

한국인으로부터 분리한 *Pediococcus pentosaceus* EROM101의 면역증강 및 항암활성

송미경 · 우석규 · 장정순 · 김중학 · 김화영 · 홍성길 · 이병욱 · 박미현* · 정건섭¹
(주)이롬라이프 생명과학연구원, ¹연세대학교 생물자원공학과

Immunostimulating and Anti-cancer Effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 Isolated from Korea. Song, Mi-Kyung, Seok-Gyu Woo, Jung-Soon Jang, Jung-Hak Kim, Hwa-Young Kim, Seong-Gil Hong, Byung-Wook Lee, Mi-Hyun Park, and Kun Sub Chung¹. EromLife R&D center, EromLife Co. Ltd, Seoul, 135-010, Korea, ¹Dept. of Biological Resources & Technology, Yonsei Univeristy, Kangwondo, 220-710, Korea – Immunostimulating effects of lactic acid bacteria as biological response modifier is a subject of growing interest, but the knowledge of these focused on some bacteria as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. In this study, we investigated the effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 on the immunostimulating and anti-cancer activity in murine model. *P. pentosaceus* was mainly found in Kimchi and fermented sea food and is facultatively anaerobic, catalase-negative, gram-positive cocci arranged in pairs, tetrads and clusters. The immunostimulating effects of *P. pentosaceus* EROM101 were evaluated using IgA production assay of Peyer's patch and proliferation assay of exudated immune cells of Balb/C mice fed *P. pentosaceus* EROM101 for 3 weeks. The macrophage and splenocyte proliferation were enhanced by orally administrated of *P. pentosaceus* EROM101. Also, IgA production in Peyer's patch increased by *P. pentosaceus* EROM101. Anti-cancer activity of *P. pentosaceus* EROM101 was appeared in Sarcoma 180 tumor-bearing ICR mice. However, this bacterium lysate itself appeared to have noncytotoxic substance against Sarcoma 180 cell *in vitro*. These results suggested that *P. pentosaceus* EROM101 reinforce immune system and therefore was revealed to be anti-cancer activity in mice.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*, immunostimulant, anti-cancer, lactic acid bacteria

1900년대 메치니코프가 유산균에 의한 수명 연장 효과를 발표하면서부터 본격화된 유산균에 관한 연구는 1960년대 Bogdanov 등[1]이 *Lactobacillus bulgaricus*가 실험동물의 복수로 이식된 복수암 세포주인 Sarcoma 180의 성장을 현저하게 억제한다고 발표하면서 더욱 관심을 집중시키게 되었다. 특히, 항암제와 함께 사용되어 생물학적 반응을 조절할 수 있는 보조약제(Biological Response Modifier, BRM)의 일종으로 생체내 면역기능을 활성화시키는 방법에 관한 연구가 활발히 진행되었다. 현재 BRM으로 사용하고 있는 생균제제로는 *Mycobacterium bovis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium parvum* 등이 이용되고 있으나, 이들은 낮은 빈도로 감염증이나 다른 합병증을 유발하는 것으로 보고되어 있어 임상사용이 극히 제한적으로 이루어지고 있다[2-4]. 따라서, 새로운 면역요법의 필요성이 증가함에 따라 항암과 면역활성을 가지고 식품으로서의 사용에 안전성이 확보되어 있는 유산균에 대한 관심이 더욱 높아지고

있다. 유산균이 생체내의 반응을 조절하는 BRM으로서의 역할은 장내에서 서식하며 자연살세포(Natural Killer cell)이나 대식세포(Macrophage) 등을 활성화 시켜 체액성 면역활성 증가에 기인한다고 알려져 있으나 최근 들어서는 세포성 면역을 담당하는 비장세포의 활성화에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 그러나 현재까지 BRM으로서 유산균에 관한 연구는 주로 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 속에 한정되고 있었고, 최근 들어 *Streptococcus*, *Leuconostoc* 속에 대한 연구도 활발히 진행 중에 있으나 이외의 유산균에 대한 연구는 미미한 실정이다.

*Pediococcus pentosaceus*는 김치 또는 젓갈 발효에 이용되는 호염성의 4연쇄상 유산균으로 주로 항균성 peptide인 bacteriocin 중 pediocin의 생산 균주로서 널리 알려져 있으나 아직까지 BRM의 자원으로서의 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다[5-6]. 그러나 *Pediococcus* 속은 최근의 계통분류학상으로는 완전히 *Lactobacillus* 속에 속하며, 세포벽 성분 또한 *Lactobacillus* 속의 peptidoglycan과 동일한 Lys-Ala-Asp 형태를 가지고 있어 *Lactobacillus* 속이 가지는 BRM으로서 기능을 발휘할 가능성이 높다[7]. 본 연구에서는 한국인의 장으로부터 분리한 유산균 중 생체내 면역

*Corresponding author
Tel: 82-2-3345-3377, Fax: 518-6721
E-mail : mhpark@erom.eromlife.co.kr

증강 및 항암활성을 보여주는 *P. pentosaceus* EROM101을 선별하여 BRM으로서의 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리 및 동정

한국의 대학생 20명으로부터 분변을 채취하여 LBS agar (Lactic acid Bacteria Selection agar)에서 유산균을 분리하였다. 분리된 유산균을 MRS broth로 배양한 뒤 균체를 수거하여 초음파 파쇄 후에 상층액을 시료로 하여 mouse 대식세포 증식 유도능을 비교하여 활성이 높은 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Gram염색 후 현미경관찰과 API50CHL kit(BioMerieux, France) 분석을 통하여 동정하였다.

유산균 시료의 제조

P. pentosaceus EROM101(KFCC11307)과 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356은 MRS broth에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 균체만을 회수한 후 생리식염수로 2회 세척하였다.

유산균 생균 시료는 수거된 유산균을 saline에 현탁시켜 1×10^9 /mL 이 되도록 균수를 조절하여 생균 시료로서 사용하였다. 유산균 파쇄액의 제조는 1×10^9 /mL로 조정된 유산균 현탁액에 lysozyme을 가한 후 25°C에서 30분간 반응하였다. 이후 초음파 파쇄기(Fisher Scientific Model 5000)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이후 세포 파쇄액을 12,000 g에서 10분간 원심분리하여 불용성의 물질을 제거한 이후 수거된 상등액을 시료로 사용하였다.

실험 동물 및 처리

P. pentosaceus EROM101의 면역 증강 활성을 알아보기 위하여 3주령의 Balb/c mouse를 대한바이오링크로부터 분양 받아 사용하였으며, 사육환경은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 20\%$, 12시간 조명하에 사육하였다. 사료는 마우스용 고형 사료를, 음수는 상수도수를 제한 없이 섭취시켰다. 상기에서 배양 제조된 *P. pentosaceus* EROM101 생균(ER group) 및 파쇄액(EL group)과 *L. acidophilus*의 생균(LR group) 및 파쇄액(LL group)의 면역증강 효과를 확인하기 위하여 실험동물에게 1일 1회 1수당 1×10^9 cell의 농도로 3주간 경구 투여하였다. 실험 동물은 *P. pentosaceus* EROM101 생균 섭취군(ER group) 및 파쇄액 섭취군(EL group)과 *L. acidophilus*의 생균 섭취군(LR group) 및 파쇄액 섭취군(LL group)으로 분류하였다.

대식세포 활성 측정

대식세포 활성화 능력을 측정하기 위하여 3주간 시료를 섭취시킨 실험동물에게 1 mL의 thioglycollate를 투여하고 72 시간 이후 희생시키고, RPMI 1648배지 5 mL을 복강에 주

입하여 세척한 후 다시 회수한 뒤 원심분리를 통하여 대식세포를 분리하였다. 분리된 대식세포를 1×10^5 cell/well이 되도록 희석한 뒤 일정량을 96 well microplate에 분주하였다. 이후 37°C에서 2시간동안 배양한 이후 상층액을 제거하고 새로운 RPMI 1640(10% FBS)배지를 첨가하여 24시간 추가 배양하였다. 대식세포의 활성은 대식세포가 활성화되었을 때 분비되는 lysosomal enzyme의 활성을 측정하여 결정하였다. 즉, 추가 배양된 대식세포의 배양액을 제거하고, 0.1% Triton X-100을 첨가한 이후 10 mM의 *p*-nitrophenyl phosphate와 0.1 M citrate buffer(pH 6.0)을 첨가하여 37°C에서 45분간 반응시킨 뒤 0.2 M borate buffer를 추가하여 반응을 종료시킨다. 이후 이 반응액의 흡광도를 405nm에서 측정하여 대식세포의 활성을 측정하였으며, 본 실험에서 양성대조군으로는 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하여 비교 평가하였다.

비장세포 활성 측정

비장세포의 활성화 능력을 측정하기 위하여 실험 동물을 경추탈골하여 희생시킨 후 곧바로 비장을 적출하였다. 적출해낸 비장은 mesh를 통하여 분쇄하고 원심분리하여 상층을 제거하여 비장세포를 회수하였다. 이후, 적혈구 lysis buffer로 잔여 적혈구를 제거한 뒤 RPMI 1640 배지를 이용하여 2회 세척하였다. 얻어진 비장세포를 5×10^5 cells/well로 농도 조절한 후 96 well microplate에 분주하고 72시간 동안 추가 배양하였다. 이후 비장세포의 활성은 세포 생존도를 통하여 분석하였고, 세포 생존도 측정은 MTS 방법을 이용하여 분석하였다. 비장세포의 활성은 T세포 활성화 유도물질인 LPS와 B세포 활성화 유도물질인 concanavalin A(ConA)을 양성대조군으로 사용하여 비교 평가하였다.

Immunoglobulin A의 정량

장관면역 활성의 측정은 소장점막상피세포(Peyer's patch)에서 분비되는 immunoglobulin A(IgA)의 함량을 측정하여 결정하였다. 유산균시료를 3주간 경구 섭취한 실험동물의 소장점막상피세포를 분리한 이후 1×10^6 cells/well 이 되도록 세포농도를 조절하여 24 well microplate를 분주하고 5일간 추가 배양하였다. 이후 상등액을 취하여 Pharmingen사(U.S.A.)의 IgA 측정 immunoassay kit를 이용하여 IgA의 함량을 측정하였다. 양성대조군으로는 유산균시료를 섭취하지 않는 실험동물로부터 분리된 소장점막상피세포에 LPS를 처리하여 5일간 배양한 이후 IgA의 함량을 측정하였다.

항암효과의 측정

4주령의 ICR mouse를 대한바이오링크로부터 분양 받아 상기의 실험 동물 조건에서 사육하였으며, 입수 후 1주간 사육 환경에 적응시킨 이후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 복수암 세포주인 Sarcoma 180(KCLB 40066)은 한국세포은행으로부터 분양 받아 사용하였다. Sarcoma 180 세포

주는 ICR mouse의 복강으로 13일 간격으로 계대 배양하였으며, mouse의 복강으로부터 Sarcoma 180 세포주를 분리/수거 한 뒤 1×10^7 cell/mL로 농도를 조절하고 실험동물의 복강에 0.1 mL씩 주사하여 복수암을 유발시켰다. 이후 *P. pentosaceus* EROM101 균주 및 *L. acidophilus* 균주의 파쇄액을 0.2 mL씩 2일 간격으로 14일간 복강에 주사하였고 실험기간동안 체중과 생존율을 조사하였다. 유산균시료를 처리하지 않고 복수암 세포주만을 이식한 실험동물을 대조군으로 하여 비교 평가하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

20명의 한국 대학생의 분변으로부터 분리한 유산균주의 파쇄액을 이용하여 대식세포 활성을 조사하였으며, 그 결과 대식세포 활성이 우수한 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 API50CHL kit를 이용하여 동정한 결과 Table 1과 같은 당 이용성을 나타내어 *P. pentosaceus*와 99.9%의 상동성을 나타내었으며, 현미경 관찰 결과에서도 4연쇄상 구균임을 확인하였다. 따라서, 분리 균주를 *P. pentosaceus* EROM101로 명명하였으며, 한국중균협회에 기탁하여 *P. pentosaceus* KFCC11307로 등록하였다.

Table 1. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 using API50CHL kit.

Substrate	Utilization	Substrate	Utilization
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto-gluconate	-
Esculine	+		

대식세포 활성 측정

실험동물에게 3주간 *P. pentosaceus* EROM101의 생균 및 파쇄액, *L. acidophilus*의 생균 및 파쇄액을 경구 투여한 이후 분리한 대식세포의 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. 대식세포의 활성화를 유도하는 물질로 LPS를 대조군에서 분리한 대식세포에 첨가한 실험군을 양성대조군으로 하여 비교 평가한 결과 *P. pentosaceus* EROM101의 생균 투여군은 $92.6 \pm 15.71\%$ 를 나타내었으며, 파쇄액 투여군은 $111.5 \pm 6.8\%$ 의 상대 활성도를 나타내어 대식세포의 활성을 유도하는 기능이 있는 것으로 판명되었다. 또한, *P. pentosaceus* EROM101의 생균 투여군보다 파쇄액의 투여가 더 뛰어난 대식 세포 활성능을 나타내었다. 반면 대조 유산균으로 사용한 *L. acidophilus* 투여군은 생균에서 $83.2 \pm 16.8\%$, 파쇄액 투여군에서는 $106.0 \pm 15.6\%$ 를 나타내어 *P. pentosaceus* EROM101보다 낮은 활성을 나타내었다.

Chae 등의 연구에서는 김치 유산균을 경구 투여할 경우 장내 분비 항체와 특이 항체생산 세포의 증가와 함께 혈액 내의 interleukin-2와 TNF-alpha의 분비량이 증가되고, 이러한 작용이 최종적으로 면역활성 작용으로 나타난다고 보고하여 유산균의 경구 투여에 의한 면역 활성화 작용이 있음을 확인하였다[8]. 또한, Park 등의 연구에서는 김치 유산균 파쇄액을 경구 투여하였을 경우 대식세포가 현저하게 활성화되어 *Staphylococcus aureus*에 대한 phagocytosis가 증가된다고 보고하였다[9]. 유산균과 같은 BRM이 생체내에서 효과를 발휘하는 것은 크게 두가지로 구분될 수 있다. 첫 번째는 투여된 유산균이 장내에 정착 증식하며 지속적으로 활성을 나타내는 것이며, 두 번째는 투여된 유산균이 장내에 정착하여 증식하지는 못하지만 균체를 구성하는 성분이 장내에서 작용하여 면역기능을 조절하는 것이다. *P. pentosaceus*

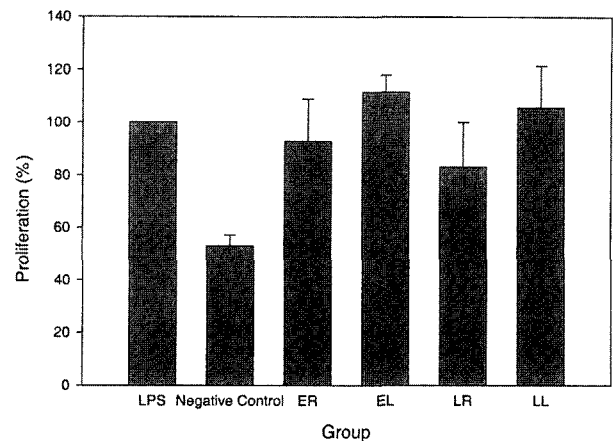


Fig. 1. Effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 on macrophage proliferation after oral administration in mice. LPS, Lipopolysaccharide; ER, *Pediococcus pentosaceus* EROM101 raw cells; EL, *Pediococcus pentosaceus* EROM101 lysate; LR, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 raw cells; LL, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 lysate.

EROM101의 경우 생균을 직접 경구 투여하는 것보다 세포 파쇄액을 제조하여 경구 투여하였을 경우 대식세포 활성화 능력이 더 뛰어난 것으로 나타나 생균이 직접 면역활성을 나타내는 것이라기 보다는 세포구성 성분이 장 점막에 직접 작용하여 면역조절 능력을 나타내는 것으로 사료된다.

비장세포 활성 측정

T세포의 활성화를 유도하는 물질로 알려져 있는 LPS를 대조군에서 분리한 splenocyte에 첨가하여 T세포 활성을 유도한 실험군을 양성대조군으로 하여 비교평가 한 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같이 나타났다. 즉, *P. pentosaceus* EROM101 생균 투여군은 96.6±15.0%, 파쇄액 투여군은 107.3±8.1%로 나타난 반면 *L. acidophilus*의 경우는 생균이 84.7±8.9%, 파쇄액은 79.5±10.1%의 활성을 나타내었다. 대식세포에서와 마찬가지로 생균 투여군보다 파쇄액 투여군이 더 높은 활성을 나타내었으며, *L. acidophilus* 투여군의 경우는 생균 투여군이 더 높은 효과를 나타내었다. B세포의 활성을 유도하는 ConA를 사용하여 splenocyte를 활성화시킨 군을 양성대조군으로 하여 비교 평가한 결과 *P. pentosaceus* EROM101 생균 투여군은 106.0±11.7%, 파쇄액 투여군은 115.8±13.1%로 나타난 반면 *L. acidophilus*의 경우는 생균이 85.5±9.0%, 80.2±10.1%를 나타내었다. 이 결과는 앞서의 실험결과와 동일하게 파쇄액이 면역활성을 조절하는데 있어서 더 유효성이 높은 것으로 사료되었다.

일반적으로 유산균의 투여에 의하여 나타나는 면역활성은 대식세포 또는 NK세포의 활성 증가와 같은 체액성 면역과 밀접하게 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, T세포 및 B세포 활성화와 같은 세포성 면역과는 관련성이 적은 것으로 보고되어 있었다[10-11]. 그러나 최근 들어 Kirjavainen 등은

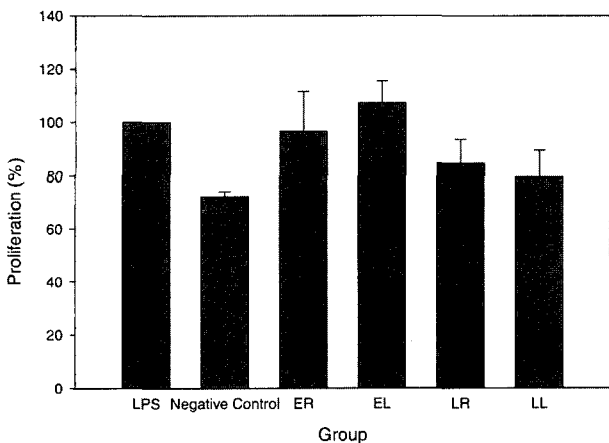


Fig. 2. Effects of *Pedococcus pentosaceus* EROM101 on splenocyte proliferation after oral administration in mice. LPS, Lipopolysaccharide; ER, *Pedococcus pentosaceus* EROM101 raw cells; EL, *Pedococcus pentosaceus* EROM101 lysate; LR, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 raw cells; LL, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 lysate.

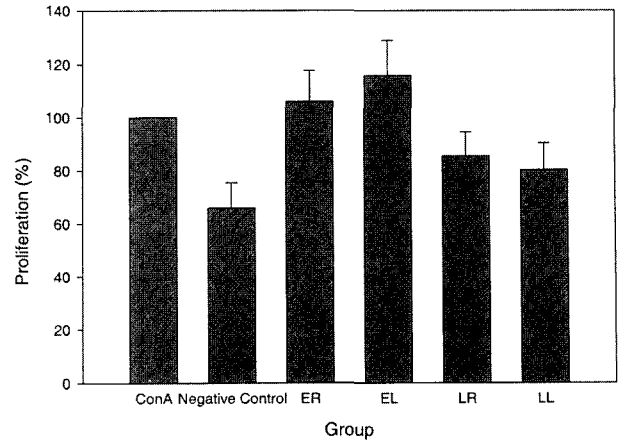


Fig. 3. Effects of *Pedococcus pentosaceus* EROM101 on splenocyte proliferation after oral administration in mice. ConA, Concanavaline A; ER, *Pedococcus pentosaceus* EROM101 raw cells; EL, *Pedococcus pentosaceus* EROM101 lysate; LR, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 raw cells; LL, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 lysate.

L. rhamnosus GG 등의 유산균을 실험동물에게 경구 투여한 뒤, 이 실험동물로부터 분리한 splenocyte의 활성을 조사한 결과, 유산균의 섭취가 비장세포의 분열을 촉진하여 면역을 증강시킨다고 보고하고 있어[12], 유산균이 단순 체액성 면역증강뿐만 아니라 세포성 면역증강에도 영향이 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 결과에서도 *L. acidophilus*의 경우 대식세포 활성화능에 비하여 비장세포 활성화능이 약한 것으로 나타나, 기존의 연구보고와 같이 세포성 면역증강효과는 체액성 면역증강효과보다 일반 유산균의 경우 활성이 떨어지는 것으로 사료된다. 반면에 *P. pentosaceus* EROM101의 경우 T세포 활성화 물질인 LPS나 B세포 활성화 물질인 ConA를 처리한 군보다 높은 활성을 나타내었다. 즉, *P. pentosaceus* EROM101은 대식세포 활성화로 대표되는 체액성 면역증강 기능과 더불어 splenocyte가 관여하는 체액성 면역활성화 기능도 동시에 포함하고 있는 것으로 사료된다. 그러나 대식세포 활성화 결과와 유사하게 생균 투여시보다 파쇄액 투여시 더 높은 활성을 가진 것으로 나타나 장내에서 유산균 자체의 성장에 의한 효과가 아닌 균체성분이 면역증강활성을 나타내는 것으로 사료된다.

소장점막세포(Peyer's patch)에서 IgA의 생산 증강 효과

IgA는 코 및 장 등의 점막에서 면역조절을 담당하는 인체의 중요한 면역글로불린중의 하나이다. IgA는 다른 면역글로불린과 다르게 점막을 통하여 외부로 배출되는 면역글로불린이다. IgA는 미생물이나 독소 등의 외부 항원(allergen)이 점막에 면역반응이나 염증반응을 유발하는 것을 막는 기능을 수행한다. 즉, IgA는 외부 항원이 점막에 결합하지 못하게 하는 일차적 점막 방어기전(primary mucosal defense

mechanism)의 중요한 기능으로 장의 만성염증 질환인 크론 병 등의 개선에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13]. 특히, 유산균의 정상기능증의 하나로서 장 점막의 IgA 분비를 증가시키는 기능성은 여러 보고에서 알려져 있어 이의 임상적인 응용 연구가 널리 진행되고 있다[14-15].

P. pentosaceus EROM101 및 *L. acidophilus*의 파쇄액을 3주간 경구 투여한 후 소장점막세포에서 IgA의 생성량을 측정한 결과(Fig. 4) 시료를 섭취하지 않은 대조군의 경우 2.98 ± 0.22 ug/mL이 나타났으나, *P. pentosaceus* EROM101을 3주간 섭취한 실험동물에서는 11.25 ± 1.25 ug/mL로 약 4배 이상 IgA의 분비량이 증가하는 것으로 나타났다. 대조군의 소장점막세포에 항원으로서 ConA를 첨가하여 배양하였을 경우에도 3.91 ± 2.30 ug/mL의 농도로 나타나 *P. pentosaceus* EROM101의 효능에 미치지 못하였다. 또한, *L. acidophilus* 파쇄액을 섭취한 군의 경우에는 7.60 ± 0.13 ug/mL의 농도로 IgA가 검출되어 ConA 첨가 배양시보다는 IgA 분비량이 증가하였으나 *P. pentosaceus* EROM101에 비해서는 낮은 것으로 나타났다.

Takahashi 등은 *Bifidobacterium*을 2주간 경구 투여하였을 경우 장 점막에서 IgA의 생산량이 증가한다고 하여 유산균에 의해 장 점막에서 IgA 분비량이 증가가 이루어짐을 보고하였다[16]. 또한, Tejada-Simon 등은 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium*을 함유한 요구르트를 3주간 mouse에게 경구 투여한 이후 IgA의 분비량이 증가한다고 보고하였으며, 이 결과는 본 연구에서 *L. acidophilus*의 경구투여로 IgA 분비량의 증가가 나타난 것과 동일한 결과였다[17]. 본 연구에서는 기존의 *Lactobacillus*나 *Bifidobacterium*와 같은 발효유에 사용되는 유산균이 아닌 김치 또는 젓갈류의 발효에 주로 이용되고 있는 *P. pentosaceus* EROM101에 의해 IgA의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이런 결과로

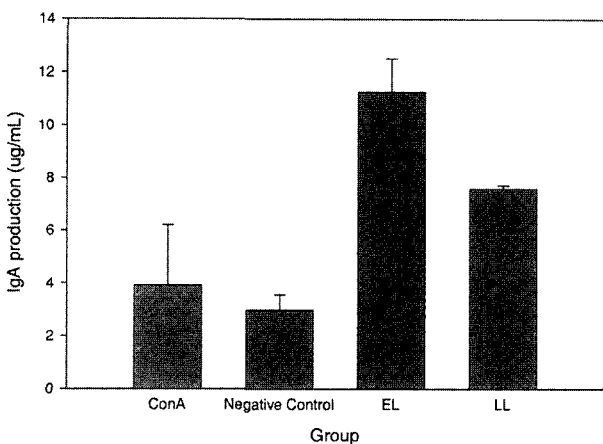


Fig. 4. Effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 on immunoglobulin A production with concanavaline A after oral administration in mice's peyer's patch. ConA, Concanavaline A; EL, *Pediococcus pentosaceus* EROM101 lysate; LL, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 lysate.

비추어 볼 때 *P. pentosaceus* EROM101의 경구 섭취가 장관 면역 기능을 조절하는 정상작용에 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 추측된다.

복수암 세포에 대한 항암 활성

유산균의 암세포 증식 억제 효과는 1950년대에 처음으로 보고되었으며 이후 지속적인 연구를 통하여 *Lactobacillus*속을 비롯하여 *Streptococcus*속 및 *Leuconostoc*속, *Bifidobacterium*속의 유산균 들이 암세포 생장 억제 효능이 있음이 계속 보고되고 있다[18-20].

본 연구에서는 Sarcoma 180 복수암 세포주를 실험 동물의 복강에 이식한 이후 *P. pentosaceus* EROM101 및 *L. acidophilus* 파쇄액을 2주간 투여하며 복수암에 대한 항암 효능을 평가하였다. Sarcoma 180 세포주만을 이식한 대조군은 Sarcoma 180 복수암 세포주를 이식하지 않은 정상군에 비하여 동일 기간동안 체중 증가량이 약 44%가 증가하였으며, 이는 복수암 세포의 성장에 의한 것으로 사료되었다. 또한, 정상군의 체중 증가량에 대비하여 대조 유산균인 *L.*

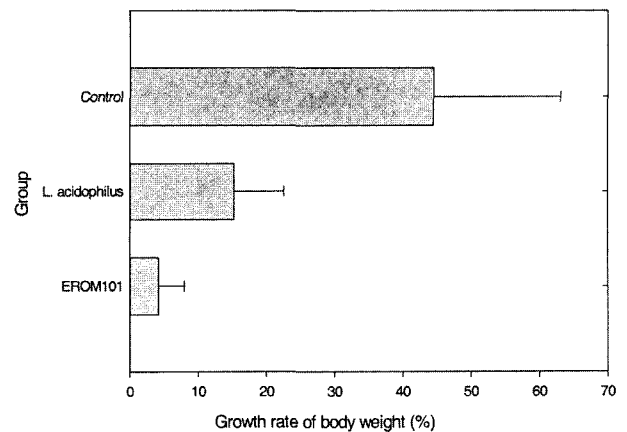


Fig. 5. Anti-cancer effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 lysate in mice.

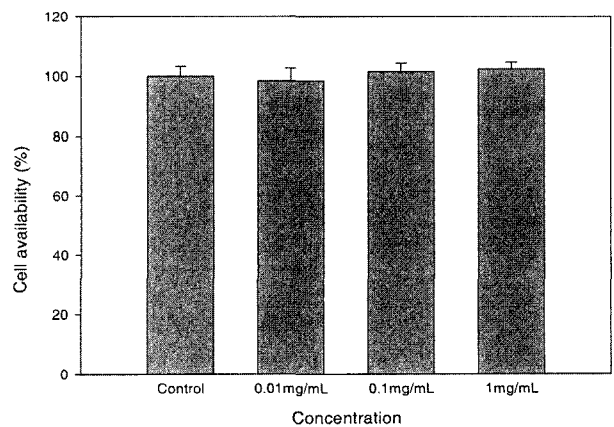


Fig. 6. Cytotoxic effects of *Pediococcus pentosaceus* EROM101 lysate on Sarcoma 180 cancer cell line.

acidophilus 투여군은 15%, *P. pentosaceus* EROM101 투여군은 4%만의 체중 증가량을 나타내었다. *L. acidophilus* 군주도 항암효과를 나타내었으나 *L. acidophilus*보다 *P. pentosaceus* EROM101의 항암효과가 더 뛰어난 것으로 사료되었다.

본 연구에서 사용된 균주가 항암 효과를 나타내는 기전을 확인하기 위하여 직접적으로 *P. pentosaceus* EROM101의 세포독성을 확인하였다. 즉, Sarcoma 180과 함께 *P. pentosaceus* EROM101의 파쇄액을 함께 배양하였으며, 그 결과 *P. pentosaceus* EROM101의 파쇄액은 1 mg/mL의 농도에서 Sarcoma 180의 세포생육도에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서, *P. pentosaceus* EROM101의 투여에 의하여 나타나는 복수암 세포 Sarcoma 180의 성장 억제 효과는 *P. pentosaceus* EROM101의 직접적인 세포독성이 아니라 *P. pentosaceus* EROM101에 의하여 나타나는 면역증강효과에 의한 것으로 추측되었다.

이상의 결과를 종합할 때 *P. pentosaceus* EROM101의 경구 섭취시 생체내 면역반응을 조절하여 항암 및 면역증강작용을 나타내는 유산균 BRM으로써의 가능성을 강력히 제시해 주고 있다. 그러나 *Pediococcus* 속에 대한 면역증강 또는 항암활성에 대한 연구가 다른 유산균주에 비하여 많지 않으므로, 본 연구에 이어 *P. pentosaceus* EROM101에서 항암 및 면역증강효과를 나타내는 물질에 대한 연구를 진행중에 있다.

요 약

사람 분변으로부터 대식세포 활성 증강효능이 있는 유산균을 선별하여 이를 동정한 결과 *P. pentosaceus*로 동정되었으며, 이 균주를 *P. pentosaceus* EROM101로 명명하였다. *P. pentosaceus* EROM101의 면역증강 및 항암활성을 알아보기 위하여 실험동물에게 3주간 생균 및 파쇄액을 경구 투여한 뒤 대식세포와 비장세포의 활성화를 측정하였으며, 동시에 소장점막상피세포에서 생산되는 IgA의 함량을 측정하였다. *P. pentosaceus* EROM101의 경구 투여는 대식세포 및 비장세포의 분열을 촉진하여 면역증강 기능이 있는 것으로 나타났다. 특히, 생균보다 파쇄액에서 활성이 더 뛰어난 것으로 나타나, *P. pentosaceus* EROM101은 장내에서 생균으로 서식하여 지속적으로 면역증강 기능을 나타내는 것이 아닌 세포 구성물에서 면역증강활성이 있는 것으로 사료되었다. 또한, 소장점막상피세포에서 IgA의 분비량에서도 대조군보다 약 4배이상의 IgA 생산량을 증가시켜 장관면역 활성화 기능이 있는 것으로 판단되었다. 또한 *P. pentosaceus* EROM101 파쇄액이 Sarcoma 180 복수암세포를 이식해 준 실험동물 내에서 복수암성장을 억제하였으나, Sarcoma 180 세포열에 대한 세포독성을 나타내지 않아 면역증강에 의해서 항암 활성이 나타난 것으로 추측되었다. 이상의 연구결

과에서 *P. pentosaceus* EROM101은 면역증강 능력이 있으며, 동시에 항암 활성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Bogdanov, I.G., P.G. Dalev, A.I. Gurevich, M.N. Kolosov, V.P. Malekova, L.A. Plemyannikova, and I.B. Sorokina. 1975. Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett.* 1: 259-261.
- Sato, H., A. Yokosawa, H. Arai, H. Nagai, N. Kumano, M. Motomiya, and K. Konno. 1978. Antitumor activity of hot-water extract from delipidated BCG. *Tohoku. J. Exp. Med.* 125: 247-252.
- Milas, L., B. Hunter, K. Mason, D. Grdina, and H. Withers. 1975. Nonspecific Immunotherapy of Murine Solid Tumors With *Corynebacterium granulosum*. *J. Natl. Cancer. Inst.* 54: 895-902.
- Proft, T., V.L. Arcus, V. Handley, E.N. Baker, and J.D. Fraser. 2001. Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. *J. Immunol.* 2001 166: 6711-6719.
- Facklam, R. and J.A. Elliott. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 479-495.
- Osmanagaoglu, O., Y. Beyatli, U. Gunduz, and S.C. Sacilik. 2000. Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. *J. Basic. Microbiol.* 40: 233-241.
- de Ambrosini, V.M., S. Gonzalez, G. Perdigon, H.A.P. de Ruiz, and G. Oliver. 1996. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem. Pharm. Bull.* 44: 2263-2267.
- Chae, O.W., K.S. Shin., H.W. Chung, and T.B. Choe. 1988. Immunostimulating effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 424-430.
- Park, I.S. 1992. Function and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. Ph.D. thesis. Chung-Ang Univ. Korea.
- Yasutake, N., M. Ohwaki, M. Mutai, Y. Koide, and T. Yoshida. 1985. Anti-tumour effect of humoral and cellular immunities mediated by a bacterial immunopotentiator, *Lactobacillus casei*, in mice. *Cancer. Immunol. Immunother.* 20: 109-116.
- Matsuzaki, T., T. Yokokura, and I. Azuma. 1987. Antimetastatic effect of *Lactobacillus casei* YIT9018 (LC 9018) on a highly metastatic variant of B16 melanoma in C57BL/6J mice. *Cancer. Immunol. Immunother.* 24: 99-105.
- Kirjavainen, P.V., H.S. Elnezami, S.J. Salminen, J.T. Ahokas, and P.F.A. Wright. 1999. Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte

- proliferation. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **6**: 799-802.
13. Takahashi, I. and H. Kiyono. 1999. Gut as the largest immunologic tissue. *J. Parenter. Enterol. Nutr.* **23**: S7-S12.
 14. Isolauri, E., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, and S. Salminen. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 444S-450S.
 15. McGhee, J.R. and H. Kiyono. 1993. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect. Agents. Dis.* **2**: 55-73.
 16. Takahashi, T., N.T. Nakagawa, T. Yajima, and T. Kuwata. 1998. Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 10-15.
 17. Tejada-Simon, M.V., J.H. Lee, Z. Ustunol, and J.J. Pestka. 1999. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiates immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J. Dairy. Sci.* **82**: 649-660.
 18. Kelkar, S.M., M.A. Shenoy, and G.S. Kaklij. 1988. Antitumor activity of lactic acid bacteria on a solid fibrosarcoma, sarcoma-180 and Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Lett.* **42**: 73-77.
 19. Kim, G.T., H. Bae, Y.J. Baek, and H.Y. Lee. 1994. Antitumor activity of *Bifidobacterium adolescentis* ATCC-15703 against Sarcoma 180 in mice. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 322-328.
 20. Yoshida, J., S. Takamura, and S. Suzuki. 1991. Antitumor action of an acidic glycoprotein (SAGP) from *Streptococcus pyogenes* in mice. *Biotherapy* **3**: 331-336.

(Received July 22, 2003/Accepted Nov. 8, 2003)