

Lactobacillus spp.와 *Bifidobacterium* spp.에 의한 돌연변이원물질 2-Nitrofluorene에 대한 돌연변이 억제특성

윤영호·조종근
중앙대학교 축산학과

Antimutagenic Characteristics of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. against 2-Nitrofluorene

Y. H. Yoon and J. K. Cho

Department of Animal Science, Chung-Ang University

ABSTRACT

Studies on the antimutagenicity of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. against 2-nitrofluorene have been conducted utilizing *Salmonella typhimurium* TA 98 in order to characterize the activity by the starter and non-starter strains. The average antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. against 2-nitrofluorene was 20.29% and *L. plantarum* CU 722 revealed the greatest mutation inhibition activity of 50.34%. An intensive antimutagenicity was found in the cell wall and cytoplasm fraction of *L. plantarum* CU 722 in skim milk culture showing inhibition rate of 34.9% and 24.5% respectively and very low activity remained in cell free broth and in lactic acid. The optimum cultivation time for *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. to inhibit mutation was 24 hours and the optimum preincubation time of the reaction mixture containing the mutagen, lactic culture and indicator strain was 60 minutes, and the optimum incubation time for the test plates was 48 hours.

(Key words: antimutagenicity, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*)

I. 서론

젖산균 발효는 인류가 사용한 가장 오래된 식품의 가공 및 보존방법 중의 하나이며 젖산균과 발효유제품은 인간의 건강유지와 영양소 흡수 면에서 그 중요성이 인정되고 있다(Shahani와 Ay-

ebo, 1980). *Lactobacillus*속과 *Bifidobacterium*속의 여러 균주는 산업적 활용도가 높아 각종 발효유제품 제조에 광범위하게 사용되며 발효유에 사용되는 젖산균들은 기질 중에 존재하는 유당이나 기타 당류를 분해하여 젖산과 유기산을 생성하여 제품에 적합한 기호성을 부여함은 물론 pH를 저하하고 여러 종류의 미생물 억제물질을 생산하여

병원성 세균과 변패미생물 억제효과를 나타내는 것으로 보고된바 있다(Kurmann, 1988).

발효유제품이 나타내는 활성 중에는 항돌연변이원성을 갖는다는 연구자들의 보고가 있었고 (Reddy 등, 1983; Gilliland, 1990; Reddy 등, 1992; Shahani, 1980), 또한 종양과 연관되는 질병 발생에는 특별한 유전자의 돌연변이와 세포분열 단계들이 관여되는 것으로 알려졌다(Feron과 Vogelstein, 1990). 따라서 항암제는 유전자의 돌연변이나 세포증식을 강력하게 억제하는 활성을 가지며 젖산균의 유전자 변이 억제와 세포 증식 억제 활성 평가에 주목되고 있다. 항돌연변이원성을 측정하는데 가장 널리 이용되는 기법은 *Salmonella typhimurium* 이나 *Escherichia coli* 균주를 이용한 미생물 돌연변이 분석법이며 (Ames 등, 1975; Hosono 등, 1986a) 젖산균은 화학적 돌연변이원성 물질로 처리한 후 나타나는 돌연변이 세균의 생성을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Hosono 등, 1986a; Renner와 Munzner, 1991; Bodana와 Rao, 1990). Hosono 등 (1986b)은 발효유가 화학적 발암물질, 즉 돌연변이원성 물질과 결합하는 작용이 있음을 보고하였고 발효유가 화학적 돌연변이 유발물질인 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO)에 대해 항돌연변이원성이 있음을 밝혔다.

본 연구에서는 2-Nitrofluorene의 변이원활성이 *Lactobacillus* spp. 와 *Bifidobacterium* spp. 균주에 의하여 나타나는 항돌연변이원성에 미치는 균주의 배양시간, preincubation 시간, 혼합액의 보존시간의 영향과 세포 분획별 활성 강도를 구명하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양조건

본 연구는 kefir와 yoghurt에서 분리된 *Lactobacillus* spp. 40균주와 본 연구실에서 보관 중인 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp. 17균주 중 57균주를 사용하였다. 분리균주의 분리원을

국가별로 보면 Switzerland의 kefir와 yoghurt에서 분리된 2균주, Greece에서 4균주, Hungary에서 1균주, Austria 3균주, France 1균주, Netherland 5균주, Finland 5균주, Sweden 3균주, Norway 3균주, Denmark 3균주, Spain 3균주, Germany 4균주, England 3균주 등이며 분리기간은 1996년 7월초로부터 1997년 8월말 기간 중에 분리되었다.

균주의 배양은 MRS broth(Difco)로 37℃에서 하였고 배양액을 10%(w/v) 탈지유에 0.2%(v/v) 접종하여 37℃에서 약 24시간 배양한 후 curd가 형성된 것을 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

본 연구에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA 98은 농촌진흥청 농약연구소로부터 분양받았으며 균주의 배양은 Nutrient broth(Difco)에 NaCl을 첨가하여 37℃의 Shaking incubator에서 약 16시간 배양하여 동결보호제인 Dimethylsulfoxide(Merck)를 첨가하여 -80℃에서 보관하면서 사용하였다.

2. 간균질 물질(S-9)과 S-9 mix의 제조

돌연변이원 물질의 미생물 체내에서 변이유발 활성을 포유동물 세포내에서와 동일한 수준으로 대사활성을 촉진하기 위하여 간균질 물질을 사용하였다. 간균질 물질은 농촌진흥청 농약연구소로부터 분양을 받았으며 S-9 mix의 조제를 위하여 생쥐의 간균질물질(S9) 2.0ml, 1.65M MgCl₂·0.4M KCl salt 1.0ml, 1M Glucose-6-phosphate 0.25ml, 0.1M NADP 2.0ml, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 25ml, 멸균증류수 19.75ml를 혼합하여 조제하였다.

3. 시험균주의 항돌연변이원 효과

Top agar 100ml (증류수 1당 agar 6g, NaCl 5g)를 microwave에서 녹인 후 0.05mM L-histidine/biotin 10ml를 첨가하여 항온 수조에서 45℃로 유지시키고 시험관에 변이원 물질 2-ni-

trofluorene 100 μ l (10 μ g)을 넣고 *Lactobacillus* 배양액 100 μ l를 첨가하였다. 혼합액에 pH 7.4로 조정된 0.1 M potassium phosphate buffer 0.5ml 또는 대사활성화 방법을 적용한 경우에는 S-9 mix 0.5ml를 첨가한 다음 16시간 배양시킨 *S. typhimurium* TA 98을 100 μ l 첨가하였다. 그 혼합액을 37 $^{\circ}$ C의 incubator에서 30분간 예비 배양한 후 2ml의 top agar를 첨가하여 미리 준비한 minimal glucose agar plate에 증충한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후에 균수를 계수하여 측정하였다. 변이원 물질이 첨가되지 않은 대조구로는 100 μ l의 변이원 물질 대신에 100 μ l의 dimethylsulfoxide가 첨가되었다. 돌연변이 억제활성은 positive control에 대한 colony수의 감소로서 측정된다. 각 실험은 처리구당 2개의 plate를 사용하였으며 3회씩 반복하여 실험하였다.

4. *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.의 성장기에 의한 항돌연변이원 활성에 영향을 미치는 요인

Lactobacillus spp. 및 *Bifidobacterium* spp.의 배양시간에 따른 항 돌연변이 효과를 측정하기 위하여 멸균된 탈지유에 유산균을 0.2% 접종한 후 정온 배양기에 배양하면서 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96시간마다 시료를 채취하였다.

균주의 배양시간이 항돌연변이 활성에 미치는 영향요인으로 균주의 배양시간에 의한 요인을 측정하였으며 각각의 test tube에 2-nitroglycerine(100 μ g /mg) 100 μ l를 첨가한 후 cultured milk 100 μ l, 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.5ml 그리고 *S. typhimurium* TA 98 100 μ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에 배양하면서 30분, 60분, 120분, 180분마다 2ml의 top agar를 minimal glucose agar plate에 증충하여 다시 48시간 배양하였다.

5. 혼합액 보존시간에 의한 영향

100 μ l의 시험균주 배양액과 100 μ l의 2-nitro-

fluorene(100 μ g /ml)를 혼합하고 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 0.5ml 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 각각 0, 24, 48, 72, 96시간 동안 유지하면서 주어진 시간마다 100 μ l의 *S. typhimurium* TA 98과 2ml의 top agar를 첨가하여 minimal glucose agar plate에 증충하여 48시간 배양 후 측정하였다.

6. 세포분획성분 및 배지성분과 젖산의 항돌연변이 활성 측정

Test tube에 100 μ l의 2-nitrofluorene(100 μ l /ml)와 1%의 젖산을 100 μ l 혼합하고 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 0.5ml 첨가한다. 혼합액을 37 $^{\circ}$ C, incubator에서 0, 24, 48, 72, 96시간 배양하면서 주어진 시간마다 *S. typhimurium* TA 98 100 μ l와 L-histidine /biotin이 함유된 top agar 2ml를 첨가하여 minimal glucose agar plate 위에 증충하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후에 돌연변이 억제활성을 측정하였다.

세포성분, 배양액 성분, 세포벽이 분해된 세포, 세포질 그리고 세포벽 등의 세포 부분 성분의 돌연변이 억제활성을 조사하였다. 먼저, 대수 성장기에 있는 배양액을 원심분리하여 전체세포와 전체세포를 제외한 배양액 부분으로 분리하여 보관하였고 분리된 세포를 pH 7.0으로 조정된 0.1M potassium phosphate buffer로 3회 세척한 후 획득된 세포 중의 일부에 lysozyme과 mutanolysin을 함께 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리한 후 이를 다시 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포질과 세포벽 그리고 세포벽이 분해된 세포를 획득하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Lactobacillus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp.에 의한 항돌연변이원 활성

Lactobacillus spp. 및 *Bifidobacterium* spp.에 의한 2-nitrofluorene에 대한 항돌연변이원 활성

은 Fig. 1에 제시되었다. *Lactobacillus* spp.의 평균 항돌연변이원 활성은 20.53%였고, *Bifidobacterium* spp.에 의한 항돌연변이원 활성은 21.69%였으며 그 평균치는 20.29%로 나타났다.

Lactobacillus 속 중에 7종에 대한 항돌연변이원 성이 측정되었으며 종별 평균치는 억제활성이 높은 순으로 보면 *L. plantarum* 30.7%, *L. delbrueckii* 27.0%, *L. fermentum* 19.7%, *L. paracasei* 18.9%, *L. casei* 17.0%, *L. acidophilus* 16.4%, *L. bulgaricus* 15.8%의 돌연변이 억제활성을 각각 나타내었다. 균주별로 가장 강한 억제활성을 보인 균주는 *L. plantarum* CU 722로 50.3%의 억제활성을 보였다. *Bifidobacterium* spp.의 경우 *B. breve* ATCC 15700이 26.7%의 항돌연변이원 활성을 보였다.

돌연변이원 물질을 4NQO로 대치한 후 돌연변이 억제성향을 측정한 결과 보존균주 21균주 대부분이 90%를 상회하는 고도의 억제활성을 보였으며 21균주 중 2균주만이 80% 이하의 억제율을 나타내었다. 억제활성의 정도는 *Lactobacillus* spp.가 *Bifidobacterium* spp.보다 강하게 나타났으며 균주에 따라 변이억제 활성은 유의한 수준으로 나타났다. 이중 가장 높은 억제 성향을 가진 균주는 *L. plantarum* KCTC 1048으로 99.3%의 강한 억제활성을 나타내었다. 위의 결과를 근거로 할 때 항돌연변이 억제원 활성은 변이원 물질에 따라 크게 차이를 보일 수 있다는 사실이 입증되었다. Hosono 등 (1986b)이 *Escherichia coli* B/r WP2 trp⁻ her⁻ 균주를 이용하여 4NQO에 대한 항돌연변이 활성실험에서 약 77% 정도의 억제활성을 나타내었고, *S. typhimurium* TA 98의 streptomycin-dependent 균주인 SD 510을 사용하여 실시한 실험에서는 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*가 각각 83.14%, 98.58%의 억제 활성을 나타낸 것으로 보고한 결과와 유사한 성향을 보인다.

2. 2-Nitrofluorene 항돌연변이 활성성분의 분포

젖산균이 성장과 수반하여 생산하는 젖산과 배양에 이용되는 배지 및 세포성분 중 세포질과 세포벽 성분을 구분하여 젖산균 *L. plantarum* CU 722 균주세포 분획별 돌연변이 억제활성 분포를 측정한 결과는 Table 1에 제시된 바 있다. 배양액과 분리된 세포간의 변이억제 활성 차이를 비교한 결과 세포부분의 억제활성이 높은 것으로 확인되었으며, 세포가 전혀 존재하지 않는 배양액에도 낮은 수준의 억제활성은 나타내었다. 세포벽 부분의 돌연변이 억제활성이 가장 높은 34.91%를 나타내었으며 세포질 부분이 24.48%, 세포벽 분해된 세포가 18.02%, whole cell 부분이 17.16% 그리고 whole cell을 제외한 배양액에서 5.43%의 활성이 있는 것으로 밝혀졌다.

Nadathur 등(1994)은 2%의 젖산을 발효하지 않은 우유를 첨가한 후에 실시한 실험에서 젖산에 의한 억제효과는 없는 것으로 보고하였으나 본 시험결과와는 약간의 차이를 보이고 있으며, Hosono 등(1986a)도 96시간까지의 반응에서 젖산에 의한 효과는 크게 나타나지 않는 것으로 보고한 바 있다. 젖산균이 발효하면서 생성하는 산에 의해 pH를 낮추어 병원성 미생물을 억제하는 효과가 있으나 돌연변이 유발물질에 대한 돌연변이 억제에 미치는 영향은 크지 않다고 할 수 있다.

3. 항돌연변이 활성의 최적조건

배양시간에 따른 젖산균의 항돌연변이원 활성을 *L. casei* KCTC 2680, *L. delbrueckii* subsp.

Table 1. Antimutagenic activity of cell components of *L. plantarum* CU 722

Components	Inhibition(%)
Whole cell	17.16
Cell free cultured broth	5.43
Sonicated cell	18.02
Cytoplasm	24.48
Cell wall component	34.91

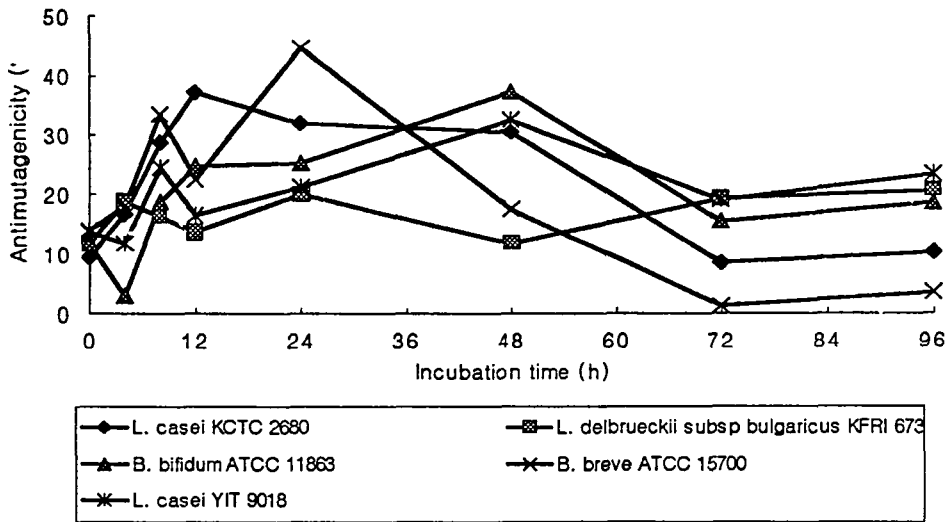


Fig. 1. Changes of antimutagenicity of cultured milk during cultivation.

bulgaricus KFRI 673, *B. bifidum* ATCC 11863, *B. breve* ATCC 15700, *L. casei* YIT 9018 등을 사용하여 탈지유 배지에서 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96시간 배양하면서 생장시간에 따른 돌연변이 colony 수의 감소 성향과 그에 따른 억제율을 관찰하였고, 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다.

전체균주가 생장기에 의하여 영향을 받으며 대수적인 증식기인 12시간에서 24시간 배양된 배양액에서 가장 높은 항돌연변이 활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 발효시간이 48시간을 지나 96시간로 가면서 그 억제현상이 저하되는 경향으로 나타났다. Hosono 등(1986a)이 *Str. Faecalis* IFO 12964를 가지고 배양하면서 측정된 결과에 따르면 발효 3시간 이후부터 12시간까지의 억제 효과가 증가하면서 12시간 이후 24시간부터 다시 감소하는 추세를 보였다. 또한 Hosono 등(1988)은 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*로 동일한 실험 결과 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*의 경우 48시간에, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*는 24시간에 각각 가장 높은 억제 활성을 갖는 것으로 나타났으며 두 균주 모두 48시간을 넘기면서 억제활성이

다시 감소하는 것으로 나타났다.

이것으로 미루어 볼 때 유산균의 배양시간이 정체기로 진전됨에 따라 돌연변이 억제연관 물질의 생성은 감소하는 것으로 사료된다.

돌연변이원 물질과 유산균 발효유 S-9 mix 및 *Salmonella typhimurium* TA 98의 혼합액을 37°C에서 예비배양하는 시간이 항돌연변이원성에 미치는 영향을 7 균주를 사용하여 측정하였으며 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. *L. acidophilus* KCTC 2182, *L. casei* KCTC 2680, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673, *L. plantarum* KCTC 110, *B. bifidum* ATCC 11863, *B. breve* ATCC 15700, *L. casei* YIT 9018 등의 균주로 실시한 결과에서 *L. acidophilus* KCTC 2182균주는 30분에서, *L. casei* KCTC 2680은 60분에서, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KFRI 673은 60분, *L. plantarum* KCTC 110균주는 30분, *B. bifidum* ATCC 11863도 30분, *B. breve* ATCC 15700은 120분, *L. casei* YIT 9018은 60분 배양액에서 각각 가장 높은 억제활성을 보였다. 이 결과를 종합할 때 30분에서 60분 예비배양시간에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

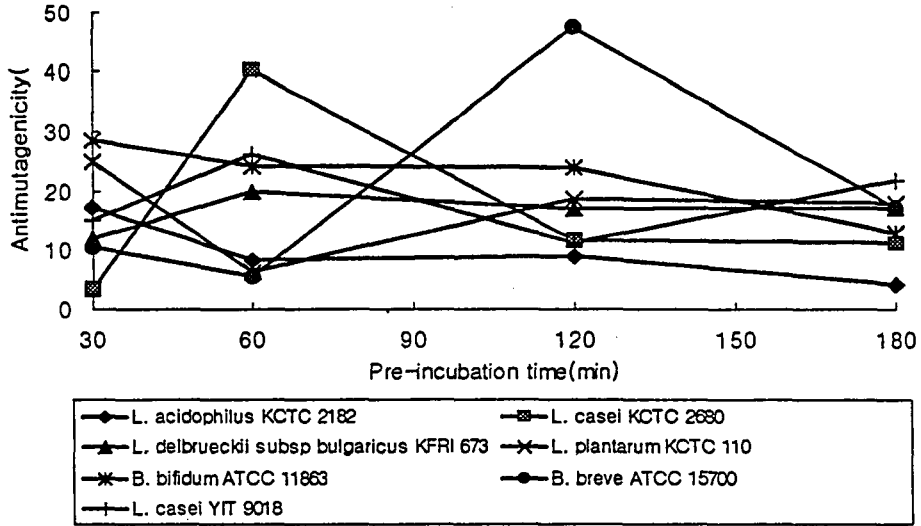


Fig. 2. Effect of preincubation time on the antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in cultured milk.

Hosono 등(1988)이 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 를 가지고 배양한 발효유로 실험한 결과에서는 각각 3 시간과 1시간의 pre-incubation time에서 가장 높은 억제율을 갖는 결과를 비교하면 약간의 차이를 나타내었다.

항돌연변이원 활성측정과정에서 젖산균 배양액과 돌연변이원물질, S-9 mix, *Salmonella typhimurium* TA 98 및 top agar 혼합한 후 minimal glucose agar에 균일하게 확산한 후 배양시간이 억제활성에 영향요인으로 판단되어 배양시간과 억제활성의 관계 측정한 결과를 Fig. 2에 제시하였다.

Lactobacillus spp.와 *Bifidobacterium* spp. 시험균주의 전체평균과 속의 평균치를 나타낸 결과를 보면 48시간을 중심으로 하여 점차 저하되었다가 48시간 이후부터는 그 활성이 점차 증가되는 성향을 나타내었다.

Hosono 등 (1986a)의 결과에서는 각 균주로 발효된 발효유가 유지시간이 경과함에 따라 유의하게 저하하는 경향을 보였다. 본 실험에서도 균주마다 약간의 차이는 보였으나 배양시간이 경과

하면서 억제율은 점차로 저하한 이후 48시간을 경과하면 점차 증가하는 경향을 나타낸다.

IV. 요약

젖산균에 의한 항돌연변이원 활성의 특성을 구명하기 위하여 돌연변이원 물질 2-nitrofluorene에 대한 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.의 항돌연변이원 활성의 균주간의 차이, 활성의 분포 및 활성의 최적조건을 *Salmonella typhimurium* TA 98을 이용하여 측정하였다. *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.는 평균 20.29% 수준의 억제활성을 보였고 *Lactobacillus* spp.는 20.53%와 *Bifidobacterium* spp.는 21.63%의 억제활성을 나타내었으며 균주별로 가장 큰 활성을 보인 균주는 *L. plantarum* CU 722로서 50.34%의 억제활성을 나타내었다. *L. plantarum* CU 722의 탈지유 배양액에서 항돌연변이 활성의 분포를 측정하였던 바 세포벽 성분 및 세포질 성분에서 34.91%와 24.48%로 높은 활성을 보인 반면 세포를 함유하지 않은 배양액에서는 매우 낮은 활성이 나타났다. 항돌연변이 활성을 나타내

는 조건으로 균주의 배양시간은 24시간 배양액에서, 돌연변이원 물질과 젖산균 배양액 및 시험균주와의 예비배양시간은 60분으로 유지할 때, 배양시간은 48시간 이상으로 할 때 가장 높은 항돌연변이 활성을 보였다.

V. 참고문헌

1. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome test. *Mutation Res.* 31:347-364(1975).
2. Bodana, A. R. and Rao, D. R. : Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 73:3379-3384(1990).
3. Feron, E. R. and Vogelstein, B. : A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-767(1990).
4. Gilliland, S. E. : Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Rev.* 87: 175(1990).
5. Hosono, A., Kashina, T. and Kada, T. : Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.* 69:2237-2242 (1986a).
6. Hosono, A., Sagae, S. and Tokita, F. : Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induce mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp⁻ her⁻ *Milch-wissenschaft.* 41:142-145(1986b).
7. Hosono, A., Shashikanth, K. N. and Otani, H. : Antimutagenic activity of whole casein on the pepper-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA 98. *J. Dairy Res.* 55:435(1988).
8. Kurmann, J. A. : Starter for fermented milk. Section 5. Starter with selected intestinal bacteria. *Int. Dairy Feed. Bull* (1988).
9. Nadathur, S. R., Gould, S. J. and Bakalinesky, A. T. : *J. Dairy Sci.* 77:3287-3295 (1994).
10. Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B. and Goldman, M. : Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterol.* 102:1457-1482(1992).
11. Reddy, G. V., Friend, B. A., Shahani, K. M. and Farmer, R. E. : Antitumor activity of yogurt components. *J. Food. Prot.* 46:8(1992).
12. Renner, H. W. and Munzner, R. : The possible role of probiotic as dietary antimutagens. *Mutation Res.* 262:239-245 (1991).
13. Shahani, K. M. and Ayebo, A. D. : Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microscopy. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2448-2457(1980).