

The Inhibitory Effects of Intestine-oriented *Lactobacillus* sp. KP-3 on the Accumulation of Heavy Metals in Sprague Dawley rats

Shin Yeon Kim and Hyun Pyo Kim*

Department of Biomedical Science, Jungwon University, Chungbuk 367-700, Korea

Received November 17, 2014 / Revised February 25, 2015 / Accepted February 25, 2015

To investigate the effect of lactic acid bacteria on the heavy metal adsorption from internal organs and blood, lactic acid bacteria were isolated from human feces. Some strains resistant to heavy metals were selected by incubation in agar media containing each of chrome and cadmium salts. Among them, a strain named KP-3 was ultimately chosen due to its higher growth rate in selective broth medium containing the heavy metals at the concentration of 0.01%. The strain was identified as *Lactobacillus* sp. based on its morphological, cultural and physiological characteristics. For evaluating the ability to prevent accumulation of heavy metals by selected *Lactobacillus* sp. strain *in vivo*, Sprague Dawley rats were fed with heavy metal salts (cadmium, chrome and lead) with or without cultured whole cells for 7 days. The amounts of heavy metals accumulated in liver, kidney and blood were analyzed. As a result, chrome was accumulated to kidney mostly, and lead was frequently found in liver and kidney. Experimental group (rats fed with lactic acid bacteria) showed less accumulation of heavy metal than control group (rats fed with saline solution). The inhibition rates of heavy metal accumulation were calculated to 41.8% (Cd), 33.4% (Cr) and 44.2% (Pb). Especially, feeding lactic acid bacteria strongly reduced accumulation of cadmium in blood. The results showed that feeding *Lactobacillus* sp. KP-3 could prevent the bioaccumulation of heavy metals in the living body.

Key words : Accumulation, heavy metals, lactic acid bacteria, Sprague Dawley rats

서 론

사회 및 기술의 발전 그리고 문명에 발달에 따라 환경오염의 심각성은 여러 가지 원인에 의해서 야기 됐다. 그 중 생활활동의 과정 속에서 배출되는 중금속은 인체에 노출 되어 높은 위험성을 지니고 있고 동시에 생태계에 위협을 할 수 있다. 이런 위협에 쉽게 노출 될 수 있는 우리의 인체는 음식물이나 물, 공기, 토양과 같은 주변 환경에 노출되어 사람마다 어느 정도의 차이는 있겠지만 중금속을 항상 섭취하게 된다. 특히 한국인이 식품을 통해 섭취하게 되는 유해적인 중금속의 섭취량이 인체 허용 1일 섭취량인 ADI (acceptable daily intake)에 근접해 있고[19], 이런 중금속이 인체 내에 들어가면 쉽게 배출되지 않고 그 중 유독성 중금속은 다소 낮은 농도로도 인체 조직과 반응하여 천천히 독성을 띄고 일정 수준을 넘어 중독이 되면 회복하여 완치가 불가능하기 때문에 현대 식품 사회에 큰 문제가 되고 있다[14, 47].

그런 인체에 독성을 가진 중금속 중 카드뮴은 매우 유해하

며 자연계에서는 상대적으로 적은 농도로 존재하지만[18, 43] 각종 공장과 산업장에서 이용이 증가하고 있어서 인체에 미치는 건강 영향 평가 결과 급성·만성 중독을 일으키는 환경오염 물질로서 관심이 높아지게 되었다[8, 9, 12].

다른 종류로 크롬은 크롬 광산, 크롬산염 제조 공정, 도금 및 합금, 시멘트 제조, 잉크, 페인트 및 플라스틱 안료 등에서 주로 배출되고 크롬은 자연계에서 6가 혹은 3가 형태로 존재하는데 3가 형태는 인체에 거의 무해하다고 알려져 있고 이중 인체에 유해한 것은 6가 크롬을 포함하고 있는 크롬산이나 중크롬산이다. 6가 크롬은 인체에 강한 독성작용이 있으며 수소나 탄소, 붕소와 직접 결합된 6가의 크롬산 이온은 강력한 산화제로 알려져 있다[4]. 6가 크롬은 potassium hypochlorite, chlorine, sulfite 등에 의해 3가로 환원되며 3가 크롬 중 0.2~0.7% 정도가 6가 크롬으로 산화되는 것으로 알려져 있다[35]. 장시간 흡입시 비중격 연골부에 원형의 천공이 생기는 것이 특이점이고 발암물질 중 하나이다. 만성 피해로는 만성 카타르스 비염, 폐기종, 폐부종, 만성 기관지염이 있고, 급성 피해는 폐출혈, 기관지염, 폐암 등이 있다.

납은 연의 정련, 건전지 및 축전지 체로, 인쇄 공업, 크레용 및 페인트 안료, 농약, 자동차 배기가스 등에서 배출되며 주로 소화기, 호흡기, 음식물, 피부로 흡수되어 인체 내에 축적된다. 반드시 빈혈을 수반하고 조혈기관 및 소화기, 중추신경계 장애를 일으킨다. 0.3 ppm 이상이면 만성 중독, 0.7 ppm 이상이면 급성 중독 증상이 나타난다.

*Corresponding author

Tel : +82-43-830-8606, Fax : +82-43-830-8579

E-mail : khps@s@jwu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중금속의 흡수가 미생물에 의한 경우에는 보편적으로는 두 가지 방법에 의하여 일어난다고 알려져 있다. 먼저 세포표면에 존재하는 음이온 그룹에 대한 양이온의 결합에 의해 세포표면에 흡착되는 방법이고 두 번째로는 대사 작용에 의하여 세포 내에 축적되는 과정인 것으로 알려져 있는데 현재는 세포 표면 흡착에 관한 연구가 주로 이루어지고 있다[24]. 유산균은 당분을 분해하여 유산을 생성하는 세균을 총칭하며 그 종류가 대단히 많고 genus와 species에 따라 성상이 다르다. 특히 유산균 발효유에 주로 사용되는 *Lactobacillus* 속의 성상은 gram 양성이고 아포를 형성하지 않으면 혐기적 조건을 좋아 하는 미호기성이고 운동성이 없는 간균이다[25].

Metchnikoff의 불로장생설 이래 다수의 유산균발효유의 효능과 효과에 대한 연구가 지금까지 보고 되어왔다. Fykov 등 [32]은 유아기 때 유산균발효유를 섭취함으로써 장내에 *Lactobacillus flora*를 형성시킬 수 있었고, Tramer [37], Shahani와 Ayebo [34], Sandine 등[29]은 유산균 발효유가 위장장애, 간장질환, 신염, 하리, 대장염, 식욕부진에 효과가 있을 뿐만 아니라 병원성 세균의 억제, 소화효소의 촉진, 간장기능의 촉진 등에 좋다고 하였다. Bogdanov 등[3], Reddy 등[26], Farmer 등[10]은 복수 암세포와 육종 세포를 이식한 마우스에 유산균 발효유를 투여하여 암세포의 증식 억제 작용 즉, 항암효과가 있다고 보고하였다.

유산균 중 특히 *Lactobacillus spp.*는 인체의 장내에서 증식하게 되면 장점막에 병원성 대장균이 정착하는 것을 경제적으로 저지시킴으로써 대장균에 의한 설사를 예방하는 효과가 있음은 물론 장내의 pH를 낮추어 대장균의 발육을 억제할 뿐만 아니라 *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* 등은 장내 병원성 세균의 성장을 억제하는 것으로 밝혀져 있으며[23, 36], 섭취한 음식물의 소화를 장내 균총의 정상적인 서식을 일으킴으로써 흡수를 도와주고 또한 각종 부패균들을 억제하는 항생물질을 생성하고 소화불량에 영향을 미치는 *L. acidophilus*와 *L. bulgaricus*의 이점이 알려져 있다[22, 33].

위 사실과 같이 체내에 이로운 점이 많은 유산균을 이용한 유산균발효유는 현대에서 수 많은 종류가 상품화되어 시판되고 있으며 그 소비량이 한국에서 지속적으로 증가하는 경향을 보아 건강식품으로 관심이 계속 커지고 있음을 알 수 있다. 또한 최근 들어 가축의 사료 효율을 증대시키고 질병 예방을 위한 목적으로 생균제(probiotics)로 개발되고 있다[29].

종합적으로 유산균은 사람과 동물에게 위장장애, 간염, 신장염, 빈혈의 치료, 노화방지 및 암의 억제 등 매우 광범위한 효과가 인정되고 있으나 중금속 물질의 생체 내에서 흡수 및 축적 과정에서 유산균이 어떠한 영향을 미치는지 아직 연구가 부족하다. 유산균의 흡착성질은 미생물의 세포벽에 의해 나타내며[49], 사람의 위액을 첨가하거나 가열하여 손상을 주어도 흡착성질이 크게 감소되지 않아서[48], 인체에 흡수되어 축적되려는 중금속 물질들을 제거하는데 효과적으로 응용할 수 있을 가능성을 보였다.

본 연구에서는 인체에 이롭고 광범위하게 활용되어 왔으며 안전한 균주로 인식되고 있는 유산균[11]중 중금속 내성과 흡착력이 우수한 균주를 탐색하였다. 그런 다음 탐색된 최적의 균주를 납, 수은, 카드뮴, 크롬 등 인체에 치명적 영향을 주는 잘 알려진 유해한 중금속들이 체내에 쌓이는 것을 저해할 수 있는지 ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometer) [2]를 이용하여 장기 및 혈액에 잔존하는 중금속 함량 분석을 통해 동물 실험을 통해 확인하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 계대

신생아 및 성인의 분변으로부터 유산균을 분리하기 위해 Table 1의 조성과 같은 BCP 배지[23]를 이용하였다. 살균된 면봉으로 채취한 분변을 멸균 PBS 완충용액(10 mM, pH 7.3)이 담긴 Eppendorf tube에 넣어 현탁하고 멸균 생리 식염수로 희석하여 분리용 고체 배지에 도말한 다음 37°C에서 2일간 배양하였다[36]. 형태학적으로 유산균으로 추정되는 colony를 1차적으로 순수 분리하여 200개 균주를 획득하였으며, 분리한 균주들은 MRS agar에 계대 보관하며 실험에 이용하였다.

중금속 내성 균주의 분리

사람의 분변에서 분리한 유산균주를 0~0.1% 사이의 농도별로 중금속 용액을 첨가한 MRS agar에 도말한 후 모두 생존한 농도인 0.01%의 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 중금속 0.01%로 동일한 농도의 MRS broth에 접종하여 24시간 배양한 후 적정 농도로 희석한 후 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 중금속을 함유한 액체 배지에서의 생육을 조사하였다.

중금속 흡착능 확인

중금속 내성을 보인 유산균주들의 배양 희석액 2 ml를 실험

Table 1. Composition of isolation medium

Ingredients	Amounts (g)
Lactose	10
Sucrose	10
Pancreatic digest of casein	7.5
Thiopeptone	7.5
NaCl	5
Yeast extract	2
Sodium citrate	2
Sodium deoxycholate	1
Bromocresol purple	0.02
Agar	25
Distilled water	up to 1 l

pH 7.2±0.2 at 25°C
autoclaved at 121°C for 15 min

균의 경우 6가 크롬 포준원액(1,000 ppm) 8,000 ppm과 혼합하고, 대조군으로는 멸균 증류수 8 ml와 혼합하였다. 37°C 배양기에서 10분간 방치한 다음 각각의 반응액을 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 균체를 동결건조하였다. 실험군과 대조군의 동결건조후의 균체의 무게를 측정하였고, 실험군의 균체 무게에서 대조군의 균체 무게를 빼어 균체가 흡착한 중금속의 무게를 산출함으로써 균체에 흡착된 중금속의 양을 측정하였다.

분리 균주의 동정

중금속 내성 및 흡착능이 뛰어난 균주를 최종적으로 선정하여 각종 형태학적 및 생화학적 조사를 실시하였다. 또한 API 50 CHL kit를 가지고 당 이용성, arginine과 esculin 분해능 등을 조사하였으며[22, 33], 이를 토대로 APILAB program을 이용하여 균주를 동정하였다.

균주의 내담즙산 및 내산성 확인

선별된 균주의 담즙산 내성을 조사하기 위해 oxgall을 농도별로 첨가한 MRS agar에 균주를 접종하여 배양한 다음 생성된 집락수를 계측하였다. 내산성을 측정하기 위해 초기 pH를 다양하게 조절한 MRS broth에 균주를 배양한 다음 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

실험동물을 통한 중금속 축적 저해

In vitro 상에서 가장 뛰어난 중금속 내성 및 중금속 흡착능을 보인 유산균이 *in vivo* 상에서도 효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위해 실험동물을 가지고 체내 중금속 축적 저해능을 조사하였다. 본 실험은 중원대학교 동물실험 윤리위원회의 승인하에 표준 작업 지침에 따라 수행되었다(JWU 2014-0611). 실험군 및 대조군 각 조건별로 8마리씩의 수컷 Sprague dawley (SD) rat을 사용하였고, cage 당 2마리씩 수용하였다.

실험군은 선별된 균주를 매일 배양하여 동일 농도(2.0 O.D., 660 nm)의 생균체 현탁액으로 준비하여 10 ppm의 중금속 용액에 1:1 (v/v)로 혼합한 것을 급수통에 담아 마리당 평균 100 ml/day씩 7일간 자유급식을 실시하였다.

대조군은 중금속 용액과 멸균 생리 식염수를 1:1(v/v)로 혼합하여 투여한 군, 선별된 생균체 현탁액과 멸균 생리 식염수를 1:1 (v/v)로 혼합하여 투여한 군, 멸균 생리 식염수만을 투여한 군으로 분리하여 마리당 평균 100 ml/day씩 7일간 자유급식을 실시하였다.

동물로부터 시료의 채취 및 전처리

Ether로 마취시킨 실험동물을 개복한 뒤 심장에서 직접 3~5 ml의 혈액을 채취하여 EDTA가 담긴 시험관에 담아 즉시 냉장보관 하였다. 신장과 간장은 각각 일정 부위를 3~4 g 적출하여 생리식염수에 수세한 후 액체 질소에 담가 순간 냉동시킨다

음 즉시 -60°C에서 냉동보관 하였다. 시료가 모두 준비된 후 혈액 및 장기 내 축적된 중금속의 함량을 분석하였다[29]. 시료의 전처리는 각 시료를 3~4 g 정량하여 질산(HNO₃) 10 ml를 가하여 반응시키고, 다시 질산(HNO₃) 10 ml와 과산화수소수(H₂O₂) 3 ml를 가하여 반응시킨 다음 이 중 23 g만을 취하였다.

시약, 실험 동물 및 시료의 분석

실험에 사용한 모든 시약은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 중금속은 생리식염수에 용해시켜 사용하였고, Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 미생물 배양에 사용한 배지 및 시약은 Difco사 또는 Junsei사의 제품을 이용하였다.

유산균의 투여에 의한 중금속 축적 억제능을 조사하기 위해 생후 4주령의 수컷 Sprague dawley (SD) rat을 ㈜대한바이오링크에서 분양받아 사용하였고, (주)삼양사의 흰쥐용 고품사료로서 적응시켰다. 사육장의 온도는 25°C로 유지하였으며 실험 시작 하루 전까지 식이와 식수를 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

장기 및 혈액에 축적된 중금속 함량을 알아보기 위해 전처리 과정을 거친 시료를 filter paper로 걸러 ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometer, Model : ELAN 6,100, Perkin-Elmer SCIEX, Source : Argon plasma 6,000 k, Mass Resolution : 0.3-3.0 amu, RF Power : 1150w, Sample injection Flow rate : 0.86 ml/min)를 사용하여 정량 분석하였다. 기기 검출 한계(0.1 ppb=μg/l)는 전처리 배수(약 7배)를 감안하였기에 0.7 ppb였다.

결과 및 고찰

중금속 내성 균주의 분리

본번으로부터 분리한 200개의 유산 균주를 0~0.1% 사이의 각각의 농도별로 카드뮴용액을 첨가한 MRS agar에 도말하여 배양하였다. 카드뮴 농도가 높아짐에 따라 생존한 균주의 수는 조금씩 감소하였으며, 이중 0.01% 농도를 기준으로 하여 생존한 20개의 중금속 내성 균주를 선별하였다(Table 2).

중금속 내성이 있다고 판단되는 20개의 선별된 균주를 중금속 0.01%로 동일한 농도의 MRS broth에서 24시간 동안 배양한 다음 적정 농도로 희석하여 660 nm에서의 흡광도를 측정한 결과 KP-3 균주가 2.279의 흡광도로 다른 균주들에 비해 가장 높은 생육을 보였다.

중금속 흡착능 확인

6가 크롬 표준원액(1,000 ppm)을 중금속 내성 유산균주 20개를 대상에게 사용하여 *in vitro*에서의 흡착된 중금속의 무게를 산출하여 흡착능을 확인한 결과는 Table 3과 같았다.

KP-3 균주가 중금속 흡착능에서도 2,100 ppm으로 제일 많은 양의 중금속을 흡착시키는 것으로 보였다. 그 외에는 KP-9

Table 2. Growth test of lactic acid bacteria in MRS agar media containing cadmium

Selected strains	Concentration of Cadmium solution (%)							
	0	0.0001	0.0005	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1
KP-1	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-2	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-3	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-4	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-5	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-6	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-7	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-8	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-9	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-10	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-11	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-12	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-13	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-14	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-15	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-16	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-17	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-18	+	+	+	+	+	+	+	+
KP-19	+	+	+	+	+	+	-	-
KP-20	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 3. Amounts of adsorbed hexachromium

Strains	Amounts of adsorbed Cr (ppm)
KP-1	900
KP-2	100
KP-3	2,100
KP-4	100
KP-5	700
KP-6	400
KP-7	0
KP-8	300
KP-9	1,200
KP-10	200
KP-11	400
KP-12	700
KP-13	0
KP-14	400
KP-15	100
KP-16	900
KP-17	100
KP-18	1,200
KP-19	800
KP-20	400

및 KP-18 균주가 1,200 ppm의 중금속 흡착을 보였으며, 일부 균주는 중금속을 거의 흡착시키지 못하는 경우도 보였다. 중금속 내성을 지닌 균주를 대상으로 실험하였지만 중금속 흡착능은 균주에 따라 서로 큰 격차를 보이는 경향을 나타내었다.

그래서 6가 크롬 흡착능이 가장 뛰어나고 카드뮴을 함유한 액체 배지에서 가장 높은 생육을 나타냈던 KP-3 균주를 이번 실험에 사용할 최종 균주로 선별하였다.

분리 균주의 동정

최종적으로 선정된 KP-3 균주를 MRS broth에서 18시간 동안 배양한 뒤 Gram staining을 실시하여 광학 현미경으로 morphology를 관찰한 결과 Gram양성 간균으로 나타났다. KP-3 균주는 glucose로부터 가스를 생성하지 않았고 catalase 및 oxidase 모두 음성으로 나타났으며, 15℃부터 45℃까지의 온도 범위 모두 생육하였고 pH 2.5에서도 생육하였다(Table 4). API 50 CHL kit를 가지고 균주의 당발효성 특징을 조사한 결과 Table 5와 같았다.

이상의 결과를 가지고 APILAB program으로 분석하여 동정한 결과 피검 균주는 *Lactobacillus sp.*와 유사하였다. 따라서 이 균주를 *Lactobacillus sp.* KP-3 (이하 KP-3 라고 함)로 명명하였다.

균주의 내담증성 및 내산성 확인

유산균이 섭취되고 난 후 위에서 생존하여 장에 안정적으로 도달하기 위해서는 내담증성이 필수적이며 더불어 내산성을

Table 4. General characteristics of *Lactobacillus sp.* KP-3

Item examined	Characteristics
Morphology	
Shape	rod
Gram stain	+
Spore	-
Motility	-
Culture characteristics	
Growth in air	+
Growth anaerobically	+
Growth at 15℃	+
at 25℃	+
at 30℃	+
at 37℃	+
at 40℃	+
at 45℃	+
Growth in broth at pH 2.5	+
pH 3.5	+
pH 4.5	+
pH 5.5	+
pH 6.5	+
pH 7.5	+
pH 8.5	+
pH 9.5	+
Physiological characteristics	
Catalase	-
Oxidase	-
Gas from glucose	-

Table 5. Fermentation tests for utilizing sugar by *Lactobacillus* sp. KP-3

Sugar	Fermentation	Sugar	Fermentation
Glycerol	+	salicin	+
Erythritol	-	cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon (starch)	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentibiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannose	+	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	+	Gluconate	-
Amygdaline	+	2-Ceto-gluconate	-
Arbutin	+	5-Ceto-gluconate	-
Esculin	+		

갖추고 있을수록 가능성이 높다. 하지만 본 연구에서는 선별된 균주를 생균체 상태로 동물에게 투여하여 그 효능을 조사하고자 하였기에 내담즙성 및 내산성이 뛰어난 균주를 선별하려는 것보다 우선은 장내 정착이 가능할지를 동물실험 수준에서 확인하는 것에 더 중점을 두어 내담즙성 및 내산성을 측정하였다.

Lactobacillus sp. KP-3 균주의 내담즙성을 조사하기 위해 여러 농도의 oxgall이 함유된 MRS broth에서 배양한 뒤 생균수를 측정된 결과 Fig. 1과 같았다. 첨가된 oxgall의 농도에 따라

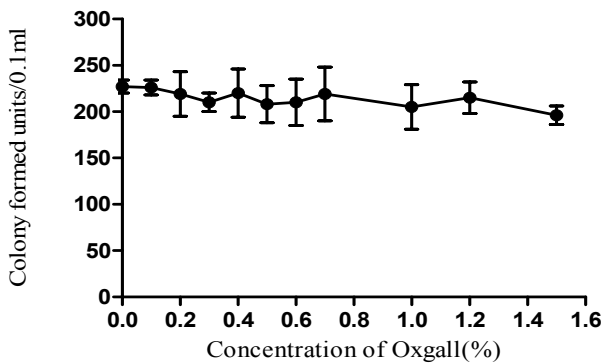


Fig. 1. Bile salt tolerance for *Lactobacillus* sp. KP-2 grown in various concentration of oxgall-containing media.

균주의 생육에는 크게 영향을 미치지 않는 경향을 나타냈으며 최대 첨가 농도인 15%에서의 생존 균수와 무 첨가 시 생존 균수에 차이가 거의 없었다. 이를 통해 *Lactobacillus* sp. KP-3 균주가 강한 내담즙성을 지니고 있으며 생균으로 투여하였을 경우에도 장내에 정착할 가능성이 높을 것으로 간주한다.

또한 *Lactobacillus* sp. KP-3의 내산성을 조사한 결과(Fig. 2) 초기 배지 pH가 6 이상에서는 생육에 영향을 받지 않았으나 pH 6 이하부터 생육이 저해되었으며 pH 5 이하부터는 급격한 생육 저해를 보였다. 낮은 pH에서도 미미한 생육을 보이기는

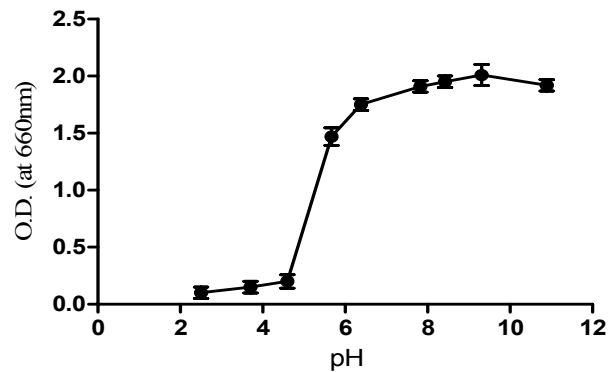


Fig. 2. Acid tolerance for *Lactobacillus* sp. KP-2 grown in media with various pH values.

했지만 *Lactobacillus sp.* KP-3 균주의 내산성은 낮은 편으로 간주된다.

중금속 축적량 분석

카드뮴

카드뮴의 체내 흡수는 직업적 노출에 의한 호흡기계의 흡수를 제외하면 대부분 호흡기와 위장관 계통으로 이루어지며 일반적으로 식품을 통한 위장관계의 흡수가 많다. 위장관에서 흡수율은 여러 요인에 따라 차이가 있게 되며 대체로 3~6%가 흡수되는 것으로 보고되고 있다[18, 43]. 흡수된 카드뮴은 주로 간과 신장에 전신 부하량의 1/2~2/3가 축적되어 건강에 영향을 주며, 흡수한계를 초과하게되면 노출량에 관계없이 일정하게 축적되는 것으로 밝혀져 있다[43, 45]. 또한, 음식물 섭취와 같은 식생활 측면에서 인체에 유해한 중금속의 문제를 해결하고자 하는 본 연구는 생균체를 혼합하여 투여함으로써 식품을 통해 섭취된 유해한 중금속에 유산균이 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험을 하였다.

흰쥐에게 *Lactobacillus sp.* KP-3의 투여가 생체 내 카드뮴 축적에 미치는 영향을 실험한 결과 Fig. 3부터 Fig. 5에 나와바와 같다. 카드뮴만을 투여한 군은 간장(Fig. 3)에서 262.8±5.3 ppb, 신장(Fig. 4)에서 382.3±27 ppb, 혈액(Fig. 5)에서 11.4±1.5 ppb의 축적량을 나타냈다. 카드뮴과 *Lactobacillus sp.* KP-3를 혼합하여 투여한 군은 Fig. 3과 같이 간장에서 228±16.2 ppb, Fig. 4와 같이 신장에서 351.2±28.6 ppb의 축적량을 나타냈고 Fig. 5와 같이 혈액에서는 검출되지 않았다. 카드뮴만을 투여한 군보다 카드뮴과 *Lactobacillus sp.* KP-3 생균체를 혼합하여 투여한 군에서 카드뮴 축적량이 낮았고 이는 *Lactobacillus sp.* KP-3가 생체 내 카드뮴 축적을 저해한 것으로 판단된다. 카드뮴 축적 저해율을 비교해 보면 카드뮴과 *Lactobacillus sp.* KP-3를 혼합하여 투여한 군의 경우 간장, 신장, 혈액에서 각각 13%,

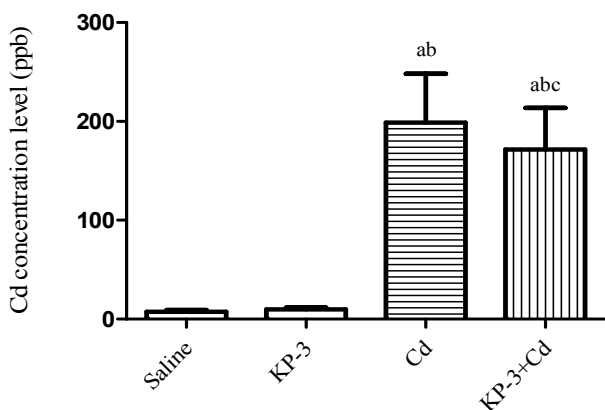


Fig. 3. Concentration of cadmium in liver of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Cd group, $p < 0.05$.

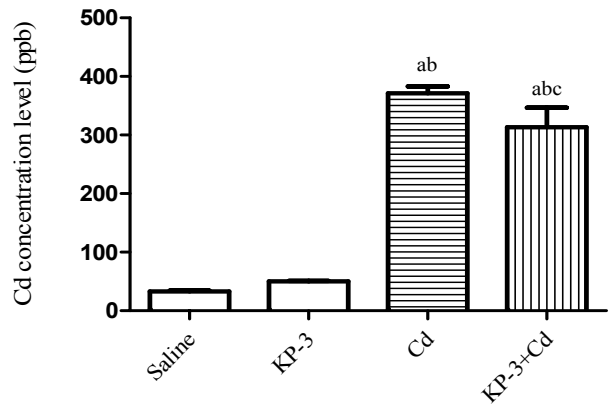


Fig. 4. Concentration of cadmium in kidney of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Cd group, $p < 0.05$.

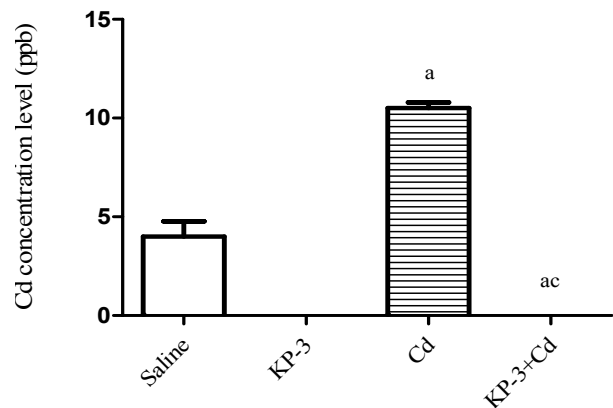


Fig. 5. Concentration of cadmium in blood of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "c" means significant difference from Cd group, $p < 0.05$.

8%, 100%의 저해율을 나타냈다.

사람의 경우 카드뮴의 생체내 흡수는 호흡기를 통해 10~40%의 흡수율을 보인다고 하였으며 장관에 의한 흡수율은 마우스나 랫트에서는 약 20%, 원숭이는 5%, 사람에서는 1.5~29%라고 보고하여 연구대상에 따라 큰 차이를 나타내고 있다[38]. 이와 같이 호흡기나 소화관을 통해 흡수된 카드뮴은 50~67% 정도가 신장과 간장에 축적되는 것으로 알려져 있으며[8, 9, 12], 본 실험에서도 신장과 간장에서만 검출되어 같은 결과를 나타내었다.

유산균은 위암, 결장암, 비장암 등에 항암효과를 갖고 있으며, 화학물질에 기인된 암세포를 억제하는 작용이 있고[3, 10, 26], 장 점막에 균막을 형성하며, 단백질의 소화 흡수를 증진시키는 작용[28, 34, 37]과 칼슘(Ca), 인(P), 철(Fe)의 이용도를 향상시키며 체내에 비타민 B₁, B₂, niacin, folic acid의 양을 증진시킨다[15]. 또한 화학물질에 의해 유도된 DNA 손상의 회복

에 대한 효과가 있다는 사실과 카드뮴의 체내 흡수가 장관 내 균총과 무기질과 단백질함량이 높은 식이에 의해 저지된다는 보고들이 있다[30, 39]. 그러므로 유산균의 지속적인 섭취로 카드뮴의 장관 내 흡수를 억제하여 카드뮴 중독증을 완화시킬 수 있는 가능성을 기대할 수 있다.

크롬

크롬은 대부분이 음식을 통해 흡수되는데 하루 섭취량은 대략 100 µg 이하이며 극소량은 음용수나 호흡을 통해 흡수된다. 음식을 통해 섭취된 3가 크롬의 약 1% 정도가 위장관을 통해 체내로 흡수되며 6가 크롬은 쉽게 세포막을 통과하여 세포내에서 3가 크롬으로 환원된다[42].

본 실험에서는 인체에 유해한 6가 크롬 표준원액을 사용하여 실험하였으며 간장에서의 크롬 축적량의 신장이나 혈액에서보다 대체로 높게 나타났다.

Lactobacillus sp. KP-3의 투여가 흰쥐의 생체 내 크롬 축적에 미치는 영향을 실험한 결과 Fig. 6~8에 나타난 바와 같다. 크롬만을 투여한 군은 Fig. 6과 같이 간장에서 872.8±134.2 ppb, Fig. 7과 같이 신장에서 745.6±195.6 ppb, Fig. 8과 같이 혈액에서 219.5±8.3 ppb의 축적량을 나타냈다. 크롬과 KP-3를 혼합하여 투여한 군은 Fig. 6과 같이 간장에서 379.3±121.3 ppb, Fig. 7과 같이 신장에서 614±57.1 ppb, Fig. 8과 같이 혈액에서 147.8±1.3 ppb의 축적량을 나타냈다. 크롬만을 투여한 군보다 크롬과 *Lactobacillus sp.* KP-3 생균체를 혼합하여 투여한 군에서 크롬 축적량이 낮았고 이는 *Lactobacillus sp.* KP-3가 생체 내 크롬 축적을 저해한 것으로 판단된다. 크롬 축적 저해율을 비교해보면 크롬과 *Lactobacillus sp.* KP-3를 혼합하여 투여한 군의 경구 간장, 신장, 혈액에서 각각 57%, 18%, 33%의 저해율을 나타냈다.

호흡기나 경구 또는 피부를 통해 흡수되는 크롬은 건강에 장해를 일으키고 주요 노출 통로는 호흡기, 피부, 눈 또는 경구

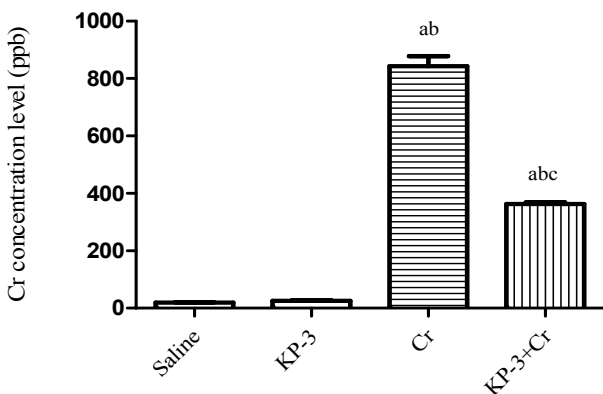


Fig. 6. Concentration of chromium in liver of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Cr group, $p < 0.05$.

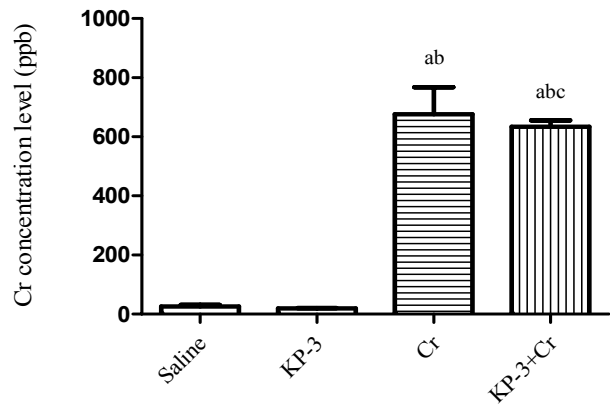


Fig. 7. Concentration of chromium in kidney of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Cr group, $p < 0.05$.

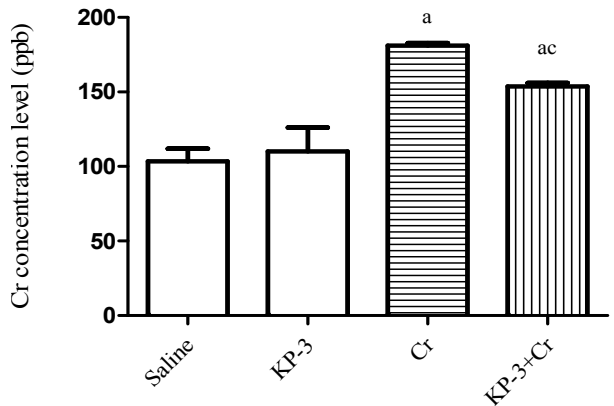


Fig. 8. Concentration of chromium in blood of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "c" means significant difference from Cr group, $p < 0.05$.

로 삼켰을 경우이다[7]. 국내 대부분의 크롬에 관련된 연구는 대부분 건강장해에 관한 연구들이고, 주로 혈액에 축적이 되며 본 실험결과에서도 Fig. 8에서 보는 것과 같이 혈액에서는 다른 중금속과 비교했을 때 대조군과 실험군 모두 높은 100 ppb 이상의 수치를 나타내었다.

6가크롬에 노출된 사람에게서 피부궤양, 알리지성 피부염, 비중격 천공등이 발생되며 만성적인 노출시에는 폐암을 유발시킨다[46]. 최근에는 유전독성과 생식독성을 유발시키는 물질로 보고되고 있다[40]. 체내의 혈액순환계통에 들어온 6가 크롬은 적혈구의 세포막을 빠르게 통과하며 세포 내에서 세포 밖으로 이동할 수 없기 때문에 적혈구와 함께 존재하게 된다 [1, 44]. 이처럼 체외로 잘 배출되지 않는 크롬이 유산균을 섭취함으로써 축적 저해 효과를 나타내었기에 혈중 크롬 함량 감소 효과를 얻을 수 있으리라 기대가 되고 호흡기 감염이 되었을 경우에도 체내의 크롬 농도를 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

납

납은 체내에 축적되어 영양소 대사 이상뿐만 아니라 조직의 기능장애나 급, 만성질환을 유발하기도 한다[13]. 납중독의 증상으로 몇몇 동물실험에서 혈액의 납함량이 증가하고 간, 신장, 뇌 등의 장기조직의 납 함량이 증가한다고 보고되고 있다 [16].

본 실험에서는 신장에서의 납 축적량이 다른 장기의 납 축적량에 비해 비교적 높게 나타났으며, *Lactobacillus sp.* KP-3의 투여가 흰쥐의 생체 내 납 축적에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 9~11에 나타내었다. 납만을 투여한 군은 Fig. 9와 같이 간장에서 256.9±36.6 ppb, Fig. 10과 같이 신장에서 889.7±111.6 ppb, Fig. 11과 같이 혈액에서 49.2±3.6 ppb의 축적량을 나타냈다. 납과 *Lactobacillus sp.* KP-3 생균체를 혼합하여 투여한 군은 Fig. 9와 같이 간장에서 99.5±41.5 ppb, Fig. 10과 같이 신장에서 465.8±6.7 ppb, Fig. 11과 같이 혈액에서 3.1±1.9 ppb의 축적량을 나타냈다. 납만을 투여한 군보다 납과 *Lactobacillus sp.* KP-3를 혼합하여 투여한 군에서 납 축적량이 낮았고 이는 *Lactobacillus sp.* KP-3가 생체 내 납 축적을 저해한 것으로 판단된다. 납 축적 저해율을 비교해보면 납과 *Lactobacillus sp.* KP-3를 혼합하여 투여한 군의 경우 간장, 신장, 혈액에서 각각 61%, 48%, 94%의 저해율을 나타냈다.

납은 신장 기능을 저해하며 미토콘드리아에서의 산화와 인산화작용을 저하시켜 에너지 대사에 장애를 주게 된다[5, 41]. 신장은 납을 배출하는 주요 장기로 납에 가장 민감한 표적 기관이며, Conard 등[5]은 흰쥐에 lead acetate를 정맥 내에 투여한 후 시간에 따른 장기의 축적량을 살펴본 실험에서 신장, 적혈구, 간의 순서로 축적되었다고 하였다. 본 실험 결과에서도 Fig. 9와 Fig. 11에 나타난 것처럼 간장과 혈액에서는 생리 식염수만 투여한 군과 *Lactobacillus sp.* KP-3만을 투여한 군에서 거의 검출되지 않았다. 이는 납이 자연적인 상태로 체

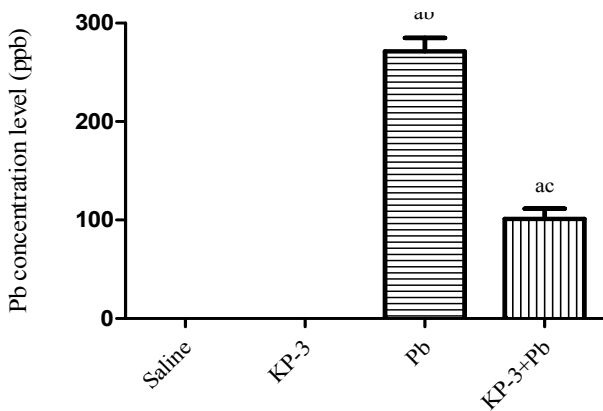


Fig. 9. Concentration of chromium in liver of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Pb group, $p < 0.05$.

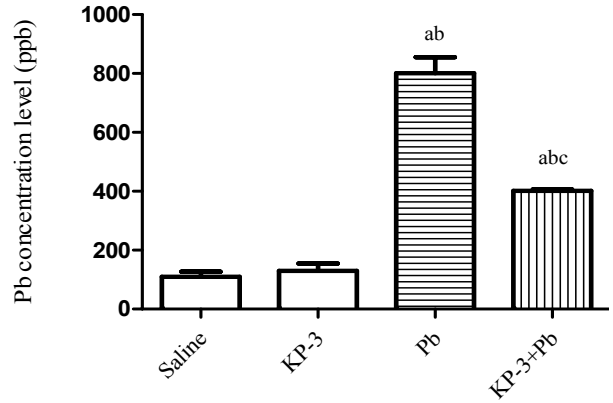


Fig. 10. Concentration of chromium in kidney of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Pb group, $p < 0.05$.

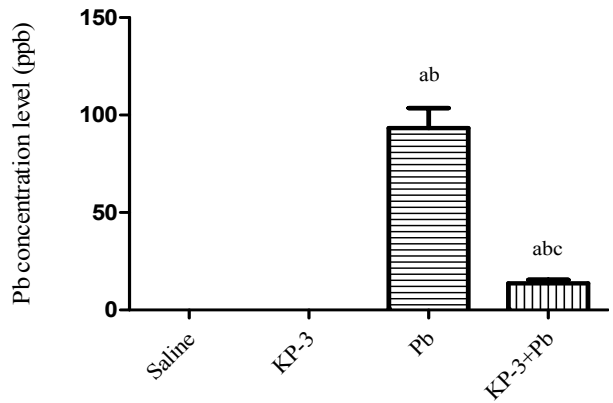


Fig. 11. Concentration of lead in blood of rats. 1) Letter "a" means significant difference from saline group, $p < 0.05$, 2) Letter "b" means significant difference from KP-3 group, $p < 0.05$, 3) Letter "c" means significant difference from Pb group, $p < 0.05$.

내 흡수되어 축적되는 경우가 적은 것으로 생각되며 주로 축적되는 부위는 신장이라는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 유산균 섭취에 따른 납 축적의 저해는 식품을 통한 섭취가 많은 납 중독의 예방 차원에서도 효과가 있을 것으로 생각된다.

예상과 같이 중금속 종류별로는 납이 평균 61.5%의 저해율로 *Lactobacillus sp.* KP-3 투여에 의한 가장 높은 저해 효과를 보였고, 장기별로는 혈액에서의 중금속 축적 저해율이 평균 약 70%로 가장 높았다. 특히 눈에 띄는 점은 실험에 사용된 *Lactobacillus sp.* KP-3 균주가 혈액에 축적되는 카드뮴을 100% 저해했다는 점이다. 카드뮴의 경우 투여량의 80% 정도가 간장과 신장에 축적된다는 연구 결과도 있고 축적된 양이 소량이긴 하지만, 100% 저해율을 보였다는 점에서 *Lactobacillus sp.* KP-3 균주의 효용가치를 높이는 것이라 여겨진다.

References

- Alexander, J. and Aaseth, J. 1995. Uptake of chromium in human red blood cells and isolated rat liver cells: The role of the anion carrier. *Analyst* **120**, 931-933.
- Baek, Y. K. 2001. The study of characteristics of spectrometers for heavy metal analysis, Masters Thesis. The University of Seoul, Seoul, Korea.
- Bogdanov, I. G., Dalev, P. G. and Gurenich, A. I. 1975. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett.* **57**, 259-261.
- Clayton, G. D., Clyton, F. E., Beliles, R. P., David, R. M., Morgott, D. A., Donghue, J. L., Sandler, H. and Topping, D. C. 1994. *Patty's industrial hygiene and toxicology*, pp. 1973-1983, 4th ed., New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Conrad, M. E. and Barton, J. C. 1978. Factors affecting the absorbing and excretion of lead in the rat. *Gastroenterology* **74**, 7313.
- Cowan, N. R. and Steel, K. J. 1984. *Manual of the identification of medical bacteria*, 2nd ed., Williams & Wilkins.
- Department of Labor. 1978. *Occupational health guideline for chromic acid and chromates*.
- Dudley, R. E., Svovoda, D. J. and Klaassen, C. D. 1982. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **65**, 302-313.
- Faeder, E. J., Chanet, S. Q. and King, L. C. 1997. Biochemical and ultrastructural changes in livers of cadmium treated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **39**, 473-483.
- Farmer, R. E., Reddy, G. V. and Shahani, K. M. 1974. Antitumor activity of yogurt fractions. *J. Dairy Sci.* **57**, 582.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics, *The scientific basis*, pp. 1-8, Chapman and Hall, London.
- Goyer, R. A. 1986. Toxic effects of metals, Casarett and Doull's Toxicology. *The basic science of poison*, pp. 582-596, 3rd ed., Macmillan Publishing Co, New York.
- Graeme, K. A. and Pollack, C. V. 1998. Heavy metal toxicity, Part2: Lead and metal fume fever. *J. Emergency Med.* **16**, 171-177.
- Han, J. H. and Lee, W. J. 2003. Nutritional characteristics and damage mitigation effects on heavy-metals exposure of Peking-duck by-product extracts added with medicinal herbs (II) damage mitigation effects on heavy-metals exposure of Peking-duck by-product extracts. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **13**, 293-304.
- Hartman, A. M. and Dryden, L. P. 1965. Vitamin in milk and milk products. Champaign, III. *Am. Dairy Assoc.*
- Hong, C. M. 2001. Effect of repeated exposure to Pb acetate on hematopoietic function, testis and kidney in male rats. *J. Toxicol. Pub. Health* **17**, 309-316.
- Jung, Y. S. 1991. The study of distribution and accumulation of heavy metals in rat organs. Masters Thesis. Hanyang University, Seoul, Korea.
- Lee, J. S. and White, K. L. 1980. A review of the health effects of cadmium. *Am. J. Ind. Med.* **1**, 307-317.
- Lim, S. Y. 1995. The Effect of Korean green tea, oolong tea, and Persimmon leaf tea on eliminating heavy metal ion. Masters Thesis. Youngnam University, Daegu, Korea.
- Macfaddin, J. F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2nd ed., Williams & Wilkins.
- Marth, E. H. 1997. *Standard Method for the examination of dairy Products*. AVI Publishing Company 242.
- Mikoajcik, E. M. and Hamdan, I. Y. 1975. *Lactobacillus acidophilus*. II. Antimicrobial agents. *Cultured Dairy Products J.* **10**, 18-20.
- Muralidhara, K. S., Shegery, G. G., Elliker, P. R., England, D. C. and Sandine, W. E. 1977. Effect of feeding Lactobacilli on the coliform and Lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. *J. Food Protect* **40**, 288.
- Oda, M. and Minami, K. 1978. Isolation and identification of cadmium ion-tolerant microorganisms and accumulation of cadmium ion by the cells. *J. Ferment Technol.* **46**, 1046-1055.
- Peter, H. A., Nicholas, S., Elizabeth, M. and John, G. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 1209-1219. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Reddy, G. V., Shahani, K. M. and Banerjee, M. R. 1973. Inhibitory effect of Yogurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 815-817.
- Ronald, M. 2002. *Hand Book of Microbiological Media*. CRC Press.
- Sandine, W. E. 1981. Function of intestinal lactic acid bacteria in humans. *Second Annual National Symposium for Lactic Acid Bacteria and Health*. Korea.
- Sandine, W. E., Muralidhara, K. S., Elliker, P. R. and England, D. C. 1972. Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* **35**, 691-702.
- Scioli, S. E. 1985. The influence of acidophilus milk and yogurt diets on the repair of carcinogen-induced DNA damage. Masters Thesis. University of Nebraska, Nebraska, USA.
- Sendelbach, L. E. and Klassen, C. E. 1998. Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 95-102.
- Seneca, H., Henderson, E. and Collins, A. 1950. Bactericidal properties of yogurt. *Am. Pract. Dig. Treat.* **1**, 1252-1259
- Shahani, K. M., Vakil, J. R. and Kilara, A. 1976. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bulgaricus*. I. Cultural conditions for the production of antibiosis. *Cultured Dairy Products J.* **11**, 14-17.
- Shahani, K. M. and Ayebo, A. D. 1980. Role of dietary Lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2448-2457.
- Sheehan, P., Ricks, R., Ripple, S. and Paustenbach, D. 1992. Field evaluation of a sampling and analytical method for environmental levels of airborne hexavalent chromium. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **53**, 57-68.
- Sorrells, K. M. and Speck, M. L. 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc*

- citrovorum. *J. Dairy. Sci.* **53**, 239-241.
37. Tramer, J. 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature* **21**, 204-205.
38. Tsuchiya, K. 1978. *Cadmium studies in japan*. pp. 1-376, Kodansha, Tokyo.
39. Underwood, E. J. 1977. *Trace elements in human and animal nutrition*. 4th ed., Academic Press. 243-257.
40. VonBurg, R. and Liu, D. 1993. Chromium and hexavalent chromium. *J. Appl. Toxicol.* **13**, 225-230.
41. Wapnir, R. A., Modak, S. A., Lifshitz, F. and Teichberg, S. 1979. Alterations of intestinal and renal function in rats after intraperitoneal injection of lead acetate. *J. Lab. Clin. Med.* **94**, 144.
42. Wexler, P., Gad, S. C., Hartung, R., Henderson, R. F., Krenzelok, E. P., Locey, B. J., Mehendale, H. M., Plaa, G. L., Pope, C. and Witschi, H. 1988. *Encyclopedia of toxicology* (volume1). Academic Press.
43. WHO Task group. 1997. *Health criteria for cadmium*, WHO, Geneva.
44. Wiegand, H. J. 1985. Fast uptake kinetics in vitro of chromium (VI) by red blood cells of man and rat. *Arch. Toxicol.* **57**, 31-34.
45. Worker, N. A. and Mogenicovsky, B. B. 1961. Effect of vitamin D on the utilization of zinc, cadmium and mercury in the chick. *J. Nutr.* **75**, 222-224.
46. World Health Organization. 1988. *Environmental health criteria 61. Chromium*. WHO. Geneva
47. Yeom, K. S. 1995. The effect of heavy metals on the microstructure of proximal convoluted tubules of the mouse kidney. Masters Thesis. Soonchunhyang University, Seoul, Korea.
48. Zhang, X. B. and Ohta, Y. 1991. *In vitro* binding of mutagenic pyrolyzate to lactic acid bacterial cell in human gastric juice. *J. Dairy Sci.* **74**, 752-757.
49. Zhang, X.B. and Ohta, Y. 1992. Binding of mutagenic pyrolyzate to fraction of intestinal bacterial cell. *Can. J. Microbiol.* **38**, 614-617.

초록 : Sprague Dawley 쥐에서 장내 유래 *Lactobacillus sp.* KP-3의 중금속 축적 저해 효과

김신연 · 김현표*

(중원대학교 의생명과학과)

유산균주들을 신생아 및 성인의 분변으로부터 분리하여 그 중에서도 가장 중금속 흡착능이 크고 중금속에 내성이 있다고 사료되는 균주 KP-3를 선별하여 동정한 결과 *Lactobacillus sp.*으로 밝혀졌다. 동물 실험에서는 생후 4주령의 Sprague dawley male rat에게 선별한 균주 KP-3를 투여하여 혈액 및 장기 내의 중금속 축적 저해효과가 어느 정도인지 조사하였다. 실험군으로는 SD rat 한 마리당 *Lactobacillus sp.* KP-3와 중금속 10 ppm을 혼합하여 약 100 ml/day씩 7일간 투여하였다. 대조군으로 중금속과 멸균 생리 식염수를 혼합하여 투여한 군과 *Lactobacillus sp.* KP-3와 멸균 생리 식염수를 혼합하여 투여한 군, 멸균 생리 식염수만을 투여한 군으로 분리하여 SD rat 한 마리당 약 100 ml/day씩 7일간 투여하였다. 혈액, 간장 및 신장의 시료를 채취하여 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 납(Pb) 등의 중금속 축적량을 측정하였다. 측정 결과 크롬(Cr)은 신장에 주로 축적되었고, 납(Pb)은 간장과 신장에 주로 많은 축적을 보였고, 실험군인 *Lactobacillus sp.* KP-3와 중금속을 혼합하여 투여한 군에서는 중금속만을 투여한 군보다 중금속 축적량이 낮은 것으로 나타났다. 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 납(Pb)의 평균 중금속 축적 저해율은 각각 41.8%, 33.4% 44.2%로 나타났다. 특히, 혈액에서의 중금속 축적 저해율은 약 70%로 매우 높게 나타났고 혈액에서의 카드뮴 축적 저해율은 100%로 나타났다. 본 실험에서 탐색하여 최적화된 유산균이라고 생각되는 *Lactobacillus sp.* KP-3균주는 실험 결과에 의하면 중금속 축적 저해에 효과가 있는 것으로 여겨지며, 또한 유산균이 함유된 식품을 지속적으로 섭취함으로써 체내의 중금속의 축적 억제에 도움이 크게 되리라 생각된다.