

김치에서 분리한 유산균과 starter를 첨가한 김치의 항암효과

양희진 · 황경아 · 황유진 · 이수원* · 이인선¹ · 박용하¹

성균관대학교 식품생명공학과

¹(주)프로바이오틱스 기술연구소

서 론

유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물로서 김치, 장류, 요구르트 등 각종 발효식품을 중심으로 인류생활에 광범위하게 이용되어오고 있다. 유산균은 probiotics로서 정장작용, 병원성 미생물 생육 억제효과⁽¹⁾, 항돌연변이 효과⁽²⁻³⁾, 항암효과⁽⁴⁾, 면역증강 효과⁽⁵⁾ 등의 다양한 생리적인 기능과 효능으로 오랫동안 연구가 계속 되어오고 있다. 그 중 김치는 우리나라 전통의 식품으로서 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 등의 유산균에 의해 발효된 식품이지만 요구르트와 같은 다른 발효 식품에 비해 probiotics로서의 역할에 대한 연구는 다소 미흡한 실정이다. 본 연구는 김치에서 분리한 유산균과 starter를 첨가하여 제조한 김치의 항암효과를 in vitro 에서 측정하고자 실시하였다.

재료 및 방법

세포배양

세포주들은 인체 각 기관 유래의 암세포인 A-427(lung), SK-HEP-1(liver), A-498(kidney), HeLa(uterine), WiDr(colon), MKN-45(stomach)를 사용하였고, 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용한 medium은 heat inactivation시킨 10%(v/v)의 FBS, 항생제(penicillin-100units/ml, streptomycin-100 μ g/ml), 10mM의 HEPES 및 20mM의 L-glutamine을 함유하고 pH 7.2로 조정된 DMEM, RPMI(Gibco/BRL, USA) culture medium을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 충분히 배양되어 90%정도 자랐을 때 계대 배양하며 사용하였다.

시료의 제조

실험에 이용한 시료는 (주)프로바이오틱스 기술연구소로부터 제공받아 사용하였다. 시료로는 김치에서 분리한 *Lactobacillus sakei* 와 *Leuconostoc mesenteroides*를 각각 배양해서 얻은 균체-1(W1), 균체-2(W2)와 이 두가지 균을 혼합 배양해서 얻은 균체-3(W3), 그리고

이들 균체의 파쇄액인 E1, E2, E3와 *Lactobacillus sakei*와 *Leuconostoc mesenteroides*를 starter로 첨가하여 제조한 김치의 김치액-1(K1), 김치액-2(K2)를 사용하였다.

김치액 시료는 starter를 첨가하여 제조한 김치의 액을 NaOH로 중화시킨 후 원심분리하여 상등액을 0.22 μ m filter로 여과시켜 사용하였고, 균체인 W1, W2, W3의 경우에는 MRS 배지에서 배양된 균체를 원심분리로 회수하고, PBS로 세척하여 배지성분을 제거한 후 이것을 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 열처리하여 사용하였다. 또한 균체 파쇄액 E1, E2, E3은 각각의 균체들을 각각 초음파분쇄기로 30분간 파쇄해서 원심분리한 후, 상등액을 회수하였다. 이것을 pH를 7로 조정 한 후, 0.22 μ m filter로 여과하여 실험에 이용하였다.

Cytotoxicity 측정

암세포주에 대한 시료의 cell mediated cytotoxicity를 측정하기 위하여 배양된 각 암세포주는 적정농도로 세포수를 조정하여 실험하였다. 96 well microplate에 적정농도로 분주한 암세포를 4시간 동안 전배양하여 plate 바닥에 부착시킨다. 배양을 마친 후, 배양에 사용된 medium을 제거하고 새로운 culture medium을 180 μ l와 각 시료를 농도별로 20 μ l를 넣어 well 부피를 200 μ l가 되도록 조절하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 MTT(5mg/ml) 용액을 10 μ l씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 그리고 배양배지를 조심스럽게 제거하고 formazan 결정을 부유시키기 위해 PBS buffer 100 μ l 와 20% SDS 용액을 50 μ l씩 분주하여 18시간 동안 발색시킨 후, ELISA microplate reader로 흡광도(540nm)를 측정하였다. 다음 식을 이용하여 암세포의 cytotoxicity를 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Sample O.D.} - \text{Control O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

결과 및 고찰

유산균과 김치액이 암세포에 미치는 영향에 대해서 관찰하기 위해 A427, SK-HEP-1, A498, HeLa, WiDr 및 MKN-45 등의 인체 유래의 암세포주를 이용하여 MTT assay로 세포독성을 측정하였다. 예비실험에서 김치액의 경우에는 고농도에서 세포독성을 나타내었으나 마우스의 splenocyte를 사용해 실험한 결과, 정상세포에서도 세포독성을 보이는 것으로 나타났다(data not shown). 이것은 시료의 농도에 의한 세포의 피사로 판단하여 본 실험에서는 시료의 농도를 1mg/ml 수준으로 적용하였다.

그림 1은 각 암세포주에 대한 유산균 시료의 세포독성을 나타낸 것이다. 전체적으로 볼 때 유산균 균체에 비해 균체를 초음파로 파쇄한 균체 파쇄액의 세포독성이 훨씬 높아 유산균 파쇄액이 암세포의 성장을 저해하는 능력을 가지고 있는 것을 관찰할 수 있었다.

균체 자체로는 실험에 사용한 모든 암세포에 있어서 10% 이내의 세포독성을 나타내어 실제로 암세포주 자체에는 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰 되었다.

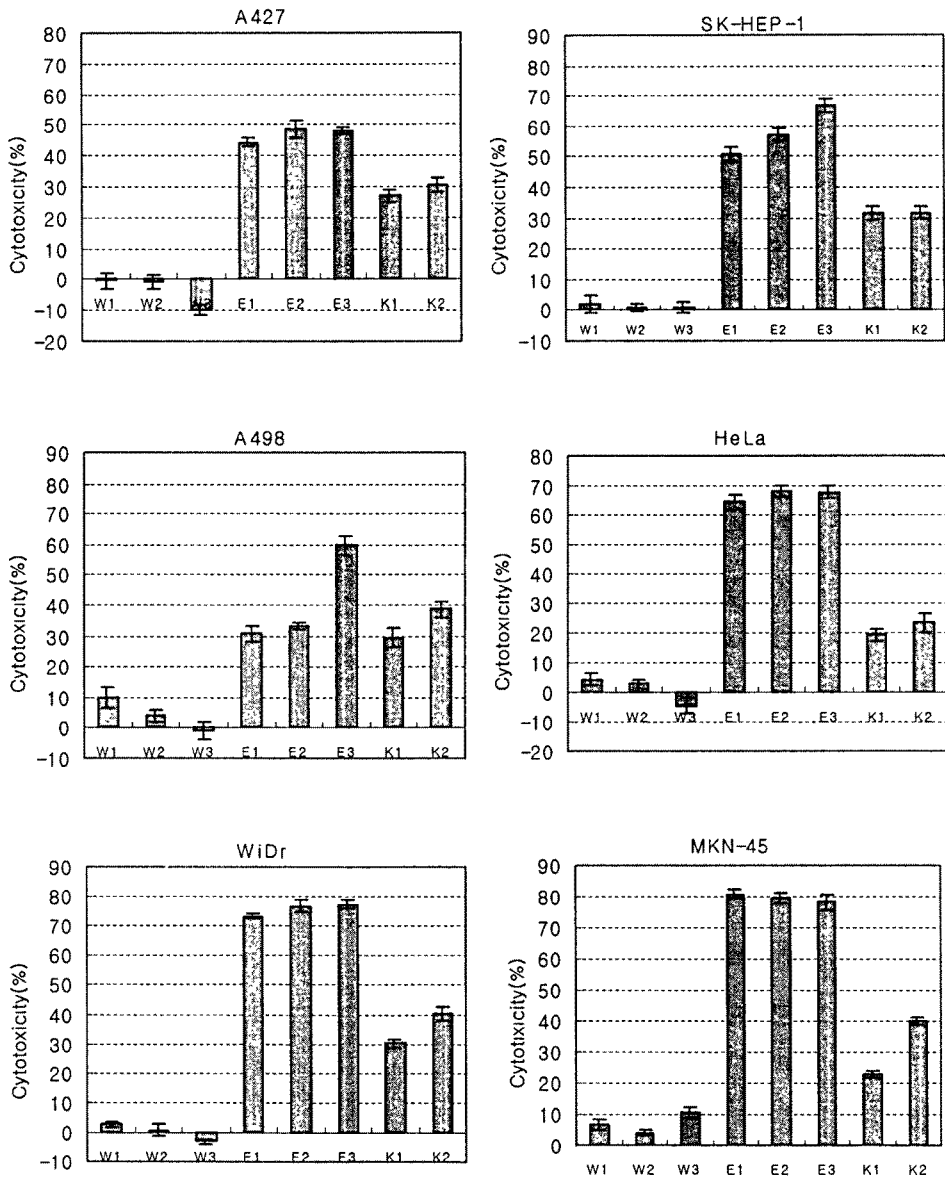


Fig. 1. Cytotoxicity of lactic acid bacteria samples on human cancer cell lines.

김치액의 경우에는 평균적으로 30~40% 정도의 세포독성을 보여주었고, K2가 K1에 비해 다소 높은 세포독성을 나타내어 첨가된 starter에 따라 약간의 차이를 나타내었다: 김치액은 유산균 뿐만 아니라 여러 가지의 양념 성분들이 포함되어 있어 암세포 저해효과가 유산균의 영향이라고 단정 짓기에는 다소 어려울 듯 싶다. 물론 starter에 따른 차이는 균의 종류에 따른 차이라고 판단을 할 수 있겠지만 김치 속의 양념 성분이 각각의 유산균 생육에 관계하여 유산균의 성장과 대사산물 생산에 영향을 미칠 수도 있고 양념 성분 자체가 세포

독성을 나타낼 수도 있기 때문이다. 그렇기 때문에 김치액이 암세포에 대한 저해효과를 나타내는 것이 직접적으로 무엇과 연관되는지에 관하여 확실히 설명하기에는 어려움이 있다.

유산균의 파쇄액의 경우에는 모든 암세포에서 50%이상의 세포독성을 나타내어 본 실험에서 암세포의 성장을 억제시키는데 가장 효과적인 것으로 나타났다. 특히, 대장암 세포인 WiDr과 위암세포인 MKN-45에서 70~80% 정도의 세포독성으로 암세포 성장 저해에 상당히 효과적으로 관찰되었다. 반면 폐암 세포인 A427의 결과에서는 세포독성의 50%정도로 다른 암세포주들에 비해 세포독성이 떨어지는 경향을 볼 수 있었다.

유산균의 종류에 따른 세포독성을 비교해보면, E1, E2, E3 등 균의 종류에 따른 세포독성 차이는 그리 크진 않지만 신장암인 A498 세포주에서는 혼합 균체 파쇄액인 E3가 각 균체들의 파쇄액보다 상대적으로 2배에 가까운 차이를 나타냈고 전반적으로도 약간 높은 경향을 보여주었다.

요 약

본 연구는 김치에서 분리한 유산균과 starter를 첨가하여 제조한 김치의 항암효과가 *in vitro* 상에서 어떻게 나타나는지 알기위해 실시하였다. 유산균의 균체 자체로는 모든 암세포에 있어서 세포독성을 거의 나타내지 못하였으며, 김치액의 경우는 평균적으로 30~40% 정도의 세포독성을 보여주었다. 김치액인 K2가 K1에 비하여 다소 높은 세포독성을 나타내어 첨가된 starter에 따라 약간의 차이를 보여주었다. 유산균의 파쇄액의 경우에는 모든 암세포에서 50%이상의 세포독성을 보였고 대장암 세포인 WiDr과 위암세포인 MKN-45에서 70~80% 정도의 세포독성으로 암세포 성장 저해에 상당히 효과적으로 관찰되었다. 유산균의 종류에 따른 세포독성을 비교해보면, 혼합 균체 파쇄액인 E3가 단일 균체 파쇄액보다 전반적으로 약간 높은 경향을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Aguirre, M. and Collins, M. D. (1993) *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 95-107.
2. Rhee, C. H. and Park, H. D. (1999) *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 15-22.
3. Park, K. Y. et al. (1995) *Food Biotechnol.*, 4, 141-145.
4. Choi, M. W. et al. (1997) *J. Food Sci. Nutr.*, 2, 241-245.
5. Tejada-Simon, M. V. and Pestka, J. J. (1999) *J. Food Prot.*, 62, 1435-1444.