

Bifidobacteria에 의한 항돌연변이 효과

이세경 · 지근억*
한림대학교 식품영양학과

Antimutagenic Effects of Bifidobacteria

Sae Kyung Lee and Geun Eog Ji
Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

Abstract

The antimutagenic properties of twenty-one strains of *Bifidobacterium* were examined using *Salmonella typhimurium* TA98 in an *in vitro* assay system. The mutagens utilized for testing included Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-⁵H-pyrido (4, 3-b) indole), benzopyrene, IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline), and NQO. The lyophilized cells of strain showed inhibitory effect of 64, 38, 29 and 20% in average against Trp-P-1, benzopyrene, NQO and IQ, respectively. There was no marked variation between each strain or growth stage in the degree of antimutagenicity against Trp-P-1, benzopyrene and IQ. Twelve hour grown cells showed higher antimutagenicity against NQO than 5-day grown cells. The results indicate that *Bifidobacterium* cells had a antimutagenic effect against several well-known mutagens to some degree.

Key words: *Bifidobacterium*, antimutagenic properties

서 론

발효유제품과 유산균은 *in vitro*에서 돌연변이 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 유산균의 항돌연변이 효과에 관한 연구는 대부분 *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*속 등을 대상으로 이루어졌다^(1,4). 최근에는 편성 혐기성 균인 *Bifidobacterium*을 이용한 발효제품 및 정장 캡슐제제가 증가하고 있다. 장내에서 *Bifidobacterium*은 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 비하여 100배 이상의 균수로 존재하고 특히 모유를 먹는 아기에서는 *Bifidobacterium*이 최우세 균총을 형성한다.

*Bifidobacterium*은 돌연변이 유발 물질인 Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-⁵H-pyrido (4, 3-b) indole), Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido{1,2-a:3',2'-d}imidazole), IQ 등에 대한 흡착능을 보유한 것으로 보고된 바 있다^(5,6). Borob'eva 등^(7,8)은 *B. bifidum*의 2-nitrofluorene과 NQO (4-nitroquinoline oxide)에 대한 항돌연변이원성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 한국인의 분변으로부터 분리된 약 20종류의 *Bifidobacterium* 균주들을 대

상으로 *Salmonella typhimurium* 98 균주에 의한 Ames 시험법을 이용하여 Trp-P-1, IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline), benzopyrene, NQO 등에 대한 항돌연변이 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

NQO, Trp-P-1, IQ, 1,2-benzopyrene 등은 Wako Chemical Co. (Japan)에서 구입하였다. Aroclor 1254는 Chem Service (U.S.A.)에서 구입하였다. DMSO, L-histidine, D-biotin, D-glucose-6-phosphate, NADPH, NADH 등은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)로부터 구입하였고 nutrient broth, Bacto-agar 등은 Difco Chemical Co. (U.S.A.)로부터 구입하였다.

S9 분획 조제

옥수수 기름에 200 mg/ml 농도로 희석한 Aroclor 1254를 체중 약 200 g의 Sprague-Dawley male rat에 500 mg/kg 양으로 복강내 주입하였다. 5일 후(12시간 전부터 물만을 제공하고 절식 시킴) 무균 상태의 실험 조건에서 간을 채취하여 냉각된 KCl로 여러번 수세하였다. 3배 부피의 0.15 M KCl 용액에 옮긴 수세된 간

Corresponding author: Geun Eog Ji, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Okchon-dong, Chuncheon, Kangwon-do 200-702, Korea

을 균질화한 후 원심분리 (10 min at 9000×g)하여 그 상정액을 취하였다. 이 S9 분획은 취해지는 즉시 Nunc tubes에 담아 -80°C deep freezer에 보관하였다.

시험 균주

사용된 *Bifidobacterium*은 21균주로서 이중 17균주는 본 연구실에서 분리된 균주들이고 나머지 4균주는 표준균주로서 *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* ATCC 15707, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 15697들이었다. *S. typhimurium* reversion assay에 사용한 시험균주 *S. typhimurium* TA 98은 Ames (U. C. Berkeley, U.S.A.)로 부터 분양받았다. TA 98의 유전적 안정성을 확인하기 위하여는 주기적으로 ampicilin (25 µg/ml) 내성을 확인하고 minimal glucose agar배지와 histidine 첨가 배지에서 histidine 영양 요구성을 확인하였다.

S. typhimurium reversion assay

돌연변이원으로 S9를 필요로 하는 benzopyrene, Trp-P-1, IQ 등을 사용하였고 S9에 의한 활성화를 필요로 하지 않는 물질로는 NQO를 사용하였다. Maron과 Ames의 방법¹⁹⁾에 준하여 preincubation test를 이용하여 *Bifidobacterium*의 돌연변이 억제효과를 조사하였다. *Bifidobacterium* 균주들은 1% glucose가 첨가된 Brain Heart Infusion 배지에 10-12시간 배양하였다. 원심분리 후 얻은 균체를 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 3번 수세한 후 동결건조시켰다. 0.2 M phosphate buffer (pH 4.0)용액 0.3 ml에 돌연변이원으로서 DMSO에 녹인 30 µl의 benzopyrene (5 mg/ml), 10 µl의 Trp-P-1 (2.5 mg/ml), 5 µl의 IQ (250 µg/ml), 10 µl의 NQO (1 mg/ml) 등을 각각 섞고 동결균체 2 mg을 첨가하였다. 대조군에서는 균체를 첨가하지 않았다. 이 혼합액을 37°C에서 3시간 진탕한 뒤 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이와 같이 전처리한 후 30 µl의 benzopyrene, 10 µl의 NQO, 10 µl의 Trp-P-1, 10 µl의 IQ 반응액을 각각 취하여 45°C의 2.3 ml top agar와 섞고 TA98균주 배양액 100 µl와 S9 혼합액 500 µl를 첨가하였다. 최소 글루코오스 한천평판배지에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 복귀 콜로니의 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

식품 또는 환경 중에 존재하는 돌연변이원을 활성화 하 또는 불활성화시키는 요인을 조사하는 것은 인체

Table 1. Effects of *Bifidobacterium* cells on the antimutagenicity against Trp-P-1, Benzopyrene, IQ and NQO in *Salmonella typhimurium* TA 98

	Mutagens used			
	Trp-P-1 ¹⁾	Benzopyrene ¹⁾	IQ ³⁾	NQO ³⁾
	No. of revertants by mutagen minus No. of spontaneous revertants			
Control	428	102	571	340
Twenty-one <i>Bifidobacterium</i> strains ³⁾	154	63	405	272
Antimutagenicity (%) ⁴⁾	64	38	29	20

¹⁾With metabolic activation

²⁾Without metabolic activation

³⁾Average value of 21 *Bifidobacterium* strains tested in this study was shown

⁴⁾Antimutagenicity indicates the percentage of inhibition against control

의 위해 인자의 수준을 조사하는데 중요하다. *Bifidobacterium*은 장내에서 우세균총을 형성하는 균이며 식품산업에서 널리 사용되고 있어 *Bifidobacterium*이 돌연변이 물질들의 돌연변이 유발능에 어떠한 영향을 미치는 것인가를 조사하는 것은 의미있는 일일 것이다. 본 조사에서는 21균주의 *Bifidobacterium*을 대상으로 Trp-P-1, benzopyrene, NQO, IQ에 대한 항돌연변이 능력을 조사하였다(Table 1). 각 균주들은 각각의 돌연변이 물질에 대한 항돌연변이 효과에 어느 정도의 차이는 있었지만 평균적으로 Trp-P-1에 대하여는 64%, benzopyrene에 대하여는 38%, NQO에 대하여는 20%, IQ에 대하여는 29% 수준으로 항돌연변이율을 나타내었다. *Bifidobacterium*의 항 돌연변이율은 S9의 필요 여부와의 관계보다는 각 돌연변이원과의 특이적인 반응정도에 기인하는 것으로 생각된다. Morotomi와 Mutai의 보고²⁰⁾에서 사용된 *Bifidobacterium*들은 IQ에 비하여 Trp-P-1에 보다 높은 결합력을 갖는다고 보고하였는데 본 연구의 결과에서 IQ보다 Trp-P-1에 대한 항돌연변이 효과가 높은 것은 이와 같은 *Bifidobacterium* 균체의 Trp-P-1에 대한 높은 결합력에 기인한 결과로 해석된다. Zhang과 Ohta²¹⁾는 120°C에서 15분간 열처리한 유산균 균체들이 이들 돌연변이 물질에 결합하는 정도에는 영향을 미치지 않았고 돌연변이 물질에 결합하는 균체의 성분은 CWS (cell wall skeleton), 특히 peptidoglycan 성분이라고 보고하였다. 그러나 아직 이들 돌연변이원들이 *Bifidobacterium* 균체 성분의 효소적 또는 화학적 변환을 받아 돌연변이율에 변화가 일어났을 가능성도 남아있다고 할 수 있다. 사용된 균주중 *Bifidobacterium* sp. SU31,

Table 2. Effects of growth periods of the *Bifidobacterium* cells on the antimutagenicity

		Mutagens used			
		Trp-P-1	Benzopyrene	IQ	NQO
		No. of revertants by mutagen minus No. of spontaneous revertants			
Control		442	105	553	358
<i>Bifidobacterium</i> sp. SU31	5-hours	148	61	405	254
	12-hours	158	47	427	124
	5-316s	162	62	448	382
<i>B. longum</i> ATCC 15707	5-hours	172	63	437	274
	12-hours	152	61	459	285
	5-316s	168	62	415	345
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	5-hours	153	60	452	263
	12-hours	171	58	441	229
	5-316s	155	65	469	339

B. longum ATCC 15707, *B. infantis* 15697의 성장기별에 따른 항 돌연변이 효과를 조사하였다(Table 2). 배양 초기균으로는 5시간 배양된 균을 사용하였고 배양 중기의 대수기 세포로서 12시간 배양균주, 정지기 세포로는 5일 배양균주를 사용하였다. Trp-P-1, IQ, benzopyrene에 대하여는 배양시간별 균체의 항돌연변이능에 큰 차이가 나타나지 않았다. NQO에 대하여는 5일 배양세포들의 항돌연변이능이 감소하였고 SU 31의 12시간 배양균체는 항돌연변이능이 가장 큰 것으로 나타났다. 항돌연변이 능력이 균체와 돌연변이 흡착에 기인한다면 성장 시기별에 따른 차이는 미약할 것이고 돌연변이 물질에 대한 균체 성분의 대사작용에 기인한다면 성장기별 차이가 클 것으로 생각되나 보다 자세한 기작은 추후 면밀히 연구되어야 할 것이다. Borob'eva 등^(7,8)은 대수기의 *Streptococcus faecalis*와 propionic acid bacteria 등이 thiol compound를 생산하여 NQO를 불활성화시키는 것이라고 제안한 바 있다. 본 실험에서 조사된 *Bifidobacterium* 균체 자체는 돌연변이를 유발하지 않았다(data not shown). 결론적으로 *Bifidobacterium* 균체는 *Salmonella*를 이용한 Ames 실험법에서 돌연변이는 일으키지 않으면서 Trp-P-1, benzopyrene, IQ, NQO 등의 돌연변이 유발능을 저하시키는 것으로 나타났다. 따라서 *Bifidobacterium*의 유해세균에 대한 길항작용, 독성물질에 대한 감소 효과와 아울러 돌연변이에 대한 항돌연변이 효과 등은 장내에서의 유익작용에 대해 크게 기여한다고 할 수 있다. 앞으로 더욱 다양한 돌연변이 물질 및 독성 물질 대사에 대한 *Bifidobacterium*의 영향을 조사하는 것이 바람직 할 것이다.

요 약

분리된 균주와 표준균주의 *Bifidobacterium* 21종류에 대하여 *Salmonella typhimurium* TA 98균주를 이용한 *in vitro* 항돌연변이능을 조사하였다. 실험에 이용된 돌연변이원으로는 Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-³H-pyrido (4, 3-b) indole), benzopyrene, IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline)와 NQO (4-nitroquinoline oxide) 등이었다. 동결건조된 균체들은 평균적으로 각각 Trp-P-1, benzopyrene, NQO, IQ에 대하여 64, 38, 29, 20%의 항돌연변이능을 나타냈다. Trp-P-1, benzopyrene, IQ에 대하여는 균주의 종류와 성장 시기에 따른 항돌연변이능에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. NQO에 대하여는 12시간 배양세포가 5일 배양세포보다 항돌연변이능이 우수한 것으로 나타났다. 본 연구결과는 *Bifidobacterium* 균주들이 일반적으로 몇 종류의 잘 알려진 돌연변이원에 대한 항돌연변이능을 보유하고 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 지원의 선도기술개발사업(8-3-01, 1995년)과 통상산업부의 공업기반기술개발사업(1995년)의 연구비 지원에 의한 일부의 결과로서 연구비 지원에 대한 감사를 드립니다.

문 헌

- Hosono, A., Kashina, T. and Kada, T.: Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.*, **69**, 2237 (1986)
- Bodana, A. R. and Rao, D.R.: Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, **73**, 3379 (1990)
- Hosono, A, Wardojo, R. and Otani, H.: Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosoamines. *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 1639 (1990)
- Zhang, X. B. and Ohta, Y.: Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. *J. Dairy Sci.*, **73**, 2702 (1990)
- Zhang, X. B. and Ohta, Y.: Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1477 (1991)
- Morotomi, M. and Mutai M.: In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. *J. National Cancer Inst.*, **77**, 195 (1986)
- Borob'eva, L.I., Cherdyntseva, T.A. and Abilev, S.K. : Antimutagenic action of bacterial culture liquid on mutagenesis induced by 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* strains. *Genetika (Russian)*, **31**, 901 (1995)

8. Borob'eva, L. I., Cherdyntseva, T.A. and Abilev, S.K.: Antimutagenic action of bacteria on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in *Salmonella typhimurium*. *Microbiologia* (Russian), **64**, 228 (1995)
9. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the

Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 73 (1983)

(1996년 5월 10일 접수)