ISSN(Print) : 1738-7248, ISSN(Online) : 2287-7428
Korean J Food Preserv
20(3), 394-403 (2013)
http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2013.20.3.394

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Repeated-dose oral toxicity study of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 in rats

Hwan Lee, Myung-Yul Lee, Hae-Choon Chang, Jae-Joon Lee*
Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 500-759, Korea

Lactobacillus plantarum AF1이 생성한 조항진균 물질의 흰쥐에 대한 반복투여독성

이환 · 이명렬 · 장해춘 · 이재준*
조선대학교 식품영양학과

Abstract

This study was performed to investigate the four-week repeated-dose toxicity of the crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 (*Lb. plantarum* AF1), a lactic acid bacterium isolated from kimchi, in male and female rats. Sprague-Dawley male and female rats were divided into four groups, with 10 animals in each group. The test article was administered once daily by gavage to rats at dosage levels of 0, 500, 1,000, and 2,000 mg/kg/day for four weeks. There were no test-article-related deaths or abnormal clinical signs in both the male and female rats during the observation period. Furthermore, no differences in the body weight changes, food intake and water consumption levels of the control and treatment groups were found. The hematological parameters, serum biochemical analysis results, histopathological examination results and all other findings also showed no significant or dose-dependent changes. There were also no changes in the organ weights upon the administration of the crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1. These results suggest that the oral administration of the crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 had no adverse effects up to a dosage level of 2,000 mg/kg in both male and female rats.

Key words : *Lactobacillus plantarum* AF1, antifungal compounds, repeated four-week oral toxicity, rats

서 론

식품을 안전하게 장기간 보존하기 위한 노력들이 오래전부터 진행되었으며, 식품 보존 방법 중 발효는 가장 오래된 보존 기술 중 하나로서 현재 유럽인들의 경우 섭취하는 식품 중 발효식품이 차지하는 비율이 25%, 개발도상국의 경우 60% 정도 차지한다고 한다(1). 발효는 식품에서 식품 부패 미생물과 병원 미생물을 포함하는 잡균을 제어할 수 있는 미생물을 이용하며, 발효와 연관된 대표적인 미생물이 GRAS(generally recognized as safe)로 알려진 유산균이다.

유산균은 lactic acid, acetic acid, propionic acid 등의 유기산을 생성하며, 이러한 유기산은 pH의 저하와 발효산물 중 항균활성 물질의 생산으로 부패미 생물과 병원성 미생물을 사멸시키거나 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다(2). 이 외에도 유산균이 생성하는 H_2O_2, CO_2, diacetyl, bacteriocin 등이 항균작용을 한다(1-3). 세균이 생성하는 항균 물질인 bacteriocin은 세포외로 분비되는 peptide나 단백질인데 생산균주와 근연관계의 미생물을 죽이거나 생육을 저해하는 물질이다(4,5). Bacteriocin은 사람이 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해됨으로써, 인체에 무독하고 잔류성이 낮다는 점에서 식품 등의 천연 방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(6). 또한 bacteriocin은 항균 범위가 매우 광범위하여 부패균, 식중독균, 전염병균이나 포자 형성균 등의 증식을 억제하거나 사멸시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(7). 따라서 유산균이 생산하는 bacteriocin은 식품의 보존 및 저장을 위해 사용되어질 안전한 천연보존제로 많은 관심을 받기 시작하였다.

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

Bactericon 생성 유산균의 항세균 및 항진균효과에 대한 연구로는 김치에서 분리한 유산균인 *Lb. plantarum* LHC52이 생성한 조항균 물질이 *Escherichia coli* K-99에 대한 항균효과가 매우 높게 나타났으며, *L. plantarum* LHC52를 첨가하여 제조한 요구르트도 *E. coli*에 대한 항균력이 높았다(8). 또한 김치에서 분류한 유산균인 *Lb. plantarum* LHB55이 생선한 조항균 물질(9)과 동치미에서 분리한 유산균인 *Lb. plantarum* K11이 생산한 bacteriocin(10)도 *E. coli* O157에 대한 항균효과가 높았다. 본 연구에 사용되어진 김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질은 정제된 형태가 아닌 배양액의 농축물 상태에서도 항진균 활성이 매우 높은 것으로 나타나 식품과 가축 사료를 오염시키며 인체에 매우 유해한 *Aspergillus funigatus, A. ochraceus, A. nidulans* 등의 곰팡이와 병원성 곰팡이인 *A. nigrum*과 *Cladosporium gossypiicola*에 대하여 강한 생육억제작용을 나타내었다(11). 또한 *Lb. plantarum* AF1의 배양액은 식품보존제인 sodium benzonate, potassium sorbate 또는 pimaricin과 비슷하거나 좀 더 강한 항균효과가 있는 것(12)으로 나타났다.

Probiotics 균주로 알려진 유산균은 이미 여러 나라에서 상품화되어 사용되고 있다(13). 미생물이 probiotics로서 이용되기 위해서는 안전성(14)뿐만 아니라 기능성 및 기술적인 요소에 대한 검증을 거쳐야 하는데 최근에는 probiotics에 관한 규제와 검증이 강화되고 있는 실정이다. 유산균 균주에 관한 독성연구로는 *Lb. casei* GG, *Streptococcus thermophilus* 101 및 *Lb. helveticus* 230에 관한 급성독성 연구(15)와 Huang 등(16)이 *Propionibacterium jensenii* 702을 80일간 흰쥐에게 경구 반복투여 후 안전성 검사를 실시하였는데, 시료 물질 투여로 인한 체중의 변화나 어떠한 임상적인 증상이 나타나지 않은 안전한 물질이라고 보고하였다. 또한 유산균이 식품첨가물로써 미국 식품의약품안정청의 승인을 받은 GRAS 균주로는 *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* 및 *Pediococcus*이다(17). 김치로부터 분리한 김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1은 단회투여 급성 독성과 4주 반복독성 시험 결과 시료 물질 투여로 인한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않아 저독성 물질로 천연 식품보존제 및 사료보존제로서 활용이 기대된다고 하였다(18,19). 또한 *Lb. plantarum* AF1 배양액도 단회 혹은 반복독성 시험 결과 무독한 물질로 나타났다(data not shown). 이와 같이 유산균의 독성연구는 주로 유산균 균주만을 가지고 주로 연구가 수행되었으며, 이들 유산균들이 생산하는 bacteriocin에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 유산균이 생산하는 bacteriocin을 식품첨가제 혹은 항생제 대체 사료첨가제로의 기능을 수행하기 위해서는 독성에 관한 연구가 체계적으로 이루어져야 한다.

본 연구는 김치로부터 분리·동정하여 항세균 뿐만 아니라 항진균 활성을 지닌 김치산막효모억제 유산균(12)인 *Lb. plantarum* AF1 생산하는 조항진균 물질을 식품보존제 혹은 사료첨가제로서 활용하기 위한 기초자료를 얻는데 있는데, 이를 위하여 안전성 평가의 일환으로 Sprague-Dawley 계열 흰쥐를 이용하여 4주간 반복독성시험을 "의약품 등의 독성시험 기준(식품의약품안정청고시 제 1999-61호)"에 준(20~22)하여 실시하였다.

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(12). 분리 유산균을 5 mL MRS(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 액체배지에 접종하여 30℃ incubator(Vision Co., Seoul, Korea)에서 24시간 정치 배양하였다. 100 mL MRS 액체 배지에 1% 전배양액을 접종하고, 다시 30℃에서 24시간 동안 본 배양을 하였다. 본 배양액을 4℃에서 원심분리(9,500g, 15 min)하여 얻은 상징액을 0.45 μm membrane filter로 제균하여 배양 상징액을 준비하였다.

Solid Phase Extraction(SPE) 정제 조항진균 물질의 분류

Lb. plantarum AF1이 생산한 조항진균 물질은 Yang과 Chang(23)이 제조한 것을 사용하였는데, 조항진균 물질 정제를 위한 전처리 단계로 SPE 정제를 시행하였다. Methanol과 10 mM sodium acetate 완충액을 흘려 equilibration 상태인 SPE column(Isolute, C_{18} EC, 10 g; International Sorbent Technology Ltd, Hengoed, UK)에 제균 된 상징액 2.5 L를 통과시킨 후, 5% aqueous acetonitrile(HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)로 column을 세척하고 95% aqueous acetonitrile로 3 mL씩 수집하였다. 용출된 시료는 speed vacuum concentrator(Centra-Vac VS-802, Vision, Seoul, Korea)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 시료로 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

Sprague-Dawley(SD) 계통의 특정병원균 부재 암·수컷 흰쥐 각각 5주령 40 마리를 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. SD 계통 흰쥐는 전 세계적으로 반복 투여독성 등의 시험에 널리 사용하고 있어 비교할 만한 시험 기초자료(24-26)가 축적되어 선택하였다. 시험동물은 온도 23±1℃, 상대습도 55±5%, 환기 회수는 시간당 10~18회, 조명은 12시간 명암주기(08:00~20:00), 조도는 300~500 Lux의 사육환경에서 스테

인레스스틸 케이지에 1마리씩 암·수 각각 넣어 4주간 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료주식회사)를 자유 급여하였으며, 음수는 여과된 정제수를 자유 섭취시켰다. 실험동물의 개체 식별은 꼬리에 개별인식 처리한 후 동물을 관찰하였다.

시험군의 구성 및 투여 용량의 설정

실험동물은 대조군과 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 투여군로 나누었으며, 암·수컷 각각 10마리로 하였다. 실험 전 7일간의 순화사육 기간 동안에 임상관찰 등을 시행하여 체중감소가 없는 건강하고 정상적인 동물만 시험에 사용하였으며, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다. 본 시험물질은 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 시험물질의 투여용량은 OECD Guideline(22), Principles and Methods of Toxicology(27) 및 미국 환경보호청(US Environmental Protection Agency)에서 무해물질 분류 기준(28)에 근거하여 설정하였다. 투여용량 설정은 예비 독성시험 결과를 바탕으로 하였으며, 반복투여 경구 독성시험에서 시험물질의 독성이 매우 적고 중독량을 정하기가 어려운 경우 투여량의 상한선은 기술적으로 투여할 수 있는 최대량으로 하는 것이 기본이여서, 암·수 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. 투여용량은 경구투여 시 10 g 당 0.2 mL를 넘지 않게 일정한 액량으로 시료물질의 각 농도가 들어가게 조제하여 투여 액량을 결정하였는데 투여량은 투여직전 체중에 따라 산출하였다. 시료물질인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질은 투여 용량을 고려하여 10 mM sodium acetate(pH 4.0)에 각 농도 별로 용해하여 사용하였다 시험물질의 투여는 투여 개시 전에 잘 현탁시킨 다음 매일 1회 4주간 경구투여용 존데(zonde)를 정착한 주사기를 이용하여 위 내에 직접 투입하였으며, 대조물질로는 10 mM sodium acetate(pH 4.0)를 사용하였다. 시험동물은 시험물질 투여 후 2시간 동안은 사료를 제한하지 않았으며, 전 시험기간 동안 물은 자유롭게 섭취시켰다.

일반증상 및 사망동물의 관찰

시험물질 투여 당일은 시료물질 경구투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음 날부터 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상씩 모든 동물에 다하여 일정한 시간에 일반상태의 변화, 중독 증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였고(27), 일반증상은 식욕부진, 타액분비, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화를 중심으로 관찰하였다(29). 또한 시험기간 중 매일 functional observation battery(FOB) test(30)에 기초하여 실험동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 등에 관한 임상증상도 관찰하였다.

체중변화, 사료섭취량 및 수분섭취량 측정

모든 실험동물의 체중은 시험물질 투여 개시 전에 실시하였으며, 투여 개시 후에는 시험기간 중 매주 마다 일정한 시간에 1회 측정하였다. 사료섭취량 및 수분섭취량은 매주 3회 측정하여 산출하였다.

혈액학적 검사

부검 전 12시간 절식시킨 동물을 CO_2로 가볍게 마취시킨 후 복대정맥으로부터 전 채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA로 항응고 처리한 tube에 혈액을 채취한 후 자동혈구측정기(MEK-6318J/K, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)를 이용하여 총 적혈구수(red blood cells, RBC), 혈 중 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 원심분리해서 얻은 혈청에 대하여 혈액 생화학적자동분석기(Hitachi-747, Hitachi Medical., Tokyo, Japan)를 사용하여 알라닌 아미노기전이효소(alanine transaminase, ALT), 아스파라진산 아미노기전이효소(asparate transaminase, AST), 아스파라진산 아미노기전이효소(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 28일 째 까지 생존한 동물은 CO_2로 마취시킨 후 방혈 치사 시킨 다음 부검하여 육안적 외부소견, 피하, 내부 장기 및 뇌의 이상 유무를 관찰한 후, 장기를 적출한 다음 뇌, 폐, 정소, 난소, 신장, 심장, 췌장 및 간의 중량을 측정하였다.

조직학적 검사

조직학적 검사를 위하여 최종 부검 일에 모든 실험동물의 육안적 병변을 관찰한 후, 간과 신장을 적출하여 10%

중성완충포르말린 용액으로 고정한 다음 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시하고, 포매된 각 조직은 microtome(Lecis RM2255, Lecis, Wetzlar, Germany)으로 3-4 μm의 절편을 준비하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학현미경(Axio-imager M1, Carlziess, Niedersachsen, Germany)으로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0 P/C package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 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 임상증상

식품의약품안정청의 독성시험기준을 참고로 하여 모든 실험동물에 대하여 전 시험기간 동안 김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 4주간 경구 투여한 후 매일 일정한 시간에 암·수 흰쥐의 사망률과 임상증상을 관찰한 결과(Table 1과 2), 암·수 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 1). 또한 시험 전 기간 동안 암·수 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 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 2). 경구투여 독성 한계 용량인 2,000 mg/kg에서 시험물질 투여에 따른 이상 증상이 관찰되지 않아 본 시험물질의 최소 치사량이 암수 모두 2,000 mg/kg/day 이상을 상회할 것으로 보인다.

Table 1. Mortality of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Days after treatment						Final mortality
			0	7	14	21	28	end	
Male	0	10	0/10[1)]	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S[2)]	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

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

Table 2. Clinical signs of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Days after treatment				
			0	7	14	21	28
Male	0	NAD[1)]	0/10[2)]	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2,000	NAD	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

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

체중 변화, 사료섭취량 및 수분섭취량

암·수 흰쥐에게 김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 농도 별로 달리하여 4주간 경구 투여한 후 체중 변화, 사료섭취량 및 수분섭취량을 살펴본 결과는 Table 3, 4 및 5와 같다. 시험 전 기간 중 체중의 변화는 Table 3에서와 같이 암·수 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 시험 기간이 경과함에 따라 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 사료섭취량과 수분섭취량도 Table 4와 5에서와 같이 시험기간 동안 암·수 모두 시험물질 투여군과 대조군 간에 유의성 있는 변화는 나타나지 않아 시료물질 투여로 사료섭취량 및 수분섭취량에 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

부검결과 및 장기무게

김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 저(500 mg/kg/day), 중(1,000 mg/kg/day) 및 고(2,000 mg/kg/day) 용량으로 암·수 각각의 흰쥐에게 4주간 반복 투여 후 주요 장기에 미치는 영향을 육안적 관찰과 장기무게의 변화를 통해 측정한 결과는 Table 6과 7과 같다. 조사한 결과 모든 개체의 장기에서 유의성 있는 변화나 시험물질의 투여로 인한 용량 의존적인 특이할 만한 부검소견은 관찰되지 않았다. 장기 무게의 경우 뇌(brain), 폐(lung), 고환(testis), 난소(ovary), 좌우 신장(kidney), 심장(heart), 췌장(spleen) 및 간(liver)의 무게는 암·수컷 흰쥐 모두 시료물질 투여에 의한 차이가 발견되지 않았고, 투여 용량 의존적인 이상 변화도 관찰되지 않았다. 다만 암컷 흰쥐의 폐의 무게가 고(2,000 mg/kg/day) 용량

Table 3. Body weight changes of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Body weight (g)				
		Days after treatment				
		0	7	14	21	28
Male	0	107.01±11.01[1)NS2)]	138.42±11.43[NS]	193.38±11.07[NS]	245.27±10.58[NS]	292.45±9.66[NS]
	500	109.53±12.03	142.72±9.58	201.26±13.22	251.22±8.67	294.77±14.74
	1,000	109.41±9.78	140.60±12.17	199.17±9.88	248.34±10.64	290.47±12.63
	2,000	108.75±9.02	141.45±14.35	197.45±8.66	249.58±12.22	290.88±10.89
Female	0	92.41±6.32[NS]	121.44±10.37[NS]	145.23±7.69[NS]	176.75±5.45[NS]	209.25±6.55[NS]
	500	91.52±4.01	120.86±6.38	143.75±8.53	177.33±8.53	208.22±8.86
	1,000	92.63±9.43	116.74±6.23	145.95±9.52	171.44±9.68	207.55±6.98
	2,000	92.75±7.67	117.28±9.63	143.36±7.86	172.98±8.36	206.47±8.36

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

Table 4. Daily food consumption of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Food consumption (g/day/rat)			
		Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	18.36±2.84[1)NS2)]	21.72±3.65[NS]	27.25±2.47[NS]	31.14±2.37[NS]
	500	17.36±3.57	23.35±3.77	25.66±3.78	28.32±3.67
	1,000	16.22±3.58	22.47±2.67	26.27±3.55	29.14±2.34
	2,000	16.24±3.64	21.66±2.33	24.58±3.35	26.34±2.85
Female	0	14.24±1.93[NS]	14.84±1.99[NS]	18.77±1.65[NS]	21.71±1.43[NS]
	500	13.68±2.67	13.25±0.81	18.05±2.76	21.25±2.48
	1,000	13.57±2.07	13.76±5.16	17.82±1.52	20.20±3.50
	2,000	12.68±2.36	14.28±1.58	17.96±3.27	20.01±0.91

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

Table 5. Daily water consumption of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Dose (mg/kg)	Water consumption (mL/day/rat)			
		Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	27.72±1.44[1)NS2)]	32.12±2.34[NS]	38.36±4.48[NS]	43.57±4.34[NS]
	500	28.39±2.46	33.52±3.21	39.25±5.25	44.32±3.76
	1,000	27.71±1.85	33.68±2.21	39.63±3.76	43.65±5.15
	2,000	27.56±2.64	32.45±2.12	38.75±4.51	42.74±2.35
Female	0	23.17±3.14[NS]	29.11±2.82[NS]	33.17±2.54[NS]	37.82±4.33[NS]
	500	24.15±4.34	28.24±3.06	34.53±3.12	38.55±1.53
	1,000	24.64±3.35	29.38±2.12	32.22±2.28	36.46±1.19
	2,000	23.45±4.12	29.54±3.24	32.48±3.45	34.55±3.42

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

투여군이 대조군에 비하여 저하되었으나 유의차는 없었다. 일반적으로 독성이 있는 물질이 섭취가 되면 가장 먼저 간에서 해독작용이 일어나 간이 가장 큰 영향을 줄 수 있는데(31), 간의 무게를 살펴보면 각 군 간에 유의할 만한 차이점이 보이지 않았다. 이상의 결과 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물 투여는 장기 무게의 변화에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

혈액학적 검사

대조군과 각 시험물질을 투여한 흰쥐의 혈액학적 검사결과는 부검 후 자동혈구측정기를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(Hb), 헤마토크리트치(HCT), 총적혈구수(red blood cells, RBC), 평균 적혈구 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 측정한 결과, Table 8에서와 같이 암·수 모두 대조군과 시험물질 투여군 간에는 차이가 없었다. 혈액학적 검사 결과 대조군과 시료투여군의 수치 모두 정상 범위(33)에 속하였으며, 용량 의존성도 보이지 않았다. An 등(32)은 한약제인 백두옹을 사료첨가제로서 활용하기 위한 4주 반복독성시험을 실시한 결과 고용량 투여군의 경우 호중구, 림프구 및 단핵구의 농도가 유의적으로 증가하여 면역 활성이 보였다고 보고하였는데, 본 연구에서도 수컷 흰쥐의 경우 백혈구, 호중구, 림프구 및 단핵구의 경우 고(2,000 mg/kg/day) 용량 투여군의 경우 대조군 보다 수치가 약간 증가하였으나 유의차가 없었다. 이러한 혈액학적 검사결과는 SD계 흰쥐를 이용한 4주 반복투여 독성시험에서의 혈액학적 기초 자료에서 보고(33)한 범위와 유사하였다.

Table 6. Gross findings of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Thyroid gland NGF[1)]	10(100)[2)]	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)
Testis 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)

[1)]NGF: no gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers (the percentage of animal numbers).

Table 7. Organ weights of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Organs (g)	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	Brain	1.96±0.17[1)NS2)]	1.95±0.18	1.91±0.14	1.94±0.13
	Lungs	1.28±0.23[NS]	1.31±0.33	1.35±0.34	1.29±0.27
	Testis	2.85±0.52[NS]	2.90±0.57	2.86±0.62	2.88±0.68
	Kidney-L	1.17±0.62[NS]	1.18±0.68	1.20±0.58	1.21±0.48
	Kidney-R	1.18±0.41[NS]	1.19±0.32	1.19±0.33	1.20±0.61
	Heart	0.90±0.22[NS]	0.95±0.21	0.96±0.18	0.92±0.37
	Spleen	0.68±0.42[NS]	0.61±0.43	0.65±0.36	0.68±0.38
	Liver	8.90±2.34[NS]	8.93±3.34	8.91±4.41	8.92±4.57
Female	Brain	1.63±0.24[NS]	1.65±0.27	1.65±0.31	1.66±0.34
	Lungs	1.21±0.64[NS]	1.19±0.74	1.21±0.28	1.01±0.68
	Ovary	0.066±0.01[NS]	0.065±0.01	0.063±0.02	0.064±0.01
	Kidney-L	0.89±0.25[NS]	0.91±0.33	0.92±0.45	0.92±0.12
	Kidney-R	0.88±0.22[NS]	0.92±0.18	0.93±0.23	0.92±0.31
	Heart	0.75±0.14[NS]	0.76±0.16	0.77±0.17	0.76±0.13
	Spleen	0.55±0.22[NS]	0.56±0.29	0.57±0.28	0.56±0.26
	Liver	6.67±3.68[NS]	6.59±3.64	6.65±3.48	6.71±3.62

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

혈액 생화학적 검사

복대정맥 혈액으로부터 분리한 혈청으로부터 혈액 생화학적자동분석기를 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 측정한 결과, Table 9에서와 같이 암·수 모든 투여군은 대조군에 비하여 시험물질 투여에 기인한 유의성 있는 혈청 생화학적 변화가 관찰되지 않았으며, 대조군과 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물 투여군 모두 정상 수치를 나타내었다. 간 기능지표 효소로 알려진 혈청 AST와 ALT 활성은 간세포의 독성 시에 간세포에 장애가 발생하여 간세포가 파괴되어 혈액으로 이들 효소의 방출이 항진되어 활성이 증가한다(34). 또한 혈청 중 ALP은 담도계 폐색 또는 간질환 등에 의해 그 활성이 증가되어지는 효소로, 급성 신부전증, 고지혈증 및 폐경색증이 있을 때 간세포 장애가 진행되면 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성 수치가 함께 동시에 높아져 간의 담즙산 배설장애가 유발되고 이로 인하여 혈청 콜레스테롤 함량이 상승되는 것으로 알려져 있다(35). 본 연구 결과 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성의 경우 수컷 흰쥐는 ALT, AST 및 ALP 활성이, 암컷 흰쥐는 AST와 ALP 활성이 농도 의존적으로 저하되는 경향이었으나 유의차는 없었다. 혈액생화학적 결과는 *Lb. plantarum* AF1 균주를 흰쥐에 대한 반복투여 독성시험(19)에서의 혈액 생화학적 검사결과와 유사하였다. 본 연구 결과 혈액 생화학적 수치는 모두 정상 범위(36)이내의 변화로 용량 상관성이 결여되면 시험물질 투여로 인한 독성학적 변화가 나타나지 않았다.

병리학적 조직검사

Lb. plantarum AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물

Table 8. Hematology of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	WBC ($\times10^3$/μL)	7.31±0.26[1)NS2)]	7.28±0.69	7.36±0.78	7.41±0.64
	RBC ($\times10^3$/μL)	7.49±0.96[NS]	7.32±0.45	7.39±0.56	7.25±0.84
	Hb (%)	15.32±2.46[NS]	15.22±2.18	15.28±2.47	15.26±1.68
	HCT (%)	47.12±5.36[NS]	47.22±5.74	47.31±5.82	47.51±5.69
	MCV (fL)	62.08±6.32[NS]	62.25±6.38	62.36±4.57	62.48±5.32
	MCH (pg)	21.67±2.36[NS]	21.80±2.68	20.65±3.47	20.71±2.76
	MCHC (g/dL)	33.56±8.36[NS]	34.21±7.64	35.25±8.49	33.61±7.38
	Platelets ($\times10^3$/μL)	904.36±77.41[NS]	899.36±74.35	915.03±70.12	908.37±70.36
	Reticulocytes (%)	3.86±0.51[NS]	3.95±0.56	3.69±0.53	3.65±0.72
	Neutropils (%)	7.13±0.64[NS]	7.25±0.69	7.05±0.72	7.93±0.78
	Eosinopils (%)	0.77±0.38[NS]	0.76±0.42	0.76±0.31	0.80±0.24
	Basophils (%)	0.95±0.32[NS]	0.97±0.43	0.80±0.47	0.89±0.39
	Lymphocytes (%)	87.61±6.11[NS]	82.67±9.35	85.69±9.35	90.12±9.18
	Monocytes (%)	0.99±0.07[NS]	0.98±0.08	1.02±0.04	1.12±0.06
Female	WBC ($\times10^3$/μL)	6.66±0.87[NS]	6.67±0.19	6.71±0.38	6.72±0.24
	RBC ($\times10^3$/μL)	6.45±0.51[NS]	6.46±0.71	6.50±0.36	6.49±0.68
	Hb (%)	13.33±3.28[NS]	13.34±3.14	12.26±2.23	13.28±4.81
	HCT (%)	42.51±4.36[NS]	40.48±4.25	43.69±4.71	42.34±3.18
	MCV (fL)	59.46±5.61[NS]	57.68±5.18	59.69±5.47	60.21±5.32
	MCH (pg)	18.90±2.61[NS]	19.12±2.63	20.25±2.74	19.47±2.76
	MCHC (g/dL)	29.44±4.57[NS]	28.58±5.81	31.14±5.67	30.36±6.18
	Platelets ($\times10^3$/μL)	856.31±87.52[NS]	829.35±69.36	891.74±66.68	884.29±68.21
	Reticulocytes (%)	2.83±0.26[NS]	2.96±0.33	2.85±0.51	2.99±0.43
	Neutropils (%)	6.86±0.63[NS]	6.98±0.53	6.08±0.57	6.81±0.64
	Eosinopils (%)	0.61±0.29[NS]	0.63±0.18	0.57±0.11	0.59±0.14
	Basophils (%)	0.87±0.23[NS]	0.80±0.13	0.89±0.22	0.84±0.41
	Lymphocytes (%)	85.21±9.78[NS]	81.36±9.45	90.95±8.65	87.69±8.32
	Monocytes (%)	0.96±0.09[NS]	0.99±0.08	0.98±0.07	1.01±0.09

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

Table 9. Levels of serum biochemical indices of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	ALT (U/L)	38.21±3.23[1)NS2)]	37.26±3.36	38.36±4.21	32.75±4.58
	AST (U/L)	156.36±32.13[NS]	157.76±23.65	158.61±24.75	149.74±33.45
	ALP (U/L)	142.25±9.36[NS]	145.36±21.70	139.28±9.50	135.48±15.65
	GLU (mg/dL)	110.01±15.63[NS]	109.23±16.42	99.47±26.75	107.36±16.85
	BUN (mg/dL)	15.07±3.28[NS]	16.59±3.64	17.46±4.10	18.32±4.35
	TC (mg/dL)	71.59±8.59[NS]	69.80±7.75	73.65±7.00	72.71±7.51
	TG (mg/dl)	99.36±13.24[NS]	90.34±13.59	88.46±12.48	96.25±14.40
	TP (g/dL)	7.54±1.57[NS]	7.98±1.36	7.08±1.36	8.69±1.38
	Albumin (mg/dL)	4.11±0.185[NS]	3.95±0.18	4.09±0.18	4.05±0.18
	CRE (mg/dL)	0.73±0.06[NS]	0.75±0.08	0.69±0.09	0.71±0.03
Female	ALT (U/L)	30.54±3.36[NS]	35.67±3.54	35.74±3.18	32.68±4.76
	AST (U/L)	151.36±45.03[NS]	155.24±42.12	149.49±29.84	146.47±36.34
	ALP (U/L)	109.21±11.46[NS]	125.63±22.14	104.28±19.45	98.36±11.18
	GLU (mg/dL)	93.36±15.42[NS]	89.75±15.15	92.47±15.36	93.64±15.325
	BUN (mg/dL)	12.64±3.025[NS]	11.46±3.47	13.26±3.14	13.24±3.42
	TC (mg/dL)	69.45±6.04[NS]	75.32±7.68	62.65±6.32	71.47±6.72
	TG (mg/dL)	86.34±10.23[NS]	79.48±7.35	80.32±21.18	85.19±9.41
	TP (g/dL)	7.31±1.02[NS]	7.47±1.32	8.15±1.07	8.64±1.14
	Albumin (mg/dL)	3.69±0.23[NS]	3.46±0.11	3.11±0.19	2.99±0.19
	CRE (mg/dL)	0.36±0.02[NS]	0.41±0.03	0.38±0.05	0.37±0.07

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

을 투여한 흰쥐의 간과 신장의 병리학적 조직검사 결과는 Fig. 1과 2에 나타내었다. 병리학적 조직검사를 위해 먼저 간과 신장을 육안적으로 관찰한 결과 장기의 형태, 크기, 색조, 경조 및 기타 병변 등의 육안적 이상소견은 보이지 않았다. 따라서 간과 신장을 채취하여 10% 중성완충포르말린 용액으로 고정 후, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰한 결과, 간에서는 모든 군에서 염증, 괴사, iron 침착, bilirubin 침착 등의 병변을 보이지 않았고 간세포의 구조도 모두 정상적인 세포를 유지하고 있었다(Fig. 1). 신장에서도 염증, 괴사 등의 병변을 보이지 않았고 신장세포도 변화없이 정상적인 구조를 유지하였으며, 면역학적 요인이나 독성물질에 기인하는 사구체와 신세뇨관의 괴사도 발견되지 않았다(Fig. 2). 따라서 병리조직학적 검사 결과 대조군과 암·수 시료물질 투여군에서 모든 개체는 간과 신장의 유의성 있는 변화나 시험물질 투여로 인한 용량의존적인 특이할 만한 조직학적인 이상은 나타나지 않았으며, 이러한 소견은 장기 중량 변화와 혈액 생화학적 변화 결과와 부합되는 결과로 판단된다.

식품에 사용되는 인공 방부제나 식품첨가물과 가축의 사료첨가제에 관한 관심이 증가하면서 이들 식품의 안전성에 관한 관심이 매우 커지기 시작하였다. 유산균을 이용한 항세균 및 항진균 효과에 관한 연구가 최근 다양하게 수행되고 있으며(8-12), 이는 무분별하게 사용되고 있는 항생제로 인하여 항생제 내성균을 줄일 수 있는 해결방법 중 하나인 유산균이 생성하는 bacteriocin과 같은 천연 항생제의 개발이 중요하다. 현재 우리나라의 경우 유산균 유래 bacteriocin을 상업적으로 생산되어 식품첨가물로 사용되고 있는 것은 *Lactococcus lactics* 유래 nisin에 불과하며(37),

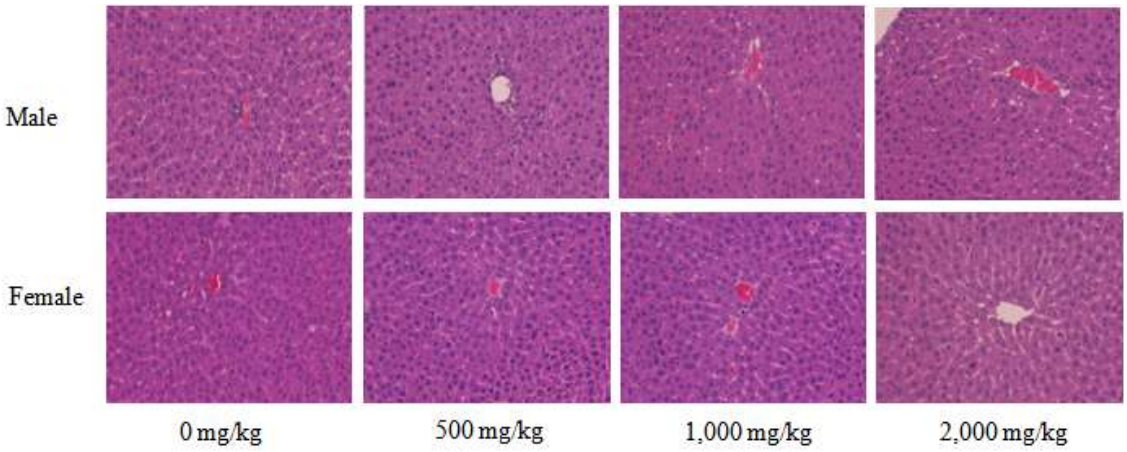

Fig. 1. Histopathological examinations of the liver of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

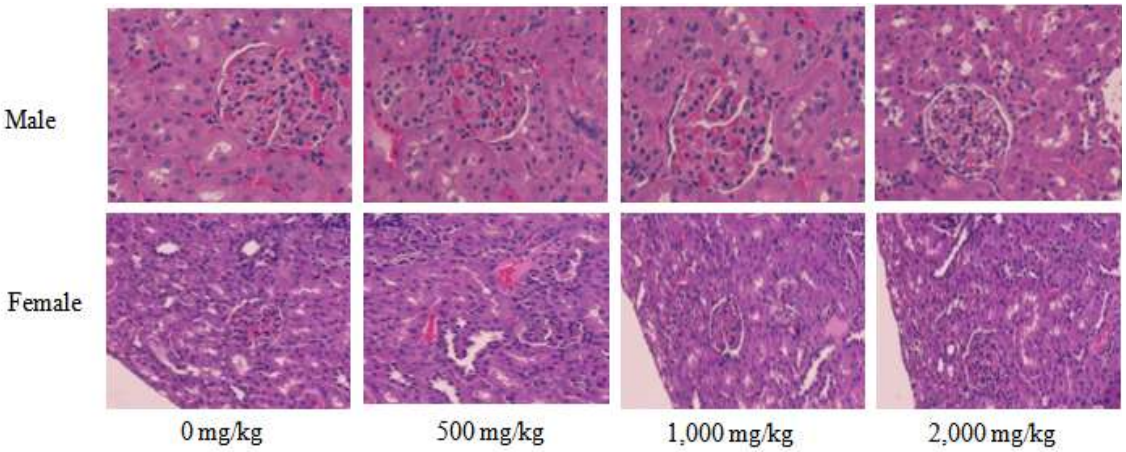

Fig. 2. Histopathological examinations of the kidney of male and female SD rats treated orally with crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1 for 28 days

가공 치즈의 경우 nisin을 200 mg/kg 이하의 농도로 첨가가 허용되고 있다(식품첨가물공전). Nisin은 GRAS로 인정받아 현재 50여개 개국 이상에서 치즈, 통조림식품, 유아식, 가공 채소 등의 보존제로 사용되고 있다(29,38). 본 연구의 시험물질인 *Lb. plantarum* AF1이 생성한 항진균 물질은 열과 peptidase, protease, pepsin, trypsin, α-amylase, lysozyme, lipase와 같은 효소에서 매우 안정한 물질이며, 곰팡이, 세균 및 효모를 포함하는 넓은 항균 활성을 가지고 있고, *Lb. plantarum* AF1이 생성한 항진균 물질은 2종류로 2,3-bis(2-methylpropyl)-1,4-piperazinedion와 delta-dodecalactone로 확인되었다(12). 본 연구결과 *Lb. plantarum* AF1이 생성한 항진균 물질은 저독성의 안전한 물질로 항균 및 정균제제를 포함하여 여러 식품에서 천연 식품보존제 또는 사료첨가제로 활용할 수 있는 후보물질임을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 김치산막효모억제 유산균인 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 SD 계통의 흰쥐에게 4주간 반복 경구투여를 통하여 장기투여에 의한 안전성을 확인하였다. 암·수 흰쥐에 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 4주간 반복 경구투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 수분섭취량, 부검소견, 장기무게 변화, 혈액학적, 혈액생화학적 및 병리조직학적 검사를 실시하였다. 모든 시험군에서 전 시험기간 시험물질로 인한 임상증상 및 사망동물이 관찰되지 않았다. *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물의 경구투여 결과 체중이 4주간 지속적으로 증가되었지만 대조군과 유의성 있는 변화가 없었다. 또한 장기의 육안적 관찰, 장기 중량변화, 혈액학적, 혈액생화학적 및 병리조직학적

검사에서도 모든 시험물질 투여군이 대조군과 유의성이 있는 차이를 보이지 않았으며, 모두 정상 범위의 수치로 시험물질에 기인하는 이상 소견을 발견할 수 없었다. 이상의 결과 4주 반복투여 독성시험 결과 *Lb. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물은 저독성의 안전한 물질로 판정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. Stiles ME (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leewenhoek, 70, 331-345
2. Messens W, de Vuyst L (2002) Inhibitory substances produced by *Lactobacillus* isolated sourdoughs - a review. Int J Food Microbiol, 72, 31-43
3. Klaenhammer TR (1988) Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochim, 70, 337-349
4. Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbiol Rev, 59, 171-200
5. Riley MA, Wertz J (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. Ann Rev Microbiol, 56, 117-137
6. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 40, 722-756
7. Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LH, Prevost H (2006) The continuing story of class Ⅱ a bacteriocins. Microbiol Mol Biol Rev, 70, 564-582
8. 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 form kimchi. Korean J Food Sci Ani Resour, 30, 328-335
9. Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang A, Kim DH, Bae IH, Ham JS (2010) A study on the yogurt manufacture suitability and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 isolated form kimchi. J Anim Sci Technol, 52, 141-148
10. Lim SM, Im DS (2007) Bacterial effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from dongchimi on *Escherichia coil* O157. J Fd Hyg Safety. 22, 151-158
11. Yang EJ, Chang HC (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. Korean J Microbiol Biotechnol, 36, 276-284
12. Yang EJ (2008) Application of kimchi lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis* for development of novel antibiotics and edible vaccine. PhD Thesis, Chosun University, Korea. p 67-69
13. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev, 16, 658-672
14. Ishibashi N, Yamazaki S (2001) Probiotics and safety. Am J Clin Nutr, 73, 465S-470S
15. Donohue DC, Deighton M, Ahokas JT, Salminen S (1993) Toxicity of lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright A. (Eds.) Lactic acid bacteria Marcell Dekker. NY, USA, p 307-313
16. Huang Y, Kotula L, Adams MC (2003) The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administrated novel probiotics, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male star rat model. Food Chem Toxicol, 41, 1781-1787
17. 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
18. 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
19. 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
20. Korea Food and Drug Administration (2005) Toxicity test guidelines for safety evaluation of drugs. Notification. p 60
21. Korea Food and Drug Administration (2005) Good laboratory practice regulation for nonclinical laboratory studies, Notification No. 2005-79. Toxicity test guidelines for safety evaluation of drugs. p 406-408
22. Organization for economic cooperation and Development (OECD) (2001) OECD Guideline for the testing of chemicals, acute oral toxicity; Up-down-Procedure (UDP). p 425
23. 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
24. 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

25. Cha SD, Yu JJW, 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
26. 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
27. Hayes AW (1984) Hayes toxicology. Raven press, NY, USA. p 17-19
28. De Vuyst L, Vandamme EJ (1994) Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and application. p 152-221. In De Vuyst L, Vandamme EJ. (Eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, UK
29. Lorke DA (1983) New approach to practical toxicity testing. Arch Toxicol, 54, 275-287
30. Iriwin S (1968) Comprehensive observational assessment: Ia. A systemic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. Psychopharmacol, 13, 222-257
31. 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 form kimchi. Korean J Food Sci Ani Resour, 30, 328-335
32. An IJ, Kwon JK, Lee JS, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim SK, Kim BS, Cho SD, Choi CS, Lee BH, Kang BK, Jung JY (2012) Evaluate a repeated oral dose toxicity and immunomodulating activity of *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* in sprague-dawely rats. J Fd Hyg Safety. 27, 96-102
33. 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
34. Plaa GL, Charbonneau M (1994) Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In principles and methods of toxicology. Hayes AW, ed. Raven Press, NY, USA, p 839-870
35. Lim SS, Kim MH, Lee JH (1997) Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Circium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. Korean J Nutr, 30, 797-80
36. Wolford ST, Schroer RA, Cohs FX (1986) Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. J Tox Env Health, 18, 161-188
37. Hata T, Tanka R, Ohmomo S (2010) Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. Int J Food Microbiol, 137, 94-99
38. Hurst A (1981) Nisin. Adv Appl Microbiol, 27, 85-123

(접수 2013년 3월 4일 수정 2013년 6월 4일 채택 2013년 6월 7일)