J. Fd Hyg. Safety 13(1), 20 - 23(1998)

재배상황버섯의 장내세균 유해효소 및 알파글루코시다제 저해효과

김동현† · 최혁재 · 배은아* · 한명주* · 박순영**
*경희대학교 약학과, *식품영양학과, **의학대학*

Effect of Artificially Cultured *Phellinus linteus* on Harmful Intestinal Bacterial Enzymes and Rat Intestinal α-glucosidases

Dong-Huyn Kim†, Hyuk-Jae Choi, Eun-Ah Bae*, Myung Joo Han* and Soon-Young Park**
College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea
**Department of Foods and Nutrition, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea*
***College of Medicine, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea*

ABSTRACT—The objective of this study was to evaluate the bifidogenic effect and α-glucosidase inhibitory effect of artificially cultured *Phellinus linteus*. The water extract of *P. linteus* promoted the growth of *Bifidobacterium breve* as well as the decrease of final pH in the media culturing intestinal bacteria. The growth of lactic acid bacteria inhibited effectively the bacterial enzymes, β-glucosidase, β-glucuronidase and tryptophanase, of intestinal bactetria. The water extract of *P. linteus* inhibited maltase, sucrase and α-amylase of rat intestine.

Key words □ Bifidogenic factor, α-glucosidase, Intestinal bacteria, *Phellinus linteus*

사람의 건강에 일생동안 영향을 미치는 것 중의 하나가 장내 세균이며, 사람의 장내에는 약 100종류, 100조 이상의 세균이 서식하고 있다.[1] 사람의 장내에 서식하는 장내 세균에는 사람의 건강을 지켜주는 유용균과 나쁜 영향을 주는 유해균이 있으며 이들 양자의 균형에 의하여 건강 상태가 조절되고 있다. 유용균의 대표적인 것이 Bifidobacterium과 lactobacillus이며 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 장내 세균은 섭취하는 음식물, 생활환경, 스트레스에 의해 영향을 받으며 질병의 발생과는 밀접한 관계가 있다. 예를 들면, 육류를 많이 섭취하는 서양인들은 채소류를 많이 섭취하는 동양인들보다 대장암 발생이 높다. 그러나 서양인 중에서도 핀란드인의 경우는 육류의 섭취가 많은 데도 대장암의 발생이 현저히 낮았으며 그 이유는 요구르트의 섭취 때문이라고 보고하고 있다. 즉, 육류의 섭취가 많으면 육류중의 지방 또는 단백질이 장내세균의 β-glucuronidase나 tryptophanase 등을 유도시키는 반면에 유산균은 이들효소의 생산성을 억제하는 것으로 보고하고 있다.[6,7]

이와 같이 장내의 환경에 의해 변화되기 쉬운 장내 우세균인 비피더스균주를 장내 우세균 상태로 계속 유지시켜준다면 비피더스균은 장내에서 유산 및 초산을 생성하여 장내의 pH를 산성으로 유지시키고 부패성 세균의 증식을 억제하는 역할을 할 것이다. 따라서 장내의 환경은 신체를 유해 세균의 작용으로부터 방어할 수 있다.[8,9] 한편, 대표적인 성인병인 당뇨병 역시 장내균총에 영향을 미쳐 유산균인 Bifidobacterium의 균수를 감소시키고 *Clostridum perfringens* 또는 Bacteroides속 균주가 증가하는 것으로 알려져있다.[10] 이러한 당뇨병에 한방에서는 옛부터 상황을 사용해오고 있다.

따라서 최근 새로이 재배가 가능케 된 상황버섯에 대해 인슐린 비의존형인 당뇨병에 사용되는 acarbose[11]와 같이 *in vitro*에서 알파글루코시다제를 저해시키고 장내유산균을 증가시켜 장내환경을 개선시킬 수 있는지에 대하여 조사하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

재배상황버섯은 금사버섯농원에서 구입하여 사용하였으며, General Anaerobic Medium(GAM), GAM(-glucose), BL 배지는 日水製藥사(일본)에서 구입하여 사용하였으며, PYF 배지는 Mitsuoka법[10]에 따라 조제하였으며, lactulose, p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl β-D-glucuronide, tryptophan, p-dimethylaminophenylaldehyde, pyridoxal 5-phosphate, starch azure, glucose oxidase, peroxidase 등은 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였다. 기타 배지는 Difco사(미국)에서 구입하여 사용하였다.

버섯시료의 추출

잘말린 상황버섯 150 g에 증류수 1 *l*를 가하여 80°C 수욕상에서 8시간 동안 추출한 후 여과하고, 다시 잔사에 증류수 0.5 *l*를 가하여 4시간 동안 추출한 후 여과하여 얻은 수층을 앞에서 얻은 물추출물과 합했다(0.9 L). 이 물추출액를 유산균 증식효과를 측정하기 위한 재료로 사용하였다.

유산균 증식효과 측정

GAM배지 10 m*l*에 버섯 추출물을 0.5% 또는 1%을 가하여 멸균한 후 *Bifidobacterium breve* JCM 1192를 접종하고, 37°C에서 20시간 배양하여 탁도를 측정하였다. 대조물질로서는 lactulose를 사용하였다.

장내유해효소의 활성 측정[12,13]

GAM배지 10 m*l*에 버섯 추출물을 0.5% 또는 1%을 가하여 멸균한 후 사람(건강한 잡식성 20대 한국사람) 또는 흰쥐의(Wistar, male, 200 g) 장내세균총으로써 신선한 분변 또는 *Bifidobacterium breve* JCM 1192를 접종하고, 37°C에서 20시간 혐기적 조건(80% N_2, 10% CO_2 및 10% H_2를 함유한 anaerobic box; Coy Lab Product, inc.)에서 배양한 후에 배지의 pH 및 효소활성(β-glucosidase, β-glucuronidase 및 tryptophanase)을 측정하였다. 대조물질로서는 lactulose를 사용하였다.

β-Glucosidase효소활성은 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0) 0.3 m*l*에 2 mM p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside 0.2 m*l*, 효소액 0.1 m*l*를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH 0.4 m*l*을 가해 반응을 종료시키고 증류수 1ml를 가하여 원심분리(2000×g, 20 min.)한 후 상등액으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β-Glucuronidase 효소활성 측정은 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0) 0.38 ml에 10 mM p-nitrophenyl β-D-glucuronide 0.02 m*l*, 효소액 0.1 m*l*를 가하여 37°C에서 한 시간 반응시키고 0.5 N NaOH 0.5 m*l*를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1 m*l*를 가하여 원심분리(2000×g, 20 min)한 후 상등액으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tryptophanase 효소활성은 complete reaction mixture(0.1 M bicine(pH 8.0), 4% pyridoxal 5-phosphate, 20% bovine serum albumin) 0.2 m*l*, 0.02 M tryptophan 0.2 m*l* 및 효소액 0.1 m*l*을 가하여 37°C에서 30분 반응시키고 color reagent (p-dimethylaminobenzaldehyde 14.7 g, 95% ethanol 948 m*l*, C-H_2SO_4 52 m*l*) 2 m*l*을 가하여 반응을 종료 시킨 후 원심분리(2000×g, 10 min)하고 상등액으로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

흰쥐 장관효소의 활성 측정[11]

효소액의 조제는 흰쥐(Wistar, 웅성 200 g)를 하룻밤 절식시키고 치사한 후 십이지장을 제외한 소장관 전체를 적출하고 얼음에 냉각시킨후 생리식염수로 2회 세척하였다. 이것을 반으로 갈라 소장관 안쪽을 slide glass로 긁어서 점막층을 모은 후 10배량의 10 mM 인산 완충액(pH 7.0)을 가하고 여기에 0.5% trition X-100을 첨가하여 초음파처리한후 원심분리(20,000×g, 30 min)한 후 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Maltase 효소활성측정은 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0), 2 mM maltose 0.1 m*l*, 효소액 0.1 m*l*, 증류수(또는 재배상황버섯의 추출물) 0.1 m*l* 를 첨가하여 37°C에서 40분간 배양한 후 수욕상(90°C)에서 10분간 처리한 후 원심분리(2000×g, 10 min)하여 얻은 상등액 0.1 m*l*에 OPD액(O-phenylenediamine 5 mg, reddish peroxidase 0.5 mg, glucose oxidase 35 unit를 100 m*l*에 넣어 조제한 액) 0.75 m*l*을 넣고 30분간 37°C에서 배양한후 0.1 N HCl 0.5 m*l*를 넣고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sucrase효소활성측정은 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0), 2 mM maltose 0.1 m*l*, 효소액 0.1 m*l*, 증류수(또는 재배상황버섯의 추출물) 0.1 m*l*를 첨가하여 37°C에서 40분간 배양한 후 수욕상(90°C)에서 10분간 처리한 후 원심분리(2000×g, 10 min)하여 얻은 상등액 0.1 m*l*에 OPD액 0.75 m*l*을 넣고 30분간 37°C에서 배양한후 0.1 N HCl 0.5 m*l*를 넣고 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

α-Amylase효소활성측정은 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0) 0.35 m*l*, 1% starch azure 0.35 m*l*, 효소액 0.1 m*l*, 증류수(또는 재배상황버섯의 추출물) 0.2 m*l*를 넣어 37°C에서 1시간 배양한후 0.1 N HCl 0.5 m*l*을 넣어 원심분리한후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

재배상황버섯이 알파글루코시다제의 저해에 미치는 효과

Acarbose는 최근 개발되어 사용되고있는 대표적인 알파글루코시다제의 저해제이다. 한방에서는 이러한 목적으로 사용되는 대표적인 것이 백간잠 및 상황버섯이다. 그래서 알파글루코시다제인 maltase, sucrase 및 알파아밀라제에 대한 저해효과를 측정하였다(Table 1). 그 결과 기존에 민간에서 이용되고있는 영지버섯과 비교해서 maltase나 sucrase를 효과적으로 저해하였다. 그러나 알파아밀라제는 영지버섯과 비슷한 저해효과를 나타냈다. 지금 의약품으로 사용중인 acarbose는 0.2 mg/ml에서 90% 이상 maltase 및 sucrase를 저해하였다. 한편 백간잠에서의 알파글루코시다제의 저해성분으로 nojirimycin의 유도체가 분리되었으며, 상백피에서도 비슷한 성분인 지방산의 nojirimycin의 유도체가 분리되었다. 이러한 점을 감안해본다면, 재배상황버섯은 acarbose보다는 약하지만 재배상황버섯이 알파글루코시다제를 효과적으로 저해하였으며 이러한 작용이 기대되는 성분으로는 역시 nojirimycin의 유도체에 기인된 것으로 추정된다.

Table 1. Inhibitory effect of *P. linteus* on rat intestinal α-glucosidases

	Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)		
		Maltase	Sucrase	α-Amylase
Control	0	0	0	0
P. linteus	0.2	8±0.4	96±0.2	36±0.4
	2	73±1.7	100	56±1.5
G. lucidum	0.2	4±0.3	1±0.6	19±0.9
	2.0	25±1.4	27±0.4	96±1.6
Acarbose	0.2	92±1.8	94±1.3	89±0.7
	2.0	99±0.7	100	96±1.4

All values represent Mean±S.D.

재배상황버섯이 유산균의 증식에 미치는 효과

상황버섯에 대하여 *Bifidobacterium breve*균주를 배양하면서 유산균증식 및 배지의 pH저하효과를 측정하였다(Table 2). 상황버섯을 배지에 0.5%을 첨가한 경우 대조군에 비교해서 1.22배의 증식효과를 나타냈으며 배지의 pH는 대조군보다 0.3 더 저하되었다. 1% 첨가한 경우에는 1.31배의 증식효과를 나타냈으며 배지의 pH는 0.5 더 저하되었다. 이것은 유산균증식제로 알려진 lactulose보다는 약하지만 우수한 효과라 생각된다. 한편 한등은 장내유산균총의 배양시 배지의 pH의 저하와 유산균의 증식은 상관관계를 갖는다는 보고를 하였다.[14]

이러한 결과로 미루어 보면, 버섯을 먹을 경우 장내의 pH를 저하시키고 장내 내산성균인 유산균을 선택적으로 증식시킬 수 있을 것으로 기대되며, 그외에도 장내 총균수를 약간 증식시켜 통변효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

재배상황버섯이 장내세균의 효소활성에 미치는 효과

재배상황버섯를 함유한 배지에서 배양시 장내세균총의 유해효소활성에 미치는 효과를 측정하였다(Table 3). 먼저 장내세균총을 배양한 후 배지의 pH를 조사한 결과 사람의 장내세균총인 경우는 대조군과 비교해서 0.4가 더 낮아졌으며 흰쥐의 장내세균총인 경우에는 0.6이 더 낮아졌다. β-

Table 2. The final pH of the medium cultured *B. breve* and effect of *P. linteus* on the growth of *B. breve*

	Concentration (%)	pH	Growth
Control	0	5.2±0.05	100[1)]±5.5
P. linteus	0.5	4.9±0.12*	122±4.8*
	1.0	4.7±0.07*	131±5.2*
Lactulose	0.5	4.42±0.06*	128±3.8*
	1.0	4.25±0.15*	140±2.6*

All values represent Mean±S.D.
1): Growth of the control group was taken as 100%.
*: Significantly different from the control group ($p<0.05$).

Table 3. Effect on *P. linteus* on the productivity of harmful enzymes of intestinal microflora of human and rats

	Concn (%)	Inhibition of rat microflora enzyme (%)			Inhibition of human microflora enzyme (%)		
		β-glucosidase	β-glucuronidase	tryptophanase	β-glucosidase	β-glucuronidase	tryptophanase
Control	0	0	0	0	0	0	0
P. linteus	0.5	16±2.8	25±5.2	65±6.9	17±6.2	24±5.5	72±4.2
	1.0	63±10.5	30±5.7	96±8.0	57±9.3	51±5.8	94±2.1
Lactulose	0.5	1±0.4	78±4.3	78±4.3	43±7.2	78±6.3	37±3.2
	1.0	2±0.6	93±5.8	73±2.8	45±5.7	73±5.2	53±8.9

All values represent Mean±S.D.

Glucosidase 효소 활성을 측정한 결과, 현재 장내 pH 저하제로 사용하는 lactulose와 비교해서 사람의 장내세균총에서는 비슷한 결과를 나타냈으나 흰쥐의 장내세균총에 대해서는 현저히 우수한 저해효과를 나타냈다. 장내세균의 효소중 대장암의 발생과 밀접한 상관관계를 가지고 있는 β-glucuronidase를 보면 사람의 장내세균의 효소는 재배상황버섯를 배지에 첨가한 경우 lactulose보다는 약하지만 대조군과 비교해서는 사람의 장내세균총과 흰쥐의 장내세균총을 이식한 모든 경우에 약 30%의 저해효과를 나타냈다. 이외에 방광암 등의 발암물질인 인돌의 생성에 관여하는 tryptophanase 효소 활성을 측정한 결과 사람의 장내균총의 효소를 억제하는 것은 재배상황버섯를 배지에 첨가한 경우 lactulose와 유사하거나 더 우수한 결과를 나타냈다. 이미 저자등은 시중에서 식용으로 이용되는 버섯중에서는 표고버섯이 유산균증식효과가 우수하다고 보고한 바있다.[15] 이 표고버섯과 비교해볼 때 비슷한 효과를 나타냈다. 그러나 이 표고버섯과 비교해볼 때 재배상황버섯은 알파글루코시다제의 저해효과가 우수하였다. 이러한 면에서 재배상황버섯은 장내 미생물의 효소중 대장암 등의 원인으로 생각되어지는 β-glucuronidase및 tryptophanase효소활성을 억제시키고 장관막의 알파글루코시다제효소활성을 저해시킬수있다는 점에서 대장암 및 당뇨병등에 효과가 기대되는 식품으로써 개발이 가능할 것으로 생각된다.

국문요약

재배상황버섯의 유산균 증식 효과를 측정한 결과 *B. breve*에 대한 증식 효과와 배양배지의 pH 저하 효과가 우수했다. 사람 및 흰쥐의 장내 세균을 버섯추출물 함유 배지에서 배양시 배지의 pH 저하 효과가 우수할뿐만아니라 β-glucosidase의 효소 활성을 억제하였다. 그외에도 대장암 및 방광암 등의 원인효소로 주목되고있는 사람 및 흰쥐의 장내 세균총 효소인 β-glucuronidase 및 tryptophanase 효소 활성을 억제하였다. 이외에도 인슐린 비의존형 당뇨병의 치료제로 사용되는 acarbose보다는 약하지만 maltase, sucrase 및 알파아밀라제를 효과적으로 저해하였다.

참고문헌

1. Mitsuoka, T.: Intestinal bacteriology, Mitsuoka, T. ed, Asakurashyoten pp. 33-149 (1990).
2. 김동현: 한방약물과 장내미생물. 김동현저 신일상사. pp. 145-163 (1993).
3. 백영진: 유산균과 건강. 한국식품영양학회지. **6**, 53-65 (1993).
4. 강국희, 허경택: 비피더스균과 올리고당. 유한문화사. pp. 25-27 (1994).
5. Hill, M.J., Drasar, B.S., Aries, V., Crowther, J., Hawksesworth, 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. 김동현, 한명주: 유산균에의한 장내미생물효소의 저해. 약학회지 **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. 김동현, 한명주: 성인병과 장내세균 신일상사 51-57 (1997).
11. Mueller, L.: Chemistry, biochemistry and therapeutic potential of microbial -glucosidase inhibitors in Novel microbial products for medicine and agriculture. (edited by Demain *et al.*) Elsevier press Amsterdam 109-116 (1989).
12. Kim, D.-H., Kang, H.-J., Kim, S.-W. and Kobashi, K.: pH-Inducible β-glucosidase and β-glucosidase 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. 한명주, 임혜영, 김동현: 장내유산균 증식인자의 신속한 검색. 한국식품위생학회지 **8**, 91-95 (1993).
15. 한명주, 배은아, 이영경, 김동현: 버섯의 장내유산균 증식효과. 한국식품과학회지 **28**, 947-952 (1996).