

## 혐기적 조건하에서 젖산균의 cadmium 축적

신용서\* · 김성효 · 김동한<sup>1</sup> · 이갑상  
원광대학교 농화학과, <sup>1</sup>목포대학교 식품영양학과

### Accumulation of Cadmium in Lactic Acid Bacteria under the Anaerobic Condition

Yong-Seo Shin\*, Sung-Hyo Kim, Dong-Han Kim<sup>1</sup> and Kap-Sang Lee

Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iri, Chonbuk 570-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Mokpo National University, Mokpo, Chonnam 530-830, Korea

**Abstract** — In this study, authors investigated the cadmium tolerance, the accumulation of cadmium, and the cellular distribution of accumulated cadmium in lactic acid bacteria under the anaerobic condition. Lactic acid bacteria grew fairly well in modified EG medium containing 10 ppm of cadmium but could hardly grow at 50 ppm of cadmium. Tolerance to cadmium of genus *Lactobacillus* was greater than that of genus *Streptococcus*, and *Lactobacillus acidophilus* showed the highest cadmium tolerance among the bacteria tested. The capacity of cadmium accumulation (9.304~12.428 mg/g wet cell) of lactic acid bacteria was higher than that (6.775 mg/g wet cell) of *Escherichia coli*. *Lactobacillus casei* of them took up the largest amount of cadmium. The cadmium elimination amount (28.46~29.25%) of lactic acid bacteria from modified EG medium containing cadmium were also higher than that (14.43%) of *Escherichia coli*. Accumulated cadmium in *Lactobacillus acidophilus* was distributed by 42.41% at cell wall, 28.97% at cytoplasm, and 28.62% at plasma membrane, respectively.

중금속은 산업활동의 증대와 함께 하천 및 토양 등의 환경에 광범위하게 오염되어 있으며, 대부분의 생물체에 대해 독성물질로서 작용하고 있다(1, 2). 특히 cadmium은 식품사슬을 통해 인체에 흡수되면 미량으로써도 생체내 대사장애를 야기시키고 일단 흡수되면 쉽게 배설되지 않아 연령이 높을 수록 체내축적은 증가되어 적혈구 감소, 골연화증 등을 일으키며 이 증독증상이 심해지면 Itai-itai 병과 같은 만성질환을 유발하게 된다(3-8). 최근 중금속 제거에 관한 연구가 여러 방면에서 진행되어 왔다. 즉 중금속이 오염된 환경으로부터 효율적으로 중금속을 제거하기 위한 생물학적 연구(9-12)와 체내로 섭취된 중금속의 독성 완화에 부추, 마늘, 양파 등의 식품을 이용한 연구들이 보고되고 있다(13-15).

한편 젖산균은 발효유제품(요구르트, 치즈)이나 발효채소류 등에 널리 분포하면서 식품·영양학적으로 우수할 뿐만 아니라 살아 있는 상태로 섭취된 젖산

균은 장내에서 혈청콜레스테롤의 감소, 유당소화흡수의 촉진, 장내유해세균의 생육억제 그리고 대장암 발생을 저하 등의 효과를 발휘하는 인간에게 유익한 균종 중의 하나이다(16, 17). 일반적으로 세균의 세포벽에 있는 음이온 물질은 금속이온들과 용이하게 결합할 뿐만 아니라 여러가지 기작에 의해 금속이온들을 세포내로 흡수한다는 보고가 있다(12).

따라서 본 연구에서는 구강 섭취된 cadmium이 장내에서 체내의 각 조직으로 흡수되기 전 장내 상재균인 젖산균에 흡착, 축적되어 변과 함께 체외로 배출되어질 수 있다고 가정하고 혐기적 조건하에서 젖산균체의 cadmium 흡수능력과 그 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 공시균주는 본 대학 미생물학 교실에 보관중인 것으로 실험에 사용하기 전 3회 계대하였으며, 그 목록은 Table 1과 같다. 중금속 흡수 실험에 사용한 배지는 modified EG medium으로 그

**Key words:** Lactic acid bacteria, cadmium tolerance, accumulation of cadmium, cellular distribution of cadmium

\*Corresponding author

**Table 1. List of used strains and media for subculture**

Strain	Media
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRS broth <sup>1)</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> IFO 3533	MRS broth
<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 4797	MRS broth
<i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 2185	MRS broth
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ATCC 11842	MRS broth
<i>E. coli</i> ATCC 25922	BHI medium

<sup>1)</sup>Lactobacilli MRS broth (Difco)

**Table 2. Composition of modified EG medium (unit: g/l)**

Beef extract	2.0	
Proteose peptone	10.0	
Yeast extract	5.0	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0	
Souble starch	0.5	pH 6.8
Glucose	1.5	
L-cystein HCl	0.4	
Tween 80	0.52	

조성은 Table 2와 같으며, 젖산균의 생균수 측정배지는 BCP(Eiken Co. Japan) 배지를 사용하였다.

#### 사용시약

실험에 사용된 중금속은 cadmium nitrate로 Shinyo Pure Chemicals Co.(Japan)의 특급시약을 이용하였다.

#### 젖산균의 생육에 미치는 cadmium의 영향

젖산균의 cadmium 내성을 조사하기 위해 cadmium이 0, 10, 50 ppm 씩 첨가된 modified EG medium를 혼합가스(CO<sub>2</sub> : 15%, H<sub>2</sub> : 5%, N<sub>2</sub> : balance)로 bubbling 하여 용존산소를 제거시킨 후 젖산균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 anaerobic controlled glove box에서 혐기적으로 배양하면서 pH와 적정산도를 상법에 준하여 경시적으로 측정하였으며, 생균수는 배양액을 혐기성 희석액(0.85% NaCl, 0.1% L-cystein HCl, 0.1% sodium thioglycollate)에 일정 배수로 희석하여 BCP plate count agar에 도포하고 37°C에서 72시간 배양시킨 후 나타난 균락을 계수하여

**Table 3. Conditions for atomic absorption spectrophotometer**

Lamp current (mA)	3.5
Wavelength (nm)	228.8
Spectral band pass (nm)	0.5
Optimum working range (µg/ml)	0.5~2.0
Fuel	acetylene
Support	air
Flame stoichiometry	oxidizing

측정하였다.

#### 젖산균의 cadmium 측정

혐기적 조건하에서 장관내 유용세균인 젖산균과 유해세균중에 하나인 *E. coli*의 cadmium 측적을 측정하기 위해 cadmium이 50 ppm 첨가된 modified EG medium을 혼합가스로 bubbling 하고 젖산균과 *E. coli*을 4%(v/v) 되게 접종하여 37°C의 anaerobic controlled glove box에서 24시간 동안 혐기적으로 배양한 후 원심분리기(Sorvall Instruments, DUPON, Model RC-5C, 5,000×g, 30 min, 4°C)로 균체를 회수하여 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 3회 세척하였다. 균체중에 흡수된 cadmium 정량을 위해 습식분해법을 이용하여 시료를 분해하였다. 즉 회수, 세척된 균체에 HNO<sub>3</sub> : HClO<sub>4</sub>(2 : 1)을 가한 후 70°C hot plate에서 내용물을 무색이 될 때까지 분해하였다. 분해가 완료된 시료는 냉각 후 3차 증류수를 가하여 50 ml로 정용하고 atomic absorption spectrophotometer(Model : Varian Spectra AA 30/40)의 분석시료로 사용하였다. AAS 분석조건은 Table 3과 같다.

#### 젖산균체의 성분별 cadmium 분포

측정된 cadmium의 젖산균체내 분포를 측정하기 위해 젖산균중 *Lactobacillus acidophilus*를 선발하여 cadmium과 함께 혐기적 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 균체를 회수, 세척하여 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)를 가하고 20분간 초음파(Danbary Model LC 500, 16 KHZ) 처리한 후 Fig. 1과 같이 최(18)의 방법을 변형하여 균체를 세포질, 원형질막 및 세포막성분으로 분획하였다. 얻어진 각 분획을 습식분해 후 AAS로 cadmium을 정량하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 젖산균의 생육에 미치는 cadmium의 영향

젖산균의 cadmium 내성을 측정하기 위해 cad-

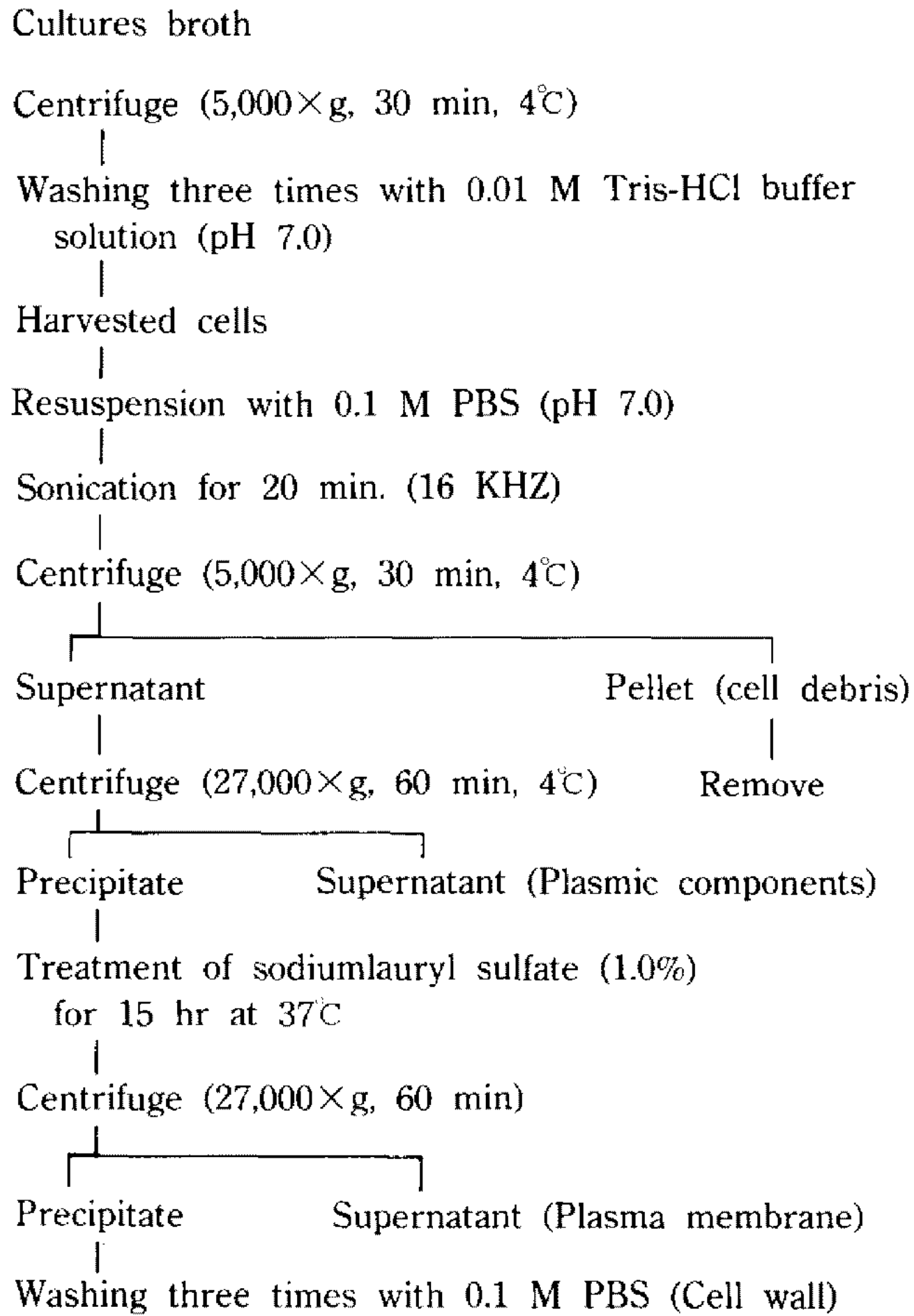


Fig. 1. Fractionation of *Lactobacillus acidophilus* cell.

medium이 0, 10, 50 ppm 첨가된 modified EG medium에 젖산균을 접종하고 37°C에서 혐기적으로 배양하면서 경시적인 젖산균수, 산생성량(pH, 적정산도)을 측정하는 결과는 Fig. 2, 3, 4, 5, 6과 같다.

즉 5종의 젖산균 모두 cadmium이 10 ppm 첨가된 배지에서는 대조구와 큰 차이 없이 정상적인 생육곡선을 보여 잘 생육하는 것으로 나타났으나, cadmium이 50 ppm 첨가된 배지에서는 거의 생육하지 못해 젖산균의 대사과정이 저해를 받는 것으로 추정되었다. 또한 pH, 적정산도의 결과에서 나타난 바와 같이 10 ppm 첨가구에서의 산생성량 역시 대조구와 큰 차이가 없었으나 50 ppm 첨가구의 경우에는 산생성량이 거의 증가하지 못하고 있어 젖산균의 산생성 또한 cadmium에 의해 저해 받는 것으로 나타났다. 젖산균간의 비교에서 *Streptococcus* 속보다는 *Lactobacillus* 속이 비교적 cadmium 내성이 더 높았으며, *Lactobacillus* 속중에서도 *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus casei*가 다른 균종보다 유의적으로 cadmium 내성이 높았다. 이러한 젖산균에 대한 cadmium 독성은 젖산균의 세포외막의 mucopolysaccharides와

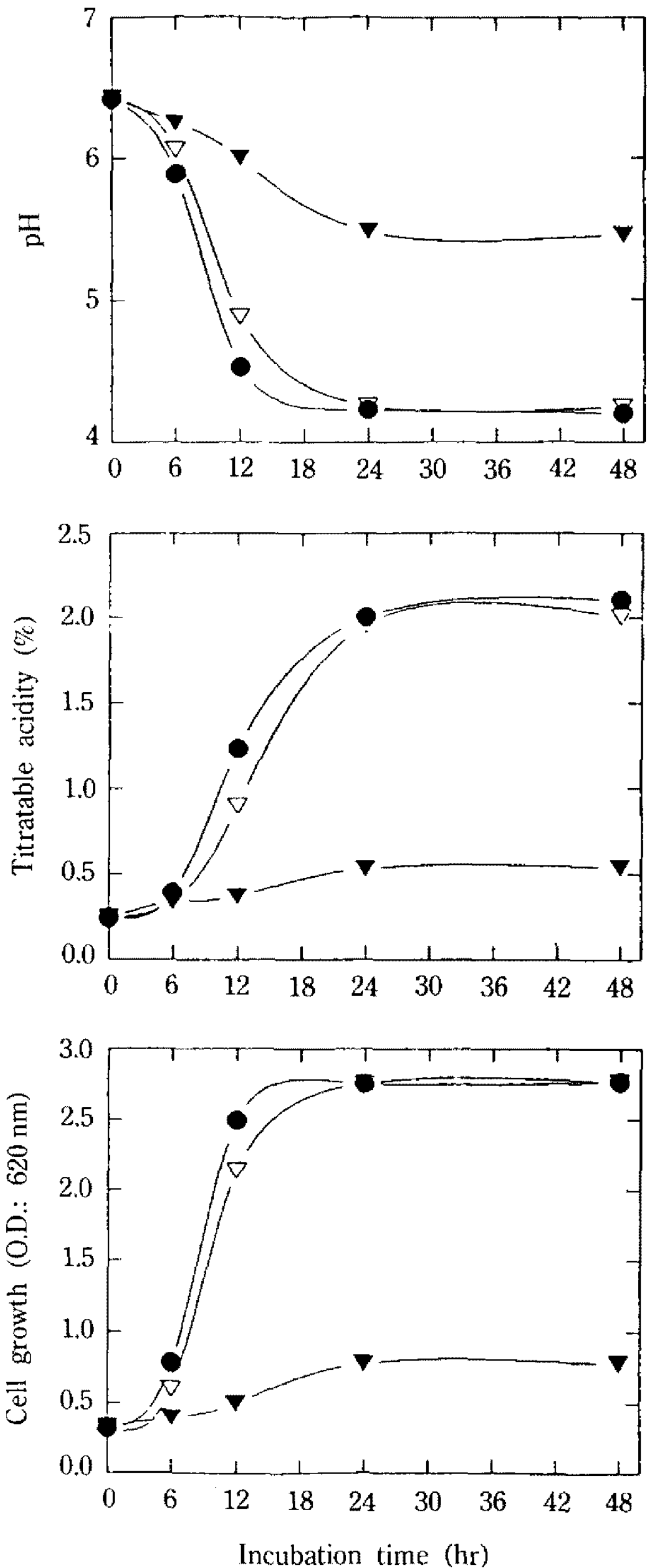
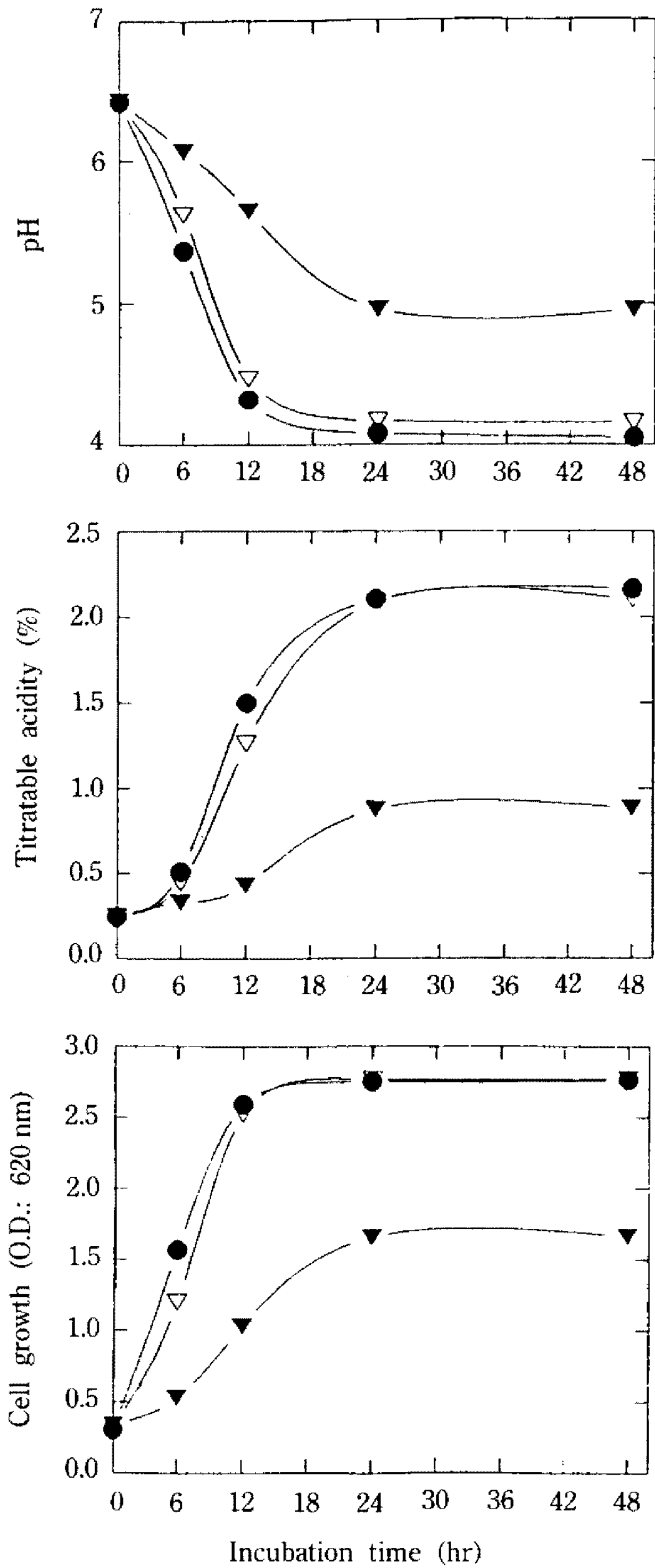


Fig. 2. Changes in cell growth and acid production of *Lactobacillus bulgaricus* in modified EG medium containing cadmium under the anaerobic condition.

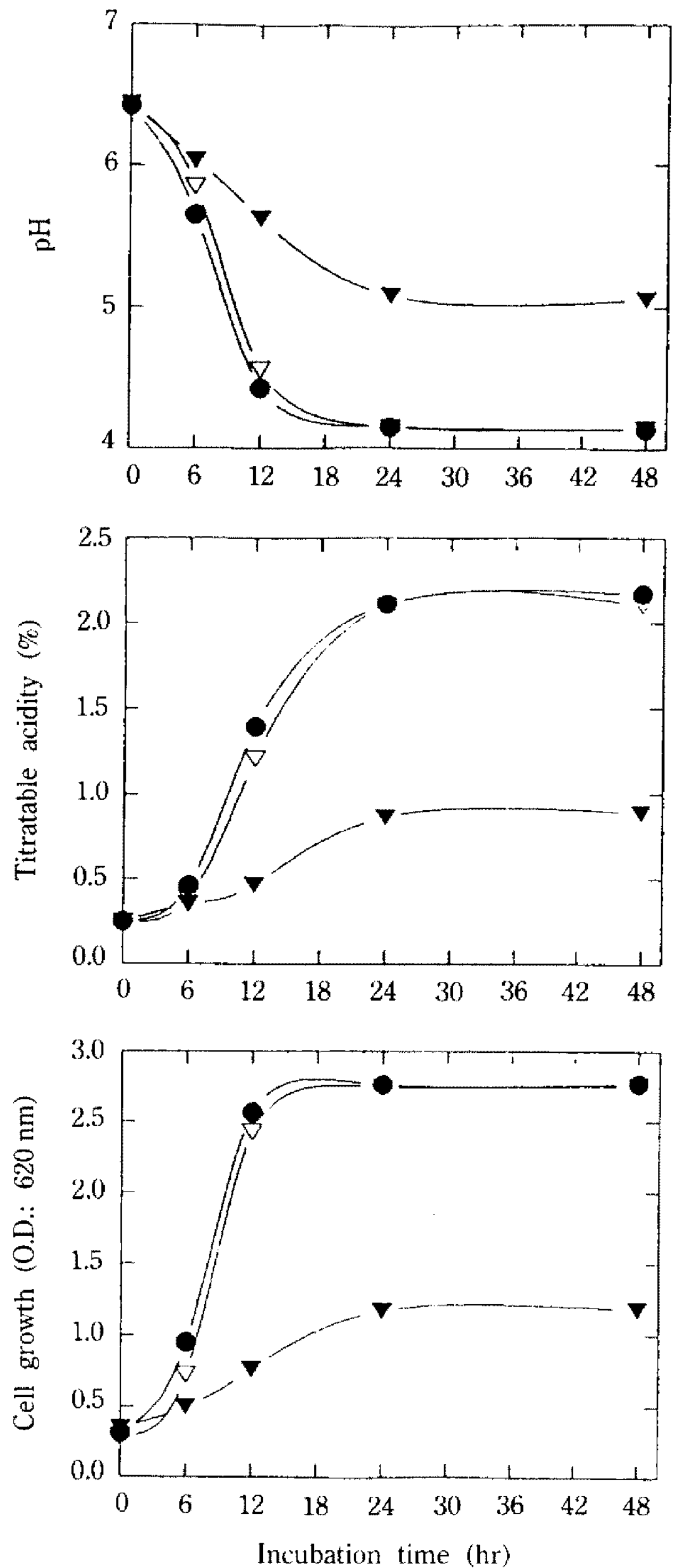
—●— control, —▽— 10 ppm, —▼— 50 ppm

같은 점질물이나 또는 음이온물질과 결합하여 세포막의 형태적, 기능적 변화를 일으켜 독성을 야기시킬 것으로 사료되며, 세포막 결합성 효소나 세포내 효소들의 cofactor와 서로 교환됨으로 세포막 투과성의 변화를 초래시키거나 세포의 대사저해를 일으켜 독



**Fig. 3. Changes in cell growth and acid production of *Lactobacillus acidophilus* in modified EG medium containing cadmium under the anaerobic condition.**  
 -●- control, -▽- 10 ppm, -▼- 50 ppm

성을 내는 것으로 추정된다. 이상의 결과에서 보면 실제 장내 중금속의 농도는 극히 미량이고, *Lactobacillus* 속이나 *Streptococcus* 속의 생육은 cadmium 농도 10 ppm 이하에서 거의 영향을 받지 않을 뿐만 아니라 더욱이 숙주인체에 정상작용 등의 여러가지 유용성을



**Fig. 4. Changes in cell growth and acid production of *Lactobacillus casei* in modified EG medium containing cadmium under the anaerobic condition.**  
 -●- control, -▽- 10 ppm, -▼- 50 ppm

부여하고 있으므로, 장관내의 cadmium의 생물학적 제거제로서 유용한 균주로 판단되었다.

**젖산균의 cadmium 축적**

혐기적 조건하에서 젖산균의 cadmium 제거 능력을

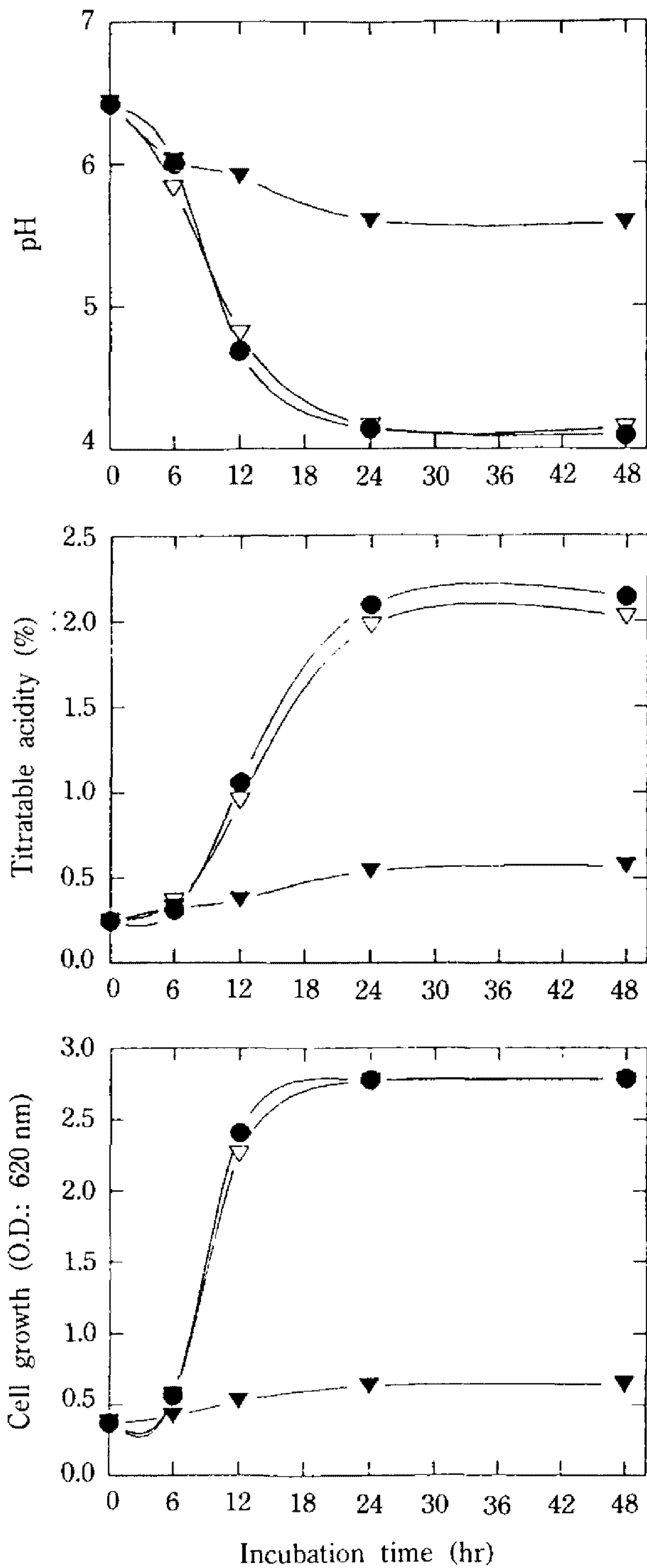


Fig. 5. Changes in cell growth and acid production of *Streptococcus thermophilus* in modified EG medium containing cadmium under the anaerobic condition. -●- control, -▽- 10 ppm, -▼- 50 ppm

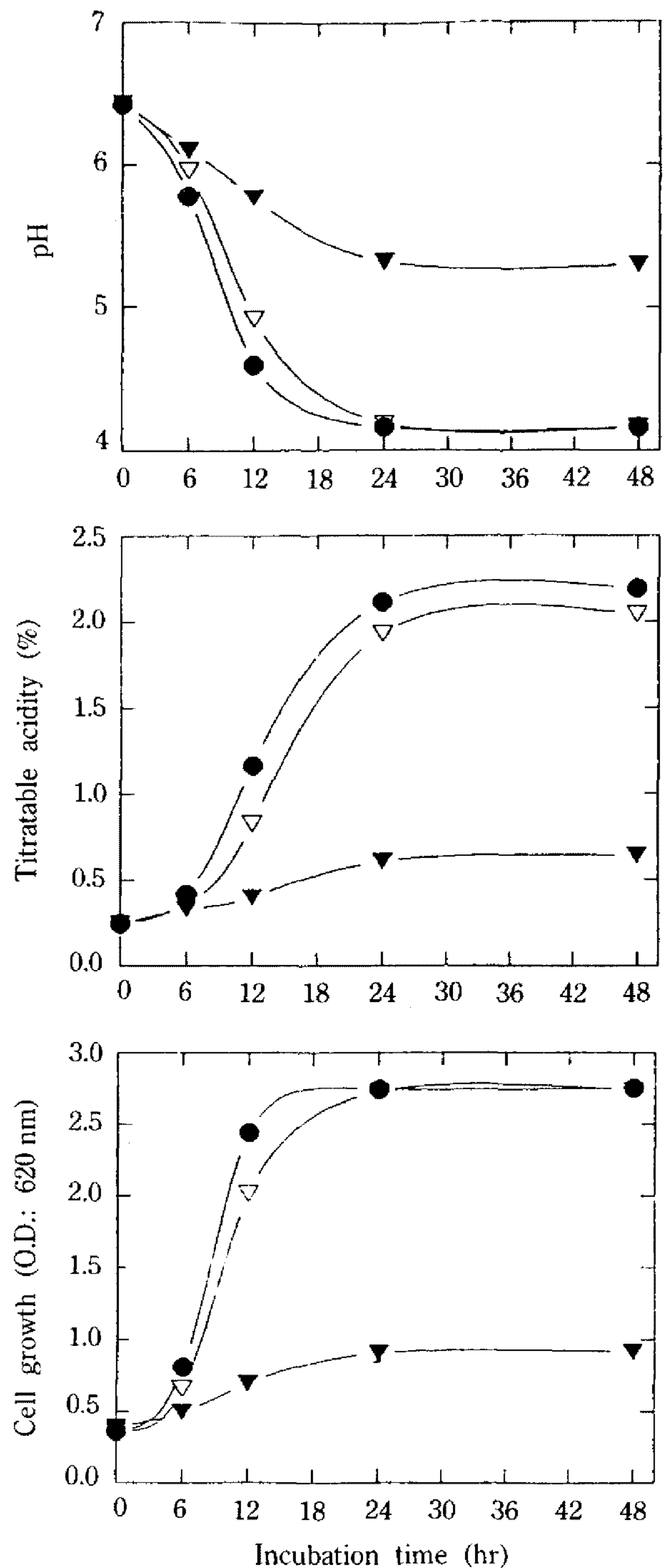


Fig. 6. Changes in cell growth and acid production of *Lactobacillus lactis* in modified EG medium containing cadmium under the anaerobic condition. -●- control, -▽- 10 ppm, -▼- 50 ppm

평가하기 위해 cadmium이 50 ppm 함유된 modified EG medium에 장내유용세균인 젖산균과 유해세균중의 하나인 *E. coli*를 접종하고 37°C에서 혐기적으로 24시간동안 배양하여 젖산균체와 *E. coli* 균체에 축적된 cadmium의 함량을 atomic absorption spectro-

photometer로 측정된 결과는 Table 4와 같다.

장내유익균인 젖산균이 cell wet weight 1 g당 9.304 ~ 12.428 mg으로 6.775 mg의 *E. coli*보다 상당히 많은 양의 cadmium을 축적하였으며, 특히 *Lactobacillus lactis*의 경우는 *E. coli*보다 약 두배 정도의 축적량을

**Table 4. Accumulation of cadmium in lactic acid bacteria grown in modified EG medium containing 50 ppm of cadmium**

Strains	Wet harvested cell (mg/200 ml cultures)	Accumulated cadmium in cells	
		Total cadmium (mg)	Total cadmium/cell mass (mg/g wet cell)
<i>E. coli</i>	0.213	1.443	6.775
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.290	2.925	10.086
<i>Lactobacillus casei</i>	0.313	2.912	9.304
<i>Lactobacillus lactis</i>	0.229	2.846	12.428
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.277	2.876	10.383
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0.249	2.859	11.482

보였다. 젖산균간의 비교에서 볼 때 cadmium 내성 정도와는 달리 *Lactobacillus* 속이나 *Streptococcus* 속의 축적량은 차이가 없었으며, *Lactobacillus casei*가 다른 균에 비해 다소 cadmium 축적량이 적었다. 또한 배지중 cadmium의 축적율도 젖산균이 28.46~29.25%로 14.43%의 *E. coli*보다 상당히 높은 것으로 나타났다. 이러한 젖산균의 cadmium 축적량 및 축적율은 유(12) 등이 보고한 고농도의 cadmium 배지에서 좋은 성장을 보이는 cadmium 내성 균주 *Serratia marcescens* strain P(축적량 0.35 mg/g wet cell, 축적율 : 16.59%)보다는 상당히 높은 것으로 cadmium 내성 정도와 축적율과는 일정한 상관관계가 없는 것으로 판단된다.

#### 젖산균내의 cadmium 분포

축적된 cadmium의 젖산균체내 분포를 측정하기 위해 젖산균중 *Lactobacillus acidophilus*를 선발하여 50 ppm cadmium이 첨가된 배지에서 24시간 혐기적으로 배양시킨 다음 Fig. 1과 같이 세포질, 원형질막 그리고 세포벽성분으로 분획하여 AAS로 cadmium 함량을 분석한 결과는 Table 5와 같다.

중금속 내성 세균에 축적된 중금속은 대부분이 원형질막 및 세포벽과 같은 세포 표층구조물에 주로 분포하며 그 함량은 약 50~90%에 달하는 것으로 보고(12)되고 있다. 본 실험의 *Lactobacillus acidophilus*

**Table 5. Distribution of cadmium in cellular structures of *Lactobacillus acidophilus***

Structures	cadmium content (mg/g wet cell)	Distribution ratio (%)
Cytoplasm	2.922	28.97
Plasma membrane	2.887	28.62
Cell wall	4.277	42.41

에 있어서도 축적된 cadmium은 원형질막에 28.62%, 세포벽에 42.41%, 그리고 세포질에 28.97%로 분포되어 표층구조물(원형질막과 세포벽)에 71.03%가 함유된 것으로 나타나 다른 중금속 내성균주와 유사한 것으로 나타났다. 세포질 보다는 세포벽이나 원형질막에 많은 양의 cadmium이 축적되는 것은 젖산균 세포막의 선택적 투과성으로 인해 cadmium의 세포질 속으로의 수송이 제한을 받게 되는 반면에, 세포외벽에 존재하는 많은 양의 음이온 물질들은 cadmium과 쉽게 결합하기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 보면 젖산균은 인체의 장관내의 생물학적 cadmium 농도내에서 잘 생육할 뿐만 아니라 장내상재균으로써 다른 유해장내세균(본 실험에서는 *E. coli*와 비교함)에 비해 cadmium 축적율이 월등히 높아 대장암 발생을 저하, 유당소화 흡수의 촉진, 혈청 콜레스테롤의 저하 등의 정상작용 뿐만 아니라 구강으로 섭취된 cadmium의 제거제로써 유용한 균주로 사료된다. 그러나 cadmium 외에 다른 유해중금속에 대한 연구 뿐만 아니라 이러한 중금속의 세포막 투과기작과 세포막 부착기작 그리고 세포내의 동태에 대한 보다 많은 연구가 더 진행되어야 하며 실험동물을 통한 *in vivo* 실험이 이루어져야 할 것이다.

#### 요 약

구강섭취된 cadmium이 장관에서 체내의 각 조직으로 흡수되기전 장관 정상 균총인 젖산균에 흡착, 축적되어 변과 함께 체외로 배출될 수 있다고 가정하고, 혐기적 조건하에서 젖산균체의 cadmium 내성, 축적능력 및 균체내 분포를 *in vitro* 상에서 조사하였다. cadmium이 10 ppm 첨가된 배지에서 젖산균의 생육과 산생성량은 양호하였으나, 50 ppm에서는 거의 생육하지 못하였다. *Lactobacillus* 속이 *Streptococcus* 속보다 더 높은 내성을 가진것으로 나타났으며, 그중 *Lactobacillus acidophilus*가 가장 높은 cadmium



내성을 가진 것으로 나타났다. cadmium이 첨가된 배지에서 24시간 배양시킨 젖산균에 축적된 cadmium은 9.304~12.428 mg/g wet cell로 6.775 mg의 *E. coli*보다 상당히 높았으며, 젖산균 중 *Lactobacillus casei*가 가장 높은 축적량을 나타내었다. 젖산균의 cadmium 축적을 역시 28.46~29.25%로 14.43%의 *E. coli*보다 유의적으로 높았다. 젖산균체 내의 cadmium의 분포는 세포벽에 42.41%, 원형질막에 28.62%, 세포질에 28.97%로 나타났다.

### 참고문헌

1. Dean, J.G., Bosqui, F.L. and Lanovette, K.H. 1972. Removing heavy metals from wasted water. *Environ. Sci. Technol.* **6**: 518-522.
2. Boon, D.Y. and Soltanpour, P.N. 1992. Lead, cadmium and zinc contamination of aspen garden soils and vegetation. *J. Environ. Qual.* **21**: 82-86.
3. 장성길. 1983. 한국인 각 장기 조직 중의 미량금속 원소 분포. 중앙대학교 대학원 박사학위 논문.
4. Page, A.I. and Chang, A.C. 1986. Cadmium Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, Pp. 33.
5. 정규철, 박정덕, 조병희. 1989. 급성 카드뮴 중독의 치사량과 혈액 및 간조직에 미치는 영향. *중앙의대지* **13**: 31-36.
6. 승정자. 1983. 극미량의 원소와 영양. 민음사, Pp. 317.
7. Frank, N.K. and Cartis, D.K. 1981. Cadmium in the environment. John wileys & Sons II, Pp. 595.
8. Murakami, M., Cain, K. and Webb, M. 1983. Cd-metallothionein induced nephropathy, a morphological and autoradiographical study of Cd distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *J. Appl. Toxicol.* **5**: 237-244.
9. 유대식. 1979. 중금속 내성균주의 미생물학적 성질. *한국산업미생물학회지* **7**: 183-190.
10. Yu, T.S., Song, H.I. and Chung, K.T. 1989. Intracellular accumulation of cadmium by intact cadmium tolerant yeast cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 29-34.
11. 김영배, 이서래. 1976. 카드뮴의 내성균 분리 및 균체내 축적. *한국산업미생물학회지* **4**: 111-115.
12. 유관희, 이호용. 1992. *Serratia marcescens* strain P 성장에 미치는 중금속 내성. *한국산업미생물학회* **20**: 693-698.
13. 안영미. 1990. 흰쥐의 카드뮴 독성에 대한 부추(*Allium odorum* L.)의 방어효과에 관한 연구. 명지대학교 박사학위 논문.
14. 엄순택, 송동빈, 차철환. 1986. 白鼠의 카드뮴 중독시 BAL 및 DMSA와 마늘의 방어효과에 대한 비교연구. *고대의대논문집* **23**: 109-118.
15. 이영옥, 차철환. 1986. 白鼠의 카드뮴 중독시 마늘, D-penicillamine 및 N-acetyl-DL-penicillamine의 방어효과에 관한 연구. *고대의대논문집* **23**: 43-52.
16. Grunewald, K.K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* **7**: 208-214.
17. Kilara, and K.M. Shahani. 1975. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *J. Dairy sci.* **59**: 2031-2035.
18. 최경호, 현은민, 박금순. 1981. *Staphylococcus aureus*의 균체분획. *한국영양식량학회지* **10**: 85-91.

(Received 8 March 1995)