

김치로부터 항돌연변이 물질을 생산하는 유산균의 분리 및 특성

이창호 · 박희동*
경북대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Producing Antimutagenic Substance from Korean Kimchi. Rhee, Chang-Ho and Heui-Dong Park*. Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 701-702, Korea - Various lactic acid bacteria were isolated from Korean Kimchi in order to study their antimutagenic substances. Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 showed the strain KLAB21 to have the highest antimutagenic activity among the 230 isolated strains against MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), NPD (4-nitro-O-phenylenediamine), NQO (4-nitrosoquinoline-1-oxide) and AFB1 (aflatoxin B1). The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* based on its morphological, cultural and physiological characteristics. Antimutagenic activity of *L. plantarum* KLAB21 was found in culture supernatant suggesting the bacterium secrete antimutagenic substance in the media. No mutagenic activity was found in the culture supernatant. The isolated strain *L. plantarum* KLAB21 showed much higher antimutagenic activity than *L. plantarum* IAM1261 which is being used industrially for fermented milk production. The antimutagenic activity of *L. plantarum* KLAB21 was reconfirmed by the spore-rec assay using spores of *Bacillus subtilis* H17(Rec⁺) and M45(Rec⁻).

Key words: antimutagenic activity, Ames test, spore-rec assay, lactic acid bacteria, Kimchi

유산균은 인간에 의해 오랜 세월 동안 산업적으로 이용되어온 매우 중요한 세균의 하나로서 발효유, 치즈, 버터 등의 우유 가공품과 우리나라의 김치, 간장, 된장 등의 자연발효 식품에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 인간의 장, 구강 등에 존재하는 미생물군으로 인간과 밀접한 관계가 있으며, 특히 장내에서 인간에게 유익한 작용을 나타내어 건강 유지에도 큰 역할을 담당하고 있다[3, 21].

최근 건강에 대한 관심의 증폭과 함께 식이를 이용한 암의 예방과 치료에 많은 연구자들의 관심이 집중되고 있다. 이들 중 유산균 발효산물과 낙농제품의 잠재적 영양 및 치료의 잇점[10-13, 16, 37]을 보여주는 많은 연구들이 보고되어 있고, 이는 주로 위장관의 미생물계가 유제품에 의해 인체에 이로운 방향으로 변화하는데 기인한다[15, 34, 39]고 한다. 이러한 이론에 대한 의문들이 다소 제기되기는 하지만 발효유제품의 섭취가 장내 유산균의 수를 늘리고 coli form의 수를 줄이는 것은 잘 알려져 있는 사실이다[14, 38]. 유산균이 인간의 건강을 증진시킬 수 있다는 것은 최초로 Metschnikoff[30]의 연구에 의해 밝혀졌다. 그는 요구르트 제조에 관여하는 젖산균이 대장내에서 혐기성 세균, 포자형성 세균 및 독소 생성 세균

들의 증식을 억제하기 때문에 장내에 *Lactobacillus bulgaricus*를 이식하여 줌으로써 장수에 매우 중요한 역할을 한다고 주장하였다. 최근에 있어서 인간의 건강과 장수에 관한 가장 중요한 인자의 하나는 암의 조절 문제이다. Bogdanov 등[2]에 의해 *L. bulgaricus*가 강력한 항암 효과를 가지고 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 실험동물을 이용한 유산균의 항암효과 및 세균세포를 이용한 항돌연변이 효과에 관한 연구가 이루어져 왔다[1, 2].

또한, 유산균의 기능으로서 식품에 특유의 풍미와 우수한 보존성 부여, 단백질 부분 분해에 의한 소화 흡수성의 향상, 장내 정상 세균총의 유지, 장내 이상 발효의 개선, 장내 부패세균의 독성물질 무독화 작용, 칼슘의 체내 흡수 촉진, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 면역기능 부활작용에 의한 interferon 유도, 항체 생성 및 세포성 면역 활성화등의 기작에 의한 병원성 세균의 감염 방어 및 항암 효과가 알려짐에 따라 기능성 식품 및 의약품에의 이용에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[1, 3, 11-15, 38-39].

우리나라 대표적인 젖산 발효식품인 김치에 관한 연구로는 최근에 이르러 김치의 규격화[4, 5], 김치의 산패 지연으로 인한 저장성의 증가[27, 28], 김치의 항산화 활성[35, 36], 김치 유산균이 생산하는 항세균성 물질[8, 9], 김치 유산균의 starter 개발[25, 26]에 관한 연구 등이 활발하게 수행되고 있다. 이외에도 김치의 항돌연변이성 또는 항암성에 관한 연구로는 김치의 추출물[6, 7, 32,

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5774, Fax. 82-53-950-5774
E-mail: hpark@kyungpook.ac.kr

33], 김치의 원료[24] 등의 항돌연변이 및 항암활성에 관한 연구 보고가 있으나 김치로부터 분리한 유산균의 항돌연변이 또는 항암 효과에 대한 연구는 거의 보고된 바 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 전통 발효식품인 김치로부터 230여주의 유산균을 분리하여 이들의 항돌연변이 효과를 직접변이원과 간접변이원에 대하여 조사하였으며 활성이 가장 높은 균주를 동정한 후 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

유산균의 분리는 숙성중의 김치시료를 20일간 4℃에 보관하면서 5일 간격으로 채취하여 행하였다. 시료를 멸균된 0.9% NaCl 용액에 적당량 희석한 상등액을 bromocresol purple(BCP)를 함유한 plate count agar (yeast extract 0.25%, bactopectone 0.5%, glucose 0.1%, tween 80 0.1%, L-lysine 0.01%, BCP 0.004%, agar 1.5%) 배지에 도달하여 37℃에서 2일간 배양한 후 균체 주변에 황색환을 형성하는 약 230여주의 유산균을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 MRS broth(bactopectone 1%, meat extract 1%, yeast extract 0.5%, glucose 2%, tween 80 0.1%, sodium acetate 0.5%, triammonium citrate 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 배지에 배양하여 상등액의 항돌연변이 활성[29, 40, 41]을 측정 후 활성이 가장 높은 균주를 최종 선별하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

분리된 세균의 동정은 배양학적, 형태학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 색인[20]에 따라 동정하였다.

배양상등액의 조제

MRS broth를 사용하여 37℃에서 36시간 150 rpm으로 균을 진탕배양한 후 25,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Ames test에 의한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성 조사

시료의 돌연변이 및 항돌연변이원성 조사는 Ames test를 개량한 preincubation법[29, 40, 41]에 따라 히스티딘 영양요구주로서 point mutant인 *Salmonella typhimurium* TA100(hisG46, rfa, Δ uvrB)과 frame shift mutant인 *S. typhimurium* TA98(hisD3052, rfa, Δ uvrB)을 사용하여 시료에 의한 His⁺ 복귀돌연변이 정도를 조

사하여 행하였다. 변이원으로서 S. typhimurium TA 100의 경우 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), NPD(4-nitro-O-phenylenediamine), AFB1 (aflatoxin B1)를 plate당 각각 5 μ g, 15 μ g, 1 μ g되게 사용하였으며 S. typhimurium TA98의 경우 NPD, NQO(4-nitroquinoline-1-oxide), AFB1을 각각 2.5 μ g, 0.25 μ g, 1 μ g되게 사용하였다. AFB1과 같은 간접돌연변이원의 활성화를 위하여는 쥐 간의 microsome 분획인 Sigma사의 S-9 mix 0.5 ml를 첨가하여 행하였다. 항돌연변이원성 조사를 위하여는 미리 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료 용액을 일정농도로 첨가하고 변이원을 50 μ l 첨가한 다음 여기에 영양배지에서 16시간 배양시킨 S. typhimurium TA 배양액 100 μ l와 직접변이원의 경우 0.2 M sodium phosphate buffer 0.5 ml 또는 간접변이원의 경우 S-9 mix 0.5 ml를 첨가하였다. 이것을 37℃에서 30분간 preincubation한 다음 소량의 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45℃) 3 ml를 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar상에 중층하여 평판고화 시킨 다음 37℃에서 48시간 배양하였다. 항돌연변이 활성은 상기의 고체배지에서 생육하는 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니를 계수한 다음 다음식으로 환산하여 His⁺ 복귀돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

- a: 변이원에 의해 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수
- b: 변이원과 시료 처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수
- c: 변이원과 시료 무처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수

시료의 돌연변이원성 조사를 위하여는 변이원을 첨가하지 않고 시료만을 첨가하여 상기의 항돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 행하였다. 돌연변이 활성은 시료에 의한 His⁺ 복귀 돌연변이율로서 무처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수(자연 복귀돌연변이 콜로니 수)에 대한 시료 처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수의 %로 나타내었다. 돌연변이 및 항돌연변이 조사는 3구 3회 반복으로 실험하여 평균값으로 나타내었다.

Spore-rec assay에 의한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성 조사

Kada의 방법[21-23]에 따라 *B. subtilis* H17(rec⁺)과 *B. subtilis* M45(rec⁻)의 포자를 조제하여 실험에 사용하였다. 영양한천배지를 조제하여 50℃로 냉각시켜 *B. subtilis* H17 및 *B. subtilis* M45의 포자 현탁액을 배지 10 ml당 1 ml의 비율로 혼합한 후 petri dish에 각각 분주하여 고화시킨 다음 돌연변이원성 및 항돌연변이원성 실험

에 사용하였다. 항돌연변이원성을 조사하기 위하여는 고화시킨 *B. subtilis* H17 및 *B. subtilis* M45 포자 한천배지에 paper disc를 놓고 37°C에서 30분간 반응시킨 배양 상등액과 MNNG(10 µg/10 µl) 또는 NQO(20 ng/10 µl) 혼합액을 주입하고 4°C에서 8시간 incubation하였다. 그 후 37°C에서 16시간 배양하여 paper disc 주변에 형성된 생육 저지대의 직경을 측정하였다. 돌연변이원성 조사를 위하여는 배양 상등액을 첨가하지 않고 상기의 항돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 행하였다.

결과 및 고찰

균주의 선별

숙성김치로부터 BCP를 함유한 plate count agar 배지에서 황색환을 형성하는 약 230여주의 균을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 MRS 배지에서 36시간 재배양한 후, 원심분리하여 얻은 배양 상등액의 직접변이원인 MNNG에 대한 항돌연변이 활성을 측정하여 활성이 90% 이상인 14균주를 2차 선별하였다. 이 균주들의 배양 상등액을 *S. typhimurium* TA100과 *S. typhimurium* TA98 균주를 사용하여 MNNG, NPD와 NQO에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 분리된 모든 균주들에 있어서 MNNG에 대한 항돌연변이 활성이 다른 변이원에 대한 활성보다 높게 나타났다. 14개의 균주들 중에서 특히 균주 KLAB21이 모든 구간에 있

Table 1. Antimutagenic activities of various bacteria isolated from Kimchi on *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98

Strains	Inhibition ratio(%)*			
	TA100		TA98	
	MNNG	NPD	NPD	NQO
KLAB17	92.98	46.92	23.50	37.67
KLAB21	94.69	54.78	39.35	38.14
DLAB8	93.63	42.18	30.55	28.37
DLAB16	95.18	48.82	21.83	46.05
KLAB325	90.37	45.97	35.39	25.58
KLAB346	90.55	32.70	4.23	0.93
KLAB408	90.22	44.55	32.75	13.49
KLAB421	90.13	36.49	12.24	3.72
KLAB433	90.04	45.50	21.92	19.07
KLAB504	90.66	30.81	14.97	1.40
KLAB506	90.31	49.76	26.23	6.05
KLAB507	90.48	41.71	15.23	16.28
KLAB508	90.31	40.28	4.84	3.26
KLAB519	90.63	38.39	15.23	3.72

*Significantly different from the control at the P<0.05 level. Antimutagenic activity is expressed as inhibition ratio(%) of His⁺ reversion of *Salmonella typhimurium* which is described in detail by Maron and Ames[29].



Fig. 1. Scanning electron micrograph of *L. plantarum* KLAB 21.

어서 활성이 가장 높았으므로 본 균주를 공시균주로 사용하였다.

분리균주의 동정

항돌연변이 활성이 가장 우수한 균주 KLAB21을 MRS 한천 배지에서 배양한 후 전자 현미경으로 관찰한 결과 세포의 형태가 간균이었다(Fig. 1). 분리 균주의 생리학적 성질을 조사한 결과 Gram 염색 양성으로서, 운동성이 없었으며, catalase 시험, oxidase 시험, V-P 시험시 음성, glucose로부터 gas를 생성하지 않았으며, arginine으로부터 NH₃를 생성하지 않았다. 또한 6.5% NaCl 존재하에서 생육하였으나 10% ethanol 존재하에서는 생육하지 못하였다(Table 2). 탄소원 이용성을 조사한 결과 amygdaline, esculin, glucose, lactose, raffinose, salicin, gluconate, trehalose 등은 이용하였으나, rhamnose, xylose, erythritol, inositol, xylitol 등은 이용하지 못하였다(Table 3). 이상의 형태 및 생리학적 특성을 토대로하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 기술된 분류 기준[20]에 따라 동정한 결과, *Lactobacillus plantarum* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리 균을 *Lactobacillus plantarum* KLAB21로 명명하였다.

Lactobacillus plantarum KLAB21의 항돌연변이 활성

분리 동정된 유산균을 MRS 배지에서 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양 상등액의 MNNG, NQO에 대한 변이원성을 조사한 결과 배양 상등액의 농도에 따른 돌연변이 효과는 mutation ratio가 2.0이하이며 농도 의존성을 나타내지 않으므로 돌연변이 활성이 없음을 알수 있었다(Table 4). 배양 상등액의 농도를 달리하여 항돌연변이 활성을 측정한 결과 point mutant인 *S. typhimu-*

Table 2. Morphological and Physiological characteristics of the isolated strain KLAB21

Classification	KLAB21
Morphological characteristics	
Form	Rod
Gram stain	+
Motility	-
Spore formation	-
Facultative anaerobic	+
Physiological characteristics	
Catalase	-
Methy red test	+
V-P test	-
V-P test(below pH 7.0)	-
Indole production	-
Starch hydrolysis	-
Utilization of citrate	-
Hydrogen sulfide production	+
Gas from glucose	-
Urease test	+
Pigment production	-
Oxidase test	-
Nitrate reduction	-
Growth at 15°C	+
Growth at 45°C	-
Growth at pH 3.6	+
Growth at pH 9.6	+
Growth in 6.5% NaCl	+
Growth in 10% ethanol	-

+: positive, -: negative

rium TA100을 이용한 실험에서 변이원 MNNG, NPD 및 AFB1에 대한 활성은 배양 상등액 100 µl/plate 첨가 시 각각 98.42%, 73.95%, 82.52%로 가장 높게 나타났다. 또한 frame shift mutant인 *S. typhimurium* TA98을 이용한 실험에서 변이원 NPD, NQO 및 AFB1에 대한 활성은 배양 상등액 100 µl/plate 첨가 시 각각 62.78%, 57.21%, 78.53%로 가장 높게 나타났다(Table 5). 유산균 배양 상등액의 항돌연변이 활성은 *S. typhimurium* TA100에 있어서 *S. typhimurium* TA98보다 양성변이원에 대하여 강한 활성을 나타내었다. 이와 같이 항돌연변이 활성이 두 균주간에 차이를 나타내는 현상은 *S. typhimurium* TA100은 *hisG* 유전자의 point mutant이고 *S. typhimurium* TA98은 *hisD*의 유전자의 frame shift mutant로서 복귀돌연변이의 기작이 서로 다르기 때문인 것으로 추측된다. 현재까지 발효유 및 유산균의 항돌연변이원성에 관하여는 거의 연구보고가 없으나 항암활성에 관하여는 많은 연구보고가 있다[1, 2, 17-19]. 1975년 Bogdanov에 의해 발효유의 제조에 관여하는 *Lactoba-*

Table 3. Carbon utilization of the isolated strain KLAB21

Carbon source	KLAB21
Glycerol	-
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
Adonitol	-
β-Methyl-xyloside	-
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Mannitol	+
Sorbitol	+
α-Methyl-D-mannoside	+
α-Methyl-D-glucoside	-
N-acetyl glucosamine	+
Amygdaline	+
Arbutine	+
Esculine	+
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	+
Saccharose	+
Trehalose	+
Inuline	-
Melezetose	+
D-Raffinose	+
Amidon	-
Glycogen	-
Xylitol	-
β-Gentiobiose	-
D-Turanose	+
D-Lyxose	-
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-
2-keto-gluconate	-
5-keto-gluconate	-

+: positive, -: negative

Table 4. Mutagenic tests of *L. plantarum* KLAB21 culture supernatant on *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98

Dose (μl/plate)	TA100		TA98	
	His ⁺ (CFU)	Mutation ratio*	His ⁺ (CFU)	Mutation ratio*
0	78	1.000	51	1.000
25	76	0.974	53	1.039
50	85	1.089	51	1.000
75	82	1.051	52	1.020
100	79	1.013	50	0.980
125	89	1.141	47	0.922
150	92	1.180	49	0.961

*Significantly different from the control at the P<0.05 level. Mutagenic activity is expressed as mutation ratio(%) of His⁺ reversion of *Salmonella typhimurium* which is described in detail by Maron and Ames[29].

*cillus bulgaricus*가 쥐의 sarcoma에 대하여 항암효과를 가지고 있다는 것이 처음으로 알려졌다[2]. 그후 *Strep-*

tococcus thermophilus, *Bifidobacterium infantis*, *B. thermophilus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. cremoris* 등 역시 실험동물에 있어서 각종의 암에 대하여 항암효과를 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다[1]. 이들 젖산균이 생산하는 항암물질은 대부분이 glycopeptide 또는 다당류로서 알려져 있으나[1] 본 실험에서 분리한 균주가 생산하는 항돌연변이원성 물질과 어떤 차이가 있을 지는 좀더 연구해야 할 과제이며 현재 본 균이 생산하는 항돌연변이 물질을 정제중에 있다.

산업적으로 이용되는 유산균과 분리된 균주와의 항돌연변이 활성의 비교

김치로부터 분리한 유산균인 *L. plantarum* KLAB21 과 현재 발효유의 제조에 산업적으로 이용되고 있는 유산균인 *L. plantarum* IAM1261과의 양성 변이원에 대한 항돌연변이 활성을 비교하였다(Table 6). 분리균주의 활성이 대조균주보다 활성이 높게 나타났다. 분리균주는

Table 5. Antimutagenic activities of *L. plantarum* KLAB21 culture supernatant on *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98

Dose (μl/plate)	Inhibition ratio(%)*					
	TA100			TA98		
	MNNG (5 μg/plate)	NPD (15 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)	NPD (2.5 μg/plate)	NQO (0.25 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)
25	93.46	39.38	57.59	34.52	32.21	48.29
50	95.72	54.79	69.83	39.30	37.98	54.11
75	96.60	65.75	75.87	51.59	52.88	65.53
100	98.42	73.95	82.52	62.78	57.21	78.54
125	96.33	64.38	80.04	59.46	51.44	76.60
150	94.20	44.86	77.02	55.11	45.67	71.12

*Significantly different from the control at the P<0.01 level. Antimutagenic activity is expressed as inhibition ratio(%) of His⁺ reversion of *Salmonella typhimurium* which is described in detail by Maron and Ames[29].

Table 6. Comparison in the antimutagenic activities of culture supernatant between the isolated strain *L. plantarum* KLAB21 and the industrial strain *L. plantarum* IAM1261

Strains	Dose (μl/plate)	Inhibition ratio(%)*					
		<i>L. plantarum</i> KLAB21			<i>L. plantarum</i> IAM1261		
TA100		MNNG (5 μg/plate)	NPD (15 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)	MNNG (5 μg/plate)	NPD (15 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)
	50	95.72	54.79	69.83	49.58	31.25	40.59
	100	98.42	73.95	82.52	25.59	39.77	28.50
	150	96.38	63.26	77.02	19.81	-	10.54
TA98		NPD (2.5 μg/plate)	NQO (0.25 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)	NPD (2.5 μg/plate)	NQO (0.25 μg/plate)	AFB ₁ (1 μg/plate)
	50	39.30	37.98	54.11	9.79	29.36	35.40
	100	62.78	57.21	78.54	28.26	28.51	23.25
	150	44.06	38.92	71.12	42.42	21.28	9.51

*Significantly different from the control at the P<0.05 level. Antimutagenic activity is expressed as inhibition ratio(%) of His⁺ reversion of *Salmonella typhimurium* which is described in detail by Maron and Ames[29].

Table 7. Mutagenic and antimutagenic activities of the *L. plantarum* KLAB21 on MNNG and NQO in the spore-rec assay

Mutagen	Culture supernatant (μ l/disc)	Inhibition zone (mm)*					
		Mutagenic activity			Antimutagenic activity		
		M45	H17	Difference	M45	H17	Difference
MNNG (10 μ g/10 μ l)	0	39	0	39	39	0	39
	50	25	25	0	32	24	6
	100	33	33	0	35	31	4
	150	38	37	1	38	34	4
NQO (20 ng/10 μ l)	0	40	0	40	40	0	40
	50	30	30	0	31	27	4
	100	34	34	0	35	33	2
	150	38	38	0	39	36	3

*Mutagenic and antimutagenic activities are expressed as inhibition zone (mm) of *Bacillus subtilis* which is described in detail by Kada et al.[21, 22].

100 μ l/plate 첨가시 활성이 우수하였으나 대조균주는 TA100에서는 50 μ l/plate 첨가시 TA98에서는 각각의 변이원에 따라 차이는 있지만 NPD를 제외하고 50 μ l/plate 첨가시 활성이 다소 높게 나타났으나 그 활성은 강하지 못하였다.

Spore-rec assay에 의한 각 분획별 항돌연변이 활성

*Bacillus subtilis*의 포자를 이용한 spore-rec assay 방법을 이용하여 분리균주의 돌연변이 활성 및 항돌연변이 활성을 확인한 결과는 Table 7과 같다. 분리균의 배양 상등액을 첨가하지 않은 경우 변이원 MNNG와 NQO의 변이원성 실험결과 *B. subtilis* M45와 *B. subtilis* H17의 생육저지대의 차이가 30 mm이상으로서 2가지 변이원 물질은 강력한 돌연변이원 활성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 배양 상등액의 농도를 증가시켜 주입함에 따라 생육저지대의 차이가 없었으므로 상등액은 돌연변이원성이 없음을 알 수 있었다. 배양 상등액의 항돌연변이 활성을 조사한 결과는 각각의 변이원에 대해 상등액의 첨가량에 따라 *B. subtilis* M45와 *B. subtilis* H17의 생육저지대의 차이가 각각 최저 4 mm와 2 mm로서 분리균의 배양 상등액이 강한 항돌연변이 활성을 가지고 있음을 재확인할 수 있었다.

요 약

우리나라 김치발효에 관여하는 젖산균의 항돌연변이 활성을 조사하기 위하여 숙성중의 김치로부터 5일 간격으로 20일간 230여주의 젖산균을 분리하였다. 이들을 MRS 배지에서 36시간 배양하여 얻은 상등액의 항돌연변이 활성을 *Salmonella typhimurium*의 TA100과 TA98을 이용한 His⁺ 복귀돌연변이의 저해정도 측정 방법으로 조사하고 항돌연변이 활성이 가장 우수한 한 균주를

선별하여 그 특성을 조사하였다. 변이원은 직접변이원으로서 MNNG(N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine), NPD(4-Nitro-O-Phenlenediamine), NQO(4-nitrosoquinoline-1-oxide)와 간접변이원으로서 AFB1(Aflatoxin B1)을 사용하여 행하였다. 변이원에 대하여 항돌연변이 활성이 가장 우수한 균주 KLAB21의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류기준에 따라 동정한 결과 *Lactobacillus plantarum* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리한 젖산균을 *Lactobacillus plantarum* KLAB21로 명명하였다. 균주 KLAB21의 배양 상등액의 MNNG, NPD, NQO 및 AFB1에 대한 항돌연변이 활성은 100 μ l/plate 첨가시 활성이 가장 높았다. 분리균주의 항돌연변이 활성을 현재 산업적으로 발효유의 제조에 이용되고 있는 *L. plantarum* IAM1261 균주와 비교한 결과 분리균주의 활성이 높게 나타났다. 또한 *Bacillus subtilis*의 포자를 이용한 spore-rec assay 방법을 사용하여 MNNG, NQO에 대한 항돌연변이 활성을 재확인하였다.

REFERENCES

- Adachi, S. 1992. Lactic acid bacteria and the control of tumors, pp. 233-247. In B. J. B. Wood(ed.), *The Lactic Acid Bacteria* Vol. 1: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science, London, U. K.
- Bogdanov, I. G., P. G. Dalev, L. A. Gurevich, M. N. Kolesov, V. P. Malkove, L. A. Plemyannikova, and I. B. Sorokina. 1975. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters* 57: 259-261.
- Carr, J. G. 1975. *Lactic Acid Bacteria in Beverage and Foods*. Academic press, New York, USA.
- Cho, E. J., K. Y. Park, and S. H. Rhee. 1997. Standardization of ingredient ratios of Chinese cabbage Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1228-1235.

5. Cho, E. J., S. M. Lee, S. H. Rhee, and K. Y. Park. 1998. Studies on the standardization of Chinese cabbage *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 324–332.
6. Choi, M. W., K. H. Kim, S. H. Kim, and K. Y. Park. 1997. Inhibitory effects of *Kimchi* extracts on carcinogen-induced cytotoxicity and transformation in C3H/10T1/2 cells. *J. Food Sci. Nutr.* **2**: 241–245.
7. Choi, M. W., K. H. Kim, and K. Y. Park. 1997. Effects of *Kimchi* extracts on the growth of sarcoma-180 cells and phagocytic activity of mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 254–260.
8. Choi, S. Y., H. W. Lee, and K. S. Chung. 1992. Effect of addition of nisin and *Leuconostoc mesenteroides* IFO 12060 on *Escherichia coli* growth in stored *Kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**: 414–417.
9. Choi, Y. O. and C. Ahn. 1997. Plasmid-associated bacteriocin production by *Leuconostoc* sp. LAB145-3A isolated from *Kimchi*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 409–416.
10. Deeth, H. C. 1984. Yogurt and cultured products. *Aust. J. Dairy Technol.* **39**: 111–114.
11. Fernandes, C. F., K. M. Shahni, and M. A. Amer. 1987. Therapeutic role of dietary and *Lactobacilli* fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 343–356.
12. Fernandes, C. F., K. M. Shahni, and M. A. Amer. 1988. Control of diarrhea by *lactobacilli*. *J. Appl. Nutr.* **40**: 32–39.
13. Gilland, S. E. 1989. Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumer. *J. Dairy Sci.* **72**: 2483–2489.
14. Gilland, S. E., M. I. Speck, and G. F. Nauyok. 1978. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora healthy males. *J. Dairy Sci.* **61**: 1–7.
15. Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**: 756–762.
16. Gurr, M. I. 1987. Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 337–342.
17. Hosoda, M., H. Hasimoto, H. Morita, M. Chiba, and A. Hosono. 1992. Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P2-induced mutagenicity to TA98 strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Research* **59**: 543–549.
18. Hosono, A., A. Yoshimura, and H. Otani. 1988. Desmutagenic property of cell wall of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolyzates. *Milchwissenchaft* **43**: 168–170.
19. Hosono, A., T. Kashina, and T. Kada. 1986. Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.* **69**: 2237–2241.
20. John, G. H., R. K. Noel, H. S. S., Peter, T. S. James, and T. W. Stanely. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed.
21. Kada, T., K. Kaneko, T. Matsuzaki, and Y. Hara. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor. *Mutat. Res.* **150**: 127–132.
22. Kada, T., K. Tutikawa, and Y. Sadaie. 1975. *In vitro* and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens. *Mutat. Res.* **16**: 165–170.
23. Kada, T., M. Moriya, and Y. Shirasu. 1974. Screening of pesticide for DNA interactions by "rec-assay" and mutagenesis testing and frameshift mutagens detected. *Mutat. Res.* **26**: 243–249.
24. Kim, E. S., H. C. Chun, B. K. Kim, and K. C. Rhee. 1997. Garlic and cancer prevention. *J. Food Sci. Nutr.* **2**: 180–190.
25. Kim, Y. C., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, O. S. Yi, T. J. Kwon, and S. M. Kang. 1998. Strain improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on *Kimchi* fermentation as a starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 151–160.
26. Kim, Y. C., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, S. H. Jung, D. H. Yi, T. J. Kwon, and S. M. Kang. 1998. Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as *Kimchi* starter. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 102–109.
27. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentations and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1–5.
28. Lee, H. J., J. H. Baek, M. Yang, H. U. Han, Y. D. Ko, and H. J. Kim. 1993. Characteristics of lactic acid bacterial community during *Kimchi* fermentation by temperature downshift. *Korean J. Microbiol.* **31**: 346–352.
29. Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173–219.
30. Metchnikoff, E. 1908. *The Prolongation of Life*, pp. 161–183. C. P. Putanama's sons, New York, USA.
31. Mitsuoka, T. and T. Emeritus. 1992. The human gastrointestinal tract, pp. 69–78. In B. J. B. Word(ed.), *The Lactic Acid Bacteria* Vol. 1: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science, London, U. K.
32. Park, K. Y. 1995. The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of *Kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 440–445.
33. Park, K. Y., K. A. Baek, S. H. Rhee, and H. S. Cheigh. 1995. Antimutagenic effect of *Kimchi*. *Food Biotechnol.* **4**: 141–145.
34. Robinsin, R. K. 1989. Special yogurts the potential health benefits. *Dairy Ind. Int.* **54**: 23–29.
35. Ryu, S. H., Y. S. Jeon, J. W. Moon, Y. S. Lee, and G. S. Moon. 1997. Effect of *Kimchi* ingredients to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 998–1005.
36. Ryu, S. H., Y. S. Jeon, M. J. Kwon, J. W. Moon, Y. S. Lee, and G. S. Moon. 1997. Effect of *Kimchi* extracts to

- reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 814–821.
37. Savino, D. A. and M. D. Levitt. 1987. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* **70**: 397–403.
38. Shahani, K. M. and R. C. Chandan. 1979. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* **62**: 2884–2889.
39. Shun, Y. L., J. A. Ayres, W. Winkler, and W. E. Sandine. 1989. *Lactobacillus* effect on cholesterol: *In vitro* and *in vivo* results. *J. Dairy Sci.* **72**: 2884–2889.
40. Yahagi, T., M. Degawa, Y. Seino, T. Matsushima, M. Nagao, T. Sugimura, and Y. Hashimoto. 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* **1**: 91–98.
41. Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, and M. Okada. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.* **48**: 121–126.

(Received October 20, 1998)