

## 김치에서 분리한 *Leuconostoc Citreum* GR1의 흰쥐에 대한 반복투여독성

김아라 · 이명렬 · 장해춘 · 이재준<sup>†</sup>

조선대학교 식품영양학과

### Four-Week Repeated Oral Toxicity Study of *Leuconostoc citreum* GR1 in Rats

Ah-Ra Kim, Myung-Yul Lee, Hae-Choon Chang, and Jae-Joon Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

#### Abstract

This study was performed to investigate the repeated-dose toxicity of *Leuconostoc citreum* GR1 (*Leuc. citreum* GR1), a lactic acid bacterium isolated from kimchi, in male and female rats. Sprague-Dawley male and female rats were divided into four group (ten animals in each group) and *Leuc. citreum* GR1 was administered daily by gavage to rats at dosage levels of 0, 500, 1,000, or 2,000 mg/kg/day for four weeks. There were no bacterial-related deaths or abnormal clinical signs in either gender of rats during the observation period. Furthermore, no differences were found between the control and treatment groups in terms of body weight, food intake, and water consumption. Hematological parameters, serum biochemical analysis, and histopathological examination also showed insignificant dose-dependent alterations. There were also no alterations in organ weights upon administration of *Leuc. citreum* GR1 alone. These results suggest the oral application of *Leuc. citreum* GR1, up to a dosage level of 2,000 mg/kg, causes no adverse effects in both male and female rats.

**Key words:** *Leuconostoc citreum* GR1, repeated four-week oral toxicity, rats

#### 서 론

유산균은 그람양성으로 탄수화물을 에너지원으로 사용하여 최종산물로 젖산과 초산 등의 유기산을 주로 생산하는 미생물로, 산업적으로 다양한 발효식품에 이용되어 발효채소류, 발효유제품 등 인류생활에 광범위하게 이용되어 오고 있다. 식품에서 유산균은 발효식품의 맛과 발효산물의 특징을 결정하고, 유기산 및 박테리오신 등의 항균활성물질을 생성하여 식품의 저장수명을 연장시켜 식품보존에 중요한 역할을 한다(1). 또한 유산균은 인체 내에서 장내 유해균 억제, 혈중 콜레스테롤 저하효과, 항암효과, 면역 증강 효과 등 다양한 기능성이 보고되었으며(2), probiotics로서 살아 있는 균주를 섭취하는 것이라 잔류 및 내성문제를 해결할 수 있는 항박테리아제로 기능적인 측면에서 주목 받으면서 최근 건강기능성 식품으로서도 활용되고 있다(3).

김치는 한국의 대표적인 발효식품으로서 기능성과 효능에 관한 연구들이 활발하게 진행되면서 인체 내에서 면역증강, 항산화, 항균, 항콜레스테롤, 발암 및 변이 물질의 생성을 방지하는 등 다양한 기능성이 알려져 있고(4,5), 숙성 중에 다양한 김치 유산균이 증식하여 발효에 관여하므로 유용 유산균의 훌륭한 보고가 되고 있다. 김치발효 관련 미생물에 관한 연구에 의하면 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococ-*

*cus*, *Pediococcus* 및 *Weissella* 속의 유산균들이 김치의 주요 유산균이며, *Leuconostoc* 속은 발효 초기에 김치 내용물을 산성화하여 혐기적 상태로 유지하며 호기성 세균의 성장을 억제하고, 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속이 우점으로 김치 발효에 관여하는 것으로 보고되었다(6-8). 이처럼 김치발효는 강한 내산성 및 내담즙성을 지닌 인체에 유용한 유산균이 김치의 발효를 주도하고 있으며, 유용한 유산균을 김치 담금 시 starter로 이용하면 내산성 균주의 장내 정착이 가능하여 정장 작용을 높일 수 있는 것으로 보고되었다(9). 또한 쥐에서 김치 유산균 파쇄액의 면역 활성 증가 효과(10), 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 김치유산균분말의 비만 억제 및 혈장 지질 저하 효과(11), 항암효과(12) 등이 있음이 보고되면서 김치 유산균의 건강 증진효과가 부각되고 있다.

한편 유산균은 GRAS(generally recognized as safe) 등급 미생물로 분류되고 있으나(13), 실제 식품에 적용 시에는 안전성이 검증되어야 하므로 김치 종균으로 사용하고 있는 유산균을 김치에 적용할 경우 반드시 식품원료 가능성 여부를 검토 받아야 하며, 식약청에 등록된 유산균이 아닌 경우 그에 필요한 안전성 검토를 위한 자료를 요구받게 되어 있다. 이와 관련하여 김치 유산균에 관한 안전성과 독성에 관한 연구로 김치에서 분리한 장에 정착성이 우수하고 내산성, 인공위액, 인공담즙에 높은 저항성을 나타낸 exopolysac-

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: leejj80@chosun.ac.kr  
Phone: 82-62-230-7725, Fax: 82-62-225-7726

charide(EPS) 생성 유산균인 *Leuconostoc kimchii* GJ2의 급성독성(14), 김치 숙성에 관여하는 우수한 발효능, 박테리오 생성능 및 박테리오신 생성 유도작용 보유능을 동시에 갖춘 김치발효 우량 종균인 *Leuconostoc citreum* GJ7의 급성독성(15), 산막효모제어능을 지닌 항진균 및 항세균 활성을 나타내는 *Lactobacillus plantarum* AF1의 급성독성(16) 및 반복투여독성(17), *Helicobacter pylori* 억제능 유산균 *Pediococcus pentosaceus* MD1의 반복투여독성(18) 등이 보고되어 김치 유산균의 저독성 물질로서의 안정성 연구가 보고된 바 있다.

본 연구에서는 김치로부터 분리·동정한 *Leuconostoc (Leuc.) citreum* GR1의 안정성 평가의 일환으로 반복 투여 시 나타날 수 있는 독성 평가를 위해 Sprague-Dawley 계열 흰쥐를 이용하여 4주간 반복독성시험을 “의약품 등의 독성 시험 기준(식품의약품안전청고시 제 1999-61호)”에 준하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

시험 유산균주는 광주광역시와 전라남도 등지에서 수집한 잘 익은 배추김치에서 분리한 것으로 조선대학교 식품영양학과 식품미생물실험실에서 *Leuc. citreum* GR1을 선별하여 실험에 사용하였다. 유산균 성장배지는 MRS(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)의 액체를 사용하였으며, 배양조건은 30°C incubator(Vision Co., Seoul, Korea)에서 24시간 정지배양 하였다. 배양한 *Leuc. citreum* GR1을 4,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 배양액 중의 균체를 회수하여 시료로 사용하였다.

### 공시동물 및 사육환경

Sprague-Dawley(SD) 계통의 특정병원균 부재 암·수컷 흰쥐 각각 5주령 40마리를 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)로부터 구입하여 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. SD 계통 흰쥐는 전 세계적으로 반복투여독성 등의 시험에 널리 사용하고 있어 비교할 만한 시험 기초자료(11,19,20)가 축적되어 선택하였다. 실험 전 7일간의 순화사육 기간 동안에 임상관찰 등을 시행하여 체중감소가 없는 건강하고 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 시험동물은 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 환기 회수는 시간당 10~18회, 조명은 12시간 명암주기(08:00~20:00), 조도는 300~500 Lux의 사육환경에서 스테인레스 스틸케이지에 1마리씩 암수 각각 넣어 4주간 사육하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사, Deajeon, Korea)를 자유 급여하였으며, 음수는 여과된 정제수를 자유 섭취시켰다.

### 시험군의 구성 및 투여용량의 설정

실험동물은 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대한

여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였다. 투여 용량은 미국 환경보호청(US Environmental Protection Agency)에서 무해물질 분류 기준에 근거하여 설정하였다. 투여용량 설정은 예비 독성시험 결과를 바탕으로 하였으며, 반복투여 독성시험에서 시험물질의 독성이 매우 적고 중독량을 정하기가 어려운 경우 투여량의 상한선은 기술적으로 투여할 수 있는 최대량으로 하는 것이 기본이어서, 암수 모두 최고 용량을 2,000 mg/kg/day로 하고 등비를 1/2로 하여 체중 kg 당 500, 1,000 및 2,000 mg을 설정하여 저 용량군, 중간 용량군 및 고 용량군으로 설정하였다. 각 군의 동물 수는 암수 각각 10마리씩으로 하였다. 투여 용량은 경구투여 시 10 g당 0.2 mL를 넘지 않게 일정한 액량으로 시료 물질의 각 농도가 들어가게 조제하여 투여 액량을 결정하였는데 투여량은 투여 직전 체중에 따라 산출하였다. 시료물질인 *Leuc. citreum* GR1은 투여 용량을 고려하여 주사용 멸균증류수에 각 농도 별로 용해하여 사용하였다. 시험물질의 투여는 투여 개시 전에 잘 현탁 시킨 다음 매일 1회 4주간 경구투여용 존데를 사용하여 위 내에 직접 주입하였으며, 대조물질로는 주사용 멸균증류수를 사용하였다.

### 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험물질 투여 당일은 경구투여 후 6시간까지 계속적으로 관찰하였고, 투여 다음 날부터 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상씩 일반상태의 변화, 중독 증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였고(21), 이상이 있었던 경우는 증상의 종류, 발견 및 증상의 정도를 개별적으로 기록하였다. 모든 동물에 대하여 매일 폐사나 빈사상태를 살폈다.

### 체중변화, 사료섭취량 및 수분섭취량 측정

모든 동물에 대하여 시료물질 투여 직전 및 투여 후 4주 동안에 매 주마다 일정한 시간에 1회 측정하였다. 사료섭취량 및 수분섭취량은 매주 3회 측정하여 산출하였다.

### 혈액학적 검사

부검 전 12시간 절식시킨 동물을 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취시킨 후 복대정맥으로부터 전 채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA로 항응고 처리한 tube에 넣어 보관한 다음 1시간 이내에 자동혈액측정기(Sysmex SE-9000, TOAMedical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan)를 이용하여 총 적혈구수(red blood cells, RBC), 혈중 적혈구 비율(hematocrit, HCT), 헤모글로빈 함량(hemoglobin, Hb), 평균 적혈구 용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균 적혈구 혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균 적혈구 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판(platelets), 망상적혈구수(reticulocytes), 총 백혈구수(white blood cells, WBC), 호중구(neutrophils), 호산구

(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구(lymphocytes) 및 단핵구(monocytes)의 백분율을 측정하였다.

#### 혈액 생화학적 검사

부검 당일 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 해서 얻은 혈청에 대하여 혈액생화학적 검사를 자동분석기(Hitachi-747, Hitachi Medical Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 알라닌 아미노기전이효소(alanine transaminase, ALT), 아스파라진산 아미노기전이효소(aspartate transaminase, AST), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP), 포도당(glucose, GLU), 요소(blood urea nitrogen, BUN), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC), 중성지질(triglyceride, TG), 총 단백질(total protein, TP), 알부민(albumin) 및 크레아티닌(creatinine, CRE)을 측정하였다.

#### 부검 및 육안검사

시료물질 투여 후 28일까지 생존한 동물은 CO<sub>2</sub>로 마취 시킨 후 방혈 치사시킨 다음 부검하여 육안적 외부조건, 피하, 내부 장기 및 뇌의 이상 유무를 관찰한 후, 장기를 적출한 다음 무게를 측정하였다.

#### 병리조직학적 검사

모든 실험동물의 최종 부검일에 시료물질을 투여한 모든 실험동물의 육안적 병변을 관찰한 후, 간과 신장을 적출하여 10% 중성완충포르말린 용액으로 고정하였다. 그 다음 파라핀 포매를 실시하고 3~4 µm의 절편을 준비하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시하였다.

#### 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0 P/C package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 실험군당 평균과 표준 오차를 계산하였고 일원배치분산분석(one way, ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 Tukey's test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 이루어졌다.

#### 결과 및 고찰

##### 사망률 및 일반증상

김치로부터 분리한 *Leuc. citreum* GR1을 4주간 경구 투여한 후 암수 흰쥐를 4주 동안 사망률과 일반증상을 관찰한 결과는 Table 1과 2와 같다. 시험기간 동안 실험동물들 매일 일정한 시간에 관찰한 결과 암수 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 1). 또한 시험 전 기간 동안 암수 흰쥐 모두 대조군을 포함한 시험물질 저(500 mg/kg/day), 중(1,000 mg/kg/day) 및 고(2,000 mg/kg/day) 용량 투여군 모두에서 특이적인 이상 증상도 관찰되지 않았다(Table 2). Lee 등(15)은 김치 발효 우량 종균인 *Leuc. citreum* GJ7의 마우스에 대한 급성독성시험에서 복강투여 후 24시간 관찰한 결과, *Leuc. citreum* GJ7 투여군에서 부분적으로 사망례가 관찰되었으나 나머지 시험동물은 계속 생존하여 최고 용량인 2,500 mg/kg까지는 치사량(LD<sub>50</sub>)을 나타내지 않았고, 5,000 mg/kg을 14일 동안 경구 투여하였을 경우에는 사망례가 없었으며 특이한 임상증상도 관찰되지 않아 경구급성

Table 1. Mortality of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days

Sex	Dose	No. of animal	Days after treatment					End	Final mortality
			0	7	14	21	28		
Male	0	10	0/10 <sup>1)</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S. <sup>2)</sup>	0/10
	500	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	1,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	2,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
Female	0	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	500	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	1,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	2,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10

<sup>1)</sup>Values are expressed as the numbers of dead animals/total numbers of animals. <sup>2)</sup>T.S: terminal sacrifice.

Table 2. Clinical signs of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days

Sex	Dose	Clinical signs	Days after treatment				
			0	7	14	21	28
Male	0	NAD <sup>1)</sup>	0/10 <sup>2)</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
	1,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
	2,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
Female	0	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
	500	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
	1,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	
	2,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	

<sup>1)</sup>NAD: no abnormalities detected. <sup>2)</sup>Values are expressed as number of animals with the sign/number of animals examined.

독성시험의 경우 치사량은 적어도 5,000 mg/kg 이상으로 산출하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 경구투여 독성 한계 용량인 2,000 mg/kg에서 시험물질 투여에 따른 이상 증상이 관찰되지 않아 본 시험물질의 최소치사량이 암수 모두 2,000 mg/kg/day 이상을 상회할 것으로 보인다.

**체중 변화**

암수 흰쥐에게 *Leuc. citreum* GR1을 농도 별로 달리하여 4주간 경구투여 한 후 체중의 변화를 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 시험 전 기간 중 체중의 변화는 암수 흰쥐 모두 대조군과 시험물질 저(500 mg/kg/day), 중(1,000 mg/kg/day) 및 고(2,000 mg/kg/day) 용량 투여군 모두에서 유의할 만한 체중 변화는 관찰되지 않았다. 또한 시험물질 투여일로부터 시험 종료 시까지 대조군과 시험물질 투여군 모두 매주 간 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 최근 김치유산균의 항비만 효과에 관한 연구들이 보고되었는데, Kwon 등(11)은 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 김치유산균 추출물의 급여로 체중을 유의하게 감소시켰으며 비만의 중요한 원인이 되는 복부지방 함량 또한 유의하게 감소되어 김치유산균 추출물의 체중 저하 및 복부지방 축적 억제 효과에 관하여 보고하였다. 또한 Cha 등(19)은 4주간 고콜레스테롤혈증을 유발한 흰쥐에게 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* CIB 001의 급여로 고콜레스테롤 식이군에 비하여 체중증가량이 감소하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 *Leuc. citreum* GR1의 투여로 체중의 변화는 관찰되지 않았는데

이러한 결과는 본 연구에서는 정상식이와 함께 김치유산균을 투여하였지만, 항비만 효과가 나타난 연구에서는 고지방 혹은 고콜레스테롤식을 급여하여 식이의 차이에 의한 것으로 보인다. Cha 등(19)의 연구에서는 4주간 정상식이와 함께 김치유산균을 급여하였을 경우에는 체중증가량의 변화가 거의 없었다고 하였고, Lee 등(18)이 보고한 김치 유산균 *Pediococcus pentosaceus* MD1의 반복투여 독성시험에서도 시험물질 투여에 의한 유의할 만한 체중변화는 관찰되지 않았다고 하여 본 연구결과와 유사하였다.

**사료섭취량 및 수분섭취량**

사료섭취량 및 수분섭취량은 Table 4, 5에서와 같이 시험 기간 동안 암수 모두 시험물질 투여군과 대조군 간에 유의성 있는 변화는 나타나지 않아 시험물질 투여로 사료섭취량 및 수분섭취량에 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

**부검결과**

실험동물을 부검 후 주요 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과 Table 6에서와 같이 암수 흰쥐 모두 대조군과 시험물질 투여군에서 장기의 유의성 있는 변화나 시험물질의 투여로 인한 용량 의존적인 특이할 만한 부검소견은 관찰되지 않았다.

**장기무게**

*Leuc. citreum* GR1을 저(500 mg/kg/day), 중(1,000 mg/

**Table 3. Body weight changes of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days**

Sex	Dose	Body weight (g)				
		Days after treatment				
		0	7	14	21	28
Male	0	109.21 ± 12.09 <sup>1NS2)</sup>	140.72 ± 12.33 <sup>NS</sup>	197.40 ± 11.37 <sup>NS</sup>	249.20 ± 11.58 <sup>NS</sup>	295.62 ± 10.78 <sup>NS</sup>
	500	110.53 ± 13.08	145.70 ± 8.85	204.62 ± 14.25	252.75 ± 9.76	291.90 ± 15.78
	1,000	110.14 ± 9.87	141.80 ± 13.15	201.07 ± 9.58	249.54 ± 11.46	289.50 ± 13.62
	2,000	109.65 ± 10.02	143.54 ± 15.25	195.74 ± 7.65	253.68 ± 14.92	290.60 ± 11.76
Female	0	95.71 ± 7.66 <sup>NS</sup>	125.64 ± 13.38 <sup>NS</sup>	149.05 ± 9.79 <sup>NS</sup>	185.40 ± 5.30 <sup>NS</sup>	215.80 ± 5.75 <sup>NS</sup>
	500	94.25 ± 4.15	124.40 ± 7.08	147.90 ± 9.56	186.35 ± 17.52	210.20 ± 11.87
	1,000	95.35 ± 15.40	120.80 ± 11.20	149.61 ± 11.54	180.84 ± 10.68	212.60 ± 8.69
	2,000	95.00 ± 5.57	121.74 ± 13.19	147.72 ± 10.62	181.40 ± 12.75	211.84 ± 9.94

<sup>1)</sup>Values are expressed as means ± SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

**Table 4. Daily food consumption of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days**

Sex	Dose (mg/kg)	Food consumption (g/day/rat)			
		Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	17.38 ± 0.84 <sup>1NS2)</sup>	20.27 ± 4.95 <sup>NS</sup>	25.35 ± 2.94 <sup>NS</sup>	28.82 ± 1.09 <sup>NS</sup>
	500	15.15 ± 1.65	21.62 ± 3.97	24.46 ± 4.68	27.14 ± 4.67
	1,000	16.19 ± 2.93	20.44 ± 1.45	25.25 ± 1.75	28.17 ± 0.77
	2,000	16.04 ± 3.59	19.65 ± 2.68	23.87 ± 2.36	26.92 ± 2.75
Female	0	13.72 ± 0.94 <sup>NS</sup>	14.84 ± 1.99 <sup>NS</sup>	18.77 ± 1.65 <sup>NS</sup>	21.71 ± 1.43 <sup>NS</sup>
	500	12.89 ± 3.61	13.25 ± 0.81	18.05 ± 2.76	21.25 ± 2.48
	1,000	12.60 ± 2.40	13.76 ± 5.16	17.82 ± 1.52	20.20 ± 3.50
	2,000	13.64 ± 1.22	14.28 ± 1.58	17.96 ± 3.27	20.01 ± 0.91

<sup>1)</sup>Values are expressed as means ± SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

Table 5. Daily water consumption of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Water consumption (mL/day/rat)			
		Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	26.37±2.54 <sup>1)NS2)</sup>	31.85±1.35 <sup>NS</sup>	37.13±5.58 <sup>NS</sup>	41.28±5.14 <sup>NS</sup>
	500	27.23±3.66	32.46±4.85	38.57±6.45	42.31±4.75
	1,000	26.47±1.58	31.38±2.41	38.86±4.85	41.24±6.75
	2,000	26.65±4.65	32.86±3.52	37.98±4.56	40.77±3.85
Female	0	22.18±1.54 <sup>NS</sup>	27.20±1.81 <sup>NS</sup>	31.81±2.45 <sup>NS</sup>	36.42±4.23 <sup>NS</sup>
	500	23.48±5.44	26.69±4.05	32.54±3.01	37.56±2.53
	1,000	23.65±3.25	26.54±3.92	30.18±1.28	35.47±2.17
	2,000	22.48±4.85	27.52±4.25	30.45±4.45	36.25±5.42

<sup>1)</sup>Values are expressed as means±SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

Table 6. Gross findings of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
	Thyroid gland NGF <sup>1)</sup>	10(100) <sup>2)</sup>	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Brain NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Heart NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Liver NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Kidney NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Lung NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Spleen NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Adrenal gland NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Testes NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)				
	Ovary NGF					10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
	Thymus NGF	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)

<sup>1)</sup>NGF: no gross finding. <sup>2)</sup>Values are expressed as animal numbers (the percentage of animal numbers).

kg/day) 및 고(2,000 mg/kg/day) 용량으로 암수 각각의 흰 쥐에게 4주간 반복 투여 후 장기무게를 측정된 결과는 Table 7과 같다. 뇌(brain), 폐(lung), 고환(testis), 난소(ovary), 좌우 신장(kidney), 심장(heart), 췌장(spleen) 및 간(liver)의 무게는 암수 모두 시료물질 투여에 의한 차이가 발견되지 않았고, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았다. 일반적으로 독성이 있는 물질이 섭취가 되면 가장 먼저 간에

서 해독작용이 일어나 간이 가장 큰 영향을 줄 수 있는데 (20), 간의 무게를 살펴보면 각 군 간에 유의할 만한 차이점이 보이지 않았다. 이상의 결과 *Leuc. citreum* GR1 투여는 장기무게의 변화에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

#### 혈액학적 검사소견

부검 후 혈구 측정기를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(Hb), 헤마토크리트치(HCT), 평균 적혈

Table 7. Organ weights of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days (unit: g)

Sex	Organs	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	Brain	1.85±0.18 <sup>1)NS2)</sup>	1.86±0.12	1.84±0.15	1.83±0.13
	Lungs	1.30±0.14 <sup>NS</sup>	1.28±0.09	1.29±0.07	1.29±0.15
	Testis	2.86±0.31 <sup>NS</sup>	2.82±0.25	2.79±0.34	2.82±0.45
	Kidney-L	1.17±0.03 <sup>NS</sup>	1.20±0.05	1.12±0.06	1.12±0.10
	Kidney-R	1.18±0.04 <sup>NS</sup>	1.19±0.06	1.12±0.06	1.16±0.02
	Heart	0.92±0.09 <sup>NS</sup>	0.88±0.19	0.86±0.07	0.85±0.19
	Spleen	0.67±0.01 <sup>NS</sup>	0.68±0.08	0.70±0.10	0.71±0.08
	Liver	8.81±0.36 <sup>NS</sup>	8.77±0.67	8.75±0.65	8.72±0.27
Female	Brain	1.62±0.10 <sup>NS</sup>	1.60±0.58	1.63±0.81	1.62±0.26
	Lungs	1.09±0.09 <sup>NS</sup>	0.98±0.04	0.99±0.02	1.01±0.05
	Ovary	0.062±0.01 <sup>NS</sup>	0.061±0.01	0.062±0.01	0.060±0.02
	Kidney-L	0.88±0.02 <sup>NS</sup>	0.87±0.02	0.81±0.09	0.83±0.07
	Kidney-R	0.89±0.04 <sup>NS</sup>	0.86±0.03	0.82±0.09	0.82±0.06
	Heart	0.70±0.09 <sup>NS</sup>	0.75±0.04	0.77±0.07	0.72±0.07
	Spleen	0.52±0.03 <sup>NS</sup>	0.50±0.05	0.53±0.04	0.54±0.04
	Liver	6.57±0.23 <sup>NS</sup>	6.84±0.46	6.74±0.80	6.65±0.31

<sup>1)</sup>Values are expressed as means±SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

구 용적(MCV), 평균 적혈구 혈색소량(MCH), 평균 적혈구 혈색소 농도(MCHC), 혈소판(platelets), 망상적혈구수(reticulocytes), 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구(lymphocytes) 및 단핵구(monocytes)의 백분율을 측정된 결과, Table 8에서와 같이 암수 모두 시험물질 투여군과 대조군 간에는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 혈액학적 검사 결과 대조군과 시료투여군 모두 정상 범위에 속하였으며 용량 의존성도 보이지 않았다. 이러한 결과는 SD계 흰쥐를 이용한 4주 반복투여 독성시험에서의 혈액학적 기초 자료에서 보고(22)한 범위와 유사하였다.

**혈액 생화학적 검사조건**

복대정맥 혈액에서 분리한 혈장으로부터 혈액생화학적 분석기를 이용하여 혈액생화학적 지표인 알라닌 아미노기전이효소(ALT), 아스파라진산 아미노기전이효소(AST), 알칼리성 인산분해효소(ALP), 포도당(GLU), 요소(BUN), 총 콜레스테롤(TC), 중성지질(TG), 총 단백질(TP), 알부민(albumin) 및 크레아티닌(CRE)을 측정된 결과, Table 9에서와 같이 암수 모든 투여군은 대조군에 비하여 시험 물질 투여에 기인한 유의성 있는 혈청 생화학적 변화가 관찰되지 않았으며, 대조군과 *Leuc. citreum* GR1 투여군 모두 정상 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 김치에서 분리한 *Lb. plantarum* AF1의 흰쥐에 대한 반복투여 독성시험(17)에서

의 혈액 생화학적 검사결과와 유사하였으며, 수컷의 경우 유산균 투여 용량이 증가할수록 혈장 중 총 콜레스테롤과 중성지방 함량은 용량 의존적으로 감소하는 경향이었으나 유의차는 없었다고 하였다. 또한 Cha 등(19)은 김치에서 분리한 *L. plantarum* CIB 001을 정상식이와 함께 급여하여 혈중 콜레스테롤 함량은 2주와 6주에서는 유의차를 보이지 않았으나 4주에서 유의적으로 줄어들었다고 보고하여 본 연구 결과와 상이한 결과를 보였다. 이러한 결과는 미생물의 균주의 차이로 인한 것으로 사료된다.

**병리조직학적 검사**

*Leuc. citreum* GR1을 투여한 흰쥐의 병리학적 조직검사를 위해 간과 신장을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 병리조직학적 검사를 관찰한 결과, 간에서는 모든 군에서 염증, 괴사, iron 침착, bilirubin 침착 등의 병변을 보이지 않았고 간세포의 구조도 정상적인 세포를 유지하고 있었다(Fig. 1). 신장에서도 염증, 괴사 등의 병변을 보이지 않았고 신장 세포도 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). 따라서 병리조직학적 검사 결과 대조군과 암수 시료물질 투여군에서 모든 개체는 간과 신장의 유의성 있는 변화나 시험물질 투여로 인한 용량 의존적인 특이할 만한 조직학적인 이상은 나타나지 않았으며, 이러한 조건은 장기 중량변화와 혈액 생화학적 변화 결과와 부합되는 결과로 판단된다.

**Table 8. Hematology of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days**

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7.26 $\pm$ 0.26 <sup>1)NS2)</sup>	7.25 $\pm$ 0.85	7.35 $\pm$ 0.52	7.42 $\pm$ 0.57
	RBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7.42 $\pm$ 0.98 <sup>NS</sup>	7.32 $\pm$ 0.67	6.44 $\pm$ 1.62	7.20 $\pm$ 0.91
	Hb (%)	14.36 $\pm$ 2.16 <sup>NS</sup>	14.96 $\pm$ 0.78	14.56 $\pm$ 2.32	13.98 $\pm$ 2.68
	HCT (%)	46.52 $\pm$ 5.13 <sup>NS</sup>	45.12 $\pm$ 4.87	44.28 $\pm$ 9.96	45.62 $\pm$ 3.65
	MCV (fL)	61.45 $\pm$ 4.65 <sup>NS</sup>	62.62 $\pm$ 3.17	60.82 $\pm$ 7.27	61.35 $\pm$ 2.95
	MCH (pg)	20.54 $\pm$ 0.96 <sup>NS</sup>	20.32 $\pm$ 0.65	19.75 $\pm$ 1.54	19.55 $\pm$ 1.67
	MCHC (g/dL)	31.48 $\pm$ 1.36 <sup>NS</sup>	33.46 $\pm$ 1.85	32.12 $\pm$ 3.55	32.05 $\pm$ 2.82
	Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	905.45 $\pm$ 76.32 <sup>NS</sup>	914.65 $\pm$ 88.54	903.66 $\pm$ 65.28	892.16 $\pm$ 68.14
	Reticulocytes (%)	3.78 $\pm$ 0.27 <sup>NS</sup>	3.85 $\pm$ 0.50	3.81 $\pm$ 0.74	3.82 $\pm$ 0.75
	Neutropils (%)	7.42 $\pm$ 0.81 <sup>NS</sup>	7.61 $\pm$ 0.68	7.35 $\pm$ 1.08	7.27 $\pm$ 0.84
	Eosinopils (%)	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>NS</sup>	0.63 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.09
	Basophils (%)	0.97 $\pm$ 0.08 <sup>NS</sup>	0.95 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.08
	Lymphocytes (%)	87.04 $\pm$ 5.85 <sup>NS</sup>	86.75 $\pm$ 6.74	85.64 $\pm$ 4.61	86.10 $\pm$ 7.58
	Monocytes (%)	0.98 $\pm$ 0.05 <sup>NS</sup>	0.97 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.09	0.97 $\pm$ 0.15
Female	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.68 $\pm$ 0.87 <sup>NS</sup>	6.75 $\pm$ 1.35	5.98 $\pm$ 0.68	6.12 $\pm$ 0.87
	RBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.28 $\pm$ 0.54 <sup>NS</sup>	5.82 $\pm$ 0.59	6.90 $\pm$ 0.28	5.64 $\pm$ 0.38
	Hb (%)	13.65 $\pm$ 2.39 <sup>NS</sup>	13.52 $\pm$ 1.62	12.98 $\pm$ 1.82	13.45 $\pm$ 0.84
	HCT (%)	42.45 $\pm$ 2.61 <sup>NS</sup>	40.48 $\pm$ 3.57	41.12 $\pm$ 2.88	42.65 $\pm$ 1.49
	MCV (fL)	58.23 $\pm$ 5.64 <sup>NS</sup>	57.52 $\pm$ 1.68	58.01 $\pm$ 1.68	59.24 $\pm$ 1.31
	MCH (pg)	19.45 $\pm$ 1.65 <sup>NS</sup>	18.25 $\pm$ 0.98	18.54 $\pm$ 1.27	19.35 $\pm$ 0.67
	MCHC (g/dL)	28.12 $\pm$ 0.45 <sup>NS</sup>	29.45 $\pm$ 1.86	29.65 $\pm$ 2.90	28.68 $\pm$ 1.86
	Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	845.22 $\pm$ 78.32 <sup>NS</sup>	878.22 $\pm$ 81.52	849.24 $\pm$ 65.12	883.46 $\pm$ 112.35
	Reticulocytes (%)	2.53 $\pm$ 0.42 <sup>NS</sup>	2.46 $\pm$ 0.54	2.57 $\pm$ 0.28	2.49 $\pm$ 0.35
	Neutropils (%)	6.60 $\pm$ 0.56 <sup>NS</sup>	6.66 $\pm$ 0.49	6.54 $\pm$ 0.80	6.52 $\pm$ 0.78
	Eosinopils (%)	0.60 $\pm$ 0.20 <sup>NS</sup>	0.58 $\pm$ 0.13	0.57 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.11
	Basophils (%)	0.97 $\pm$ 0.08 <sup>NS</sup>	0.94 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.05
	Lymphocytes (%)	86.51 $\pm$ 5.85 <sup>NS</sup>	85.25 $\pm$ 7.65	86.35 $\pm$ 6.20	83.42 $\pm$ 3.57
	Monocytes (%)	0.94 $\pm$ 0.05 <sup>NS</sup>	0.92 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.10

<sup>1)</sup>Values are expressed as means $\pm$ SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

Table 9. Levels of serum biochemical indices of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	ALT (U/L)	37.42±10.41 <sup>1)NS2)</sup>	36.35±7.42	35.45±6.29	35.75±4.35
	AST (U/L)	152.23±25.26 <sup>NS</sup>	145.29±14.45	154.13±23.20	147.21±30.48
	ALP (U/L)	130.43±12.35 <sup>NS</sup>	123.45±21.74	126.31±21.00	131.23±12.10
	GLU (mg/dL)	105.36±11.46 <sup>NS</sup>	97.22±12.14	98.77±9.11	101.83±18.75
	BUN (mg/dL)	13.56±3.21 <sup>NS</sup>	12.64±5.71	12.29±4.54	11.87±3.54
	TC (mg/dL)	69.25±4.85 <sup>NS</sup>	71.45±5.75	66.75±332	67.95±5.51
	TG (mg/dl)	98.43±11.28 <sup>NS</sup>	95.46±9.45	92.65±5.74	89.45±7.56
	TP (g/dL)	6.49±1.42 <sup>NS</sup>	6.65±0.85	6.75±0.45	6.45±0.95
	Albumin (mg/dL)	3.42±0.25 <sup>NS</sup>	3.56±0.45	3.52±0.65	3.75±0.84
Female	CRE (mg/dL)	0.63±0.08 <sup>NS</sup>	0.65±0.05	0.60±0.07	0.63±0.09
	ALT (U/L)	38.45±2.65 <sup>NS</sup>	37.67±4.02	36.17±5.65	38.02±4.37
	AST (U/L)	148.43±22.65 <sup>NS</sup>	152.21±20.88	150.71±35.12	158.52±40.24
	ALP (U/L)	105.45±21.32 <sup>NS</sup>	98.78±34.83	107.17±17.46	109.53±20.25
	GLU (mg/dL)	95.46±16.34 <sup>NS</sup>	101.17±13.85	98.16±14.45	99.29±12.65
	BUN (mg/dL)	10.57±2.45 <sup>NS</sup>	12.24±0.98	10.75±1.25	11.21±0.97
	TC (mg/dL)	71.45±6.84 <sup>NS</sup>	74.42±5.74	66.75±9.17	69.05±7.13
	TG (mg/dL)	93.76±13.74 <sup>NS</sup>	86.48±9.42	88.67±11.35	85.42±12.31
	TP (g/dL)	5.60±0.21 <sup>NS</sup>	6.05±0.35	6.18±0.45	5.84±0.34
Albumin (mg/dL)	3.35±0.11 <sup>NS</sup>	3.60±0.42	3.50±0.27	3.51±0.51	
CRE (mg/dL)	0.56±0.06 <sup>NS</sup>	0.55±0.02	0.60±0.08	0.59±0.07	

<sup>1)</sup>Values are expressed as means±SE (n=10). <sup>2)</sup>NS: not significantly different among groups.

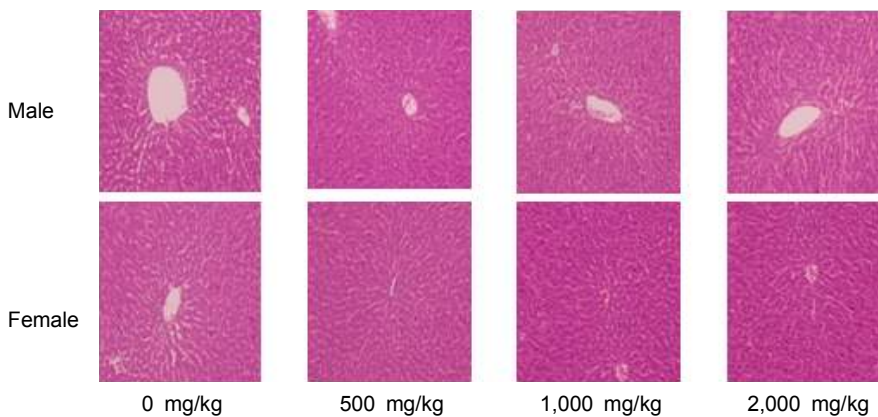


Fig. 1. Histopathological examinations of the liver of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days.

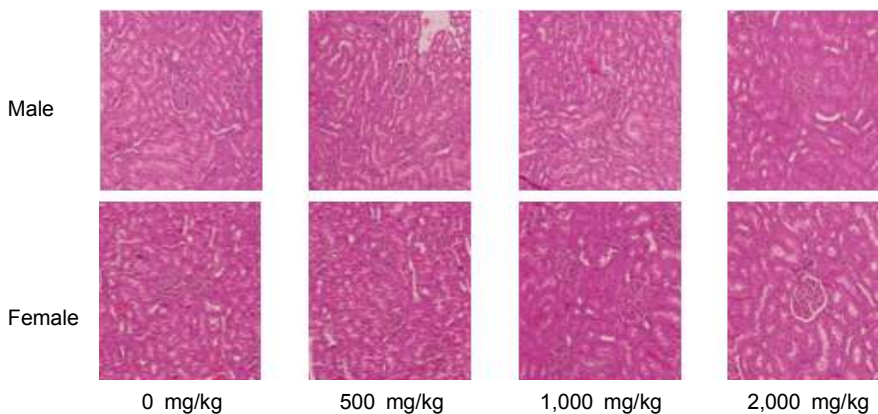


Fig. 2. Histopathological examinations of the kidney of male and female SD rats treated orally with *Leuc. citreum* GR1 for 28 days.

## 요 약

본 연구는 김치 유래 유산균인 *Leuc. citreum* GR1의 안전성을 평가하고자 *Leuc. citreum* GR1을 SD 계통의 흰쥐에게

4주간 반복 경구투여를 통하여 장기투여에 의한 안전성을 확인하고자 식품의약품안전청의 의약품 등의 독성시험기준에 따라 실시하였다. SD 계열의 암수 흰쥐에 시험물질을 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 4주간 반복 경구

투여 한 후 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 수분섭취량, 부검소견, 장기무게의 변화, 혈액학적, 혈액생화학적 및 병리조직학적 검사를 실시하였다. 모든 시험군에서 시험기간 시험물질로 인한 일반증상 및 사망동물이 관찰되지 않았다. 전 시험기간 동안 *Leuc. citreum* GR1의 4주간의 경구투여 결과 체중이 지속적으로 증가되었지만 대조군과 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 또한 장기의 육안적 관찰, 장기 중량변화, 혈액학적, 혈액생화학적 및 병리조직학적 검사에서도 모든 시험물질 투여군이 대조군과 유의성이 있는 차이를 보이지 않았으며, 모두 정상 범위를 벗어나지 않아 시험물질에 기인하는 이상 소견을 발견할 수 없었다. 이상의 결과로 보아 4주 반복투여 독성시험 결과 김치 유산균인 *Leuc. citreum* GR1은 저독성의 안전한 물질로 판정되며, 본 시험물질의 무독성량은 암수 모두 2,000 mg/kg/day 이상을 상회하는 것으로 판단되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### 문헌

- Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park KJ, Park MS. 2011. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 43: 446-452.
- Gilliland SE. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7: 175-188.
- Lee KH, Jun KD, Kim WS, Paik HD. 2001. HD Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol* 32: 146-151.
- Hur HJ, Lee KW, Kim HY, Chung DK, Lee HJ. 2006. *In vitro* immunopotentiating activities of cellular fractions of lactic acid bacteria isolated from kimchi and bifidobacteria. *J Microbiol Biotechnol* 16: 661-666.
- Kim JH, Kwon MJ, Lee SY, Ryu GD, Moon GS, Cheigh HS, Song YO. 2002. The effect of kimchi intake on production of free radicals and anti-oxidative enzyme activities in the liver of SAM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 109-116.
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 20: 102-109.
- Lim CR, Park HK, Han HU. 1989. Reevaluation of isolation and identification of Gram-positive bacteria in Kimchi. *Kor J Microbiol* 27: 404-414.
- So MH, Kim YB. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 27: 495-505.
- Lee SH, No MJ. 1997. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 617-622.
- Chae O, Shin K, Chung H, Choe T. 1998. Immunostimulation effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 424-430.
- Kwon JY, Cheigh HS, Song YO. 2004. Weight reduction and lipid lowering effects of kimchi lactic acid powder in rats fed high fat diets. *Korean J Food Sci Technol* 36: 1014-1019.
- Shin K, Chae O, Park I, Hong S, Choe T. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 357-363.
- Sandine WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 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.
- Lee JJ, Lee YM, Chang HC, Lee MY. 2007. Acute toxicity of *Leuconostoc kimchii* GJ2, an exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from Kimchi, in mice. *J Life Science* 17: 561-567.
- Lee JJ, Chang HC, Lee MY. 2007. Acute toxicity of *Leuconostoc citreum* GJ7 isolated from Kimchi in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 534-539.
- Lee H, Lee JJ, Chang HC, Lee MY. 2012. Acute toxicity of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi in mice. *Korean J Food Preserv* 19: 315-321.
- Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2012. Repeated-dose toxicity study of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 612-620.
- Lee JJ, Lee YM, Chan HC, Lee MY. 2007. Repeated-dose toxicity study of *Pediococcus pentosaceus* MD1, an anti-*Helicobacter pylori* activity lactic acid bacteria isolated from Kimchi, in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 975-982.
- Cha SD, Yu JW, Kim TW, Cho HS, Lee DH. 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* CIB 001 on lipid metabolism of hypercholesterolemic rats. *Korean J Food Sci Technol* 44: 324-330.
- Hong CO, Seo MY, Koo YC, Nam MH, Lee HA, Kim JH, Wang Z, Yang SY, Lee SH, No SH, Lee KW. 2009. Single and 14-day repeated oral toxicity studies of 70% ethanol extract of *Lindera obtusiloba* Blume leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1324-1330.
- Hayes AW. 1984. *Hayes Toxicology*. Raven press, New York, NY, USA. p 17-19.
- Kang BH, Kim YB, Lee HS, Kim YH, Im WJ, Ha CS. 2004. Background data on hematology, blood biochemistry and organ weights for 2 weeks and 4 weeks repeated-dose toxicity studies using Sprague-Dawley (SD) rats. *Korean J Lab Ani Sci* 20: 134-140.

(2012년 12월 17일 접수; 2013년 1월 18일 채택)