

Toxic Effect of Endocrine Disruptors on the Growth Rate of Lactic Acid Bacteria

Su Won Kim¹, Jin Sik Kim¹, Hye Myung Ryu¹, Jin Sik Nam², Hong Sik Cheigh³,
Byung Tae Min⁴, Soo Hyun Park⁴ and Min Yoo^{1†}

¹Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea,

²Department of Food & Nutrition, Suwon Women's College, Hwasung, Kyonggi 445-895, Korea,

³Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea,

⁴Vilac Company LTD. R&D Center, Kimhae, 621-190, Korea

Environmental endocrine disruptors (EDs) are toxic, hormone-like chemicals which can be found in our normal daily life. We have examined if EDs can inhibit the monocellular microorganisms such as lactic acid bacteria or if the growth of lactic acid bacteria could be resistant to the endocrine disruptors. We have used *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (KCTC No. 3165) as an experimental strain and bisphenol A, benzophenone and phenylphenol for the comparison purpose. Experiments included the evaluation of turbidity, absorbance and actual cell counts. We found that No. 3165 was somewhat resistant to EDs naturally, however, high concentration of EDs could inhibit the growth of No. 3165 completely. Different EDs showed different spectrum of inhibit. This study should contribute to the development of more resistant lactic acid bacteria to EDs and to the development of functional fermented beverage.

Key Words: Bisphenol A, Endocrine disruptor, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*

서 론

환경호르몬이라 불리는 내분비 교란물질은 항상성의 유지와 발달의 조절을 담당하는 체내 자연호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 결합, 작용 혹은 배설을 간섭하는 체외 화학물질이다. '외인성 내분비 교란 화학물질'이 더 정확한 명칭으로서 인체에 유해한 영향을 미칠 수 있는 인위적으로 합성된 화학물질들이다. 주로 살충제와 관련된 물질들이 많으나 다이옥신, PCB, DDT와 같은 기존의 유기화학물질과 프탈레이트, 비스페놀 A (BPA), 폴리비닐에톡실레이트 등과 같이 플라스틱 또는 세제와 관련되어 실생활에 자주 이용되는 물질, 그리고 일부 중금속도 포함되는 것으로 알려져 있다. 최근에 들어 가장 문제가 되는 것은 환경성 내분비 교란물질로 현재 100여종이 넘는 것으로 알려져 있다.

내분비 교란물질이 인체에 미치는 영향으로는 생식작용을 비롯해서 동물의 발생에 미치는 영향과 신경계 및 면역 체계

에 미치는 영향, 암 발병에 미치는 영향, 생태계에 미치는 영향 등이 있다 (Carlsen et al., 1992). 지금까지의 연구 결과에 의하면 내분비 교란물질은 사람에게 발생하는 유방암의 발병 위험을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀져 있으며 (Wolff et al., 1993), 남성의 정자 수를 감소시키거나 (Irvine et al., 1996; Swan et al., 1997), 고환암, 전립선암 등 생식선의 발병 위험을 증가시키고 (Czeizel, 1985), 생식능력까지도 저하시킨다 (Irvine et al., 1996)고 알려져 있다. 그 이외에도 이제까지 잘 다루지 않았던 성기 기형, 행동의 변화 등까지도 내분비 교란작용에 의한 것이라는 것이 점차 알려지면서 더욱 관심을 가지게 되었다. 이러한 내분비 교란물질은 폐기물 소각장 및 매립장, 화학공장 그리고 농축산업 시설에 의해 배출된 다음 환경을 오염시키고 생태계의 먹이사슬을 거쳐 농축된 뒤 오염된 지역의 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 물고기에게까지 축적되어 식품으로 인체에 유입되는 것으로 보고 있다. 더욱이 식품 포장에 사용되는 플라스틱의 합성제품에서도 화학물질이 용출되어 인체에 흡수되기도 한다 (Park, 1998; Kim, 1998).

이렇듯 인체에 막대한 피해를 줄 수 있는 내분비 교란물질에 대해 국민적인 관심이 높아지고 있지만, 정부의 대책은 아직도 미흡한 현실이며, 국내의 본격적인 연구 역시 아직 부족하다는 것이 관련 전문가들의 의견이다. 본 연구에서는

* 논문 접수: 2004년 11월 5일

수정재접수: 2004년 12월 10일

† Corresponding author: Min Yoo, Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.

Tel: 053-580-5000, Fax: 053-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

내분비 교란물질이 우리 생활에서 일상적으로 응용 섭취되고 있는 유산균에 대해 얼마나 억제 효과를 보이는지를 조사하고자 하였다. 유산균의 장내균총이 내분비 교란물질에 의해 영향을 받으면 그만큼 정상작용이 떨어질 것이고 이는 전체적으로 국민건강 저해 요소가 될 것이기 때문이다.

본 연구는 내분비 교란물질에 내성이 더욱 강한 균을 찾아내고 차후 이를 이용한 기능성 발효유를 개발하기 위한 학문적 기초를 이룰 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 실험균주 및 환경호르몬

실험에 사용한 유산균주는 KCTC (Taejon, Korea)에서 분양받은 No. 3165였다. 대표적인 환경호르몬으로 bisphenol A (BPA), benzophenone (BPN)과 phenylphenol (PNP)을 사용하였다. 배양 배지는 TCM 배지와 10% skim milk 배지를 사용하였다.

2. No. 3125 유산균 성장곡선 작성

BPA, BPN, PNP 등을 농도별로 첨가한 배지에 No. 3165 유산균을 접종한 후 시간별로 탁도 (turbidity)를 육안 관찰하였고, 흡광도 (optical density; OD)와 생균수 측정을 통해 성장곡선 (growth curve)을 작성하였다. 또한 성장곡선에서 얻어진 억제 효과를 재검증하기 위하여 paper disc를 이용한 저해환 크기 측정 실험을 실시하였다.

3. No. 3125 유산균의 당분해능 및 효소활성 측정

당분해능 및 효소활성을 측정하기 위하여 판매되고 있는 Kit (Difco, USA)를 사용하였다. 실험방법은 첨부된 사용 매뉴얼에 근거하였으며, 대체적으로 기질 또는 각 당을 종류별로 strip에 떨어뜨린 후 배양한 유산균을 그 위에 추가로 떨어뜨리고, 24~48시간 배양하여 발색되는 정도에 따라 결과를 관찰하였다.

결 과

1. No. 3165 유산균 배양 및 환경호르몬의 유산균 성장 저해

1) 환경호르몬의 적정농도 측정

환경호르몬이 유산균의 성장을 실제로 억제하는지, 만일 억제한다면 어느 정도나 억제하는지를 알아보기 위해 BPA, BPN, PNP를 TCM broth에 농도별로 첨가하고 No. 3165 균주를 1% 접종하여 37°C에서 배양을 하면서 탁도를 육안으로 관찰하였다. 그 결과, BPA, BPN, PNP 모두 0~50 µg/ml 정도까지 첨가될 때는 대체로 잘 자라는 편이었으나, 그 이

Table 1. Optical Density at 660 nm along with the time change after incubation with endocrine disruptors

| Incubation time (hrs) | Absorbance (660 nm) | | | |
|-----------------------|---------------------|-------------|--------------|--------------|
| | Control | Bisphenol A | Benzophenone | Phenylphenol |
| 0 | 0.033 | 0.031 | 0.03 | 0.031 |
| 6 | 0.046 | 0.04 | 0.037 | 0.039 |
| 12 | 0.057 | 0.052 | 0.054 | 0.055 |
| 18 | 0.053 | 0.055 | 0.067 | 0.057 |
| 24 | 0.062 | 0.066 | 0.06 | 0.07 |
| 36 | 0.076 | 0.069 | 0.063 | 0.064 |
| 48 | 0.176 | 0.161 | 0.094 | 0.067 |
| 60 | 0.665 | 0.678 | 0.629 | 0.526 |
| 72 | 1.751 | 1.827 | 0.094 | 0.067 |
| 84 | 1.783 | 1.816 | 1.593 | 1.571 |

상 50~100 µg/ml가 첨가되면 유의적으로 성장이 훨씬 저해되는 것이 관찰되었다. 아주 고농도로 실험하기 위해 500 µg/ml의 환경호르몬을 첨가하기도 했는데 이때는 첨가 즉시 배지 전체가 뿌옇게 변해 버렸기에 이미 포화농도를 넘은 것으로 추정되었다. 실제로 이렇게 만든 고농도 배지에서는 아예 균이 자라지 못한 것으로 육안 관찰되었다 (data not shown).

2) 환경호르몬을 농도별로 첨가한 배지에서의 유산균 성장곡선

환경호르몬을 적절한 농도로 첨가한 상기의 실험에서 50 µg/ml 정도까지는 비교적 유산균주가 잘 자랐지만 50~100 µg/ml 이상에서 저해를 받기 시작한 것으로 나타났기 때문에 이를 성장곡선으로 나타내기 위해 BPA, BPN, PNP를 각각 100 µg/ml씩 분주한 TCM 배지 30 ml을 준비하고, 여기에 No. 3165 균주를 접종하였다. 접종한 후 환경호르몬을 넣지 않은 대조군과 함께 37°C에서 배양하였고 배양시간별로 흡광도와 생균수를 측정하였다.

전체적으로 보았을 때, 대조군과 환경호르몬 투여군들 사이에 분명한 생균수의 차이가 있는 것으로 관찰되었으며, 그러나 같은 농도의 환경호르몬 중에서는 BPA에서 가장 잘 자라고, 그 다음 BPN 그리고 PNP 순으로 자라는 것이 관찰되었다 (Fig. 1).

흡광도를 측정한 결과 환경호르몬을 넣지 않은 대조군과 환경호르몬 투여군 모두 다 크게 차이는 없었다. 어느 경우에는 환경호르몬 투여군에서 오히려 Optical Density 값이 조금 더 많이 나왔지만, 전체적으로 볼 때에는 거의 차이가 없어 이런 오차는 실험상 오차로 인한 것이라 추정하였다 (Table 1). 생균수와 달리 흡광도에서 별로 차이가 없었던 이유는 생균수는 살아 있는 균수만을 측정하게 되어 있지만 흡광도는 생사에 관계없이 존재하는 모든 측정된 균을 측정하기 때문에 나타난 결과로 사료되었다. 그럼에도 불구하고 환경호르몬에 의해 유산균이 억제된다는 결론은 분명한 것

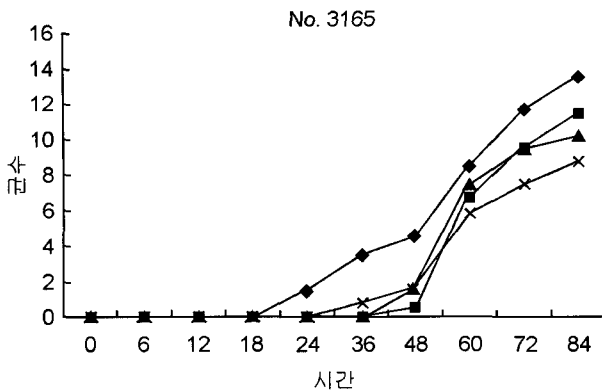


Fig. 1. Viable cell counts of lactic acid bacteria No. 3165 after treatment with endocrine disruptors at a concentration of 100 µg/ml. ◆; control, ■; Bisphenol A, ▲; Benzophenone, X; Phenylphenol

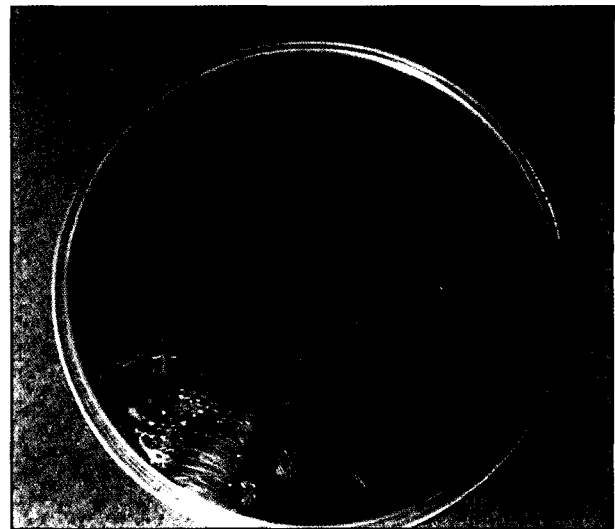


Fig. 2. Inhibitory ring test of lactic acid bacteria No. 3165 against endocrine disruptors. Upper line; 1. control, 2. Bisphenol A 100 µg/ml, 3. Bisphenol A 500 µg/ml Mid-line; 1. control, 2. benzophenone 100 µg/ml, 3. Benzophenone 500 µg/ml Lower line; 1. control, 2. Phenylphenol 100 µg/ml, 3. Phenylphenol 500 µg/ml

으로 판단되었다.

3) 환경호르몬에 대한 No. 3165 유산균 대사능

환경호르몬이 유산균을 저해하는 정도를 육안으로 분명하게 관찰하기 위해 멸균한 paper disc에 BPA 100 µg/ml, BPA 500 µg/ml, BPN 100 µg/ml, BPN 500 µg/ml, PNP 100 µg/ml, PNP 500 µg/ml을 충분히 적시고, 환경호르몬을 넣지 않은 대조군 paper disc와 함께 차례대로 No. 3165 균주가 도말된 배지 위에 올려놓았다. 그런 다음 37°C에서 배양하면서 저해 환 (clear zone)이 형성되는 정도를 관찰하였다. 3종의 환경호르몬 모두 500 µg/ml의 disc는 배지 위에 올려놓는 순간 투명한 band를 형성하는 것을 볼 수 있었다. 이는 액체배지에서 포화농도를 넘어 아예 균이 자라지 못한 결과와 일치하는 것이었다. 반면 환경호르몬을 전혀 묻히지 않은 대조군 paper disc 주변에서는 별 다른 반응 없이 유산균이 모두 잘 자랐다. 그러나 BPA, BPN, PNP 100 µg/ml의 disc에서는 약간의 환이 형성되었는데 이는 환경호르몬의 농도가 100 µg/ml 정도가 되면 유산균의 생육이 저해된다는 앞의 실험을 다시 증명해 주는 것이었다. 다시 한번 BPA, BPN, PNP 모두 500 µg/ml의 disc 주위에서는 크고 뚜렷한 환이 형성되었고, 이 농도에서는 유산균이 완전히 억제받는다 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

2. No. 3165 유산균의 당분해능 및 효소활성도 측정

No. 3165 유산균의 당분해능을 측정한 결과, lactose와 sucrose, glucose 분해능이 있었으며, β-galactosidase가 발현되었고, NO₂를 생성하며 urease를 발현하는 것으로 조사되었다.

고 찰

환경호르몬이라고 불리는 '내분비계 교란물질'은 체내에

들어와 호르몬과 유사한 작용을 함으로써 생식세포에 이상을 일으키기도 하고, 암발생과도 관련이 있어 생명에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 물질이다. 이에 본 실험에서는 환경호르몬이 No. 3165 유산균을 억제하는 정도를 조사하였다. 유산균에 대한 관심이 높은 것은 정상작용을 하는 미생물로서 체내의 독성물질을 제거해 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 때문에 환경호르몬에 의해 유산균이 억제를 받으면 장내 균총 형성에 문제가 있을 것이고 그만큼 정상작용이 저해되기 때문이다.

억제 정도는 주로 생균수와 흡광도를 측정함으로써 조사되었고 저해환을 형성하는 실험도 병행하여 재검증을 하였다. NO. 3165 균이 당분해능과 효소활성에서 전형적인 유산균의 패턴을 보여준다는 것도 먼저 검증하였다. 일정 농도의 환경호르몬이 들어 있는 배지에서는 이 균이 비교적 잘 자랐기에 자연적인 내성을 어느 정도까지는 가지고 있다고 판단되었다. 환경호르몬의 억제작용은 종류에 따라 다소 다르게 조사되었다. 즉 No. 3165의 경우 BPA에 더 많은 내성을 보였는데 이는 No. 3165를 이용해 BPA에 더욱 강한 내성균주를 만들고 이를 기능성 발효유 개발에 사용할 수 있다는 결론이다. 적정농도를 훨씬 넘어 버릴 경우에는 유산균이 전혀 자라지 않았기에 그 동안의 연구처럼 환경호르몬은 다세포 생물 조직에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 세포 자체에 대해 강력한 유해물질이라는 것을 알 수 있었다. 이것은 향후 좀 더 다양한 유산균종과 여러 종류의 내분비 교란물질을 사용하여 연구를 확대시켜 나갈 필요가 있음을 시사하는 결과라 하겠다.

본 연구는 내분비 교란물질이 유산균에 대해 억제작용을 보인다는 단순한 증거에 그치지 않고 내분비 교란물질에 강력한 억제작용을 보이는 균주를 능동적으로 선별하고 검색하여 유전자 차원에서 그 억제기작을 밝혀내고, 이를 근거로 하여 이미 섭취된 내분비 교란물질을 억제할 수 있는 기능성 발효유의 개발로 이어질 학문적 근거를 제시할 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것임.

REFERENCES

- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*. 1992. 305: 609-613.
- Czeizel. Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. *Lancet*. 1985. 1: 462-463.
- Kinouchi T. 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. *Microbiol Immunol*. 1998. 42: 347-355.
- Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom; birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Int J Gynaecol Obstet*. 1996. 54: 315.
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have a Sperm Densities Declined? A Reanalysis of Global Trend Data. *Environ Health Perspect*. 1997. 105: 1228-1232.
- Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Instit*. 1993. 21: 648-652.