

Aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력에 영향을 미치는 배양조건과 물리화학적 인자

임성미^{1*} · 안동현²

¹동명대학교 식품영양학과

²부경대학교 식품공학과

Incubation Conditions and Physico-Chemical Factors Affecting Aflatoxin B₁ Binding of Lactic Acid Bacteria

Sung-Mee Lim^{1*} and Dong-Hyun Ahn²

¹Department of Food Nutrition & Science, Tongmyong University, Busan 608-735, Republic of Korea

²Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

(Received August 1, 2013 / Accepted August 23, 2013)

The purpose of this study was to investigate the aflatoxin B₁ binding of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Korean traditional soybean paste and to evaluate the effect of incubation conditions and physico-chemical factors on the binding ability of LAB to this mutagen. The amount of aflatoxin B₁ bound by *Enterococcus faecium* DJ22, *Lactobacillus fermentum* DJ35, *Lactobacillus rhamnosus* DJ42, and *Lactobacillus pentosus* DJ47 was strain specific with the percent bound ranging from 19.3% to 52.1%. However, *Enterococcus faecalis* DJ14, *Lactobacillus panis* DJ29, and *Pediococcus halophilus* DJ50 strains did not exhibit any of the binding ability to aflatoxin B₁. For most strains, the binding ability was significantly affected by the environmental conditions such as the aflatoxin B₁ level, incubation time and temperature, and the initial cell count of LAB. The stability of the aflatoxin B₁-bacteria complexes was significantly more unstable after washing. In addition, the binding stability between viable and nonviable cells was not statistically significant. Treatment with heating, acidic pH, α -amylase, protease, lysozyme, or sodium metaperiodate caused a significant ($P < 0.05$) decrease in aflatoxin B₁ binding for the tested strains, suggesting that carbohydrates or proteins in the cell walls may be involved in aflatoxin B₁ binding ability. Since the aflatoxin B₁ binding of LAB was significantly reduced ($P < 0.05$) by the pretreatment of the urea, the binding force observed in this study may have resulted from hydrophobic interaction.

Keywords: aflatoxin B₁ binding, lactic acid bacteria, soybean paste

고온 고습한 환경 조건하에서 옥수수, 땅콩, 수수, 아몬드 등의 식품을 오랜 기간 저장하게 되면 소비자들의 건강을 위협하는 각종 곰팡이들이 번식하면서 발암성 진균독을 생산한다. 특히 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* subsp. *parasiticus*, 및 *Aspergillus nomius* 등의 증식과정 중 생성된 이차 대사산물인 aflatoxin은 열대 혹은 아열대 지역에서 생산된 곡류 및 두류 등의 재배, 수확, 운송 및 저장 중에 흔히 발견되는 진균독이다. Aflatoxin 생성량은 식품의 성분, 온도, pH, 수분 함량, 산소 및 혼재하고 있는 미생물 종류 등의 인자에 따라 영향을 받는다 (Gourama and Bulleraman, 1997). 종류로는 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ 등이 있으며, 그 중에서 aflatoxin B₁은 자연계에 널리 존재하는 가장 강력한 발암물질이다 (Wogan, 1999). 이들

진균독에 오염된 식품이나 사료를 섭취할 경우 사람이나 동물에게는 돌연변이를 비롯하여 간장과 신장세포 괴사, 발암, 기형, 면역력 억제 및 라이 증후군(Reye syndrome) 등 심각한 질병을 유발하므로 공중보건학적 위해 뿐만 아니라 농작물 폐기로 인한 막대한 경제적 손실을 초래하게 된다(Eaton and Callanger, 1994). 이러한 돌연변이원이 체내에 축적될 경우 DNA의 변이와 손상으로 인하여 심장병, 죽상동맥경화증과 같은 만성 퇴행성 질환 등을 유발하게 되며, 변이원에 의한 유전적 변이는 대장암의 진행에 결정적인 요소로 작용할 수 있다(Fearon and Vogelstein, 1990). Aflatoxin은 열에도 매우 안정하여 가열 처리만으로는 불활성화 되기 어려우며 지금까지 알려져 있는 물리화학적 처리에 의한 무독화 방법은 식품의 영양가 손실, 풍미 저하, 2차 오염 및 고가의 장비 사용에 의한 단가 상승 등의 문제점이 있어 제어하기 어렵다(Galvano *et al.*, 2001).

최근 연구에 따르면, 항돌연변이 활성을 가진 미생물은 식품

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr; Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

에 오염된 돌연변이원을 제거하여 돌연변이 발생을 억제할 뿐만 아니라 그로 인한 암세포 증식을 억제하는데 효과적이라는 보고가 있다(Ferguson, 1994). 유산균은 aflatoxin B₁을 비롯하여 육류의 조리과정 중 발생하는 heterocyclic amines, benzo(a)pyrene, nitroso 화합물 및 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF2) 등의 식이성 발암물질에 대한 제거효과가 보고되었다(Lankaputhra and Shah, 1998; Sreekumar and Hosono, 1998; Lo *et al.*, 2002). Probiotic *Lactobacillus* 속은 aflatoxin 생합성을 저해함으로써 발암원의 유전적 독성을 저해하여 암 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(Karumaratne *et al.*, 1990). Probiotic 유산균은 사람이나 동물의 건강에 이로운 유용한 미생물로서 돌연변이를 유발하는 효소를 억제하고, 유전적 독성을 감소시키며, 대장 내 암 발생 위험을 줄이는 것으로 보고되고 있다(Burns and Rowland, 2000). 유산균에 의한 항돌연변이와 항암효과의 정확한 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았지만, 지금까지 확인된 바에 의하면 유산균의 대사산물에 의해 돌연변이원을 제거하는 것으로 알려져 있다(Hirayama and Rafter, 1999). 또한 유산균의 세포벽 표면에 돌연변이원을 흡착시켜 항돌연변이 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 세포벽의 성분은 돌연변이원의 결합과 불활성화에 중요한 역할을 한다(Wollowski *et al.*, 1999). *Lactobacilli*와 *bifidobacteria*는 aflatoxin B₁과의 결합에 의해 변이원을 제거하는 것으로 밝혀졌는데(El-Nezami *et al.*, 1998b), 이들 세포벽에 존재하는 다당류와 peptidoglycan에 대부분 aflatoxin을 결합시킨다고 보고되었다(Lahtinen *et al.*, 2004). 이와 같은 결합에 의한 aflatoxin B₁ 제거 메커니즘은 이온 교환이나 분자간의 다양한 결합 등의 물리적 방법에 의해 나타난다고 알려져 있다(Pizzolitto *et al.*, 2011). 따라서 항돌연변이 활성을 발휘하는 probiotic 유산균을 스타터로 사용하여 각종 발효식품, 식이섬유 보조제 및 건강기능식품 등의 제조에 이용할 경우 돌연변이 발생을 억제시킴으로써 소비자들의 질병 예방 및 건강을 향상시키는데 도움을 줄 수 있을 것이므로 산업적으로서의 활용 가치가 높을 것으로 예상된다(Gomes and Malcata, 1999).

본 연구에서는 숙성된 된장으로부터 분리된 유산균에 의한 aflatoxin B₁의 결합 정도를 HPLC를 이용하여 분석함으로써 항돌연변이능을 알아보려 한다. 또한 aflatoxin B₁의 농도, 세포와의 반응시간 및 온도, 초기 세포수에 따른 결합력을 비교하였고, 가열, 효소, pH 및 금속성분 등의 물리화학적 처리가 aflatoxin B₁에 대한 유산균 세포의 결합력에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 아울러, aflatoxin B₁-유산균 복합체의 결합 안정성과 세포벽에 결합된 aflatoxin B₁ 양을 측정하였다.

재료 및 방법

실험 균주 분리배양

일반 가정에서 제조하여 1년 이상 숙성된 된장 11종을 수집하여 무균적으로 채취한 시료 45 g을 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0) 450 ml를 혼합한 뒤 2분간 분쇄기(Waring Product Division, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 시험용액은 심진 희석 방법으로 희석하여 *Lactobacilli* MRS Agar (Difco Co., USA) 평

판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 전형적인 유산균 종류별로 총 7종을 순수 분리하여 20% glycerol (v/v) 내에 보관하면서 실험에 사용하였다. 보관된 균주는 MRS agar 사면배지 상에서 3회 계대 배양하여 활성을 높인 다음 aflatoxin B₁에 대한 결합력 측정에 사용하였다.

실험 균주 동정

선발된 균주는 API 50CH 혹은 API 20 Strep kit (bioMérieux Co., France)를 이용하여 당 분해능을 조사하였다. 16S rRNA sequencing 하기 위해 실험 균주를 PBS (pH 7.0)에 부유시켜 100°C에서 10분간 가열한 후 원심분리(12,000×g, 10분, 4°C)하여 얻은 상등액을 DNA template로 사용하였고, 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primer를 사용하여 16S rRNA 유전자를 polymerase chain reaction (PCR, Bio-Rad Laboratories Ltd., Canada)으로 증폭시켰다. PCR은 97°C에서 5분간 열 변성 후 94°C에서 1분, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분의 과정을 30회 반복한 후 72°C에서 4분간 연장반응을 실시하였고, 증폭된 DNA는 전기영동을 통해 band를 확인한 후 QIA quick PCR kit (QIAGEN, USA)로 정제하였다. 정제산물은 sequencing하여 분석된 염기서열은 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 database와 비교한 후 BLASTN program (version 2.0.8., Altschul *et al.*, 1990)으로 상동성을 검색하여 균주명을 확인하였다.

배양조건에 따른 유산균 세포와 aflatoxin B₁의 결합력

실험 균주는 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, 배양액을 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 세포와 배양 상등액을 분리하였다. 세포는 PBS (pH 7.0)으로 2회 세척하고 최종 균수 1.0×10^{10} CFU/ml로 조정하였다. Aflatoxin B₁은 benzene-acetonitrile (97:3, v/v)에 녹여 1000 mg/L의 농도에 맞춘 후, 항온수조 내에서 80°C, 10분간 가열하여 용매를 휘발시키고 aflatoxin B₁은 methanol에 용해시켰다. 유산균 세포의 결합력에 대한 aflatoxin B₁ 농도의 영향을 살펴보기 위해, aflatoxin B₁은 PBS (pH 7.0)을 사용하여 2.5, 5, 10 및 20 µg/ml의 농도로 조정된 용액 1.5 ml를 유산균 세포(1.0×10^{10} CFU/ml)와 37°C에서 24시간 반응시킨 후 독소의 농도에 따른 유산균 세포와의 결합력을 확인하였다. Aflatoxin B₁과 유산균 세포의 결합력에 대한 배양시간의 영향을 알아보기 위해, 유산균 세포(1.0×10^{10} CFU/ml)는 PBS (pH 7.0)에서 세척한 후 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/L) 1.5 ml에 첨가하여 가볍게 vortexing 한 후 37°C에서 12, 24, 48 및 72시간 배양하여 배양시간에 따른 결합력을 확인하였다. Aflatoxin B₁과 유산균 세포의 결합력에 대한 배양온도의 영향을 확인하기 위해, 유산균 세포(1.0×10^{10} CFU/ml)는 PBS (pH 7.0)로 세척한 후 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/L) 1.5 ml에 혼합하여 가볍게 vortexing 한 후 4, 25 및 37°C에서 24시간 진탕 배양하여 배양온도에 따른 결합력을 확인하였다. Aflatoxin B₁과 유산균 세포의 결합력에 대한 세포수의 영향을 조사하기 위해, 유산균 세포수를 ml당 10^7 , 10^8 , 10^9 및 10^{10} 으로 각각 조정된 세포를 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/ml) 1.5 ml 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하여 유산균 세포수에 따른 결합력을 확인하였다.

유산균 세포와 aflatoxin B₁의 결합 안정성

유산균 세포와 aflatoxin B₁ 복합체의 안정성을 측정하기 위해 배양액을 세척한 후 잔존하는 결합력을 측정하였다. 유산균 세포(1.0×10^{10} CFU/ml)는 PBS (pH 7.0)로 세척한 후 현탁시킨 다음 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/L) 1.5 ml에 첨가하여 가볍게 vortexing 한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. Aflatoxin B₁ 용액과 배양한 세포는 Milli-Q water (1.5 ml)에 현탁시켜 약 15초간 vortexing 한 후 상온에서 10분간 방치하고 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 얻은 상등액은 HPLC로 결합력을 측정하였다. 배양 후 총 3회 세척하여 결합력을 분석함으로써 aflatoxin B₁과 세포의 결합 안정성을 확인하였다.

Aflatoxin B₁의 결합력에 영향을 미치는 물리화학적 처리 조건

Aflatoxin B₁에 대한 유산균 세포의 결합력에 영향을 미치는 물리화학적 처리 조건을 확인하기 위해, 유산균 세포 배양액을 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 회수한 유산균 세포(1.0×10^{10} CFU/ml)를 80°C에서 30분, 100°C에서 20분 및 121°C에서 15분간 가열 처리한 직후 냉각시켜 가열하는 동안 생긴 응고물을 5분간 vortexing한 다음 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/ml)과 37°C에서 24시간 배양시켜 결합력을 측정하였다. 또한 pH의 영향을 살펴보기 위해, glycine-HCl buffer (pH 3.0), acetate buffer (pH 4.0와 5.0) 및 phosphate buffer (pH 6.0과 7.0) 100 mM 내에 유산균 세포를 현탁시킨 후 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/ml)과 37°C에서 24시간 배양시켜 결합력을 측정하였다. 효소의 영향을 살펴보기 위해, 원심분리하여 얻어진 세포 침전물(1.0×10^{10} CFU/ml)을 α-amylase (50 mM sodium acetate, pH 6.0), protease (50 mM Tris-HCl, pH 7.5), lipase (50 mM Tris-HCl, pH 7.5), lysozyme (50 mM sodium phosphate, pH 8.8) 용액에 현탁시켜 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 효소 반응을 정지시킨 다음 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/ml)과 37°C에서 24시간 배양시켜 결합력을 조사하였다. 한편, 유산균의 세포 침전물(1.0×10^{10} CFU/ml)을 50 mM NaCl, MgCl₂ 및 8 M urea 용액에 각각 첨가하고 aflatoxin B₁ 용액(5 µg/ml)과 37°C에서 24시간 배양하였다. 게다가 sodium metaperiodate (50 mM)는 37°C에서 24시간 배양한 후 배양이 끝날 즈음 ethylene glycol 한방울을 떨어뜨려 metaperiodate을 파괴하였다. 각각의 조건에서 배양한 배양액은 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 세포 침전물을 회수하고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 후 aflatoxin B₁과의 결합력을 측정하였다.

유산균 세포벽에 대한 aflatoxin B₁ 결합력

유산균의 세포벽은 Gopal과 Reilly (1995)의 방법에 따라 준비하였다. 즉, 유산균 세포수 1.0×10^{10} CFU/ml에 맞춰 PBS (pH 7.0)에 현탁시킨 세포 부유액을 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 얻은 침전된 세포는 PBS (pH 7.0)에 현탁시켰다. 이를 얼음물 속에서 10초 간격으로 초음파 파쇄하였고, 세포 파쇄물은 원심분리(1,000×g, 10분, 4°C)하여 제거하였다. 이를 MRS agar 평판배지에 도말하여 37°C에서 배양했을 때 세포의 증식을 확인하여 세포가 파괴되었음을 확인하였다. 세포 파쇄물을 4°C에서 15,000×g의 속도로 25분간 원심분리하여 회수한 침전물을 15

mM NaCl로 2회, 50 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane hydrochloride로 세척한 다음 10 mM PBS (pH 7.0)에 현탁시켰다. 50 µg/ml RNase와 DNase를 첨가하고 37°C에서 90분간 배양하고, 15,000×g, 25분간 원심분리하여 얻어진 세포벽 성분은 PBS (pH 7.0)로 다시 세척한 다음 sodium dodecylsulfate (SDS, 20 g/L)로 처리하고 세포막을 제거하기 위해 70°C에서 2시간 가열 처리 하였다. SDS 성분을 제거하기 위해 수 차례 PBS (pH 7.0)으로 세척하고 원심분리한 침전물에서 세포벽을 얻어 aflatoxin B₁과의 결합력을 측정하였다.

HPLC에 의한 aflatoxin B₁량 측정

각각의 조건에서 유산균 세포와 aflatoxin B₁ 용액을 배양한 후 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 얻어진 상등액은 회수하여 세포로부터 분리된 aflatoxin B₁의 양을 측정하였다. 이들 각 시료는 El-Nezami 등(1998b)의 방법을 일부 변형하여 HPLC (Shimadzu, Japan)의 ODS Spheri-5 Brownlee C₁₈ column (220×4.6 mm, 5 µm; Perkin Elmer)으로 분석하였다. HPLC system에는 dual-pump model 400 solvent delivery system, model 980 programmable fluorescence detector 및 Rheodyne injector으로 구성되었다. Detector의 여기 파장 365 nm, 방출 파장 418 nm에서 이동상은 water/acetonitrile/methanol (6:3:1, v:v:v)을 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min으로 이동시켰다. 시료 주입량은 50 µl로 하였고, 검출 시간은 약 9.5분으로 하였다. 유산균 세포에 부착한 aflatoxin B₁의 결합력(%)은 다음 식에 따라 계산하였다. 결합력(%) = [1-(시료의 aflatoxin B₁ peak 면적 / 대조구의 aflatoxin B₁ peak 면적)] × 100.

통계처리

총 3회 측정하여 얻은 값을 SPSS (version 12.0) program의 Student's t-test을 통해 $P < 0.05$ 에서 대조구와 실험구의 측정값들 간의 유의적인 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

실험 균주 동정

속성된 된장으로부터 총 7종의 유산균을 선발하여 당 분해능 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정한 결과는 Table 1과 같다. DJ14 균주는 glycerol, D-glucose, D-fructose, D-mannose, cellobiose, maltose, saccharose 등을 분해할 수 있었으나, D-arabinose, inuline 등은 분해할 수 없어 당 분해능 결과 *Enterococcus* 속으로 확인되었다. 하지만, 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Enterococcus faecalis* JCM 5803 균주의 RNA 배열과 99.8% 일치하였다. DJ22 균주는 galactose, D-glucose, D-fructose, D-maltose, melibiose, trehalose 등은 분해할 수 있었던 반면, D-arabinose, D-mannose, cellobiose, saccharose, inuline, D-raffinose 등은 분해할 수 없어 API kit 상에서는 *Enterococcus* 속으로 확인되었으나, 16S rRNA 염기서열 분석 결과에서는 *Enterococcus faecium* 균주로 판명되었다. DJ29 균주는 galactose, D-glucose, D-fructose, maltose, lactose, melibiose, D-raffinose 등은 분해할 수 있었던 반면,

Table 1. Identification of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional soybean paste by API kit and 16S rRNA sequencing

Strain	Phenotypic identification	Genotypic identification		Identification
		Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)	
DJ14	<i>Enterococcus</i> ssp.	<i>E. faecalis</i> JCM 5803 (AB012212)	99.8	<i>E. faecalis</i>
DJ22	<i>Enterococcus</i> ssp.	<i>E. faecium</i> ATCC 19434 (DQ411813)	98.2	<i>E. faecium</i>
DJ29	<i>L. fermentum</i>	<i>L. panis</i> DSM 6035 (X94230)	97.8	<i>L. panis</i>
DJ35	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> NBRC 3956 (AP008937)	99.6	<i>L. fermentum</i>
DJ42	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 (D16552)	99.9	<i>L. rhamnosus</i>
DJ47	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i> JCM 1558 (D79211)	99.9	<i>L. pentosus</i>
DJ50	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. halophilus</i> IAM 1676 (D88668)	99.2	<i>P. halophilus</i>

Table 2. Effect of aflatoxin B₁ level, incubation time and temperature, and bacterial cell counts on aflatoxin B₁ binding by lactic acid bacteria isolated from Korean traditional soybean paste

Strain	Control ^a	Aflatoxin B ₁ level ^b (µg/ml)			Incubation time ^c (h)			Incubation temperature ^d (°C)		Bacterial cell counts ^e (CFU/ml)		
		2.5	10	20	12	48	72	4	25	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
<i>E. faecalis</i> DJ14	ND ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. faecium</i> DJ22	37.7±1.8	36.1±2.4	39.2±3.3	35.6±2.3	19.9±2.3*	26.9±2.4*	24.0±2.1*	15.1±1.2*	19.4±1.9*	22.3±1.4*	27.3±1.9*	30.0±1.8*
<i>L. panis</i> DJ29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. fermentum</i> DJ35	31.2±3.4	25.1±1.9*	29.9±1.4	30.5±2.0	32.6±2.0	29.4±2.1	26.9±1.9*	19.9±2.3*	27.4±2.3	28.1±2.2	27.2±1.9	32.0±1.7
<i>L. rhamnosus</i> DJ42	52.1±1.8	40.0±2.7*	49.1±2.9	50.1±1.9	45.4±1.7*	49.8±3.4	52.7±3.1	56.7±2.4	54.0±02.3	33.4±2.9*	35.7±2.4*	42.2±1.9*
<i>L. pentosus</i> DJ47	19.3±2.0	10.4±0.9*	20.9±1.9	18.4±0.8	18.9±1.5	20.1±1.4	16.0±1.7*	10.6±0.8*	16.0±1.7*	11.6±1.4*	12.2±1.8*	17.3±1.3
<i>P. halophilus</i> DJ50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Bacterial pellets (1.0×10¹⁰ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 24 h at 37°C.

^b Bacterial pellets (1.0×10¹⁰ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (2.5, 10 or 20 µg/ml) and incubated for 24 h at 37°C.

^c Bacterial pellets (1.0×10¹⁰ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 12, 48, or 72 h at 37°C.

^d Bacterial pellets (1.0×10¹⁰ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 24 h at 4 or 25°C.

^e Bacterial pellets (1.0×10⁷, 10⁸, or 10⁹ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 24 h at 37°C.

^f Not detected.

Data are means±standard deviation (SD) from triplicate determinations.

* Significantly differ (*P*<0.05) from the control group by Student's *t*-test.

rhamnose, amygdaline, cellobiose, gluconate 등은 분해할 수 없었으므로 당 분해능 결과 *Lactobacillus fermentum*으로 확인되었으나, 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Lactobacillus panis* DSM 6035와 염기배열이 97.8% 일치하였다. DJ35 균주는 galactose, D-glucose, D-fructose, maltose, melibiose, D-raffinose 등은 분해할 수 있었던 반면, amygdaline, cellobiose, gluconate 등은 분해할 수 없었으므로 당 분해능을 확인한 결과 *L. fermentum*으로 확인되었으나, 16S rRNA 염기서열 분석결과 *L. fermentum* NBRC 3956와 염기배열이 99.6% 일치하였다. DJ42 균주는 galactose, D-glucose, D-fructose, maltose, lactose, melibiose, D-raffinose, gluconate 등은 분해할 수 있었던 반면, amygdaline, cellobiose, rhamnose 등은 분해할 수 없었으므로 당 분해능 결과 *Lactobacillus rhamnosus*로 확인되었으며, 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *L. rhamnosus*로 동정되었다. DJ47 균주는 galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, cellobiose, lactose, maltose 등은 분해하였고, amygdaline, inuline, D-raffinose 등은 분해할 수 없었으며, 당 분해능 결과는 *Lactobacillus plantarum*으로 나타났다. DJ50 균주는 L-arabinose, D-xylose, galactose, salicin, maltose, lactose 등은 분해할 수 있었으나,

cellobiose, saccharose, trehalose 등은 분해할 수 없었으며, 당 분해능에서는 *Pediococcus pentosaceus*로 확인되었으나, 16S rRNA 분석 결과 *Pediococcus halophilus*로 동정되었다. 따라서 본 실험에서 된장으로부터 분리된 유산균은 *E. faecalis* DJ14, *E. faecium* DJ22, *L. panis* DJ29, *L. fermentum* DJ35, *L. rhamnosus* DJ42, *L. pentosus* DJ47, 및 *P. halophilus* DJ50으로 명명하였다.

된장에서 분리되는 미생물은 주로 내염성 균으로써 Yoo 등 (1999)에 의하면, 우리나라 전통 된장에서는 다양한 *Bacillus* spp., *Micrococcus lylae* 및 *Cellulomonas flavigena* 등이 주로 분리되었다고 하였다. 또한 Lim 등(2006)은 된장으로부터 항암 활성을 나타내는 *Lactobacillus cellobiosus*가 분리된 바 있으며, Cui 등(2012)에 따르면, 중국의 전통 발효 된장으로부터 *P. halophilus* 균종이 우점종으로 나타났으며, 그 외에도 *L. panis*, *L. pentosus*, *Lactobacillus vaccinostrercus* 및 *Lactobacillus collinoides* 등이 분리되었다고 보고하였다.

Aflatoxin B₁ 농도, 반응시간 및 온도와 초기 균수에 따른 유산균 세포와의 결합력

Aflatoxin B₁과 유산균의 결합력에 대한 독소의 농도, 반응시간 및 온도, 초기 세포수의 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같

다. 된장에서 분리된 7종의 유산균 중 *E. faecalis* DJ14, *L. panis* DJ29 및 *P. halophilus* DJ50 균주는 aflatoxin B₁에 대한 결합력을 나타내지 않았다. 하지만 *E. faecium* DJ22, *L. fermentum* DJ35, *L. rhamnosus* DJ42 및 *L. pentosus* DJ47 균주들의 세포수 1.0×10^{10} CFU/ml은 aflatoxin B₁ 5 µg/ml와 37°C에서 24시간 배양시키는 동안 19.3–52.1% 정도의 aflatoxin B₁ 결합 효과를 나타내었다. 실험 균주 중 aflatoxin B₁에 대한 *L. rhamnosus* DJ42의 결합력이 52.1%로 가장 높게 나타났으며, *L. pentosus* DJ47가 가장 낮은 값을 보였다. *E. faecium* DJ22의 결합력은 aflatoxin B₁의 농도에 영향을 받지 않았지만, *L. fermentum* DJ35, *L. rhamnosus* DJ42 및 *L. pentosus* DJ47 균주들의 결합력은 aflatoxin B₁의 농도가 2.5 µg/ml인 경우에는 5 µg/ml 보다 유의하게 낮았으나 ($P < 0.05$), 10과 20 µg/ml인 경우에는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 배양시간이 결합력에 미치는 영향을 살펴본 결과, *E. faecium* DJ22는 aflatoxin 5 µg/ml와 37°C에서 24시간 배양한 경우가 12, 48 혹은 72시간 배양한 경우보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). *L. fermentum* DJ35와 *L. pentosus* DJ47 균주의 경우, 12, 24 및 48시간 배양한 경우에는 aflatoxin B₁에 대한 결합력에 큰 차이가 없었으나, 72시간 배양했을 때에는 오히려 결합력이 감소되었다. 하지만 *L. rhamnosus* DJ42는 24시간 배양시 12시간 보다 결합력이 더 높았고 72시간 배양했을 때와 비슷한 수준으로 유지되었다. 배양온도의 영향을 조사한 결과, aflatoxin B₁에 대한 *E. faecium* DJ22와 *L. pentosus* DJ47의 결합력은 37°C가 최적 온도로서 4°C와 25°C에서 배양했을 때보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). *L. fermentum* DJ35는 4°C 배양했을 때 유의하게 낮았지만, 25°C와 37°C에서 배양했을 때는 비슷한 수준의 결합력을 보인 반면, *L. rhamnosus* DJ42는 배양온도에 관계없이 일정한 결합력을 나타내었다. 한편, *E. faecium* DJ22와 *L. rhamnosus* DJ42의 세포수가 증가할수록 aflatoxin B₁에 대한 결합력은 높게 나타났다. *L. pentosus* DJ47의 균수는 10^9 CFU/ml일 때 결합력이 10^7 과 10^8 CFU/ml보다 더 높았으나, 10^{10} CFU/ml와는 유의한 차이가 없었다. 그러나 aflatoxin B₁에 대한 *L. fermentum* DJ35의 결합력은 세포수에 별 다른 영향을 받지 않고 일정한 값을 나타내었다.

Peltonen 등(2001)의 보고에 따르면, aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력은 균종에 따라 다양하게 나타났으며, *Lactobacillus* 속은 17.3–59.7%, *Bifidobacterium* 속은 18.0–48.7%, *Lactococcus* 속은 5.6–41.1%의 aflatoxin B₁을 세포에 결합시켰다. 이처럼 균주별 aflatoxin B₁에 대한 결합력에 유의적 차이가 나는 이유로는 세균마다 세포벽과 세포막 구조가 서로 다르기 때문인 것으로 보고하였다. *Lactobacillus amylovorus* CSCC5197와 *L. rhamnosus* Lc ½는 aflatoxin B₁ 용액과 혼합 직후부터 결합하여 72시간 동안에도 50% 이상 결합력을 유지하였고, 배양시간이 증가할수록 *L. amylovorus* CSCC 5160의 결합력은 점진적으로 증가하는 경향을 보였다. El-Nezami 등(1998b)에 의하면, *L. rhamnosus* GG 및 Lc 705균주들은 반응직후 aflatoxin B₁을 80% 이상 결합시켰고, 72시간 동안에도 높은 결합력을 유지하였다고 보고하였다. 또한 세포수가 aflatoxin B₁의 제거에 영향을 미치는 것으로 나타나 초기 균수가 $2-5 \times 10^9$ CFU/ml 이상일

때 aflatoxin B₁은 약 13–50% 제거되었고, *L. rhamnosus* GG와 Lc 705 각각의 생균수가 2×10^{10} CFU/ml인 경우에는 aflatoxin B₁을 99%와 87% 제거할 수 있었다고 하였다. 그리고 aflatoxin B₁ 결합력은 배양온도에도 영향을 받아 37°C에서 가장 높은 결합력을 나타내었다고 하였다. Aflatoxin B₁의 농도가 증가될수록 제거된 양은 다소 증가하였으나, 증가율이 유의할만한 차이는 아니었다고 하였다. El-Nezami 등(1998a)은 aflatoxin B₁의 농도가 증가할수록 세포에 결합된 aflatoxin B₁의 양은 거의 일정하게 유지되었다고 하였는데, 이는 살아있는 세포는 자기 방어 시스템에 의해 aflatoxin B₁가 전부 세균의 세포 구성성분에 결합되지 않는 것으로 추정하였다. 하지만, Lee 등(2003)은 세균 세포 주위에 있는 aflatoxin B₁의 농도가 높을수록 세포와 상호 작용하는 aflatoxin B₁의 결합 속도는 증가되었다고 보고하였다. 따라서 이상의 결과를 요약하면, aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력은 균주마다 유의한 차이를 보이는데 이는 aflatoxin B₁이 결합되는 세포의 구조가 다르기 때문인 것으로 생각되며, 독소의 농도, 반응시간 및 온도와 초기 세포수 등의 배양 조건에 따라서도 aflatoxin B₁을 결합시키는 속도와 결합력에 차이가 있음을 알 수 있었다.

Aflatoxin B₁에 대한 유산균 세포의 결합력에 영향을 미치는 물리화학적 처리 조건

Aflatoxin B₁과 유산균 세포의 결합력에 대한 가열, 효소, pH, 금속이온, urea 및 sodium metaperiodate의 영향을 살펴본 결과는 Table 3과 같다. Aflatoxin B₁에 대한 *E. faecium* DJ22의 결합력은 80°C에서 30분 처리한 세포에서는 감소되지 않았으나, 100°C 이상의 온도에서 가열한 경우에는 유의하게 감소되었다 ($P < 0.05$). 또한 lipase에는 영향을 받지 않았지만, α -amylase, protease 및 lysozyme 처리한 경우에는 대조구에 비해 결합력이 유의하게 감소되었다. 약산성 내지는 중성의 pH에서는 결합력이 안정하였으나, pH 4.0 이하에서는 유의하게 낮은 값을 보였다 ($P < 0.05$). 그리고 NaCl, urea 및 sodium metaperiodate에 의해서도 결합력은 크게 감소되었음을 확인하였다. *L. fermentum* DJ35의 대조구 결합력은 $31.2 \pm 3.4\%$ 정도로 나타났는데 121°C에서 15분의 가열 처리와 pH 3.0–7.0의 범위에서도 대조구와 유사한 정도의 결합력을 유지하였다. 또한 α -amylase, lipase, protease, urea 및 sodium metaperiodate 처리 시에는 결합력이 다소 감소되었으나, 유의할 만한 수준은 아니었다. 하지만 lysozyme의 처리에 의해서 대조구에 비해 약 50% 정도의 활성이 감소되었고, NaCl과 MgCl₂에 의해서도 유의할 정도의 결합력이 감소되었다 ($P < 0.05$). *L. rhamnosus* DJ42는 80°C에서 30분 가열 처리에는 결합력이 안정하였으나, 가열 처리 온도가 높을수록 결합력이 현저하게 감소되었다. Lysozyme, urea 및 sodium metaperiodate의 처리에 의해서 결합력이 유의하게 감소되었다 ($P < 0.05$). 하지만 pH 3.0–7.0 범위에서와 α -amylase, lipase, protease 및 금속이온 처리에서도 결합력은 비교적 안정하였다. Aflatoxin B₁에 대한 *L. pentosus* DJ47의 결합력은 열에 매우 안정하여 121°C에서도 거의 변함없는 활성을 유지하였다. 하지만 lipase를 제외한 amylase, protease 및 lysozyme에 의해서 결합

Table 3. Effect of physico-chemical treatments on aflatoxin B₁ binding by lactic acid bacteria isolated from Korean traditional soybean paste

Physico-chemical treatment	Strain			
	<i>E. faecium</i> DJ22	<i>L. fermentum</i> DJ35	<i>L. rhamnosus</i> DJ42	<i>L. pentosus</i> DJ47
Control ^a	37.7±1.8	31.2±3.4	52.1±1.8	19.3±2.0
Heating	80°C, 30 min	36.9±1.7	29.9±1.4	50.0±2.2
	100°C, 20 min	30.0±2.4*	28.5±1.2	45.7±3.6*
	121°C, 15 min	21.1±2.2*	32.1±2.1	26.2±2.1*
Enzyme	α-Amylase	14.4±1.9*	29.2±1.5	50.8±3.4
	Lipase	36.9±2.9	28.8±1.7	51.6±1.1
	Protease	20.0±3.8*	27.9±1.8	50.2±2.3
	Lysozyme	18.4±3.1*	16.6±1.7*	20.8±1.4*
pH	3.0	19.6±1.7*	30.8±1.2	54.8±2.6
	4.0	26.4±3.1*	28.1±2.4	51.9±1.4
	5.0	34.5±1.2	32.2±1.6	53.4±1.6
	6.0	36.0±1.6	29.8±1.7	53.4±2.0
	7.0	37.8±2.3	31.9±1.6	53.3±1.5
Metal ion	NaCl	21.9±2.5*	20.3±2.5*	53.0±2.5
	MgCl ₂	35.6±2.7	24.6±1.8*	50.3±1.7
Urea		17.0±1.7*	28.4±2.4	34.8±1.3*
Sodium metaperiodate		11.9±1.5*	29.4±2.1	28.4±1.0*

^a Bacterial pellets (1.0×10¹⁰ CFU/ml) were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 24 h at 37°C. Data are means±SD from triplicate determinations.

* Significantly differ (*P*<0.05) from the control group by Student's *t*-test.

력이 유의하게 감소되었으며, pH 3.0–6.0 사이의 산성 영역에서 급격하게 감소되었다. Sodium metaperiodate 처리에도 유의할 만하게 감소되었으나, 금속이온과 urea에 의해서는 별다른 영향을 받지 않았다.

El-Nezami 등(1998a)에 따르면, 효과적으로 aflatoxin B₁을 제거하기 위해선 세포가 반드시 생존한 상태에서만 나타나는 것은 아니라고 하였으며, 세포를 불활성화 시키는 물리·화학적 처리가 세균의 aflatoxin B₁ 결합력을 완전하게 파괴시키지는 못했다고 보고하였다. 오히려 가열 처리가 세균의 aflatoxin B₁ 결합력을 점진적으로 증가시킨다고 하여 본 결과와 다소 차이가 있었다. 가열 처리는 polysaccharide와 peptide 혹은 단백질 사이에 maillard reaction 산물을 형성하거나 단백질 변성을 유발하므로 독소와의 결합력을 저하시킬 수 있으나(Haskard *et al.*, 2001), aflatoxin B₁에 대한 살아있는 세포와 121°C에서 20분간 가열 처리된 *E. faecium* M74와 EF031 균주의 독소 결합력에는 유의할만한 차이가 없었다고 밝혔다(Topcu *et al.*, 2010). Aflatoxin B₁에 대한 가열이나 산 처리된 *L. rhamnosus* GG세포의 결합력이 감소되지 않는 것은 aflatoxin B₁이 세포의 대사과정에 분해되는 것이 아니라는 것을 나타내며, 또한 이러한 처리조건이 살아있는 세포들의 결합위치를 변화시키거나 혹은 새로운 결합위치에 노출됨으로써 aflatoxin B₁이 결합할 수 있게 된다고 하였다(Haskard *et al.*, 2000). 또한 autoclaving은 세포의 단백질과 효소의 변성을 유발하나 이러한 고온 처리만으로는 강하게 결합된 aflatoxin B₁을 유리시킬 수 없었다고 하였다(Haskard *et al.*, 2001).

한편, 산은 polysaccharides의 glycosidic 연결을 파괴하여 단량체들을 유리시키고 단백질들 사이의 amide 연결을 분해시켜

펩타이드와 아미노산을 생성하게 된다. 그러므로 산 처리는 petidoglycan 구조를 파괴할 수도 있고, 세포의 정상 구조를 손상시킬 수도 있다. 세균의 세포벽에 peptidoglycan 층은 아무리 두껍다고 할지라도 낮은 pH에서는 세포벽의 두께가 감소되고 교차연결이 붕괴되면서 세포벽의 공극을 증가시키게 된다. 게다가 산 처리는 단백질과 지질을 분해하므로 세균에 의한 aflatoxin B₁의 결합을 억제할 수도 있다(Haskard *et al.*, 2001). 그러나, Haskard 등(2001)은 산성 조건하에서는 세포벽이 파괴되어 polysaccharide와 peptidoglycan과 같은 세포벽 성분에 영향을 미쳐 독소의 결합력을 낮출 수 있으나, aflatoxin B₁은 세포벽이 손상되어도 세포막의 구성 성분들에도 쉽게 결합할 수 있어 낮은 pH 영역에서도 이들 독소는 결합이 가능하다고 하였다. 한편, 낮은 pH 영역에서 독소를 더 강하게 결합하는 것은 aflatoxin B_{2a}와 양자를 얻게 된 세균의 결합위치 사이에 수소결합이 강해진 것이라고 하였다(Haskard *et al.*, 2000).

Haskard 등(2000)은 aflatoxin B₁에 대한 *L. rhamnosus* GG세포의 결합력은 pH 2.5–8.5 범위에서 거의 변화되지 않았으므로 이들의 결합에 수소결합은 관여하지 않음을 알 수 있었고, 이 때문에 장내 환경 하에서도 유산균에 의한 aflatoxin B₁의 결합 효과는 나타날 것으로 가정하였다. *L. rhamnosus* GG를 pronase E로 처리한 경우 이들의 aflatoxin B₁에 대한 결합력을 유의하게 저해하였으므로 이는 독소 결합에 단백질이 관여함을 의미한다고 하였고, lipase 처리는 aflatoxin B₁의 결합력에 영향을 거의 주지 않았으므로 lipoteichoic acid와 같은 지질 성분은 결합에 관여하지 않는 것으로 보고하였다. Urea는 anti-hydrophobic agent로서 수소결합을 파괴하고 단백질을 변성시킴으로써 aflatoxin

Table 4. Effect of washes on aflatoxin B₁ binding by viable cell and non-viable cell of lactic acid bacteria from Korean traditional soybean paste

Strain	Viable cell ^a				Non-viable cell ^b			
	Washing frequency (times)				Washing frequency (times)			
	Control ^c	1	2	3	Control ^c	1	2	3
<i>E. faecium</i> DJ22	37.7±1.8	32.5±1.1*	29.5±1.9*	30.3±2.6*	30.0±2.4	25.4±1.7*	24.31.7*	20.32.3*
<i>L. fermentum</i> DJ35	31.2±3.4	29.8±1.7	21.9±1.6*	18.1±1.6*	28.5±1.2	23.5±2.1*	20.43.2*	14.91.6*
<i>L. rhamnosus</i> DJ42	52.1±1.8	50.5±1.9	48.2±2.0*	45.4±1.7*	45.7±3.6	42.9±1.2	40.12.5*	37.51.6*
<i>L. pentosus</i> DJ47	19.3±2.0	17.9±1.2	14.5±1.1*	11.7±1.2*	18.1±1.7	14.7±2.2*	11.5±1.5*	10.9±1.5*

^a Viable cell pellets with bound aflatoxin were washed by suspending in 1.5 ml of PBS containing no aflatoxin B₁ and incubated for 10 min at 37°C.

^b After heating at 100°C for 20 min, non-viable cell pellets with bound aflatoxin B₁ were washed by suspending in 1.5 ml of PBS containing no aflatoxin B₁ and incubated for 10 min at 37°C.

^c Viable or non-viable cell pellets were suspended in 1.5 ml of aflatoxin B₁ solution (5 µg/ml) and incubated for 24 h at 37°C.

Data are means±SD from triplicate determinations.

* Significantly differ ($P<0.05$) from the control group by Student's t-test.

B₁에 대한 *L. rhamnosus* GG세포의 결합력을 현저하게 감소시켰다고 보고하였는데, 이는 소수성 상호결합이 유산균 세포와 aflatoxin B₁ 사이에 작용한다는 것을 의미한다. 한편, periodate는 aldehyde와 carbon acid group에 대한 cis OH groups의 산화를 유발하여 aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력을 감소시켰으므로, 이는 aflatoxin B₁ 결합에 세균 세포의 당 성분이 관여하는 것을 의미한다고 하였다.

금속이온은 amino acid pyrolyzate에 대한 유산균의 결합력을 저해 한다는 사실은 이미 많은 연구에서 밝혀졌으나, 1가 양이온에 대한 영향은 극히 적었다고 알려져 있다. Haskard 등(2000)은 aflatoxin B₁에 대한 *L. rhamnosus* GG의 결합력은 Na⁺ 1가 양이온보다 Ca²⁺ 2가 양이온에 의해 유의하게 낮아졌다고 하였다. Aflatoxin B₁의 β-dicarbonyl 일부분에 대한 금속이온의 봉쇄에 의해 aflatoxin B₁의 결합은 저해되며, 금속이온의 크기는 복합체의 안정성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Morotomi and Mutai, 1986; Orrhage et al., 1994).

따라서 aflatoxin B₁을 결합시키는 유산균의 세포 구성성분은 가열이나 효소, pH 및 금속이온에 의해 일부 파괴되거나 변형되어 aflatoxin B₁에 대한 결합력이 감소되는 것으로 여겨진다. 특히, 유산균 세포에 lysozyme을 처리한 경우 세포벽이 용해되어 aflatoxin B₁에 대한 결합력이 현저하게 감소됨을 알 수 있었고, α-amylase, protease 및 sodium metaperiodate의 처리에 의해 결합력이 감소되는 것을 볼 때 aflatoxin B₁과 결합되는 성분은 세포벽에 존재하는 당이나 단백질을 짐작할 수 있었다. 결과적으로 유산균의 세포 구조와 물리·화학적 처리 조건에 따라 결합력에 유의한 차이가 있으며, 그 중에서도 urea 처리에 의해 결합력이 감소되는 것으로 보아 일부 유산균은 aflatoxin B₁과 소수성 상호결합을 하는 것으로 추정된다.

Aflatoxin B₁와 유산균 세포의 결합 안정성

Aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력을 세척횟수에 따라 측정하여 결합 안정성을 확인한 결과는 Table 4와 같다. *E. faecium* DJ22의 살아있는 세포와 100°C에서 20분간 가열처리한 세포의 결합 안정성은 비교적 약하게 나타나 1회 세척시에도 대조구보다 유의하게 감소되었다. 살아있는 *L. fermentum* DJ35 세포의

결합력은 세척 1회시에는 비교적 안정하였으나, 2회와 3회 세척했을 때에는 결합력이 현저하게 감소되었다. 하지만 가열 처리한 세포의 결합력은 1회 세척했을 때에도 대조구에 비해 유의하게 감소되었다($P<0.05$). *L. rhamnosus* DJ42의 살아있는 세포의 결합력은 52.1%이고 가열 처리한 세포의 결합력은 45.7%였는데 각각 세척 1회에서는 결합력이 비교적 안정하게 유지되었으나, 2회 세척했을 때에는 대조구의 결합력보다 약 4% 이상 감소되었다. *L. pentosus* DJ47의 살아있는 세포의 결합력은 세척 2회부터 유의하게 감소되었으나, 가열 처리한 세포의 결합력은 1회 세척했을 때에도 대조구에 비해 현저하게 감소되었으므로 aflatoxin B₁에 대한 유산균들의 결합 안정성은 다소 약하게 나타났다.

Peltonen 등(2001)의 보고에 따르면, *L. amylovorus* CSCC 5160의 균주는 세척횟수가 증가할수록 유리된 aflatoxin B₁의 양은 급격하게 증가하여 총 5회 세척한 직후 대조구의 약 94.4%의 aflatoxin B₁이 유리되었다. *L. amylovorus* CSCC 5197와 *Lactobacillus* LC ½은 대조구에 비해 각각 74.2와 27.8% 결합된 양이 감소되었고, 5회 세척 후 결합된 양은 각각 17.4%와 32.2% 정도로 유지되었다. 따라서 세척횟수에 따라 유산균-aflatoxin B₁ 복합체로부터 유리된 aflatoxin B₁의 양은 증가되었다고 하여 본 결과와 유사하게 나타났다. Haskard 등(2000)은 *L. rhamnosus* GG와 aflatoxin B₁의 복합체로부터 aflatoxin B₁이 유리되는 것은 이들 사이의 결합이 약한 비공유결합의 상호작용 때문인 것으로 설명하였다.

한편, *E. faecium* M74와 EF031 균주들과 복합체를 형성한 aflatoxin B₁이 첫 회 세척에 의해 소량 유리되었으나, 그 이후 세척에는 비교적 안정하게 유지되었다고 하였다(Topcu et al., 2010). Haskard 등(2001)에 따르면, aflatoxin B₁에 대한 살아있는 세포 및 가열과 산 처리된 세포의 결합력은 비교적 안정하게 유지되었고, 121°C에서의 가열처리와 초음파 처리된 세포는 물로 5회 세척하더라도 aflatoxin B₁을 결합을 끊을 수 없었다고 하였다. 유산균 세포와 aflatoxin B₁ 사이의 결합은 가역적이며, 복합체의 결합력 세기는 균주, 처리 및 환경조건에 의존하여 상이한 차이가 있다고 보고하였다. Niderkorn 등(2009)에 의하면, 진균독과 유산균 상호작용의 강도는 peptidoglycan 구조 중 아미

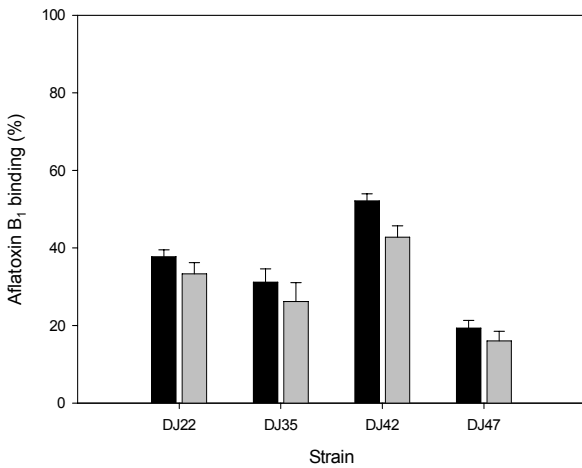


Fig. 1. Aflatoxin B₁ binding of the whole cells (■) and cell wall fractions (▒) obtained from the tested strains. Bars represent means of triplicate assays and error bars represent SD.

노산 구성성분에 의해 결정된다고 밝힌 바 있다.

Aflatoxin B₁에 대한 유산균 세포벽의 결합력

유산균의 세포벽에 결합된 aflatoxin B₁의 양을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 살아있는 *E. faecium* DJ22에 의해 결합된 양은 37.7±1.8%이고, 세포벽에는 33.3±2.9% 결합되었다. *L. fermentum* DJ35의 살아있는 세포와 세포벽 각각에 결합된 aflatoxin B₁의 양은 31.2±3.4%와 26.2±4.9%로 확인되었다. *L. rhamnosus* DJ42의 세포벽에 부착된 aflatoxin B₁의 양은 살아있는 세포의 결합력에 약 82%에 달했다. Aflatoxin B₁에 대한 살아있는 *L. pentosus* DJ47 세포의 결합력은 19.3%에 비해 세포벽에 결합된 양은 16.0±2.5%로 측정되어 이미 보고된 결과에서 밝힌 균주들과 비교할 때, 균주별 aflatoxin B₁의 결합력에 차이가 나타나는 것은 세포벽 구조의 차이 때문인 것으로 추정된다.

Peltonen 등(2001)은 유산균에 의한 aflatoxin B₁ 제거 메커니즘은 주로 세균 세포벽이나 세포벽 구성성분에 aflatoxin B₁을 결합시킴으로써 나타난다고 보고한 바 있다. Haskard 등(2001)에 의하면, 유산균의 세포 표면 구성성분에 aflatoxin B₁이 결합된다고 하였으며, Haskard 등(2000)은 당이나 단백질 등 *L. rhamnosus* GG 세포벽의 특이한 성분이 파괴될 경우 aflatoxin B₁에 대한 결합력이 감소되었다고 하였으며, 많은 세포성분들이 aflatoxin B₁ 결합에 관여한다고 하였다. 비록 지금까지 세균 세포에 의한 aflatoxin B₁의 결합 메커니즘은 완전하게 밝혀지지 않았지만, 세포벽의 다당류와 peptidoglycan 및 단백질은 aflatoxin B₁을 비롯한 다양한 독소들을 결합시키는데 관여하는 주요 성분이다(Lahtinen et al., 2004). 온전한 세포일 때 결합이 어렵더라도 세균 세포벽에 가해진 충격은 세포벽과 세포막의 구성성분에 aflatoxin B₁가 결합될 수 있도록 도와준다고 알려져 있다(Orrhage et al., 1994). 게다가 aflatoxin B₁은 세균 세포와 약하게 결합하고 세균의 표면에 수소성 포켓들과 관련된 비공유 상호작용에 의해 결합된다고 추정하고 있다(Haskard et al., 2001; Peltonen et al., 2001). *Lactobacillus gasseri*의 세포벽 다당류는 amino acid pyrolyzate을

결합시키는 자리를 가지고 있으며, 포도당 분자는 독소 결합에 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다(Orrhage et al., 1994). 유산균과 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 세포에 대한 aflatoxin B₁의 결합은 물리적인 흡착에 의한 것으로 이들 사이에는 주로 약한 반데르발스 힘, 수소결합이나 소수성 결합이 작용한다고 알려져 있다(Pizzolitto et al., 2011).

본 실험에 사용된 유산균은 각각의 세포에 부착된 aflatoxin B₁ 양중에서 약 80% 이상을 세포벽에 부착시키며, 앞의 결과와 종합해 볼 때, 이들의 결합력은 가열, 효소, pH 및 sodium metaperiodate에 영향을 받았으므로 세포벽 내에 존재하는 당이나 단백질에 주로 aflatoxin B₁이 결합됨을 알 수 있었다.

이상의 결과를 요약하면, aflatoxin B₁의 존재 가능성이 높은 식품이나 사료에 의한 위해를 감소시키기 위해 독소에 대한 결합력을 가진 유산균을 적용한다면 위험한 식이성 유해물질의 제거와 아울러 이로 인한 돌연변이 및 암 발생율을 감소시킬 수 있어 위해 인자로부터 소비자들의 건강을 보호하는데 유용할 것으로 기대한다. 진균독 결합 활성을 가진 유산균을 건강기능식품 및 의약품 성분으로 이용하여 섭취한다면 장내 진균독을 흡착시켜 배출시킬 수 있으므로 이들 유산균은 기능성 소재로서 활용 가치가 높을 것으로 판단된다. 만약 장내 상피세포에 부착된 유산균 세포와 독소의 복합체가 오랫동안 장관 내에 머무른다면 오히려 그로 인한 유해작용이 발생할 수 있으므로 장관 내에 존재하는 aflatoxin B₁의 효율적인 제거를 위해선, 독소가 장관 내에 흡수 되기 전에 유산균 세포가 진균독을 결합시켜 신속하게 배출해야 할 것이다. 따라서 좀 더 다양한 장내 환경조건이 결합력에 미치는 영향을 살펴보고 또한 장내 상피세포에 대한 유산균들의 부착력을 확인하여 독소가 신속하게 배출될 수 있는지에 관한 연구가 현재 진행 중이다.

적요

본 연구에서는 숙성된 된장으로부터 분리된 유산균에 의한 aflatoxin B₁의 결합 정도를 배양조건에 따라 측정하였고, 물리화학적 처리조건이 aflatoxin B₁에 대한 유산균 세포의 결합력에 미치는 영향을 살펴보았다. *Enterococcus faecium* DJ22, *Lactobacillus fermentum* DJ35, *Lactobacillus rhamnosus* DJ42 및 *Lactobacillus pentosus* DJ47는 19.3–52.1% 정도의 aflatoxin B₁ 결합 효과를 나타내어 균종에 따라 결합력에 차이가 있었다. 하지만 *E. faecalis* DJ14, *Lactobacillus panis* DJ29 및 *Pediococcus halophilus* DJ50 균주는 aflatoxin B₁에 대한 결합력을 나타내지 않았다. Aflatoxin B₁에 대한 유산균의 결합력과 결합속도는 독소의 농도, 반응시간 및 온도와 초기 세포수 등의 배양 조건에 따라 유의한 차이가 있었다. Aflatoxin B₁의 결합력은 세척 횟수에 따라 현저하게 감소하였고, 감소율은 살아있는 세포와 가열 처리한 세포에서 비슷하게 나타났다. 가열, 산성 pH, α-amylase, protease, lysozyme 혹은 sodium metaperiodate의 처리에 의해 결합력이 유의하게 감소된 것으로 보아 주로 세포벽에 존재하는 당이나 단백질에 aflatoxin B₁이 결합되며, urea의 처리에 의해 결합력이 낮아지는 것은 이들 사이에는 소수성 결합이 작용하는 것으로 추정되었다.

참고문헌

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Burns, A.I. and Rowland, I.R. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1**, 13–24.
- Cui, Y., Qu, X., Li, H., He, S., Liang, H., Zhang, H., and Ma, Y. 2012. Isolation of halophilic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented soybean paste and assessment of the isolates for industrial potential. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 797–806.
- Eaton, D.L. and Callanger, E.P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 135–172.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., and Ahokas, J. 1998a. Physicochemical alterations enhance the ability of diary strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.* **61**, 466–468.
- El-Nezami, H., Salminen, S., Ahokas, J., and Kankaanpaa, P. 1998b. Ability of strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 321–326.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767.
- Ferguson, L.R. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Muta. Res.* **307**, 395–410.
- Galvano, F., Piva, A., Ritiene, A., and Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *J. Food Prot.* **64**, 120–131.
- Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for used as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 139–157.
- Gopal, P.K. and Reilly, K.I. 1995. Molecular architecture of the lactococcal cell surface as it relates to important industrial properties. *Int. Dairy J.* **5**, 1095–1111.
- Gourama, H. and Bulleraman, L.B. 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 131–143.
- Haskard, C.A., Binnion, C., and Ahokas, J.T. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem. Biol. Interact.* **128**, 39–49.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., and Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3086–3091.
- Hirayama, K. and Rafter, J. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 391–394.
- Karunaratne, A., Wezenberg, E., and Bulleraman, L.B. 1990. Inhibition of mold growth and aflatoxins production by *Lactobacillus* spp. *J. Food Prot.* **53**, 230–236.
- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., and Ahokas, J.T. 2004. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Food Addit. Contam.* **21**, 158–164.
- Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat. Res.* **397**, 169–182.
- Lee, Y.K., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K.Y., Salminen, S., and Mykkanen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and non-viable bacteria. *J. Food Prot.* **66**, 426–430.
- Lim, S.M., Lee, G.J., Park, S.M., Ahn, D.H., and Im, D.S. 2006. Characterization of *Lactobacillus cellobiosus* D37 isolated from soybean paste as a probiotic with anti-cancer and antimicrobial properties. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 792–798.
- Lo, P.R., Yu, R.C., Chou, C.C., and Tsai, Y.H. 2002. Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a]pyrene. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 148–153.
- Morotomi, M. and Mutai, M. 1986. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J. Nat. Cancer Inst.* **77**, 195–201.
- Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Aboab, B., Lemaire, M., and Boudra, H. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 977–985.
- Orrhage, K., Sillerstrom, E., Gustafsson, J.A., Nord, C.E., and Rafter, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.* **311**, 239–248.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., and Salminen, S. 2001. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **84**, 2152–2156.
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, A.M., and Salvano, M.A. 2011. Binding of aflatoxin B₁ to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*: A useful model to determine the most efficient microorganism. Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology. In Guevara-Gonzalez, R.G. (eds.) InTech China, pp. 323–346.
- Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1029–1036.
- Topcu, A., Bulat, T., Wishah, R., and Boyac, I.H. 2010. Detoxification of aflatoxin B₁ and patulin by *Enterococcus faecium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, 202–205.
- Wogan, G.N. 1999. Aflatoxin as a human carcinogen. *Hepatology* **30**, 573–575.
- Wollowski, I., Ji, S.T., Bakalinski, A.T., Neudecker, C., and Pool-Zobel, B.L. 1999. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J. Nutr.* **129**, 77–82.
- Yoo, S.K., Cho, W.H., Kang, S.M., and Lee, S.H. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 113–117.