

바이오짐의 에탄올 대사에 대한 영향

남석우 · 박승희 · 윤성필¹ · 서동완 · 남태균 · 홍성렬¹ · 이항우*

성균관대학교 약학과, ¹유전공학과

Effects of Biozyme on the Ethanol Metabolism *in vivo* and *in vitro*

Suk Woo NAM, Seung Hee PARK, Sungpil YOON¹, Dong Wan SEO, Tae Kyun NAM, Sungyool HONG¹ and Hyang Woo LEE*

Department of Pharmacy and Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received May 29, 1995; accepted June 12, 1995)

Abstract—Effects of Biozyme® and Business® on alcohol metabolism in rats, and on the activities of alcohol dehydrogenase(ADH) and acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) were studied *in vitro*. Alcohol concentration in rat blood was decreased after the treatment of Business(3.3 ml/kg, Biozyme 1.67 mg/ml) and Biozyme(3.3 ml/kg, 1.67 mg/ml) prior to the administration of ethanol(25%, 0.83 g/kg). And the acetaldehyde concentration of rat blood was also decreased when compared with control values in the same condition. Effects of Biozyme on ADH and ALDH activity were also studied. While the ALDH activity was elevated in the presence of Biozyme(2 µg/assay), the ADH activity was not influenced by Biozyme at the concentration range from 2 µg/assay to 0.2 mg/assay. In summary, Biozyme accelerated the rate of ethanol metabolism and the acceleration might be due to the increase in ALDH activity.

Keywords □ Biozyme, ethanol, acetaldehyde, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase

에틸 알콜의 체내동태를 간략히 살펴보면 생체 내에서는 간내 효소에 의한 산화반응을 통해 acetaldehyde 및 acetic acid가 된다. 이 acetic acid의 약 90%는 직접 H₂O와 CO₂로 되며, 약 10%는 TCA cycle에 의해 H₂O와 CO₂로 된다. 이때 acetaldehyde가 체내에서 원활한 배설이 이루어지지 못해 축적 현상이 일어나 이로 인한 오심, 두통, 구토, 혈압저하, 빈맥, 쇼크 등 여러 가지 증상이 발현된다. 구체적인 알콜의 생체내 대사를 살펴보면 에탄올은 세 가지 효소계에 의하여 아세트알데히드로 대사 된다. 이러한 세 가지 효소계는 에탄올의 80~90%를 대사 시키는 alcohol dehydrogenase(ADH)를 비롯하여 peroxisomal catalase 및 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)를 말한다. 생성된 아세트알데히드는 aldehyde dehydrogenase에 의하여 acetate로 변하여 대사가 완료된다. 에탄올에 의한 급성독성은 에탄올, 아세트알데히드 및 에탄올 대사산물의 변형 생성물질 등에 기인한다고 보고되어있다(Bunsel 과 Leh-

mann, 1980). 알콜 섭취 후 혈중 에탄올 농도를 낮추는 것은 음주에 의한 급성 중독상태에 머무는 시간을 단축 시키는데 실제적인 중요성이 있다(Rogers *et al.*, 1987). 음주시 혈중 에탄올 농도의 조절은 크게 나누어 에탄올의 흡수(absorption)와 제거(elimination) 단계로 나눌 수 있다.

음주 전 음식 섭취는 에탄올의 흡수를 느리게 할 것이라는 상식을 뒷받침하는 시험결과가 보고되었다(Smith와 Newman, 1959). 그 후 fructose가 혈중 에탄올 제거에 효과가 있다는 보고(Lundquist와 Wolthers, 1958)가 있어 음식물 섭취가 에탄올의 흡수뿐만 아니라 제거에도 영향을 미친다는 것이 밝혀졌으며, Rogers 등(1987)에 의하여 이러한 효과는 fructose에만 국한되는 것이 아니라, 탄수화물의 종류를 가리지 않고 유사한 효과를 나타낸다는 사실이 알려지게 되었다. 이 발표를 입증하기 위한 실험 결과로서 glucose도 혈중 에탄올 농도를 낮춘다는 보고가 나오게 되었다(Mascord *et al.*, 1988).

한편 NAD의 원활한 공급이 ADH의 활성 발현에 필

* To whom correspondence should be addressed.

수적이라는 데는 이론의 여지가 없으며, 세포내 NAD 생성을 촉진하는 shuttle system으로는 glycerol-3-phosphate shuttle 과 aspartate- malate shuttle system이 알려져 있다. 이외에 thiamine(Dalvi *et al.*, 1974), ascorbic acid(Bunsel과 Lehmann, 1980), riboflavin(Satanovskaya *et al.*, 1981) 등이 에탄올 또는 아세트 알데히드의 혈중농도 저하를 가져올 수 있다는 보고들이 있다.

본 실험에서는 *Bacillus subtilis natto* sp.를 식물 추출물 배지로 하여 배양 후 단백질분해효소에 의해 고분자 물질을 절단하여 얻은 발효액 (상품명: Biozyme, 바이오짐) 및 그것을 주성분으로 한 비지니스(상품명)가 탯드의 에탄올 대사에 미치는 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

시험 물질로서 일본생물과학연구소에서 제조한 바이오짐과 조선무약 합자회사에서 제조한 바이오짐 포함 제품인 비지니스를 사용하였으며, 음성 대조로는 물(생수)을 사용하였다.

Alcohol dehydrogenase 와 aldehyde dehydrogenase 는 Sigma 사로부터 구입하였으며, 기타의 시약은 시판 특급을 사용하였다.

시험 동물 및 사육 환경

시험구역은 성균관대학교 약학연구소 GLP(Good Laboratory Practice) room에서 실시하였으며, SD계 웅성 랫드를 구입하여 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 형광등 명암 12 hr cycle, 배기 10~18회/hr, 조도 300~500 Lux의 사육 환경에서 폴리카보네이트 사육케이지(280W × 420L × 170H mm)에 4마리씩 넣어 사육하였으며 1주일간의 순화 사육후 실험에 사용하였다. 사료는 삼양사료 주식회사의 실험동물사료를 자유로이 공급하였으며, 음용수는 멸균수도를물을 자유롭게 섭취시켰다.

군 분리 및 투여방법

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균 체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였다.

동물의 개체 식별은 사육 상자별 tag 표시법을 사용하였다.

에탄올 투여군을 대조군으로 하고 비지니스와 에탄올 투여군, 바이오짐과 에탄올 투여군으로 나누었으며, 각각의 군별 개체수를 혈중 에탄올 농도의 측정시에는 n=6으로, 혈중 아세트알데히드 농도의 측정시에는 n=5로 하였다.

에탄올은 0.83 g/kg 용량이 되도록 음용수에 희석하여 25% 수용액으로 투여하였고, 비지니스는 시판품을 3.33 ml/kg(비지니스 1.0 ml/당 바이오짐 1.67 mg 함유)의 용량으로 투여하였으며, 바이오짐은 음용수 100 ml에 167

mg이 함유(바이오짐 1.67 mg/ml)되도록 조제한 수용액을 3.33 ml/kg 투여 하였으며 음성 대조군에는 동일 용량의 음용수를 투여 하였다. 투여 경로는 경구로 하였다.

채혈

알콜 투여 전 30분, 투여 후 30분, 60분, 90분, 120분, 4시간, 8시간, 16시간 후에 에테르로 마취시켜 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 혈중 에탄올 및 아세트알데히드의 양을 측정하였다.

혈중 에탄올 농도 측정

혈액 1.5 ml을 채혈하여 Eppendorf 시험관에 넣고 마개를 하여 실온에서 한시간 동안 방치한 후 1,500 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하고 냉장보관하였다. 채혈 다음날 혈액 중의 알콜 농도를 TDx REA Ethanol Reagent(Abbott Laboratories, U.S.A.)를 사용하여 Abbott TDx analyzer 에서 측정하였다.

혈중 알콜 측정방법의 원리는 에탄올을 NAD와 함께 alcohol dehydrogenase로 산화시키면 NAD는 NADH로 환원되고 생성된 NADH 와 monotetrazolium(MTT)을 diaphorase 로 반응시키면 NADH는 NAD로 되며, MTT는 형광을 띤 MT-Formazan 으로 변한다. 이를 표준곡선을 작성하여 에탄올의 농도와 형광도간의 상관관계를 확립한 후, 미지의 혈중 에탄올 농도를 산정하였다.

혈액중 아세트알데히드 농도 측정

혈액 1 ml에 제단백을 위해 냉각한 0.6 M perchloric acid in 0.15 M sodium chloride 4 ml를 가하여 즉시 혼합한 후 2,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 냉각된 시험관에 취하여 시료로 사용하였으며, 분석시까지 -20°C에 보관하였다.

상등액 4 ml에 dinitrophenylhydrazine 시약(DNPH 1 mg/ml in 6 N HCl) 100 μl , 3 M sodium acetate 2 ml, 내부 표준 물질로 crotonaldehyde 20 μl , 그리고 isoocetane 3 ml를 가하고 20분간 진탕한 후 상등액 2 ml을 취하였다. 질소 가스를 주입하면서 60°C에서 증발 건조시켜 그 잔사를 65%(v/v) acetonitrile 300 μl 에 녹여 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 5 μm ODS column(25 cm × 4.6 mm i.d.)을 사용하였고 이동상으로는 65% (v/v) acetonitrile 을 1.2 ml/min의 유속으로 흘렸으며, 시료 20 μl 를 주입하였다. 검출기는 356 nm UV absorbance detector를 사용하였고 a.u.f.s.는 0.01이었다.

시험관내 에탄올 대사 효소의 활성에 대한 바이오짐의 영향

Alcohol dehydrogenase(ADH) 의 활성도 변화

시험관에 1.81 ml의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 20 μl 의 50 mM NAD^+ 와 20 μl 의 바이오짐을 함유하거나 함유하지 않은 반응액을 37°C에서 2분간 반응시킨후 50 μl 의 ADH(0.15 unit/assay)를 넣고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 ADH의 기질로 17.2 mM 에탄올 100 μl 를 가한 후 340 nm에서 3분간 흡광도를

측정하였다.

Aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성도 변화

시험관에 1.81 ml의 50 mM sodium pyrophosphate buffer(pH 8.8), 20 μl의 50 mM NAD⁺와 20 μl의 바이오짐을 함유하거나 함유하지 않은 반응액을 37°C에서 2 분간 반응시킨 후 50 μl의 ALDH(0.3 unit/assay)를 넣고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 ALDH의 기질로 100 mM 아세트알데히드 100 μl를 가한 후 340 nm에서 3분간 흡광도를 측정하였다.

실험결과

혈중 에탄올 농도 변화에 대한 바이오짐의 효과

시험군과 대조군 모두 혈중 에탄올 농도가 알콜 투여 30분 후에 최고에 도달하였으며, 대조군에 비해 바이오짐 투여군이 30분 후부터 전체 측정 시간대에서 혈중 알콜농도가 낮게 나타났다(Fig. 1). 대조군의 혈중 알콜농도를 100으로 하였을 때 알콜 투여 2시간 경과후 가장 큰 감소 효과(대조군: 49.10±5.20 mg/dl, 시험군: 25.90±7.16 mg/dl, 47% 감소)를 나타내었으며, 30분, 60분, 90분, 120분 경과 후 시험군의 혈중 알콜 농도는 대조군에 비하여 각각 24%, 31%, 12%, 47% 감소하였다. 한편 AUC(area under the curve)로 비교하여 보면 바이오짐 투여군의 혈중 알콜 농도는 대조군에 비해 39%가 저하되어 현저한 알콜 농도 감소 효과를 나타내었다.

혈중 에탄올 농도 변화에 대한 비지니스의 효과

시험군과 대조군 모두 혈중 에탄올 농도가 알콜 투여 30분 후에 최고에 도달하여 Tmax는 투여후 30분이었다. 대조군에 비해 비지니스 투여군이 30분 후부터 전체 측정 시간대에서 혈중 알콜농도가 낮게 나타났다(Fig. 2). 특히 투여 30분 경과후 대조군의 알콜 농도(101.03±10.54 mg/dl)에 비해 시험군의 알콜 농도(59.48±11.56 mg/dl)는 유의성 있는 감소를 나타내었다. 대조군의 혈중 알

콜농도를 100으로 하였을 때 알콜 투여 60분 경과후 가장 큰 감소 효과(대조군: 83.70±11.80 mg/dl, 시험군: 45.12±6.63 mg/dl, 47% 감소)를 나타내었으며, 알콜 투여 30분, 60분, 90분, 120분 경과 후 시험군의 혈중 알콜 농도는 대조군에 비하여 각각 42%, 47%, 18%, 9% 감소하였다. 한편 AUC로 비교하여 보면 비지니스 투여군의 혈중 알콜 농도는 대조군에 비해 30%가 저하되어 현저한 알콜 농도 감소 효과를 나타내었다.

혈중 아세트알데히드 농도 변화에 대한 바이오짐의 효과

시험군과 대조군 모두 혈중 아세트 알데히드 농도가 알콜 투여 60분 후 최고에 도달하였으며, 대조군에 비해 바이오짐 투여군이 30분 후부터 전체 측정 시간대에서 혈중 아세트알데히드 농도가 낮게 나타났다(Fig. 3). 특히 투여 60분 후의 바이오짐 투여군의 혈중 아세트알데히드의 농도(3.96±0.07 nmol/ml)가 대조군(6.45±0.64 nmol/ml)에 비해 유의성 있는 감소(39%)를 나타내었다. 대조군의 혈중 아세트알데히드 농도를 100으로 하였을

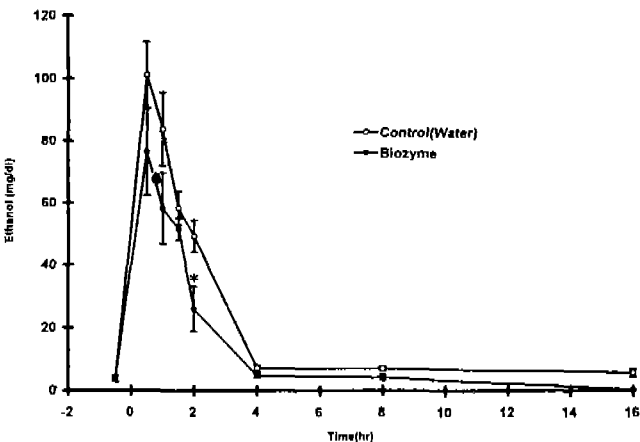


Fig. 1. Effect of Biozyme on the concentration of ethanol in rat blood. (*statistical significance p<0.05, n=5)

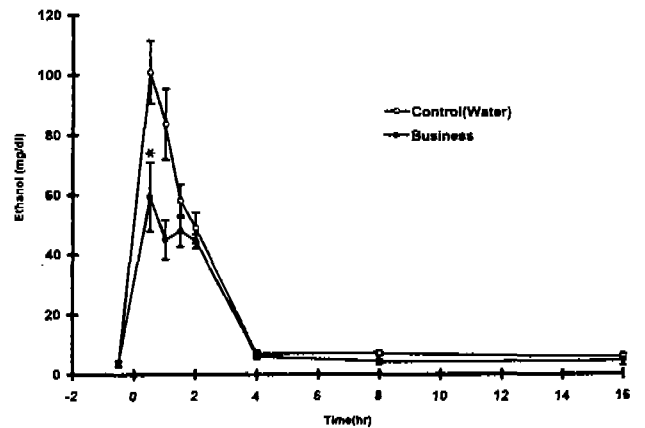


Fig. 2. Effect of Business on the concentration of ethanol in rat blood. (*statistical significance p<0.05, n=5)

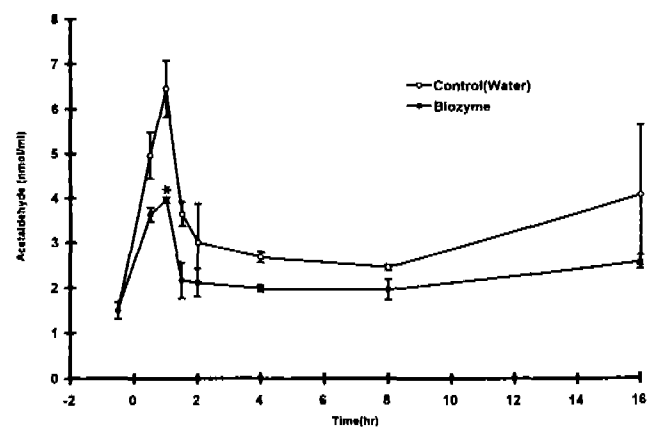


Fig. 3. Effect of Biozyme on the concentration of acetaldehyde in rat blood. (*statistical significance p<0.05, n=5)

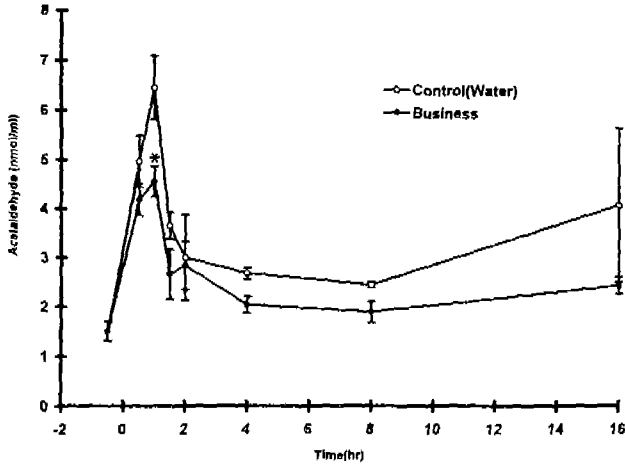


Fig. 4. Effect of Business on the concentration of acetaldehyde in rat blood. (*statistical significance $p < 0.05$, $n = 5$)

때 알콜 투여 30분, 60분, 90분, 120분 경과 후 시험군의 혈중 아세트알데히드 농도는 대조군에 비하여 각각 26%, 39%, 41%, 30% 감소하였다. 한편 AUC로 비교하여 보면 바이오짐 투여군의 혈중 아세트알데히드 농도는 대조군에 비해 48%가 저하되어 현저한 아세트알데히드 농도 감소 효과를 나타내었다.

혈중 아세트알데히드 농도 변화에 대한 비지니스의 효과

시험군과 대조군 모두 혈중 아세트알데히드 농도가 알콜 투여 60분 후에 최고에 도달하였으며, 대조군에 비해 비지니스 투여군이 30분 후부터 전체 측정 시간대에서 혈중 아세트알데히드 농도가 낮게 나타났다(Fig. 4). 투여 60분 후의 비지니스 투여군의 혈중 아세트알데히드의 농도(4.56 ± 0.51 nmol/ml)가 대조군(6.45 ± 0.64 nmol/ml)에 비해 유의성 있는 감소(29%)를 나타내었다. 대조군의 혈중 아세트알데히드 농도를 100으로 하였을 때 알콜 투여 30분, 60분, 90분, 120분 경과 후 시험군의 혈중 아세트알데히드 농도는 대조군에 비하여 각각 16%, 29%, 27%, 5% 감소하였다. 한편 AUC로 비교하여 보면 비지니스 투여군의 혈중 아세트알데히드 농도는 대조군에 비해 35%가 저하되어 현저한 아세트알데히드 농도 감소 효과를 나타내었다.

시험관내 에탄올 대사 효소에 대한 바이오짐의 효과

시험관내에서 aldehyde dehydrogenase(1.5 unit/assay)의 효소 활성에 대한 바이오짐의 효과를 관찰하고자 바이오짐 (2.0 μ g/assay) 존재하에 효소 활성에 대한 영향을 관찰하였다. 반응 초기부터 효소 활성의 증가를 보였으며, 반응후 5분 후에 최대 약 14%의 효소활성 증가를 보였으며(Fig. 5), 그 작용이 10분 후까지 지속(11% 증가)되며 이는 바이오짐이 aldehyde dehydrogenase의 효소 활성을 증강시키는 것으로 사료된다.

그러나, alcohol dehydrogenase의 효소 활성에 대해

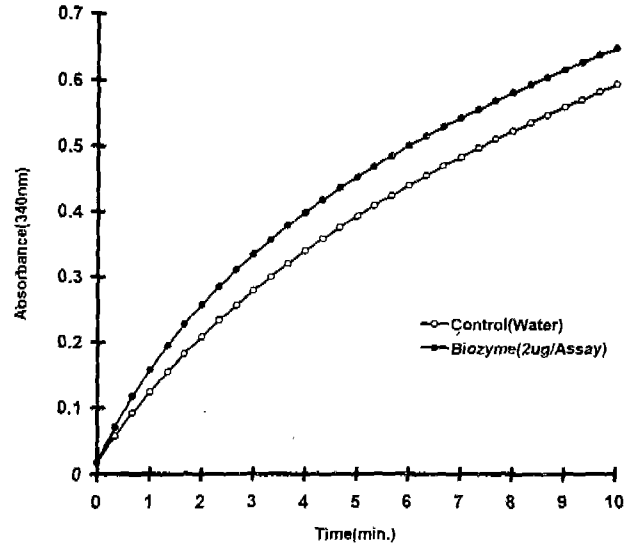


Fig. 5. Effect of Biozyme on the activity of acetaldehyde dehydrogenase.

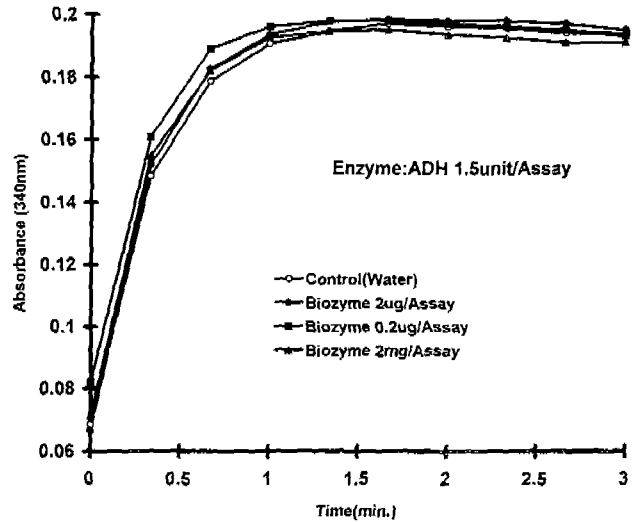


Fig. 6. Effect of Biozyme on the activity of alcohol dehydrogenase.

서는 바이오짐의 양을 2.0 μ g/assay 부터 2 mg/assay로 증가시켜도 효소 활성에는 변화가 없었다(Fig. 6).

고 찰

랫드의 에탄올 대사에 대한 바이오짐 및 비지니스의 효과를 알아보려고 알콜 섭취후 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 혈중 함량 변화를 측정하고 시험관내 에탄올 대사 효소에 대한 바이오짐의 효과에 대한 실험을 실시하였다.

시험관내 에탄올 대사 효소에 대한 바이오짐의 효과를 검색해본 결과 바이오짐이 aldehyde dehydrogenase 의

활성을 최대 14% 증가시키는 것으로보아 바이오짐이 혈중 아세트알데히드의 대사에 관여하는 생체내 효소계를 활성화시킴으로써 아세트알데히드의 대사 및 배설에 효과적이라고 사료된다.

비지니스 투여시 알콜만을 섭취한 대조군에 비해 혈중 에탄올 농도를 비교한 결과 Tmax는 30분이었으며, 알콜 투여 60분 경과후 가장 큰 감소 효과를 나타내었으며, 30분 후에도 42%의 혈중 에탄올 농도의 감소 효과를 나타내었다. 또한 바이오짐 투여시 혈중 에탄올 농도가 알콜 투여 2시간 경과후 가장 큰 감소 효과를 나타내었으며, 투여 60분과 2시간 후에 대조군에 비해 31%, 47% 감소하였다. 이로부터, 비지니스 및 바이오짐이 음주후 상승된 혈중 에탄올 농도를 감소시키는 것으로 사료된다.

또한, 혈중 아세트알데히드에 대한 비지니스 및 바이오짐의 영향을 관찰하였다. 비지니스 투여시 투여 60분 후의 비지니스 투여군의 혈중 아세트알데히드의 농도가 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 알콜 투여 90분 경과 후 시험군의 혈중 아세트알데히드 농도는 대조군에 비하여 27% 감소하는 효과를 나타내었다.

한편, 바이오짐 투여시에는 투여 60분 후의 바이오짐 투여군의 혈중 아세트알데히드의 농도가 대조군에 비해 유의성 있는 감소(39%)를 나타내었으며, 알콜 투여 90분 경과 후 시험군의 혈중 아세트알데히드 농도는 41% 감소하였다.

이로부터, 비지니스 및 바이오짐이 음주후 상승된 혈중 아세트알데히드의 농도에 대해 감소 효과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 비지니스 및 바이오짐은 음주후 상승된 혈중 에탄올의 혈중 농도를 감소시키는 효과가 있으며, 특히 아세트알데히드의 혈중 농도를 감소시키는 효과를 나타내었다.

바이오짐 및 비지니스는 생체의 에탄올 및 아세트알데히드의 대사에 밀접한 연관성을 가지리라 추정되는데, 결과로부터 추정해 볼때 비지니스의 및 바이오짐은 알콜 대사과정에 있어 첫 단계인 에탄올의 대사 및 배설을 효과적으로 증가시키는 작용이 있으며, 이차적 산물이며 독성을 일으키는 주요 원인 물질들 중의 하나인 혈중 아세트알데히드의 분해 및 제거에 효과를 나타낸다고 사료된다.

바이오짐은 thiamine, riboflavin, niacinamide, ascorbic acid, pantothenic acid 등의 비타민들과, 아미노산, 탄수화물 및 유기산, 핵산의 염기들(adenine, guanine, cytosine, thymine), AMP, 탄수화물과 lipoic acid 등으로 구성되어 있는 복잡한 혼합물이다. 구성 비타민류는 에탄올 또는 에탄올 대사물질인 알데히드와 아세트산의

혈액 중 소멸을 촉진시킨다고 보고된(Dalvi *et al.*, 1974; Bunsel과 Lehmann, 1980; Chernikevich *et al.*, 1993; Satanovskaya *et al.*, 1981) 비타민의 종류가 포함되어 있다. 이중 thiamine 은 hepatic microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)을 증강시킴으로서 알콜대사를 촉진한다는것이 (Takabe and Itokawa, 1983) 알려졌고, Sicsic 등은 AMP가 에탄올 대사의 주 효소인 ADH의 cofactor 작용을 도움으로서 에탄올 산화를 촉진시킨다고 보고하였다(Sicsic *et al.*, 1984). 그러므로, 비지니스 및 바이오짐의 에탄올 대사와 아세트알데히드 대사에 대한 효과는 각기 다른 작용기전을 갖는 바이오짐의 구성 생리활성 물질들의 협동 또는 복합작용의 결과라고 사료되며, 관여하는 정확한 메카니즘을 규명하기 위해서는 구성성분들 각각에 대한 시험관내, 생체내 실험이 수반되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bunsel, R. G. and Lehmann, A. G. (1980). Antagonistic effect of sodium ascorbate on ethanol-induced changes in swimming of mice. *Behavioural Brain Research* **1**, 351-356.
- Dalvi, R. R., Sauberlich, H. E. and Neal, R. A. (1974). An examination of the metabolism of thiamine by rat liver alcohol dehydrogenase. *J. Nutr.* **104**, 1476-83.
- Lundquist, F. and Wolthers, H. (1958). The influence of fructose on the kinetics of alcohol elimination in man. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* **14**, 290-294.
- Mascord, D., Smith, J., Stramer, G. A. and Whitfield, J. B. (1988). Effect of oral glucose on the rate of metabolism of ethanol humans. *Alcohol and Alcoholism* **23**, 365-370.
- Rogers, J., Smith, J., Stramer, G. A. and Whitefield, J. B. Differing effects of carbohydrate, fat and protein on the rate of ethanol metabolism. (1987). *Alcohol and Alcoholism* **22**, 345-353.
- Satanovskaya, V. I., Ostrovsky, Y. M. and Sadovnik, M. N. (1981) The liver alcohol, - and aldehyde dehydrogenases of rats with chronic alcohol intoxication after riboflavin administration. *Substance and Alcohol Action/Misuse* **2**, 149-152.
- Sicsic, S., Durand, P., Langrene, S. and le Goffic, F. (1984). A new approach for using cofactor dependent enzymes: example of alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **176**, 321-30.
- Smith, M. E. and Newman, H. W. (1959). The rate of ethanol metabolism in fed and fasting animals. *J. Biol. Chem.* **234**, 1544-1549.
- Takabe, M. and Itokawa, Y. (1983) Thiamine Depletion after Ethanol and Acetaldehyde Administration to Rabbits. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **29**, 509-514