

식이에 따른 장내세균의 효소활성 및 장내세균총의 비교

최성숙¹ · 하남주^{2*}

삼육대학교 생명과학연구소¹, 삼육대학교 약학과²

식이에 따른 장내세균의 균총의 변화와 장내미생물의 효소활성을 비교하였다. 동물성 식이를 실시한 군에서는 식물성 식이를 실시한 군과 비교시 유해한 혐기성 균의 수가 약 10배 정도 많게 관찰되었으며 식물성 식이를 실시한 군에서는 비피더스균(*Bifidobacterium*)이나 유산간균(*Lactobacillus*)의 수가 동물성 식이를 실시한 군보다 10배 정도 많게 관찰되었다. 또한 대장암 발병과 상관관계가 깊은 것으로 알려진 장내미생물 유래 효소활성을 비교한 결과 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, urease 등의 효소활성이 동물성 식이를 실시한 군에서 1.8-2배 가량 높게 나타났다. 즉 식이에 따라 장내 세균총의 차이 및 장내세균의 효소활성의 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ 장내세균, 비피더스균, 유산간균, β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, urease

사람은 그 일생 중 단지 1% 정도에 해당하는 정도만 모체의 태내에서 무균 상태의 환경에서 산다. 생후 2-3일 부터는 체내에서 미생물이 관찰되기 시작하며 특히 장 내용물의 경우 분변 1g당 10^{11} 정도의 균이 관찰되는 것으로 보고되고 있다(17). 관찰되는 균총도 *Bifidobacterium* 등이 주로 관찰되나 성장하면서 먹는 음식물, 스트레스, 호르몬의 변화 등의 요인에 의해 장내 유산균인 *Bifidobacterium*은 현저하게 감소하고 대장균, 장구균, *Clostridium*, *Bacteriodes* 등이 현저하게 증가한다(13). 이와 같은 장내 세균총의 변화의 주요 원인으로는 식생활, 스트레스, 호르몬의 변화 등을 이야기한다. 그 실 예로서 장수촌의 노인의 장내 세균총은 도시의 노인의 그것과 비교했을 때 젊은이의 장내 세균총을 형성하고 있다는 보고도 있다(13). 즉 정제되지 않은 곡류, 과일, 요구르트 등의 섬유소가 풍부한 식물성 식단이 그 이유로 설명되고 있다. 식이는 장내 세균총의 우세 집단을 좌우할 뿐 아니라 장내 미생물이 생성하는 효소의 활성에도 밀접한 영향이 있다. 세계 각국의 질병의 발생 현황을 보면 인종의 차이는 있겠지만 음식물, 흡연, 대기오염, 지형적인 요인 등이 암의 발병과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(3). 특히 식사와 암의 발병과의 상관관계는 최근에 관심을 불러 일으키고 있다.

위암이 많은 나라는 대장암과 결장암의 발생빈도가 적으며 그 반대의 경우도 가능하다. 즉 한국, 일본 등의 나라에서는 위암의 발생이 많으나 미국, 유럽 등에서는 위암이 발생은 적으나 대장암의 발생빈도가 현저히 높다. 물론 유럽중에서도 핀란드는 예외이다. 최근 우리 나라도 식생활이 서구화되어가 육류의 섭취가 증가하면서 대장암의 발생이 증가하는 추세이다(1, 6, 7, 15, 18, 23). 따라서 섭취하는 음식물과 장내세균 및 암과의 관계는 필연 관계를 갖고 있음을 알 수 있다. 특히 동물성의 고지방, 고단백 식이는 장내 미생물의 β -glucuronidase 등의 효소 활성을 증

가시켜 암을 유발하는 것으로 사료된다(8, 19, 21). 따라서 본 연구에서는 식이와 장내 세균총 및 장내 미생물의 효소활성의 상관 관계를 알아보코자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 웅성 ICR mouse(12 ± 2 g)로서 삼육대학교 실험 동물실에서 분양 받아 실험실 환경에서 일주일간 적응시킨 후 식이를 조정하여 사육하였다.

시약

p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- β -D-glucuronide, p-nitrophenol, L-tryptophan, indole, pyridoxal-5-phosphate, bovine serum albumin 등은 Sigma사의 시약을 구입하여 사용하였고 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

배지

장내세균의 배양을 위하여 선택배지를 사용하였다. 선택배지는 일본 Nissui 제품으로 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 선택배지로는 DHL 배지, 비피더스균의 선택배지로는 BL 배지, 클로스트리디움의 선택배지로는 *Clostridia* count agar를 사용하였다. 유산간균의 배양에는 *Lactobacilli* culture agar, *Bacterioides*의 배양에는 *Bacterioides* agar를 각각 사용하였다.

생쥐의 식이

본 실험에 사용한 생쥐의 식이는 Table 1에 표시하였다. 식물성 단백질원으로는 대두분말을 사용하였고 동물성 단백질원으로는 전지분유를 사용하였다. 대조군의 경우는 시중에서 구입한 실험동물 사료(제일제당)를 먹이면서 광범위 항생제인 chloramphenicol을 87.5 mg/g/day로 경구 투여하였다. 식수는 사육공간에 공급하였다. 식이를 조정하여 20주간 실험하면서 관찰하였다.

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 02-3399-3653, Fax : 02-948-5370
E-mail : Hanj@syu.ac.kr

Table 1. Composition of diet

Ingredients	Composition (g/100 g diet)	
	the group fed with plant feeds	the group fed with animal feeds
Wheat flour	60	60
Soybean	21	-
Whole milk	-	21
Corn oil	10	10
Vitamin-mineral mix.	9	9

실험동물의 사육 및 분변의 채취

실험동물을 6마리를 1 group으로 하여 동물성 단백질이군, 식물성 단백질이군 및 대조군 등 3군으로 나누어 사육하였다. 각 군별로 채취한 분변을 혐기성 희석액(0.7% K₂HPO₄ 37.5 ml, soln. I [0.47% KH₂PO₄, 1.8% NaCl, 1.20% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄ · H₂O] 37.5 ml, 0.1% resazurin 1.0 ml, L-cystein · HCl 0.5 g, 25% L-ascorbic acid soln. 2.0 ml, 8% Na₂CO₃ soln. 50 ml, agar 0.5 g, d.w. 860 ml, pH 6.8)으로, g당 10⁵-10⁸까지 희석하여 균 희석액으로 사용하였다.

한편 효소활성을 측정하기 위해서는 분변을 각 군별로 매일 채취하여 인산 완충액(pH 6.8)으로 10배 희석하여 얼음위에 1 시간 정도 방치후 vortex mixing후 500 g에서 5분 정도 원심 분리하여 상등액을 효소액으로 사용하였다.

장내 세균의 배양

마우스를 식이를 조정하여 사육한 후 17주 될 때부터 매주 1 회씩 4회 분변을 채취하여 반복실험 후 그 값을 평균하였다. 각 군별로 희석한 희석액 100 µl를 각각의 선택배지에 도말하여 DHL 배지는 호기적 조건에서 배양했으며 나머지 배지는 혐기적 조건에서 배양하였다. 모든 배양은 동일 희석배수를 2번 실험하였다. 혐기 배양은 Bactron Anaerobic chamber를 사용하였다.

장내세균의 효소활성 측정

β-glucosidase 활성(9)을 측정하기 위해서는 0.1 M potassium phosphate용액(pH 6.8) 0.3 ml, 2 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside 0.2 ml, 및 효소액 0.1 ml을 37°C에서 15분간 반응 후 0.25 N NaOH용액 0.4 ml을 가하여 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 p-nitrophenol로 점량선을 작성하여 생성된 p-nitrophenol의 양을 정량 하였다. β-glucuronidase 활성(10)을 측정하기 위해서는 0.1 M potassium phosphate용액(pH 6.8) 0.38 ml, 10 mM p-nitrophenyl-β-D-glucuronide 0.02 ml 및 효소액 0.1 ml을 37°C에서 15분간 반응 후 0.5 N NaOH용액 0.5 ml을 가하여 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 p-nitrophenol로 점량선을 작성하여 생성된 p-nitrophenol의 양을 정량 하였다. tryptophanase활성(5)의 측정을 위해서는 complete reagent [0.05 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 22.5 ml, pyridoxal phosphate 2.75 mg, EDTA 19.6 mg, BSA 10 mg, 증류수 87.5 ml] 0.2 ml, 0.02 M tryptophan 0.2 ml, 효소액 0.1 ml을 37°C에

서 30분간 반응한다. color reagent (95% ethanol 94.8 ml, 36 N sulfuric acid 5.2 ml, dimethylaminobenzaldehyde 1.47 g) 2 ml을 가하고 현탁하여 섞은 후 60% trichloroacetic acid 0.1 ml을 가하여 반응을 중지하고 550 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Indole을 표준물질로 점량선을 작성하여 생성된 indole의 양을 정량 하였다.

Urease 활성(11) 효소액 0.1 ml, 5 M urea 0.05 ml를 37°C에서 10분간 반응한 후, 1 N 황산액 0.1 ml를 넣는다. 용액 I. (phenol 5 g, sodium nitroprusside 25 mg, 증류수 500 ml) 및 용액 II(NaOH 2.5 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 26.0 g, NaOCl 5 ml, 증류수 495 ml)를 각각 1 ml씩 가하고 60°C에서 20분간 반응한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

식이에 따른 장내 세균총의 비교

동물성 단백질이와 식물성 단백질을 실시한 군으로 나누어 각각의 군 별로 생쥐의 분변중의 세균총을 비교하였다. 비교대상 세균총으로는 장내세균과(Enterobacteriaceae), 유산간균(Lactobacilli), Bacteriodes, Clostridia sp. 및 Bifidobacterium이었다. 모든 실험은 3회 이상 반복실험을 하였다. 각각의 선택배지에서 균수를 비교한 결과 장내세균과의 경우 식물성 식이를 실시한 군에서는 1.67 × 10⁷ cells/g 분변 이었고 동물성 식이를 실시한 군에서는 1.8 × 10⁷ cells/g으로 현저한 차이를 나타내지 못하였다. 유산간균(Lactobacillus)의 경우에는 식물성 식이를 실시한 군에서는 1.28 × 10⁹ cells/g이었고 동물성 식이를 실시한 군에는 1.01 × 10⁸ cells/g으로 나타나 식물성 식이를 실시한 군이 약 10배정도 유산간균의 분포가 많은 것으로 관찰되었다. Bifidobacterium은 식물성 식이를 실시한 군에서는 5.05 × 10⁸ cells/g이었으며 동물성 식이를 실시한 군에서는 1.99 × 10⁸ cells/g으로 관찰되었다. Bacteriodes는 식물성 식이를 실시한 군에서는 1.3 × 10⁸ cells/g이었으나 동물성 식이를 실시한 군에서는 1.8 × 10⁹ cells/g으로 나타나 10배 이상 균수가 증가한 것을 알 수 있었으며 Clostridium속의 경우에는 식물성 식이군에서는 1.85

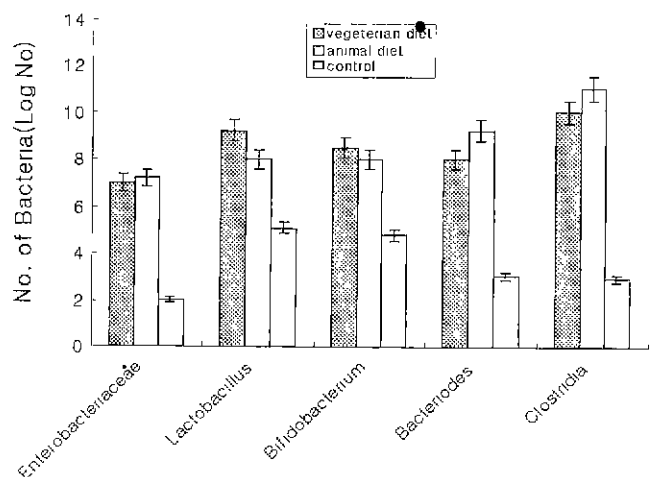


Fig. 1. Comparison of bacterial population in the feces of mouse fed with plant feeds and animal feeds.

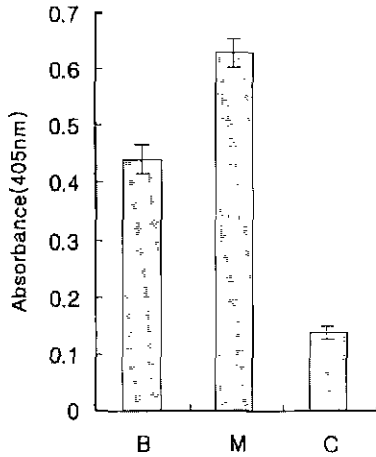


Fig. 2. β -glucosidase activities in the feces of mouse fed with different diets. B, soybean diet group; M, whole milk diet group; C, control group.

$\times 10^{10}$ cells/g이었고 동물성 식이를 실시한 군에서는 8.35×10^{10} cells/g으로 관찰되어 약 5배 정도의 균수의 증가가 확인되었다. 한편 정상적인 생쥐 사료와 항생제를 공급한 대조군의 경우에는 장내세균과의 경우 1.02×10^2 cells/g, *Clostridium*의 경우 2.95×10^3 cells/g 등 균수의 감소를 확인할 수 있었으며 항생제의 영향으로 사료된다.

식이에 따른 장내미생물의 효소활성

생쥐의 분변중의 β -glucosidase 활성 생쥐의 분변중의 β -glucosidase 활성은 식물성 단백질 투여군에서는 $1.2 \pm 0.08 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였으며 동물성 단백질 투여군에서는 $1.6 \pm 0.07 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였다. 동물성 단백질 식이군이 식물성 단백질 식이군에 비하여 효소활성이 평균 33% 정도 증가한 것을 알 수 있었다. 한편 광범위 항생물질을 경구 투여한 대조군에서는 이 효소의 활성이 70% 정도 감소한 결과를 나타내었다. 따라서 이 효소활성은 주로 분변중에 존재하는 미생물에

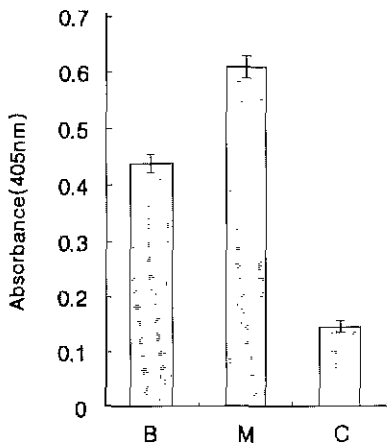


Fig. 3. β -glucuronidase activities in the feces of mouse fed with different diets. B, soybean diet group, M, whole milk diet group; C, control group.

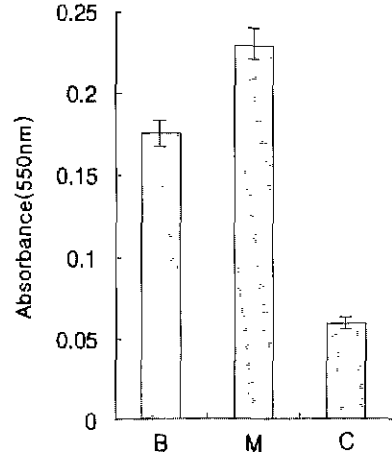


Fig. 4. Tryptophanase activities in the feces of mouse fed with different diets. B, soybean diet group; M, whole milk diet group; C, control group.

기인한 것으로 생각된다.

생쥐의 분변중의 β -glucuronidase 활성 생쥐의 분변중의 β -glucuronidase 활성은 식물성 단백질 투여군에서는 $1.37 \pm 0.1 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였으며 동물성 단백질 투여군에서는 $2.06 \pm 0.07 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였다. 동물성 단백질 식이군이 식물성 단백질 식이군에 비하여 효소활성이 평균 50% 정도 증가한 것을 알 수 있었다. 한편 광범위 항생물질을 경구 투여한 대조군에서는 이 효소의 활성이 70% 정도 감소한 결과를 나타내었다. 따라서 이 효소활성은 주로 분변중에 존재하는 미생물에 기인한 것으로 생각된다.

생쥐의 분변중의 Tryptophanase 활성 생쥐의 분변중의 tryptophanase 활성은 식물성 단백질 투여군에서는 $0.17 \pm 0.03 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였으며 동물성 단백질 투여군에서는 $0.22 \pm 0.07 \mu\text{mole/min/g}$ wet feces였다. 동물성 단백질 식이군이 식물성 단백질 식이군에 비하여 효소활성이 평균 30% 정도 증가한 것을 알 수 있었다. 한편 광범위 항생물질을 경구 투여한 대조군에서는 이 효소의 활성이 75% 정도 감소한 결과를 나타내

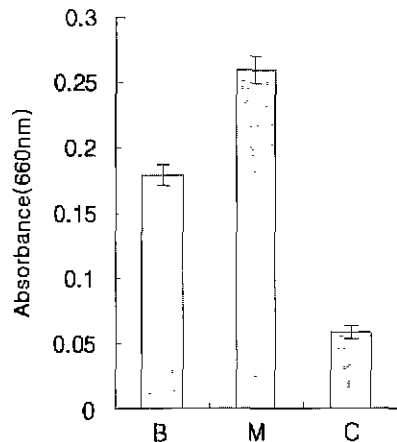


Fig. 5. Urease activities in the feces of mouse fed with different diets. B, soybean diet group, M, whole milk diet group, C, control group

었다. 따라서 이 효소활성은 주로 분변중에 존재하는 미생물에 기인한 것으로 생각된다.

생쥐의 분변중의 Urease 활성 생쥐의 분변중의 urease 활성을 비교하기 위해 효소 반응액을 660 nm에서 흡광도를 측정한다. 결과 식물성 단백질 투여군에서는 흡광도가 0.17였으며 동물성 단백질 투여군에서는 0.25였다. 동물성 단백질식이군이 식물성 단백질 식이군에 비하여 효소활성이 평균 45% 정도 증가한 것을 알 수 있었다. 한편 광범위항생물질을 경구 투여한 대조군에서는 이 효소의 활성이 68% 정도 감소한 결과를 나타내었다. 따라서 이 효소활성은 주로 분변중에 존재하는 미생물에 기인한 것으로 생각된다.

고 찰

본 연구에서는 식이에 따른 장내 세균총의 변화와 장내미생물에 기인한 효소활성을 비교하여 보았다. 동물성 단백질 식이와 식물성 단백질 식이를 실시한 생쥐를 대상으로 장내 세균총을 비교한 결과 유산균 및 비피더스균의 숫자가 식물성 식이군에서 5-10배 정도 우세하게 나타났으며 동물성 식이를 실시한 군에서는 혐기성 유해균인 *Bacteriodes*와 *Clostridium*이 10배 정도 많이 관찰되었다. 식이에 따른 지방과 동물성 단백질에 의한 장내 균총의 차이가 있음을 알 수 있었으며 특히 동물성 고지방, 고단백식을 실시한 군에서는 유해한 혐기성 균이 상대적으로 우세한 것을 알 수 있었다. 성인의 대장암 발생과 관련이 깊은 것으로 알려진 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, urease 등의 효소 활성을 비교한 결과에서도 동물성 식이를 실시한 군에서 각각의 효소활성이 1.8-2배까지 높게 나타남을 알 수 있었다. 신체는 체내에 들어온 유해물질로부터 스스로를 보호하기 위하여 glucuronic acid conjugate의 형태로 독성 물질을 포합시켜 배설하는 것으로 알려졌다. 그러나 대장에 서식하는 세균총이 분비한 β -glucuronidase의 작용을 받게되면 이 포합체가 가수분해되어 다시 독성물질로 되고 그 결과 대장암등을 유발시킨다고 알려졌다(14, 21). Celika 등(4)도 grain diet와 비교 시 meat diet를 실시한 결과 β -glucuronidase 활성이 1.5-2.5 정도 높은 것으로 보고했다. 한편 동물성 단백질식은 암모니아 생성등을 통해 장내 pH를 상승시키며 pH 상승은 효소활성을 유도하는 것으로 알려졌다(12). Tryptophanase는 tryptophan을 indole, ammonia, pyruvic acid 등으로 분해하는 효소로 특히 동물성 고단백식을 하는 경우 tryptophan의 함량이 높아 장내 indole 함량이 증가하여 대장암의 원인이 되는 것으로 생각되어 지고 있다(2, 16). 특히 장내 세균총의 숫자적인 차이에 비해 효소활성이 더 현저한 차이를 보이는 것은 식이가 장내미생물의 효소 활성을 유도하는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 볼 때 식이에 따라 장내 세균총에 차이가 있음을 확인하였으며 세균총의 차이보다 더 현저한 장내세균의 효소 활성의 차이를 확인하였다. 즉 식이에 따라 장내 미생물의 효소활성이 유도됨을 알 수 있었다. 특히 β -glucuronidase, tryptophanase 등의 활성이 높아지면 2차 담즙산(secondary bile acid) 생성이나 indole 등의 생성이 증가되어 암을 일으키는 것으로 보고된 바 있다(8, 19, 22). 본 실험결과 동물성 단백질 식이군에서는 위의 효소활성이 50% 정도까지 증가한 것으로 보아 식이와 대장암 발병율의 밀

접한 상관관계가 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구의 일부는 1998학년도 삼육대학교 교비 연구비에 의하여 시행되었으며 이에 깊은 감사의 뜻을 올립니다.

참고문헌

1. Berg, J.W. and M.A. Hawell. 1974. The geographic pathology of bowel cancer. *Cancer*, **34**, 807-814
2. Bostford, J.L. and R.D. Demoss. 1972. *Escherichia coli* tryptophanase in the enteric environment. *J. Bacteriol.* **109**, 74-80.
3. Burkitt, D.P. 1975. Large bowel cancer; an epidemiologic jigsaw puzzle. *J. Nat'l Cancer Inst.* **54**, 1, 3-6.
4. Celika, C.D., A. Lewis, and A. Middleman. 1983. Induction of colon mucosal β -glucuronidase production as a mechanism for 1, 2-Dimethylhydrazine colon carcinogenesis. *J. Surgical Oncology* **24**, 209-211
5. Chung, K.T., G.E. Funk, and M.W. Slain. 1975. Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**, 1073-1078.
6. Doll, R. and R. Peto. 1981. The cause of cancer; quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the U. S. today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1991-1308.
7. Drassar, B.S. and D. Irving. 1973. Environmental factor and cancer of the colon and breast. *Br. J. Cancer* **27**, 167-172.
8. Finegold, S.M. and D.J.A. Flora. 1975. Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients. *Cancer Res.* **35**, 3407-3417.
9. Fishman, W.H. 1974. β -Glucosidase, methods of enzymatic analysis. 2nd ed., pp. 217-226. Academic Press, New York.
10. Fishman, W.H. 1974. β -Glucuronidase, methods of enzymatic analysis 2nd ed., pp. 929-943, Academic Press, New York
11. Gutmann, I. and H.U. Bergmeyer. 1974. Urea, In Methods of enzymatic analysis vol. 4, Bergmeyer, H.U. (Eds.), pp. 1791-1794, Academic Press, Inc., New York.
12. Kim, D.H., H.J. Sang, S.W. Kim, and K. Kobayashi. 1992. pH inducible β -glucosidase and β -glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1667-1669.
13. Kim, D.H. and M.J. Han. 1997. Adult disease and intestinal bacteria. pp. 9-15, Hyoil Press, Korea.
14. Kinoshita, N. and H.V. Gelvoin. 1978. β -Glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo- $[\alpha]$ -pyrene-glucuronide and binding to DNA. *Science* **199**, 307-309.
15. LARC. 1977. Dietary fiber, transtme, fecal bacteria, steroids and colon cancer in two Scandinavian populations. *Lancet*, **30**, 207-211.
16. Macfalane, G.F., J.H. Cummings, and C. Allison. 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J. Microbiol.* **132**, 1647-1656.
17. Mitsuoka, T. 1971. The method of screening for intestinal flora. *J. Japan. Infect. Dis.* **45**, 406-412.
18. Moore, W.E.C. and L.V. Holdeman. 1975. Discussion of current bacteriological investigations of the relationships between intestinal flora, diet and colon cancer. *Cancer Res.* **35**, 3415-3420.
19. Reddy, B.S. and E.L. Wynder. 1973. Large bowel carcinogenesis-fecal constituents of populations with diverse incidences rates of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1**, 1437-1442.

20. Reddy, B.S. and E.L. Wynder. 1977. Metabolic epidemiology of colon cancer. *Cancer* **39**, 2533-2539.
21. Thorton, J.R. 1981. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet* **16**, 1081-1083.
22. Tomonatsu, H. 1994. Health effect of oligosaccharide. *Food Technology*. **48**, 61-65.
23. Willet, W.C., M.J. Stamofor, G.A. Colditz, B.A. Rosner, and E.E. Spizer. 1990. Relation of meat, fat, fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *New Eng. J. Med.* **323**, 1664-1672

(Received December 28, 1998/Accepted March 18, 1999)

ABSTRACT : Fecal Microflora of Mice in Relation to Diet

Sung Suk Choi¹ and Nam Joo Ha^{2*} (Institute of Life Science¹, Department of Pharmacy, Samyook University, Seoul 139-742, Korea)

The effects of diet on the composition of fecal microflora in mouse and the activities of several enzymes in the feces were investigated. Vegetarian dietary groups were found to contain about ten times higher numbers of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* than animal dietary groups. Animal dietary groups were found to contain about 5 to 10 times higher numbers of anaerobic *Clostridia* and *Bacteriodes* than the vegetarian dietary groups. Fecal microbial β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase and urease activities in the animal dietary groups were shown to be 30 to 50% higher than those in the vegetarian dietary groups.