

젓갈에서 분리한 *Bacillus subtilis* SW-1의 항암활성

박종기 · 조용운 · 최영주¹ · 정영기² · 갈상완*

진주산업대학교 미생물공학과, ¹신라대학교 식품영양학과, ²동의대학교 미생물학과

Received August 12, 2004 / Accepted September 21, 2004

Antitumor activity of *Bacillus subtilis* SW-1 isolated from Jeotgal. Jong ki Park, Young Un Cho, Young Ju Choi¹, Yong Kee Jeong² and Sang Wan Gal*. Department of Microbiological Engineering, Chinju National University, 150 Chilamdong Chinju 660-758. ¹Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1 Sasanggu Goebeopdong Pusan, 617-736. ²Department of Life science and biotechnology, Dong eui University, San24 Jingu Gayadong Pusan, 614-010 – A bacterium containing antitumor activity was isolated from traditional korean food, Jeotgal. Through the 16s rRNA sequence analysis, the bacterium was identified as a strain of *Bacillus subtilis* SW-1. The best culture condition for antitumor activity of the bacterium is 3% of soluble starch and 1% of yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively. Cytotoxic concentrations of the culture supernatant of *B. subtilis* SW-1 against cancer cell lines, A549 and SK-OV3 were 30 μ l/ml and 40 μ l/ml, respectively, as IC₅₀ values. In DNA fragmentation assay, the culture supernatant showed the programmed cell death (apoptosis) to cause degrading the chromosomal DNA like ladder. Taken together, the culture supernatant of the *B. subtilis* SW-1 has some possibility to be used as an antitumor agent.

Key words – Jeotgal, *Bacillus subtilis*, antitumor, apoptosis

동서양을 막론하고 성인병은 국민의 생명과 복지를 위협하는 가장 중요한 요인으로 지목되고 있다. 특히 산업화가 이루어진 많은 국가에서는 암이 사망원인의 수위를 차지하고 있으며[17], 이를 조절하기 위한 꾸준한 연구개발에도 불구하고 지난 30여년간 그 발생률에는 별 차이를 보이지 않고 있다. 암의 발생은 90% 이상이 특정한 환경요인에 의하여 발생하며 이러한 요인 중 40~60%는 식이와 관련된다[3]. 이에 기초하여 최근 식생활과 연관된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 진행중이며, 한편으로는 식품 중에서 항암을 소유한 물질들의 개발에 대한 연구도 다양하게 이루어지고 있다.

항암제 screening 방법에는 중앙 system과 미생물 및 생화학적인 방법을 이용한 *in vitro* system이 있다[2]. *In vitro*에서 활성이 있던 물질이 *in vivo*에서 활성을 갖지 못하는 경우도 있지만, Foley와 Epstein[9]은 *in vitro*에서 사용되고 있는 screening 방법 중 human carcinoma cell을 이용하는 방법에서, cell line은 생체내 암세포가 나타내는 지속적인 성장·분열의 특성을 가진다는 점에서 항암물질의 개발에 많이 사용되고 있다고 밝히고 있다. 이런 방법으로 개발된 250개 항암물질의 82%가 *in vivo*에서도 활성이 있다고 밝혀, 현재 많이 밝혀지지 않은 미생물로부터 항암물질을 screening 하는 예비 방법으로 *in vitro* system을 사용할 수 있음을 시사하고 있다.

미생물을 이용한 항암 활성에 관한 연구는 1978년 Azuma

등[1]과 Milas등[11], 그리고 Yamaue[18] 등이 미생물의 세포 성분이 실험동물과 사람에게 현저한 항암 효과를 나타낸다는 보고를 한 이래, 이들이 이용한 암 치료용 약제가 개발되어 시판 되고 있으나 이 미생물들의 균체는 가끔 질병을 일으키고 임상적용을 가로막는 부작용을 야기 하고 있다[14].

따라서 최근에는 유산균이 동물 실험에서 높은 항암 효과를 나타낸다[7]는 보고 이후, 지난 10년간 유산균의 항암효과에 관한 연구가 활발히 진행 되어왔다[13,15]. 유산균은 옛부터 요구르트와 같은 발효 유제품에 이용되어온 그람 양성 비 병원성 균으로 인체에 독성이 없는 것으로 인식되어 왔다.

많은 연구에서, 유산균이 실험동물에서 육종(Sarcoma), 유종암(Carcinoma) 및 백혈병(Leukemia)의 성장을 강력하게 억제하는 것으로 보고 되었다[4,6]. 하지만 국내에서는 김등[8]이 유산균에 대한 항암 효과 등을 보고 한 것이 있으나 식품 미생물에 대한 항암 관련 연구는 거의 전무라 할 수 있다.

본 연구에서는 한국고유의 전통 발효 식품인 젓갈로부터 항암 활성을 갖는 미생물을 순수 분리, 동정하고 항암활성 물질 생산을 위한 최적배양조건 및 항암제로서의 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

젓갈로부터 항암물질 생산 미생물의 탐색

균주의 분리를 위하여 한국전통식품, 젓갈을 멸균수로 시험관(180mm×18mm)에 순차적으로 희석하여 Luria Bertani (LB) plate에 도말하여 single colony를 유도한 다음 각각의 colony들을 LB broth 5ml에 접종하여 30°C에서 24시간 배양

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@chinju.ac.kr

하였다. 그 배양액을 항암활성이 높은 균주를 선별하기 위해 사용하였다.

암세포 배양

세포독성 측정을 위해 사용한 인체암세포인 A549 (lung cancer cell line, ATCC CLL-185), SK-OV3 (ovarian cancer cell line, ATCC HTB-77) 그리고 HL60 (promyelocytic leukemia, ATCC CCL-240)를 ATCC에서 구입하여 사용하였고, 이들 세포주는 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Gibco, Rockville, MD, USA)에 10%(v/v) Fetal Bovine Serum (Gibco), 0.37% sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 혼합한 배지에 100unit의 streptomycin/penicillin을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양용기에서 분리하기 위한 trypsin 용액[16]은 Hank's balanced salts solution (HBSS)[12]에 0.05% (w/v)trypsin과 0.53 mM EDTA가 첨가된 것을 사용하였고 배양세포의 세척 등에는 HBSS를 사용하였다.

세포독성 측정

세포수의 측정에는 hemacytometer와 trypan blue 염색법을 이용하였다. 분리한 세포배양액 10 µl와 trypan blue solution (0.4% trypan blue, 0.8% NaCl, 0.06% KH₂PO₄, 0.05% methyl-p-hydroxybenzoate, pH7.2) 10 µl를 잘 혼합한 후 혼합액의 10 µl를 hemacytometer에 취해 inverted microscope를 이용해 세포수를 측정하였다.

세포독성은 1차적으로 세포의 형태변화를 관찰하여 항암 활성을 확인하였고, 암세포에 대한 시료의 세포독성을 측정하기 위하여 Carmichael의 방법[5,10]에 따라 MTT assay를 실시하였다. 암세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/well이 되게 하여 160 µl씩 분주하고 배양상등액 20 µl를 첨가하여 37°C에서 5% CO₂배양기로 24시간 배양하였다. 여기에 인산생리 식염수에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 20 µl를 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 2,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 각 well당 DMSO 150 µl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader (Molecular Device Co.)로 550nm에서 흡광도를 측정하여 성장억제효과(Growth inhibitory effect(%))=[(대조구의 흡광도-시료처리구의 흡광도)/대조구의 흡광도]×100를 구하여 세포독성 활성의 지표로 하였다. 또한, 암세포의 성장을 대조구에 비하여 50% 억제하는 시료의 농도를 IC₅₀으로 나타내었다. 대조구는 시료대신 대장균의 배양액을 첨가한 것으로 하였다.

항암물질 생산균주의 동정

항암활성을 갖는 미생물의 동정을 위하여 균의 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 형태학적 특성은 Scanning Electron Microscope (SEM)로 표면형태, 크기, sclerotia의 형태

유무등으로 관찰하였고, 정확한 동정을 위해 한국 미생물보존센터에 의뢰하여 16s rRNA sequence를 분석하여 유전자간의 상동성을 비교하여 동정하였다.

최적 배지조성 및 배양조건의 결정

미생물 생육 최적 탄소원은 최소배지인 M9[Na₂HPO₄ 0.6%, KH₂PO₄ 0.3%, NH₄Cl 0.1%, NaCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O solution (246.5g/L) 0.1%, Thiamine·HCl solution (1g/L) 0.1%, CaCl₂ solution (14.7g/L) 0.1%] 배지에 각종 탄소원을 1.0%로 첨가하였고, 최적 질소원은 각종 질소원을 1.0%로 첨가하여 생균수를 관찰하여 결정하였다. 또한 각각의 탄소원, 질소원 농도를 변화시키면서 균의 배양 상등액의 항암활성을 관찰하여 최적 배지조성을 결정하였다. 최적 배지 초기 pH는 위에서 결정된 최적 배지의 pH를 3.0~11.0으로 변화시키면서 결정하였고, 최적 배양온도는 온도를 20°C에서 45°C까지 변화시키면서, 그 활성을 측정하여 결정하였다.

분리 균주의 항암 활성

암세포는 폐암세포(A549)와 난소암(SK-OV3) 및 백혈구 암세포(HL-60)를 사용하였으며 항암제 Control로 현재 병원에서 사용중인 taxol (1 µg/ml)을 사용하여 활성을 비교하였다. 암세포는 95% 습도, 5% CO₂, 37°C 온도 조건에서 배양하였으며, 배지는 10% FBS가 든 α-DMEM을 사용하였고 48시간 간격으로 배지를 교체하였다. 배양액 처리 전 24시간에 1% FBS로 바꿨으며 Cell 수는 5×10⁴ cell/ml일때를 사용하였으며 농도별, 시간별 암세포의 사멸율을 typhan blue로 염색 후 counting 하였다.

DNA fragmentation assay

암세포에 대한 항암활성미생물의 apoptosis(계획된 세포 죽음)를 조사하기 위하여 암세포배양액에 항암 활성 미생물의 배양 상등액을 농도별 0, 10 µl/ml, 30 µl/ml, 50 µl/ml로 처리하고 24시간 후 chromosomal DNA를 분리하여 agarose gel electrophoresis를 실시하여 DNA분해 양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

항암성 물질 생산균주의 분리

멸균수로 희석한 한국전통 젓갈을 LB배지에 도말하여 24시간 동안 37°C에서 배양후 나타난 각 colony를 LB액체배지에 접종하고 24시간 배양하여 그 상등액을 항암활성 측정에 이용하였다.

젓갈로부터 분리한 약 2,000개의 colony 중에 1차적으로 항암활성이 강한 6균주를 선별하였고, 그 중 암세포 A549에 강한 세포독성을 나타내는 균주(Fig. 1)를 선별하여 이 균주를 SW-1이라고 명명하였다.

A549(lung cancer)

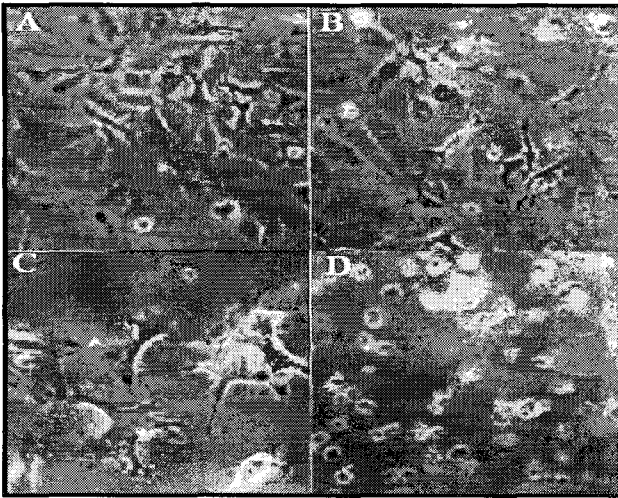


Fig. 1. Screening of bacteria containing high antitumor activity from jeotkal.

A: *E. coli* B: isolated bacterium
C: isolated bacterium D: isolated bacterium SW-1

분리균주의 동정

최종 분리 선정한 미생물 SW-1의 형태학적 규명을 위해 현미경 관찰 및 SEM 촬영 결과를 살펴 볼 때, 그람양성으로써 rod의 형태를 보였으며, 크기는 0.6×1.9 μm였고, 운동성이 있었다(Fig. 2). 또한 호기성의 불규칙한 cream형태의 흰색

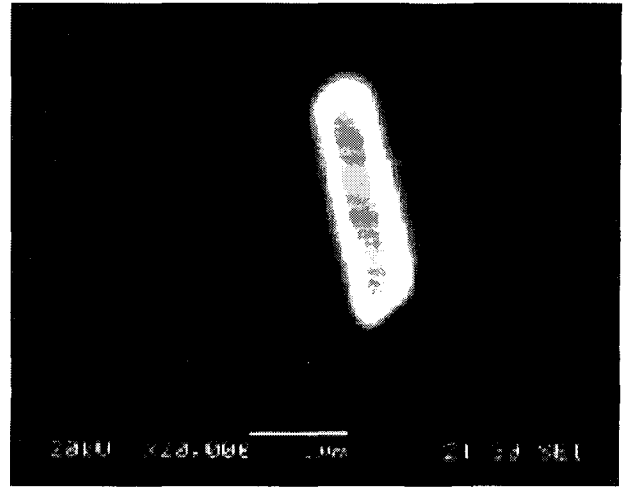


Fig. 2. Scanning electrophotogram of strain SW-1.

colony를 생성하였다. 정확한 동정을 위해 16s rRNA sequence를 결정하여 기존의 알려진 미생물과의 비교 결과 *Bacillus subtilis*와 99% 유사성을 나타냈다.(Fig. 3,4). 이상의 실험 결과로부터 젓갈류에서 분리한 항암 활성을 갖는 미생물을 *Bacillus subtilis*로 최종 동정하여, *Bacillus subtilis* SW-1로 명명하였다.

분리 균주의 항암 활성

Bacillus subtilis SW-1의 항암활성을 검토한 결과 A549, SK-

```

AGAGTTT GATCATGGCTCAGCACGAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG
CAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGT GAGTAAACCGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTACAGACATAA
AAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
CGGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGGGTTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCGCAACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACT
TGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACACCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCGCGCCCC
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCC
TCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCGCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTGAAGTGTGGGTAAAGTCCG
CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGACAGAAACA
AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAATCTGTTCTCAG
TCTGGATCGCAGTCTGCAACTGCATTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAGGTTCGGGGCCTTGACACACC
GCCCGTCAACCAACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCCGGTGAAGGTAACT
TTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTTGGGGTG
    
```

Fig. 3. 16s rRNA sequence of the isolated bacterium SW-1.

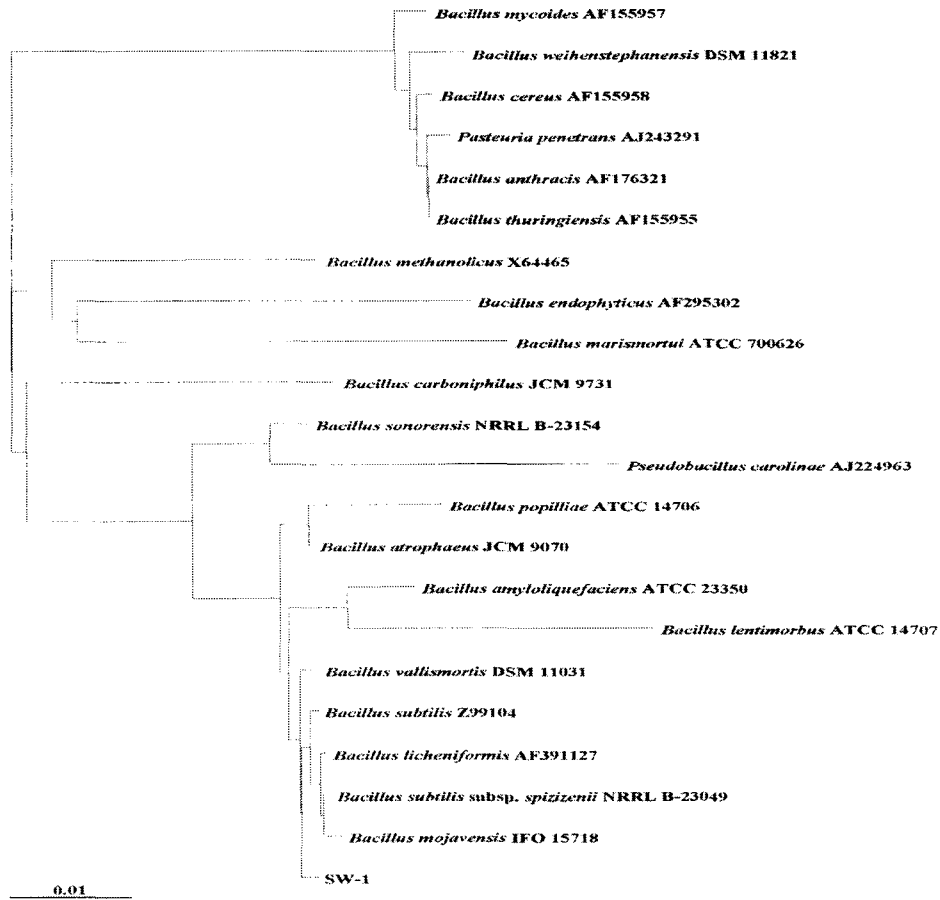


Fig. 4. Phylogenetic classification of SW-1.

OV3 세포의 경우 전반적으로 배양시간과 농도 의존적으로 세포생육을 억제하는 것으로 나타났다(Table 1). A549인 경우 30 µl/ml(SW-1 배양상등액/암세포 배양배지)의 배양상등액의 농도에서 IC₅₀를 나타내었으며 SK-OV3인 경우 50 µl/ml의 농도에서 그리고 HL60 cell인 경우 거의 세포독성을 나타내지 않았다.

항암물질생성 최적배양조건

배양온도에 따른 항암활성: 배양온도에 따른 항암활성의 변화를 보기 위하여 20, 25, 30, 35, 40, 45℃에서 각각 배양하여 비교해 본 결과는 Fig. 5와 같았다. 30℃에서 그 활성이 가장 우수하였다. 젓갈류에서 분리된 균주는 증온 발효시키기

때문에 대부분의 균주가 30~45℃에서 생육과 활성이 좋은 것으로 나타났고, *Bacillus subtilis* SW-1은 멸치젓에서 분리된 균주로써 증온인 30℃가 최적으로 나타났다.

초기 pH에 따른 항암 활성: 초기 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조정된 배양 배지에 SW-1 균주를 접종하여 배양 하였을 때 초기 pH가 4~6인 배지에서 항암활성이 가장 우수하였다. 이 결과로 볼때 본 균주는 약산성 쪽에서 활성을 나타내는 호산성 균주인 것으로 생각된다.

탄소원에 따른 항암활성: 항암 활성에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 기본 배지에 탄소원의 종류를 달리 하여 첨가한 후 30℃에서 24시간 진탕 배양하여 항암 활성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 2에 제시하였다. 탄소원의 경우, 항암 활성은 Soluble starch을 사용 하였을 때가 가장 좋았으며, 그 최적농도는 3.0%이었다.

질소원에 따른 항암 활성: 항암 활성에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 기본 배지에 질소원의 종류를 달리 하여 첨가한 후 30℃에서 24시간 진탕 배양하여 항암활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 2에 제시하였다. Yeast extract를 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6%에서 검토한 결과 Yeast extract의 최적 농도는 1.0%이었다.

Table 1. Effect of various cancer cell lines on the antitumor activity of *B. subtilis* SW-1.

Cell Lines	Activity
A549 (lung cancer cell line)	+++
SK-OV3 (ovary cancer cell line)	++
HL 60 (promyelocytic leukemia)	ND

+++ : very strong, ++ : strong, ND : not detected

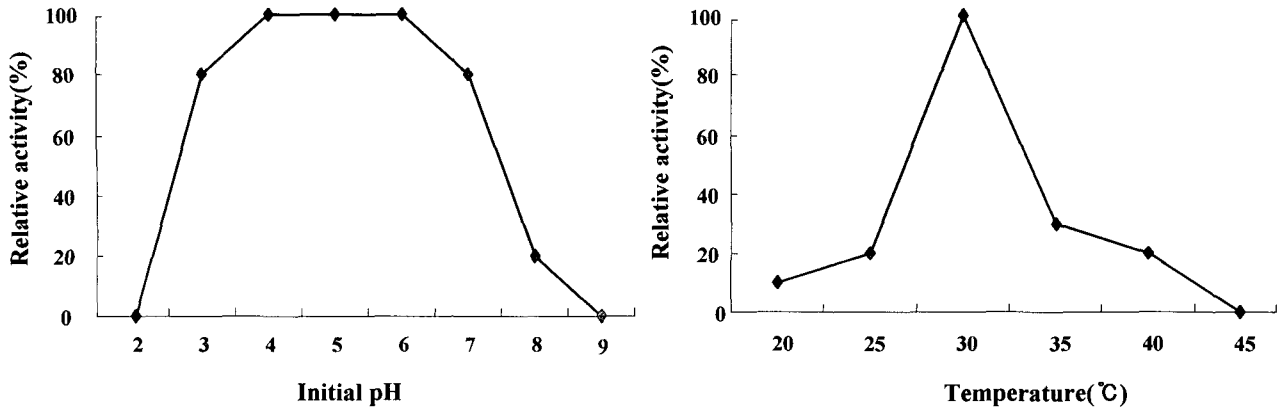


Fig. 5. Effect of initial pH (left) and culture temperature (right) on the antitumor material production from *B. subtilis* SW-1.

Table 2. The optimum medium composition and culture condition for the antitumor activities of *B. subtilis* SW-1

Composition of medium (g per liter of D.W)	
Soluble starch	30
Yeast extract	10
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.25
KH ₂ PO ₄	0.6
NH ₄ Cl	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
Temperature	30°C
pH	5.0

무기염에 따른 항암 활성: 무기염의 경우는 활성에 그다지 영향을 미치지 않았다(Table 2).

배양시간에 따른 항암 활성: 이상에서 검토한 최적 배지 조성(Table 2)을 사용하여 1%의 접종량으로 균주의 생육과 항암활성의 상관관계는 Fig. 6과 같다. 위에서 조사한 최적조건에서 배양하는 동안 균의 생육과 항암 활성을 검토한 결과, 접종 후 7시간이 경과하면서 대수증식기에 들어갔으며 18시간이 지나면서 정지기 및 사멸기에 도달하였고, 항암물질의 생산은 14시간이 지나면서 증가하기 시작하여 25시간

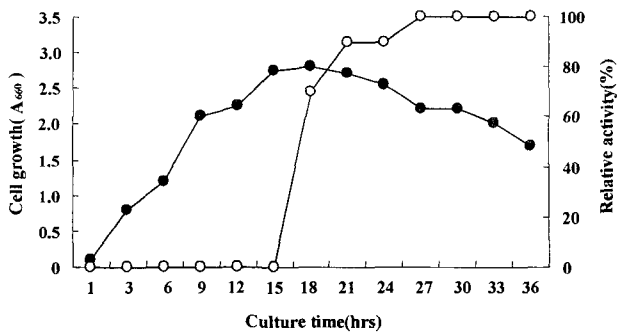


Fig. 6. Time course of the antitumor material production from *B. subtilis* SW-1.

—●—: Cell growth
—○—: Antitumor activity

이 경과한 후 최대 활성을 보였다(Fig. 6).

DNA fragmentation assay

항암제로서의 개발 가능성을 조사하는 실험단계로, DNA fragmentation assay가 있다. 일반적으로 암세포가 항암제에 의해 사멸할 때 apoptosis(계획된 세포죽음)의 현상으로 chromosomal DNA의 사닥다리모양으로 단편화가 주로 일어나며 이 관찰로 항암제로서의 이용 가능성을 확인한다. 본 미생물에서 분비된 항암활성물질은 본 실험에서 Fig. 7에서 보

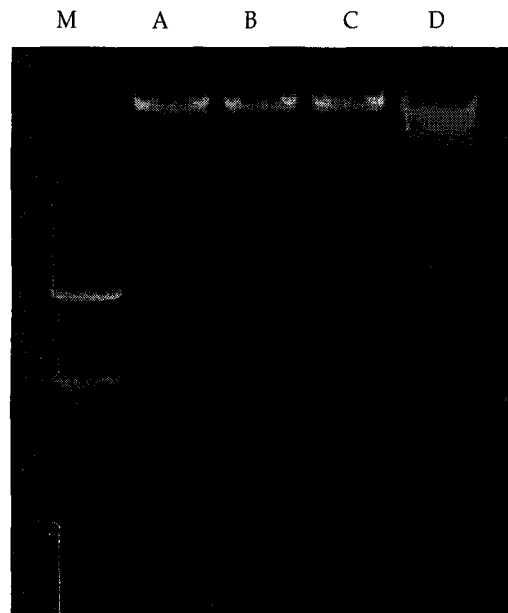


Fig. 7. DNA Fargmentation Assay in the lung cancer cell line (A549) treated with the culture supernatant of *B. subtilis* SW-1.

M lane: 100bp ladder
A lane: 0 µl of culture supernatant
B lane: 5 µl of culture supernatant
C lane: 10 µl of culture supernatant
D lane: 30 µl of culture supernatant

여주듯이 *Bacillus subtilis* SW-1 배양상등액의 50 µl/ml의 처리시 ladder모양으로 chromosome이 분해된 것이 확인되었으며 따라서 *B. subtilis* SW-1이 분비하는 항암활성물질은 항암제로써의 이용가능성이 있는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서 미생물유래의 종양 예방 및 억제제 개발을 목적으로 우리나라 전통 발효식품인 젓갈에서 항암 활성이 우수한 미생물을 분리, 동정 하였다. 젓갈로부터 항암물질을 생산하는 균주 SW-1을 분리하여 형태학적, 생리학적 특성을 검토한 결과, 본 균주는 *Bacillus subtilis* SW-1으로 동정 되었다. 본 균주로부터 항암물질은 실험에 사용한 두가지의 암세포에 강한 활성을 나타내었다. 그 중에서 폐암 세포인 A549에 가장 강한 활성을 나타내었다. 항암물질 생산을 위한 최적 배양조건을 검토한 결과, 3.0% soluble starch, 1.0% yeast extract 였다. 무기염의 경우는 활성에는 그다지 영향을 미치지 않았다. 배지의 초기 pH 및 배양온도에 따른 항암물질의 생산성을 검토한 결과 초기 pH 5.0 배양온도 30℃에서 25시간 배양 했을 때 최대 활성을 보였다. Chromosomal DNA 단편화 실험에서 *Bacillus subtilis* SW-1의 배양상등액을 처리했을 때 DNA가 사닥다리모양으로 분해되는 Apoptosis(계획된 세포죽임)를 일으키는 것으로 확인되었다. 이 미생물이 생성하는 물질을 현재 HPLC, GC등을 이용하여 분리 중에 있으며 현재까지의 결과로는 당 중합체 인 것으로 분석된다.

감사의 말

본 연구는 2003년 진주산업대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. Azuma, I., M. Yamawaki, T. Ogura, T. Youshimoto, R. Tokuzen, F. Hirao. and Y. Yamamura. 1978. Antitumor activity of BCG cell-wall skeleton and related materials. *Gann.* **21**, 73-86.
2. Bogdanov, I. G., P. Popkhistov. and L. Marinov. 1962. Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on Sarcoma-180 and the solid from of Ehlich carcinoma. Abstr. VIII Intl. Cancer Congress. Moscow. Pp: 364~365.
3. Doll, R., R. Peto, 1981. The causes of cancer: quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* **66**, 1191-1308.
4. Friend., B. A. and K. M. Shahani. 1984. Antitumor properties of Lactobacilli and dairy products fermented by Lactobacilli. *J. Food Prot.* **47**, 717-723.

5. Hrvoie, B., Z. Mirzet, D. Nullin. and F. I. Robin. 1993. Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation *in vivo*. *Biochem J.* **290**, 633-636.
6. Kato. I., S. Kobayaahi, T. Yokokura. and M. Mutai. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann.* **72**, 517-523.
7. Kim., E. R, B. M. Jung, J. Y. Kim, S. Y. Kim, H. K. Jung, H. J. Lee. and H. N. Chun. 2003. Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 31, No. 4, 348-354.
8. Kim, H. Y., H. S. Bae. and Y. J. Baek. 1991. Antitumor Activity of *Lactobacterium* against *in vivo* sarcoma 180 and Lewis Lung carcinoma. *Korean Association of Immunobiologists.* **23**, 188-196.
9. Maron, J., W. C. Roberts, J. E. Edwards, H. A. McAllister, Foley and Stephen E. Epstein. 1978. Sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy: Characterization of 26 patients without functional limitation. *The American Journal of Cardiology.* Vol. 41, Issue 5, 1, 803-810.
10. Michael, C. A., A. S. Dominic. and M. Anue. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-596.
11. Milas, L. and M. T. Scott. 1978. Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*, *Adv, Cancer Res.* **26**, 257-306.
12. Miyazak, T., M. Nishiima. 1981, Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull.* **29**, 3611-3616.
13. Oh., C. Y. and W. K. Lee. 2000. Antitumor activity of lactic acid bacteria isolated from human intestine against sarcoma 180 in mice. *Korean J. Lab. Anim. Sci.* **16**(4). 237- 244
14. Richman, S. P., J. U. Gutterman. and E. E. Ribi. 1978. Phase I-II study of intratumor immunotherapy with BCG cell wall skeleton plus P₃ *Cancer Immunol. Immunoter.* **5**, 41-44.
15. Shin, K. S., O. W. Chae, I. C. Park, S. K. Hong. and T. B. Choe. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* Vol. 13, No 4, 357-363.
16. Waymouth, C. 1974. To disaggregate or not to disaggregate: Injury and cell diagggregation. transient or permanent. *In Vitro*, **10**, 97-111.
17. Weisburger, J. H. 1996. On the etiology of gastro-intestinal tract cancer, with emphasis on dietary factory factors in Emmelot, Krick. *Environmental Press. Amsterdam.* 215-240.
18. Yamaue, H., H. Tanimura, M. Iwahashi, M. Tani, T. Tsunoda, K. Tabuse, K. Kuribayashi. and K. Saito. 1989. Role of interleukin-2 and interferon-r in induction of activated natural killer cells from mice primed *in vivo* and subsequently challenged *in vitro* with the Streptococcal preparation OK432. *Cancer Immunol. Immunother.* **29**, 79-86.