약학회지 제39권 제2호 169~174(1995)
Yakhak Hoeji Vol. 39, No. 2

유산균에 의한 장내미생물효소의 저해

김동현# · 한명주*
경희대학교 약학과, *식품영양학과

(Received March 8, 1995)

Inhibition of Intestinal Bacterial Enzymes by Lactic Acid Bacteria

Dong-Hyun, Kim# and Myung Joo, Han*
*College of Pharmacy, *Department of Food Sciences and Nutrition,*
Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—By coculturing *E. coli* HGU-3 with Bifidobacterium KH-2 or *Streptococcus faecalis* HGO-7 with *Bifidobacterium* KH-2, the productivity of β-glucuronidase and β-glucosidase was inhibited. When lactulose, growth factor of lactic acid bacteria, was added into this medium, the productivity of these enzymes and pH of the medium were dramatically decreased. When intestinal microflora of human and rat were inoculated in the medium containing lactulose, the enyzme productivity and pH of the medium were dramatically decreased. By s.c. injecting DMH into mice, β-glucuronidase of intestinal bacteria was induced, but the production of the enzymes was inhibited by adminstering lactulose.

북미, 서유럽 등 대장암발생 고빈도 지역과 아시아, 아프리카 등 대장암발생 저빈도지역의 장내세균총을 비교해 보면 저빈도지역은 Bacteriodes가 적은 반면에 Streptococcus가 많으며 호기성 균주에 대한 혐기성 균주의 비율이 낮다. 이러한 것을 제외하면 대장암의 발생빈도가 높은 북미, 서 유럽 지역의 사람들과 발생빈도가 낮은 지역 주민과 별차이가 없다. 그럼에도 불구하고 대장암발생 고빈도지역에서는 장내미생물이 글루쿠론산 포합체를 가수분해 시키거나 steroid를 대사시키는 능력이 증가되어 있었다.[1-4] 이러한 반응에 β-glucuronidase, β-glucosidase, nitroreductase, steroid 7α-dehydroxylase 등이 관여하여 carcinogenic aglycone을 방출시킴으로써 암형성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 결국 발암물질이 간에서 포합체를 형성하고 담관을 통해서 분비된 후 장내 미생물에 의해서 포합체가 가수분해 됨으로써 발암작용에 기여하는 것으로 사려되고 있다.[5-7] 이외에도 장내 pH의 변화는 세균성 효소에 의한 이물(異物)의 대사에 영향을 주며, 대장암의 발생과 밀접한 관계를 갖고 있다.[8,9] 특히 흰쥐에서, 장내세균에 대사되어 유기산을 생성하는 인공다당류인 lactulose를 투여하므로써 암발생율을 감소시켰다고 보고하고 있다.[10]

대장암 발생의 역학연구는 앞에서 언급한 바와 같이 아시아, 아프리카보다 북미, 서유럽이 더 높음을 보여준다. 그것은 높은 고지방육류과 낮은 섬유소로 구성되는 서양 식이가 주요 원인으로 생각되어지고 있다. 특히 핀란드는 1인당 지방 섭취량이 높은 나라중에서 비교적 대장암의 발생율이 낮은 예외적인 나라이다. 이 핀란드인들은 요구르트를 많이 섭취한다. 그 결과 핀란드인들의 장내에는 Lactobacillus가 많이 존재할 것으로 생각되고 있으며 Goldin 등은 이 역학적 조사를 뒷받침 하기 위해 Lactobacillus acidophillus 투여에 의한 장내세균의 β-glucuronidase, nitroreductase, azoreductase 등의 효소활성 변화를 조사한 결과 β-glucuronidase, nitroreductase의 활성이 저하됨을 보고하였다.[11,12]

최근 저자등은 이러한 장내미생물효소가 산성보다는 중성 또는 알카리성에서 잘 유도됨을 밝혔으며

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

사람의 장내미생물로부터 이러한 효소들을 생산하는 균주들을 보고하였다.[13,14] 그래서 여기에서는 pH에 의해서 유도되어지는 β-glucosidase를 생산하는 HGO-7 균주 및 β-glucuronidase를 생산하는 균주인 HGU-3균주와 유산균을 동시배양하는 과정에서 유산균증식제를 첨가하는 정도에 따라 이들 효소활성에 미치는 효과를 조사하였다.

실 험

실험재료

General anaerobic medium(GAM) broth, Glucose blood liver broth(BL) agar, Tryptic soy(TS) agar는 일본 니수이제약주식회사로부터 구입하였다. p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-glucuronide, p-nitorphenylsulfate는 미국의 Sigma 사로부터 구입하였으며, 1,2-dimethylhydrazine (DMH)는 미국의 Aldrich사로부터 구입하였으며, 혈액은 한국메디아로부터 구입하여 사용하였다.

실험균주

HGU-3 균주 및 HGO-7 균주는 이미 보고한 분리균주를 사용하였으며 Bifidobacterium KH-2 균주는 건강한 잡식성 20대 남자의 분편으로부터 Mitsuoka 방법[15]에 따라 분리한 균주를 사용하였다.

실험 동물

국립보건 안전 연구원에서 분양 받은 Wistar계 흰쥐(male, 약 200 g)을 사용하였으며 사료는 대한사료(주)의 곡물사료로 사육하였고 물은 충분히 공급하면서 사육하였다.

DMH에 의한 흰쥐 장내미생물효소 유도시험을 위해서는 흰쥐(Wistar 200 g male)를 6마리씩 4군으로 나누어 (A)군은 대조군으로 일반식(삼양사, 한국)을 먹이는 군, (B)군은 lactulose와 일반식을 혼합한 식을 투여하면서 DMH를 투여한 군, (C)군은 일반식을 먹이면서 DMH를 투여한 군, (D)군은 일반식과 함께 lactulose을 투여한 군으로 나눠 각군에 대하여 일반식과 물은 자유롭게 먹이면서 사육하였다. Lactulose는 7%를 포함하도록 일반식(대한사료)과 혼합하여 투여하였으며, DMH는 20 mg/kg을 3일마다 한번씩 피하투여 하였다.

실험방법

효소활성 측정[16]－β-Glucuronidase의 효소 활성은 10 mM p-nitrophenyl-β-D-glucuronide 20 μl, 0.1M phosphate완충액 0.38 m*l*, 효소액 0.1 m*l*를 넣은 후 37℃에서 50분간 반응시키고 0.25N NaOH를 0.5 m*l* 넣어 반응을 중지시킨 후 흡광도를 405 nm에서 측정하였다. β-Glucosidase의 효소활성은 2 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside 0.2 m*l*, 0.1M phosphate완충액 0.3 m*l*, 효소액 0.1 m*l*를 넣은 후 위와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다. 효소활성저해시험은 효소활성을 측정할 때 기질과 함께 일정농도의 저해제를 첨가한 후 효소를 가하여 효소활성을 측정하는 방법을 이용하였다.

유산균과 동시 배양시 효소활성측정－HGU-3와 HGO-7 균주 각각 5×10^6개를 GAM배지에 이식하여 각각의 균주에 대하여 4개군으로 분리하고, 여기에 사람의 장내세균으로부터 분리한 Bifidobacterium KH-2균주를 5×10^6, 5×10^7, 5×10^8개를 각군에 이식하고 Bifidobacterium KH-2균주만을 이식한 것을 대조군으로 하여 37℃에서 24시간 배양한 후 효소활성, 배지의 pH, 생균수을 측정하였다. 생균수의 측정은 적당히 희석한 검액을 BL 한천배지에 이식하고 steel wool법에 따라 2～3일간 배양한 후 측정하였다.

장내세균총에 유산균증식제첨가시 효소활성측정－사람 및 흰쥐의 신선한 장내세균총을 lactulose함유 GAM배지에 이식하고 24시간 혐기적으로 배양하여 유산균수, 배지의 pH, 효소활성을 측정하였다.

사람과 흰쥐의 분 현탁액의 조제－곡물사료와 물을 충분히 공급해 준 흰쥐로부터 직접 얻은 신선한 분을 증류수를 사용하여 10% (w/v)로 잘 현탁시킨 후 상등액을 취하여 효소활성 측정에 이용하였다.

결과 및 고찰

유산균과 동시배양시 유산균에 의한 효소활성의 변화－유산균과 HGU-3균주를 동시배양시 효소활성를 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서 보는 것과 같이 HGU-3균주만을 배양했을 때보다 Bifidobacterium과 함께 배양했을 때 HGU-3 균수는 감소했으며, 유산균수를 10배, 100배 증가시킴에 따라 HGU-3균수는 더 많이 감소했다. 유산균수가 증가함에 따라 배지의 pH에도 영향을 미쳐 유산균수의 증가와 함께

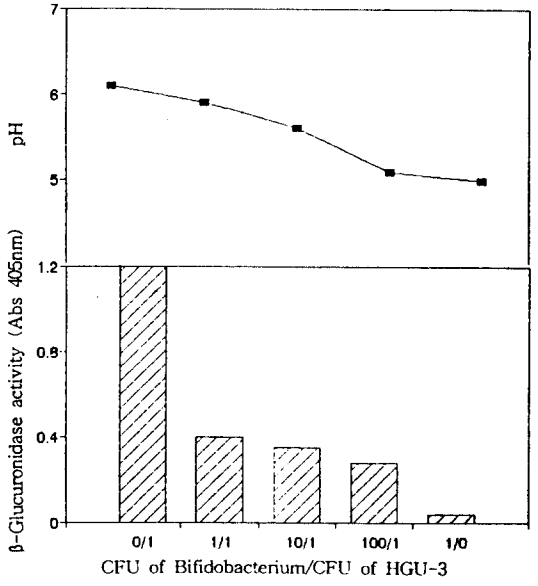

Fig. 1—Change of β-glucuronidase productivity and pH of the cultured medium by coculturing Escherichia coli HGU-3 with Bifidobacterium KH-2.

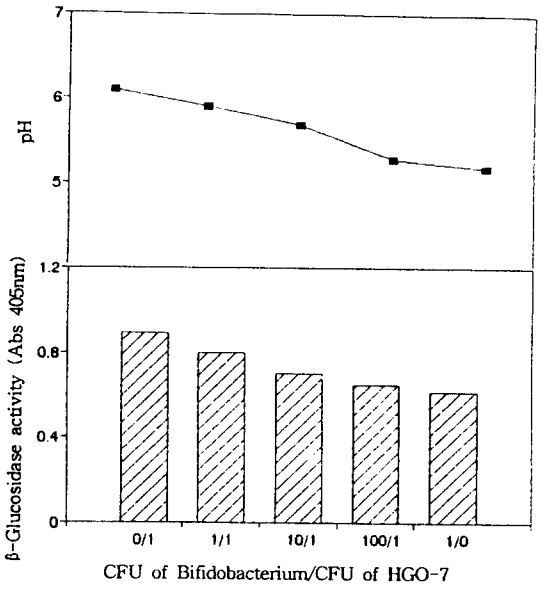

Fig. 2—Change of β-glucosidase productivity and pH of the cultured medium by coculturing Escherichia coli HGO-7 with Bifidobacterium KH-2.

배지의 pH는 감소하였다. 더욱이 이 유산균수의 증가는 HGU-3균주의 β-glucuronidase 효소활성에도 영향을 미쳐 유산균을 HGU-3균주의 100배 많이 이식했을 경우 효소활성은 유산균을 동시 배양하지 않은 대조군에 비해 24%로 효소활성이 현저히 감소했다.

HGO-7균주는 유산균과 동시 배양한 경우에 배지의 pH는 HGU-3균주의 경우와 비슷하게 저하하였으나 효소활성에 있어서는 대조군의 79 %로 21%정도 감소하였다(Fig. 2). 그러나, 유산균수는 현저하게 증가하였다. 여기에 결과를 나타내지 않았지만 Bifidobacterium KH-2 유산균만 배양했을 경우도 β-glucosidase를 생산하고 있으며 pH가 낮아짐에 따라 효소활성이 낮아졌으나, 이 유산균이 직접적으로 β-glucosidase효소를 저해하지는 않았다.

이러한 결과는 Bifidobacterium KH-2 유산균에 생산된 유기산은 배지의 pH를 저하시키고 그 결과 Bifidobacterium KH-2의 β-glucosidase 및 HGO-7 균주의 β-glucosidase의 효소활성이 모두 감소됐다고 생각된다.

유산균과 동시배양시 유산균증식제(lactulose)의 영향—유산균증식제로 알려진 lactulose함유배지에 사람의 장내세균 분리균주인 HGU-3과 HGO-7 균주

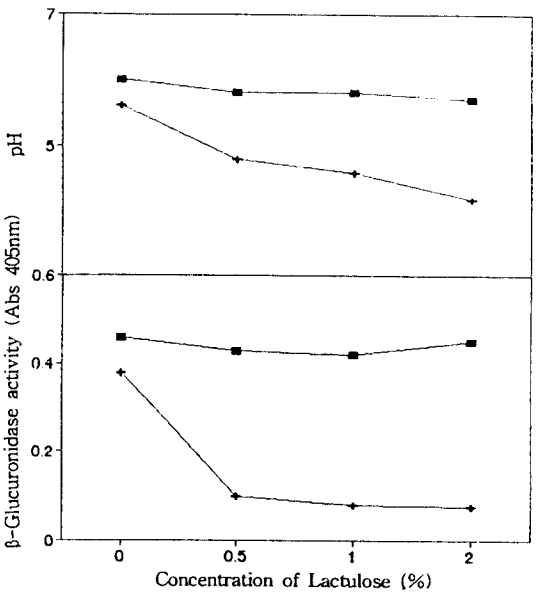

Fig. 3—Effect of lactulose on β-glucuronidase productivity and pH of the cultured medium by culturing HGU-3 only or with Bifidobacterium KH-2: ■, cultivation of Escherichia coli HGU-3: ·, cocultivation of Escherichia coli HGU-3 with Bifidobacterium KH-2.

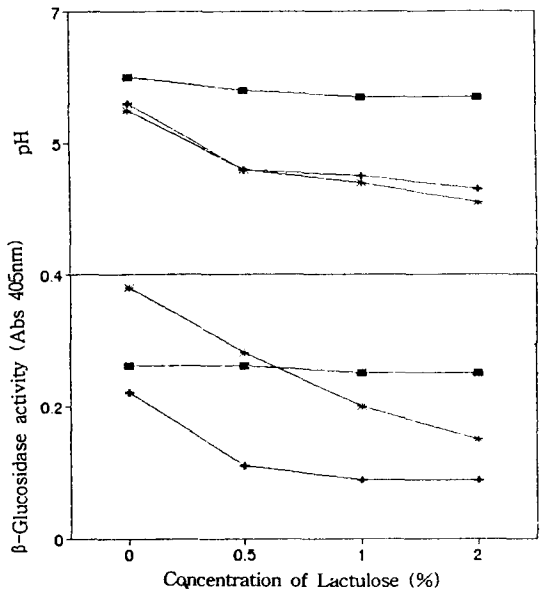

Fig. 4—Effect of lactulose on β-glucuronidase productivity and pH of the cultured medium by coculturing Escherichia coli HGO-7 with Bifidobacterium KH-2: ■, cultivation of Streptococcus faecalis HGO-7: +, cultivation of Bifidobacterium KH-2; *, cocultivation of Escherichia coli HGU-3 with Bifidobacterium KH-2.

를 유산균과 동시배양시 효소의 생산성에 미치는 효과를 조사한 것이 Fig. 3과 Fig. 4 이다.

Lactulose를 첨가한 배지에서 Bifidobacterium KH-2을 배양함에따라 배지의 pH는 현저하게 저하하였으며 β-glucosidase효소활성도 배지의 pH와 함께 감소하였다.

이 Bifidobacterium을 HGO-7과 함께 배양했을 경우에도 lactulose가 Bifidobacterium KH-2의 성장을 촉진시킨 결과 배지의 pH가 감소했으며 이에 따른 효소활성이 억제되었다.

HGU-3균주만 단독으로 lactulose배지에서 키운 결과, 배지의 pH 및 효소활성에는 거의 영향을 미치지 않았으나, 유산균과 동시 배양한 경우는 배지의 pH가 현저하게 감소했으며 효소활성도 60% 이상 억제되었다. 그러나, lactulose는 시험관내에서 β-glucosidase 또는 β-glucuronidase의 효소저해효과는 없었다.

이러한 결과는 배지의 lactulose가 유산균을 증식

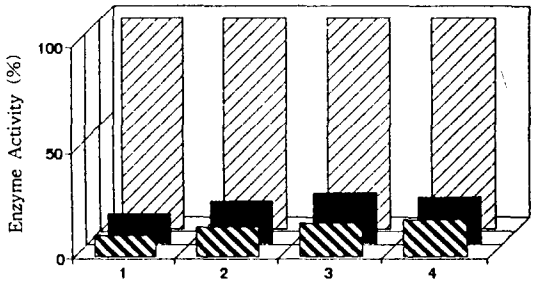

Fig. 5—Effect of the medium on β-glucuronidase and β-glucosidase activities of intestinal bacteria of human and rat: 1, β-glucuronidase activity of human intestinal bacteria; 2, β-glucuronidase activity of rat intestinal bacteria; 3, β-glucosidase activity of human intestinal bacteria; 4, β-glucosidase activity of rat intestinal bacteria: The final concentration of lactulose in the medium was 0%(▨), 1%(■) and 5%(▨), respectively.

시켜 배지의 pH을 저하시켰으며 β-glucosidase와 β-glucuronidase효소의 생산성에 영향을 미쳤다고 사려된다.

장내세균총에 유산균증식제(lactulose)첨가시 효소활성의 변화—장내세균총을 배양하는 배지에 lactulose를 첨가함으로써 β-glucosidase 및 β-glucuronidase의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Lactulose를 배지에 첨가한 결과 흰쥐의 장내세균총인 경우 1% 첨가시 β-glucuronidase는 86%, β-glucosidase는 73%의 효소저해를 나타내었고 사람의 장내세균총인 경우 1% 첨가시 β-glucuronidase는 89%, β-glucosidase는 82%의 저해를 받았다. 이것으로 보아 lactulose에 의한 대장암 발생억제효과는 장내의 pH를 간접적으로 저하시킴으로써 나타났으며, 특히 pH 6.0에서보다 pH 7.0 이상에서 현저히 유도되는 두 효소를 포함한 효소군이 대장암 발생에 주요한 인자로 작용한다고 사료된다.

DMH투여에 의한 흰쥐장내세균효소의 변화와 lactulose에 의한 영향—*in vivo*에서 DMH를 흰쥐에 투여했을 때 장내효소의 활성변화를 측정했다(Fig. 6, Fig. 7). 장내미생물의 β-glucuronidase 효소활성은 DMH를 투여했을 경우 대조군에 비해 30%정도 증가하였으나 DMH를 투여하면서 lactulose를 투여한 경우에는 대조군에 비교해서 처음에는 약 70% 감소하여 잔존활성이 30%였으나 차차 증가하여 나중에는

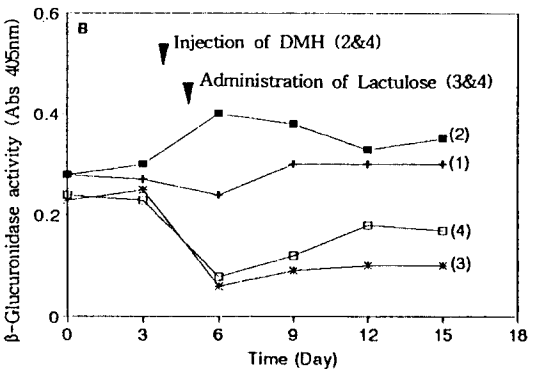

Fig. 6—Change of β-glucuronidase activity of intestinal bacteria by the administration of DMH(s.c.) and/or lactulose(p.o.): (1), control; (2), DMH only; (3), lactulose only; (4), DMH and lactulose.

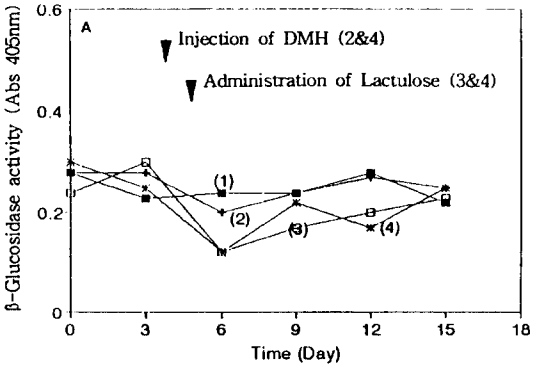

Fig. 7—Change of β-glucosidase activity of intestinal bacteria by the administration of DMH(s.c.) and/or lactulose(p.o.): (1), control; (2), DMH only; (3), lactulose only; (4), DMH and lactulose.

대조군의 60~70%까지 회복되었다. 그러나, lactulose만을 투여한 경우는 대조군의 30~50% 수준에서 유지되었다. 이러한 결과는 lactulose에 의해 장내유산균이 증식되어 pH가 저하되고 그 결과 효소생산성이 감소되었다고 생각된다. 이러한 경향은 황산전이효소의 경우는 나타나지 않았다.

그러나, β-glucosidase효소활성은 lactulose투여 후 2~3일에 효소활성이 약 10~30% 정도밖에 감소시키지 못했다. 이러한 결과는 lactulose를 투여한 경우에 증가한 유산균이 β-glucosidase를 생산하기 때문이라고 생각된다.

결 론

1. 사람의 장내세균으로부터 분리한 Bifidobacterium KH-2를 β-glucuronidase 생산하는 HGU-3균주나 β-glucosidase를 생산하는 HGO-7와 동시배양시 Bifidobacterium의 비율을 증가시킴에 따라 배지의 pH 저하와 함께 이 균들이 생산하는 효소도 억제되었다.

2. 유산균증식제인 lactulose는 직접적으로 β-glucosidase나 β-glucuronidase를 거의 저해하지 못했으나 유산균과 동시배양시 배지에 첨가할 경우 배지의 pH와 효소의 생산성은 저해되었다.

3. 사람 및 흰쥐의 장내세균총을 배양시 배지에 lactulose를 첨가한 경우에 농도의존적으로 β-glucosidase 및 β-glucoronidase효소활성이 80% 이상 억제되었다.

4. 생쥐에 DMH를 투여함으로써 장내미생물효소 중 β-glucuronidase효소활성이 유도되었으나, lactulsoe를 투여한 결과 대조군의 50% 이하까지 억제되었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단연구비지원(921-1600-001-2)에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Drasar B. S. and Hill M. J. Human intestinal flora pp123 Academic Press (1974).
2) Burkitt D. P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum, *Cancer* **28**(1), 3-13, (1971).
3) Hill M. J., Drasar B. S., Aries V., Crowther J., Hawkesworth G., Williams R.E.O., Bacteria and etiology of cancer of the large bowel., *Lancet* 1, 95-100, (1971).
4) Faivre, J., Boutron, M. -C., Quipourt, V. Diet and large bowel cancer pp 107-118 (in Advances on Nutrion and Cancer edited by Zappia, V. et al Academic press 1993).
5) Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B., Goldman, M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterol*

102, 1475-82, (1992).

6) Reddy, B. S., John, H. W. and Earnest, L. W. Faecal bacterial β-glucuronidase *Science* **183**, 416-417 (1974).
7) Kinoshita, N., Gelvoin, H. V., β-Glucuronidase catalyzed hydrolysis of Benzo [α]pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science* **199**, 307-309 (1978).
8) Walker, A.R.P., Walker, B. F. Faecal pH value and its modification by dietary means in south african black and white schoolchildren *S. AFR. Med. J.* **55**, 495-498 (1979).
9) Thornton, J. R. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet* 1081-1082 (1982).
10) Samelson, S. L., Nelson, R. N. and Nynus, L. M. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogensis. *J. Royal Society Med.* **78**, 230-233 (1985).
11) Goldin B. R.&Gorbach, S. Alteration of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, oral antibiotics, and Lactobacillus: Decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J. Natl Cancer inst.* **73**, 689-695 (1984).
12) Goldin, B., & Gorbach, S. L. Alteration in faecal microflora enzymes relatdd to diet, age, Lactobacillus supplements, and DMH. *Cancer* **40**, 2421-2426 (1977).
13) Kim, D. -H., Kang, H. -J., Kim, S. -H. and Kobashi, K. pH-inducible β-glucosidase and β-glucuronidase of intestinal bacteria *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1667-1669 (1992).
14) Kim, D. -H., Kang, H. -J. Park, S. -H. and Kobashi, K. Characterization of β–glucosidase and β-glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 423-426 (1992).
15) Mitsuoka, T. The method of screening for intestinal flora. *J. Japan. Infect. Dis.* **45**, 406-419 (1971).
16) 김동현, 한명주 베타글루코시다제나 베타글루쿠로니다제를 생산하는 호알카리성장내세균의 검색. 약학회지 **37**, 187-192 (1993).