

## 플라보노이드배당체에 의한 *Bacteroides* JY-6의 $\beta$ -글루코시다제 및 $\alpha$ -람노시다제의 유도

장일성 · 박종백 · 김동현\*

경희대학교 약학대학

(Received December 28, 1995)

### Induction of $\beta$ -Glucosidase and $\alpha$ -Rhamnosidase of *Bacteroides* JY-6 by Flavonoid Glycosides

Il-Sung Jang, Jong-Baek Park and Dong-Hyun Kim\*

College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract**—Optimal medium for growth and glycosidases production of *Bacteroides* JY-6, an human intestinal bacterium, was general anaerobic medium or tryptic soy broth containing sodium thioglycolate and ascorbic acid. By cocultivation of *Staphylococcus* R-48, *Bacteroides* JY-6 could be cultured in LB broth unable to culture JY-6. Heated *Staphylococcus* R-48 was also the inducer of the production of *Bacteroides* JY-6 glycosidases. These glycosidases were induced well by natural flavonoid glycosides, such as poncirin, naringin and rutin, but were not by synthetic substrates, p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside and p-nitrophenyl  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside.

**Keywords** □ Flavonoid glycoside, intestinal bacteria, *Bacteroides* JY-6,  $\alpha$ -rhamnosidase,  $\beta$ -glucosidase.

경구투여되는 천연의 약리활성 물질들은 소화관으로 들어오면 필연적으로 장내에 상주하는 세균총과 접하게 된다. 이때 장내세균들은 천연약물의 대사에 관여하여 원화합물의 약효를 상실시키거나 약효를 발현시키기도 하며 경우에 따라서는 독성물질로 전환시키기도 한다.<sup>1,2)</sup>

우리나라에서 많이 사용되고 있는 한방약물들은 플라보노이드성분을 다량 함유하고 있으며 장내세균의 대사를 쉽게 받는다. 이러한 flavonoid화합물들의 대부분은 glucose, galactose, rhamnose등을 가지고 있는 glycoside형태로 존재하고 있으며, 이 배당체들은 배당체형태로는 위나 소장에서 거의 흡수되지 못하고 대부분이 장내세균의 가수분해를 받아 비당체로 전환된다.<sup>3,4)</sup>

저자들은 naringin 및 poncirin (5,7-dihydroxy-

4'-methoxy flavanone 7-rhamnoglucoside)이 조직 중에서는 대부분이 대사되지 않고 장내세균에 의해 대사됨을 보고한바 있다.<sup>5)</sup> 또한, 사람의 장내세균으로부터 이러한 배당체의 대사에 관여하는 *Bacteroides* JY-6균주를 분리하였고, poncirin과 naringin의 대사과정을 비교한 결과, 두 물질은  $\alpha$ -rhamnosidase 및  $\beta$ -glucosidase의 작용에 의해 각각의 monoglucoside인 중간체를 경유하여 비당체로 대사되었으며, 이 대사체들 사이에서도 서로 전환됨을 밝혔다.<sup>6)</sup> 이러한 대사과정은 사람에 따라 상당한 차이가 있으나, 장내세균에서의 균의 종류 및 균수의 변화는 거의 없다. 이러한 결과는 균의 종류나 균수의 변화보다는 균내의 효소의 유도 정도에 따라 천연약물의 대사에 차이를 나타내는 것으로 생각된다. 이러한 것에 대한 연구는 한방약물의 약효 발현과정을 이해하는데 중요한 요소라고 생각됨에도 불구하고 연구는 거의 되어있지 못하다.

저자는 여기에서 한방약물성분인 배당체를 사용하여

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-961-0374 (팩스) 02-966-3885

사람의 장내 우세미생물인 *Bacteroides* JY-6균주의  $\beta$ -glucosidase 및  $\alpha$ -rhamnosidase의 유도양식을 조사하였다.

## 실험방법

### 시약

Naringin, sodium thioglycolate, ascorbic acid, L-cysteine, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, urea는 Sigma Chem. Co. (U.S.A.)로부터 구입하였으며, Brain heart infusion broth(BHI), tryptic soy broth(TS), muller hinton broth(MN), yeast extract를 비롯한 배지는 Difco Co. (U.S.A.)로부터 구입하였으며, general anaerobic medium(GAM)은 (株)日水製藥(日本)으로부터 구입하였다. Aucubin과 poncirin은 본 실험실에서 분리한 것을 사용하였다.

### 사용균주의 분리 및 배양

한국의 20대 건강한 잠식성 남성의 신선한 분변으로부터 김의 방법<sup>7)</sup>에 따라 장내세균총에서 분리한 *Bacteroides* JY-6균주와 *Staphylococcus* R-48균주를 받고 형 GAM배지에서 하룻밤 배양한 후 사용하였다.

### 배지의 선정

*Bacteroides* JY-6균주를 GAM, BHI, MH, LB, TS 배지에 1%이식하여 24시간 배양했을 경우, TS배지에 환원제를 첨가하였을 경우, 그리고 배지의 pH를 3.0에서 11.0까지 조정된 경우에 대해 집균하여 균의 발육 정도와 효소 생산성을 조사하였다.

### *Staphylococcus* R-48과 동시배양시 효소유도시험

500 ml의 LB배지에 각각 JY-6균주, *Staphylococcus* R-48 균주 또는 JY-6균주와 *Staphylococcus* R-48을 동시 이식하고 72시간동안 균의 성장과 효소활성을 측정하였다. 이때 이식한 균의 양은 1%였다.

### 기질 및 *Staphylococcus* R-48의 추출물에 의한 효소의 유도

Rutin, poncirin, naringin, aucubin, cellobiose, maltose, PNR, PNG등을 배지에 첨가한 후 JY-6균주를 24시간 배양하여 효소 활성을 측정하였으며,

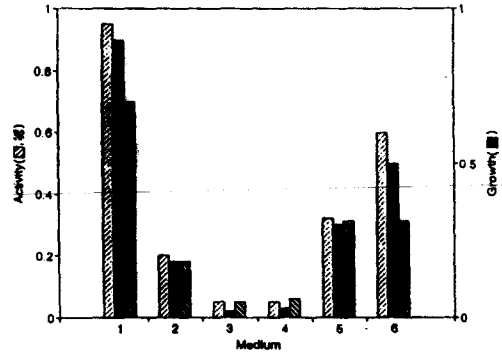


Fig. 1—Growth and glycosidases productions of *Bacteroides* JY-6 cultured in several commercial media: 1, GAM; 2, BHI; 3, LB; 4, MN; 5, TS; 6, TS+ascorbic acid+ sod. thioglycolate. ▨,  $\beta$ -glucosidase; ■,  $\beta$ -rhamnosidase; ■, growth.

naringin을 농도별로 첨가하여 경시적으로 균의 성장과 효소의 활성을 측정하였다.

### 효소 활성 측정<sup>8-10)</sup>

**$\alpha$ -L-Rhamnosidase 효소** - 2 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (PNR) 0.1 ml, 20 mM 인산완충액(pH 7.0) 0.3 ml, 효소액 0.1 ml를 넣어 30분간 37°C에서 배양한 후 0.2 N-NaOH 0.5 ml로 반응을 정지시켰다. 반응정지액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**$\beta$ -Glucosidase 효소** - 2 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -glucopyranoside (PNG) 0.1 ml, 20 mM 인산완충액(pH 7.0) 0.3 ml, 효소액 0.1 ml를 넣어 30분간 37°C에서 배양한 후 0.2N-NaOH 0.5 ml로 반응을 정지시켰다. 반응정지액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Urease 효소** - 5 M urea 0.05 ml, 효소액 0.1 ml를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨후 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시킨후 indophenol법으로 측정하였다. 그외의 실험은 위의 효소실험에서와 같이 실시하였다.

## 결과 및 고찰

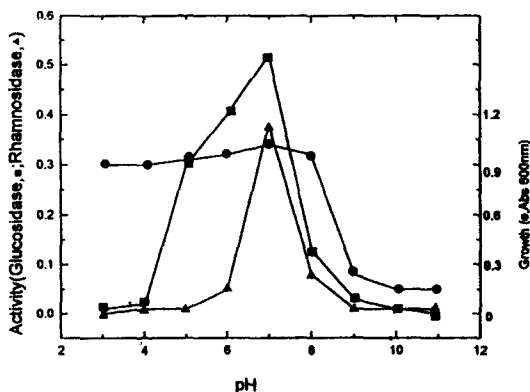
### 최적배지

*Bacteroides* JY-6균주는 실험에 사용한 배지중에서 혐기성균의 배양이 가능한 배지인 GAM, BHI배지에서 성장이 우수했다(Fig. 1). 환원제에 의한 영향을 조사하기위해 *Bacteroides*가 잘 자라지않는 TS배지에 환

**Table I**— Effect of antioxidant on growth activities of glucosidases of *Bacteroides* JY-6

Compounds <sup>1)</sup>			Growth	Activity	
Sod. thioglycolate	Cysteine	Ascorbic acid		$\beta$ -Glucosidase	$\alpha$ -Rhamnosidase
○ <sup>1)</sup>	○	○	+++	++	++
○	○	×	++	+	+
○	×	○	++++	+++	+++
×	○	○	+++	+	+
×	×	×	+	+	+

1.5% was added in TS broth 2. was not added.  
 +++++, very strong; +++, strong; ++, weak; +, very weak.

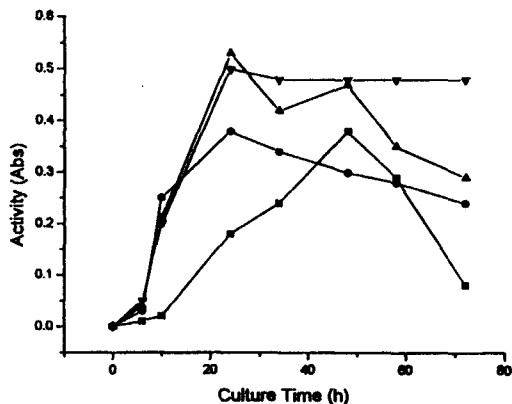


**Fig. 2**— Induction of *Bacteroides* JY-6 by medium-pH: JY-6 was cultured in the TSR media of various pHs: ■,  $\beta$ -glucosidase; ▲,  $\alpha$ -rhamnosidase; ●, growth.

원제를 첨가한 후 균의 성장과 효소활성을 조사하였다 (Table I). 환원제를 첨가한 배지에서 JY-6균주는 대체로 잘 자랐으며, 그중에서는 ascorbic acid를 첨가한 경우가 성장이 우수했다. 그러나, 효소활성의 생산성은 sodium thioglycolate를 첨가한 경우가 우수한 효과를 나타냈다. 그래서 여기에서 효소의 생산성을 조사하기 위한 배지로는 TS배지에 sodium thioglycolate와 ascorbic acid를 첨가한 배지(TSR)를 사용하였다.

**pH에 의한 효소유도**

배지의 pH가 효소생산성에 미치는 효과를 측정하여 결과를 Fig. 2에 나타냈다. *Bacteroides* JY-6의 성장은 산성과 중성부근의 pH에서는 대체로 잘 성장하였으나 pH 8.5이상에서는 성장이 거의 이루어지지 않았다. JY-6 균주의 성장과  $\beta$ -glucosidase의 생산성은 산성 내지 중성에서 우수했다. 그러나,  $\alpha$ -rhamnosidase의 생산성은 pH 7 부근에서 최대치를 나타냈으며 pH 7에서의 생산성은 pH 6에서의 생산성에 비해서 약 4배였



**Fig. 3**— By cocultivation of *Bacteroides* JY-6 and *Staphylococcus* R-48, the enzyme production of these bacteria. JY produces  $\beta$ -glucosidase (▲) and  $\alpha$ -rhamnosidase (■). R-48 produces  $\alpha$ -glucosidase (●) and urease (◆). Total growth,

다. 이러한 것은 장내의 pH에 따라  $\alpha$ -rhamnosidase의 생산성이 변화할 수 있으며 특히 산성의 pH를 갖고 있는 사람들에게서  $\alpha$ -rhamnosidase에 의한 대사는 약할 것으로 생각되며 사람에 따라 rhamnose당을 갖고있는 배당체 함유 천연약물의 약효발현에 상당한 차이가 있을 것으로 사료된다.

**Staphylococcus R-48 균주와 동시배양시 효소유도**

LB배지에 *Bacteroides* JY-6 균주를 단독배양하면 거의 성장이 되지 않으며  $\beta$ -glucosidase의 생산도 거의 되지 않는다. 그러나 LB배지에서 *Staphylococcus* R-48 균주는 성장이 잘 되며, 이 균주가 생산하는  $\beta$ -glucosidase나 urease도 생산이 잘 된다. 그래서 *Bacteroides* JY-6와 *Staphylococcus* R-48을 동시에 이식시키고 *Bacteroides*의 성장과 *Bacteroides*의  $\beta$ -glucosidase 및  $\alpha$ -rhamnosidase의 생산성을 측정했다 (Fig. 3). 동시에 두 균주를 이식한 경우 맨먼저 *Sta-*

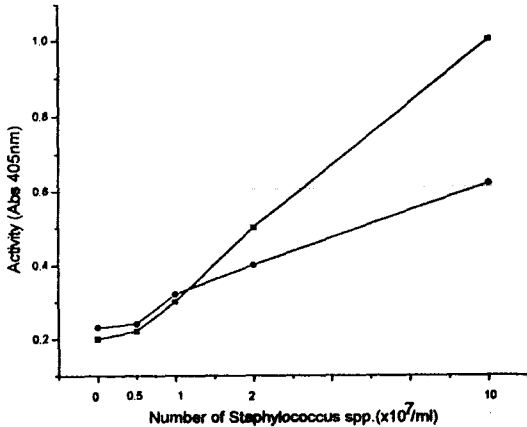


Fig. 4—Induction of β-glucosidase (●) and α-rhamnosidase (■) by the inactivated *Staphylococcus* R-48. *Staphylococcus* R-48 was sterilized at 121°C for 20 min. The sterilized R-48 was added in the medium and JY-6 was inoculated and cultured.

*phylococcus* R-48 균주의 성장이 이루어지면서 6시간이 후부터 *Bacteroides*의 균주의 시작이 이루어지고 18시간 이후에는 *Bacteroides* JY-6의 성장이 최대가 되고 동시에 효소의 생산성도 최대가 되고 있다. 이번에는 *Bacteroides* JY-6을 배양하는 배지에 사멸시킨 *Staphylococcus* R-48 균주를 첨가하여 배양하면 거의 성장이 이루어지지 않는다. 그러나, TSR배지에 사멸시킨 *Staphylococcus* R-48 균주를 첨가하여 배양하면서 효소의 생산성을 검토한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 효소의 생산성은 *Staphylococcus* R-48의 첨가량에 의존적으로 증가하였다. *Staphylococcus* R-48 균주를 ml 당 1×10<sup>8</sup>개 만큼 첨가한 경우 α-rhamnosidase의 효소는 약 5배정도 유도된 반면에 β-glucosidase는 약 3배 증가하였다. 이러한 결과는 *Staphylococcus* R-48 균주와 *Bacteroides* JY-6균주를 동시 배양하는 경우에 두 균주의 성장이 동시에 이루어지지 않고 먼저 *Staphylococcus*가 성장하면서 *Bacteroides*가 성장할 수 있는 조건, 즉 혐기성조건을 형성해줌으로써 성장이 이루어지고 있다고 생각된다. 아울러, *Staphylococcus*의 균체중에는 *Bacteroides*균주의 α-glucosidase와 β-rhamnosidase의 유도체가 함유하고 있어 이들 효소의 생산성을 증가시킬 뿐만아니라 성장을 돕고있다고 생각된다. 이러한 것에 관련된 것으로는 *Streptococcus*균주와 *Bacteroides*균주를 동시배양시 α-rhamnosidase의 유도가 이루어지고 있다고 보고하는 것<sup>11)</sup>도 이것과 유사

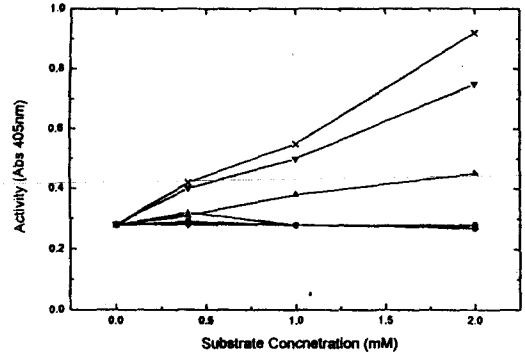


Fig. 5—Induction of JY-6 α-rhamnosidase by natural and artificial substrates: ×, poncirin; ▼, naringin; ▲, rutin; ■, aucubin; ◆, cellobiose; ●, maltose; +, p-nitrophenyl α-L-rhamnopyranoside.

한 결과로 생각된다.

**천연배당체에 의한 효소유도**

Rutin, poncirin, naringin, aucubin, maltose, cellobiose의 대부분이 2mM이상에서는 잘 녹지않기 때문에 2mM이하에서 glycosidases 유도효과를 측정하였다(Fig. 5). α-Rhamnosidase유도효과는 poncirin이 가장 우수했으며 2mM에서 약 4배의 유도효과가 있었다. 그 다음은 naringin, rutin의 순이었다. 그러나 cellobiose, maltose 및 aucubin은 효과가 없었다. 이러한 결과는 cellobiose, maltose 및 aucubin이 rhamnose 당을 갖고있는 배당체가 아니기 때문으로 생각된다.

아울러 이들 화합물이 β-glucosidase유도효과를 측정 한 결과, poncirin, naringin이 우수했으며 약 2배 정도의 유도효과를 보였다. Aucubin과 rutin은 약 1.5배의 유도를 보였다. 그외에 maltose와 cellobiose는 유도효과가 없었다. β-Glucosidase의 유도효과는 α-rhamnosidase유도효과에 비해 유도효과가 낮았으며, α-rhamnosidase의 유도효과는 없었던 aucubin이 효과를 보이는 것은 aucubin이 glucose 함유배당체이기 때문으로 생각된다.

한편, glycosidases의 합성기질을 이용하여 *Bacteroides*의 glycosidases의 유도효과를 측정하였다(Fig. 6). 합성기질인 p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside는 0.2 mM에서 0.5 mM사이에서 glucosidase효소를 약 12% 유도했으며 p-nitrophenyl β-L-rhamnopyranoside는 0.2 mM에서 약 α-rhamnosidase효소를 약 20%의 유도를 보였다. 그러나 그 이상

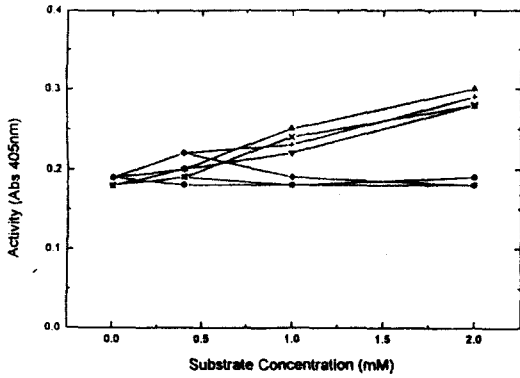


Fig. 6—Induction of JY-6  $\beta$ -glucosidase by natural and artificial substrates:▲, poncirin; +, naringin; ×, rutin; ▼, aucubin; ●, cellobiose; ■, maltose; ◆, p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside.

의 농도에서는 균의 성장을 억제하고 효소의 유도효과도 거의 없었다.

천연의 플라보노이드 배당체는 천연식품과 한방약물 중에 다량 함유하고 있으며, 우리가 늘 섭취하고있다. 그러므로 천연의 야채를 비롯한 한방약물들을 섭취하는 사람들에게서는 장내세균의 glycosidase는 늘 유도되고 있다고 생각된다. 이렇게 유도된 효소활성은 질병의 치료를 위해 한방약물을 복용할 경우 약효발현을 효율적으로 신속하게 발현시키고 있다고 생각된다.

결 론

*Bacteroides*JY-6균주에 대한 최적배지는 GAM배지와 sodium thioglycolate 및 ascorbic acid를 함유한 tryptic soy 배지였다. *Bacteroides*를 LB배지에서 배양하기 위해서는 *Staphylococcus*를 동시배양하게 되면 배양이 가능하며 아울러 여기에서 자라난 *Staphylococcus* R-48 균주의 사체는 *Bacteroides* JY-6의 glycosidases를 유도하였다.

*Bacteroides* JY-6균주의 glycosidases들은 합성기질에 의해서는 glycosidase가 거의 유도가 되지않으나 천연식품 또는 한방약물의 플라보노이드배당체 기질 등에 의해서는 유도가 높게 나타났다. 아울러 이들의 효소는 산성의 pH보다는 중성의 pH에서 유도가 잘 이루어졌다.

감사의 글

본연구는 1995년도 경희대학교 교내연구비에 의해

수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Kim, D. -H. : Metabolism of herbal medicines by human intestinal bacteria in *Herbal medicines and Intestinal bacteria*. pp- Shinil press (Seoul) (1993).
- 2) Drasar, B. S. and Hill, M. J. : Human intestinal flora 54-71 Academic press (New York) (1974).
- 3) Bokkenheuser, V. D., Shackleton, H. L. and Winter, J. : Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.* **248**, 953 (1987).
- 4) Hattori, M., Shu, Y.-Z., Tomimori, T., Kobashi, K. and Namba, T. : A bacterial cleavage of the C-glucosyl bond of mangiferin and bergenin. *Phytochemistry* **28**, 1289 (1989).
- 5) Yoon, W. -G., Hyun, S. -H., Kim, D. -H., Kim, N. -J. and Hong, N. -D. : Metabolism of poncirin by intestinal bacteria. *Yakhak Hoeji* **37**, 262 (1993).
- 6) Kim, D. -H., Jang, I. -S., Kim, N. -J. and Yoon, W. -G. : Metabolism of poncirin and naringin by human intestinal bacteria. *Yakhak Hoeji* **38**, 286 (1994).
- 7) Kim, D. -H. and Han, M. J. : Detection of  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -glucosidase producing alkalotolerant intestinal bacteria. *Yakhak Hoeji* **37**, 187 (1993).
- 8) Romero, C., Manjon, A., Bastida, J and Iborra, J. L. : A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry* **149**, 566 (1985).
- 9) Kim, D. -H., Kang, H. -J., Park, S. -H. and Kobashi, K. : Characterization of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase of alkalotolerant intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 423 (1994).
- 10) Okuda, I., and Fujii, S. : Spectrophotometric determination of blood ammonia. *Saishin Inkaku* **21**, 622 (1983).
- 11) Barker, S. A., Somers, P. J., Stacey, M. and Hop-ton, J. W. : Arrangement of the L-rhamnose units in *Diplococcus pneumoniae* type II polysaccharide. *Carbohydrate. Research* **1**, 106 (1965).