

## 된장에서 분리된 유산균의 결합력에 의한 Heterocyclic Amines 제거

임성미

동명대학교 식품영양학과

### Heterocyclic Amines Removal by Binding Ability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Soybean Paste

Sung-Mee Lim

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

(Received February 18, 2014 / Accepted March 18, 2014)

The objective of this study was to investigate the binding capacity and removal ability of lactic acid bacterial strains obtained from Korean soybean paste for mutagenic heterocyclic amines (HCAs) formed during cooking of protein-rich food at high temperature. Among 19 strains identified by carbohydrate fermentation and 16S rRNA sequencing, the live cell or cell-free culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* D11, *Enterococcus faecium* D12, *Pediococcus acidilactici* D19, *L. acidophilus* D38, *Lactobacillus sakei* D44, *Enterococcus faecalis* D66, and *Lactobacillus plantarum* D70 inhibited the mutagenesis caused by either 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) or 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The bacterial cells of the isolated strains showed greater binding activity than the pure cell wall, exopolysaccharide, and peptidoglycan. The carbohydrate moieties of the cell wall or protein molecules on the cell surface have a significant role in binding Trp-P-1 and Trp-P-2, since protease, heating, sodium metaperiodate, or acidic pH treatments significantly ( $P<0.05$ ) reduced the binding efficacy of the tested bacteria. Addition of metal ions or sodium dodecyl sulfate decreased the binding ability of *E. faecium* D12, *L. acidophilus* D38, and *E. faecalis* D66. Therefore, the binding mechanisms of these strains may consist of ion-exchange and hydrophobic bonds. Especially, the high mutagen binding by *L. acidophilus* D38 and *L. plantarum* D70 may reduce the accumulation or absorption of Trp-P-1 and Trp-P-2 in the small intestine via increased excretion of a mutagen-bacteria complex.

**Keywords:** heterocyclic amine, lactic acid bacteria, mutagen binding, soybean paste

생활습관 및 각종 공해물질뿐만 아니라 우리가 매일 섭취하는 특정 식이성분에 의해서도 심각한 질병이 유발될 수 있다. 즉, 식품의 제조, 가공 및 조리하는 과정 중에 생성되는 물질이나 의도적 혹은 비의도적으로 사용된 식품첨가물 및 유해 오염물질 등에 의해 돌연변이나 암이 발생된다. 인체에 유해한 식이성 돌연변이원은 DNA 부가물을 형성함으로써 뉴클레오타이드 변형 및 염색체 손상을 초래한다(Dipple, 1995).

특히 조리과정 중에 주로 발생하는 돌연변이원인 heterocyclic amines (HCAs)은 주로 육류나 생선을 비롯하여 계란, 콩, 우유 및 치즈 등 고단백 식품을 주로 굽거나 기름에 튀기는 과정 중 열 분해됨으로써 생성된다(Gaubatz, 1997). HCAs의 aminoimidazole 부분은 육류나 생선류의 creatine과 creatinine으로부터 생성되며, 그 외에도 Maillard 반응을 통해 아미노산과 당류의 반응물로부터 발생된다(Jägerstad *et al.*, 1991). 조리된 육류로부터 발생하는 HCAs은 약 20여 종으로 가장 대표적인 종류인 2-amino-

1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)은 creatinine, phenylalanine 및 glucose 혼합물의 가열에 의해 형성되므로 구운 쇠고기, 베이컨, 생선 및 가공육 내에 약 1-50 ng/g 정도 존재한다(Skog *et al.*, 1998). 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)은 creatinine, glycine 및 glucose의 가열처리 시 발생되며, 쇠고기 추출물 내에 수백 ppb 가량 함유된 것으로 알려져 있다. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)과 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)은 tryptophan 열분해 산물이며, 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1)과 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2)은 glutamic acid 열 분해물이다. 콩의 globulin 가열 과정 중에 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AaC)과 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAaC)도 tryptophan 으로부터 생성된다(Skog *et al.*, 1998).

*In vitro* 상에서 배양된 포유류의 세포는 HCAs에 의해 염색체 이상과 자매 염색분체 교환이 유도되었다(Tohda *et al.*, 1980). HCAs은 CYP1A2에 의해 대사적으로 활성화 되어 hydroxylamino 유도체를 생성하고, acetic acid 및 sulfuric acid와의 에스테르화

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

반응에 의해 DNA 부가물을 형성한다(Kato and Yamazoe, 1987). PhIP는 실험 쥐에 대장암과 유방암을 유발하였고(Ito *et al.*, 1991), Trp-P-2가 함유된 식이를 섭취한 쥐에서 방광암이 유발되었으며(Takahashi *et al.*, 1993), 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinolone (IQ)은 간세포에 심각한 종양을 초래하였다(Adamson *et al.*, 1990). HCAs의 생성량은 조리 온도와 시간에 영향을 받는데 일반적으로 높은 온도에서 조리한 경우 더 많은 양의 HCAs가 생성되는 것으로 알려져 있다(Skog, 1995). 따라서 가능한 HCAs의 생성을 최소화하고 이들 유해물질을 제거할 수 있는 효과적인 저감화 방법이 강구되어야 한다.

최근 연구결과에 따르면 유산균을 식이에 첨가하여 섭취시킨 후 관찰한 결과, IQ에 의해 유도된 대장암과 간암세포의 DNA 손상이 많이 개선되었다고 하였다(Knasmüller *et al.*, 2001). HCAs는 *Lactobacillus gasseri*의 세포벽에 주로 결합됨으로써 제거되었는데, 세포벽의 당 부분에는 돌연변이원에 대한 수용체가 존재하는 것으로 밝혀졌으며 포도당 분자가 HCAs의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Sreekumar and Hosono, 1998a). HCAs는 주로 그람 양성균의 peptidoglycan 층에 부착되며, 그람 음성균은 세포벽의 외막에 이들 유해물질을 부착시켜 제거한다는 결과가 보고되었다(Zhang and Ohta, 1991). 따라서 HCAs에 대한 유산균의 항돌연변이 활성에 의하여 유전적 질환 발생 위험을 낮추고, 암세포 증식의 초기 단계인 돌연변이 발생과 발암으로 진행되는 것을 억제하는데 효과적인 것으로 알려져 있다(Ferguson, 1994).

따라서 본 연구에서는 Trp-P-1 및 Trp-P-2로부터 유발된 *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100의 돌연변이에 대한 유산균의 억제 효과를 측정하였다. HCAs에 대한 유산균 세포의 결합력을 확인하였고, 결합에 관여하는 세포성분 및 돌연변이원과 세포 사이의 결합방식을 조사하였다. 또한 Caco-2 세포에 대한 유산균의 부착능을 조사하여 돌연변이원의 배출 가능성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 균주 배양 및 동정

본 연구에 사용된 균주는 전보(Lim *et al.*, 2006)에 보고된 된 장으로부터 분리한 유산균 총 19종을 대상으로 실험하였다. *Lactobacilli* MRS broth (BD Difco Co., USA)에서 배양하여 얻어진 실험 균주의 배양액은 20% glycerol(v/v) stock으로 제조하여 -80℃에서 보관하였고, 실험 직전에 MRS agar 사면배지 상에서 3회 계대 배양하여 활성을 높인 후 사용하였다. 선발된 균주는 Cenci 등(2002)에 따라 그람염색 후 세포의 형태, 효소 생성능, 산 및 가스 생성능, 질산 환원력, 암모니아 생성능 및 산소 요구성 및 염에 대한 내성 등 일반적인 형태학적 및 배양학적 특성을 살펴보았다. 또한 API 50CHL (bioMérieux Co., France)를 이용하여 당 분해능을 조사하였다.

유전자 염기서열 분석(16S rRNA sequencing)에 의한 동정을 위해 Zoetendal 등(1998)의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 즉, MRS broth 상에서 배양된 배양액(5 ml)은 1,500×g에서 5분

간 원심분리하여 세포 침전물만 모아 1 ml Tris-EDTA buffer (pH 8.0)에 현탁 시켰다. 세포 현탁액은 bead beating, phenol-chloroform 추출 및 ethanol 침전에 의해 세포의 DNA를 얻었다. 그런 다음 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR, Bio-Rad Laboratories Ltd., Canada)으로 유전자를 증폭(94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension) 시켰다. 전기영동으로 DNA band를 확인한 후 QIA quick PCR kit (QIAGEN, USA)로 정제하였다. 얻어진 산물은 sequencing을 통해 분석하였고, 염기서열은 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 database와 비교한 후 BLASTN program (version 2.0.8., Altschul *et al.*, 1990)으로 상동성을 조사하여 동정하였다.

### 돌연변이원 및 S9 분획물 제조

Trp-P-1과 Trp-P-2는 Wako Chemicals Inc. (Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 각 HCAs는 DMSO (dimethyl sulfoxide, 1 mg/ml)에 용해시켜 -20℃에 보관하였다. 실험 직전 5X phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 내에서 각 농도에 맞춘 다음 0.45 µm millipore membrane filter (USA)로 제균한 후 사용하였다. Aroclor 1254에 의해 유도된 쥐 간의 마이크로솜 분획물은 Molecular Toxicology Inc. (USA)로부터 구입하였고, 이는 간접 돌연변이원의 활성화를 위해 사용하였다. 그런 다음 Maron과 Ames (1983)의 방법에 따라 S9 fraction 10%, MgCl<sub>2</sub>-KCl salt 2%, 1 M glucose-6-phosphate 0.5%, 1 M nicotin adenine dinucleotide 4%, 20X PBS (pH 7.4)를 혼합한 뒤 여과 제균(0.45 µm, Roshi, Japan)하여 S9 mix를 준비하였다.

### 항돌연변이 활성 측정

Maron과 Ames (1983)의 preincubation Ames test에 따라 HCAs으로부터 유도된 *S. typhimurium* TA98과 TA100의 his<sup>+</sup> 복귀 돌연변이 유발에 대한 유산균의 항돌연변이 활성을 조사하였다. Frame shift mutant인 *S. typhimurium* TA98 (hisD3052, rfa, ΔuvrB)과 point mutant인 *S. typhimurium* TA100 (hisG46, rfa, ΔuvrB)은 histidine 영양요구주의 유전자형을 확인하기 위해 ampicillin (25 µg/ml)을 함유한 Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양액은 minimal glucose agar (중류수 1 L 중 magnesium sulfate 0.2 g, citric acid monohydrate 2 g, potassium phosphate dibasic 10 g, sodium ammonium phosphate 3.5 g, glucose 20 g, histidine 0.05 g, biotin 0.00074 g, ampicillin 0.025 g 및 agar 15 g 함유) 평판 배지에 접종하여 37℃에서 48시간 배양하였다. MRS broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 얻어진 배양액을 원심분리(7,000×g, 10분, 4℃)하여 유산균 세포 침전물(live cell pellet, LC)과 배양 상등액(cell-free culture supernatant, CFCS)으로 분리하였다. 이때 LC는 PBS 내에 현탁시켜 준비하였고, CFCS는 0.45 µm membrane filter로 여과시켰다. 유산균 LC 혹은 CFCS (100 µl), *S. typhimurium* TA98 혹은 TA100 배양액 (100 µl), 돌연변이원 시료 용액(100 µl) 및 0.5% S9 mix (500 µl)

을 멸균된 시험관에 넣고 압실 내 37°C에서 30분간 진탕한 다음, 혼합물을 0.05 mM L-histidine/biotine과 0.09 M NaCl을 함유한 molten top agar (0.5%, w/v) 2 ml에 첨가하여 vortexing한 다음 minimal glucose agar (1.5%, w/v) 평판배지 위에 부어 응고시켰다. 이때 사용된 HCAs의 농도는 plate당 1 µg을 사용하였다. 혼합물을 37°C에서 48시간 배양한 후 *his*<sup>+</sup> revertants 집락수를 계수하여 돌연변이 저해율을 측정하였다. 즉, 항돌연변이능(%)은  $[(a-b)/(a-c)] \times 100$ 의 계산식에 대입하였고, 이때 a는 LC 혹은 CFCS가 없는 상태 하에서 HCAs에 의해 유도된 histidine revertants의 수, b는 LC 혹은 CFCS가 존재하는 상태 하에서 HCAs에 의해 유도된 histidine revertants의 수 및 c는 HCAs이 없는 상태에서 자연 복귀 돌연변이 수를 나타내었다.

#### Cell wall (CW), peptidoglycan (PG) 및 exopolysaccharide (EP) 제조

유산균의 CW는 Gopal과 Reilly (1995)의 방법에 따라 제조하였다. MRS broth에서 배양한 유산균 배양액으로부터 얻어진 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)는 원심분리하여 세포 침전물을 회수한 후 멸균수에 현탁시켰다. 세포 현탁액은 sonicator (Qsonical, USA)를 사용하여 ice water bath 내에서 10초 간격으로 초음파 파쇄하였다. 원심분리(1,000×g, 10분, 4°C)에 의해 파쇄되지 않은 세포 잔해물은 제거하였고, 원심분리(15,000×g, 25분)하여 CW를 얻었다. CW는 PBS (pH 7.0)에 재현탁 시키고 이를 MRS agar 평판배지에 희석 접종하여 37°C에서 24시간 배양함으로써 세포가 초음파 처리에 의해 완전하게 파쇄되었는지를 확인하였다. 그런 다음, CW는 15 mM NaCl과 50 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane hydrochloride로 세척한 후 1X (pH 7.0)에 현탁시켜 50 µg/ml RNase와 DNase를 첨가하였다. 37°C에서 90분간 반응시킨 후 원심분리(15,000×g, 25분, 4°C) 해서 얻어진 CW는 PBS (pH 7.0)로 세척하고 20 g/L sodium dodecylsulfate (SDS)로 처리하고 난 후 70°C에서 2시간 가열 처리하여 세포막을 제거하였다. 분획물에 SDS를 제거하기 위해서 PBS (pH 7.0)로 세척하고 원심분리 한 다음 동결 건조하여 순수한 CW를 얻었다.

EP와 PG는 Sreekumar와 Hosono (1998c)의 방법에 따라 준비하였다. CW에 5%(w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 90°C에서 15분간 처리하고 난 후 혼합물은 냉각시켜 원심분리(11,000×g, 15분)에 의해 얻은 침전물(TCA 불용성 분획물)은 5% TCA로 세척하고 동결 건조시켜 PG를 얻었다. 한편, CW 분획물의 원심분리에서 얻어진 상등액(TCA 용해성 분획물)에 95%(v/v) ethanol을 2배 첨가하여 4°C에서 overnight 반응시켜 EP를 얻었다. 원심분리(2,000×g, 15분)하여 EP가 포함된 침전물을 얻어 ethanol과 ether로 세척한 다음 동결 건조시켰다.

#### HCAs에 대한 유산균 세포의 결합력 측정

MRS broth 상에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 세포를 모은 후, PBS (pH 7.0)로 세척하여 세포 현탁액을 제조하였다. 회수한 유산균 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)는 PBS (pH 7.0, 0.9 ml)에 부유시키고 0.1 ml HCAs (10 µg/ml)과 37°C에서 30분간 배양시킨 다음 원심분

리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 배양 상등액을 모은 후 0.45 µm membrane filter로 제균하였다. 동결 건조된 CW, EP 및 PG (2 mg)는 PBS 0.9 ml에 현탁 시키고 HCAs (0.1 ml)을 첨가하여 유산균 세포와 같은 조건으로 반응시켰다. 시료 내에 잔존하는 HCAs은 Sreekumar와 Hosono (1998c)의 방법에 따라 high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Japan)의 reverse-phase column (Shimpack CLC-ODS 6 mm×15 cm; Shimadzu)으로 분석하여 유산균 세포에 대한 HCAs의 결합력을 조사하였다. HCAs은 0.1 M citrate—0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 3.0): acetonitrile: triethylamine (50:50:0.05, v:v:v)의 이동상을 사용하여 1 ml/min의 유속으로 이동시키고 흡광도(254 nm)를 측정하였다. 유산균 세포에 대한 HCAs의 결합력은 다음 식에 따라 측정하였다. 결합력(%) =  $[1 - (\text{시료의 HCAs peak 면적} / \text{대조구의 HCAs peak 면적})] \times 100$ .

#### HCAs을 결합시키는 유산균 세포 성분 조사

HCAs의 결합에 관여하는 유산균 세포의 성분을 확인하기 위해 가열, 효소, 산 및 sodium metaperiodate 등을 처리한 세포에 대한 HCAs의 결합력을 조사하였다. MRS broth 내에서 배양된 배양액을 원심분리하여 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)를 PBS (pH 7.0)에 현탁 시킨 다음 100°C에서 20분간 가열 처리한 후 즉시 냉각시켰고, 5분간 vortexing하여 가열 시 형성된 응집물을 제거하였다. 효소(Sigma-Aldrich, 1 mg/ml)의 영향을 살펴보기 위해, 각각의 buffer에 용해시킨 α-amylase (50 mM sodium acetate, pH 6.0), pepsin (10 mM citrate, pH 2.0), trypsin (50 mM Tris-HCl, pH 8.0), proteinase K (50 mM Tris-HCl, pH 7.5), protease (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 및 lysozyme (50 mM sodium phosphate, pH 8.8) 등의 효소 용액을 준비하였다. 유산균 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)는 효소 용액에 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양시킨 다음, 5분간 가열 처리하여 효소 반응을 중지시켰다. 산에 대한 영향을 알아보기 위해 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)를 pH 2.0과 3.0으로 조정된 glycine-HCl buffer에 접종하여 37°C에서 2시간 배양하였다. 또한 10 mM acetate buffer (pH 4.5)에 용해시킨 sodium metaperiodate (Sigma-Aldrich, 50 mM) 용액에 유산균 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)를 처리하여 4°C에서 24시간 배양하고 난 후 ethylene glycol을 처리하여 혼합물 내에 존재하는 과도한 sodium metaperiodate를 제거하였다. 물리화학적 조건하에서 각각 처리한 후 HPLC를 이용하여 HCAs에 대한 유산균 세포의 결합력을 측정하였다.

#### HCAs와 유산균 세포 사이의 결합 방식 조사

유산균 배양액으로부터 모은 세포( $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml)를 PBS (pH 7.0)에 현탁 시킨 후 50 mM의 농도로 맞춘 SDS, NaCl 혹은 CaCl<sub>2</sub> 등의 금속이온 용액에 가하여 37°C에서 3시간 동안 진탕 배양시켰다. 각각의 조건에서 배양한 세포는 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 회수하였고, PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 나서 HCAs (10 µg/ml)과 37°C에서 24시간 배양하고 난 후 앞서 언급된 방법으로 HCAs에 대한 결합력을 조사하였다.

### Caco-2 세포에 대한 유산균의 부착력 측정

장내 상피세포 Caco-2 세포에 대한 유산균의 부착력은 Tuomola와 Salminen (1998)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. Korean Cell Line Bank로부터 분양 받은 Caco-2 세포는 1%(v/v) non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate 및 가열 처리(56°C, 30분)한 20%(v/v) fetal calf serum (Invitrogen-Gibco, USA)을 첨가한 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Invitrogen-Gibco)에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 한편, MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 실험 균주는 배양액은 원심분리(7,000×g, 20분, 4°C)하여 세포를 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 이때 유산균의 균수는 1.0×10<sup>10</sup> CFU/ml로 조정하여 non-supplemented DMEM에 접종하였다. Monolayer를 형성한 Caco-2 세포(5.0×10<sup>5</sup> CFU/ml)를 6-well tissue culture plate 내에 접종하고 난 후 DMEM 배지에 현탁된 유산균 세포를 첨가하였다. 5% CO<sub>2</sub>하에서 37°C, 2시간 배양 후 Caco-2 세포에 부착된 세포들은 PBS (pH 7.0)로 희석한 후 MRS agar 배지 상에서 평판배양법(37°C, 48시간)으로 유산균의 생균수를 측정하였다. 초기 접종한 균수에 대한 Caco-2 세포에 부착된 균수를 측정하여 부착율(%)을 계산하였다.

### 통계처리

돌연변이원에 대한 유산균의 결합력에 관한 실험은 각각 3회 측정하여 얻어진 값들은 평균±표준편차로 나타내었고, 측정값

들간의 SPSS program (version 12.0, SPSS, USA)의 paired t-test을 통해 유의수준 5% 하에서 유의성 검증을 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유산균 동정

된장으로부터 분리하여 본 연구에 사용된 유산균은 전보(Lim *et al.*, 2006)에서 항암 및 항균활성을 조사하여 보고한 바 있는 균주 19종이며, 이들의 API 50CHL에 의한 당 발효능과 16S rRNA sequencing에 의한 균주 동정 결과는 Table 1과 같다. 된장에서 분리된 유산균은 *Enterococcus faecalis* D08, *Lactobacillus acidophilus* D11, *Enterococcus faecium* D12, *Pediococcus acidilactici* D19, *Pediococcus pentosaceus* D21, *Leuconostoc mesenteroides* D23, *Lactobacillus fermentum* D37, *L. acidophilus* D38, *Lactobacillus sakei* D44, *Pediococcus halophilus* D49, *E. faecalis* D51, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* D59, *L. fermentum* D60, *Lactobacillus plantarum* D70, *Lactobacillus pentosus* D74, *Lactobacillus rhamnosus* D78, *Leuconostoc* sp. D82 및 *Enterococcus casseliflavus* D86으로 동정되었다.

Kim 등 (2009)은 PCR-denaturing gradient gel electrophoresis 분석에 따라 우리나라 전통 된장 내 주로 분포하는 미생물의 다양성을 조사한 결과 *L. mesenteroides*, *Tetragenococcus halophilus* 및 *E. faecium* 등이 유산균들이 우점종으로 확인되었다고 보고하였다. 그 외에도 *L. sakei*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *Weissella viridescens*, *Weissella confuse*, *Carnobacterium plestocenium*

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

Strain	Carbohydrate fermentation		16S rRNA sequencing		Identification
	Species affiliation	Confidence (%)	Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)	
D08	<i>Enterococcus faecium</i>	96.2	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803 (NR040789)	99.0	<i>Enterococcus faecalis</i>
D11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	98.7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> EMBS082 (KC150145)	99.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
D12	<i>Enterococcus faecium</i>	97.5	<i>Enterococcus faecium</i> JZ1-1 (JQ067694)	98.4	<i>Enterococcus faecium</i>
D19	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99.2	<i>Pediococcus acidilactici</i> LAB5 (JN039351)	99.8	<i>Pediococcus acidilactici</i>
D21	<i>Pediococcus acidilactici</i>	93.8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SWU62978 (KF673544)	98.9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
D23	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98.9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DM1-2 (EF579728)	99.5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
D37	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	99.5	<i>Lactobacillus fermentum</i> HT3 (JF414109)	99.8	<i>Lactobacillus fermentum</i>
D38	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	98.4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132 (HM162411)	99.9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
D44	<i>Lactobacillus sakei</i>	97.2	<i>Lactobacillus sakei</i> NBRC3541 (AB680110)	98.7	<i>Lactobacillus sakei</i>
D49	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	95.8	<i>Pediococcus halophilus</i> JCM5888 (AB596938)	97.9	<i>Pediococcus halophilus</i>
D51	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.1	<i>Enterococcus faecalis</i> YN3 (JX197373)	99.3	<i>Enterococcus faecalis</i>
D59	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	96.0	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM6124 (AB596935)	98.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
D60	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98.6	<i>Lactobacillus fermentum</i> Lb11 (JX202610)	99.7	<i>Lactobacillus fermentum</i>
D66	<i>Enterococcus faecium</i>	96.3	<i>Enterococcus faecalis</i> LZEF-Y4 (KC150142)	98.6	<i>Enterococcus faecalis</i>
D70	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.2	<i>Lactobacillus plantarum</i> BM-1 (JX244152)	99.8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
D74	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97.4	<i>Lactobacillus pentosus</i> LT32 (JQ288726)	98.2	<i>Lactobacillus pentosus</i>
D78	<i>Lactobacillus paracasei</i>	94.7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HT2 (JF414108)	97.9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
D82	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	82.9	<i>Leuconostoc</i> sp. JCM8610 (KF026048)	98.6	<i>Leuconostoc</i> sp.
D86	<i>Enterococcus faecalis</i>	95.1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> JM47 (KC461188)	98.0	<i>Enterococcus casseliflavus</i>

등의 유산균이 분리되었다고 하였다. Nam 등(2012)은 된장 내에 유산균이 차지하는 비율은 약 39.8-77.7%에 이른다고 보고하였고, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *Lactobacillus halophilus*, *L. mesenteroides*, *P. acidilactici* 등이 동정되어 본 연구에서 분리된 균주와 일치하는 균종이 다수를 차지하는 것으로 확인되었다. 특히, *T. halophilus*와 같은 호염성 세균은 일본 전통 된장인 *miso* 내에 주로 분포하면서 *miso* 된장의 숙성 과정에서 이취 발생을 억제하고 풍미를 향상시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Yoo *et al.*, 2000). 된장의 주요 유산균인 *E. faecium*의 경우 bacteriocin을 생산하여 식중독균을 비롯한 각종 유해균 및 기타 잡균의 번식을 억제시킬 수 있다고 보고한 바 있다(Yoo *et al.*, 1999).

### 항돌연변이 활성

유산균의 LC와 CFCS를 분리한 다음, Ames test에 따라 Trp-P-1 (1 µg/plate)과 Trp-P-2 (1 µg/plate)에 대한 항돌연변이 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *E. faecalis* D08, *P.*

*acidilactici* D19, *P. pentosaceus* D21, *L. mesenteroides* D23, *L. fermentum* D37, *P. halophilus* D49, *E. faecalis* D51, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* D59, *L. fermentum* D60, *L. pentosus* D74, *L. rhamnosus* D78, *Leuconostoc* sp. D82 및 *E. casseliflavus* D86의 LC와 CFCS 모두 Trp-P-1에 대한 항돌연변이 활성이 나타나지 않았다. 하지만, *E. faecium* D12, *L. acidophilus* D38, *E. faecalis* D66 및 *L. plantarum* D70의 LC는 *S. typhimurium* TA98의 *his*<sup>+</sup> revertants를 46.5-61.6% 억제시켰고, *S. typhimurium* TA100에 대한 49.0-76.3% 정도의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 이와는 달리 *L. acidophilus* D11 및 *L. sakei* D44의 LC에 의해서는 항돌연변이 활성이 나타나지 않았지만, *S. typhimurium* TA98에 대해선 CFCS에 의해 각각 67.6%와 37.7%의 억제 효과가 나타났다.

Trp-P-1에 대한 항돌연변이 활성을 나타낸 대부분의 균주는 Trp-P-2에 대해서도 활성이 있는 것으로 확인되었다. 특히, *S. typhimurium* TA98의 *his*<sup>+</sup> revertants는 *L. plantarum* D70의 LC에 의해서 가장 높게 억제되었고(55.5%), *S. typhimurium* TA100의

**Table 2.** Antimutagenic activity of LC and CFCS obtained from lactic acid bacteria against Trp-P-1 and Trp-P-2 in *S. typhimurium* TA98 and TA100

Strain	Number of revertants (plate) / Inhibition (%)							
	Trp-P-1 (1 µg/plate)				Trp-P-2 (1 µg/plate)			
	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100		<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	LC	CFCS	LC	CFCS	LC	CFCS	LC	CFCS
<i>Enterococcus faecalis</i> D08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> D11	ND	12,500 / 67.6	ND	630 / 67.9	ND	58,200 / 48.0	ND	800 / 63.6
<i>Enterococcus faecium</i> D12	20,600 / 46.5	ND	900 / 49.0	ND	63,600 / 43.2	ND	430 / 85.0	ND
<i>Pediococcus acidilactici</i> D19	ND	ND	ND	ND	85,300 / 23.8	91,400 / 18.4	720 / 68.2	1,100 / 46.3
<i>Pediococcus pentosaceus</i> D21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> D23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> D38	15,700 / 59.3	ND	800 / 56.0	ND	74,000 / 33.9	ND	810 / 63.0	ND
<i>Lactobacillus sakei</i> D44	ND	24,000 / 37.7	ND	1,200 / 28.0	ND	91,000 / 18.8	ND	960 / 54.4
<i>Pediococcus halophilus</i> D49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> D51	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> D59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> D60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> D66	19,700 / 48.9	ND	780 / 57.4	ND	55,400 / 50.5	ND	680 / 70.6	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> D70	14,800 / 61.6	ND	510 / 76.3	ND	49,900 / 55.5	ND	750 / 66.5	ND
<i>Lactobacillus pentosus</i> D74	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> D78	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc</i> sp. D82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus casseliflavus</i> D86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Data are means from triplicate determinations.

ND; Not detected.

In *S. typhimurium* TA98, the number of histidine revertants induced by Trp-P-1 in the absence of the live cells (LC) or cell-free culture supernatant (CFCS) was 38,500 revertants/µg.

In *S. typhimurium* TA100, the number of histidine revertants induced by Trp-P-1 in the absence of the LC or CFCS was 1,600 revertants/µg.

In *S. typhimurium* TA98, the number of histidine revertants induced by Trp-P-2 in the absence of the LC or CFCS was 112,000 revertants/µg.

In *S. typhimurium* TA100, the number of histidine revertants induced by Trp-P-2 in the absence of the LC or CFCS was 1,900 revertants/µg.

In *S. typhimurium* TA98, the number of spontaneous *his*<sup>+</sup> revertants in the absence of the Trp-P-1 or Trp-P-2 was 28 revertants/µg.

In *S. typhimurium* TA100, the number of spontaneous *his*<sup>+</sup> revertants in the absence of the Trp-P-1 or Trp-P-2 was 171 revertants/µg.

*his*<sup>+</sup> revertants는 *E. faecium* D12의 LC에 의해 85.0%로 가장 높게 억제되었다. 특히, 다른 균주들과는 달리 *P. acidilactici* D19의 LC와 CFCS 모두 Trp-P-1에 대해선 항돌연변이 활성을 나타내지 않았지만, Trp-P-2에 대해서는 활성이 나타났다. 따라서, HCAs에 대한 유산균의 항돌연변이 활성은 균종에 따라 유의적인 차이가 있었고, 또한 동일한 균종 일지라도 HCAs의 종류와 세포의 배양산물에 따라서도 활성에 차이가 있었다. 특히, 유산균의 LC에 의한 항돌연변이 효과는 돌연변이원을 세포에 부착 시킴으로써 나타난 것으로 추정되며, CFCS에 의한 항돌연변이 활성은 세포가 배양과정 중 생산한 물질에 의하여 돌연변이 유발이 억제된 것으로 사료된다.

일부 장내세균이나 유산균들은 육류나 어류 내에 포함된 아미노산의 열분해 산물인 HCAs과 같은 발암성 물질을 무독화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 이미 보고된 바 있다(Orrhage et al., 1994; Sreekumar and Hosono, 1998b; Knasmüller et al., 2001; Nowak and Libudzisa, 2009). Yun (2005)은 natto에서 분리된 총 8균주의 *Bacillus natto* 균주는 Trp-P-2와 IQ에 대한 55-75%와 69-85%의 항돌연변이 활성을 나타내었고, 이들의 세포질 성분들에 의해 높은 항돌연변이 활성이 나타났으며, 이는 정상 세포의 활성보다 더 높게 나타났다고 하여 본 결과와 다소 차이가 있었다. *L. casei*는 니트로세이트된 육 추출물에 의해 유도된 돌연변이를 효과적으로 억제할 수 있었으나, CFCS는 항돌연변이 효과가 매우 미미하거나 거의 나타나지 않았다고 하였다. 게다가 돌연변이원에 의해 유발된 염색체 이상과 소핵 유발은 유산균에 의해 약 80% 감소되었다고 보고하였다(Renner and Munzner, 1991). IQ, MeIQx 및 PhIP 등의 대사작용과 흡수에 대한 probiotic 균주 *L. casei* DN 114001의 영향을 알아보기 위해 HCAs를 유산균과 MRS broth에서 24시간 혼합 배양했을 때 IQ와 PhIP는 약 98-99% 감소되었고, MeIQx는 약 27% 낮아졌다고 하여 HCAs의 대사와 흡수에 유산균이 유용한 영향을 미치는 것으로 보고하였다(Nowak and Libudzisz, 2009).

유산균이 암 세포 증식을 억제하고 악성 종양으로의 진행을 저지하는 효과는 항돌연변이 물질을 생산하거나 유산균 세포에 돌연변이원을 결합시켜 제거하는 능력에 의한 것으로 알려져 있다. 특히, *Bifidobacterium lactis*는 세포벽에 돌연변이원을 부착 시킴으로써 항돌연변이 효과가 나타났다고 밝혔다(Ljungh and

Wadström, 2006). Park 등(1998)은 요구르트로부터 분리된 *L. acidophilus*와 김치로부터 분리된 *L. mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 및 *P. acidilactici* 세포벽에 의한 항돌연변이 활성을 조사한 결과, MeIQ에 대해선 *L. plantarum* 세포벽의 항돌연변이 활성이 가장 강했고, Trp-P-2에 대해선 *L. fermentum*, *L. plantarum* 및 *L. acidophilus*에 의해서 가장 강한 활성이 나타났으며, 이들 유산균의 세포질에 대한 항돌연변이 활성은 세포벽에 비해 약하게 나타났다고 하였다. 반면, Lankaputhra와 Shah (1998)의 보고에 의하면, *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium* spp.의 항돌연변이 활성은 배양산물인 butyric acid와 acetic acid에 기인한다고 보고한 바 있어 *L. acidophilus* D11, *P. acidilactici* D19 및 *L. sakei* D44의 CFCS의 항돌연변이 활성도 이와 같은 대사산물에 의한 것으로 추정된다.

### HCAs에 대한 유산균 세포의 결합력

Ames test에 따라 유산균의 LC에 의해 돌연변이 활성을 나타내는 균주로부터 얻은 CW, EP 및 PG로부터 Trp-P-1 및 Trp-P-2의 결합력을 측정한 결과는 Table 3과 같다. *E. faecium* D12의 LC는 약 52.8%의 Trp-P-1을 결합시켰고, CW의 결합력은 LC와 유의적인 차이가 없었으나, EP와 PG는 LC에 비해 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 한편, D12 균주의 결합력은 Trp-P-1 보다 Trp-P-2에 대해 더 높게 나타났으며, LC, CW 및 PG의 결합력은 유의할만한 차이가 없었으나, EP는 47.1%로 다소 낮게 나타났다. *P. acidilactici* D19는 Trp-P-1에 대한 결합 효과를 나타내지 않은 반면, Trp-P-2에 대해선 LC와 CW 각각 45.5% 및 39.6%의 비슷한 수준을 보였으나, EP와 PG는 이보다 낮은 결합력을 나타내었다. *L. acidophilus* D38의 LC는 Trp-P-1을 높은 수준으로 결합시켰으나, Trp-P-2에 대해선 비교적 낮은 결합력을 보였고, 특히 CW, EP 및 PG의 결합력이 LC보다 낮게 나타났다. *E. faecalis* D66은 Trp-P-1 보다는 Trp-P-2에 대한 결합력이 더 높았고, 돌연변이원에 대한 LC의 결합력은 CW, EP 및 PG 보다 유의할 만한 수준으로 높게 나타났다. *L. plantarum* D70의 LC는 다른 균주들에 비해 Trp-P-1과 Trp-P-2를 매우 높게 결합시켰는데, 특히, CW는 Trp-P-1을 LC와 비슷한 정도의 결합력을 나타내었지만, EP와 PG의 결합력은 이보다 낮았다. 따라서 Trp-P-1과 Trp-P-2는 *E. faecium* D12, *P. acidilactici* D19,

**Table 3.** Trp-P-1 and Trp-P-2 binding of cell components of lactic acid bacteria obtained from Korean soybean paste

Strain	Mutagen binding (%)							
	Trp-P-1				Trp-P-2			
	Control (LC)	CW	EP	PG	Control (LC)	CW	EP	PG
<i>Enterococcus faecium</i> D12	52.8±5.5	49.3±3.4	35.4±2.8*	43.6±4.6*	62.7±2.3	55.6±3.8	47.1±7.8*	50.3±4.8
<i>Pediococcus acidilactici</i> D19	ND	ND	ND	ND	45.5±3.9	39.6±3.9	36.4±4.8*	36.4±4.9*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> D38	67.0±5.5	55.6±6.4*	39.3±4.6*	44.4±5.0*	40.6±3.0	37.6±3.9	21.7±2.1*	30.5±3.8*
<i>Enterococcus faecalis</i> D66	55.1±0.7	43.3±4.2*	30.1±5.1*	41.2±3.0*	78.5±6.0	66.4±5.7*	53.7±4.0*	60.2±7.2*
<i>Lactobacillus plantarum</i> D70	74.3±3.9	71.8±5.1	58.3±6.9*	57.4±3.2*	70.2±4.1	58.3±4.1*	56.4±7.0*	57.3±5.7*

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

ND; Not detected.

\* Significantly differ ( $P<0.05$ ) from the control group by paired *t*-test.

*L. acidophilus* D38, *E. faecalis* D66 및 *L. plantarum* D70의 세포벽 및 세포벽의 구성 성분에 주로 결합됨을 알 수 있었다.

몇몇 연구에 따르면, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus faecalis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* 및 *Bifidobacterium longum* 등의 유산균들의 세포에 HCAs를 결합 시킴으로써 항돌연변이 활성을 나타낸다고 보고하였다(Morotomi and Mutai, 1986; Hosono *et al.*, 1990; Orrhage *et al.*, 1994). Zhang과 Ohta (1991)의 결과, 중국 전통치즈에서 분리한 *Streptococcus cremoris* Z-25 세포에 부착되지 않은 Trp-P-1과 Trp-P-2는 각각 13.35%와 15.22%로 나타났고, CW에 부착되지 않은 양은 각각 29.25%와 31.56%로 측정되었다고 보고하여 본 연구의 균주들 보다 결합력이 비교적 높게 나타났다. 또한 *S. cremoris* Z-25, *L. acidophilus* IFO13951 및 *Bifidobacterium bifidum* IFO 14252는 Trp-P-1에 대해 가장 높은 결합을 나타낸 반면, 이들 균주들은 Glu-P-1 및 IQ에 대해선 매우 낮은 결합효과를 나타내었다.

Rajendran과 Ohta (1998)에 따르면, HCAs에 대한 일본 발효 식품인 miso로부터 분리한 25종 유산균의 결합력을 조사한 결과, 실험 균주 모두 Trp-P-1, Trp-P-2, MeAαC PhIP에 대해 강한 결합력을 보인 반면 Glu-P-1과 IQ에 대해선 유의할만한 결합력을 나타내지 않았다. 한편, *P. acidilactici* 균주의 세포 보다 순수 분리된 CW와 PG가 HCAs를 더 효과적으로 결합시킨다고 보고하여 본 결과와는 다소 차이가 있었다. Zhang과 Ohta (1991)에 따르면, *S. cremoris* Z-25, *L. acidophilus* IFO 13951 및 *B. bifidum* IFO 14252는 CW에 의해 Trp-P-1 (19.53-19.96 µg/mg)과 MeIQ (5.98-11.46 µg/mg)를 가장 많이 결합시킨 반면, 세포질의 성분에 의해선 결합효과가 나타나지 않았다고 하였다. 특히 CW로부터 얻어진 PG, 외막, glucan 및 mannan은 Trp-p-1을 가장 높게 결합시켜 이 물질에 의해 유도된 돌연변이를 효과적으로 저해할 수 있었다고 하였다(Zhang과 Ohta, 1993).

HCAs는 주로 PG와 외막에 결합되는 것으로 알려져 있으며, *Lactobacillus gasseri*의 HCAs 결합 수용체는 유산균 세포벽에 존재하는 당의 일부분이고, 그 중에서도 포도당 분자는 결합 반응에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌다(Sreekumar and Hosono, 1998c). Orrhage 등(1994)은 HCAs에 대한 장내 세균과 유산균의 결합력을 측정한 결과, 이들 세균의 세포 표면과 Trp-P-2 사이에는 비가역적 결합방식이 작용하였고, 또한 이들 세균은 PhIP를 약 50% 정도 결합시킬 수 있었으나, IQ와 MeIQx는 매우 약하게 결합시켰다.

따라서 유산균의 항돌연변이 활성은 균종, 세포벽의 구조 및 돌연변이원의 pH 및 화학적 구조 등과 같은 다양한 인자들에 의존한다고 알려져 있다(Sreekumar and Hosono, 1998b). 또한 돌연변이원에 대한 유산균 CW의 결합력은 균종과 돌연변이원의 종류에 따라 다소 차이가 있었으며, 식이성 돌연변이원의 결합은 세균의 CW에 기인 하였고, 그 중에서도 주로 PG와 EP가 결합에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Zhang and Ohta, 1991). 일부 연구자들은 유산균 세포벽과 HCAs 사이의 양이온 교환 및 세균 세포에 존재하는 당이나 단백질 성분이 돌연변이원 결합에 관여한다는 메커니즘을 제시하고 있다(Hosono *et al.*, 1990; Tanabe *et al.*, 1994a, 1994b).

## HCAs 결합에 관여하는 유산균 세포의 성분

유산균 세포를 물리화학적 조건 하에서 반응시킨 후 Trp-P-1과 Trp-P-2에 대한 결합력의 변화를 측정하여 돌연변이원 결합에 관여하는 세포의 성분과 결합 방식을 조사한 결과는 Table 4와 같다. *E. faecium* D12는 protease, trypsin, lysozyme 및 가열 처리한 후 Trp-P-1과 Trp-P-2에 대한 결합 효과가 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타났다. Trp-P-2에 대한 *P. acidilactici* D19의 결합력은 proteinase K, protease 및 lysozyme에 의해선 유의하게 감소된 반면, α-amylase, pepsin, sodium metaperiodate 및 가열 처리에 의해선 거의 변화가 없었다. 하지만 특이하게도 낮은 pH 하에서는 이들의 결합력이 오히려 유의하게 증가하였다. *L. acidophilus* D38은 α-amylase, pepsin, sodium metaperiodate 및 가열 처리에 의해선 결합력이 대조구와 비교적 비슷한 정도로 나타났으나, protease, trypsin, lysozyme 등의 효소와 산에 의해선 결합력이 급격하게 감소됨을 알 수 있었다. 하지만, HCAs에 대한 결합력은 *E. faecalis* D66을 lysozyme의 처리에 의해선만 결합력이 감소된 반면 그 외의 효소, 산 및 가열 처리는 결합력에 영향을 미치지 않았다. Trp-P-1과 Trp-P-2에 대한 *L. plantarum* D70의 결합력은 lysozyme, sodium metaperiodate 및 가열 처리 시 대조구의 결합력보다 유의하게 감소됨을 확인하였다. 이상의 결과에서 볼 때 lysozyme의 처리에 의해 실험 균주의 결합력이 유의하게 감소되었으므로 Trp-P-1과 Trp-P-2는 유산균의 세포벽에 주로 결합됨을 알 수 있었다. 또한 proteinase K, protease 및 trypsin 등의 단백질 분해 효소, sodium metaperiodate, 산 혹은 가열 처리에 의해 결합력이 감소된 것은 돌연변이원을 결합시키는 세포벽의 성분이 당이나 단백질인 것으로 확인되었으며, 이들 물리화학적 처리에 의해 결합부위가 파괴되었거나 일부 변형되어 결합력이 감소된 것으로 추정된다.

Sreekumar와 Hosono (1998a)는 *L. gasseri*의 세포벽에 의한 HCAs의 결합력은 당 함량과 직접적인 상관관계가 있다고 하였으며, 결합 위치는 세포벽에 있는 손상되지 않은 당 일부분이라고 하였다. Aldehyde와 carbon acid group의 cis OH groups을 산화시키는 sodium metaperiodate에 의해 유산균의 결합력이 감소되었으므로 돌연변이원을 결합시키는 것은 세균 세포 내의 당 성분이라고 보고한 바 있다(Haskard *et al.*, 2000). Trp-P-1과 Trp-P-2에 대한 *S. cremoris* Z-25의 결합력은 lysozyme과 α-amylase로 처리에 의해 급격하게 감소되었다고 하여 본 연구 결과와 일부분 일치하였다(Zhang and Ohta, 1991).

Lankaputhra와 Shah (1998)에 따르면 probiotic *L. acidophilus*와 bifidobacteria의 살아 있는 균주의 돌연변이원 결합에 의한 항돌연변이 효과는 가열 처리된 세포보다 더 높게 나타났다. 더욱이, 살아 있는 세포는 돌연변이원을 영구적으로 결합시킬 수 있었던 반면, 가열 처리한 세포에 의해선 쉽게 해리되었으므로 항돌연변이 활성을 가진 유산균의 세포를 살아있는 상태로 소비하거나, 돌연변이원의 효과적인 저해를 위해선 장내에서 유산균의 활성이 유지되어야 한다고 강조하였다. 한편, 살아있는 세포가 가열 처리한 세포보다 결합력이 높은 것은 살아있는 세포는 돌연변이원을 무독화시킬 수 있는 반응을 촉매하거나 활성을 잃게 하는 대사산물을 생산함으로써 항돌연변이 활성을 나타내는



것으로 추정하고 있다(Nowak와 Libudzisz, 2009). 세균 세포를 가열 처리하게 되면 polysaccharide, peptide 및 단백질 사이에 Maillard reaction 산물을 형성하거나 혹은 단백질 변성을 유발하므로 독소와의 결합력이 저하되는 것으로 보고되고 있다(Haskard *et al.*, 2001). 하지만, 가열 처리된 *L. rhamnosus* GG 세포의 돌연변이원 결합력이 감소되지 않은 것은 가열 처리 중에 살아남은 세포들의 결합위치가 변화되었거나 혹은 새로운 결합위치가 노출됨으로써 독성물질이 결합된 것으로 알려진 결과도 있다(Haskard *et al.*, 2000).

산성 영역에서 유산균은 세포벽 내에 존재하는 glycosidic 연결이 파괴되고, 단백질을 사이의 amide 연결이 분해될 뿐만 아니라 세포벽에 존재하는 단백질과 지질 성분이 변성됨으로써 세균의 돌연변이원 결합력이 감소된다(Haskard *et al.*, 2001). 하지만, Orrhage 등(1994)은 IQ에 대한 *L. acidophilus* NCFB1748의 결합력은 pH 3.0 하에서 더 효과적이라도 하였으며, pH 2.0에서 3시간 처리한 경우 bifidobacteria의 항돌연변이 활성은 대조구(pH 7.0) 보다 크게 상승하였다고 하였다. Lo 등(2004)에 따르면, *B. lactis*는 산 처리 하에서 생균수가 급격히 감소되었으나, 다른 균주들에 비해 가장 높은 항돌연변이 활성(71.5%)을 나타내었다고 하여, 생균수와 항돌연변이 활성과는 상관관계가 없다고 하였다. 산 처리로 인해 세균 세포벽의 투과력이 높아지게 되고, 낮은 pH 내에서 수소이온농도가 증가하게 됨으로써 돌연변이원과 세균의 결합위치 사이에 수소결합이 더욱 강해져 세포벽 혹은 세포막 구성성분에 대한 돌연변이원의 결합을 더 용이하게 한다고 El-Nezami 등(1998)과 Haskard 등(2000)은 보고한 바 있다.

한편, SDS를 처리한 *E. faecium* D12와 *E. faecalis* D66의 돌연변이원 결합력은 대조구에 비해 유의하게 감소되었으나, 금속 이온에는 영향을 받지 않았다. HCAs에 대한 *P. acidilactici* D19와 *L. plantarum* D70의 결합력은 SDS와 금속이온 처리에도 큰 변화가 없었다. Trp-P-1에 대한 *L. acidophilus* D38은  $\text{CaCl}_2$ 를 처리했을 때 대조구에 비해 유의하게 결합력이 감소되었으나, SDS나 NaCl을 처리했을 때는 유의할만한 차이가 없었다.

Yun (2004)의 보고에 의하면, *B. natto*의 세포벽은 Trp-P-2를 매우 강하게 결합시켰는데 이들의 활성은 금속이온의 농도에 따라 저해 효과가 높게 나타났다고 하였다. Tsuda 등(2008)에 따르면, HCAs에 대한 *L. plantarum* 301102로부터 얻어진 EP의 결합력은 pH에 의존하였으며,  $\text{Mg}^{2+}$  금속이온과 SDS의 처리에 의해 결합력이 크게 저하되었으므로 EP의 결합 메커니즘은 이온 교환과 소수성 결합에 의한 것으로 추정된다고 하였다. SDS는 단백질 내의 소수성 부분에 결합하여 단백질 간의 소수성 결합을 방해하는 역할을 하게 되므로 SDS 처리에 의해 결합력이 감소되는 *E. faecium* D12 및 *E. faecalis* D66 와 HCAs 사이의 결합은 소수성 상호 작용에 의한 것으로 추정된다.

유산균에 의한 amino acid pyrolyzate의 결합력이 금속이온에 의해 저해된다는 사실은 이미 많은 연구에서 밝혀졌으나, 1가 양이온에 대한 영향은 극히 적었다고 보고되었다. Haskard 등(2000)은 돌연변이원에 대한 *L. rhamnosus* GG의 결합력은 1가 양이온( $\text{Na}^+$ )보다 2가 양이온( $\text{Ca}^{2+}$ )에 의해 유의하게 낮아졌다고 하였다. Aflatoxin B<sub>1</sub>의  $\beta$ -dicarbonyl 일부분에 대한 금속이온의

봉쇄는 aflatoxin B<sub>1</sub>의 결합을 저해하며, 금속이온의 크기는 복합체의 안정성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Morotomi and Mutai 1986; Orrhage *et al.*, 1994). 유산균과 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 세포에 대한 aflatoxin B<sub>1</sub>의 결합은 물리적인 흡착에 의한 것으로 이들 사이에는 주로 약한 반데르발스 힘이나 수소결합이 작용한다고 밝혀진 바 있으므로(Pizzolitto *et al.*, 2011), SDS와 금속이온에 영향을 받지 않은 *P. acidilactici* D19와 *L. plantarum* D70 균주들이 Trp-P-1 및 Trp-P-2를 결합시키는데 이와 같은 결합력이 작용했을 것으로 추정한다.

### 유산균에 의한 HCAs의 배출 능력

유산균 세포에 돌연변이원을 결합시켜 체외로 배출 가능anzhi를 확인하기 위해 Caco-2 세포에 대한 유산균의 부착력을 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. Trp-P-1 및 Trp-P-2의 결합력이 높은 *L. acidophilus* D38과 *L. plantarum* D70 균주는 Caco-2 세포에 대한 부착력이 20% 이하인 것으로 나타났다. *E. faecalis* D66과 *E. faecium* D12의 부착력은 각각 40.2% 및 48.6%이며, *P. acidilactici* D19는 다른 균주에 비해 가장 높은 74.1%의 부착력을 나타내었다. 실험 균주 중 *L. acidophilus* D38과 *L. plantarum* D70은 Trp-P-1과 Trp-P-2에 대하여 높은 결합력을 나타내었으나, Caco-2 세포에 대한 부착력은 비교적 낮게 나타났다. 이는 세균 세포와 결합하는 돌연변이원과 장관 상피세포의 구조적 차이에 따라 결합 방식이 상이하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 Caco-2 세포에 대한 부착력이 낮은 *L. acidophilus* D38과 *L. plantarum* D70은 HCAs를 세포 표면에 결합시켜 체외로 배출시키는데 효과적인 것으로 사료된다.

*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* LC-705 및 *Lactobacillus* GG는 Caco-2 세포에 대한 부착력이 매우 높게 나타났으나, *L. casei* var. *rhamnosus*는 가장 낮은 부착력을 나타내어 상피세포에 대한 부착력은 균종에 따라 유의적인 차이가 있다고 보고된 바 있다(Tuomola *et al.*, 2000). Lakhtin 등(2006)에 따르면, lactobacilli 및 bifidobacteria는 세포 표면에 S-layer와 같은 부착 관련 인자를 가지고 있으므로 장내 상피세포에 부착이 가능하다고 하였고, Caco-2 세포에 대한 *Lactobacillus johnsonii* La1의

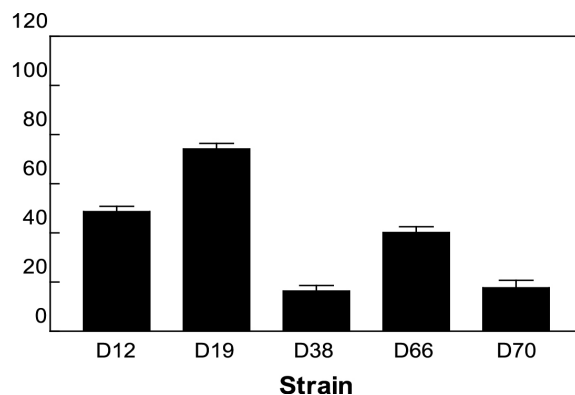


Fig. 1. Adhesion of lactic acid bacteria obtained from Korean soybean paste to Caco-2. Bars represent means of triplicate assays and error bars represent SD.



부착 메커니즘은 세균 세포 표면에 존재하는 비단백질성 인자인 lipoteichoic acid 및 EP와 관련 있다고 보고하였다(Granato *et al.*, 1999). 게다가 유산균과 상피세포 간의 정전기적 인력이나 소수성 결합 및 입체적인 힘의 작용에 의해 장내 상재균이 장관 내에 부착될 수 있다(Servin, 2003).

유산균은 돌연변이원과 복합체를 형성하여 배설을 촉진시킬 뿐만 아니라 장내 aflatoxin의 축적을 감소시키는데 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kankaanpää *et al.*, 2000). F344 쥐의 소장 내에서 HCAs의 흡착에 관한 유산균의 영향을 살펴본 결과, 소장 내 돌연변이원의 흡착율은 유산균이 없는 때보다 *S. thermophilus* 1131 균주가 존재할 때 유의하게 낮아졌다고 보고하였다(Terahara *et al.*, 1998). Surono 등(2009)에 의하면, *E. faecium* IS-27526으로 발효시킨 우유를 쥐에게 투여할 때 투여하지 않은 쥐에 비해 분변에 잔존하는 Trp-P-1의 양이 유의하게 감소됨을 확인하였다. 이는 IS-27526 균주의 돌연변이원 결합능력에 의하여 분변 내의 Trp-P-1의 회수율이 극히 낮은 것으로 나타났다. 이외에도 식이와 함께 유산균을 섭취한 임상실험에서도 분변 내에 돌연변이원의 배출량이 감소되었다고 보고하였는데(Lidbeck *et al.*, 1992; Hayatsu와 Hayatsu, 1993; Surono, 2004), 본 연구에서는 HCAs를 흡착시킨 유산균이 장관 상피세포에 부착되지 않으므로써 독성물질을 체외로 배출시킬 수 있을 것으로 확인되었다.

대표적인 발효 스타터인 유산균은 다양한 기능이 밝혀진 유용 균주로 알려져 있으며 본 연구에서는 이들의 항돌연변이 활성을 조사하였다. 단백질 함량이 높은 식품을 고온 하에서 조리하는 과정 중에 주로 발생하는 HCAs에 대한 유산균의 항돌연변이 활성에 의해 이들 독성물질로 인한 위험을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한 유산균 세포에 돌연변이원을 흡착시켜 배출함으로써 체내 잔존하는 독성물질의 양을 낮추고 이로 인한 돌연변이와 암의 발생률을 억제할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서 HCAs에 대한 항돌연변이 활성이 있는 유산균을 발효식품이나 건강 기능성 식품 및 의약품 소재로 활용할 경우 유산균의 산업적 응용 가치를 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 기대한다.

## 적 요

단백질이 풍부한 식품을 고온 하에서 조리하는 과정 중에 주로 발생하는 돌연변이원 heterocyclic amines (HCAs)에 대한 유산균의 결합력 및 제거능을 조사하였다. 당 발효능 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정된 19종의 유산균 중 *Lactobacillus acidophilus* D11, *Enterococcus faecium* D12, *Pediococcus acidilactici* D19, *L. acidophilus* D38, *Lactobacillus sakei* D44, *Enterococcus faecalis* D66 및 *Lactobacillus plantarum* D70의 세포이나 배양 상등액은 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)과 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-2)에 의한 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100의 돌연변이 유발을 억제할 수 있었다. HCAs에 대한 유산균 세포의 결합력은 cell wall, exopolysaccharide 및 peptidoglycan 보다 높게 나타났다. 한편, 이들의 결합력은 단백

질 분해효소, 가열, sodium metaperiodate 및 산 처리에 의해 유의하게 감소되었으므로 세포벽에 존재하는 당이나 단백질 성분이 이들 HCAs을 결합시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 또한 *E. faecium* D12, *L. acidophilus* D38 및 *E. faecalis* D66의 결합력은 SDS나 금속이온에 의해 감소되었으므로 이들 세포와 돌연변이원 사이에는 이온 결합이나 소수성 결합이 작용하는 것으로 추정되었다. 한편, HCAs 결합력이 높은 *L. acidophilus* D38과 *L. plantarum* D70은 장관 상피세포에 대한 부착력이 낮으므로 돌연변이원을 세포에 결합시켜 체외로 배출함으로써 독성물질을 제거하는데 효과적인 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

- Adamson, R.H., Thorgerirsson, U.P., Snyderwine, E.G., Thorgerirsson, S.S., Reeves, J., Dalgard, D.W., Takayama, S., and Sugimura, T. 1990. Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 10-14.
- 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.
- Cenci, G., Rossi, J., Trotta, F., and Caldini, G. 2002. Lactic acid bacteria isolated from dairy products inhibit genotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-Chromotest. *System. Appl. Microbiol.* **25**, 483-490.
- Dipple, A. 1995. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **16**, 437-441.
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Slaminen, S., and Ahokas, J. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.* **61**, 466-468.
- Ferguson, L.R. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* **307**, 395-410.
- Gaubatz, J.W. 1997. Heart damage associated with cooked meat mutagens. *Nutr. Biochem.* **8**, 490-496.
- 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**, 1095-1110.
- Granato, D., perotti, F., Masserey, L., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., and Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1071-1077.
- 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.
- Haskrad, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., and Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3086-3091.
- Hayatsu, H. and Hayatsu, T. 1993. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett.* **73**, 173-179.
- Hosono, A., Tanabe, T., and Otani, H. 1990. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolysates. *Milchwissenschaft* **45**, 647-651.
- Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama,

- S., and Sugimura, T. 1991. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* **12**, 1503–1506.
- Jägerstad, M., Skog, K., Grivas, S., and Olsson, K. 1991. Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutat. Res.* **259**, 219–233.
- Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., and Salminen, S.J. 2000. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *J. Food Prot.* **63**, 412–414.
- Kato, R. and Yamazoe, Y. 1987. Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**, 297–311.
- Kim, T.W., Lee, J.H., Kim, S.E., Park, M.H., Chang, H.C., and Kim, H.Y. 2009. Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 265–271.
- Knasmüller, S., Steinkeller, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C., and Kassie, F. 2001. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.* **480-481**, 129–138.
- Lakhtin, V.M., Aleshkin, V.A., Lakhtin, M.V., Afanas'ev, S.S., Pospelova, V.V., and Shenderov, B.A. 2006. Lectins, adhesions, and lectin-like substances of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Vestn. Ros. Akad. Med. Nauk.* **1**, 28–34.
- Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat. Res.* **397**, 169–182.
- Lidbeck, A., Overvick, E., Rafter, J., Nord, C.E., and Gustfsson, J.A. 1992. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in feces and urine in humans. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* **5**, 59–62.
- 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.
- Ljungh, A. and Wadström, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* **7**, 73–90.
- Lo, P.R., Yu, R.C., Chou, C.C., and Huang, E.C. 2004. Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test. *Int. J. Food Microbiol.* **93**, 249–257.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215.
- Morotomi, M. and Mutai, M. 1986. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J. Natl. Canc. Inst.* **77**, 195–201.
- Nam, Y.D., Lee, S.Y., and Lim, S.I. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 36–42.
- Nowak, A. and Libudzisz, Z. 2009. Ability of probiotic *Lactobacillus casei* DN114001 to bind or/and metabolise heterocyclic aromatic amines *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* **48**, 419–427.
- Orrhage, K.M., 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.
- Park, K.Y., Kim, S.H., and Son, T.J. 1998. Antimutagenic activities of cell wall and cytosol fractions of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Food Sci. Nutr.* **3**, 329–333.
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, A.M., and Salvano, M.A. 2011. Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*: A useful model to determine the most efficient microorganisms, Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology, pp. 323–346. In Guevara-Gonzalez, R.G. (eds.) In Tech China.
- Rajendran, R. and Ohta, Y. 1998. Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso, a fermented Japanese food. *Can. J. Microbiol.* **44**, 109–115.
- Renner, H.W. and Munzner, R. 1991. The possible role of probiotics as dietary antimutagen. *Mutat. Res.* **262**, 239–245.
- Servin, A.L. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 741–754.
- Skog, K.I., Johansson, M.A., and Jägerstad, M.I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 879–896.
- Skog, K., Steineck, G., Augustsson, K., and Jägerstad, M. 1995. Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis* **16**, 861–867.
- Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998a. The heterocyclic amino binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat. Res.* **421**, 65–72.
- Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998b. Antimutagenic activity and influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *J. Dairy Sci.* **81**, 1508–1516.
- Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998c. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultures milk against some heterocyclic amines. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1029–1036.
- Surono, I.S. 2004. The effect of freezing methods on binding properties towards Trp-P-1 and β-galactosidase activity of dadih lactic bacteria. *J. Microbiol. Ind.* **8**, 8–12.
- Surono, I.S., Pato, U., Koesnandar, A., and Hosono, A. 2009. *In vivo* antimutagenicity of dadih probiotic bacteria towards Trp-P-1. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **22**, 119–123.
- Takahashi, M., Toyoda, K., Aze, Y., Furuta, K., Mitsumori, K., and Hayashi, Y. 1993. The rat urinary bladder as a new target of heterocyclic amine carcinogenicity: tumor induction by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 852–858.
- Tanabe, T., Suyama, K., and Hosono, A. 1994a. Effect of sodium dodecylsulfate on the binding of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* with 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. *J. Dairy Res.* **61**, 311–315.
- Tanabe, T., Suyama, K., and Hosono, A. 1994b. Effect of pepsin, trypsin or bile acid on the binding of tryptophan pyrolysates by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* T-180. *Milchwissenschaft* **44**, 438–441.
- Terahara, M., Meguro, S.D., and Kaneko, T. 1998. Effects of lactic acid bacteria on binding and absorption of mutagenic heterocyclic amines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 197–200.
- Tohda, H., Oikawa, A., Kawachi, T., and Sugimura, T. 1980. Induction of sister-chromatid exchanges by mutagens from

- amino acid and protein pyrolysates. *Mutat. Res.* **77**, 65-69.
- Tsuda, H., Hara, K., and Miyamoto, T.** 2008. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J. Dairy Sci.* **91**, 2960-2966.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., and Salminen, S.J.** 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli after their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int. J. Food Microbiol.* **60**, 75-81.
- Tuomola, E.M. and Salminen, S.J.** 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 45-51.
- 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.
- Yoo, S.K., Kang, S.M., and Noh, Y.S.** 2000. Quality properties on soy bean pastes made with microorganisms isolated from traditional soybean paste. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 1266-1270.
- Yun, S.I.** 2004. The binding of *Bacillus natto* isolated from natto to heterocyclic pyrolysates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 469-474.
- Yun, S.I.** 2005. Antimutagenic effect of *Bacillus natto* isolated from natto. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 133-137.
- Zhang, X.B. and Ohta, Y.** 1991. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton by lactic acid bacteria on mutagens. *J. Diet. Sci.* **74**, 1477-1481.
- Zhang, X.B. and Ohta, Y.** 1993. Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolysates. *Mutat. Res.* **298**, 247-253.
- Zoethendal, E.G., Akkermans, A.D.L., and de Vos, W.M.** 1998. Temperature gradient gel host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859.