

Evaluation of Lactic Acid Bacteria for the Resistance to Endocrine Disruptors

Su-Won Kim, Byung-Tae Min¹ and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

¹Vilac Company LTD. R&D Center, Kimhae, Kyungnam, 621-190, Korea

Endocrine disruptors are chemicals which can be found in our normal daily life. They can be easily ingested through plastic food containers, pesticides, etc. They include DDT, bisphenol A, benzophenone and phenylphenol, etc. Endocrine disruptor can be very harmful and toxic because it disrupts the normal function of the endogenous endocrine system. It has been reported that endocrine disruptor can cause the fatal strike in reproductive system, central nervous system and the other part of the body. We have examined if the growth of lactic acid bacteria could be resistant to the endocrine disruptor. We have used *Lactobacillus delbruekii* as an experimental strain and benzophenone and phenylphenol for the comparison purpose. Experiments included the evaluation of turbidity, absorbance and actual cell counts. Although *Lactobacillus delbruekii* showed the higher resistance to benzophenone than phenylphenol it was still resistant to both benzophenone and phenylphenol. Because the experimental concentrations of benzophenone and phenylphenol were so high to compare with the actual concentration we meet in daily life, *Lactobacillus delbruekii* was considered to be sufficient to survive in the environmental concentration of these endocrine disruptors. This study should contribute to the development of fermented beverage with beneficial effect by lactic acid bacteria.

Key Words: Lactic acid bacteria, Endocrine disruptor, *Lactobacillus delbruekii*, Benzophenone, Phenylphenol

서 론

환경호르몬이라고도 하는 '내분비교란물질'은 체내에 들어와 인체의 호르몬과 유사하게 작용함으로써 대사작용을 교란시키는 화학물질이다. 정확한 명칭은 '외인성 내분비교란 화학물질'이라고 한다. 미국 환경처 (EPA)가 내린 정의에 의하면 환경호르몬은 정상적인 호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 또는 배설을 간섭하는 체외 물질이다. 내분비교란물질은 그 종류도 다양하여 이미 100여종 이상이 보고되어 있는데 플라스틱 용기와 세계 등에 많이 함유되어 있다. 대표적으로 다이옥신, PCB, DDT, 플라스틱 가소제, 유기농약 등이 이에 해당한다¹⁻⁴⁾.

내분비교란물질은 생식작용을 비롯해 발생과정, 신경계,

면역체계까지 영향을 미치며, 암발생과도 상당히 관련되어 있을 것으로 추정된다⁵⁾. 직접적인 연구에 따르면, 유방암의 위험을 증가시킬 수 있으며⁶⁾, 정자의 수를 감소시키거나^{7,8)}, 고환암, 전립선암을 발병시키고⁹⁾, 생식능력마저 저하시킨다¹⁰⁾고 알려져 있다. 이외에도 성기의 기형적 변화를 야기하고 행동 변화마저 초래하기 때문에 내분비교란물질에 대한 사회적 두려움이 점차 고조되고 있다⁷⁻¹⁵⁾.

이렇듯 내분비교란물질의 위험성이 높아지는데 비해, 국내의 본격적인 연구는 선진국에 비해 아직 부족하다는 것이 관련 전문가들의 의견이다. 내분비교란물질에 대한 연구가 부족한 이유는 이 물질에 따른 위험을 정량화 하는 것이 매우 어렵기 때문으로 알려져 있다.

최근에 이미 섭취된 다이옥신의 체외 배출을 촉진하고, 또 장내 흡수를 억제할 것으로 기대되는 미생물제제 식품 개발 가능성이 소개되면서 미생물과 내분비교란물질의 상호 억제 효과에 대해 과학적 관심이 조금씩 나타나기 시작하였다.

본 연구는 발효식품의 대표적 미생물인 유산균이 내분비교란물질에 대해 얼마나 내성을 보이는지에 대한 조사, 분석이다. 특히 의약품의 원료로 사용되는 benzophenone과 농약의 주성분인 phenylphenol이 유산균 성장에 얼마나 영향을 미치는지를 분석한 결과이다. 본 연구는 내분비교란물질에

*논문 접수: 2002년 6월 3일

수정재접수: 2002년 6월 15일

[†]별책 요청 저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 생물학과

Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

"본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것임"

대해 내성이 강한 유산균을 찾아내고, 차후 유산균 음료의 음용을 통해 내분비교란물질의 독성효과를 감소시킬 수 있는 발효제품을 만들기 위한 학문적 기초가 될 것이다.

재료 및 방법

1. 재료

KTCC 목록에 있는 *Lactobacillus* 균주 중 성장률이 현저히 우수하다고 파악된 No. 2181 균주 (*Lactobacillus delbruekii subsp. lactis*)를 실험균주로 사용하였다. 실험균주는 10% skim milk에 배양한 후 4°C에 냉장보관하였고, TCM 배지 (Table 1)에 계대배양하여 사용하였다. 배양조건은 37°C에서의 통성배양이었다. 경성, 연성고체배지 (hard 및 soft 배지)의 제조를 위해서는 1.5%, 또는 0.7%의 agar를 각각 첨가하였다. 생균수는 생리식염수 (0.85% NaCl in DW)에 원액을 풀어 단계별로 희석하면서 측정하였다.

기타 시약은 시중에서 구입 가능한 최상의 품질을 사용하였고, 초자기구는 121°C에서 30분간 고압증기멸균하여 사용하였다. Microcentrifuge tube, tip, petridish 등은 일회용품을 사용하였다.

2. 방법

1) 유산균의 배양

동결건조된 균을 적온에서 10% skim milk 배지에 조심스레 섞은 후 백금으로 찍어 TCM 배지에 접종하였다. 37°C에서 2일간 배양하여 나타나는 콜로니를 확인한 후 4°C에 보관하였고, 2주마다 동일한 방법으로 계대배양하여 활력을 최대한 높인 상태에서 실험에 사용하였다. 동시에 10% skim milk에도 접종하였고 흔들지 않은 채로 37°C에서 배양하면서 3~6일간 방치하여 굳는 정도 (curd)를 관찰하였다.

2) 유산균의 성장곡선 결정

아무 것도 첨가하지 않은 배지, 또는 benzophenone과 phenylphenol을 적당량 첨가한 배지에 실험균주를 접종한 후 탁도 (turbidity)와 흡광도, 생균수 측정을 통해 성장곡선을 작성하였다. 먼저 실험균주를 benzophenone과 phenylphenol을 각각 5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml씩 분주한 TCM 배지에 접종한 후, 아무 것도 첨가하지 않은 대조군과 함께 37°C에서 배양하였다. 0시간, 6시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 72시간마다 육안으로 탁도의 변화를 관찰하였다. 흡광도는 역시 동일한 방법으로 균주를 배양하면서 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 생균수를 측정하기 위해서 먼저 해당 시간마다 시료의 일부를 채취해 10⁰~10⁻⁹배까지 연속적으로 희석하였다. 각 희석단계마다 2 µl씩 TCM hard 배지에 spot test 방법으로 분주하였고 37°C에서 24시간 배양한 후 자라난 colony의 수를 세어 원액에 들어

Table 1. TCM medium (per 1ℓ)

Beef extract	4.5 g
Peptone	7.5 g
Yeast extract	5.0 g
Tween 80	1.0 ml
K ₂ HPO ₄	3.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Glucose	2.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.025 g
pH	6.8

있는 생균수를 결정하였다.

3) 내분비교란물질에 대한 유산균 내성 비교

실험균주를 18시간 동안 배양한 후 일부를 덜어내어 TCM soft 배지에 부어서 섞었다. 이렇게 섞은 균액을 TCM hard 배지 위에 부어 골고루 덮고 실온에서 약 30분간 방치하여 충분히 굳게 하였다. Benzophenone과 phenylphenol을 각각 100 µg/ml, 500 µg/ml의 농도로 미리 준비하였고 이를 멸균한 paper disc (지름 5 mm)에 각각 충분히 적신 다음 대조군 paper disc와 함께 차례대로 배지 위에 올려 놓았다. 37°C에서 24시간 배양하면서 disc 주위에 나타나는 저해환 (clear zone)을 관찰하였다.

결 과

1. 유산균 배양조건

동결건조된 균을 TCM 배지에 접종한 후 37°C에서 배양시킨 결과 정상적인 활력을 되찾기 위해서는 적어도 3회 이상의 계대배양이 필요하였다. 10% skim milk에서 배양할 때에는 4일 이후부터 curd가 생기는 것이 관찰되었다.

2. 탁도 측정

TCM 배지에 배양한 후 18시간이 지나면서 탁도의 변화가 생기기 시작하였다. 내분비교란물질을 넣지 않은 대조군에서는 균의 생장이 왕성하였기에 탁도 변화가 뚜렷하였으며, benzophenone 및 phenylphenol을 소량 (5 µg/ml) 첨가한 경우에도 비교적 균의 생장이 원만한 편이었다. 전반적으로 볼 때 benzophenone보다 phenylphenol에서 균의 생장이 더욱 억제되는 경향이 짙었다. Benzophenone과 phenylphenol 모두 500 µg/ml을 넣은 경우에는 균의 생장이 완전히 억제되어 탁도 변화가 전혀 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. A change of turbidity after adding endocrine disruptor

Concentration of Endocrine Disruptor ($\mu\text{g/ml}$)	Time (hrs)									
	0	6	12	15	18	24	36	48	72	
None	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	
Benzophenone (5)	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++	
Benzophenone (50)	-	-	-	-	-	+	+	++	++	
Benzophenone (500)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phenylphenol (5)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
Phenylphenol (50)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Phenylphenol (500)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(+) indicates the increment of turbidity and/or cell growth

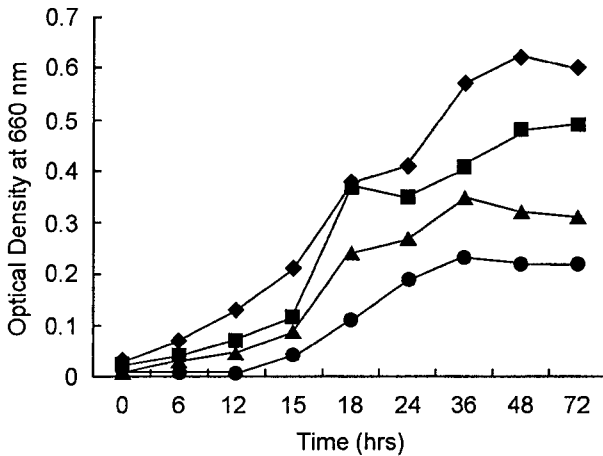


Fig. 1. Growth curve in the presence of benzophenone. (◆); Control, (■); benzophenone 5 $\mu\text{g/ml}$, (▲); benzophenone 50 $\mu\text{g/ml}$, (●); benzophenone 500 $\mu\text{g/ml}$.

3. 흡광도 측정

대조군의 경우, 15시간이 지나면서부터 급격한 증가를 보이기 시작하였다. 내분비교란물질을 첨가한 경우, 전반적으로 benzophenone을 넣은 실험군에서 phenylphenol의 경우보다 흡광도 값이 높게 측정되었다 (Fig. 1, 2). 흡광도는 15시간에서 18시간까지 증가하다가 이후에는 완만해지는 것이 관찰되었다. Phenylphenol의 경우 전체적으로 흡광도 값이 낮았으며 모든 농도에서 완만한 경사를 나타내었다. 특히 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 거의 흡광도 값의 변화가 없었다.

4. 생균수 측정

15시간이 지난 후부터 균의 생육이 현저해지면서 내분비교란물질을 첨가하지 않은 대조군의 경우는 급격한 증가곡선을 보였다. Benzophenone의 경우 5 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 균의 생육이 양

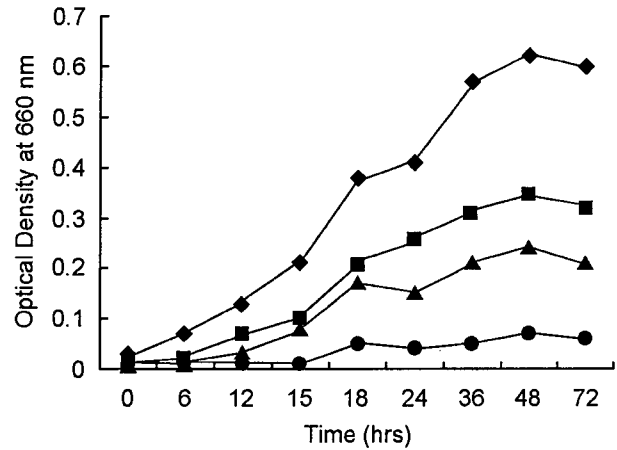


Fig. 2. Growth curve in the presence of phenylphenol. (◆); Control, (■); phenylphenol 5 $\mu\text{g/ml}$, (▲); phenylphenol 50 $\mu\text{g/ml}$, (●); phenylphenol 500 $\mu\text{g/ml}$.

호하였으나 50 $\mu\text{g/ml}$ 부터는 현저히 억제되면서 성장곡선이 완만한 곡선을 나타내었다. 반면 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 거의 성장하지 못하는 것으로 확인되었다 (Fig. 3). Phenylphenol의 경우는 5 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 잘 자라지 않았으며, 그나마 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우에는 24시간 이후부터, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우에는 36시간 이후부터는 거의 변화를 보이지 않았다. 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 생육의 저해를 받아 거의 자라지 않은 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

5. 내분비교란물질에 대한 유산균 내성 비교

TCM 고체 배지상에 나타난 저해현을 관찰한 결과 예상대로 대조군의 경우 disc 주위에 균이 잘 자라 나왔다 (Fig. 5). Benzophenone이나 phenylphenol의 경우에도 100 $\mu\text{g/ml}$ disc 주위에는 균이 비교적 무리없이 성장한 것을 볼 수 있었다. 그러나 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우에는 disc 주위에 저해현이 뚜렷하게

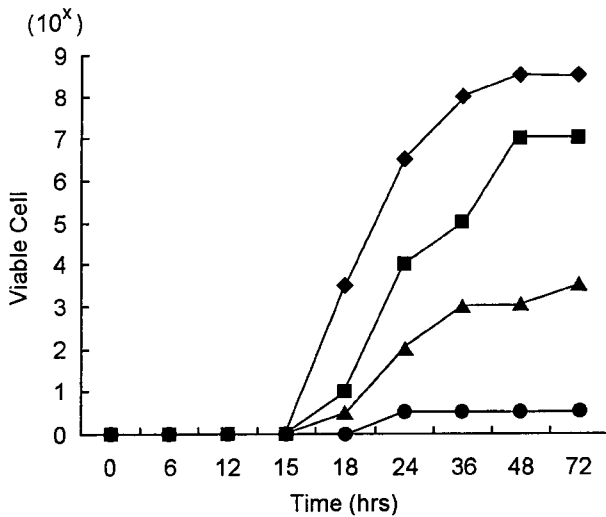


Fig. 3. Growth curve in the presence of benzophenone. (◆); Control, (■); benzophenone 5 µg/ml, (▲); benzophenone 50 µg/ml, (●); benzophenone 500 µg/ml.

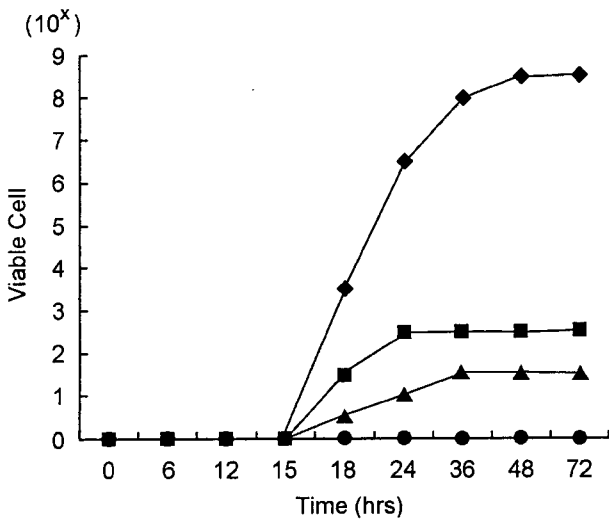


Fig. 4. Growth curve in the presence of phenylphenol. (◆); Control, (■); phenylphenol 5 µg/ml, (▲); phenylphenol 50 µg/ml, (●); phenylphenol 500 µg/ml.

나타나는 것으로 보아 유산균이 현저히 저해받았음을 알 수 있었다. 저해환의 크기를 비교해 볼 때 benzophenone보다는 phenylphenol이 더욱 강한 억제력을 나타내는 것이 관찰되었다.

고 찰

내분비교란물질은 화학적 구조가 체내 호르몬과 유사하기 때문에 흡수될 경우 정상적인 호르몬의 기능을 혼란시키게 된다. 그러나 이러한 위험성에 비해 아직까지 국가별로도 규제범위가 서로 다르며 국제적으로 일치된 검출 방법이 없음

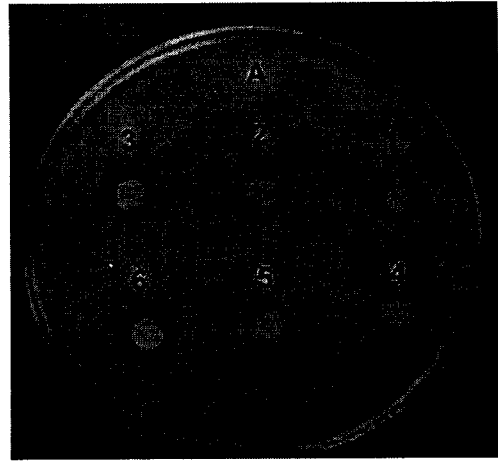


Fig. 5. Inhibitory ring test of *Lactobacillus delbrueckii* against endocrine disruptors. 1; Control, 2; benzophenone 100 µg/ml, 3; benzophenone 500 µg/ml, 4; Control, 5; phenylphenol 100 µg/ml 6; phenylphenol 500 µg/ml.

으로 인해 일상생활 속에서 무방비적으로 노출되어 있는 현실이다. 다행스러운 것은 최근에 유해성이 인정되는 물질에 대해서는 판매금지조치를 내리는 등 무의식적인 노출을 줄이기 위한 노력이 적극적으로 행해지고 있으며, 내분비교란물질 억제에 대한 연구 역시 활발해지고 있다는 점이다.

본 연구 결과 실험균주로 사용된 유산균 (No. 2181)이 상당히 높은 농도의 내분비교란물질에 대해서는 억제를 받지만 낮은 농도에서는 어느 정도의 내성을 유지한다는 것을 알 수 있었다. 더욱이 이 내성은 내분비교란물질의 종류에 따라 특이적이라는 것도 관찰되었다. 전체적으로는 benzophenone에 대해 상대적으로 높은 내성을 보이는 것으로 관찰된 반면 phenylphenol에 대해서는 약한 것으로 확인되었다. 이같은 결과는 향후 좀 더 다양한 유산균주와 여러 종류의 내분비교란물질을 사용하여 연구를 확대시켜 나갈 필요가 있음을 시사하고 있다 하겠다. 유산균은 장내에 균총을 형성하지만 오래 머무르지 않는 것이 특징이다. 때문에 유산균이 약간의 내성만 가지고 있다면 지속적인 음용을 통해 장청소효과를 나타내기에 무리가 없다는 추측이다. 게다가 우리가 실험에 사용한 농도는 일상생활에서 접하는 것보다 수만배 이상의 고농도였기 때문에 실제로는 유산균을 이용해 내분비교란물질을 억제하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구는 유산균이 내분비교란물질에 대해 어느 정도 내성을 나타낸다는 단순한 증거에 그치지 않고, 내분비교란물질에 강력한 억제작용을 보이는 균주를 능동적으로 선별, 검색하여 유전자 차원에서 그 억제 기작을 밝혀내고, 이를 근거로 하여 이미 섭취된 내분비교란물질을 적극적으로 억제할 수 있는 유산균 음료의 개발로 이어질 학문적 근거를 제시하고 있다 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V and Olea NX (1995): Estrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, **103**: 608-612.
- 2) Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, Autrup H, Barfoed M, Beresford NA, Bjerregaard P, Christiansen LB, Gissel B and Hummel (1999): Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, **107**: 89-108.
- 3) Rogan WJ and Gladen BC (1992): Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicology*, **13**: 27-35.
- 4) Hendry WJ, DeBrot BL, Zheng X, Branham WS and Sheehan DM (1999): Differential activity of diethylstilbestrol versus estradiol as neonatal endocrine disruptors in the female hamster (*Mesocricetus auratus*) reproductive tract. *Biology of Reproduction*, **61**: 91-100.
- 5) Caelsen E, Giwercman A, Keiding N and Shakkebaek NE (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*, **305**: 609-613.
- 6) Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M and Dubin N (1993): Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J National Cancer*, **21(85)**: 648-652.
- 7) Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E and Aitken J (1996): Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom; birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **54**: 315.
- 8) Swan SH, Elkin EP and Fenster L (1997): Have a Sperm Densities Declined? A Reanalysis of Global Trend Data. *Environmental Health Perspectives*, **105**: 1228-1232.
- 9) Czeizel (1985): Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. *Lancet*, **1**: 462-463.
- 10) Kinouchi T, Kataoka K, Bing SR, Nakayama H, Uejima M, Shimono K, Kuwahara T, Akimoto S, Hiraoka I and Ohnishi Y (1998): Culture supernatants of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* repress formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug by suppressing unbalanced growth of aerobic bacteria and lipid peroxidation. *Microbiology & Immunology*, **42**: 347-355.
- 11) Barthold JS, Kryger JV, Derusha AM, Duel BP, Jednak R and Skafar DF (1999): Effects of an environmental endocrine disruptor on fetal development, estrogen receptor (alpha) and epidermal growth factor receptor expression in the porcine male genital tract. *The Journal of Urology*, **162**: 864-871.
- 12) Palanza P, Morellini F, Parmigiani S and von Saal FS (1999): Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**: 1011-1027.
- 13) Parmigiani S, Palanza P and von Saal FS (1998): Ethotoxicology: an evolutionary approach to the study of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Toxicology and Industrial Health*, **14**: 333-339.
- 14) Palanza P, Parmigiani S and von Saal FS (2001): Effects of prenatal exposure to low doses of diethylstilbestrol, DDT on postnatal growth and neurobehavioral development in male and female mice. *Hormones and Behavior*, **40**: 252-265.
- 15) Palanza P, Morellini F, Parmigiani S and von Saal FS (2002): Ethological methods to study the effects of maternal exposure to estrogenic endocrine disruptors: a study with methoxychlor. *Neurotoxicology and Teratology*, **24**: 55-69.