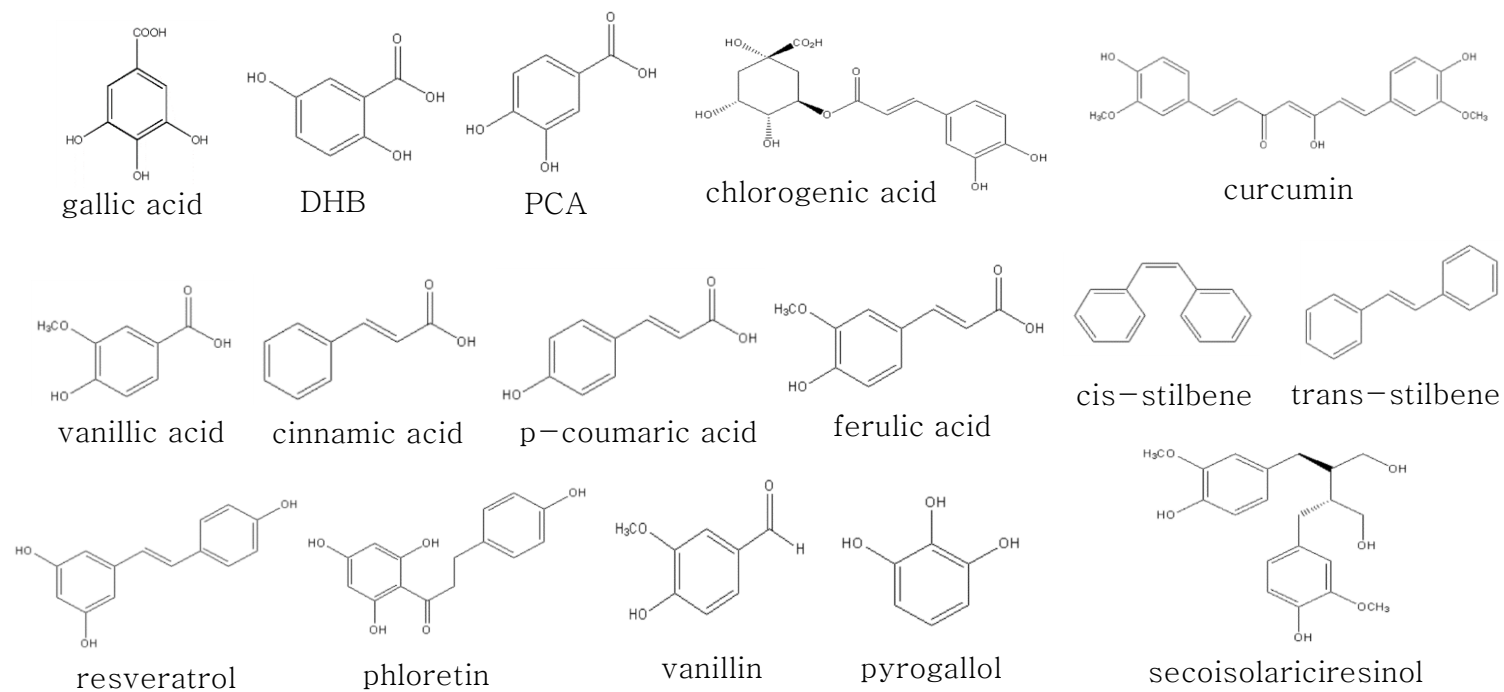


그림 1.3 논플라보노이드의 구조

## 2.2 균주 생장에 DMSO가 미치는 영향 파악

선정한 폴리페놀들을 테스트 하기 전, 폴리페놀 스탁을 만들 때 사용하는 DMSO가 균주 성장에 영향을 미치지 않음을 증명하는 테스트를 진행하였다. 처리한 폴리페놀 종류와 농도에 따른 균주의 성장 변화를 확인하기 위한 대조군으로 폴리페놀을 넣지 않은 DMSO를 잡았다. DMSO의 처리가 균주 성장에는 영향을 미치지 않음을 확인하기 위해 어떠한 처리도 하지 않은 균주와 1% v/v의 DMSO를 처리한 균주를 각 플라스크에서 12시간 동안 배양하면서 2시간 마다 UV-Spec으로 OD600 (optical density at 600nm) 값을 측정하였다.

## 2.3 폴리페놀 농도 범위 선정

균주에 유의미한 영향을 줄 수 있는 폴리페놀의 최적 처리 농도 범위를 정하기 위해 LGG에 플라보노이드에 해당하는 genistein, EGCG와 논플라보노이드에 해당하는 gallic acid, phloretin의 네 종류의 폴리페놀을 다양한 농도로 처리하였다. 각 스탁은 10mg/mL, 5mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.1mg/mL, 0.05mg/mL, 0.01mg/mL의 여덟 종류의 농도로 제작하였다. 100mL 배지에 1% (v/v) LGG 혹은 1% (v/v) C.his를 접종한 뒤 폴리페놀 스탁 역시 1% (v/v)로 처리해 플라스크 상에서 폴리페놀의 최종 농도가 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 0.5  $\mu$ g/mL, 0.1  $\mu$ g/mL 가 되게 하였다. 배치 상에서 12시간 동안 Culture를 진행하면서 2시간 마다 샘플링을 해 OD600을 측정하였다.

## 2.4 균주의 성장

혐기성 조건을 맞춰주기 위해 유리 바이알에 RCM broth를 가득 채운 뒤, 플레이트 상의 균주 콜로니를 따 전배양액을 준비하였다. 플라스크로 스케일을 넓히기 전에 전배양한 균주의 OD 값을 측정해 매 실험마다 동량의 세포를 사용했다. 플라스크에 배지 100 mL를 가득 채워 산소와 접할 수 있는 표면적을 최대한 줄인 뒤, 1 % (v/v) 의 전배양액과 1% (v/v)의 폴리페놀 스탁을 접종하였다. 플라스크 내의 균주 농도를 동일

하게 유지해주기 위해 30℃ 환경에서 200 rpm 으로 배양을 진행하였다. 각 폴리페놀은 DMSO에 10mg/mL 혹은 더 낮은 농도로 녹인 뒤 -20℃ 냉동고에 보관했다가 실험하고자 하는 농도에 맞춰 희석시켜 사용하였다. 폴리페놀 스탁은 전체 배지 량에 대비해 1% (v/v)로 처리해 최종 농도가 10  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL가 되게 하였다. (단, 플라보노이드 중 malvidin, luteolin, kaempferol과 논플라보노이드 중 secoisolariciresinol, cis-stilbene, curcumin의 폴리페놀 여섯 종은 배지에서의 최종 농도가 0.1  $\mu$ g/mL, 0.01  $\mu$ g/mL가 되게 하였다.)

## 2.5 균주의 생장 분석

처리한 폴리페놀 종류, 농도에 따른 균주 생장을 시간대 별로 확인하기 위해 2시간 마다 1mL씩 샘플링을 진행하여 UV-Spec으로 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 균주의 생장은 배치 상에서 12시간 동안 관찰하였고, 같은 실험을 세 번 수행하였다. 측정한 OD<sub>600</sub> 값은 평균을 낸 뒤 semi-log plot인 균주 생장 곡선(growth Curve)을 그리고 표준 편차를 계산하여 error bar를 기재하였다.

### 3. 결과 및 토의

#### 3.1 DMSO가 균주 생장에 미치는 영향 파악

처리한 폴리페놀 종류와 농도에 따른 균주의 성장 변화를 확인하기 위한 대조군으로는 균주에 폴리페놀을 넣지 않은 DMSO를 1% v/v 처리한 것을 사용했다. DMSO는 폴리페놀 스타크를 만들 때 이용하기 때문에 대조군으로 사용하기 적합하다 판단했기 때문이다. 그러나 DMSO를 과량 처리 시, 균주에 독성으로 작용해 성장을 저해시킬 수 있기 때문에 처리한 DMSO 농도에서 균주가 성장을 제대로 하는지 확인할 필요성이 있었다.

100mL RCM broth로 채운 플라스크에 아무런 처리도 하지 않은 1% v/v LGG를 배양한 것과 1% v/v의 DMSO를 처리한 뒤 1% v/v LGG를 배양한 두 경우의 성장 곡선을 그려 성장곡선의 형태, 최종 OD, 성장률의 차이가 없음을 확인하였다(표 1.4, 그림 1.4). C.his의 배양에서도 LGG와 마찬가지로 DMSO 처리 여부에 따른 성장곡선의 형태, 최종 OD, 성장률을 비교해 차이가 없음을 확인하였다(표 1.4, 그림 1.5).

결과적으로 1% v/v의 DMSO를 처리한 것이 균주 생장에 유해하지 않음을 확인하였다.



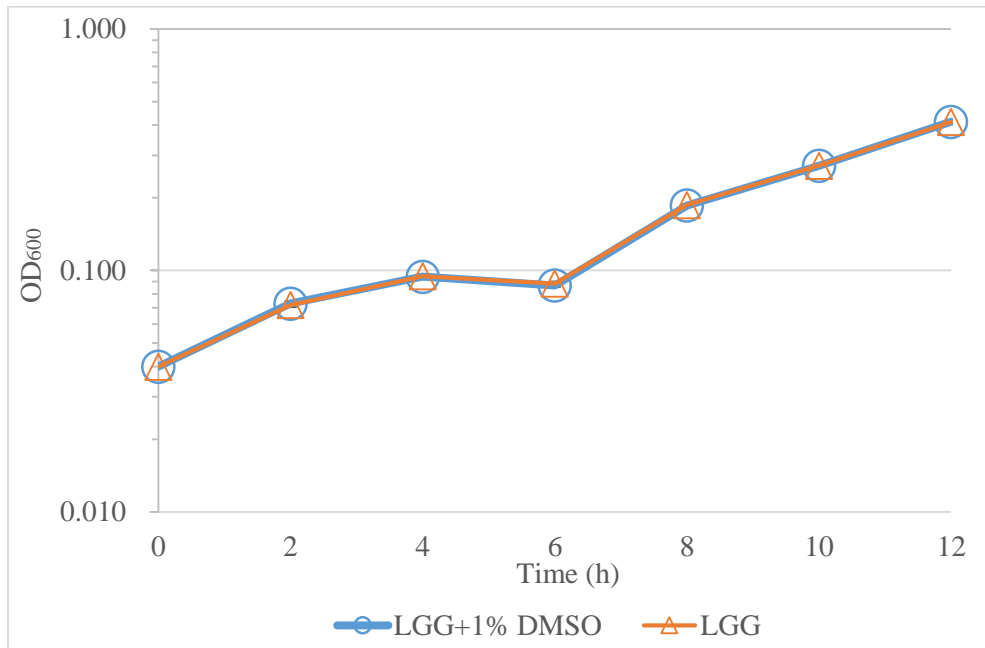


그림 1.4 DMSO 처리 여부에 따른 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)의 생장곡선

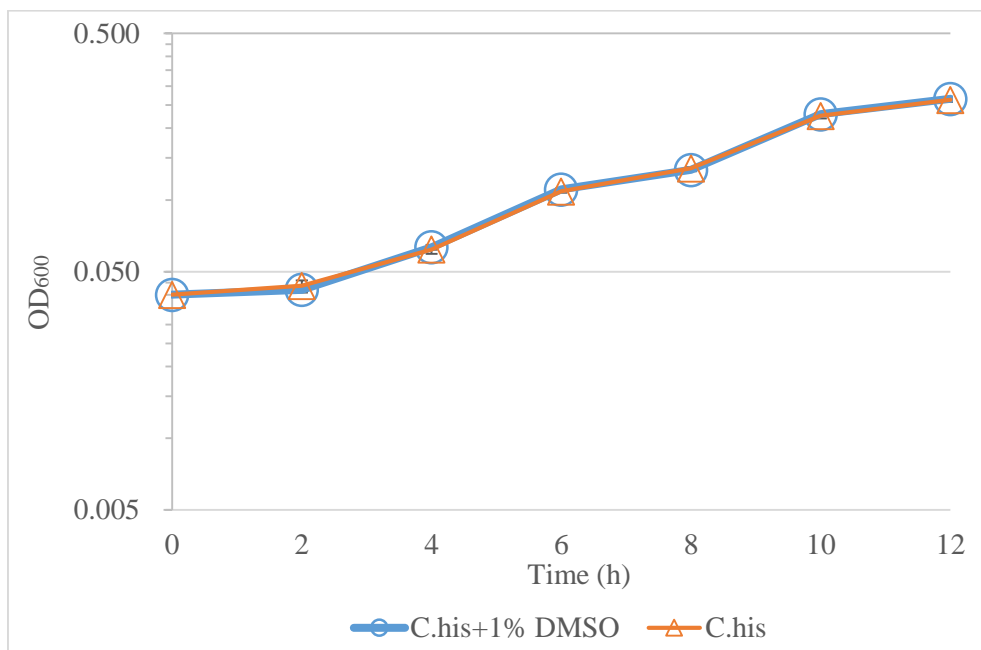


그림 1.5 DMSO 처리 여부에 따른 *Clostridium histolyticum*(C.his)의  
생장곡선

Strain	Factor	w/o DMSO	w DMSO
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	OD <sub>600</sub> (12h)	0.4120	0.4130
	생장률	0.0333	0.0333
<i>Clostridium histolyticum</i>	OD <sub>600</sub> (12h)	0.2630	0.2660
	생장률	0.0231	0.0234

표 1.4 DMSO 처리 여부에 따른 LGG, C.his의 OD<sub>600</sub>(12h)과 생장률

### 3.2 폴리페놀 최적 농도 선정

균주의 생장에 유의미한 영향을 주는 폴리페놀의 최적 농도를 찾기 위해 먼저 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주에 각기 다른 분류의 폴리페놀을 처리한 뒤 배양을 진행하였다. 테스트한 폴리페놀 네 종류는 각각 플라보노이드에 해당하는 genistein과 EGCG, 논플라보노이드에 해당하는 gallic acid, phloretin이다. 이 때, 균주에 처리하는 폴리페놀의 농도는 플라스크 상에서 최종 농도가 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ 가 되게 하였다.

배치 상에서 12시간 동안 배양을 진행하면서 네 경우의 OD<sub>600</sub>을 측정한 결과 genistein, phloretin은 고농도(100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 처리 시 anti-microbial 효과가 작용해 LGG의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있었고, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 gallic acid를 처리 했을 때의 LGG의 성장이 다른 농도를 처리했을 때와는 전혀 다른 형태로 증가하는 모습을 보였다. EGCG의 경우는 농도 범위에 상관없이 성장의 형태가 비슷하게 보였다. 세 경우를 조합한 결과 10  $\mu\text{g/mL}$  이하의 농도를 처리하였을 때 anti-microbial 효과가 작용한 것으로 보이지 않았다. 이에 10  $\mu\text{g/mL}$ 와 1  $\mu\text{g/mL}$ 가 유의미한 결과가 도출되는 농도로 판단되어 이후 진행한 모든 실험에 사용한 폴리페놀 농도를 10  $\mu\text{g/mL}$ 와 1  $\mu\text{g/mL}$ 로 맞췄다(그림 1.6-1.9).

그러나 논플라보노이드 중 curcumin의 경우 최적 농도로 선정한 지점에서 배지와 플라스크를 염색시키고 끈적한 기름 형태가 되어 더 낮은 농도를 처리하게 되었다. 마찬가지로 플라보노이드 중 malvidin, luteolin, kaempferol과 논플라보노이드 중 secoisolariciresinol, Cis-Stilbene 역시 최적 농도로 정한 농도 범위로 처리하기 어려운 문제가 발생하여 위에 기술한 폴리페놀 여섯 중(malvidin, kaempferol, luteolin, cis-stilbene, secoisolariciresinol, curcumin) 은 플라스크 상에서 최종 농도가 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 0.01  $\mu\text{g/mL}$  가 되게 하였다.

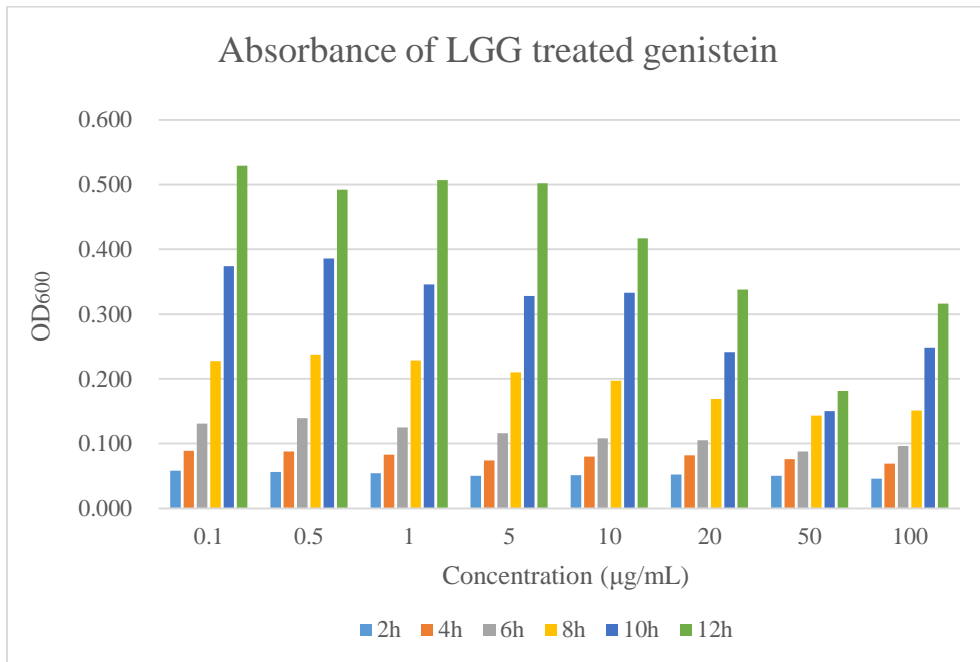


그림 1.6 최적 농도 조건 테스트 : genistein 처리 시 LGG의 생장곡선

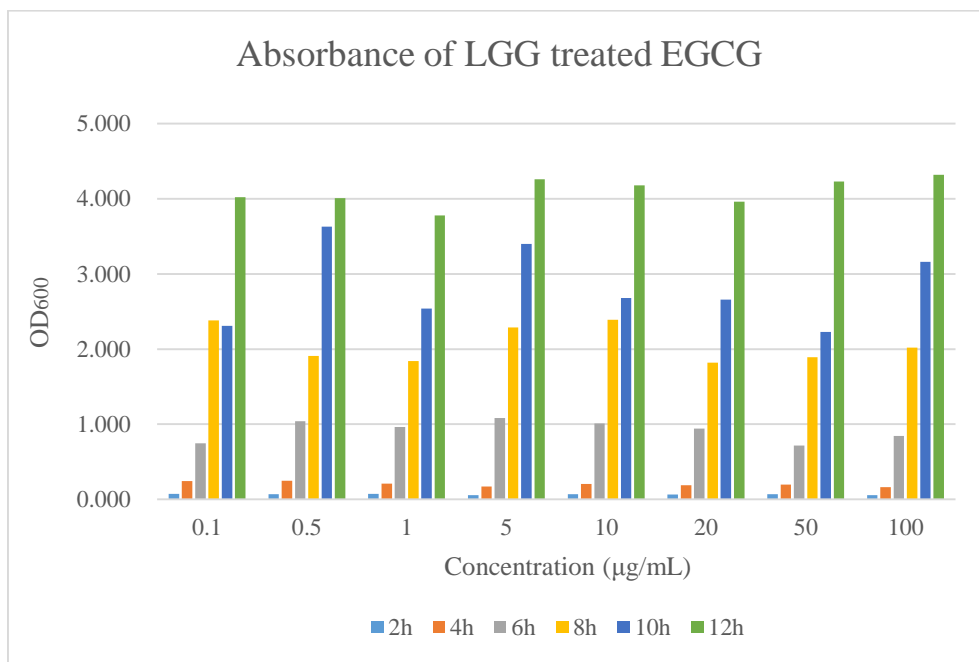


그림 1.7 최적 농도 조건 테스트 : EGCG 처리 시 LGG의 생장곡선

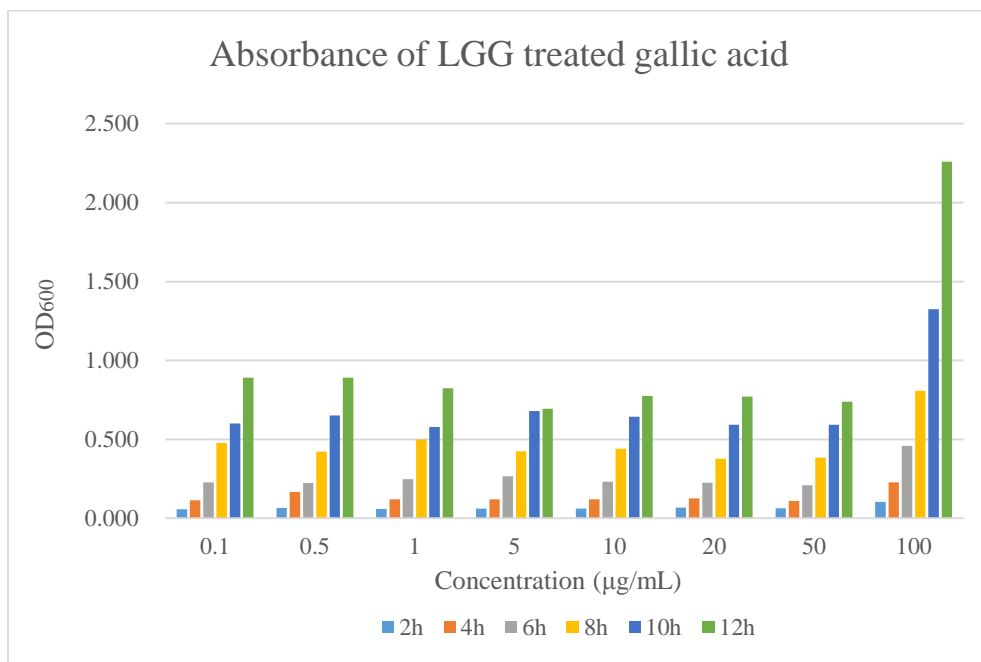


그림 1.8 최적 농도 조건 테스트 : gallic acid 처리 시 LGG의 생장곡선

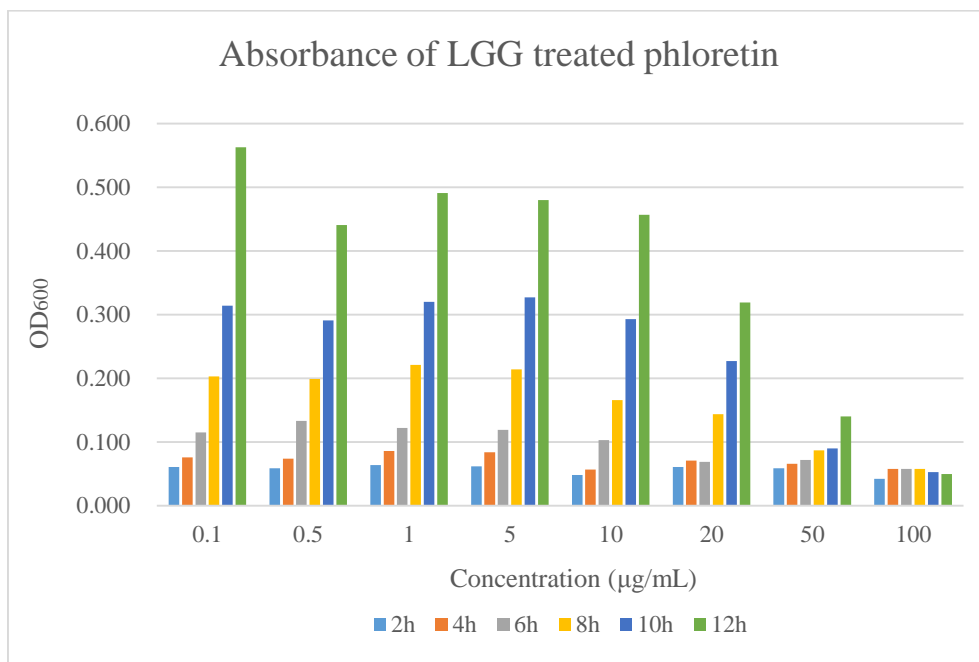


그림 1.9 최적 농도 조건 테스트 : phloretin 처리 시 LGG의 생장곡선



### 3.3 플라보노이드 처리한 균주의 성장 분석

유익균에 해당하는 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)와 유해균에 해당하는 *Clostridium histolyticum*(C.his)에 1% (v/v)의 플라보노이드를 처리한 뒤 12시간 동안 배양하면서 OD<sub>600</sub>을 측정하였다. 이렇게 얻은 데이터로 성장곡선을 그리고 OD<sub>600</sub> (at 12h), 성장률을 구해 그 값을 비교해보았다(그림 1.10-1.17 / 표 1.5-1.6). 또한 각 플라보노이드를 처리한 결과가 유의미한지 여부를 p-value로 확인하였다.

#### 3.3.1 flavone, isoflavone 처리 시 균주의 성장

플라보노이드 중 flavone (apigenin, luteolin), isoflavone (daidzein, genistein)을 각 균주 배양에 처리하였을 때의 LGG와 C.his의 성장을 확인해 보았다(그림 1.10-1.11).

OD<sub>600</sub>, 성장률 두 경우 모두 같은 결과를 보였으며, 유의미함을 확인하였다. ( $p < 0.05$ ) LGG의 경우 flavone을 처리하였을 때에는 균주의 생장이 대조군보다 감소하였고, isoflavone을 처리하였을 때에는 균주의 생장이 대조군보다 증가하였다(그림 1.10). C.his의 경우 flavone 중 apigenin, isoflavone 중 genistein을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 flavone 중 luteolin, isoflavone 중 daidzein을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.11).

#### 3.3.2 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주의 성장

플라보노이드 중 flavanol (EC, EGC, EGCG), anthocyanin (malvidin)을 처리하였을 때 LGG와 C.his의 성장을 확인해 보았다(그림 1.12-1.13).

OD<sub>600</sub>으로 결과를 정리하였을 때, LGG에 flavanol과 anthocyanin을 처리한 경우 모두 균주의 생장이 대조군보다 증가하였다(그림 1.12). C.his의 경우 flavanol 중 EGC, EGCG, anthocyanin을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 flavanol 중 EC를 1  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.13).

반면에 생장률로 결과를 정리하였을 때, LGG에 flavanol과 anthocyanin을 처리한 경우 모두 대조군보다 성장 속도가 증가하였다. C.his에 EC 10  $\mu$ g/mL, EGCG를 처리하였을 때엔 대조군보다 성장 속도가 증가, EGC 1  $\mu$ g/mL와 malvidin을 처리하였을 때엔 대조군과 비슷한 성장 속도를, EC 1  $\mu$ g/mL와 EGC 10  $\mu$ g/mL를 처리하였을 때 대조군보다 성장 속도가 감소하였다.

### 3.3.3 flavonol 처리 시 균주의 생장

플라보노이드 중 flavonol (rutin, quercetin, kaempferol)을 처리하였을 때 LGG와 C.his의 생장을 확인해 보았다(그림 1.14-1.15).

OD600으로 결과를 정리하였을 때, LGG의 경우 rutin을 10  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 그 외의 경우는 모두 대조군보다 생장이 감소하였다(그림 1.14). C.his의 경우 rutin 혹은 quercetin을 1  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 quercetin을 1  $\mu$ g/mL 농도로 혹은 kaempferol을 처리하였을 때 균주의 생장이 Control 보다 감소하였다(그림 1.15).

반면에 생장률로 결과를 정리하였을 때, LGG의 경우 rutin을 10  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 경우에는 균주의 성장 속도가 대조군의 성장 속도보다 증가하였고, quercetin 1  $\mu$ g/mL을 처리하였을 때 대조군과 비슷한 성장 속도를, 그 외의 경우는 모두 대조군보다 성장속도 감소하였다. C.his의 경우 rutin, quercetin 1  $\mu$ g/mL을 처리하였을 때 대조군보다 성장 속도가 증가하였고 quercetin 10  $\mu$ g/mL, kaempferol을 처리하였을 때 대조군보다 성장 속도가 감소하였다.

### 3.3.4 flavanone 처리 시 균주의 생장

플라보노이드 중 flavanone (naringenin, hesperetin)을 처리하였을 때 LGG와 C.his의 생장을 확인해 보았다(그림 1.16-1.17).

OD600으로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 naringenin을 처리한 경우 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 hesperetin을 처리한 경우엔

균주의 생장이 대조군보다 생장이 감소하였다(그림 1.16). C.his의 경우 naringenin 혹은 hesperetin을  $10\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 hesperetin을  $1\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.17).

생장률로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 성장 속도가 naringenin 처리 시 증가하고 hesperetin을 처리 시 감소하였다. C.his의 경우 naringenin 처리 시 성장 속도가 증가하고, hesperetin을  $10\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 대조군과 비슷한 성장 속도를, hesperetin을  $1\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 성장 속도가 감소하였다.

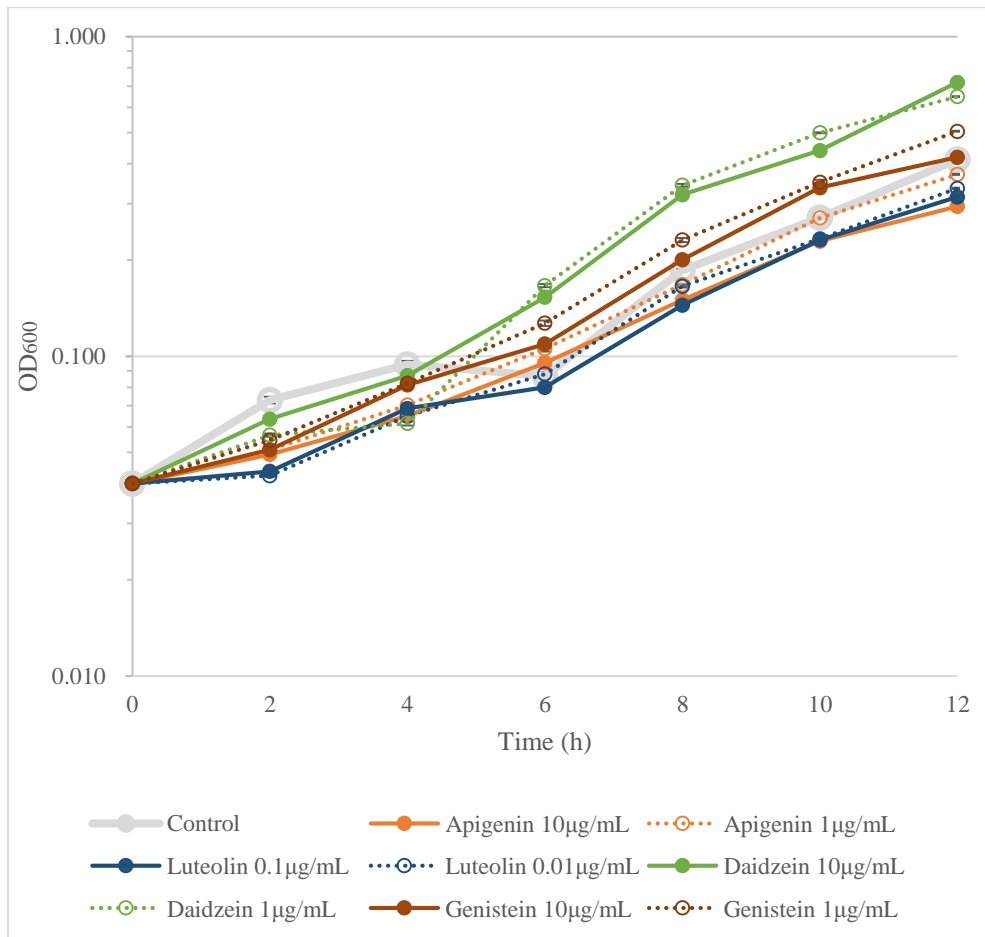


그림 1.10 flavone, isoflavone 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

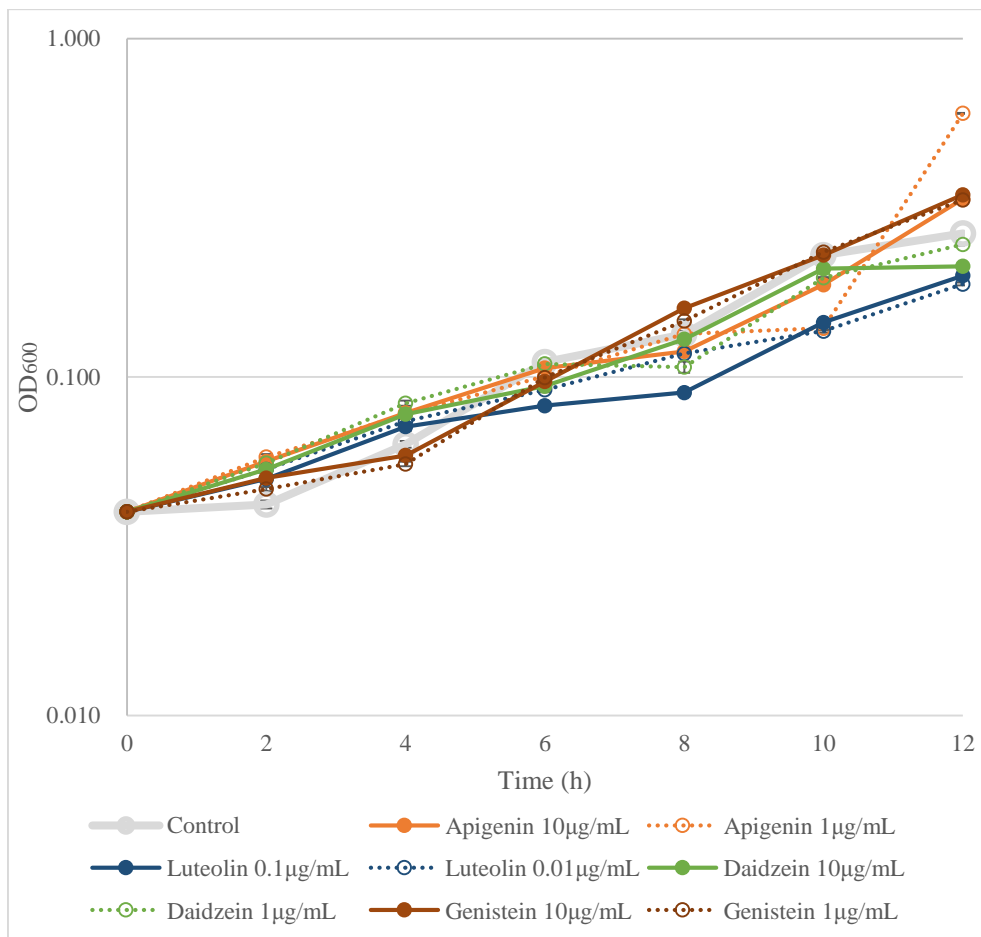


그림 1.11 flavone, isoflavone 처리 시 균주 C.his의 생장곡선

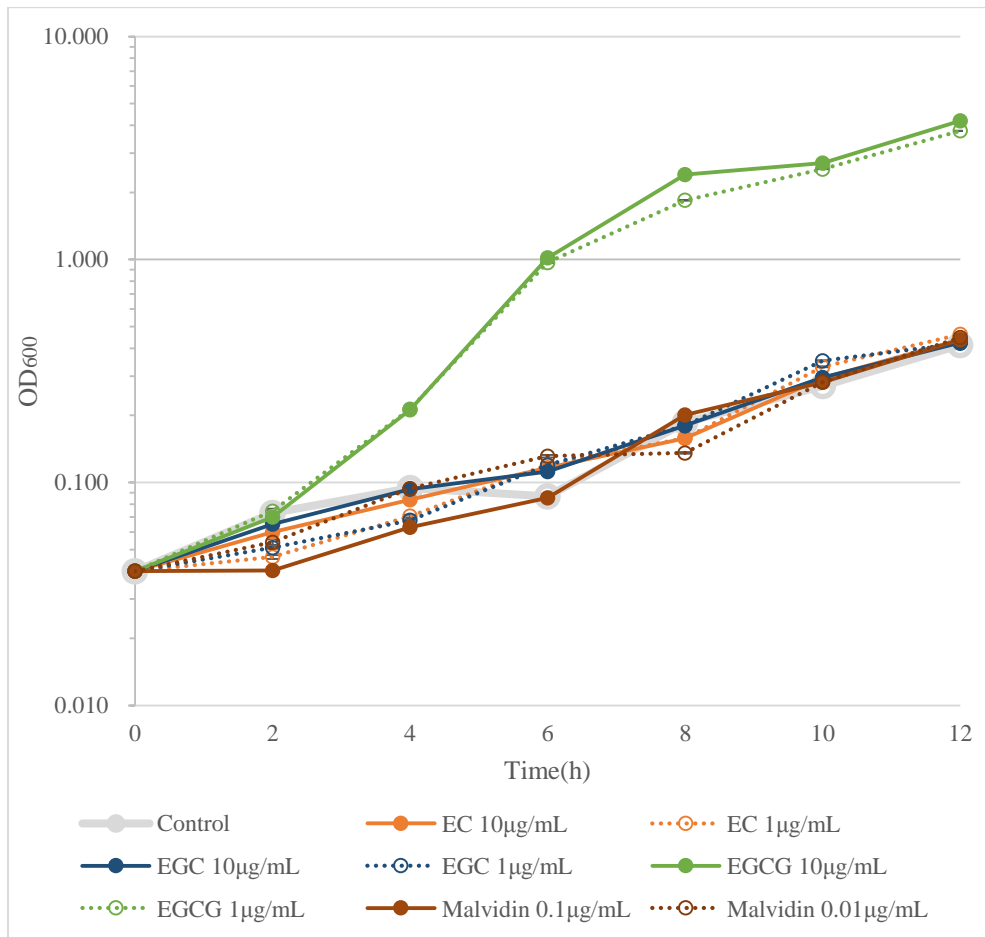


그림 1.12 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

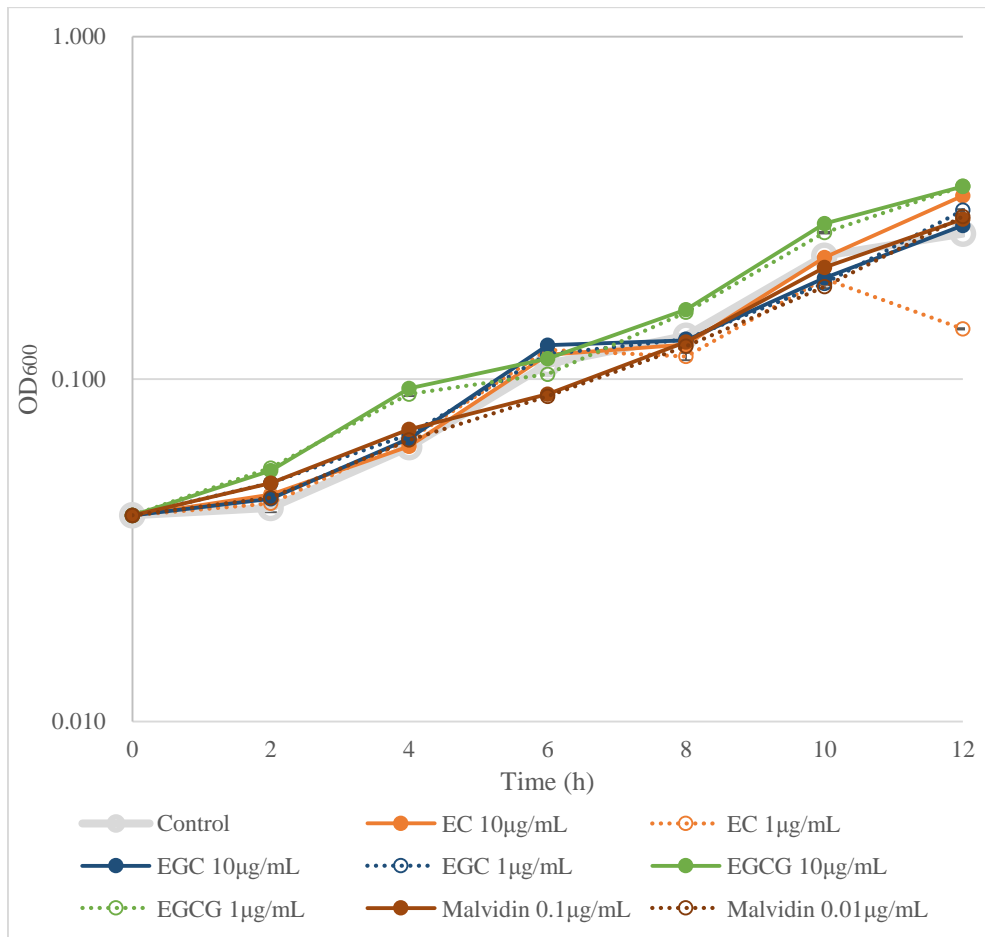


그림 1.13 flavanol, anthocyanin 처리 시 균주 *C. his*의 생장곡선

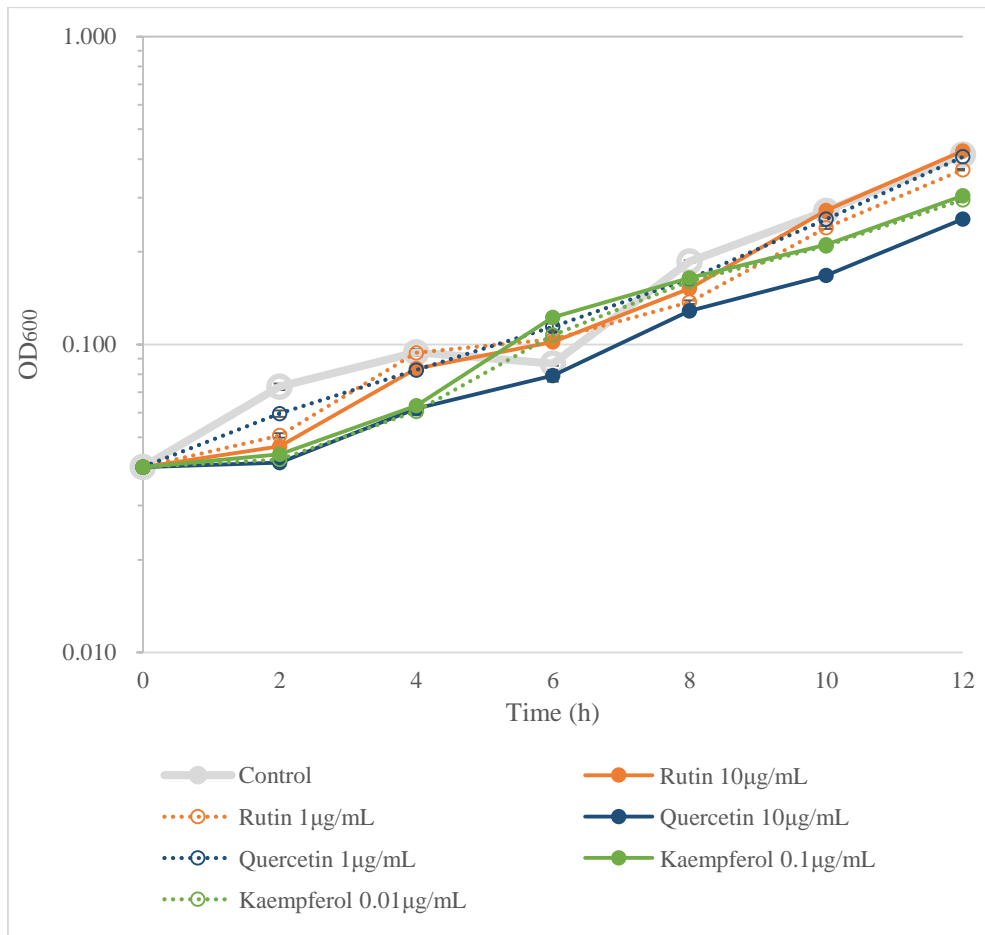


그림 1.14 flavonol 처리 시 균주 LGG의 생장곡선



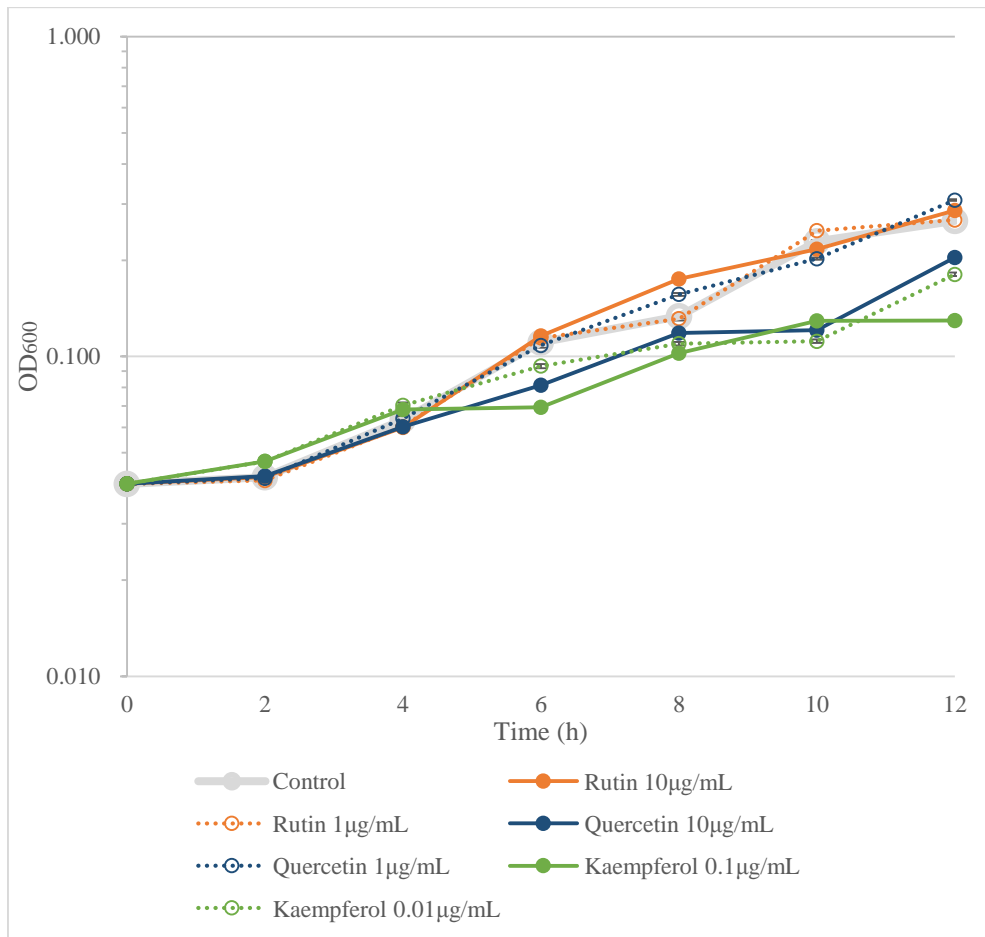


그림 1.15 flavonol 처리 시 균주 *C. his*의 생장곡선

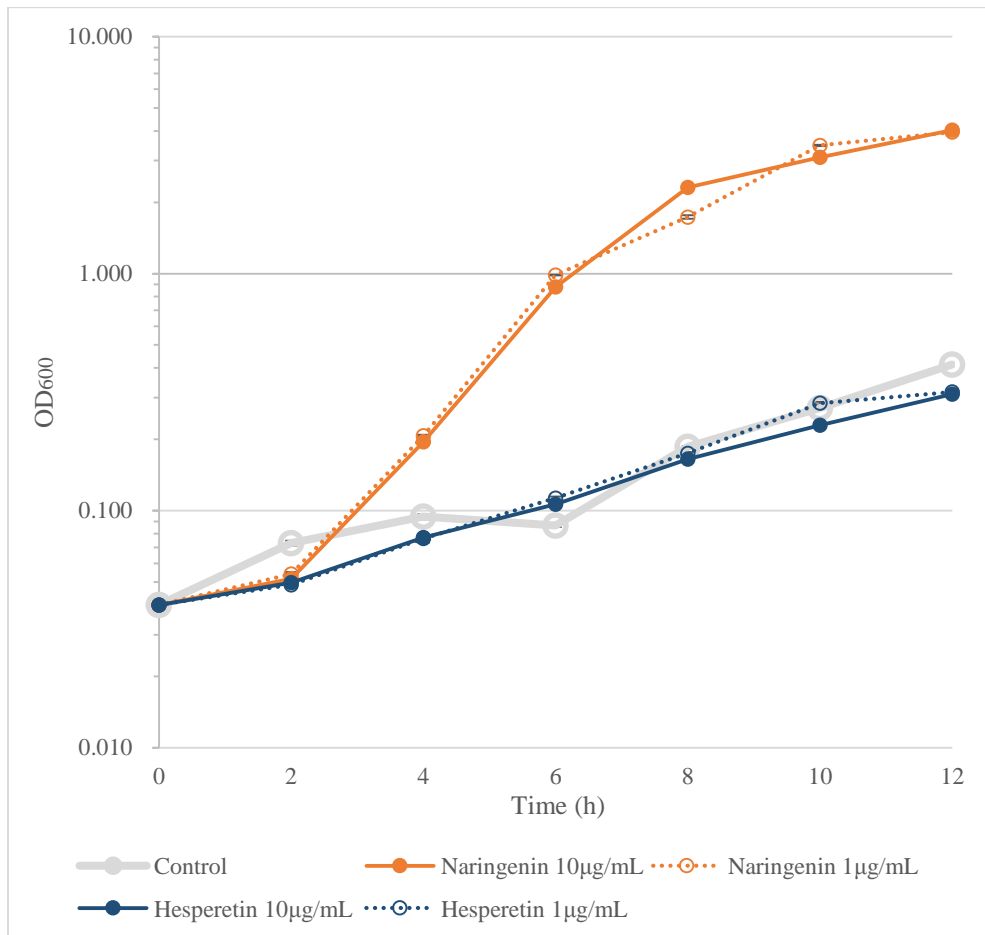


그림 1.16 flavanone 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

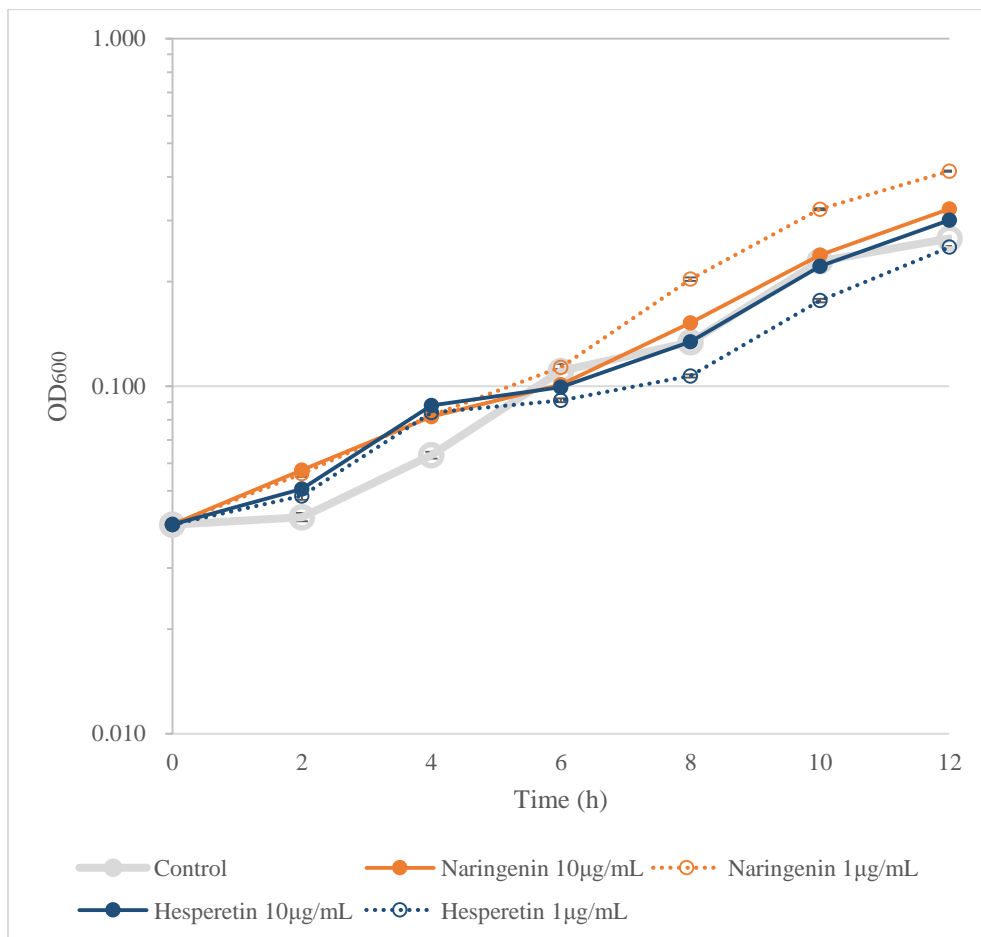


그림 1.17 flavanone 처리 시 균주 *C. his*의 생장곡선

구분	폴리페놀 종류	LGG OD600 (12h)	C.his OD600 (12h)
	대조군	0.413	0.266
flavone	apigenin 10 $\mu$ g/mL	0.294	0.336
	apigenin 1 $\mu$ g/mL	0.371	0.601
	luteolin 0.1 $\mu$ g/mL	0.315	0.199
	luteolin 0.01 $\mu$ g/mL	0.335	0.188
isoflavone	daidzein 10 $\mu$ g/mL	0.719	0.212
	daidzein 1 $\mu$ g/mL	0.649	0.247
	genistein 10 $\mu$ g/mL	0.419	0.346
	genistein 1 $\mu$ g/mL	0.506	0.334
flavanol	EC 10 $\mu$ g/mL	0.437	0.343
	EC 1 $\mu$ g/mL	0.461	0.140
	EGC 10 $\mu$ g/mL	0.424	0.281
	EGC 1 $\mu$ g/mL	0.421	0.311
	EGCG 10 $\mu$ g/mL	4.190	0.365
	EGCG 1 $\mu$ g/mL	3.777	0.366
anthocyanin	malvidin 0.1 $\mu$ g/mL	0.437	0.293
	malvidin 0.01 $\mu$ g/mL	0.447	0.298
flavonol	rutin 10 $\mu$ g/mL	0.425	0.286
	rutin 1 $\mu$ g/mL	0.370	0.267
	quercetin 10 $\mu$ g/mL	0.256	0.204
	quercetin 1 $\mu$ g/mL	0.407	0.308
	kaempferol 0.1 $\mu$ g/mL	0.304	0.130
	kaempferol 0.01 $\mu$ g/mL	0.295	0.181
flavanone	naringenin 10 $\mu$ g/mL	4.037	0.324
	naringenin 1 $\mu$ g/mL	3.953	0.416
	hesperetin 10 $\mu$ g/mL	0.310	0.300
	hesperetin 1 $\mu$ g/mL	0.317	0.251

표 1.5 플라보노이드 처리 시 LGG, C.his의 OD600 (12h)의 평균값

구분	폴리페놀 종류	LGG 생장률	C.his 생장률
	대조군	0.0333	0.0234
flavone	apigenin 10 $\mu$ g/mL	0.0253	0.0248
	apigenin 1 $\mu$ g/mL	0.0323	0.0419
	luteolin 0.1 $\mu$ g/mL	0.0273	0.0139
	luteolin 0.01 $\mu$ g/mL	0.0292	0.0127
isoflavone	daidzein 10 $\mu$ g/mL	0.0643	0.0175
	daidzein 1 $\mu$ g/mL	0.0636	0.0184
	genistein 10 $\mu$ g/mL	0.0386	0.0293
	genistein 1 $\mu$ g/mL	0.0452	0.0288
flavanol	EC 10 $\mu$ g/mL	0.0365	0.0283
	EC 1 $\mu$ g/mL	0.0413	0.0124
	EGC 10 $\mu$ g/mL	0.0353	0.0225
	EGC 1 $\mu$ g/mL	0.0394	0.0241
	EGCG 10 $\mu$ g/mL	0.4210	0.0310
	EGCG 1 $\mu$ g/mL	0.3769	0.0306
anthocyanin	malvidin 0.1 $\mu$ g/mL	0.0393	0.0240
	malvidin 0.01 $\mu$ g/mL	0.0362	0.0237
flavonol	rutin 10 $\mu$ g/mL	0.0358	0.0250
	rutin 1 $\mu$ g/mL	0.0295	0.0244
	quercetin 10 $\mu$ g/mL	0.0205	0.0147
	quercetin 1 $\mu$ g/mL	0.0329	0.0257
	kaempferol 0.1 $\mu$ g/mL	0.0255	0.0090
	kaempferol 0.01 $\mu$ g/mL	0.0252	0.0116
flavanone	naringenin 10 $\mu$ g/mL	0.4296	0.0265
	naringenin 1 $\mu$ g/mL	0.4293	0.0373
	hesperetin 10 $\mu$ g/mL	0.0260	0.0240
	hesperetin 1 $\mu$ g/mL	0.0290	0.0187

표 1.6 플라보노이드 처리 시 LGG, C.his의 생장률 평균값

### 3.4 논플라보노이드 처리한 균주의 생장 분석

유익균에 해당하는 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)와 유해균에 해당하는 *Clostridium histolyticum*(C.his)에 폴리페놀 중 논플라보노이드들을 1% (v/v)을 처리하여 12시간 동안 OD<sub>600</sub>을 측정하였다. 이렇게 얻은 데이터로 생장곡선을 그리고 OD<sub>600</sub>(at 12h), 생장률을 구하였다(그림 1.18-1.25 / 표 1.7-1.8). 또한 각 논플라보노이드를 처리한 결과가 유의미한지 여부를 p-value로 확인하였다.

#### 3.4.1 phenolic acid 처리 시 균주의 생장

논플라보노이드 중 phenolic acid (gallic acid, DHB, PCA, vanillic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid)를 처리하였을 때 LGG와 C.his의 생장을 확인해 보았다.

OD<sub>600</sub>으로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 chlorogenic acid, p-coumaric acid 혹은 1  $\mu$ g/mL의 DHB나 cinnamic acid 혹은 10  $\mu$ g/mL, ferulic acid를 처리하였을 때 균주의 생장이 오히려 대조군보다 감소하였고, gallic acid, PCA, vanillic acid 또는 10  $\mu$ g/mL의 DHB나 cinnamic acid 또는 1  $\mu$ g/mL ferulic acid를 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였다(그림 1.18-1.19). C.his의 경우 gallic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid 또는 10  $\mu$ g/mL PCA를 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 DHB 또는 1  $\mu$ g/mL PCA를 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.20-1.21).

생장률로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 ferulic acid 처리 시 대조군과 비슷한 성장 속도를 보였고, chlorogenic acid와 p-coumaric acid 1  $\mu$ g/mL, DHB 1  $\mu$ g/mL 처리 시 대조군보다 느린 성장 속도를 보였으며 나머지 phenolic acid의 경우 모두 대조군보다 빠른 성장 속도를 보였다. C.his의 경우 gallic acid 10  $\mu$ g/mL 처리 시 대조군과 비슷한 성장 속도를 보이고 DHB, PCA 1  $\mu$ g/mL 처리 시 대조군보다 성장 속도가 느렸으며 나머지 phenolic acid의 경우 모두 대조군보다 빠른 성장 속도를 보였다.

### 3.4.2 stilbene, lignan 처리 시 균주의 생장

논플라보노이드 중 stilbene (resveratrol, cis-stilbene, trans-stilbene), lignan (secoisolariciresinol)을 처리하였을 때 LGG와 C.his의 생장을 확인해 보았다.

OD<sub>600</sub>으로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 cis-stilbene, trans-stilbene, secoisolariciresinol을 처리하였을 때 균주의 생장이 오히려 대조군보다 감소하였고, resveratrol을 처리하였을 때 균주의 생장이 OD<sub>600</sub> (at 12h)로 볼 땐 다소 감소한 것으로 보였으나 생장률이 대조군보다 다소 증가하였다(그림 1.22). C.his의 경우 secoisolariciresinol, resveratrol 또는 10  $\mu$ g/mL trans-stilbene를 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 cis-stilbene 또는 1  $\mu$ g/mL trans-stilbene를 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.23).

생장률로 결과를 확인해보면 resveratrol 처리 시 LGG의 성장 속도가 대조군보다 빨라지고 secoisolariciresinol, cis-stilbene, trans-stilbene 처리 시 대조군보다 느려졌다. C.his 성장 속도의 경우는 resveratrol 처리 시 대조군보다 빨라지고 10  $\mu$ g/mL의 trans-Stilbene 처리 시 대조군과 비슷한 성장 속도를 보였으며 1  $\mu$ g/mL의 trans-stilbene, cis-Stilbene, secoisolariciresinol 처리 시 대조군보다 느려졌다.

### 3.4.3 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주의 생장

논플라보노이드 중 특정 분류군으로 나뉘지 않는 논플라보노이드들 (pyrogallol, vanillin, phloretin, curcumin)을 처리하였을 때 LGG와 C.his의 생장을 확인해 보았다.

OD<sub>600</sub>으로 결과를 확인해보면 LGG의 경우 1  $\mu$ g/mL 농도의 pyrogallol을 처리하였을 때 균주의 생장이 오히려 대조군보다 감소하였고, vanillin, phloretin, curcumin 또는 10  $\mu$ g/mL 농도의 pyrogallol을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였다(그림 1.24). C.his

의 경우 pyrogallol, vanillin 또는  $1\mu\text{g/mL}$  농도의 phloretin을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 증가하였고 curcumin 또는  $10\mu\text{g/mL}$  농도의 phloretin을 처리하였을 때 균주의 생장이 대조군보다 감소하였다(그림 1.25).

생장률로 결과를 확인해보면 LGG의 경우  $10\mu\text{g/mL}$ 의 pyrogallol 처리 시 대조군과 비슷한 성장 속도를 보이고 나머지 nonflavonoid에서는 대조군보다 빠른 성장 속도를 보였다. C.his의 경우 vanillin과  $1\mu\text{g/mL}$ 의 pyrogallol 처리 시 대조군보다 빠른 성장 속도를, 그 이외의 nonflavonoid 처리 시에는 대조군보다 느린 성장 속도를 보였다.



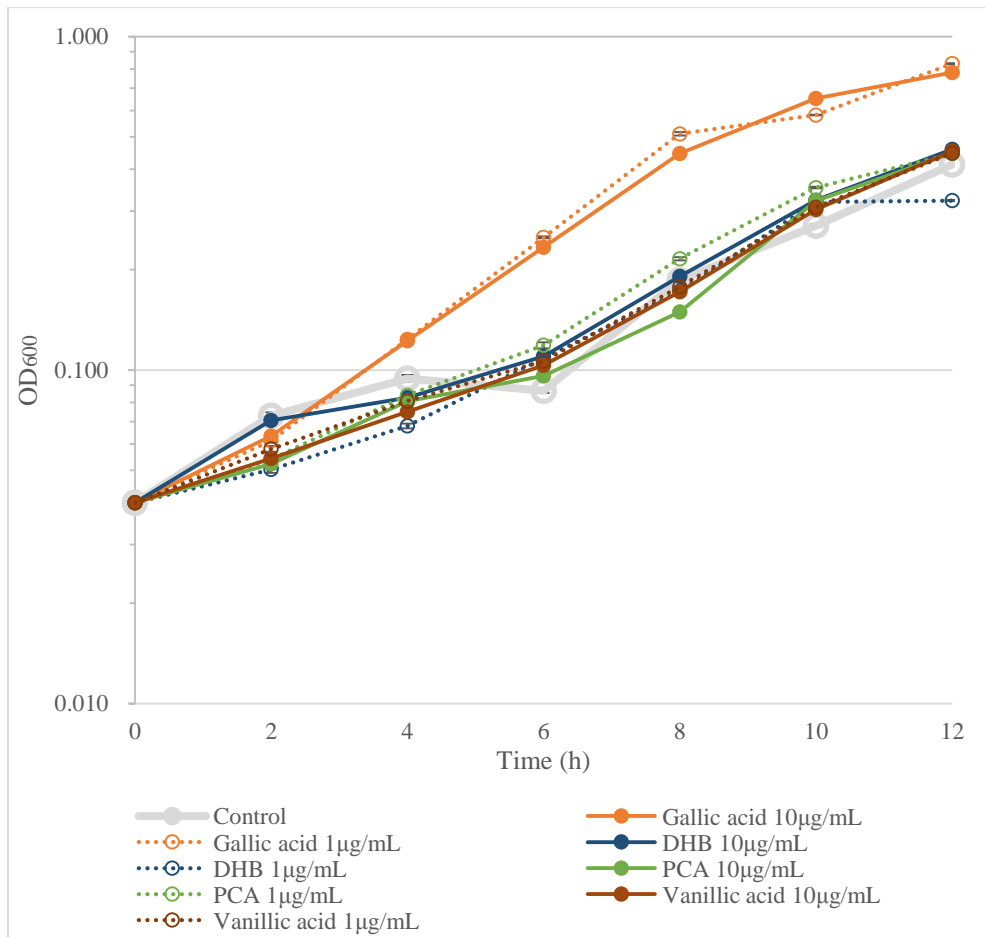


그림 1.18 phenolic acid (1) 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

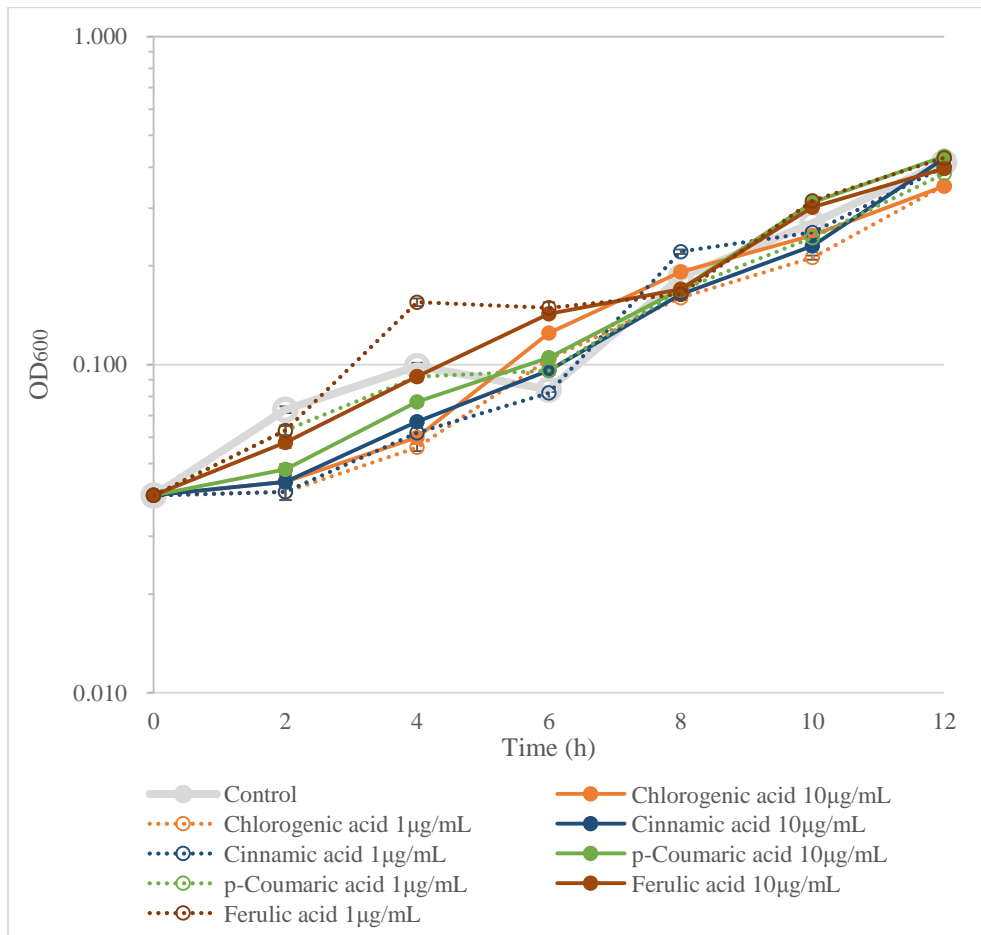


그림 1.19 phenolic acid (2) 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

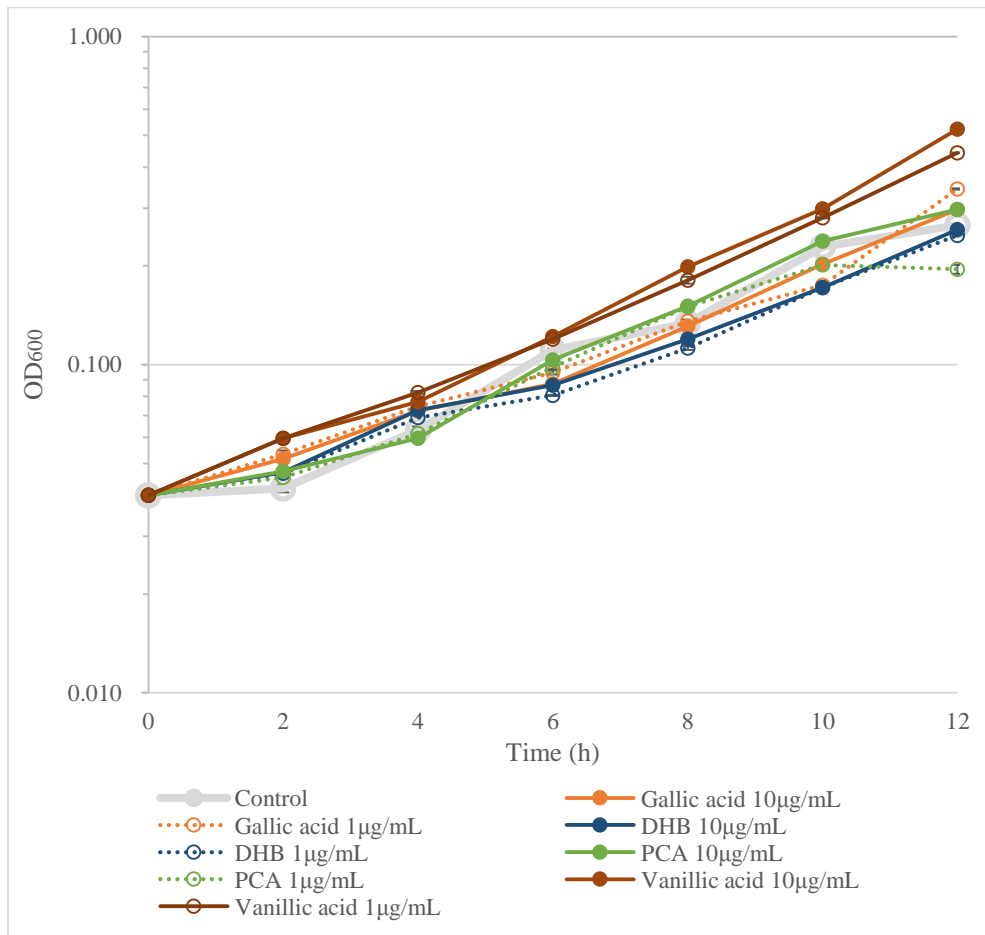


그림 1.20 phenolic acid (1) 처리 시 균주 C.his의 생장곡선

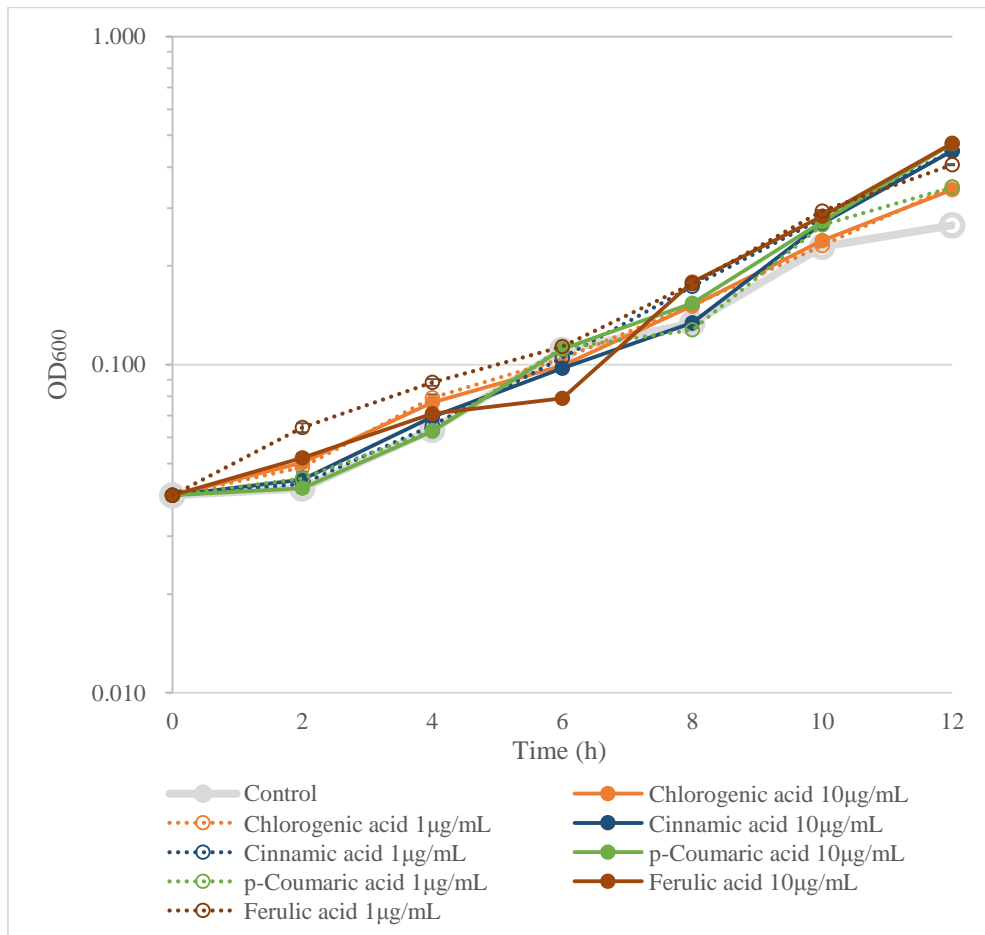


그림 1.21 phenolic acid (2) 처리 시 균주 C.his의 생장곡선

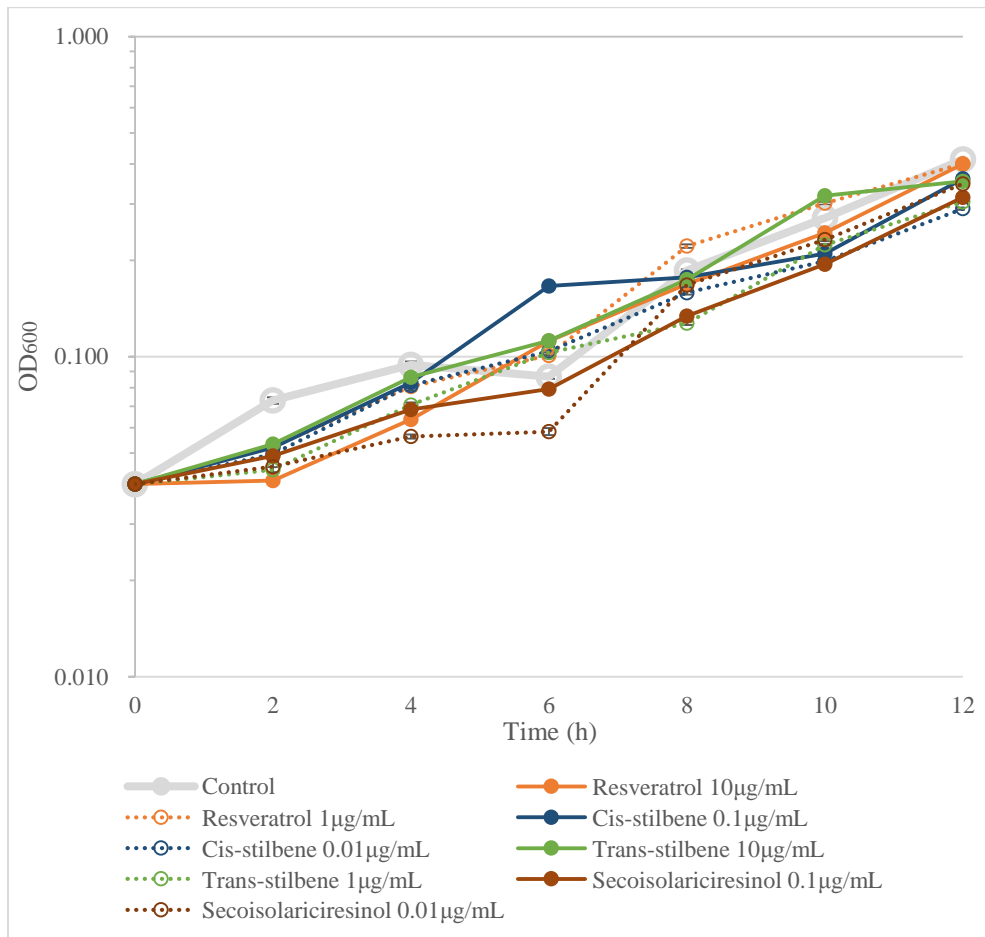


그림 1.22 stilbene, lignan 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

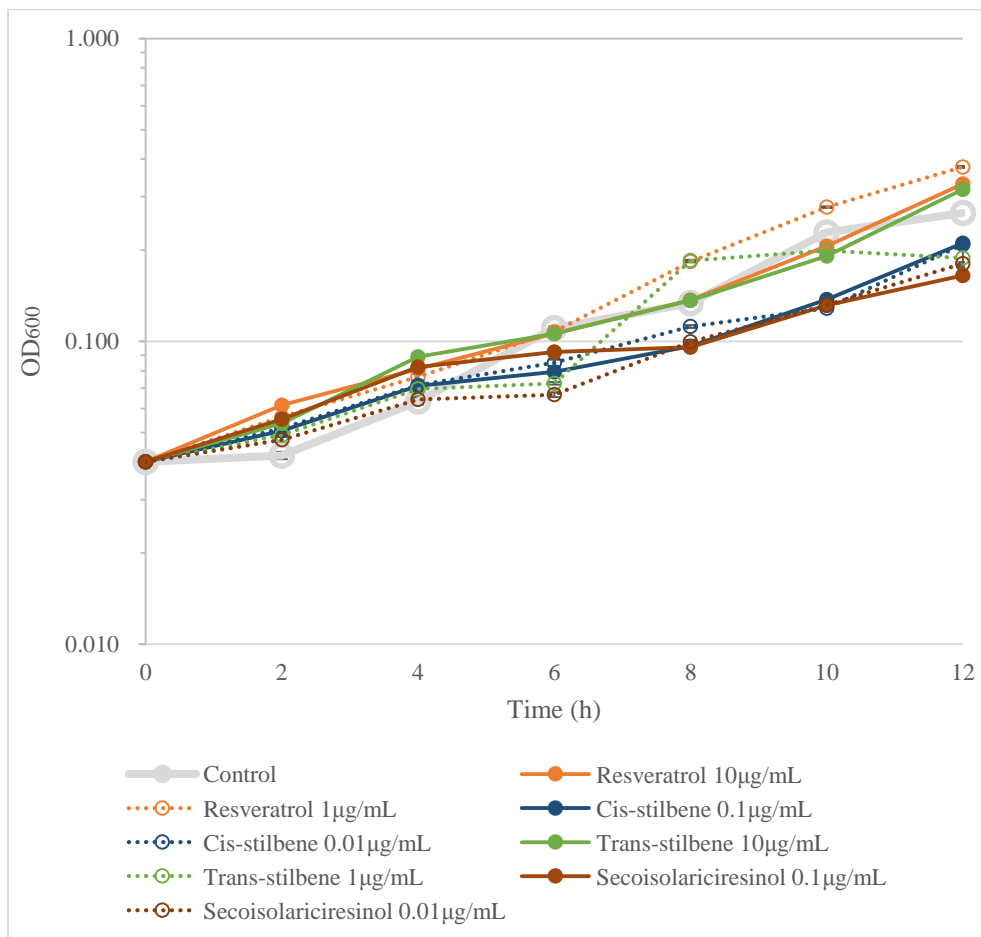


그림 1.23 stilbene, lignan 처리 시 균주 *C. his*의 생장곡선

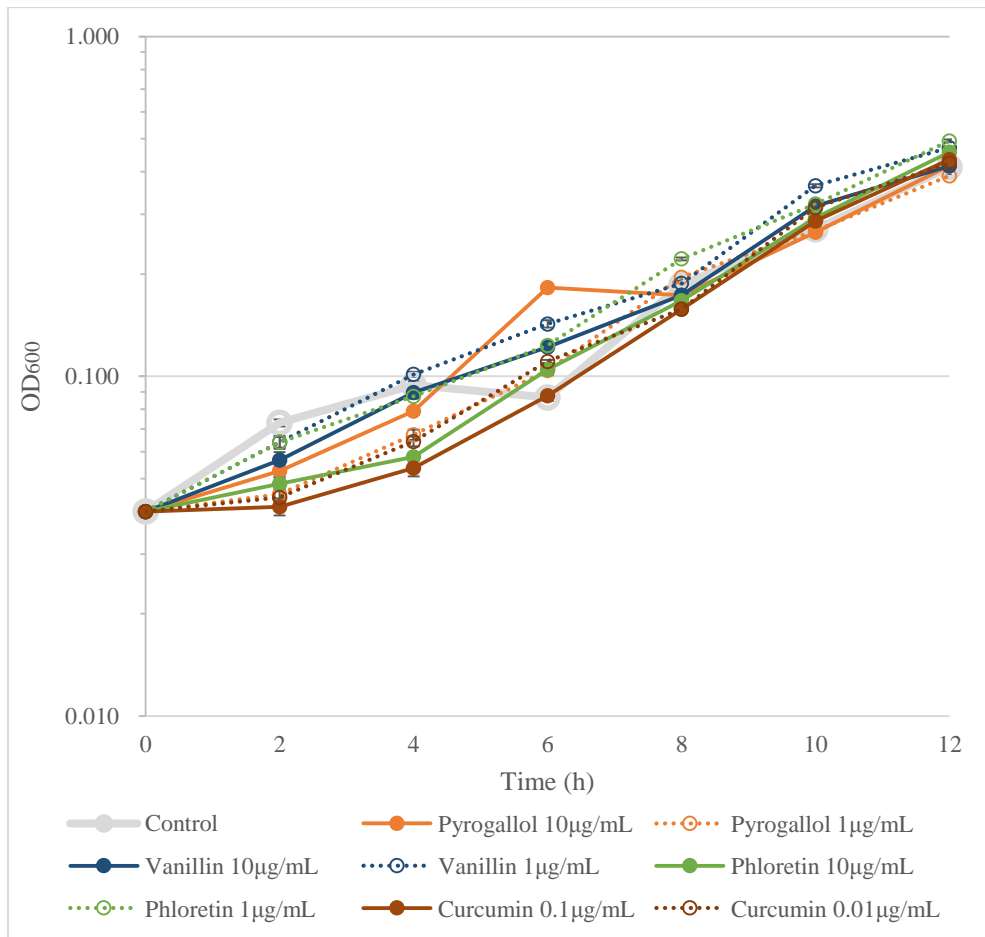


그림 1.24 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주 LGG의 생장곡선

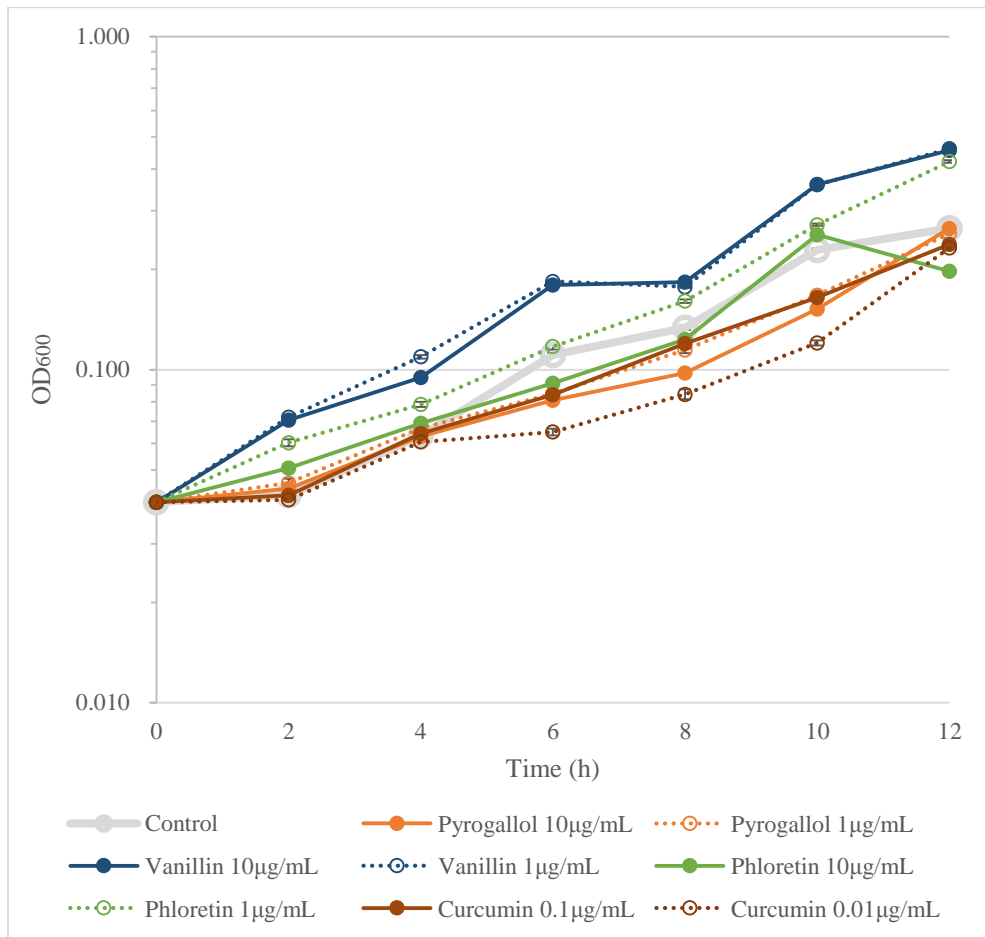


그림 1.25 분류되지 않은 논플라보노이드 처리 시 균주 C.his의 생장곡선



분류	폴리페놀 종류	LGG OD600 (12h)	C.his OD600 (12h)
	대조군	0.413	0.266
phenolic acid	gallic acid 10 $\mu$ g/mL	0.781	0.297
	gallic acid 1 $\mu$ g/mL	0.829	0.343
	DHB 10 $\mu$ g/mL	0.459	0.258
	DHB 1 $\mu$ g/mL	0.322	0.248
	PCA 10 $\mu$ g/mL	0.447	0.297
	PCA 1 $\mu$ g/mL	0.446	0.195
	vanillic acid 10 $\mu$ g/mL	0.453	0.522
	vanillic acid 1 $\mu$ g/mL	0.447	0.442
	chlorogenic acid 10 $\mu$ g/mL	0.350	0.341
	chlorogenic acid 1 $\mu$ g/mL	0.351	0.349
	cinnamic acid 10 $\mu$ g/mL	0.426	0.448
	cinnamic acid 1 $\mu$ g/mL	0.401	0.449
	p-coumaric acid 10 $\mu$ g/mL	0.432	0.472
	p-coumaric acid 1 $\mu$ g/mL	0.382	0.348
	ferulic acid 10 $\mu$ g/mL	0.396	0.473
	ferulic acid 1 $\mu$ g/mL	0.427	0.407
stilbene, lignan	resveratrol 10 $\mu$ g/mL	0.400	0.331
	resveratrol 1 $\mu$ g/mL	0.401	0.377
	cis-stilbene 0.1 $\mu$ g/mL	0.360	0.211
	cis-stilbene 0.01 $\mu$ g/mL	0.290	0.209
	trans-stilbene 10 $\mu$ g/mL	0.353	0.317
	trans-stilbene 1 $\mu$ g/mL	0.305	0.189
	secoisolariciresinol 0.1 $\mu$ g/mL	0.315	0.165
	secoisolariciresinol 0.01 $\mu$ g/mL	0.347	0.181
other	pyrogallol 10 $\mu$ g/mL	0.417	0.266
	pyrogallol 1 $\mu$ g/mL	0.389	0.256
	vanillin 10 $\mu$ g/mL	0.416	0.456
	vanillin 1 $\mu$ g/mL	0.471	0.461
	phloretin 10 $\mu$ g/mL	0.457	0.197
	phloretin 1 $\mu$ g/mL	0.493	0.422
	curcumin 0.1 $\mu$ g/mL	0.434	0.238
	curcumin 0.01 $\mu$ g/mL	0.424	0.232

표 1.7 논플라보노이드 처리 시 LGG, C.his의 OD600 (12h) 평균값

분류	폴리페놀 종류	LGG 생장률	C.his 생장률
	대조군	0.0333	0.0234
phenolic acid	gallic acid 10 $\mu$ g/mL	0.0770	0.0237
	gallic acid 1 $\mu$ g/mL	0.0782	0.0256
	DHB 10 $\mu$ g/mL	0.0392	0.0198
	DHB 1 $\mu$ g/mL	0.0311	0.0192
	PCA 10 $\mu$ g/mL	0.0393	0.0262
	PCA 1 $\mu$ g/mL	0.0409	0.0174
	vanillic acid 10 $\mu$ g/mL	0.0392	0.0436
	vanillic acid 1 $\mu$ g/mL	0.0385	0.0367
	chlorogenic acid 10 $\mu$ g/mL	0.0309	0.0285
	chlorogenic acid 1 $\mu$ g/mL	0.0296	0.0286
	cinnamic acid 10 $\mu$ g/mL	0.0352	0.0380
	cinnamic acid 1 $\mu$ g/mL	0.0359	0.0391
	p-coumaric acid 10 $\mu$ g/mL	0.0384	0.0403
	p-coumaric acid 1 $\mu$ g/mL	0.0303	0.0306
	ferulic acid 10 $\mu$ g/mL	0.0335	0.0406
	ferulic acid 1 $\mu$ g/mL	0.0331	0.0342
stilbene, lignan	resveratrol 10 $\mu$ g/mL	0.0342	0.0250
	resveratrol 1 $\mu$ g/mL	0.0361	0.0326
	cis-stilbene 0.1 $\mu$ g/mL	0.0276	0.0145
	cis-stilbene 0.01 $\mu$ g/mL	0.0230	0.0141
	trans-stilbene 10 $\mu$ g/mL	0.0322	0.0237
	trans-stilbene 1 $\mu$ g/mL	0.0255	0.0171
	secoisolariciresinol 0.1 $\mu$ g/mL	0.0252	0.0100
	secoisolariciresinol 0.01 $\mu$ g/mL	0.0306	0.0129
other	pyrogallol 10 $\mu$ g/mL	0.0339	0.0199
	pyrogallol 1 $\mu$ g/mL	0.0345	0.0198
	vanillin 10 $\mu$ g/mL	0.0362	0.0389
	vanillin 1 $\mu$ g/mL	0.0406	0.0384
	phloretin 10 $\mu$ g/mL	0.0401	0.0189
	phloretin 1 $\mu$ g/mL	0.0421	0.0347
	curcumin 0.1 $\mu$ g/mL	0.0391	0.0188
	curcumin 0.01 $\mu$ g/mL	0.0385	0.0165

표 1.8 논플라보노이드 처리 시 LGG, C.his의 생장률 평균값

### 3.5 유익균과 유해균 성장에 유의미한 영향을 주는 폴리페놀

유익균에 해당하는 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)와 유해균에 해당하는 *Clostridium histolyticum*(C.his)에 29 종의 폴리페놀을 처리한 뒤 매 2시간마다 OD<sub>600</sub>을 측정하였다. Culture 완료 시간인 12시간대의 OD<sub>600</sub>과 성장률을 비교했으며, T-test를 통해 얻은 p value로 이 결과가 유의미한지 여부를 도출한 것을 표로 정리하였다. T-test는 대조군과 폴리페놀을 처리한 경우의 양측 분포 및 이분산으로 진행하였으며 p value<0.05일 때 대조군과 폴리페놀을 처리한 두 경우가 다른 표본으로 유의미성을 띤다는 사실을 토대로 진행하였다.

결과적으로 daidzein, EC 1  $\mu$ g/mL, PCA 1  $\mu$ g/mL, phloretin 10  $\mu$ g/mL의 네 종류 폴리페놀이 LGG 양을 증가시키는 동시에 C.his 양을 낮추는 것으로 확인되었다(표 1.9). 또한 daidzein, curcumin, EGC 10  $\mu$ g/mL, DHB 10  $\mu$ g/mL, phloretin 10  $\mu$ g/mL, EC 1  $\mu$ g/mL, PCA 1  $\mu$ g/mL, pyrogallol 1  $\mu$ g/mL의 여덟 종류 폴리페놀이 LGG의 성장 속도를 빠르게 하면서 C.his의 성장 속도를 느리게 하는 것으로 확인되었다(표 1.10).

	LGG (+)	LGG (no effect)	LGG (-)
C.his (+)	genistein / EGCG malvidin / naringenin gallic acid / vanillic acid ferulic acid  EC* / PCA* finnamic acid* p-coumaric acid*  EGC** / vanillin** phloretin**	EGC* / rutin* vanillin*  quercetin**	apigenin/ resveratrol chlorogenic acid  hesperetin* / trans-stilbene*  cinnamic acid** p-coumaric acid**
C.his (no effect)	DHB*	Pyrogallol*	rutin** / pyrogallol**
C.his(-)	daidzein  phloretin *  EC** / PCA**	curcumin	luteolin / kaempferol cis-stilbene / secoisolariciresinol  quercetin*  hesperetin** / DHB** trans-stilbene**

표 1.9 OD<sub>600</sub> (12h)을 기준으로 각 폴리페놀이 균주의 생장에 미치는 영향을 나타낸 표 (p < 0.05)

((+) : 균주 성장 증가, (-) : 균주 성장 감소, \* : 10 µg/mL, \*\* : 1 µg/mL)

	LGG (+)	LGG (no effect)	LGG (-)
C.his (+)	genistein / EGCG naringenin / vanillic acid cinnamic acid / resveratrol vanillin  EC* / rutin* PCA* / p-coumaric acid*  gallic acid**/ phloretin**	ferulic acid*  quercetin** / ferulic acid**	apigenin / chlorogenic acid  rutin** / p-coumaric acid**
C.his (no effect)	Malvidin  gallic acid*  EGC**		Hesperetin* / trans-stilbene*
C.his (-)	Daidzein / curcumin  EGC* / DHB* / phloretin*  EC** /PCA** /pyrogallol**	Pyrogallol*	luteolin / secoisolariciresinol kaempferol / cis-stilbene  quercetin*  hesperetin** / DHB** trans-stilbene**

표 1.10 생장률을 기준으로 각 폴리페놀이 균주의 생장에 미치는 영향을 나타낸 표 ( $p < 0.05$ )

((+): 균주 성장 증가, (-): 균주 성장 감소, \*:  $10 \mu\text{g/mL}$ , \*\*:  $1 \mu\text{g/mL}$ )

## 4. 결론

본 논문에서는 유익균의 성장은 증대시키고 유해균의 성장은 감소시켜 장내 미생물 균형을 맞춰주는 폴리페놀을 *in vitro* 상에서 찾아내는 것을 목표로 하였다. 장내 미생물 균형 조절 및 장 건강에 영향을 끼치는 것으로 알려진 폴리페놀의 정확한 작용 기작 및 효과가 알려 있지 않기 때문에 유익균과 유해균의 대표 종을 정한 뒤 다양한 테스트를 수행하였다.

먼저 폴리페놀 스탁을 만들 때 사용하는 DMSO가 균주 성장에 유해한 영향을 주지 않음을 확인하는 테스트를 진행하였다. DMSO 처리 유무에 따른 균주 LGG와 C.his의 성장을 각각 비교해, 1% (v/v)의 DMSO를 처리해도 균주의 성장에는 무해함을 확인하였다. 또한 균주에 처리할 폴리페놀의 최적 농도 조건을 찾기 위해 총 여덟 가지 농도 범위를 테스트 하였다. 그 결과 10  $\mu\text{g/mL}$ 와 1  $\mu\text{g/mL}$ 가 최적 농도 조건임을 알아내었다.

위 실험을 통해 찾아낸 적정 농도로 총 29 종의 폴리페놀을 실제 균주에 처리해 배양을 진행하였을 때, 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다. daidzein, PCA 1  $\mu\text{g/mL}$ , phloretin 10  $\mu\text{g/mL}$ , EC 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 네 종류 폴리페놀은 유익균인 LGG의 절대량을 늘리고 유해균인 C.his의 절대량을 줄이는 동시에 두 균주의 성장 속도까지 조절해 장내 미생물 균형을 맞춰주는 것으로 보인다. curcumin, EGC 10  $\mu\text{g/mL}$ , DHB 10  $\mu\text{g/mL}$ , pyrogallol 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 폴리페놀 네 종류는 LGG의 성장 속도를 빠르게 하면서 C.his의 성장 속도를 느리게 함으로써 유익균과 유해균 비율을 조절하는 것으로 예측된다. 이전까지는 폴리페놀이 장내 미생물에 미치는 영향이 정확히 알려지지 않았으나, 위 실험을 통해 총 여덟 종의 폴리페놀이 유익균의 대표 종인 LGG와 유해균의 대표 종인 C.his의 성장에 직간접적으로 영향을 준다는 사실을 알아내었다.

더 나아가 장내 미생물에 의한 폴리페놀의 catabolism pathway로 예측되는 대사 과정과 그 외 미생물에 의한 폴리페놀 분해 과정을 비교해, 균주 성장에 영향을 준 대사물질 또는 균주 성장에 영향을 주는 대사 단계를 찾아낼 수 있을 것이다. 최종 대사물을 균주에 직접 투여해 영향을 주는 것으로 판명한 폴리페놀과 같은 영향을 보이는지 확인하는 방법 혹은 특정 단계가 균주 성장에 영향을 주는지를 가정하고, 그 단계에 사용

되는 효소의 과발현 혹은 억제를 통해 균주의 최종량 및 성장 속도의 변화를 확인하는 방법으로 실험에서 찾아낸 폴리페놀이 균주들의 성장에 영향을 주는 이유를 증명할 수 있을 것이다.

유익균의 성장은 증가시키면서 유해균의 성장은 감소시키는 것으로 보이는 폴리페놀인 daidzein, PCA, DHB, EGC, EC, phloretin의 예측되는 catabolic pathway와 이후 실험에 관해 기술하면 다음과 같다.

현재 예상되는 daidzein의 catabolism pathway 크게 두 가지다. daidzein reductase에 의해 DHD(dihydrodaidzein)로 환원된 후 DHD reductase에 의해 THD(tetrahydrodaidzein)로 환원되거나, DHD가 C ring cleavage를 거쳐 2'-dehydro-O-desmethylangolensin(=2'-dehydro-O-DMA)로 된다[33](그림 1.26). 이 LGG와 C.his에 daidzein만 처리한 경우와 DHD reductase의 inhibitor를 처리한 경우의 성장을 비교한다. 만약 DHD reductase를 처리한 경우의 LGG 성장이 daidzein만 처리한 경우보다 감소하고, C.his의 성장은 증가하게 된다면 daidzein catabolism pathway 중 DHD가 THD, Equol로 대사되는 경로와 그 때 변형된 bond가 성장에 중요한 의미를 가진다는 결론을 내릴 수 있게 된다.

DHB의 경우 dioxygenase에 의해 maleyl pyruvate가 생성되고 isomerase에 의해 fumaryl pyruvate가 생성될 수 있다. maleyl pyruvate와 fumaryl pyruvate 모두 dehydrogenase에 의해 malate와 fumarate가 될 수 있고 공통적으로 pyruvate도 생성이 된다. 즉, DHB의 최종 대사물은 malate, pyruvate, fumarate이다[34](그림 1.27). 세 물질 모두 TCA cycle에 이용되기 때문에 대사물을 직접 처리하는 것 보다는 DHB와 dioxygenase inhibitor를 함께 처리 시 LGG와 C.his의 성장과 DHB만 처리했을 때의 LGG와 C.his의 성장을 비교하는 후속 실험을 진행해, DHB가 malate, pyruvate, fumarate로 대사되는 경로가 성장에 중요한 의미를 가질 것이라는 예상이 맞는지 여부를 확인한다.

PCA의 경우 oxygenase, isomerase, hydrolase 등 다양한 효소에 의해 ring cleavage와 lactone 합성 과정 등을 거치다 CoA transferase의 작용으로 최종 대사물인 acetyl-CoA와 succinyl-CoA가 된다[34](그림 1.28). DHB와 마찬가지로 PCA와 PCA oxygenase의 inhibitor를 함께 처리한 경우와 PCA만 처리한 경우의 LGG, C.his의 성장을 비교하

는 후속 실험을 진행한다. EGC와 EC의 예측되는 catabolism pathway에서는 두 폴리페놀 모두 여러 대사 경로를 거치다 3',4'-dihydroxyphenylacetic acid가 공통적으로 생성되는데, 이 metabolite가 최종적으로 PCA가 되면서 PCA catabolism pathway를 거치게 된다 [35] [36] (그림 1.29). 결론적으로 acetyl-CoA, succinyl-CoA가 생성되므로 PCA oxygenase inhibitor 처리 여부에 따른 두 균주의 성장을 비교하도록 한다.

phloretin의 예측되는 catabolism pathway는 hydrolase에 의해 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid (=phloretate)과 phloroglucinol로 분해되는 것이다. phloretate는 여러 대사 경로를 거친 뒤 CoA transferase에 의해 acetyl-CoA, succinyl-CoA가 된다 [37] [38] (그림 1.30). phloretin과 phloretin hydrolase inhibitor를 함께 처리한 경우와 phloretin만 처리한 경우의 LGG, C.his의 성장을 비교하는 실험을 통해 phloretin이 phloretate와 phloroglucinol로 분해되는 bond가 균주 성장에 중요한 영향을 미치는지 확인할 수 있다. 혹은 장내 미생물이 대사물로 이용하는 것으로 알려진 phloroglucinol을 직접 LGG와 C.his에 투여하였을 때, phloretin을 처리한 LGG, C.his의 성장과 같은 결과를 보이는지 확인하는 것도 하나의 방법이 될 수 있다.

이처럼 각각의 폴리페놀이 장내 미생물의 성장에 미치는 영향을 정확히 파악할 수 있게 된다면, 이후 의약품 개발 및 장내 미생물로 초래된 질병의 치료에 이용할 수 있을 것이다.



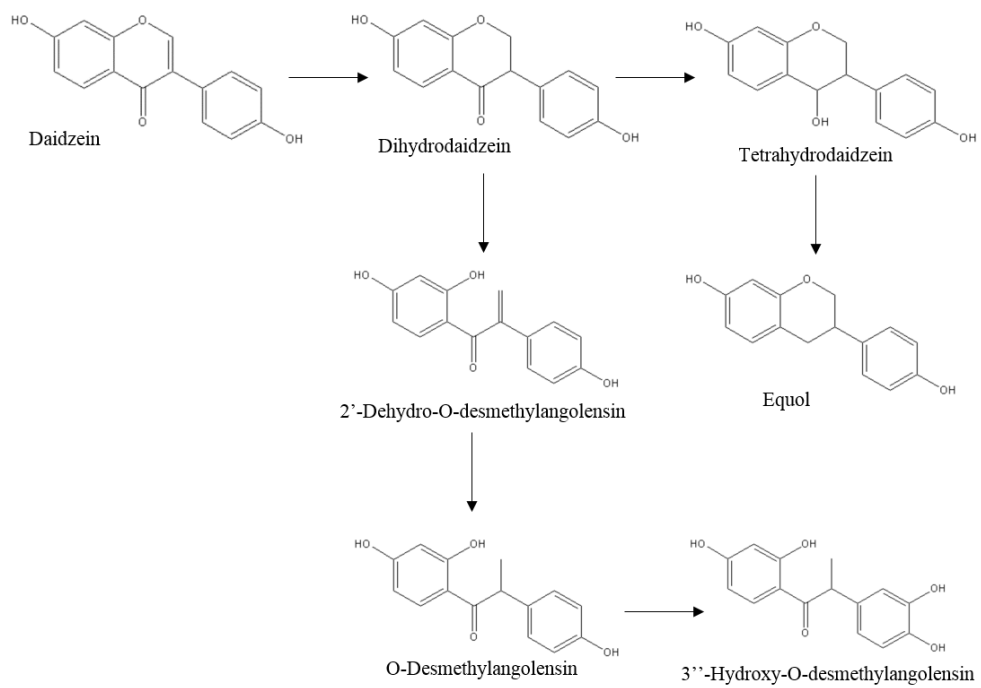


그림 1.26 daidzein의 예상되는 catabolism pathway

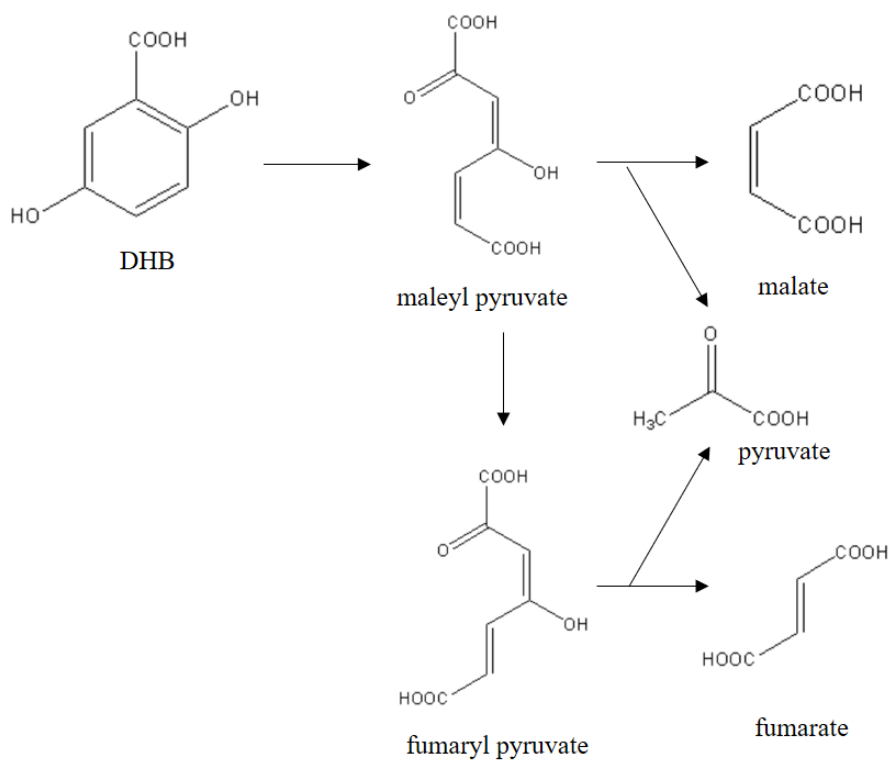


그림 1.27 DHB의 예상되는 catabolism pathway

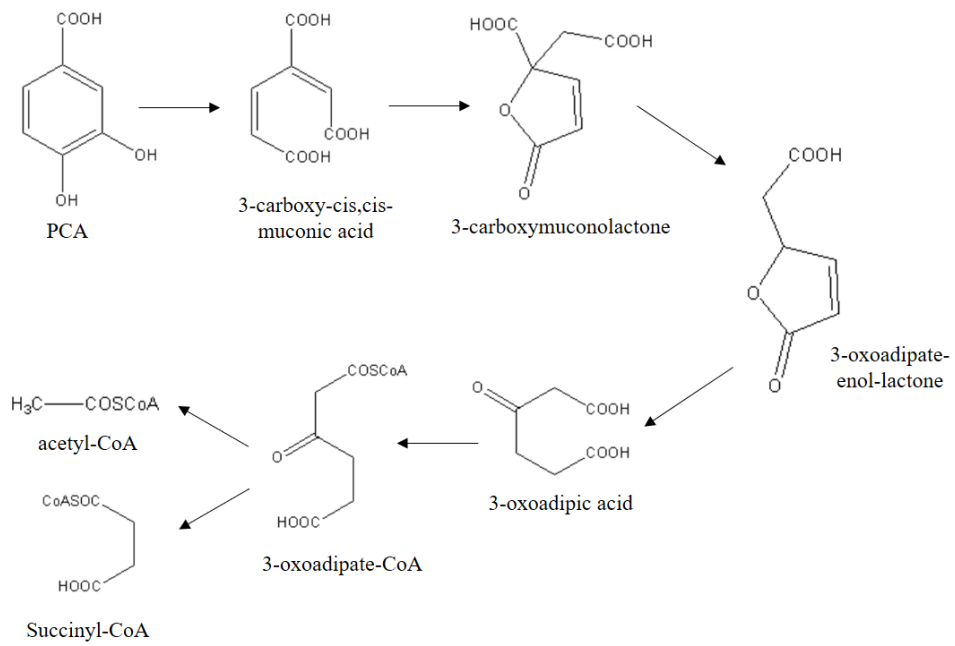


그림 1.28 PCA의 예상되는 catabolism pathway

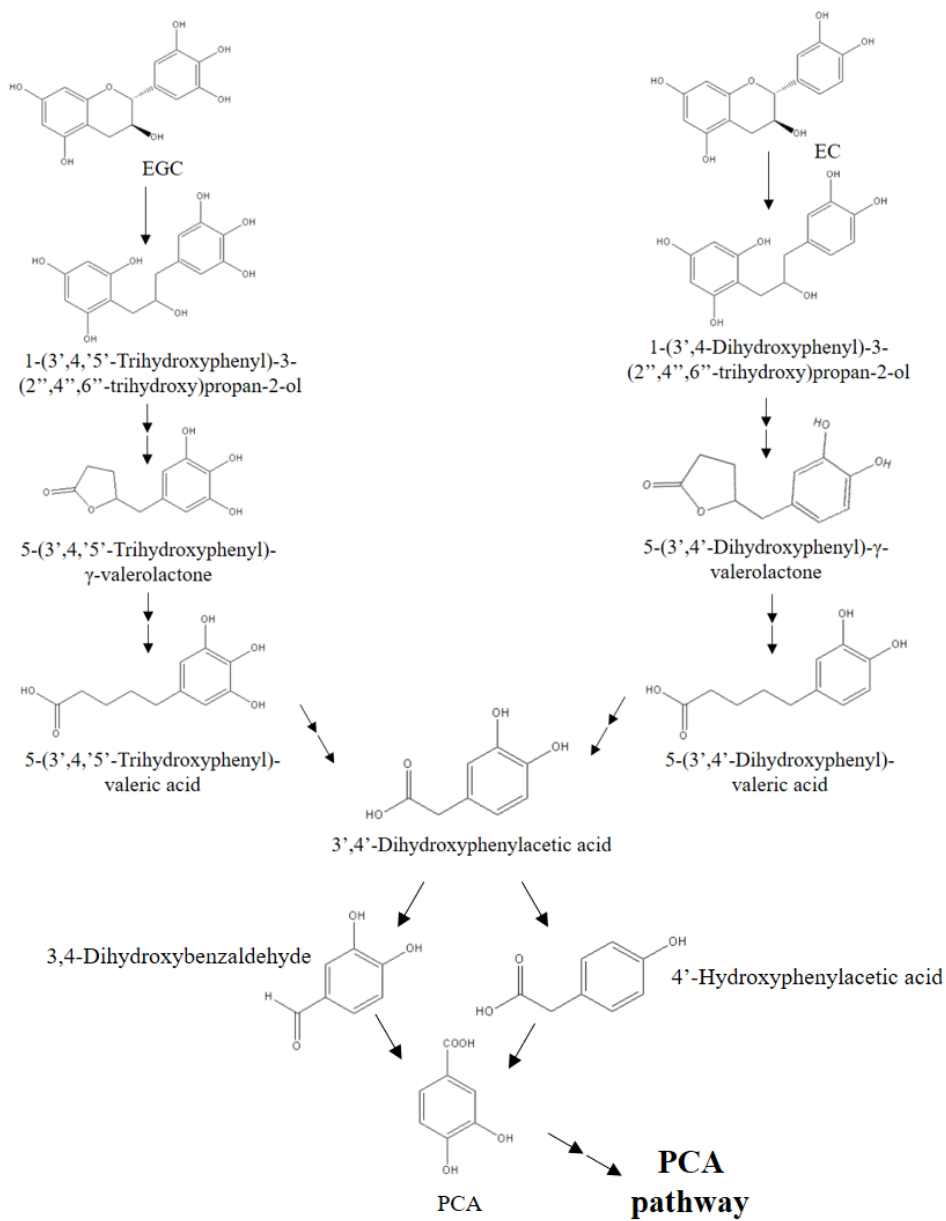


그림 1.29 EGC, EC의 예상되는 catabolism pathway

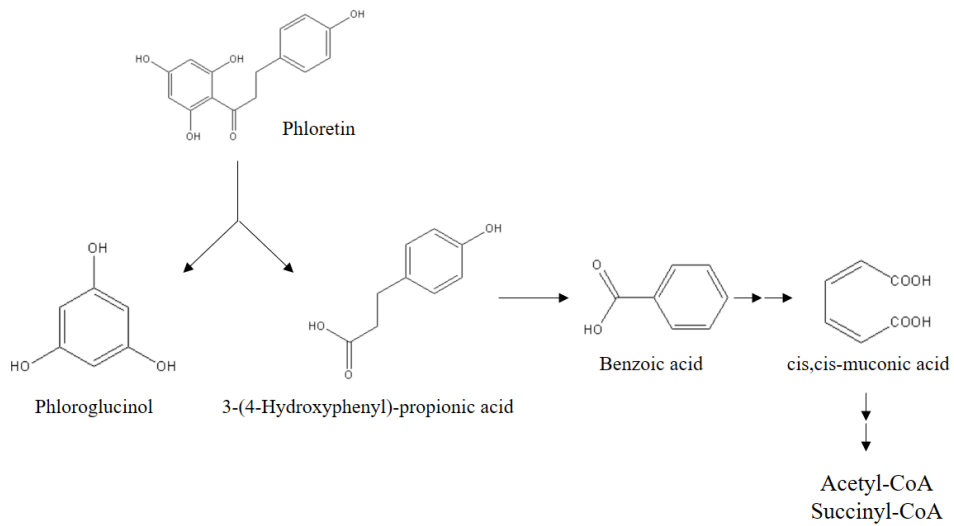


그림 1.30 phloretin의 예상되는 catabolism pathway

## 참고 문헌

- [1] Ley RE et al., Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine, *Cell*, 2006, 124(4), 837–848.
- [2] Whitman, W.B et al., Prokaryotes : the unseen majority, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 6578–6583.
- [3] Jens Walter, Ruth Ley, The human gut microbiome : ecology and recent evolutionary changes, *Annu Rev Microbiol*, 2011, 65, 411–429.
- [4] Valentina Tremaroli, Fredrik Bäckhed., Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism, *Nature*, 2012, 489, 242–249.
- [5] Christine F. Favier et al., Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates, *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1), 219–226.
- [6] Laure C. Roger, Anne L. McCartney., Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis, *Microbiology*, 2010, 156, 3317–3328.
- [7] Tanya Yatsunenko et al., Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature*, 2012, 486(7402), 222–227.
- [8] Marcus J. Claesson et al., Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly, *Nature*, 2012, 488(7410), 178–184.
- [9] Carlotta De Filippo et al., Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(33), 14691–14696.

- [10] K.P. Scott et al., Dietary fibre and the gut microbiota, *Nutr Bull*, 2008, 33, 201–211.
- [11] Grant D. Brinkworth et al., Comparative effects of very low – carbohydrate, high –fat and high –carbohydrate, low –fat weight –loss diets on bowel habit and faecal short –chain fatty acids and bacterial populations, *Br J Nutr*, 2009, 101(10), 1493–1502.
- [12] J.H. Cummings, G.T. Macfarlane., The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon, *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 70(6), 443–459.
- [13] Alan W. Walker et al., pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short –chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon, *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7), 3692–3700.
- [14] Helgeland, L et al., Microbial colonization influences composition and T–cell receptor Vb repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine, *Immunology*, 1996. 89, 494–501.
- [15] Valentina Tremaroli, Fredrik Bäckhed, Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism, *Nature*, 2012, 489(7415), 242–249.
- [16] Stevens CE, Hume I. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients, *Physiol. Rev.*, 1998, 78, 393–427.
- [17] Jeremy K. Nicholson et al., Host–Gut Microbiota Metabolic Interactions, *Science*, 2012, 336(6086), 1262–1267.
- [18] Vinson, J.A et al., Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits, *J. Agric. Food Chem*, 2001, 49, 5315–5321.
- [19] Lau, F.C et al., Beneficial Effects of Berry Fruit Polyphenols on Neuronal and Behavioral Aging, *J. Sci. Food Agric*, 2006, 86, 2251–2255.

- [20] Daniele Del Rio et al., Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases, *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(14), 1818–1892.
- [21] Andreas R. Rechner et al., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(2), 212–225.
- [22] Satya Prakash et al., Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics, *Biologics*, 2011, 5, 71–86.
- [23] D. Hervet–Hernandez, I. Goni, Dietary Polyphenols and Human Gut Microbiota: a Review, *Food Reviews International*, 2011, 27, 154–169.
- [24] Dong–Hyun Kim, Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities, *Arch Pharm Res*, 1998, 21(1), 17–23.
- [25] Anna–Marja Aura, Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon, *Phytochem. Rev.* 2008, 7, 407–429.
- [26] Jeanette Winter et al., C–Ring Cleavage of Flavonoids by Human Intestinal Bacteria, *Appl Environ Microbiol*, 1989, 1203–1208.
- [27] Bowey E et al., Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ–free and human flora associated rats, *Food Chem Toxicol*, 2003, 41, 631–636.
- [28] Harry J. Flint, Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis, *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(2), 121–131.
- [29] J.M.Laparra, Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, *Pharmacological Research*, 2010, 61(3), 219–225.



- [30] A. Duda–Chodak, The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota, *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(5), 497–503.
- [31] Maria Hidalgo et al., Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora and Their Influence on Gut Bacterial Growth, *J Agric Food Chem*, 2012, 60(15), 3882–3890.
- [32] Xenofon Tzounis et al., Flavanol monomer–induced changes to the human faecal microflora, *Br J Nutr*, 2008, 99(4), 782–792.
- [33] Mariko Uehara, Isoflavone metabolism and bone–sparing effects of daidzein–metabolites, *J Clin Biochem Nutr*. 2013, 52(3), 193–201.
- [34] Valentina Méndez et al., The Homogentisate and Homo–protocatechuate Central Pathways Are Involved in 3– and 4–Hydroxyphenylacetate Degradation by Burkholderia xenovorans LB400, *PLoS One*, 2011, 6(3)
- [35] Suri Roowi et al., Green tea flavan–3–ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans, *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 1296–1304.
- [36] Kevin E. O'connor et al., p–Hydroxyphenylacetic Acid Metabolism in Pseudomonas putida F6, *J Bacteriol*, 2001, 183(3), 928–933.
- [37] Lilian Schoefer et al., Cloning and Expression of a Phloretin Hydrolase Gene from Eubacterium ramulus and Characterization of the Recombinant Enzyme, *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(10), 6131–6137.
- [38] Xenia ME et al., Microorganisms Metabolism during Bioremediation of Oil Contaminated Soils, *J Bioremed Biodeg*, 2016, 7(2), 340–345.

## Abstract

# A Study on the effect of various polyphenols on the growth of beneficial and harmful model gut bacteria

Ji-You Hong

School of Chemical and Biological Engineering  
Graduate School  
Seoul National University

Polyphenols with anti-oxidative effects are known to have therapeutic effects not only in preventing aging and inflammation, but also in a variety of diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, and neurodegenerative diseases. The intake of polyphenols is expected to modulate the intestinal environment, resulting in an increase the growth of beneficial bacteria and inhibit the growth of harmful microbes, thereby adjusting the proportion of unbalanced microbial population in the gut. However, the effect of polyphenols on microorganisms and intestinal microorganisms is not clear, unlike the focus on polyphenols, which seem to affect intestinal microbiology and intestinal health.

In this paper, we focus on the study of finding polyphenols and the optimum treatment concentration that can control the microbial balance in the gut by affecting the growth of beneficial bacteria and growth of harmful bacteria.

In order to confirm the effect of polyphenol, selected strains are *Lactobacillus rhamnosus* GG of the *Lactobacillus* genus and *Clostridium histolyticum* of the *Clostridium* which present in excess in the gut. The strains were treated with 13 kinds of flavonoids and 16 kinds of nonflavonoids respectively, and then comparing growth curve and growth rate to select good polyphenols

First, it was confirmed that DMSO used to make polyphenol stock did not affect the growth of the strain. The growth curve of the strain was plotted, and the shape of the graph, the OD<sub>600</sub> value of the 12 hour period, and the growth rate were compared. As a result, it was found that OD<sub>600</sub> and growth rate were the same regardless of whether DMSO was treated or not, so that treatment with 1% v/v DMSO did not affect the growth of the strain.

Second, to find the optimal concentration of polyphenol to be treated in the strain, four types of polyphenols, genistein and EGCG corresponding to flavonoids and gallic acid and phloretin corresponding to non-flavonoids, were added to the strains ranging from 0.1  $\mu$ g/mL to 100  $\mu$ g/mL were tested. As a result, I found that the final concentration of 10  $\mu$ g/mL and 1  $\mu$ g/mL are optimum concentration of polyphenol to be treated in the strain.

Third, cultured strains with 29 polyphenols-treated appropriate concentration—were sampled at two hour intervals, and then OD<sub>600</sub> and growth rate values were compared. Also, p values of Control with polyphenols treated strain were confirmed whether each polyphenol had a significant effect on growth of two strains.

First of all, the final pool of the strain was examined with OD<sub>600</sub>. As a result, daidzein and EC 1  $\mu$ g/mL, PCA 1  $\mu$ g/mL, phloretin 10  $\mu$ g/mL were found to be good polyphenols which increase the growth

of the useful bacteria LGG and decrease the growth of the harmful bacteria C.his. On the other hand, the growth of the beneficial bacteria LGG was decreased and harmful bacteria C.his was increased while apigenin, resveratrol, chlorogenic acid, hesperetin 10  $\mu$ g/mL, trans-stilbene 10  $\mu$ g/mL, cinnamic acid 1  $\mu$ g/mL and p-coumaric acid 1  $\mu$ g/mL were treated to strains.

Next, the rates of the strains were examined with growth rate. The rate of LGG was accelerate than that of control and the rate of C.his was decelerate than that of control, when daidzein, curcumin, EGC 10  $\mu$ g/mL, DHB 10  $\mu$ g/mL, phloretin 10  $\mu$ g/mL, EC 1  $\mu$ g/mL, PCA 1  $\mu$ g/mL and pyrogallol 1  $\mu$ g/mL was treated. On the other hand, in the treatment of apigenin, chlorogenic acid, rutin 1  $\mu$ g/mL and p-coumaric acid 1  $\mu$ g/mL, the growth rate of LGG was decelerate than that of Control and the growth rate of C.his was accelerate than that of Control.

Keywords : Polyphenol, beneficial bacteria, harmful bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Clostridium histolyticum*, OD600, growth rate

Student number : 2015-21092