

Lactobacillus plantarum AF10이 생성한 조항진균 물질의 마우스에 대한 급성독성

손희경 · 이명렬 · 장해춘 · 이재준[†]

조선대학교 식품영양학과

Acute Toxicity of Crude Anti-fungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Hee-Kyoung Son, Myung-Yul Lee, Hae-Choon Chang, and Jae-Joon Lee[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 500-759, Korea

Abstract

We investigated the acute toxicity from a single dose of crude anti-fungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1, a lactic acid bacterium isolated from kimchi, on ICR male and female mice *in vivo*. The test article was orally administered once to both sexes of mice. The mortality rate, clinical findings, autopsy findings, and body weight changes were monitored daily for 14 days. In the oral acute toxicity test, male and female mice were gavaged with four doses (5, 50, 300 or 2,000 mg/kg) of the crude anti-fungal compounds. The oral LD₅₀ of the crude anti-fungal compounds was higher than 2,000 mg/kg. No significant changes in general conditions, body weights, clinical signs, or appearance of gross lesions were observed. In conclusion, our results suggest a low toxicity and no-adverse-effects from crude anti-fungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 up to 2,000 mg/kg via the oral route.

Key words: *Lactobacillus plantarum* AF1, acute toxicity, crude antifungal compound, mice

서 론

식품과 농산물의 곰팡이 오염으로 인하여 생성한 독소가 인체에 매우 치명적인 것으로 알려져 있다(1). 이로 인해 식품의 보존을 위한 여러 가지 물리·화학적인 방법들이 사용되고 있으나, 최근 소비자들은 신선하고 최소한의 가공과 화학 첨가물이 들어 있지 않은 유통기간이 연장된 식품을 요구하고 있다. 미생물의 오염을 억제하기 위하여 항진균 목적으로 사용되는 과도한 항생제의 오·남용에 의하여 항생제나 화학 보존제의 내성을 가지는 미생물들이 점점 증가하면서 심각한 문제가 보고되어(2-4), 새로운 식품 보존방법에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다. 최근 이러한 문제를 해결할 수 있는 식품 보존방법으로 천연 식품보존제에 대한 관심을 가지기 시작하면서 특히, 항진균 활성을 가진 물질의 분리와 항진균 물질을 생산하는 천연물질에 대한 연구가 다양하게 수행되고 있다(5-10).

김치 및 각종 채소류, 장류 등과 같은 전통 발효식품 및 발효유제품에 함유된 유산균은 풍미증가, 식품보존 작용, 장내 유해균 억제 작용, 성장작용 및 면역 증강 효과 등 다양한 생리기능성이 있으며(11,12), 이 중 유산균의 식품보존 작용은 유산균이 생산하는 유기산에 의한 pH 저하, H₂O₂, CO₂,

diacetyl, bacteriocin 등 항균활성 물질의 생산으로 유해 미생물을 사멸시키거나 생육을 억제하는 작용을 하여 식품의 저장성과 안전성에 기여한다(13-15). 특히 우리나라 전통발효식품인 김치는 숙성과정에서 증식하는 김치 유산균에 의해 생성되는 다양한 대사산물들은 기능성 음료, 식품 및 유산균제제로 인체의 영양 강화 또는 생리활성기능 촉진 및 건강기능성 식품의 형태로 활용되고 있으며(16,17), 또한 유산균이 지니고 있는 항생균 및 항진균 활성 때문에 천연 식품보존제로의 활용 가능성을 위한 연구가 이루어지고 있다(5,6,8,9).

김치 유산균 중 *Lactobacillus* 속은 유산, 초산 등의 유기산과 nisin과 같은 단백질성 항균물질인 bacteriocin을 생성함으로써 유해세균의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다(18,19). Bacteriocin은 미생물이 생산하는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 항균성 단백질이며, 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해됨으로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품 등의 천연 방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(20). 또한 bacteriocin은 항균 범위가 매우 광범위하여 부패균, 식중독균, 전염병균이나 포자 형성균 등의 증식을 억제하거나 사멸시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(21).

[†]Corresponding author. E-mail: leejj80@chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-7725, Fax: 82-62-225-7726

우리나라 전통발효식품인 김치에서 분류한 대표적인 유산균인 *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*)은 항세균 또는 항진균 활성이 우수한 것으로 알려져 있다(5). Lee 등(22)이 김치에서 분리한 *Lb. plantarum* LHC52는 *Escherichia* (*E.*) *coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis에 대해 항균효과를 나타냈고, 특히 *E. coli*에 대해 높은 항균성을 나타내었다. *Lb. plantarum* AF1은 식품 오염 곰팡이 및 병원성 곰팡이에 강한 생육 저해활성을 나타낼 뿐 아니라 효모 및 세균을 포함한 넓은 항균 활성 범위를 갖는다고 보고되었다(6). 또한 *Lb. plantarum* AF1은 급성 또는 반복독성시험 결과 시료 물질 투여로 인한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않아 저독성 물질로 천연 식품보존제 및 사료보존제로서 활용이 기대된다고 하였다(23,24). 그러나 지금까지 대부분의 유산균에 관한 독성연구는 유산균 자체에 관한 연구가 주로 이루어졌으나 이들 유산균들이 생산하는 물질에 관한 연구는 매우 미비하며, 유산균이 생산하는 물질 중 항균물질을 식품첨가제 혹은 항생제 대체 사료첨가제로의 기능을 수행하기 위해서는 독성에 관한 연구가 체계적으로 이루어져야 한다.

따라서 본 연구에서는 김치 유산균인 *Lb. plantarum* AF1 생산하는 조항진균 물질을 식품보존제 혹은 사료첨가제로서 활용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 안전성 평가의 일환으로 단회투여에 의해 발생할 수 있는 급성독성을 평가하였다.

재료 및 방법

Lb. plantarum AF1의 배양 및 배양 상징액의 준비

시험 유산균주는 광주광역시와 전라남도 등지에서 수집한 잘 익은 배추김치에서 분리한 것으로 조선대학교 식품영양학과 식품미생물실험실에서 항진균 활성이 우수하다고 알려진 유산균주인 *Lb. plantarum* AF1을 선별하여 실험에 사용하였다(25). 분리 유산균을 5 mL MRS(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 액체배지에 접종하여 30°C incubator(Vision Co., Seoul, Korea)에서 24시간 정치 배양하였다. 100 mL MRS 액체 배지에 1% 전배양액을 접종하고, 다시 30°C에서 24시간 동안 본 배양을 하였다. 본 배양액을 4°C에서 원심분리(9,500×g, 15 min) 하여 얻은 상징액을 0.45 µm membrane filter로 제균하여 배양 상징액을 준비하였다.

조항진균 물질의 정제

Lb. plantarum AF1이 생산한 조항진균 물질은 Yang과 Chang이 제조한 것(6)을 사용하였는데, 조항진균 물질 분리를 위하여 solid phase extraction(SPE) 정제과정을 통해 실시하였다. Methanol과 10 mM sodium acetate 완충액을 흘려 equilibration 상태인 SPE column(Isolute, C₁₈ EC, 10 g, International Sorbent Technology Ltd., Hengoed, UK)에

제균된 상징액 2.5 L를 통과시킨 후, 5% aqueous acetonitrile(HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)로 칼럼을 세척하고 95% aqueous acetonitrile로 3 mL씩 수집하였다. 용출된 시료는 Speed vac concentrator(Centra-Vac VS-802, Vision Co., Seoul, Korea)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 시료로 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

시험동물은 (주)오리엔트바이오(Iksan, Korea)에서 분양 받은 특정병원체부재(SPF) 5주령의 암수 ICR계 마우스를 사용하였다. 1주일간의 순회사육 기간 동안에 임상관찰 등을 시행하여 건강한 정상적인 동물만 시험에 사용하였으며, 체중 범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후 본 실험에 사용하였다. 시험동물은 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 횟수는 시간당 10~18회이며, 형광등 명암 12시간 cycle(09:00~21:00), 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육 상자(220 W×270 L×130 H mm) 케이지에 넣어 사육하였다. 실험동물 꼬리에 개별 인식 표시를 한 다음 투여 용량별로 10마리씩 암수 각각 따로 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(Jelifeed Co., Daejeon, Korea)를 자유급여 하였으며, 물은 상수도수를 자유섭취 시켰다. 동물실험은 조선대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회 규정에 따라 수행하였다.

시험군의 구성 및 투여용량의 설정

본 연구는 시험물질 투여 전 4시간을 절식시킨 후, 체중을 측정한 다음 예비시험결과를 토대로 독성징후가 관찰되지 않아 식품의약품 안정청의 독성시험기준(26,27), OECD guideline(28) 및 Cho 등(29)에 따라 2,000 mg/kg을 최고 용량으로 정하고, 정제증류수로 희석하여 5, 50, 300, 2,000 mg/kg의 시험물질을 제조하였다. 투여방법은 금속제 경구용 투여기(magen sonde)를 이용하여 위 내에 직접 주입하였다. 투여액량은 1일 1회 당일 체중을 기준으로 체중 kg당 10 mL를 투여하였으며, 대조군은 생리식염수만 투여하였다. 시험동물은 시험물질 투여 후 2시간 동안은 사료섭취를 제한하였으나 물은 시험기간 동안 계속적으로 공급하였다.

체중변화

모든 동물에 대하여 시료물질 투여 직전과 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 각각 체중을 측정하였다.

일반 임상증상 관찰

OECD guideline(28)에 따라 경구 투여 후 30분 이내에 1회 이상 관찰하고, 24시간 이내에 주기적으로 관찰(특히 6시간 이내는 세심하게 관찰)하였고, 다음날부터는 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상씩 일반상태와 변화, 중독증상의 발현 등 임상증상 및 사망동물의 유무를 총 14일 동안 관찰하였다. 관찰은 피부, 털, 눈, 점막, 호흡계, 순환계, 중추신경계, 행동유형, 전진, 설사, 유언증, 혼수상태 등의 증상을

기록하였다.

부검

14일간 시험물질 투여 후 희생하기 전날 12시간 절식시킨 후 CO₂로 마취시키고, 방혈시킨 후에 주요 내부 장기의 병변을 육안적으로 관찰하였다. 이후 간, 심장, 신장, 폐, 비장, 정소, 난소, 뇌를 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 수분을 제거하고 각각의 무게를 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0 P/C package (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one way ANOVA)을 실시하였으며 사후검정은 Tukey-test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 이루어졌다. 본 시험에서는 사망동물이 관찰되지 않아 반수치사량(LD₅₀)의 산출을 위한 통계처리는 실시하지 않았다.

결과 및 고찰

치사율 및 LD₅₀치

김치유산균 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 5, 50, 300 및 2,000 mg/kg 1회 경구투여 후 암수 ICR 마우스에게 14일 간 사망동물의 사망개체수를 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 시험기간 동안 암수 마우스 모두 대조군 및 시험물질 투여군 들에서 사망례가 관찰되지 않았다. 일반적으로 경구급성 독성시험은 사망 예를 관찰할 수 없는 경우에는 최고 용량을 2,000 mg/kg까지 투여 용량으로 하여 시험을 실시(28)하기 때문에 시료의 용해도 및 예비실험결과를 토대로 최고 용량 2,000 mg/kg까지 투여하였다. 따라서 본 연구에서는 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물의 경구급성 독성시험 LD₅₀값은 적어도 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다. OECD guideline (28)은 2,000 mg/kg에서 사망 개체가 없는 경우 무독성으로 간주하므로 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부

분 정제물의 안전성을 확인할 수 있었다. Donohue 등(30)도 유산균의 급성독성연구에서 마우스의 최소치사량이 6,000 mg/kg 이상이라고 보고하면서 매우 안전한 물질이라고 하였다.

단회투여에 의한 체중변화

암수 마우스에게 시료물질 1회 용량별로 경구투여 후 체중의 변화를 관찰한 결과는 Table 2와 같이 시험물질 투여군과 대조군 모두 시간 경과에 따라 체중이 증가하였으며, 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일 모두 시험물질 투여군과 대조군 간의 유의적인 체중변화는 없는 것으로 관찰되었다. 또한 시험물질 투여군 간의 체중변화는 경구투여한 모든 군에서 용량의존성을 나타나지 않았다.

임상증상

Table 3에서와 같이 5, 50, 300 및 2,000 mg/kg 용량의 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 경구투여 후 관찰한 결과 털 빠짐 현상, 설사, 다뇨, 연변, 활동 저하현상, 진전 및 부종 등 시험물질에 의한 어떠한 임상증상의 이상 소견이 관찰되지 않았다. 최근에는 OECD TG420(31)의 경우 독성시험의 종말점을 실험동물의 사망에 한정하지 않고, 투여 후 임상증상을 관찰하여 실험동물의 명확한 독성반응, 즉 호흡곤란, 보행불능, 지속적인 식욕결핍, 설사, 체중 감소 등이 보이면 실험동물을 사망으로 간주하고 처리하는 것이 달라진 점으로 인도적인 종말점(32-34)을 중요시하는 경향이 있다. 그러나 본 연구에서는 대조군 및 모든 시험물질 투여군에서 특이할 만한 임상증상은 보이지 않았다.

부검소견 및 장기무게

실험동물을 부검 후 주요 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과 Table 4와 같이 암수 마우스 대조군과 시험물질 투여군 모두에서 심장, 폐, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장 등의 주요 내부 장기에 대한 외관상의 이상이나 시험물질의 투여로 인한 용량 의존적인 특이할 만한 부검소견은 관찰되지 않았다. 또한 장기무게 측정 결과 Table 5와 같이 뇌, 폐, 고환, 난소,

Table 1. Mortality of male and female ICR mice treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Sex	Dose (mg/kg)	Hours after treatment						Days after treatment					Final mortality	
		1	2	3	4	5	6	0	1	3	7	14		
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

¹⁾Values are expressed as number of dead animals/ total animals.

Table 2. Body weights in male and female ICR mice treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Sex	Dose (mg/kg)	Body weights (g)				
		Days after treatment				
		0	1	3	7	14
Male	0	28.81±2.73 ^{1)NS2)}	29.52±0.52 ^{NS}	30.13±0.56 ^{NS}	32.23±1.07 ^{NS}	35.23±1.52 ^{NS}
	5	29.22±1.12	30.21±0.76	31.07±0.68	33.57±0.87	36.17±1.90
	50	28.95±0.81	29.22±0.89	30.87±1.14	32.41±0.62	35.98±2.08
	300	29.31±2.25	29.41±1.13	30.05±1.42	32.33±1.40	36.25±1.54
	2,000	29.35±0.65	29.40±0.33	30.07±1.02	32.89±0.32	36.07±3.02
Female	0	22.42±0.62 ^{NS}	23.56±0.92 ^{NS}	24.15±0.91 ^{NS}	26.42±0.91 ^{NS}	28.34±1.03 ^{NS}
	5	23.25±0.51	24.11±0.14	24.76±0.47	26.58±0.76	28.82±0.43
	50	23.42±0.37	24.07±0.37	24.66±0.35	27.33±0.41	29.74±2.51
	300	23.64±0.41	23.88±0.58	24.86±0.44	26.14±0.52	28.87±1.73
	2,000	22.91±0.35	23.10±0.28	24.23±0.23	26.86±0.39	28.88±2.51

¹⁾Values are expressed as means±SE (n=10).

²⁾NS: not significantly different among groups.

Table 3. Clinical signs in male and female ICR mice treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Sex	Dose (mg/kg)	Signs						
		Loss of fur	Diarrhea	Polyuria	Soft stool	Decreased motor activity	Tremor	Edema
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

¹⁾Values are expressed as number of animals with the sign/ number of animals examined.

Table 4. Gross findings in male and female ICR mice treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Sex	Dose (mg/kg)	Observation	Frequency
Male	0	N.G.F ¹⁾	0/10 ²⁾
	5	N.G.F	0/10
	50	N.G.F	0/10
	300	N.G.F	0/10
	2,000	N.G.F	0/10
Female	0	N.G.F	0/10
	5	N.G.F	0/10
	50	N.G.F	0/10
	300	N.G.F	0/10
	2,000	N.G.F	0/10

¹⁾N.G.F.: no gross finding.

²⁾Values are expressed as number of animals with the sign/ number of animals examined.

좌우 신장, 심장, 간, 비장의 무게는 암수 마우스 모두 시료물 질 투여에 의한 차이가 발견되지 않았으며, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았다.

최근 *Lactobacillus* 속 균주가 생산하는 bacteriocin에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 유산균이 생산하는 항균

물질 중 bacteriocin은 천연 단백질 물질로 유전적 조작을 통해 생산이 조절될 수 있고, 다양한 식품 내 존재하는 병원성 및 부패성 균들의 성장을 억제할 수 있어 bacteriocin을 이용한 천연 식품보존제 개발에 관한 연구가 점차 증가하는 추세이다. 그러나 미생물이 probiotics로서 이용되기 위해서는 안정성, 기능성 및 기술적인 요소에서 검증을 거쳐야 하는데 최근에는 probiotics에 대한 규제 및 검증이 강화되는 실정이다(8,26). 식품공전 [제 1장 식품일반에 대한 공통기준 및 규격]에 따르면 ‘유산균 함유제품에 사용되는 유산균 등은 식용 가능하고 식품위생상 안전한 것이어야 한다.’라고 명시되어 있다(35). 유산균은 실제 식품에 적용 시에는 안전성이 검증되어야 하고, 유산균이 식품 적용 여부 가능성은 식품의약품안정청에서 검토를 받아야 한다. 유럽에서도 새로운 식품으로서 probiotics 유산균, prebiotics, 유전자 조작 세균 등을 사용하고자 할 때에는 안정성 측면에서 급성 독성 (toxicity)과 관련된 기초자료를 요구하고 있다(36). 현재 식품첨가물로서 미국 식품의약품안정청(USA Food and Drug Administration)의 승인을 받은 GRAS(generally recognized as safe) 균주로는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* 및 *Pediococcus*와 같은 유산균이다(37). 본 연구에

Table 5. Organ weights of male and female ICR mice treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1

Sex	Organs	Dose (mg/kg)				
		0	5	50	300	2,000
Male	Liver	1.92±0.23 ^{1)NS2)}	1.60±0.18	1.64±0.12	1.76±0.13	1.89±0.11
	Kidney (L)	0.34±0.03 ^{NS}	0.36±0.01	0.36±0.04	0.38±0.02	0.34±0.02
	Kidney (R)	0.33±0.08 ^{NS}	0.35±0.02	0.35±0.03	0.38±0.05	0.32±0.01
	Spleen	0.11±0.03 ^{NS}	0.15±0.03	0.11±0.01	0.12±0.01	0.11±0.02
	Heart	0.20±0.07 ^{NS}	0.19±0.01	0.22±0.03	0.19±0.02	0.19±0.03
	Lung	0.24±0.05 ^{NS}	0.23±0.06	0.22±0.03	0.23±0.07	0.24±0.04
	Brain	0.41±0.04 ^{NS}	0.46±0.03	0.45±0.02	0.43±0.02	0.44±0.05
	Testes	0.23±0.04 ^{NS}	0.23±0.01	0.20±0.06	0.22±0.06	0.24±0.07
Female	Liver	1.31±0.12 ^{NS}	1.24±0.01	1.35±0.03	1.21±0.02	1.32±0.03
	Kidney (L)	0.24±0.26 ^{NS}	0.20±0.02	0.22±0.02	0.21±0.01	0.21±0.02
	Kidney (R)	0.23±0.21 ^{NS}	0.19±0.03	0.21±0.04	0.21±0.02	0.20±0.01
	Spleen	0.14±0.09 ^{NS}	0.11±0.01	0.13±0.02	0.14±0.02	0.11±0.04
	Heart	0.17±0.08 ^{NS}	0.16±0.04	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01
	Lung	0.21±0.34 ^{NS}	0.18±0.01	0.21±0.03	0.21±0.02	0.19±0.03
	Brain	0.39±0.34 ^{NS}	0.36±0.01	0.40±0.03	0.42±0.02	0.41±0.03
	Ovaries	0.03±0.34 ^{NS}	0.03±0.01	0.04±0.03	0.04±0.02	0.04±0.03

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

서 사용된 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질의 경우 식품에서의 적용을 위하여 현재 상용되고 있는 식품보존제와 항진균 활성을 비교 분석한 결과, *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질이 식품보존제인 sodium benzoate, potassium sorbate 또는 pimaricin과 비슷하거나 좀 더 강한 항균효과가 있는 것(5)으로 나타났다. *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질은 낮은 pH, 온도, peptidase, lysozyme, α -amylase, lipase와 같은 효소 등에도 비교적 안정한 것으로 나타났다(25). 또한 *Lb. plantarum* AF1은 마우스에서 단회 혹은 4주 반복 경구투여 독성연구 결과에서도 독성이 발생되지 않은 것으로 보고되었으며(23,24), 본 연구에서도 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질이 실험동물에 대하여 급성독성이 발생되지 않은 것으로 사료되나 추후 실험적 연구를 통하여 포괄적인 연구가 더 필요한 실정이다.

요 약

본 연구는 김치로부터 항진균 활성을 보이는 유산균인 *Lactobacillus(Lb.) plantarum* AF1이 생산하는 조항진균 물질의 부분 정제물이 천연 식품보존제 및 사료보존제로서 사용 가능성을 알아보기 위하여 안전성을 평가하고자 단회 급성독성시험을 실시하였다. 급성독성시험을 위하여 경구로 1회 시험물질을 최고 용량(2,000 mg/kg)으로 하여 ICR계통 암수 마우스에게 용량별 각 군당 10 마리씩 투여한 후 14일 간의 일반증상, 사망률, 체중, 임상증상 및 육안적 소견을 관찰하였다. 단회 경구투여한 후 모든 시험군에서 사망례가 관찰되지 않았으며, 시험동물은 시험 종료 시까지 계속 생존하여 평균치사량을 산출할 수 없었다. 경구투여한 후 마우스의 체중변화에 있어서도 암수 모두 대조군과 시료물질 투여

군 사이에 유의성 있는 차이는 보이지 않았으며, 용량 의존적인 차이도 볼 수 없었다. 경구투여한 후 시험 종료한 다음 생존동물 모두를 부검하여 주요 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과 대조군과 시료투여군 모두에서 외관상이나 내부 장기에 어떠한 이상소견이나 병변이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 시험물질인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질을 경구투여 시 ICR계통 암수 마우스에서 독성학적인 변화가 관찰되지 않았으며, LD₅₀은 경구투여 시 2,000 mg/kg 이상인 저독성의 안전한 물질로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Prot* 64: 120-131.
- Brul S, Coote P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol* 50: 1-17.
- Davidson MP. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. ASM press, Washington, DC, USA. p 593-627.
- Sanglard D. 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 5: 379-385.
- Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 276-284.
- Yang EJ, Chang HC. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 139: 56-63.

7. Earnshaw RG. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: Natural food preservation systems. In *The Lactic Acid Bacteria in Health And Disease*. Wood BJB, ed. Elsevier, London, UK. p 211-232.
8. Bang JH, Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. *J Life Sci* 22: 251-258.
9. Ahn JE, Kim JK, Lee HR, Eom HJ, Han NS. 2012. Isolation and characteristics of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* B16 from Kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 721-726.
10. Kim GE. 2011. Characteristics & applications of *Lactobacillus* sp. from Kimchi. *Korean Soc Biotechnol Bioengine J* 26: 374-380.
11. Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawa S. 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 278-287.
12. Resta-Lenert S, Barrett KE. 2006. Probiotics and commensals reverse TNF- α and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 130: 731-746.
13. Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.
14. Stiles ME. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 331-345.
15. Messens W, De VL. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. *Int J Food Microbiol* 72: 31-43.
16. Atrih A, Rekhif N, Milliere JP, Lefebvre G. 1993. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Canadian J Microbiology* 39: 1173-1179.
17. Klaver FA, van der Meer R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* 59: 1120-1124.
18. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 65: 351-354.
19. Seo J, Lee GS, Kim JE, Chung MJ. 2010. Development of probiotic products and challengers. *KSBB J* 25: 303-310.
20. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722-756.
21. Drider D, Fimland G, Hécharde Y, McMullen LM, Prévost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 564-582.
22. Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, Bae IH, Ham JS. 2010. A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 isolated from Kimchi. *Korean J Food Sci Ani Resour* 30: 328-335.
23. 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.
24. Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2011. Repeated-dose oral toxicity study of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 612-620.
25. Yang EJ. 2008. Application of kimchi lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis* for development of novel antibiotics and edible vaccine. *PhD Dissertation*. Chosun University, Gwangju, Korea.
26. Guidelines for toxicity tests of drugs and related materials notification. 2009. KFDA. Korea. p 1-5.
27. Good laboratory practice regulation for non-clinical laboratory studies. 2009. KFDA. Korea. p 1-74.
28. Organization for economic cooperation and development (OECD). 2001. OECD guideline for the testing of chemicals revised draft guideline 420.
29. Cho YR, Yun YN, Han ES, Kwak SJ, Kim HS, Kang MS, Lee JY, Oh JH, Lim CH, Kim DS, Kim SH, Kang TS. 2008. Internal establishment and validation of OECD guidelines of acute oral toxicity. *J Alternative Animal Experiments* 2: 21-33.
30. Donohue DC, Deighton M, Ahokas JT, Salminen S. 1993. Toxicity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S, von Wright A, eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p 307-313.
31. OECD/OECD 420. 2001. Oecd guideline for testing of chemicals: Acute oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
32. Sass N. 2000. Humane endpoints and acute toxicity testing. *ILAR J* 41: 114-123.
33. Schled E, Genschow E, Spielmann H, Stropp G, Kayser D. 2005. Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD50 test. *Regul Toxicol Pharmacol* 42: 15-23.
34. Toth LA. 2000. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *ILAR J* 41: 72-79.
35. Korean Food Standards CODEX. 2012. Korean Food and Drug Administration.
36. Donohue DC, Salminen S. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific J Clin Nutr* 5: 25-28.
37. Ozlem O, Fadime K, Ingolf FN. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentasaceus* OZF, isolated from human breast milk products AcH/PA-1. *Afr J Food Sci* 10: 2070-2079.

(2013년 1월 29일 접수; 2013년 3월 21일 채택)