

ISSN 1229-8565 (print) ISSN 2287-5190 (on-line)
한국지역사회생활과학회지 26(4) : 633~645, 2015
Korean J Community Living Sci 26(4) : 633~645, 2015
<http://dx.doi.org/10.7856/kjcls.2015.26.4.633>

Lactobacillus plantarum AF1와 *Lactobacillus plantarum* HD1이 생성한 조항균 물질의 유전학적 독성평가

장 해 춘 · 고 상 범¹⁾ · 이 재 준[†]
조선대학교 식품영양학과
한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소¹⁾

A Genotoxicological Safety Evaluation of Crude Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus Plantarum* AF1 and *Lactobacillus Plantarum* HD1

Hae-Choon Chang, Sang-Bum Koh¹⁾, Jae-Joon Lee[†]
Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, Korea
Korea Testing & Research Institute, Health Care Research Laboratory, Hwasun, Korea¹⁾

ABSTRACT

This study investigates the genotoxicity of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 (*L. plantarum* AF1) and *Lactobacillus plantarum* HD1 (*L. plantarum* HD1) isolated from kimchi. The genetic toxicity of crude antifungal compounds was evaluated in bacterial reverse mutation in *Salmonella* and *Escherichia* spp., chromosome aberrations in Chinese hamster lung cells, and micronucleous formations in mice. In bacterial reversion assays with *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, and WP2uvrA, crude antifungal compounds did not increase the number of revertant colonies in both the absence and presence of the 59 metabolic activation system. In the chromosome aberration test with Chinese hamster lung cells, crude antifungal compounds showed no increase in the frequency of chromosome aberrations in the short-period test with/without the S9 mix or in the continuous test. In the in vivo mouse micronucleus assay, crude antifungal compounds showed no increase in the frequency of polychromatic erythrocytes with micronuclei. The results show that crude antifungal compounds produced by *L. plantarum* AF1 and *L. plantarum* HD1 did not induce any genotoxicity.

Key words: crude antifungal compounds, genotoxicity, reverse mutation, chromosomal aberration, micronucleus test

This research was supported by the High Value-Added Food Technology Development Program of the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs of South Korea.

접수일: 2015년 8월 14일 심사일: 2015년 10월 6일 게재확정일: 2015년 10월 6일

[†]Corresponding Author: Jae-Joon Lee Tel: +82-62-230-7725 E-mail: leejj80@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. 서론

유산균은 오래전부터 요구르트, 치즈, 버터, 발효 소시지 등의 축산가공품, 김치, 사우어크라우트 등의 채소발효식품 및 젓갈, 간장 등의 조미식품 등과 같은 발효식품의 생산과정에서 중요한 역할을 해 왔다. 유산균은 장수와 관련하여 정장효과가 우수한 것으로 알려져 왔으며, 장내 균총의 개선, 부패균에 의한 독성물질의 무독화 작용, 칼슘의 체내 흡수 촉진, 설사와 변비의 개선, 혈압강화, 항암효과, 콜레스테롤 저하효과, 면역기능 강화효과 등으로 이용되고 있다 (Baek 1993; Kato et al. 1994; Shida et al. 1998; Jung et al. 2000; An et al. 2013). 이러한 유산균의 효능이 입증되기 시작하면서 유산균이 probiotics로서 그 유효성이 중요시되어 건강기능성 유용미생물로 식품분야에서 다양하게 사용되고 있다. 유산균으로부터 생성되어진 새로운 기능성 물질인 γ -aminobutyric acid, exopolysaccharide, conjugated linoleic acid, bacteriocin, 항진균 물질 등이 분리되면서 그 이용 가치가 더욱 증가되고 있다(Kimmel et al. 1998; Yang 2008).

식품에 사용되는 인공 방부제나 식품첨가물에 대한 인체에 대한 안전성에 대한 염려가 커지기 시작하면서 이러한 문제를 해결하기 위한 새로운 식품 보존의 방법으로 천연물 유래 식품보존제에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다. 유산균은 발효과정 중 각종 발효산물을 생성하여 산미와 풍미를 제공해 줄뿐만 아니라 유기산을 비롯하여 H_2O_2 , CO_2 , diacetyl, bacteriocin, reuterin, fatty acids 등의 다양한 항균물질을 생산하여 식품 중의 부패 미생물과 병원성 미생물의 생육을 억제하여 식품의 보존성과 안전성을 유지한다(Stiles 1996; Klaenhammer 1988; Messens & De Vuyst 2002). 유산균을 이용한 항세균 및 항진균 효과에 관한 연구가 최근 다양하게 수행되고 있다 (Lim & Im 2007; Yang & Chang 2008; Lee et al. 2010a, 2010b; Gupta & Srivastava 2014; Ryu et al. 2014). 특히 미생물이 생산하는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 항균성 단백질로 알려진 bacteriocin은 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가

수분해효소에 의해 분해됨으로써, 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품 등의 천연 방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(Tagge et al. 1976). 또한 bacteriocin은 항균 범위가 매우 광범위하여 부패균, 식중독균, 전염병균이나 포자 형성균 등의 증식을 억제하거나 사멸시키는 효과가 있다(Drider et al. 2006). 김치 유산균 중 *Lactobacillus*속은 유기산과 단백질성 항균물질인 bacteriocin을 생성함으로써 유해 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다(Alander et al. 1999; Yang & Chang 2008; Seo et al. 2010; Ryu et al. 2014). *L. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질의 경우 현재 상용되고 있는 식품보존제와 항진균 활성을 비교 분석한 결과, sodium benzoate, potassium sorbate 또는 pimaricin과 비슷하거나 좀 더 강한 항균효과가 있는 것으로 나타났으며, 곰팡이, 세균 및 효모를 포함하는 넓은 항균 활성을 가지고 있다(Yang & Chang 2008). *L. plantarum* AF1이 생산한 조항진균 물질은 낮은 pH, 온도, peptidase, lysozyme, α -amylase, lipase와 같은 효소 등에도 비교적 안정한 것으로 나타났다. *L. plantarum* AF1은 마우스에서 단회투여 및 흰쥐에게 4주 반복 경구 투여한 독성연구 결과, 독성이 발생되지 않은 것으로 보고되었다(Lee et al. 2011; Lee et al. 2012). 또한 김치 유산균인 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질의 경우는 효모보다는 곰팡이에 더 강한 항균 활성이 나타났으며, 이를 식품에 적용하기 위하여 멸균과정 없이 제조한 막걸리에 식품보존제로 사용하였을 때 막걸리의 저장기간을 연장시키는 것으로 나타났다(Ryu et al. 2014).

유산균은 오랫동안 식품과 함께 사용되면서 안전성이 입증된 GRAS(generally recognized as safe) 미생물이라는 강점을 가지고 있다. 이들 유산균들이 생성한 기능성물질에 대한 안전성 검사는 매우 미비한 편이다. 유산균이 생산하는 bacteriocin을 식품첨가제 혹은 항생제 대체 사료첨가제로의 사용을 위해서는 안전성 평가에 관한 연구가 체계적으로 이루어져야 한다. 유전독성은 본래, 세포 또는 개체 수준에서 돌연변이를 유발하는 성질을 가리키나 현재는 DNA의 상해성을 나타내는 성질을 포함하는 광범위한 의

미로 이용되고 있다(Huang et al. 2014). Rim et al.(2009)에 의하면 유전독성시험은 시험물질의 유전독성 및 발암원성을 예측하는 실험방법이라고 하였다. 따라서 본 연구는 김치 유산균인 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생성한 조항균 물질의 부분 정제물이 생체 내 안전성 확보를 위한 기초자료로 유전독성에 대한 평가를 실시하였다. 유전독성시험은 식품의약품안전처고시(Ministry of Food and Drug Safety 2014) 및 OECD guideline(OECD 2001a, 2001b, 2001c)에 따라서 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL 세포를 이용한 염색체 이상시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험으로 진행하였으며, *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 각각 생성한 조항진균 물질의 부분 정제물이 다르고, 항균활성의 범위가 다르기 때문에 식품첨가물로 사용하였을 경우 같이 사용하면 항균효과가 좋을 것으로 사료되어 동량 섞어서 사용하였다.

II. 연구방법

1. 시험물질

시험 유산균주는 광주광역시와 전라남도 등지에서 수집한 잘 익은 배추김치에서 분리한 것으로 조선대학교 식품영양학과 식품미생물실험실에서 항진균 활성이 우수하다고 알려진 유산균주인 *L. plantarum* AF1(Yang 2008)와 *L. plantarum* HD1(Ryu et al. 2014)을 선별하였다. 김치로부터 분리한 유산균을 5 mL MRS(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 액체 배지에 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, 15분)하여 얻은 상정액을 0.45 µm membrane filter로 제균하여 각각의 배양상정액을 준비하였다.

2. 조항진균 물질의 정제

L. plantarum AF1과 *L. plantarum* HD1이 생성한

조항진균 물질 부분 정제물의 분리는 solid phase extraction(SPE) 정제과정을 통해 실시하였다(Yang 2008). 제균된 배양 상정액 2.5 L은 methanol과 10 mM sodium acetate 완충액을 흘려 equilibration 상태인 SPE column(Isolute, C18 EC, 10 g, Unternational Sorbent Technology Ltd, Hengoed, UK)에 통과시킨 후, 5% aqueous acetonitrile(HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)로 칼럼을 세척하고 95% aqueous acetonitrile로 3 mL 씩 수집하였다. 용출된 시료는 Speed vac concentrator(CentraVac VS-802, Vision Co., Speed, Seoul, Korea)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 시료로 사용하였다.

3. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

세균을 이용한 복귀돌연변이시험은 식품의약품안전처 독성시험기준을 준하여 실시하였다(Ministry of Food and Drug Safety 2014). 시험물질의 복귀돌연변이원성 유무는 histidine 요구성 균주와 *Salmonella* 와 tryptophan 요구성 균주인 대장균을 직접법과 대사활성화법을 이용하여 검색하였다. 시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA의 5균주를 이용하였다. 이들 균주의 유전적 특성은 histidine 요구성, tryptophan 요구성, 자외선 감수성, crystal violet 감수성, ampicillin 내성 등을 확인하였다. 시험물질은 시험당일 멸균 증류수로 농도별로 희석하여 사용하였으며, 각각의 균주에 대한 음성대조물질은 멸균증류수를 사용하였고, 양성대조물질로는 2-aminoanthracene(2-AA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2), 9-aminocridine(9-AA), sodium azide(NaN_3)를 DMSO에 용해하여 사용하였다. 본 시험은 비교적 유전독성에 대한 민감도가 높은 pre-incubation 방법으로 복귀돌연변이시험을 실시하였다(Ames et al. 1975; Maron & Ames 1983). 시험물질의 농도 설정을 위한 예비실험을 실시하여 5000 µg/plate를 최고 농도로 하고 공비 2로 5단계의 농도로 각각의 균주에 처리하였으며, 직접법과 S-9혼합액을 이용한 대사활성법을 수행하였는데, 5000 µ

g/plate 농도까지 시험물질에 의한 세포독성이 보이지 않았다. 본 시험에서도 동일한 농도(312.5, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$)를 사용하여 5군주 모두 실시하였으며, 균의 생육저해가 나타나지 않은 농도를 최고 농도로 설정하였다. 각각의 군주를 nutrient broth(Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO USA)에 접종하여 37°C에서 12시간 진탕배양한 후, 배양액 (1.0×10^7 cell/mL) 0.1 mL, 각 농도 단계별 시험물질 용액, 음성대조물질 혹은 양성대조물질 0.1 mL, 0.1M sodium-phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL를 첨가하여 37°C에 20분간 pre-incubation을 실시하였다. 이때 대사활성계 미적용(직접법, S9-)의 경우 S-9 혼합액 대신 sodium-phosphate buffer를 넣어주고, 대사활성계 적용(S9+)의 경우는 S-9 혼합액 0.5 mL를 넣었다. Pre-incubation한 후 top agar를 2 mL 넣어 혼합하고, Vogel Bonner minimal glucose agar plate에 증충하여 37°C에 48시간 배양한 다음 복귀돌연변이 콜로니 집락수를 계측하였다. 배양 후 육안과 현미경으로 시험물질의 침전 및 분출, 균의 생육저해를 관찰하였으며, 각 농도 당 3 plate를 사용하여 복귀돌연변이 콜로니 수의 평균치를 산출하였다.

4. 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

염색체 이상시험은 Chinese hamster 유래 폐섬유아세포를 이용하여 Ishidate et al.(1981)와 Dean & Danford(1984)의 방법에 준하여 실시하였다. 본 시험에 사용한 Chinese hamster lung(CHL) fibroblast 세포주는 ATCC에서 구입하였으며, 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 배양하였다. 사용배지는 10% heat-activated fetal bovine serum 및 1% penicillin과 streptomycin을 포함한 Eagles MEM 배지에서 단층 배양하였다. 배양된 세포는 2-3일 마다 0.5% trypsin-EDTA를 이용하여 계대 배양하였으며, 이들 세포의 chromosome 개수는 25개이며, 세포주기는 14.9시간이었다. 시험물질의 염색체 이상 여부를 확인하기 위하여 최고 농도로부터 공비 2로 3단계로 설정하였으며, 3일간 4×10^3 세포를 5 mL 배양액으로 배양한 CHL 세포에 시험물질 및 양성대조물질을 각각 농도별로 처리하였다. S-9 혼합액이 존재하는 대사활성화법의 경우는

6시간, 활성대사 효소계 미적용 시험구는 두개의 군으로 나누어 시험물질 처리시간을 6시간(단시간 처리법) 및 24시간(연속 처리법) 동안 실시하였으며, 6시간 시험물질을 적용하는 경우는 처리 종료 후, 처리액을 제거하고 새로운 배양액으로 교환하여 18시간 추가 배양을 실시하였다. 분열중기세포를 추적하기 위하여 모든 plate에 대해 처리 종료 2시간 전에 colomid를 최종 농도 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 처리하고, 시험물질 처리 개시 후 24시간에 0.25% Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 박리하였다. 수거한 분열중기세포는 0.075 M KCl용액 4 mL에 넣고 37°C 수욕상에서 15분간 저장 처리한 후 냉각한 고정액(메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)에 고정시킨 다음 염색체 표본을 제작하고, 5%(v/v) Gimasa액으로 염색하여 생세포 계수기(BECKMAN COULTER, Indianapolis, IN, USA)로 세포를 계수하였다. 각 농도군당 100개 이상(용량 당 200개)의 중기상으로 결과를 해석하였으며, 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 나누어 판정하였다. 염색체 이상여부의 판정은 gap을 제외한 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만일 때 음성, 5% 이상 10% 미만일 때는 의 양성, 10% 이상일 때는 양성으로 최종 판정하였다(Ishidate & Odashima 1977).

5. ICR 마우스에 대한 소핵시험

7주령된 수컷 Imprinting control region(ICR) 계통의 특정 병원균 부재(SPF) 마우스 30마리를 (주)오리엔트바이오(Gapyeong, Korea) 구입하여, 1주일간의 순화기간을 거친 후 일반 증상과 체중을 측정하였다. 실험동물은 polycarbonate cage에 넣은 다음 SPF구역에서 사육하면서 자외선 멸균된 정제수와 실험동물용 사료를 자유 급여시켰다. 본 시험에서 투여 용량은 예비시험으로부터 경구 투여가 가능한 최고 농도 2000 mg/kg B.W.로부터 공비 2로 3단계 농도를 설정하였고, 시험당일 멸균된 3차 증류수에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질은 cyclophosphamide monohydrate 70 mg/kg B.W., 음성대조물질은 3차 증류수를 사용하였다. 시험 최고 농도는 2000 mg/kg 이었으며, 검체 균질액을 24시간 간격으로 2회 투여

하였다. 마지막 투여 후 24시간이 경과한 후 Hayashi (1991)의 방법에 준하여 40 µg/mL acridine orange 용액을 slide glass에 도포하여 공기 중에 건조시킨 다음, 마우스의 골수로부터 채취한 혈액 5 µL를 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. 세포를 고정시킨 후 형광현미경 하에서 마우스 1마리당 2,000 개의 망상적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰하여 그중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)를 측정하여 소핵생성 빈도를 계산하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 19.0 P/C package 를 이용하여 통계처리를 실시하였으며, 그 결과 $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 염색체이상시험과 소핵시험은 Scheffe 다중검정과 Dunnett's T3를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

본 시험에서 돌연변이 유발성을 시험하기 위해 김치유산균 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 동량으로 섞어 시험물질로 사용하여 *Salmonella typhimurium*의 histidine 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *Escherichia coli*의 tryptophan 요구성 균주인 WP2uvrA에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사하였다. 본 시험에서 적용 농도의 결정을 위하여 5000 µg/plate를 최고 농도로 하여 공비 2의 5단계 농도로 예비실험을 실시하였다. 예비실험 용량설정 시험 결과, 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았다. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니 수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 침전도 확인되지 않았다.

농도결정시험 결과를 바탕으로 한 본시험 결과는 Table 1에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았다. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 침전도 확인되지 않았다. 시험물질 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 무균 시험 결과도 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았다.

음성대조군의 복귀변이 집락수는 각 시험에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA 균주의 복귀변이 집락수의 범위 내에서 관찰되었다. Maron & Ames(1983)에 의하면 음성대조군의 집락은 자연 복귀돌연변이에 의해 형성되는 것이라 하였다. 또한 일반적으로 돌연변이성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 이상인 경우를 양성으로 하는 것으로 제시하는데(Ames et al. 1975; Maron & Ames 1983), 본 연구에서 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수가 현저하게 증가하여 나타났으므로 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인 할 수 있었다.

2. 포유류배양세포를 이용한 염색체 이상시험

김치유산균 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물을 각각 동량 섞은 시료로 Chinese hamster 유래의 lung cell (CHL)을 이용하여 직접법(S9-)과 대사활성법(S9+)의 염색체 이상시험을 실시하였다. 본 시험에 앞서 먼저 농도 결정시험 결과, 시험물질 처리 시 모든 용량에서 침전이 확인되지 않았다. S9 mix 미적용(이하, S9-mix으로 칭함), S9 mix 적용(이하, S9+ mix으로 칭함) 및 연속처리법 24시간 처리(이하, 24 시간 처리로 칭함)에서 각각 156, 313, 625, 1250, 2500 및 5000 µg/mL를 설정하여 실시한 시험결과 50 % 이상의 세포 증식 억제능이 관찰되지 않았다. 즉 MTT 분석에 의하여 1차 농도 설정 시험을 통해 50% 세포증식 억제능을 나타내는 농도를 산출하고자 하였으나, 모든 처리 조건에서 시험물질에 의한 세포증식 억제가 확인되지

Table 1. Bacterial reverse-mutation test of antifungal compounds

Tester strain	Test substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Mean \pm S.D.)[Factor]a	
			Without the S9 mix	With the S9 mix
TA98	Test solution	0	19 \pm 1	25 \pm 1
		312.5	20 \pm 1[1.0]	24 \pm 2[0.9]
		625	18 \pm 1[0.9]	25 \pm 2[1.0]
		1250	16 \pm 1[0.9]	26 \pm 1[1.1]
		2500	16 \pm 2[0.9]	25 \pm 3[1.0]
		5000	18 \pm 1[0.9]	23 \pm 1[0.9]
TA100	Test solution	0	100 \pm 1	115 \pm 3
		312.5	100 \pm 2[1.0]	115 \pm 2[1.0]
		625	102 \pm 2[1.0]	115 \pm 1[1.0]
		1250	101 \pm 2[1.0]	113 \pm 2[1.0]
		2500	104 \pm 4[1.0]	110 \pm 3[1.0]
		5000	102 \pm 3[1.0]	107 \pm 5[0.9]
TA1535	Test solution	0	9 \pm 1	10 \pm 3
		312.5	8 \pm 1[0.9]	11 \pm 1[1.1]
		625	8 \pm 1[0.9]	11 \pm 1[1.1]
		1250	7 \pm 1[0.7]	12 \pm 2[1.2]
		2500	8 \pm 1[0.9]	9 \pm 1[0.9]
		5000	8 \pm 1[0.9]	8 \pm 1[0.8]
TA1537	Test solution	0	9 \pm 1	9 \pm 1
		312.5	8 \pm 1[0.9]	8 \pm 1[0.8]
		625	8 \pm 2[0.9]	9 \pm 1[1.0]
		1250	10 \pm 1[1.1]	10 \pm 1[1.1]
		2500	9 \pm 2[1.0]	9 \pm 1[1.0]
		5000	10 \pm 2[1.1]	11 \pm 1[1.1]
WP2uvrA	Test solution	0	44 \pm 4	57 \pm 2
		312.5	44 \pm 3[1.0]	58 \pm 1[1.0]
		625	43 \pm 2[1.0]	53 \pm 2[0.9]
		1250	44 \pm 2[1.0]	55 \pm 3[1.0]
		2500	43 \pm 1[1.0]	58 \pm 1[1.0]
		5000	45 \pm 2[1.0]	57 \pm 1[1.0]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	326 \pm 34[17.2]	
TA100	AF-2	0.01	417 \pm 7[4.2]	
TA1535	NaN3	0.5	325 \pm 11[36.1]	
TA1537	9-AA	40.0	255 \pm 12[28.4]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	240 \pm 24[5.4]	
TA98	2-AA	0.5		175 \pm 9 [7.0]
TA100	2-AA	1.0		427 \pm 23 [3.7]
TA1535	2-AA	2.0		143 \pm 20 [13.8]
TA1537	2-AA	2.0		130 \pm 8 [14.0]
WP2uvrA	2-AA	10.0		304 \pm 8.5[5.4]

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2-AA: 2-Aminoanthracene, 9-AA: 9-Aminocridine, NaN3: Sodiumazide. All value are expressed as mean \pm S.D.

않았기에 IC₅₀은 산출하지 않았다.

단시간처리법(6기간)에 의한 염색체이상시험 결과는 Table 2와 3에서와 같이 시험물질 처리 시 모든 용량에서 침전이 확인되지 않았다. 대사활성계 미적용(S9-, Table 2) 및 대사활성계 적용(S9+, Table 3)의 모든 처리 조건에서 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/mL 처리군 모두 0-1 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비하여 통계적인 유의차를 나타내지 않았다. 음성대조군과 시험물질 처리군 모두 polyploid의 빈도는 0.0이고, 핵내배화도 관찰되지 않았다. 그러나 양성대조군에서는 이상중기상의 빈도에서 통계적 유의한 증가가 관찰되었다. 표본관찰 결과, S9- mix의 경우는 1250, 2500 및 5000 µg/mL 에 있어서의 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.5, 0.0 및 0.5%, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 그리고 S9+ mix의 경우는 1250, 2500 및 5000 µg/mL에 있어서의 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 0.5, 0.5 및 0.5%, 수적이상세포의 출현 빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.5%로 관찰되었다. 각 처리조건의 음성대조군 경우 구조이상세포 및 수적 이상세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10% 이상이었다.

연속처리법(24시간)에 의한 염색체이상시험 결과는 Table 4에서와 같이 시험물질 처리 시 모든 용량에서 침전이 확인되지 않았다. 단시간처리법과 마찬가지로 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/mL 처리군 모두 0-1 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비하여 통계적인 유의차를 나타내지 않았다. 음성대조군과 시험물질 처리군 모두 polyploid의 빈도는 0.0이고, 핵내배화도 관찰되지 않았다. 그러나 양성대조군에서는 이상중기상의 빈도에서 통계적 유의한 증가가 관찰되었다. 표본관찰 결과, 시험물질 1250, 2500 및 5000 µg/mL에 있어서의 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.5% 이었고 염색체 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0%이었다. 음성대조군

의 경우 구조 이상세포 및 수적 이상세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상이었다.

염색체 이상시험은 포유동물 배양세포에서의 염색체 이상 검출을 목적으로 하는 시험으로서, 시험물질 처리 후 최초의 유사분열 시에 세포를 분석하여 독성 유무를 평가하는 방법이다(Song et al. 2009). 이 실험 방법은 복귀돌연변이시험에서 검출하기 어려운 물질도 양성으로 나타나므로 복귀돌연변이시험의 보충시험 방법으로 많이 사용되고 있다(Dean & Danford 1984). 이상의 결과 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질부분 정제물은 대사활성 부재 및 대사활성 도입계 모두에서 유의할 만한 염색체이상을 나타내지 않은 것으로 보아 염색체이상 유발성이 없는 것으로 판단되어 진다.

3. ICR 마우스에 대한 소핵시험

소핵시험은 수컷 마우스를 이용하여 임상 적용 예상 경로인 단회 경구투여를 결정하였고, 음성대조군으로는 멸균 증류수를 경구투여, 양성대조군으로는 CPA를 복강 내 투여를 결정하였다. 김치유산균 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질 부분 정제물의 *in vivo* 유전독성학적 평가를 하고자 약 7주령의 수컷 마우스를 이용하여 소핵시험을 실시하였으며 그 결과는 Table 5와 같다. 투여 용량 결정을 위한 예비시험에서 독성의 징후가 관찰되지 않아 시험 최고 용량인 2000 mg/kg로 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생성한 조항진균 물질 부분 정제물을 동량 혼합하여 단회 경구투여하고, 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수거하여 소핵유발을 평가하였다. 모든 시험군에서 부검 당일 까지 사망동물은 없었으며, 부검 시 체중은 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질부분 정제물 투여군 모두 평균 체중이 34-35 g 정도를 유지하였으며 음성대조군에 비하여 통계적 유의성이 없었다.

Table 2. Chromosomal aberration test in the absence of the S9 mix (short-term treatment test)

Treatment· recovery period (h)	S-9 mix	Concentration (μ g/mL)	Number of cells showing structural chromosome (frequency, %)					Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (frequency, %)								
			ctb	cte	csb	cse	other		Total (%)	Number of observations	Polyploids	Endo	Total (%)				
6-18	-	Negative control (SDW)	100	0	1	0	0	0	0	1	0	95.0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	105.0	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	0	1	0	0	100.0	200	0	0	0
6-18	-	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	88.9	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	102.5	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	0	1	0	0	95.7	200	0	0	0
6-18	-	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	118.9	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	99.9	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	2	109.4	200	0	0	0
6-18	-	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	97.1	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	1	1	0	99.0	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	0	1	3	0	98.1	200	0	0	0
6-18	-	Positive control (MMC0.1)	100	3	31	1	1	3	28*	2	0	100	0	0	1	1	
			100	2	29	0	1	2	25*	2	0	100	0	0	0	0	
			200	5	60	1	2	5	53*	4	0	200	0	0	1	1	
			(2.5)	(30.0)	(0.5)	(1.0)	(2.5)	(26.5)					(0.0)	(0.5)	(0.5)		

SDW: sterile distilled water, MMC: mitomycin C, ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromosome-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication
 *Significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

Table 3. Chromosomal aberration test in the presence of the S9 mix (short-term treatment test)

Treatment recovery period (h)	S-9 mix	Concentration (μ g/mL)	Number of cells showing structural chromosome (frequency, %)										Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (frequency, %)				
			ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)	g	Number of observations	Polyploids	Endo		Total (%)				
6-18	+	Negative control (SDW)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	116.2	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83.8	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	200	0	0	0
6-18	+	1250	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	99.3	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	125.2	100	0	0	0	
			200	1	0	0	0	0	1	1	1	103.0	200	0	0	0		
6-18	+	2500	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	95.9	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	104.1	100	0	0	0		
			200	0	1	0	0	0	1	1	1	91.8	200	0	0	0		
6-18	+	5000	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	101.0	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	116.4	100	1	0	1		
			200	0	1	0	0	0	1	1	1	99.7	200	1	0	1		
6-18	+	Positive control (CPA5)	100	2	39	1	2	4	32*	1	1	100	0	1	1			
			100	2	29	2	1	2	25*	1	1	100	0	1	1			
			200	4	68	3	3	6	57*	2	2	200	0	2	2			
			(2.0)	(34.0)	(1.5)	(1.5)	(3.0)	(28.5)	(0.5)	(0.5)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(1.0)	(1.0)		

SDW: sterile distilled water, CPA : cyclophosphamide, ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromosome-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication.

*Significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

Table 4. Chromosomal aberration test in the absence of the S9 mix (continuous-treatment test)

Treatment: recovery period (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells showing structural chromosome (frequency, %)						Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (frequency, %)					
			ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)		Number of observations	Polyploids	Endo	Total (%)		
24-0	-	Negative control (SDW)	100	0	0	0	0	0	0	1	98.9	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	101.1	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	100.0	200	0	0	0
24-0	-	1250	100	0	0	0	0	0	0	95.6	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	96.6	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	96.1	200	0	0	0
24-0	-	2500	100	0	0	0	0	0	0	95.5	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	97.0	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	96.2	200	0	0	0
24-0	-	5000	100	0	0	0	0	0	0	95.3	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	93.0	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	94.1	200	0	0	0
24-0	-	Positive control (MMC0.05)	100	2	36	0	1	3	31*	0	/	100	0	0	0
			100	3	29	0	0	2	26*	0	/	100	0	0	0
			200	5	65	0	1	5	57*	0	/	200	0	0	0

SDW: sterile distilled water, MMC: mitomycin C, ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromosome-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication
 *Significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

본 시험에서 적용한 용량 범위 내에서 부검 후 개체 당 2000개 이상의 다염성 적혈구를 관찰한 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $0.06 \pm 0.02\%$ 이었으며, 500 mg/kg B.W. 투여군의 소핵 출현빈도는 $0.06 \pm 0.07\%$, 1000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 $0.10 \pm 0.06\%$, 2000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 $0.08 \pm 0.04\%$, 양성대조군의 빈도는 $3.98 \pm 0.48\%$ 를 나타내었다. 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군에 비해 증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 차이도 나타나지 않았다. 한편 양성대조군의 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다. 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 $60.07 \pm 2.54\%$, $58.32 \pm 3.14\%$, $58.52 \pm 1.75\%$, $58.98 \pm 4.77\%$ 및 $41.58 \pm 1.68\%$ 이었으며 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 한편 양성대조군의 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다. 따라서 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD10이 생산한 조항진균 물질부분 정제물은 본 시험 조건하에서는 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

이상과 같이 생체 내 유전독성시험으로는 마우스를 이용한 소핵시험(micronucleus test)이 제시되고 있는데(Hayashi et al. 1989), 본 시험법은 공수세포의 염색체이상을 관찰하는 대신 공수에서 생산되는

적혈구 중에 출현되는 소핵을 관찰하는 방법으로 유전독성의 좋은 지표이며, 돌연변이성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법이라고 하였다(Huang et al. 2014). Internationally Chemical Harmonization(2012)에서는 새로운 유전독성 평가기준을 확립하였는데 유전독성 시험과 데이터 해석을 위한 지침(S2R1)을 통해 Battery system을 도입하였다. 이 지침에 따르면 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험과 함께 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 또는 소핵시험 또는 마우스립포마 분석 중 한 시험을 수행하여 두 결과가 모두 음성으로 나오면 유전독성이 없다고 최종 판정하도록 하였다. 따라서 본 연구에서도 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD10이 생성한 조항균 물질 부분 정제물은 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험 결과 모든 시험군에서 음성을 나타냈으므로 최종적으로 유전독성이 없는 것으로 판정되었다.

이상의 결과는 식품의약품안전처에서는 식품원료 사용가능 여부를 판단하기위한 자료 제출요구시 안전성을 입증할 수 있는 독성시험자료를 제출하도록 되어 있어 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD10이 생성한 조항진균 물질의 독성여부 중 유전독성에 대한 안전성을 입증하는 기초자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD10

Table 5. Frequency micronuclei from the marrow in ICR mice treated with antifungal compounds

Sex	Test compound	Dose (mg/kg)	No. of mice tested	MNPCE ¹⁾ /2000PCEs ¹⁾ (Mean ± S.D.,%)	PCE/(PCE+NCE ¹⁾) (Mean ± S.D.,%) ¹⁾
	Negative control (SDW) ²⁾	0	5	0.06 ± 0.02	60.07 ± 2.54
Male	Test substance	500	5	0.06 ± 0.07	58.32 ± 3.14
	Test substance	1000	5	0.10 ± 0.06	58.52 ± 1.75
	Test substance	2000	5	0.08 ± 0.04	58.98 ± 4.77
	Positive control (CPA) ³⁾	70	5	3.98 ± 0.48*	41.58 ± 1.68*

이 생성한 조항균 물질의 부분 정제물의 안전성을 검토하고자 유전독성검사를 실시하였다. 복귀돌연변이 시험결과, 용량설정 예비시험 및 본시험을 5000 μ g/plate를 최고 용량으로 실시한 결과, S9 mix의 유무에 관계없이 모든 시험군주에 대하여 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 증가는 나타나지 않았으며, 용량설정 예비시험과 본시험으로 재현성이 확인되었다. 본 시험의 음성 및 양성 대조치는 시험 시설의 적정 범위 내에 있었으며, 양성대조물질에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니수는 대사활성계 미작용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 시험 군주에 대해서 현격히 증가되는 양성 결과를 보였다. 시험물질의 염색체이상 유발성을 검토하기 위해, 포유류 배양세포를 사용하는 염색체이상시험을 실시한 결과, 대사활성화의 유무에 관계없이, 염색체 구조이상 세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 단시간처리법, 연속처리법 및 확인시험에서 5% 미만이었다. 수컷 마우스를 이용하여 설치류 조혈세포에 대한 조항균 물질 부분 정제물의 소핵 유발성의 유무를 검토한 결과 사망동물이 확인되지 않았으므로, 음성대조군, 시험물질투여군(500, 1000, 2000 mg /kg/B.W. 군) 및 양성대조군의 동물에 대하여 소핵을 가지는 다염성 적혈구의 출현 빈도를 계수하였는데, 시험결과, 시험물질 투여군에서 음성대조군과 비교하여 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가는 볼 수 없었으며, 통계학적인 유의성도 나타나지 않았다. 음성대조군의 MNPCE 출현빈도 및 PCE의 비율 평균치는 historical background data의 범위 내였으며, 양성대조군에서는 통계학적인 유의성이 나타났다. 이상의 결과로부터 시험물질 부분 정제한 유산균의 조항균 물질 부분 정제물은 본 시험 조건에서 복귀돌연변이, CHL/IU세포에 대하여 염색체 이상 및 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단되어진다.

References

- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vipponen-Salmela 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(1), 351-354
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E(1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian - microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31(6), 347-364
- An SJ, Kim JY, Choi IS, Cho KK(2013) Insights into the roles of prebiotics and probiotics in the large intestine. *J Life Sci* 23(10), 1295-1303
- Baek YJ(1993) Lactic acid bacteria and human health. *Korean J Food Nutr* 6(1), 53-65
- Dean BJ, Danford N(1984) Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *Mutagenicity testing - a practical approach*, Venitt S & Parry JM(Editors), IRL Press Limited, Eynsham, England, pp187-232
- Drider D, Firmland G, Hechard Y, McMullen LH, Prevost H(2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2), 564-582
- Gupta R, Srivastava S(2014) Antifungal effect of antimicrobial peptide(AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol* 42(1) 1-7
- Hayashi M(1991) The micronucleus test. Science Press Inc., Tokyo, Japan, pp 65-69
- Hayashi M, Yoshimura I, Sofuni T, Ishidate M Jr(1989) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ Mol Mutagen* 13(4), 347-356
- Huang YH, Jung DW, Kang IJ(2014) Genotoxicity safety evaluation of imported oranges irradiated with ionizing energy. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(6), 909-915
- Internationally Chemical Harmonization(2012) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. International Conference on Harmonization, USA
- Ishidate M Jr, Odashima S(1977) Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro-A screening for chemicals carcinogen. *Mutat Res* 48(3-4), 337-354
- Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K(1981) Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monogr Cancer Res* 27(1), 95-107
- Jung HK, Kim ER, Yae HS, Choi SJ, Jung YJ, Juhn SL(2000) Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Ind Nutr* 5(2), 29-35
- Kato I, Endo K, Yokokura T(1994) Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *Int J*

- Immunopharmacol 16(1), 29-36
- Kimmel SA, Roberts RF, Zieger GR(1998) Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. Appl Environ Microbiol 64(2), 659-664
- Klaenhammer TR (1988) Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochim 70(3), 337-349
- 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(2), 315-321
- Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY(2011) Repeated-dose oral toxicity of *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi in rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 41(5), 612-620
- Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, Bae IH, Ham JS (2010a) 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(2), 328-335
- Lee SG, Lee YJ, Kim MK, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang A, Kim DH, Bae IH, Ham JS(2010b) A study on the yogurt manufacture suitability and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 isolated from kimchi. J Anim Sci Technol 52(2), 141-148
- Lim SM, Im DS(2007) Bacterial effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from dongchimi on *Escherichia coli* O157. J Food Hyg Saf 22(3), 151-158
- Maron, DM, Ames BN(1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 113(3-4), 173-215
- Messens W, De Vuyst L(2002) Inhibitory substances produced by *Lactobacillus* isolated sourdoughs - a review. Int J Food Microbiol 72(1-2), 31-43
- Ministry of Food and Drug Safety(2014) Guideline for toxicity tests of drugs and related materials notification. Chungbuk, MFDS
- OECD(2001a) OECD guideline testing of chemicals No. 471 Bacterial reverse mutation test.
- OECD(2001b) OECD guideline testing of chemicals No. 473 in vitro mammalian chromosome aberration test.
- OECD(2001c) OECD guideline testing of chemicals No. 474 mammalian erythrocyte micronucleus test.
- Rim KT, Kim SJ, Kim JG, Kim HY, Yang JS(2009) Bacterial reversion mutation (AMES) test of aluminium oxide, calcium oxide, and sodium tetraborate. J Korean Soc Environ Anal 12(3), 196-203
- Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, Chang HC(2014) Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. Food Microbiol 41(1), 19-26
- Seo J, Lee GS, Kim JE, Chung MJ(2010) Development of probiotic products and challengers. KSBB J 25(4), 303-310
- 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 culture. Int Arch Allergy Immunol 115(4), 278-287
- Song HP, Shin EH, Yun H, Cho C, Kim D(2009) Establishing the genotoxicological safety of gamma-irradiated egg white and yolk. Korean J Food Preserv 16(5), 782-788
- Stiles ME(1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70(2-4), 331-345
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW(1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev 40(3), 722-756
- 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
- Yang EJ, Chang HC(2008) Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. Korea J Microbiol Biotechnol 36(4), 276-284