

## 베타 글루쿠로니다제나 베타 글루코시다제를 생산하는 호알칼리성 장내미생물의 검색

김동현\* · 한명주\*

경희대학교 약학과, \*경희대학교 식품영양학과

(Received March 23, 1993)

### Detection of $\beta$ -glucuronidase and $\beta$ -glucosidase producing alkalotolerant intestinal bacteria

Kim, Dong-Hyun\* and Han, Myung Joo\*

College of Pharmacy, Kyung Hee University Seoul 130-701 Korea

\*Department of Food Science and Nutrition, Kyung-Hee University Seoul 130-701 Korea

**Abstract**—Approximately 1% of intestinal bacteria of human and rats was alkalotolerant. Among these bacteria of human, bacteria producing  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase and sulfotransferase were 40%, 4% and 0%, respectively. Among alkalotolerant intestinal bacteria of rats, bacteria producing, these enzymes were 70%, 8% and 0%, respectively.  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria of human and rat were induced by the medium of high pH: these enzymes activities were increased by elevating pH of the medium, but the growths were not changed. The enzyme activities at the medium of pH 7 were about ten-fold higher than those at the medium of pH 6.

**Keywords** □  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase, sulfotransferase, alkalotolerant intestinal bacteria.

장내미생물의 구성, 분포, 생리활성은 장내 각 부분에 존재하는 장 내용물, 숙주의 방어능력과 생리 및 식이상태가 중요한 요소로써 작용한다.<sup>1,2)</sup>

대장암의 발생과 관련하여 고 지방식과 장내 미생물의 대사능력은 상관관계가 있으며, 대장암 발생 고빈도 지역과 저빈도 지역의 장내세균을 비교해보면 북미, 서유럽 등 고빈도지역과 아시아, 아프리카 등 저빈도지역을 비교해 볼때 균주별로 저빈도지역은 *Bacteriodes*가 적으며 *Streptococci*가 많이 검출되고 있다. 대장암의 발생빈도가 높은 북미, 서 유럽 지역의 사람들은 주로 고지방식 및 육류음식을 많이 섭취하고 있었다. 그러나, 장내 미생물의 종류와 수는 발생빈도가 낮은 지역 주민과 별차이가 없으나 steroid를 대사시키거나 글루크론산 포함체를 가수분해시키는 능력이 증가되어 있었다고 보고하고있다.<sup>3,4)</sup>

즉,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase, nitroreductase, steroid 7 $\alpha$ -dehydroxylase 등의 효소들이 carcinogenic aglycone 을 방출시킴으로써 대장암을 야기시키는 것으로 알려져 있다.<sup>5-8)</sup> 결국 간에서 포함체를 형성하고 담관을 통해서 분비된 후 장내 미생물에 의해서 포함체가 가수분해 됨으로써 발암작용에 기여하는 것으로 사려되고 있다.<sup>9,10)</sup>

이외에도 대장내의 pH 변화는 세균성 효소에 의한 이물(異物)의 대사에 영향을 주며, 특히 대장내 pH의 감소는 대장암 발생의 위험도를 감소한다고 보고 하고 있다. 그리고 대장내알칼리성 pH는 담즙이나 콜레스테롤의 장내세균에 의한 분해를 촉진시키는데 *in vitro*에서 담즙산의 7 $\alpha$ -dehydroxylase 는 pH 6.5 이하에서 저해를 받는다.<sup>11)</sup> 그런데, 전통적으로 고섬유질, 저지방식을 섭취하는 흑인들의 경우 faecal pH는 6.5 이하이며 서양식을 하는 백인들의 경우 faecal pH가

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

그보다 높다.<sup>9,12)</sup> 이와 같이 식이섬유는 대장내 pH를 낮추어 대장암의 발생을 감소 또는 방지하는 역할을 하며, 음식물에서 섬유질의 함량의 증가는 분(糞)의 pH를 저하시킨다. 이것은 장내 미생물에 의한 섬유질의 short-chain fatty acid로 대사되는 것에 기인하는 것으로 사려되었다.<sup>13,14)</sup> 이러한 측면에서 장내 세균의 분해로 유기산을 생성하는 인공다당류인 lactulose의 투여로 장내 pH가 저하되고 암발생율이 감소했다는 보고도 있다.<sup>15)</sup>

한편, 대장암 발생의 역학연구에서 북미, 서유럽국가중에서 핀란드는 1인당 지방 섭취량이 높은 나라중에서 비교적 대장암의 발병율이 낮은 예외적인 나라이다. 이 핀란드인들은 낙농제품 특히 요구르트를 많이 섭취한다. 그 결과 핀란드인들의 장내에는 *Lactobacilli*가 많이 존재할 것으로 생각되고 있으며 Goldin 등은 이 역학적 조사를 뒷받침 하기 위해 *Lactobacillus acidophilus* 투여에 의한 장내세균의 대사의 변화를 조사했다. 즉, secondary carcinogen을 primary carcinogen으로 변형시킬 수 있는 faecal  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase, azoreductase 등의 활성을 측정하였다. *Lactobacillus acidophilus*의 투여 결과  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase의 활성이 저하됨을 보고하였다.<sup>16,17)</sup>

저자는 장내미생물이 pH환경에 의한 수의 변화와 알칼리성에서 잘자라는 장내미생물의  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase와 sulfotransferase의 생산성과 특징에 대하여 조사하였다.

## 실 험

**시약**—GAM(general anaerobic medium)은 일본 Nissui제약(주)으로부터 구입하였으며, 그외의 배지는 Difco사(미국)로부터 구입하였다. p-Nitrophenylsulfate, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide와 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside는 Sigma사(미국)로부터 구입하였다.

**사람 및 실험 동물**—사람은 20대 건강한 남자로서 잡식성이었으며, 실험 동물로는 국립보건 안전 연구원에서 분양 받은 Wistar계 흰쥐(male, 약 200g)를 사용하였으며 사료는 대한사료(주)의 곡물사료로 사육하였고 물은 충분히 공급하면서 사육하였다.

**장내세균의 분리배양**—분(糞)의 장내미생물을 분리

배양하기 위하여 사람 및 흰쥐의 분을 배설 즉시 약 0.5g을 정확히 달아 혐기성배지에 희석한 후 10배씩 단계적으로 희석한 후 0.2 ml의 희석액을 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11의 GAM agar와 TS(양의 혈액 5% 함유) agar배지에 이식하여 각각 혐기적조건과 호기적조건으로 하여 37°C에서 1~4일간 배양하였다.

**효소생산균주의 분리**—위의 실험에서 pH 10과 11의 GAM과 TS 한천배지의 집락을 액체배지에서 24시간 배양하여  $\beta$ -glucuronidase와  $\beta$ -glucosidase를 생산하는 균주를 각각 HGU(사람의 장내세균중  $\beta$ -glucuronidase 생산균주), HGO(사람의 장내세균중  $\beta$ -glucosidase 생산균주), RGU(흰쥐의  $\beta$ -glucuronidase 생산균주), RGO(흰쥐의  $\beta$ -glucosidase 생산균주)에 일련번호를 주어 명명 한뒤 사용하였다.

**사람과 흰 쥐의 분 현탁액의 조제**—사료와 물을 충분히 공급해 준 흰쥐로부터 직접 얻은 신선한 분을 증류수를 사용하여 10%(w/v)로 잘 현탁시킨 후 상등액을 취하여 효소활성 측정에 이용하였다. 같은 방법으로 잡식성의 성인 남자 3명으로부터 채취한 신선한 분을 잘 현탁하여 효소활성 측정에 이용하였다.

**장 내용물에 대한 효소활성 측정**—Wistar계 흰쥐로부터 먼저 분을 채취한 후 즉시 ether로 마취한 후 도살하여 소장(상, 하부), 맹장, 대장(상, 하부)의 내용물을 시험관에 넣고 내용물을 약 1g 취한 후 20 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣어 10배 희석한 후 현탁하고 균질화하여 효소액으로 사용하였다.

**효소활성 측정**— $\beta$ -Glucuronidase의 효소 활성은 10 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide 20  $\mu$ l, 0.1 M phosphate buffer(또는 그 외의 완충액) 0.38 ml, 효소액 0.1 ml를 넣은 후 37°C에서 50분간 반응시키고 0.25 N NaOH를 0.5 ml 넣어 반응을 중지시킨 후 흡광도를 405 nm에서 측정하여 계산하였다.

$\beta$ -Glucosidase의 효소활성은 2 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside 0.2 ml, 0.1 M phosphate buffer(또는 그 외의 완충액) 0.3 ml, 효소액 0.1 ml를 넣은 후 위와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다.

Sulfotransferase 효소활성은 50 mM p-nitrophenylsulfate 30  $\mu$ l, 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0 또는 pH 10.0) 0.21 ml, 20 mM phenol 0.29 ml, 효소액 0.1 ml를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 N NaOH 0.4 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 흡광도를 측정하여

계산하였다.

각각의 효소에 대하여 optimal pH를 측정하는 경우에는 pH 4.0에서 6.0까지 acetate buffer, pH 6.0~7.5까지는 phosphite buffer, pH 7.5~8.5까지는 Tris-HCl buffer, pH 8.5에서 11.0까지는 NaOH-Glycine buffer를 사용하여 활성을 측정하였다.

**결 과**

**흰 쥐의 장 내용물의 활성**—각 장관 부위별 내용물의  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase 및 sulfotransferase 효소활성을 측정한 결과는 Table I과 같다.

모든효소의 효소활성은 맹장에서 가장 높았으며, 대장과 분은 거의 비슷한 결과를 보였다.

$\beta$ -glucosidase와  $\beta$ -glucuronidase는 비슷한 효소활성을 보인 반면에 sulfotransferase는 이들효소의 약 10%의 활성만을 나타냈다.

**호알칼리성장 내세균의 효소활성**—알칼리성(pH 10 과 11)의 GAM과 TS배지에 배양된 장내세균 50개를 무작위 선별 배양하여  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase 및 sulfotransferase 효소활성을 측정하였다(Table II).

이 장내호알칼리성 미생물중에서  $\beta$ -glucosidase 생산균주는 사람의 장내미생물의 경우 약 40% 정도였으며, 15 nmol/min/ml medium 이상의 효소활성생산능을 갖는 균주는 14% 정도였다. 흰쥐의 장내미생물

의 경우는 70% 정도가  $\beta$ -glucosidase의 생산성을 갖는 균주였으며, 15 nmole/min/ml medium의 생산성을 갖는 균주는 20% 정도였다. 대체로 흰쥐의 경우가  $\beta$ -glucosidase을 생산하는 장내미생물이 많았으나, 이효소의 생산능에 있어서는 사람의 장내미생물이 훨씬 높은 활성을 나타냈다.

이들 균주중에서 사람에서 분리한 6균주와 흰쥐에서 분리한 5균주에 대하여  $\beta$ -glucosidase생산능을 갖는 균주를 동정한 결과 사람의 2균주 흰쥐의 3균주는 *Streptococcus faecalis*이었다.

$\beta$ -Glucuronidase생산균주는 사람의 경우 4% 정도였으며, 흰쥐의 경우 약 8% 정도 존재하고 있었다. 이들의 균주의 효소활성은 0.3~3 nmol/min/ml medium였다. 이들의 균주중에서 사람으로부터 분리한 11균주와 흰쥐에서 분리한 5균주를 동정한 결과 사람의 3균주와 흰쥐의 2균주는 *Escherchia coli*였다.

그러나, sulfotransferase를 생산하는 호알칼리성 균주를 검색하였으나, 검색할 수 없었다.

**배지 pH 변화에 따른 사람 및 흰쥐의 장내미생물의 영향**—GAM 배지의 pH를 5에서 11까지 변화 시켜 가면서 사람 및 흰쥐의 장내세균을 배양하였다(Fig. 1). 그 결과 장내세균은 pH의 변화에 따라 차이를 보였으나, 대체로 약산성과 약알칼리성에서는 큰차이를 보이지 않았다. 그러나, pH 10과 11에서는 현저하게 감소하였으며, pH 11의 배지의 경우는 pH 7의 배지의

**Table I**—Distribution of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase and sulfotransferase activities of the intestinal contents in conventional rat

	Enzyme activity ( $\mu$ mole/min/g wet faeces)		
	$\beta$ -Glucosidase	$\beta$ -Glucuronidase	Sulfotransferase
Stomach	0.01	0.02	0.010
Upper small intestine	0.10	0.06	0.010
Lower small intestine	0.10	0.04	0.015
Caecum	1.40	1.72	0.158
Colon	1.10	0.96	0.086
Feces	1.30	0.87	0.099

**Table II**—Number of bacteria producing  $\beta$ -glucosidase or  $\beta$ -glucuronidase among alkalotolerant intestinal bacteria

	$\beta$ -Glucosidase( $\mu$ mol/min/ml)			$\beta$ -Glucuronidase( $\mu$ mol/min/ml)		
	H(>15)	M15-3	L(<3)	H(>1.5)	M(1.5-3)	L(<0.3)
Human	7	13	30	2	0	0
Rat	10	25	15	2	2	0

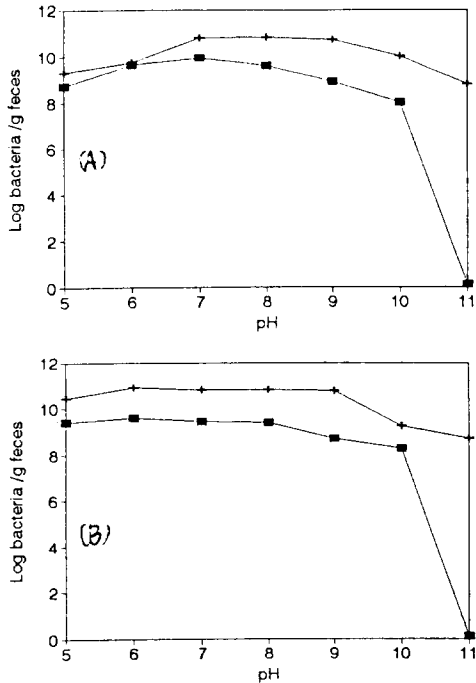


Fig. 1.—A profile of intestinal microflora by changing pH of medium:(A) human intestinal microflora in GAM(+) and TS(■) medium; (B) rat intestinal microflora in GAM(+) and TS(■).

것의 약 0.8%만이 자라나왔다. TS를 이용하여 사람 및 흰쥐의 장내미생물을 배양하였을 경우는 전반적으로 1% 정도만이 자라나왔다. 그러나 pH 11의 배지를 이용하였을 경우는 장내세균이 거의 자라나오지 못했다.

**분의 효소활성과 optimal pH**—사람과 흰쥐의 분(糞)중에 존재하는 효소의 optimal pH를 측정하였다 (Fig. 2).  $\beta$ -glucosidase의 경우 흰쥐와 사람 모두 pH 6.0~7.0이 최적 pH였다. 사람 및 흰쥐의 분중에 존재하는 이들의 효소활성은 각각 3.94, 1.69  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$  faeces였다(Table III).  $\beta$ -Glucuronidase의 optimal pH는 사람과 흰쥐 모두 pH 7.0이었고, 사람 및 흰쥐의 분중의 효소활성은 각각 2.92, 1.54  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$  faeces이었다. Sulfotransferase의 최적 pH는 8부근이었으며, 효소활성은 0.081, 0.075  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$  faeces였다.

$\beta$ -Glucosidase 및  $\beta$ -glucuronidase 각각의 효소를 생산하는 균주를 배양하여 얻은 균액을 이용하여  $\beta$ -glucuronidase와  $\beta$ -glucosidase의 optimal pH를 측정

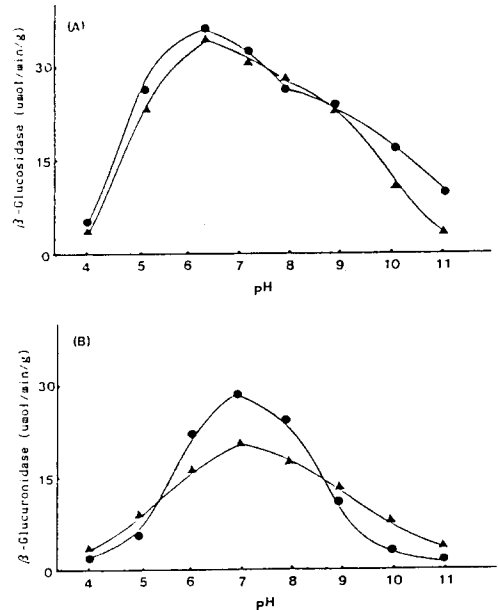


Fig. 2.—pH profile of  $\beta$ -glucosidase(A) and  $\beta$ -glucuronidase(B) activities of the faeces of humans(▲) and rats(●).

Table III—Enzyme activities intestinal contents of human and rats

	Activity( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ faeces)		
	$\beta$ -glucosidase	$\beta$ -glucuronidase	sulfotransferase
Human	3.94	2.92	0.081
Rat	1.69	1.54	0.075

한 결과  $\beta$ -Glucosidase를 생산하는 HGO-7의 optimal pH는 6.0이며 pH 7.0에서도 비교적 높은 활성을 나타냈고, HGO-1의 경우 pH 8.0이 optimal pH이나 pH 6.0부터 9.0까지 거의 유사한 활성을 보였다. 이에 반하여 RGO-5의 경우 pH 10.0에서 optimal pH를 나타내었다. HGU-2와 RGU-2의 경우 optimal pH는 7.0이며 6.0에서도 높은 활성을 나타냈다. 대체적으로 장내 미생물에 기인하는  $\beta$ -glucuronidase 및  $\beta$ -glucosidase의 optimal pH는 중성부근이지만 약산성과 약알카리성의 최적 pH를 갖는 효소도 있었다.

**배지의 pH에 의한 효소의 생산성**

배지의 pH를 5에서 10까지 갖는 GAM 액체배지에 총장내세균을 이식한 후 혐기적으로 배양하여 효소 활성을 측정하였다(Fig. 3).

사람의 경우  $\beta$ -glucuronidase 활성은 pH 6.0보다

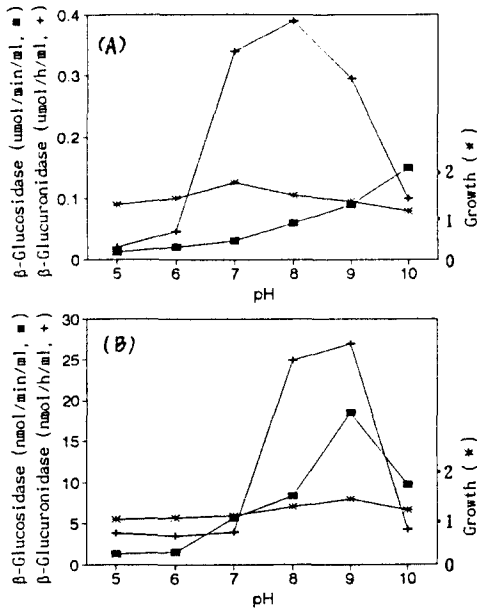


Fig. 3.—Effect of pH of media on induction of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase of intestinal bacteria: (A) Growth,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase activities of human intestinal bacteria cultured for 24 h under an anerobic condition, after the fresh feces of healthy men was inoculated into the media of various pHs; (B) Growth,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase activities of rat intestinal bacteria cultured according to the method of (A).

pH 7.0에서 배양했을때, 7.6배의 높은 활성유도를 보이면서 pH 8.0에서 가장 높은 활성을 보여주고 있다. 또한  $\beta$ -glucosidase 활성은 pH 6.0에서 보다 pH 7.0에서 1.7배 가량 높은 활성을 보이면서 pH 10.0까지 지속적인 증가를 나타내었다.

흰쥐의 경우도 사람의 효소 활성 유도과 비슷한 양상을 보이나 특히  $\beta$ -glucuronidase는 pH 7.0 이하 보다 pH 8.0에서 pH 9.0까지 6.4배 가량 높은 활성을 나타내었다.  $\beta$ -Glucosidase의 경우 pH 7.0에서 6.0에서보다 3.8배 가량 높은 활성을 보여주며 pH 9.0까지 지속적인 증가를 보였다.

황산전이효소는 pH 7과 8에서 가장 높은 효소 활성을 보였으며, pH에 의한 유도는 보이지 않았다(Fig. 4).

이러한 결과는 장내의 환경의 변화는 효소 활성에

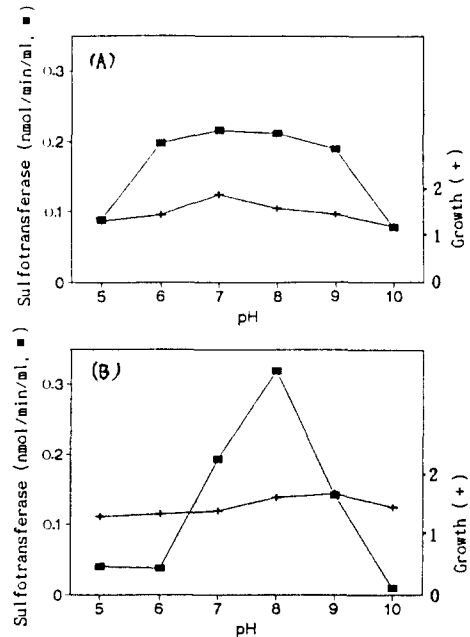


Fig. 4.—Effect of pH of media on induction of sulfotransferase of intestinal bacteria: (A) Growth and sulfotransferase activity of human intestinal bacteria cultured for 24h under an anerobic condition, after the fresh faeces of healthy men was inoculated into the media of various pHs; (B) Growth and sulfotrasferase activity of rat intestinal bacteria cultured according to the method of (A).

현저한 영향을 미치며, 특히 장내 pH가 약 알칼리로 기울어 질때 gallstone disease 및 대장암 발생과 밀접한 상관관계가 있는  $\beta$ -glucuronidase의 효소활성의 증가를 확인할 수 있었다.

### 결론

1. 사람 및 흰쥐의 장내세균은 분 1g당 GAM 배지에서 각각  $6.6 \times 10^{10}$ ,  $7.1 \times 10^{10}$ 개의 균이 자라나왔으며, TS 배지에서는 각각  $8.5 \times 10^9$ ,  $2.8 \times 10^9$ 개의 균이 자라나왔다. 그러나 pH가 11인 배지에서는 거의 자라나오지 못하거나 약 0.8%의 균만이 자라나왔다.

2. 사람 및 흰쥐의 장내용물의  $\beta$ -glucosidase의 효소활성은 각각 3.94, 1.69였고,  $\beta$ -glucuronidase의 효소활성이 각각 2.92, 1.54였고, sulfotransferase의 효소활성은 각각 0.081, 0.075  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{faeces}$  였다.

3. 사람의 호알카리성 세균 중에서  $\beta$ -glucosidase 생산균이 40%,  $\beta$ -glucuronidase 생산균주는 4%, sulfotransferase 생산균주는 나타나지 못했으며, 흰쥐의 호알카리성 세균 중에서는 각각 70%, 8%, 0%였다.

4. 분중의  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase의 최적 pH는 중성부근이었다. 분리한 호알카리성의 균중의  $\beta$ -glucosidase의 최적 pH는 산성, 중성, 알카리성이었으나,  $\beta$ -glucuronidase의 최적 pH는 중성부근 뿐이었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국 과학재단 연구비 지원(921-1600-001-2)에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Hill, M. J., Crowther, J. S. and Drasar, B. S.: Bacteria and aetiology of cancer of large bowel *Lancet* *i* 95-100 (1971).
- 2) Walker, A. R. P. and Walker, B. F.: Faecal pH value and its modification by dietary means in south african black and white school children. *S. Afr. Med J.* **55**, 495-498 (1979).
- 3) Haenzel, W. and Kurihara, M.: Studies of Japanese migrants, I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **40**, 43-68 (1968).
- 4) Goldin, B. and Gorbach, S. L.: Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, Lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* **40**, 2421-2426 (1977).
- 5) Laqueur, G. L.: The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycone. *Virchows Arch. path. Anat.* **340**, 151-163 (1965).
- 6) Strugala, S. J., Rauws, A. G. and Elbers, R.: Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2123-2128 (1986).
- 7) Renwick, A. G. and Drasar, B. S.: Environmental carcinogens and large bowel cancer. *Nature* **263**, 234-235 (1976).
- 8) Maki, T.: Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: role of E. coli,  $\beta$ -glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann Surg.* **164**, 90-100 (1966).
- 9) Kinoshita, N. and Gelboin, H. V.:  $\beta$ -Glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo( $\alpha$ )pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science* **199**, 307-309 (1978).
- 10) Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B. and Golden, M.: Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroentero.* **102**, 1475-1482 (1992).
- 11) Ross, J. K. and Leklem, J. E.: The effect of dietary citrus pectin on the excretion of human fecal neutral and acid steroids and the activity of 7  $\alpha$ -dehydroxylase and  $\beta$ -glucuronidase. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**, 2068-2077 (1981).
- 12) Drasar, B. S. and Hill, M. J.: *Human intestinal bacteria* Academic press 123 (1974).
- 13) Thornton, J. R.: High colonic pH promotes colorectal cancer *Lancet* May **16**, 1081-1082 (1981).
- 14) Mallett A. K.: The influence of incubation pH on the activity of rat and human gut flora enzyme. *J. applied Bacteriol.* **66**, 433-437 (1989).
- 15) Samelson, S. L., Nelson, R. L. and Nyhus, L. M.: Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *J. Royal Soc. Med.* **78**, 230-233 (1985).
- 16) Goldin, B. R., Swenson, L. Dwyer, J., Sexton, M. and Gorbach, S. L.: Effect of diet and Lactobacillus acidophilus supplements on human faecal bacterial enzymes. *J. Natl. Can. Ins.* **64**, 255-261 (1980).
- 17) Goldin, B. R. and Gorbach, S. L.: The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacteria enzyme activity *The American Journal of Clinical Nutrition* **39**, 756-761 (1984).