

부추 김치 우세 유산균의 항유전독성 효과와 항암 효과

육진영 · 권은혜 · 조규성 · 신현길* · 정구용¹

한동대학교 생명식품과학부 및 생명과학연구소

¹상지대학교 동물자원학부

서 론

각종 김치에는 항유전독성, 항암성을 띄는 물질이 존재하고 이는 김치에 존재하는 유산균^{(1),(2),(3)}에 의한다고 보고된다. 특히 부추김치에 존재하는 유산균은 다른 김치에서 분리한 유산균들에 비해서 그 효과가 뛰어난 것이 예비 실험을 통해 밝혀졌다. 그러나 이 균들이 실제적으로 어느 정도 항유전독성^{(4),(5)}이 효과나 항암효과^{(6),(7)}를 가지고 있는지 확실히 설명하기 위하여 특정 기능을 기준으로 하여 비교함으로써 결론을 내릴 필요가 있을 것이다. 여기에서는 각종 부추김치의 우세 균주들을 분리하여 이들 하나하나에 대한 항유전독성효과와 항암효능을 해석분석법 혹은 단일 세포 젤 전기영동법(comet assay, single cell gel electrophoresis)⁽⁸⁾으로 평가한다.

재료 및 방법

유산균, 세포주, 직접발암원

유산균은 재래시장에서 판매되는 부추김치의 즙액을 김치의 숙성전과 숙성후 2번에 걸쳐 채취하고 MRS 고체배지와 액체 배지를 이용해 단일 균주를 선별, 분리한다. 액체 배지에 배양된 균은 실험 당일에 10,000 rpm이 속도로 10분간 원심분리한 후, 상층액은 버리고 PBS 완충 용액으로 1번 세척한 후 HBSS(Hank's Balanced Salt solution)에 재현탁한다.

BALB/3T3 clone A31 세포는 항유전독성 효과 조사에 이용하고 CT-26 세포는 항암효과 조사에 이용하고 각각 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 세포배양액에 10%의 FBS, BCS를 첨가해 배양한다.

직접발암원 MNNG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)는 10mM PBS 완충 용액을 용매로 하여 45분간 sonication을 통해 녹인다.

Pre-coated agarose gel slide의 준비

10mM PBS 완충 용액에 녹아있는 0.5% normal melting point agarose(NMA) 용액을 fully frosted slide glass에 35 μ L 도포 후 건조시키고 다시 NMA 용액 75 μ L를 cover glass로 덮어 4 $^{\circ}$ C, 흡윤상태에서 보관한다.

시료의 세포처리

MNNG는 1 μ g, 유산균은 10⁹개가 HBSS 1mL에 들어가도록 하여 20°C에서 10분간 반응시켜 전처리 한 뒤, 준비된 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 씻어낸 후 세포에 처리한다.

Cell embedding and cell lysis

처리된 세포는 PBS 완충액으로 씻어내고 proteinase K(30 μ g/mL, 5.5unit/mg) 100 μ L 처리하여 세포들을 배양접시로부터 완전히 떨어뜨린 후 세포배양액을 가하여 세포들을 현탁하여 원심분리(1000rpm, 3min, 4°C)를 한다. 얻어진 세포 pellet은 세포배양액에 1 \times 10⁶ cells/ml로 재현탁하여 이용한다. 동시에 세포의 생존률 확인을 위해서 tryphan blue exclusion test를 실시한다.

처리구별 세포현탁액은 15 μ L를 향한 수조에서 40°C로 유지시킨 0.7% low melting point agarose(LMA) 용액 75 μ L에 현탁시키고, gel slide에 도포해, cover glass로 덮어 4°C에서 굳힌다. 5분 후, 세포가 깔린 slide gel 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L를 도포하여 cover glass를 덮어 10분간 굳힌다. 다음으로, alkali lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris, NaOH to pH 10.0, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 4°C에서 60분 동안 침수시켜 핵체만 제외하고 세포 내 모든 성분을 용해시킨다.

전기영동

60분 동안 lysis 용액에 침수시킨 모든 slide들은 electrophoresis buffer(0.3M NaOH and 1mM Na₂EDTA pH>12)에, DNA unwinding을 위해 20분간 둔다. 전기영동은 25V/300mA로 고정하여 20분간 실시한다. 전기영동 후, 각각의 slide들은 중화 완충 용액(Tris 0.4M, pH 7.5)으로 충분히 세척하고, 흡윤보관함에 보관한다.

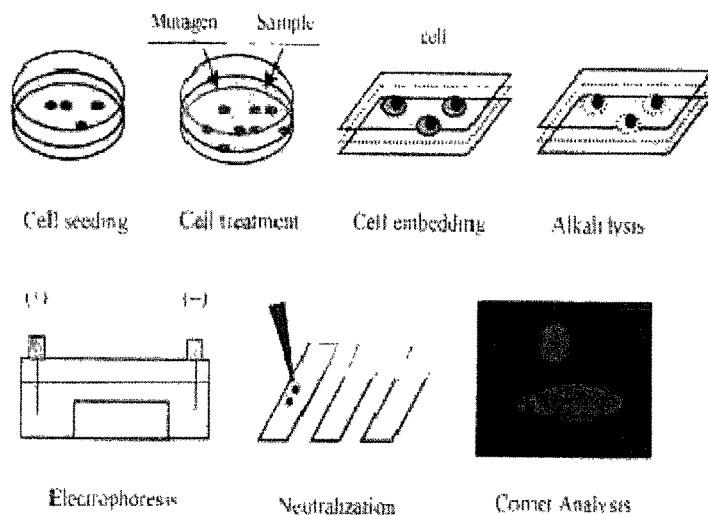


Fig. 1. Comet assay

항유전독성 효과 분석

보관된 slide는 30분 후에서 48시간 이내에 세포의 DNA 손상 정도를 살펴보기 위하여 형광염색시약(YOYO-1, 12.5uM/mL in PBS)로 염색하고, 형광현미경과 CCD camera를 통해 comet image를 관측해 Comet image analysing software 및 interface가 설치된 computer에서 분석한다. 각각의 세포핵에서 DNA 손상 정도는 slide 당 100개의 cell을 조사하여 점수를 주어 계산한다. (0은 전혀 손상을 입지 않음, 4 완전히 손상됨)

결과 및 고찰

부추김치에서 총 45종의 균종이 분리되었고 이 균주들에 대해 각각 분리한 시점과 배양 조건, 분리한 순서를 적용해서 임의의 이름을 부여하였다. 그리고 먼저 일부 균주에 대해 항유전독성 효과를 조사하였다.

Table 1의 결과를 보면 주로 호기성 상태에서 배양된 균주들에 있어서 직접 발암원만 처리된 대조구와 비교해서 유산균을 처리한 것에서 DNA 손상수치가 50% 전후로 줄어들고 있고 이로 인해 부추김치 유산균의 항유전독성이 높은 것을 알 수 있다. 혐기성 상태에서 배양되었던 균은 DNA의 손상수치

Table 1. Antigenotoxic effect of *Lactobacillus* spp. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

<i>Lactobacillus</i> . spp			DNA Damage	S.D		
Negative control			2	1		
Positive control			199	9		
Before fermentation	Aerobic	3	** 125	9		
		4	** 132	12		
		6	** 131	28		
		7	** 121	4		
		9	** 125	22		
		12	** 115	11		
		13	*** 111	7		
	Anaerobic	6	* 176	9		
		8	189	11		
		12	178	18		
		13	** 169	2		
		After fermentation	Aerobic	1	* 150	22
				6	* 153	22
7	117			23		
9	** 117			25		
10	* 123			18		
11	130			22		
12	** 107			5		

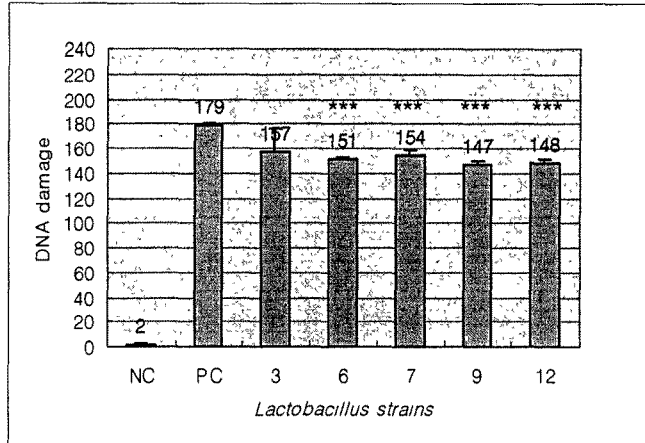


Fig. 2. Anticarcinogenic effect of *Lactobacillus* spp. *Lactobacillus* No. before fermentation. aerobic. 3,6,7,9,12 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

가 직접발암원만 처리된 대조구와 별 차이가 나지 않는다.

또한 이 균주 중 5종류를 선별해 다시 CT-26 세포를 이용해 항암효과를 조사했다. 그 결과는 Fig. 2와 같다. 항암효과에 대해서는 항유전독성효과 조사에서처럼 DNA 손상수치가 많이 줄어들지는 않지만 대체적으로 10% 정도의 손상 복구율을 보인다.

요 약

반복적인 실험을 통해 부추 김치에서 분리된 대부분의 유산균은 항유전독성 효과를 갖는 것으로 보인다. 이는 전에 시행되었던 각종 김치의 유산균을 이용한 항유전독성 효과 조사에서도 다른 김치 유산균에 비해서 부추김치의 유산균이 항유전독성효과가 높다는 것을 통해서도 증명되었다. 유산균 섭취시에 균주가 장내의 혐기성 상태에서 존재하게 되는데 아직까지는 혐기성 상태에서 배양된 균주의 항유전독성효과가 그다지 높지 않은 것으로 보여진다. 따라서 혐기성 상태에서 배양된 항유전독성 효과가 높은 균주를 찾는 것이 시급하다고 본다. 그러나 호기성 상태에서 배양된 항유전독성이 높은 균주들이 혐기성 상태에서도 배양되는 것을 확인하였고 이 균주들의 장내 생존 가능성을 예측할 수 있다. 물론 이를 뒷받침하기 위해서 이 유산균들이 위와 장내의 조건에서 생존가능하는지에 대해 pH 생존 조사를 해야 할 것이다. 또한 혐기성 상태에서 배양되었을 때에도 이 균주들이 항유전독성 효과가 있는지도 앞으로 실시되어야 할 과제일 것이다. 항유전독성 효과와 달리 항암효과에 대해서는 높은 효과를 보이지 않았지만 본래 CT-26 세포가 대장암 세포이기에 이 세포 자체의 DNA에 손상 복구율을 부여했다는 것에 의미를 둘 수 있겠다.

항유전독성효과와 항암효과가 있는 유산균의 분리를 통해 우리가 다음으로 해야 될 일은 첫째로 이 균주들에 대해 여러 가지 특성을 찾아 동정하고 둘째로 지금까지 밝혀진 결과를 *in vivo*상에서 검증하는 것이다. 지금까지 밝혀진 유산균은 대부분 발효 유제품에서 자라는 유산균인데 한국인이 주

로 섭취하는 각종 김치나 부추김치 등에서 분리한 균주에서도 이 기능이 있음을 밝힌다면 이들의 소비에 도움이 될 것이고 또한 이 균주들을 이용해 항유전독성, 항암성 등이 있는 기능성 제품을 만들어 낼 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Orrhage, K. et al. (1994) *Mutat. Research*, 311, 239-248
2. Zhang, X. B. et al. (1990) *J. Dairy. Sci.*, 73, 2702-2710
3. Zhang, X. B. et al. (1991) *J. Dairy. Sci.*, 74, 752-757
4. Pool-Zobel, B. L. et al. (1993) *Nutr. Cancer*, 20, 2610-270
5. Pool-Zobel, B. L. et al. (1996) *Nutr. Ccancer*, 26, 365-380
6. Bolognani, F. et al. (1997) *Food Chemk Toxicol.*, 35, 535-545
7. Burns, A. J. et al. (2000) *curr. Issutest. Microbiol.*, 1, 13-24
8. Tice, R.R. et al. (2000) *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 206-221