

## Lactobacillus plantarum 균체 중 항보체 활성물질의 특성과 작용양식

김장현 · 신광순 · 이 호\*  
경기대학교 자연과학부 식품생물공학전공

### Characterization and Action Mode of Anti-Complementary Substance Prepared from *Lactobacillus plantarum*

Jang-Hyun Kim, Kwang-Soon Shin and Ho Lee\*  
Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Among 12 lactic acid bacteria examined for their abilities to activate the complement system by hemolytic complement assay (TCH<sub>50</sub>), *Lactobacillus plantarum* previously isolated from *Kimchi* showed high anti-complementary activity. The anti-complementary activity of the cell wall fraction of *L. plantarum* was more potent than that of the cytosol fraction, and both activities showed dose dependency. These high activities of the cytosol and the cell wall fractions were relatively resistant to the digestion with pronase, but sharply decreased after the treatment of NaIO<sub>4</sub>. These results suggested that the complement activation by the cytosol and the cell wall fractions was mainly due to their polysaccharides. By the cross-immunoelectrophoresis using anti-human C3, the C3 activation products from both fractions were identified in Ca<sup>++</sup>-free condition. Anti-complementary activity (ITCH<sub>50</sub>) of the cell wall fraction was retained under the same condition, whereas that of the cytosol fraction was reduced considerably. From these results, it was inferred that the mode of complement activation by the cell wall fraction was mainly *via* alternative pathway, and that of the cytosol fraction was *via* both alternative and classical pathways.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*, anti-complementary activity, classical pathway, alternative pathway

### 서 론

유산균은 오래 전부터 인간이 이용해 온 유익한 미생물의 한 종류로서 발효유제품과 된장, 간장 및 김치 등 전통 발효 식품에 있어 중요한 역할을 담당하고 있으며, 최근에는 의약품 및 사료 첨가제에 까지 광범위하게 활용되고 있다<sup>(1)</sup>. 유산균은 발효식품에 특유의 풍미와 우수한 보존성을 부여할 뿐만 아니라, 유당불내증의 완화작용, 정장작용, 병원성세균의 생육억제 작용, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 및 면역활성화 작용 등 많은 건강증진 효과를 갖는다고 보고되고 있다<sup>(2-5)</sup>. Bogdanov 등<sup>(6)</sup>에 의해 유산균이 암세포의 증식을 억제한다는 사실이 처음 밝혀지고, 암의 예방과 치료에 많은 관심이 집중되면서 유산균의 항암효과에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다<sup>(7-10)</sup>. Fernandes와 Shahani<sup>(11)</sup>는 유산균의 항암 효과에 관한 연구결과를 종합하여 항암효과를 다음 세가지 가능한 기작으로 정리하고 있다. 첫째, 섭취한 유산균에 의

해 장내 발암물질을 불활성화하거나 발암전구물질을 발암물질로 전환시키는 장내 유해세균들의 효소 활성을 저해함으로써 발암물질의 생성을 억제한다. 둘째, 숙주의 면역계를 자극 또는 증강시킴으로서 interferon 유도, 항체생성 및 세포성 면역활성화 등의 기작에 의해 항암 작용을 하는 것이며, 셋째 균체성분이 장내 발암물질을 흡착하여 장외로 배설됨으로써 항암효과를 나타낼 수 있다고 가정하고 있다.

유산균은 건강한 사람의 장내 미생물 생태계의 일부로 존재하며, 특이 및 비특이적 면역체계의 증강에 의해 숙주를 보호하여 준다고 알려져 있어 최근에는 유산균에 의한 면역증강 효과에 관한 연구가 많이 보고되고 있다<sup>(12-15)</sup>. Perdigon<sup>(12)</sup>은 유산균을 쥐에게 경구 혹은 복강 투여하였을 때 macrophage와 lymphocyte가 활성화되어 항암작용을 나타냈다고 보고하고 있으며, 또 다른 연구에서는 *L. acidophilus*의 비당지질 세포벽 성분이 macrophage에 의한 IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하였다고 발표한 바 있다<sup>(13)</sup>.

그러나 면역계의 활성화는 이를 구성하는 세포 및 액성 인자 개개의 활성화보다는 각 구성인자의 협동적 상호작용에 의해 전체 활성화가 진행되므로 위에 언급한 활성이 유산균체가 갖고 있는 전체 면역활성의 작용기구라고 설명하기는 상당히 어려운 점이 있다고 판단된다. 최근 들어 생체방어계

\*Corresponding author : Ho Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea  
Tel: 82-31-249-9653  
Fax: 82-31-249-9650  
E-mail: hlee@kyonggi.ac.kr

에서 중요한 역할을 담당하는 보체계(complement system)를 활성화하는 물질(항보체 활성물질)들이 생체의 면역 부전상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되고 있으며<sup>(16)</sup>, 이들은 보체계 등과 관련이 있는 면역계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>(17)</sup>. 특히 Okuda 등<sup>(18)</sup>은 항종양 활성과 serum hemolytic activity의 손실이 밀접한 관계가 있음을 입증하여 보체계 성분의 활성화가 항종양 작용에 관여함을 보고한 바 있으며, Ito 등<sup>(19)</sup>도 항종양 활성을 가진 다당을 이용하여 항종양 활성과 항보체 활성화간에 상관 관계가 있음을 보고하기도 하였다. 보체계는 C1에서 C9까지 9개의 보체성분과 조절인자 등 약 20여종의 혈중을 순환하는 단백질들로 구성되어 있으며, 외부감염 병원체 등을 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 파괴 제거하는 주 기능이외에도 면역계 전반에 걸쳐 중요한 역할을 담당하고 있는 생체의 주요 방어기구이다<sup>(20)</sup>. 보체의 활성화는 가장 중추적 역할을 하는 C3의 활성화 개시방법 및 반응의 증폭과정에 따라 classical pathway와 alternative pathway의 독립된 두 경로 이외에도 최근 알려진 lectin pathway가 존재한다고 알려져 있으며<sup>(21)</sup>, 최종적으로 활성화가 진행되면 외부에서 침입한 병원체의 lipid bilayer를 파괴함으로써 살균작용을 나타내게 된다. 특히, alternative pathway와 lectin pathway는 면역복합체(antigen-antibody complex)의 비존재 하에서 활성화가 진행되므로 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 방어기작으로 평가되고 있다<sup>(20)</sup>. 또한 보체계의 활성화는 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다<sup>(22)</sup>.

이상에서 언급한 바와 같이 지금까지의 유산균의 항암 또는 면역활성에 관한 연구는 주로 발효유제품과 관련된 유산균에 대한 연구가 주를 이루었으며, 유산균체의 면역활성 증보체계 활성화에 의한 연구는 극히 제한된 상태이다. 따라서 본 연구에서는 유산균 대상의 면역활성 검색과정에서 높은 활성을 보였던 *Lactobacillus plantarum*의 세포성분을 대상으로 보체계 활성을 조사하였으며, 활성을 보이는 물질의 기본 특성과 활성 작용양식에 대한 기초 자료를 획득할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 유산균 공시균주 및 김치 등 유산발효식품으로부터 분리하여 본 연구실에서 확보하고 있는 균주를 사용하였다(Table 1).

### 균체 및 세포질 성분의 분리

유산균을 MRS배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 4°C, 3,000 rpm, 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고, 생리식염수(0.9% NaCl)용액으로 3회 세척한 후 증류수로 현탁하였다. 현탁 균체는 초음파 분쇄기(Ultra sonic processor, Sonics and Materials Inc., USA)로 세포벽을 파괴하여 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하고, 상등액(cytosol fraction)과 침전물(cell wall fraction)로 분획하여 동결건조 하였으며,

**Table 1. Lactic acid bacteria used for the activation of complement system in this study**

Strain number	Lactic acid bacteria strains
1	<i>Leu. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> KFRI 00821
2	<i>Leu. paramesenteroides</i> ATCC 33313
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3025
4	<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KCTC 1047
6	<i>Lactobacillus fermentum</i> KFRI 145 (ATCC 14931)
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464 (ATCC 14917)
8	<i>Lactobacillus cremoris</i> ML4
9	<i>Lactobacillus lactis ssp. diacetylactis</i> CHO 8804121
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
11	<i>Lactobacillus helveticus</i>
12	<i>Lactobacillus plantarum</i>

일정 농도의 용액으로 제조한 후 활성 측정용으로 사용하였다.

### 보체계 활성화능 측정

항보체 활성화는 Mayer법<sup>(23)</sup>을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca<sup>++</sup>, 10 mM Mg<sup>++</sup>이 함유된 GVB<sup>++</sup> 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분 동안 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB<sup>++</sup>를 350 µL씩 첨가하고 이를 10-160 배까지 연속 희석하였다. 여기에 750 µL의 GVB<sup>++</sup>와 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Japan)를 250 µL씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 4°C의 PBS (phosphate buffered saline)를 2.5 mL 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 이때 대조군은 시료대신 증류수를 첨가한 반응액을 사용하였으며, 항보체 활성화는 총보체 용혈 저지율(ITCH50: Inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타내었다.

### 항보체 활성 분체 규명

**Pronase 가수분해:** 시료 20 mg을 10 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.9, 20 mL)에 용해시킨 후 pronase (Sigma, USA) 20 mg을 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 100°C에서 5분간 처리하여 효소를 불활성화시킨 후, 원심분리하여 얻어진 상등액을 2일간 투석 및 동결건조를 행하여 pronase 가수분해물을 얻은 후 활성을 측정하였다<sup>(24)</sup>.

**Periodate Oxidation:** 시료 20 mg를 50 mM acetate buffer (pH 4.5) 10 mL에 용해시킨 후 50 mM NaIO<sub>4</sub> 5 mL를 가하여 4°C, 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 mL를 가해 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2일간 투석을 행하고 투석내액을 20 mL로 농축하였다. 농축액에 NaBH<sub>4</sub> 20 mg를 가하여 실온에서 1시간 교반하였으며, 0.1 M acetic acid로 중화한 후 투석 및 동결건조를 하여 조다당의 산화물(periodate oxidate)를 얻은 다음 활성을 측정하였다<sup>(24)</sup>.

**보체계 활성화 경로 검토**

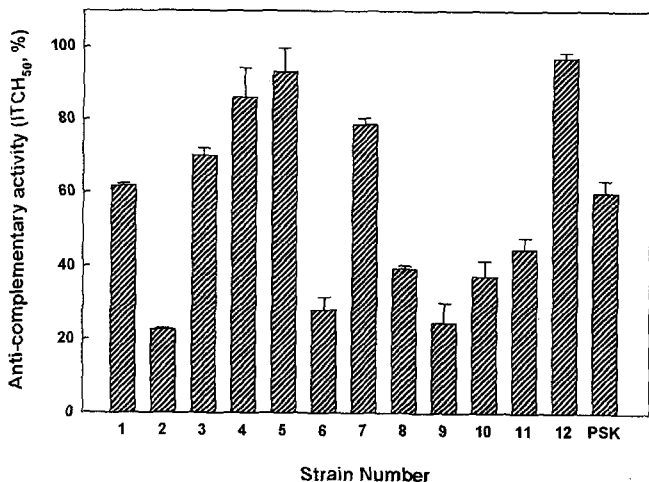
2차원 면역전기영동(Crossed Immunoelectrophoresis): GVB<sup>++</sup> buffer, 10 mM EDTA가 함유된 EDTA-GVB<sup>-</sup> buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM EGTA가 함유된 Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>-</sup> buffer에 정상인의 혈청과 시료를 각각 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후, pH 8.6 barbital buffer(ionic strength, 0.025)를 사용하여 조제한 1% agarose gel 상에서 1차원 전기영동을 행하였다(3 mA/cm). 이후 0.5% anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose gel 상에서 약 15시간 동안 전기영동을 행하였다(1 mA/cm). 전기된 gel은 bromophenol blue로 염색시켜 항체와 반응하여 형성된 침강선을 관찰함으로써 C3의 분해 산물을 확인하였다<sup>(25)</sup>.

**보체계 활성화의 측정:** 보체계 활성화 경로를 조사하기 위해 GVB<sup>++</sup>와 GVB<sup>++</sup>에서 Ca<sup>++</sup> 이온만을 제거한 Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>-</sup> 및 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>-</sup>를 사용하여 보체계 활성화능을 측정하고 그 활성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**보체계 활성화능이 우수한 유산균주의 선별**

유산균체 및 대사산물이 갖는 면역활성능을 검토하기 위하여 Table 1에 제시된 바와 같은 각종 유산균들을 대상으로 보체계 활성화 정도를 검토하였다. 각 유산균들의 균체를 회수한 후, 5분간 조음과 처리하여 세포벽을 파쇄하고 상등액을 동결건조하여 유산균 세포질 획분을 각각 조제하였다. 건조된 시료들은 각각 1,000 µg/mL 농도로 조제하여 Mayer법에 의해 보체계 활성화능을 측정된 결과, 3, 4, 5, 7 및 12번 균주들이 ITCH<sub>50</sub> 70% 이상의 높은 활성을 보였다(Fig. 1). 이들의 활성은 동일 농도에서 *Latobacillus plantarum* (97%)이 가장 높은 경향을 보여 주었으며, 그 외 활성의 순



**Fig. 1. Anti-complementary activity of cytosol fractions prepared from several lactic acid bacteria.**

Anti-complementary activity was presented as inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. Activity was measured at a concentration of 1000 µg/mL. Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. The strain-names of lactic acid bacteria are as described in Table 1.

서는 *L. delbrueckii* KCTC 1047 (90%), *L. plantarum* KFRI 464(ATCC 14917) (79%), *L. casei* KCTC 3109 (76%), *L. acidophilus* IFO 3025 (70%)의 순이었다. 이들 1차 선별한 균주들은 재차 배양하여, 활성을 반복 검토한 결과, 본 실험실에서 김치로부터 분리한 *L. plantarum*(12번) 균주의 경우 지속적으로 양호한 활성을 보였으므로 본 균주를 최종 선별하고 이후의 실험에 사용하였다. *L. plantarum*은 김치 발효에 관여하는 주요세균으로 전체 발효과정 중 주로 후숙기나 과숙기에 높은 빈도로 발견되고, 동종 유산발효균으로 김치 고온 발효 중 높은 젖산 생성능을 보여 김치를 빨리 익게 하는 산패균으로 취급되고 있으나<sup>(26)</sup>, 최근 유산균의 기능성 연구 결과 항돌연변이 효과가 우수하고<sup>(27)</sup>, *in vivo* 항암활성<sup>(28)</sup> 및 면역증강 효과<sup>(29)</sup>가 높은 것으로 보고되고 있어 새롭게 관심의 대상이 되고 있는 유산균이다. 본 실험 결과에서도, *L. plantarum*이 높은 항보체 활성을 보이고 있는 것은 최근 보고되고 있는 이러한 실험결과와 비교할 때 상당히 흥미로운 부분이라 하겠다.

***L. plantarum* 균체 성분의 보체계 활성화능**

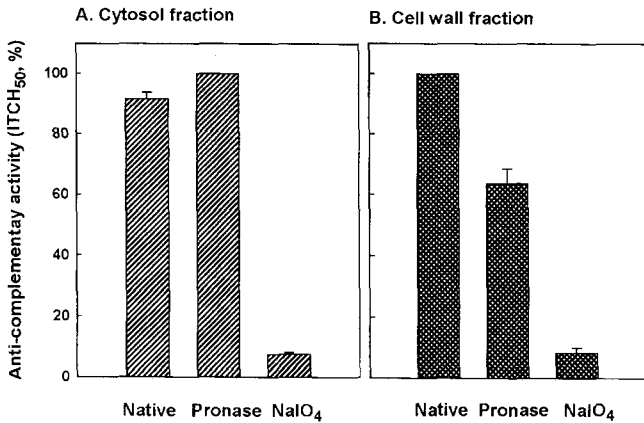
보체계 활성화능이 우수한 것으로 검색되었던 *L. plantarum*의 세포질 획분과 세포벽 획분을 대상으로 농도별 활성을 검토하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 세포벽 획분은 세포질 획분보다 양호한 높은 활성을 보였으며, 농도의 의존적으로 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 유산균의 항돌연변이 활성<sup>(30)</sup>이나 면역증강활성<sup>(28)</sup>을 검토한 많은 보고에서 세포벽 획분이 세포질 획분보다 활성이 우수한 것으로 보고되고 있는 것과 일치하는 결과이다. 또한 세포질 획분에 존재하는 활성성분의 개략적인 분자크기를 예측하기 위해 micro-acylizer(Asahi Kasei Co., Japan)를 이용해 분자량 1,000을 기준으로 하여 각각 고분자 부분과 저분자 부분으로 분리한 후, 1,000 µg/mL 농도에서 활성을 비교한 결과, 고분자 성분만이 높은 보체계 활성화능을 나타내었다. 따라서 *L. plantarum*의 경우, 세포질 획분 중에서는 고분자 물질이 주로 활성에 공헌함을 알 수 있었다.

**활성성분의 규명**

가장 높은 항보체 활성을 보였던 *L. plantarum*의 시료들은 예비실험 결과, 당류 및 단백질 물질이 혼합(결과는 제시하지 않았음) 내지는 결합되어 있는 것으로 판단되었다. 따라서 *L. plantarum*의 세포질과 세포벽 획분을 대상으로 보체계 활성화에 기여하는 본체(작용부위)를 규명하기 위해 pronase로 단백질 부분을 가수분해한 획분과 periodate 처리를 하여 당부분을 산화시킨 획분을 조제하여 이들의 활성을 비교, 분

**Table 2. Anti-complementary activity of cytosol and cell wall fractions prepared from *Lactobacillus plantarum***

Cell component	Anti-complementary activity (ITCH <sub>50</sub> , %)		
	1,000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL
Cell wall fraction	97.0±1.6	46.1±2.1	11.3±1.6
Cytosol fraction	91.5±1.5	25.4±1.4	4.3±0.8
High MW	78.5±1.5	-	-
Low MW	-3.8±0.7	-	-



**Fig. 2.** Changes in anti-complementary activity of cytosol and cell wall fractions from *Lactobacillus plantarum* after pronase digestion and periodate oxidation.

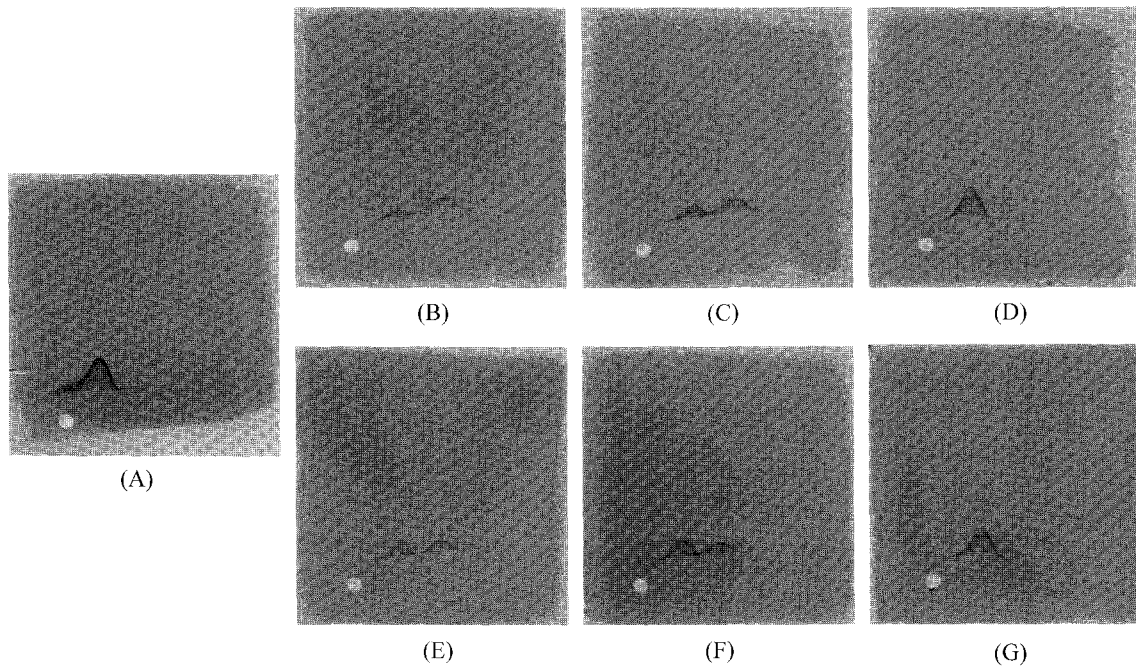
Anti-complementary activity was measured at a concentration of 1000 µg/mL. The data are mean of three separate experiments.

석하였다. Fig. 2-A에서 보는 바와 같이 *L. plantarum*의 세포질의 경우 pronase 처리한 획분은 처리하지 않은 대조군에 비해 약 10% 정도의 활성이 증가한 반면, periodate 산화시킨 획분에서는 약 80% 이상의 급격한 활성 저해가 관찰되었다. 한편 세포벽 획분의 경우, periodate 처리를 한 경우에 90% 정도의 급격한 활성의 감소가 인지되었다(Fig. 2-B). 이상의 결과로 미루어 볼 때, 선별 균주의 세포질 및 세포벽 획분의 활성 부위는 단백질이 아니라 주로 분자량 1,000 이상의 다당계 물질에 기인함을 알 수 있었다. 그러나 *L. plantarum* 세포벽 획분의 경우, pronase 처리로 약간의 활성

저하를 보였는데, 세포벽 획분에 존재하는 단백질 부위도 일부 활성에 관여하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 최근 보고되고 있는 유산균에 존재하는 항암활성의 본체가 세포벽에 존재하는 peptidoglycan과 polysacchride라는 보고<sup>(31)</sup>와 일치하는 결과로서, 활성 측정방법의 차이에도 불구하고 유사한 획분에서 높은 활성을 보인 사실은 차후 이 분야에 대한 지속적 연구가 요망된다고 하겠다.

**Lactobacillus plantarum 유래 활성물질의 작용 양식 해석**

**2차원 면역전기영동에 의한 C3 산물의 동정:** Mayer법으로 측정된 항보체 활성은 1차 반응단계에서 시료 성분에 의한 보체계의 활성화에 의한 보체의 소모정도를 측정하는 방법으로<sup>(23)</sup>, 단일 시료 중 보체계를 저해하는 특정성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 보일 수 있는 문제점을 갖고 있다. 따라서 *L. plantarum*의 세포벽 및 세포질 획분의 항보체 활성이 보체계 활성화에 의한 것인지 혹은 저해에 의한 것인지를 확인하기 위하여 보체 활성화에서 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 조사하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C3a와 C3b로 분해되므로<sup>(20)</sup> 시료와 정상인 혈청을 반응시킨 후 1차로 전기영동을 실시하고 anti-human C3을 이용, 면역전기영동을 행함으로써 C3 분해산물을 동정하고자 하였다. Fig. 3-A에 나타난 바와 같이 정상인의 혈청을 단독으로 면역전기영동한 결과는 C3의 활성화가 일어나지 않아 단일 침강선(precipitation line)이 관찰된 반면, *L. plantarum*의 세포질 및 세포벽획분과 반응시킨 경우에는 C3의 활성화가 일어나 두개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-B, 3-E). 따라서, 두 획분의 항보체 활성은 보체계 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다. 한편, *L. plan-*



**Fig. 3.** Crossed immunoelectrophoretic patterns of C3 converted by cell wall and cytosol fractions from *Lactobacillus plantarum*.

Normal human serum was incubated with the samples in GVB<sup>++</sup> (B, E), Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>-</sup> (C, F) and EDTA-GVB<sup>-</sup> (D, G) at 37°C for 30 min. The sera were then subjected to immunoelectrophoresis using anti-human C3 antibody to locate C3 cleavage products. The anode is left. Deionized water (A), Cell wall fraction (B, C, D), Cytosol fraction (E, F, G).

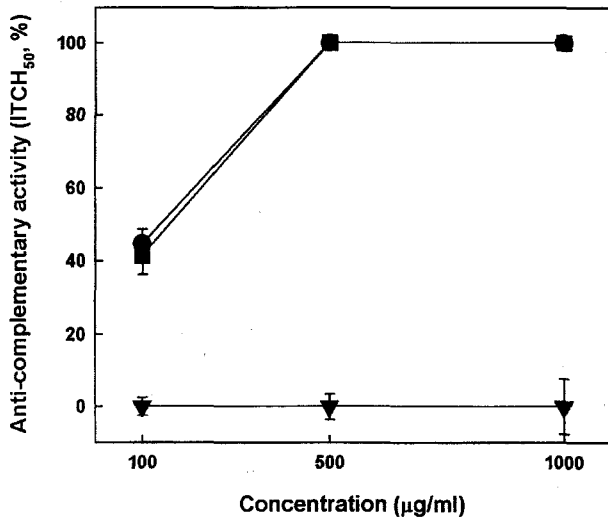


Fig. 4. Effect of calcium and magnesium ions on anti-complementary activity of cell wall fraction from *Lactobacillus plantarum*.

●, in GVB<sup>++</sup>; ■, in Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>--</sup>; ▼, in EDTA-GVB<sup>--</sup>. The data are mean of three separate experiments and presented as mean  $\pm$  S.D.

*tarum*의 활성성분을 Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>--</sup> 및 EDTA-GVB<sup>--</sup> 반응계에서 반응시킨 후 그 분해 산물을 관찰한 결과는 Fig. 3의 C, F 및 Fig. 3의 D, G항에 나타난 바와 같다. 서론에서 언급한 바와 같이, 보체계 활성화는 크게 classical pathway와 alternative pathway를 경유하여 이루어지며 그 활성화에는 classical pathway의 경우 Ca<sup>++</sup>와 Mg<sup>++</sup> 이온이, alternative pathway에는 Mg<sup>++</sup> 이온만이 각각 관여한다고 알려져 있다<sup>(20)</sup>. 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>--</sup> 반응계에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선이 관찰된 반면, Ca<sup>++</sup> 이온을 선택적으로 제거한 Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>--</sup> 반응계에서는 두획분 공히 각각 2개씩의 침강선이 관찰되었다. 정상 GVB<sup>++</sup> 반응계에서의 결과로 미루어 볼 때, 두 획분은 모두 양 경로를 활성화시키거나 주로 alternative pathway를 활성화시키는 것으로 생각되었다.

#### 각종 반응계에서의 ITCH<sub>50</sub> 비교

Classical pathway는 IgM, IgG등의 항체가 항원과 결합한 면역 복합체에 C1q 성분이 항체의 CH<sub>2</sub>(IgG)나 CH<sub>4</sub>(IgM) 영역에 결합함으로써 개시되며, 이후에 C1r, C1s들이 Ca<sup>++</sup> 존재 하에 C1qr복합체를 형성하고 C4, C2와 반응하여 C4b와 C2a를 유리시키고 Mg<sup>++</sup> 존재 하에 C3 convertase 활성을 갖는 C4b2a를 형성한다. Alternative pathway는 면역복합체의 관여없이 보체가 활성화되는 경로로 혈중 미량 생성되는 C3i에 factor B, factor D가 관여하며 Mg<sup>++</sup> 존재 하에 C3 convertase(C3iBb)가 형성된다<sup>(23)</sup>. 따라서 활성화에 관여하는 금속이온의 존재 여부에 따라 반응계를 조절하면 보체계 활성화 경로를 예측할 수 있게 된다. 높은 활성이 인정되었던 *L. plantarum*의 세포질 및 세포벽 획분을 대상으로 GVB<sup>++</sup> 기본 반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>--</sup> 반응계 및 Ca<sup>++</sup>이온만을 선택적으로 제거한 Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>--</sup> 반응계로 나누어 항보체 활성(ITCH<sub>50</sub>)을 비교 측정하였다. Fig.

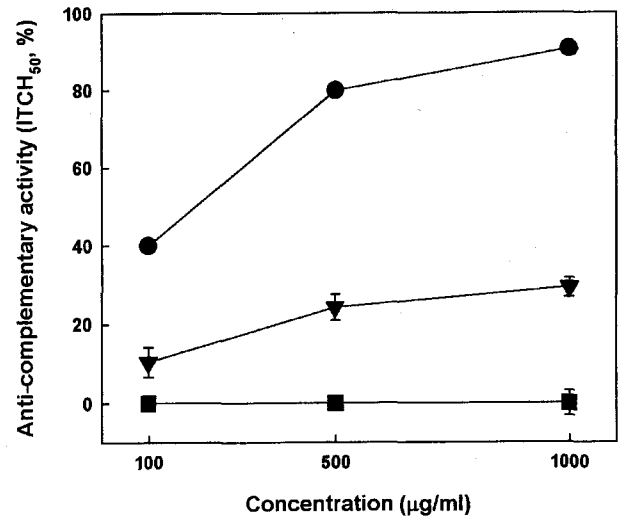


Fig. 5. Effect of calcium and magnesium ions on anti-complementary activity of cytosol fraction from *Lactobacillus plantarum*.

●, in GVB<sup>++</sup>; ▼, in Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>--</sup>; ■, in EDTA-GVB<sup>--</sup>. The data are mean of three separate experiments and presented as mean  $\pm$  S.D.

4에서 보는 바와 같이 *L. plantarum*의 세포벽 획분의 경우, 2가 금속이온 모두 제거된 반응계에서는 대조군에 비해 거의 완전한 활성의 감소를 관찰할 수 있었으나, Ca<sup>++</sup> 및 Mg<sup>++</sup>이 모두 존재하거나 Mg<sup>++</sup> 이온만이 존재하는 반응계에서는 활성의 변화가 거의 나타나지 않으므로써 세포벽 획분은 alternative pathway의 강력한 활성인자임을 알 수 있었다. 보체계에서 alternative pathway는 항체에 의한 면역 반응이 일어나기 전에 활성화되기 때문에 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 1차적 방어기작이므로 그 의미가 크다고 할 수 있다<sup>(20)</sup>. 이상의 결과는 *L. paracasei*의 세포벽 유래 다당류<sup>(32)</sup>와 담자균 유래의  $\beta$ -glucan<sup>(33)</sup>이 alternative pathway의 activator로 작용한다는 기존의 보고와 잘 일치하였다. 한편 *L. plantarum*의 세포질 획분의 경우, 2가 금속이온이 제거된 반응계에서는 대조군에 비해 완전한 활성의 상실을 보인 반면, Mg<sup>++</sup> 이온만 존재하는 경우 활성이 상당량 유지(약 29% 수준)되는 결과를 보였다(Fig. 5). 이러한 사실은 세포질 획분이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway 양 경로를 모두 활성화시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

#### 요 약

김치 및 발효유 제품으로부터 분리한 유산균과 공시균주 12종을 대상으로 보체 용혈 분석법을 이용하여 면역계에서 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계 활성화(항보체 활성, TCH<sub>50</sub>) 정도를 측정한 결과, 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum*이 타 유산균 중에 비해 높은 활성을 나타내었다. 이들 균주로부터 조제된 세포벽 획분의 경우 세포질 획분보다도 높은 활성을 보였으며 각 획분의 활성은 농도 의존적 경향을 나타내었다. *L. plantarum*의 세포질 획분과 세포벽 획분의 경우 pronase 소화 후에는 활성의 변화가 없는 반면, 과요오드산 처리에 의해서는 급격한 활성의 감소를 나타

내는데 이들 결과로부터 *L. plantarum*의 세포질과 세포벽 획득에 의한 보체계 활성화가 주로 다당 영역에 기인함을 알 수 있었다. 한편 anti-human C3를 이용한 2차원 면역전기영동에 의해, Ca<sup>++</sup> 이온을 제거한 상태에서도 세포질과 세포벽 획득에 의한 C3 활성화 산물을 동정할 수 있었다. 또한 *L. plantarum*의 세포벽 획득에 의한 항보체 활성화는 동일 조건에서 활성을 유지한 반면, 세포질 획득에 의한 활성화 정도는 동일 조건에서 상당히 감소하였다. 이상의 결과로부터 *L. plantarum* 세포벽 획득의 보체계 활성화 양식은 주로 alternative pathway의 활성화에 의한 것이며, 세포질 획득에 의한 활성화는 classical pathway와 alternative pathway 양 경로를 경유함을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 경기대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사를 드립니다.

## 문헌

- Jung, C.M. and Kang, K.H. Industrial utilization and future prospect of lactic acid bacteria. *Bioindustry News (Kor.)* 12: 16-22 (1999)
- Fernandes, C.F., Shahani, K.M. and Amer, M.A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 343-356 (1987)
- Fuller, R. Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-442 (1991)
- Chandan, R.C. Enhancing market value of milk by adding cultures. *J. Dairy Sci.* 74: 2082-2088 (1999)
- Sanders, M.E. Probiotics. *Food Technol.* 53: 67-77 (1999)
- Bogdanov, I.G., Dalev, P.G., Gurevich, L.A., Kolosov, M.N., Malkov, V.P., Plemyanikova, L.A. and Sorokina, I.B. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett.* 57: 259-261 (1975)
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. The effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 263-265 (1980)
- Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M. Antitumor activity of *L. casei* in mice. *Gann* 72: 517-523 (1981)
- Friend, B.A., Farmer, R.E. and Shahani, K.M. Effect of feeding and intraperitoneal implantation of yogurt culture cells of Ehrlich ascites tumor. *Milchwissenschaft* 37: 708-714 (1982)
- Rao, C.V., Sanders, M.E., Indranie, C., Simi, B., and Reddy, B.S. Prevention of indices of colon carcinogenesis by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM in rats. *Int. J. Oncol.* 14: 939-944 (1999)
- Fernandes, C.F. and Shahani, K.M. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Prot.* 53: 704-710 (1990)
- Perdigon, G., Elena, M., Alvarez, S., Medici, G., Oliver, G. and Holgado, A. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. *J. Food Prot.* 49: 986-989 (1986)
- Rangavajhala, N., Shahani, K.M., Sridevi, G. and Srikumaran, S. Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulates the production of interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by murine macrophages. *Nutr. Cancer* 28: 130-134 (1997)
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S. and Tokokura, T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.* 81: 48-53 (1998)
- Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J. and Gopal, P.K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* 83: 167-176 (2000)
- Yamada, H. and Kiyohara, H. Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines. *Abstracts of Chinese Medicines* 3: 104-124 (1989)
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. Antitumor and immunomodulating activities of a  $\beta$ -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola flondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 410-413 (1980)
- Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* 238: 59-64 (1972)
- Ito, H. Effects of the antitumor agents from various natural sources on drug-metabolizing system. Phagocytic activity and complement system in sarcoma 180-bearing mice. *Japan. J. Pharmacol.* 40: 435-443 (1986)
- Whaley, K. The complement system, pp. 1-35. In: *Complement in Health and Disease*. Whaley, K. (ed.). MTP Press, Lancaster, USA (1986)
- Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 262: 7451-7454 (1987)
- Egwang, T.G. and Befus, A.D. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology* 15: 207-224 (1984)
- Kabat, E.A. and Mayer, M.M. Complement and complement fixation, pp. 133-240. In: *Experimental Immunology*. 2nd ed. Charles, C. (ed.). Thomas Publisher, Illinois, USA (1971)
- Shin, K.S. Studies on selection, purification and action modes of anti-complementary polysaccharides from *Arcaea Pericarpium*. Ph.D. Dissertation, Korea Univ., Korea (1992)
- Shimura, K., Ito, H. and Hibasami, H. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Japan. J. Pharmacol.* 33: 403-408 (1983)
- Mheen, T. I. and Kwon, T.W. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16: 443-450 (1984)
- Son, T.J., Kim, J.S. and Park, K.Y. 1998. Antimutagenic activities of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Korean Assoc. Cancer Prev.* 3: 65-74 (1998)
- Shin, K.S., Chae, O.W., Park, I.C., Hong, S.K. and Choe, T.B. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 357-363 (1998)
- Park, I.S. Function and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. Ph.D. Dissertation, Chung-Ang Univ., Korea (1992)
- Park, K.Y., Kim, S.H. and Son, T.J. Antimutagenic activities of cell wall and cytosol fractions of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Food Sci. Nutr.* 3: 329-333 (1998)
- Nagaoka, M., Muto, M., Nomoto, K., Matuzaki, T., Watanabe, T., Yokokura, T. Structure of polysaccharide-peptidoglycan complex from the cell wall of *Lactobacillus casei* YIT9018. *J. Biochem.* 108: 568-571 (1990)
- Gerard, W.R., Hans, L.J., Dick, J.C., Han, H., Johannis, P.K. and Vligenthart, J.F.G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydr. Res.* 285: 129-139 (1996)
- Czop, J.K. and Austin, K.F. A  $\beta$ -glucan inhibitable receptor on human monocytes: Its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 134: 2588-2593 (1996)