

표고버섯 추출물 투여가 생쥐 장내세균 효소에 미치는 영향

배은아 · 김동현* · 한명주
경희대학교 식품영양학과, *약학과

Effect of *Lentinus edodes* water extract on some enzymes of mouse intestinal bacteria

Myung-Joo Han, Eun-Ah Bae and Dong-Hyun Kim*

Department of Foods and Nutrition,
*College of Pharmacy, Kyung-Hee University

The objective of this study was to evaluate the *in vivo* effect of *Lentinus edodes* on the harmful enzymes of mouse intestinal bacteria. When mouse intestinal microflora were cultured in the anaerobic media containing *Lentinus edodes* water extract or trehalose (LD) isolated from its extract, final pH of the cultured media was significantly decreased and the activities of harmful enzymes, particularly β -glucuronidase and tryptophanase, were significantly inhibited. By orally administering *Lentinus edodes* water extract or LD, mouse fecal β -glucuronidase and tryptophanase were also significantly inhibited.

Key words : trehalose (LD), intestinal bacteria, mushrooms, lactic acid bacteria

서 론

사람의 건강에 일생동안 영향을 미치는 것 중의 하나가 장내세균이며, 사람의 장내에는 약 100종류, 100조 이상의 세균이 서식하고 있다⁽¹⁾. 사람의 장내에 서식하는 장내세균은 숙주의 건강을 지켜주는 유용균과 숙주의 건강에 나쁜 영향을 주는 유해균이 있으며 이들 양자의 균형에 의하여 건강상태가 조절되고 있다. 유용균의 대표적인 것이 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*이며 이들 중에서도 비피더스균은 사람의 건강에 대단히 중요한 역할을 한다. 반대로, 유해균의 대표적인 균은 대장균, 식중독균, 포도상구균이며 이들은 장내의 부패를 촉진하여 노화가 빨리 일어나게 하고 발암물질을 생산한다⁽²⁻⁵⁾. 이러한 장내세균은 섭취하는 음식물, 생활환경, 스트레스에 의해 영향을 받으며 질병의 발생과는 밀접한 관계가 있다. 예를 들면, 육류의 섭취가 많은 서양인들은 채소류의 섭취가 많은 동양인들보다 대장암 발생이 높다. 그러나 서양 중에서도 핀란드인의 경우는 육류의 섭취가 많은 데도 대장암의 발생이 현저히 낮았으며 그 이유는 요구르트의 섭취 때문인 것으로 밝혀졌다^(6,7). 이와 같이 장내의 환경에 의

해 변화되기 쉬운 장내우세균인 비피더스균주를 장내우세균 상태로 계속 유지시켜준다면 비피더스균은 장내에서 유산및 초산산을 생성하여 장내의 pH를 산성으로 유지시키고 부패성 세균의 증식을 억제하는 역할을 할 것이다. 따라서 장내의 환경을 신체에 유해세균의 작용으로부터 방어할 수 있다^(8,9).

장내의 세균총을 비피더스 우세균으로 유지시켜 주기 위한 방법으로는 두 가지 방법이 시도되고 있다. 첫째는 비피더스균을 경구적으로 섭취하는 방법이다. 이 방법의 단점은 장내의 비피더스균은 숙주 고유의 특이성을 나타냄으로써 경구적으로 섭취한 비피더스균은 대장 내에서 정착하지 못하고 배설되는 것으로 나타났다. 둘째는 비피더스균에게 선택적으로 이용되는 물질 즉 비피더스 인자를 경구적으로 섭취하는 방법이다. 이 방법은 우리가 유산균 증식성분을 함유한 음식물을 통해서 자신의숙주 유산균을 증식시킬 수 있을 것이다⁽¹⁰⁾. 그래서 저자 등은 우리나라의 식용버섯에 대하여 장내 유산균 증식효과를 검토하고 표고버섯이 가장 우수한 효과를 갖고있음을 보고하였고 이 표고버섯으로부터 유산균 증식 성분인 LD(trehalose) 분리하여 보고하였다⁽¹¹⁾.

본 연구에서는 표고버섯에서 분리한 유산균 증식성분인 trehalose를 생쥐에 경구투여하고 장내 pH 및 장내세균기인성 유해효소의 저해활성에 미치는 효과를 조사하였다.

실험재료 및 방법

재료

표고버섯은 서울 경동시장에서 구입하였다. p-Nitrophenyl-

Corresponding author: Myung-Joo Han, College of Pharmacy, Kyung-Hee University, 1, Hoeki, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Korea
Tel : 82-2-961-0553
Fax : 82-2-961-0260
E-mail : mjhan@nms.kyunghee.ac.kr

β -D-glucuronide, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, tryptophan 은 Sigma Chem. Co.(USA)에서 구입하였다. GAM(-glu)배지는 Nissui Pharm. Co., Ltd(Tokyo, Japan)으로 부터 구입하였다. 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

버섯시료의 추출

잘말린 버섯 500 g에 증류수 5 L를 가하여 80°C 수욕상에서 8시간 동안 추출한 후 여과하고, 다시 잔사에 증류수 2.5 L를 가하여 4시간 동안 추출한 후 여과하여 얻은 수층을 앞에서 얻은 물추출물과 합했다. 이 물추출액을 유산균 증식효과를 측정하기 위한 재료로 사용하였다.

유산균증식인자의 추출 및 분리

이미 보고된 방법에 따라 실시하였다⁽¹¹⁾. 먼저 표고버섯에 증류수로 추출한 물 추출물을 여과한 후 상등액을 농축하였다. 추출물은 전개용매로 $CHCl_3$:MeOH(1:1)을 사용하여 silica gel column chromatography를 시행하여 LD fraction을 얻었다. 이 LD fraction에 대해 전개용매로 BuOH:pyridine:D.W=85:10:10을 사용하여 silica gel column chromatography를 시행하여 LD를 분리하였다. LD(trehalose)는 다음과 같은 spectral property를 나타내었다.: FAB-MS m/z (negative ion): 343(M+). ¹H-NMR(500 MHz, D₂O): δ 3.54(1H, t, 9.4), 3.73(1H, dd, J=3.8, 9.9), 3.84(1H, dd, J=5.0, 11.9), 3.90-3.96(3H, m), 5.28(1H, d, J=3.8). ¹³C-NMR(125 MHz, D₂O)는 63.2(C6,C6'), 72.4(C4,C4'), 73.7(C2,C2'), 74.9(C3,C3'), 75.2(C5,C5'), 95.95(C1,C1')이었다.

효소활성 측정⁽¹²⁻¹⁴⁾

β -Glucosidase 효소활성: 0.1 M phosphate buffer 0.3 mL에 2 mM p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside 0.2 mL, 효소액 0.1 mL를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH 0.4 mL을 가해 반응을 종료시키고 D.W. 1 mL를 가하여 원심분리(2000×g, 20 min.)한 후 상등액으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β -Glucuronidase 효소활성 측정: 0.1 M phosphate buffer 0.38 mL에 10 mM p-nitrophenyl β -D-glucuronide 0.02 mL, 효소액 0.1 mL를 가하여 37°C에서 한 시간 반응시키고 0.5 N NaOH 0.5 mL를 가해 반응을 종료시키고 D.W. 1 mL를 가하여 원심분리(2000×g, 20 min)한 후 상등액으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tryptophanase 효소활성: Complete reaction mixture(0.1 M bicine(pH8.0), 4% pyridoxal 5-phosphate, 20% bovine serum albumin) 0.2 mL, 0.02 M tryptophan 0.2 mL 및 효소액 0.1 mL을 가하여 37°C에서 30분 반응시키고 color reagent (p-dimethylaminobenzaldehyde 14.7 g, 95% ethanol 948 mL, C-H₂SO₄ 52 mL) 2 mL을 가하여 반응을 종료 시킨 후 원심분리(2000×g, 10 min)하고 상등액으로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물

실험에 사용한 생쥐(male ICR, 15-18 g)는 대한동물(주)에서 구입하여 실험실에서 1주일 순화시킨후 사용하였으며 사

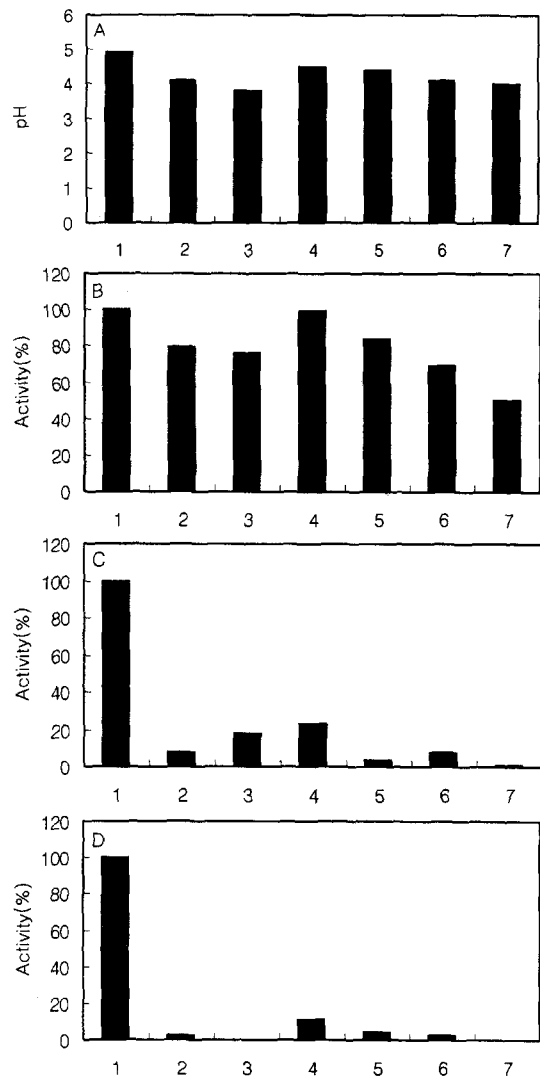


Fig. 1. In vitro effect of LD and water extract of *L. edodes* on harmful enzymes of mouse intestinal bacteria: (A), pH; (B), β -glucosidase; (C), β -glucuronidase; (D), tryptophanase. Mouse intestinal microflora were inoculated in GAM broth containin each sample and anaerobically cultured for 20 h at 37°C. The fecal enzyme activity was measured according to the procedure of Materials and methods. Enzyme activity of each group was indicated compared to control group. Symbols indicate as follows: 1, control; 2, added 0.5% lactose into GAM broth; 3, added 1% lactose into GAM broth; 4, added 0.5% *L. edodes* water extract into GAM broth; 5, added 1% *L. edodes* water extract into GAM broth; 6, added 0.5% LD into GAM broth; 7, added 1% LD into into GAM broth.

료는 삼양사료(주)를 분말화하여 사용하였다. 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 실험동물은 한 군을 10마리로하여 5 군으로 나누고 일반식이투여군, 일반식이에 0.5%의 lactose를 첨가한 군, 일반식이에 0.5% 표고버섯추출물을 첨가하여 만든 식이를 투여한 군, 일반식이에 1% 표고버섯추출물을 첨가하여 만든 식이를 투여한 군, 일반식이에 0.5% LD를 첨가하여 만든 식이를 투여한 군, 일반식이에 1% LD를 첨가하여 만든 식이를 투여한 군으로 나누어 2주간 투여한후 장관내 pH 및 장내세균기인성 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase 효소활성을 측정하였다.

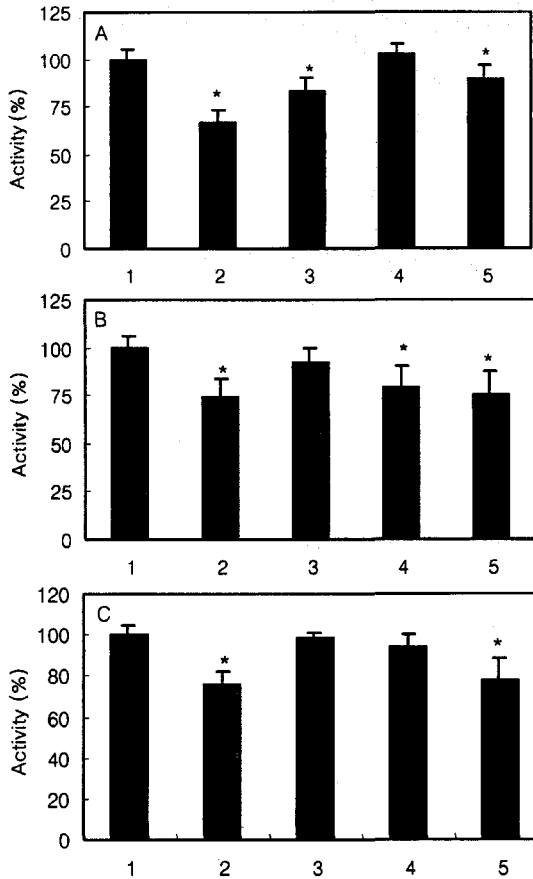


Fig. 2. *In vivo* effect of LD and water extract of *L. edodes* on harmful enzymes of mouse intestinal bacteria: (A), β -glucosidase; (B), β -glucuronidase; (C), tryptophanase
 Each sample was orally administered for 2 weeks and then the fecal enzyme activity was measured according to the procedure of Materials and methods. Enzyme activity of each group was indicated compared to control group. Symbols indicate as follows: 1, control; 2, 0.5% lactose-treated group; 3, 0.5% *L. edodes* water extract-treated group; 4, 1.0% *L. edodes* water extract-treated group; 5, 0.5% LD-treated group. *Significantly different to control group ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

***In vitro*에서 표고버섯 추출물 및 LD가 생쥐의 장내세균 효소활성에 미치는 영향**

생쥐의 장내세균총을 starter로 이용하여 표고버섯추출물 및 표고버섯으로부터 분리한 유산균 증식성분인 LD(trehalose)에 대하여 배양후 배지 pH 저하효과 및 장내세균총이 생산하는 유해효소저해활성을 조사하였다(Fig. 1). 대조군의 배지 pH가 5.0에 비해 표고버섯 추출물을 0.5% 첨가한 경우에는 4.24, 1%을 첨가한 경우에는 4.12로 표고버섯 추출물의 첨가량이 많을수록 낮은 pH를 나타내었다. 이러한 배지의 pH저하효과는 이미 보고한 한 등의 결과⁽¹⁵⁾와 아주 유사한 것으로 미루어 보아 유산균이 증식하여 유기산이 생성되었기 때문이라고 생각된다. 표고버섯류에 함유하고있는 당류중에서 단당류가 유산균증식효과가 있다하더라도 맹장 또는 대장으로 이행되기 전에 흡수되어지기 때문에 장내의 유산균증식효과를 기대하기에는 미흡하다. 그러므로 유산균 증식효과를

Table 1. Effect of LD and water extract of *Lentinus edodes* on the intestinal pH of mice

| Group | pH |
|----------------------------|-------------|
| Control | 7.52 ± 0.34 |
| 0.5% lactose-treated | 7.35 ± 0.41 |
| 0.5% water extract-treated | 7.45 ± 0.40 |
| 1.0% water extract-treated | 7.41 ± 0.39 |
| 0.5% LD-treated | 7.36 ± 0.46 |

나타낼 수 있는 당류는 대부분의 경우 우리의 장내에서 직접 흡수되어지지 않는 당류이다. 이에 따라 표고버섯으로부터 유산균증식효과가 있는 이당류인 LD를 분리하여 유해효소 저해활성도를 측정된 결과 대장암 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 β -glucuronidase와 tryptophanase가 대조군에 비해 80%이상 효과적으로 저해됨을 발견하였다(Fig. 1-C와 D).

표고버섯 및 LD의 투여가 장내세균기인성 유해효소활성에 미치는 영향

표고버섯의 추출물 및 LD가 생쥐의 장내세균의 유해효소 억제효과가 우수하였으므로 생쥐에 2주간 투여 후 장내 pH와 장내세균 기인성 유해효소를 측정하였다. Table 1에 나타난 것과 같이 LD를 투여한 군이 장내 pH를 낮추는 효과가 있었으나, 대조군, 표고버섯 물추출물 투여군, LD 투여군사이에 유의한 차이는 없었다. 그러나, Fig. 1에 나타난 것과 같이 장내세균 기인성 유해효소는 표고버섯 추출물을 투여한 경우 β -glucuronidase와 tryptophanase의 효소활성이 유의적으로 억제되었으며 대조물질로 사용한 lactose와 유사한 정도의 효과를 나타냈다. 그러나, β -glucosidase의 효소활성에는 영향을 미치지 못했다. 표고버섯의 물추출물로부터 분리한 LD를 생쥐에 2주간 투여한 경우의 장내세균의 유해효소억제효과는 물 추출물보다 더 우수하였다. 이러한 결과는 경구 투여된 표고버섯추출물 및 LD가 생쥐의 장내세균의 유기산 생산균주, 특히 유산균의 증식을 유도하여 장내 pH를 낮추고 더 나아가서 장내세균이 생산하는 유해효소의 생산을 억제했기 때문으로 생각된다.

결 론

생쥐의 장내세균을 표고버섯 물추출물 또는 LD 함유배지에서 배양시 대조군에 비해 배지의 pH를 유의성 있게 저하하였으며 유해효소인 β -glucuronidase 및 tryptophanase 효소활성을 저해하였다. 생쥐에 버섯 추출물 또는 LD를 경구투여한 결과 장내 pH를 저하시켰으나 유의성은 없었다. 장내세균 기인성 유해효소인 β -glucuronidase 및 tryptophanase 효소의 활성은 표고버섯에 의해 유의성있게 저하하였으며 표고버섯 추출성분인 LD를 투여한 경우가 더 우수한 효과를 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구사업(과제번호 961-

0720-116-2)의 일환으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Mitsuoka, T. Intestinal bacteriology. pp. 33-149 Asakurashyoten Press, Tokyo, Japan (1990)
2. Kim, D.-H. Herbal medicines and intestinal microflora. pp 145-163, Shinilsangsa press, Seoul, Korea (1993)
3. Baek, Y.J. Lactic acid bacteria and health. Kor. J. Food Nutr. 6: 53-65 (1993)
4. Kang, K.H. and Huh, K.T. Bifidus and oligosaccharides. pp 25-27 Yuhannunwhasa press, Seoul Korea (1994)
5. Hill, M.J., Drasar, B.S., Aries, V., Crowther, J., Hawkesworth, G. and Williams, R.E.O. Bacteria and etiology of cancer of the large bowel. Lancet 1: 95-100 (1971)
6. Goldin, B. and Gorbach, L. Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, Lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. Cancer 40: 2421-2426 (1977)
7. Reddy, G.V., Friend, B.A. and Shahani, K.M. Antitumor activity of yogurt components. J. Food. Prot. 46: 8-11 (1983)
8. Kim, D.-H. and Han, M.J. Inhibition of intestinal bacterial enzymes by lactic acid bacteria. Yakhak Hoeji 39: 169-174 (1995)
9. Bogdanov, I.V., Velichkov, V.F. and Gurvich, A.L. Antitumor action of glycopeptides from the wall of *Lactobacillus bulgaricus*. Bull. Exptl. Biol. Med. 84: 1750-1753 (1979)
10. Modler, H.W., McKellar, R.C. and Yaguchi, M.: Bifidobacteria and bifidogenic factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23: 29-41 (1990)
11. Bae, E.-A., Kim, D.-H. and Han, M.J. Effect of *Lentinus edodes* on the growth of intestinal lactic acid bacteria. Arch. Pharm. Res. 20: 443-447 (1997)
12. Kim, D.-H., Kang, H.-J., Kim, S.-W. and Kobashi, K. pH-Inducible β -glucuronidase and β -glucuronidase of intestinal bacteria. Biol. Pharm. Bull. 40: 1667-1669 (1992)
13. Kim, D.-H., Kang, H.-J., Park, S.-H. and Kobashi, K. Characterization of β -glucuronidase and β -glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria. Biol. Pharm. Bull. 17: 423-426 (1994)
14. Kinoshita, K. and Gelvoin, H.V. β -Glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo- α -pyrene-glucuronide and binding to DNA. Science 199: 307-309 (1978)
15. Han, M.J., Im, H.-Y. and Kim, D.-H. Rapid detection of growth factors of intestinal lactic acid bacteria. Kor. J. Food Hygiene 8: 91-95 (1993)

(2000년 6월 7일 접수)