

동치미에서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19의 배양 조건에 따른 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine과 4-nitroquinoline-1-oxide에 대한 항돌연변이 효과

이창호 · 주길재^{1*} · 우철주

경북대학교 농과대학 식품공학과
¹농화학과

Antimutagenic Effects against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline-1-oxide on Cultrue Conditions of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 isolated from *Dongchimi*

Chang-Ho Rhee, Gil-Jae Joo^{1*} and Cheol-Joo Woo

Department of Food Science and Technology and ¹Agricultural chemistry,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* DLAB19 were investigated under various culture conditions to maximize the production of antimutagenic substance(s) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) on *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* TA100 and 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98. The MRS medium containing glucose (2%) as a carbon source and yeast extract (1%) as a nitrogen source resulted in the highest production of the antimutagenic substance(s) against both mutagens in the culture supernatant of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19. Optimal pH of the culture medium, culture temperature and shaking speed for the antimutagenic substance(s) production were pH 7.0, 30°C and 150 rpm, respectively. Under the optimal condition, the antimutagenic effects of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 culture supernatant were 96.4% against MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100 and 53.8% against 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98.

Key words – *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19, antimutagenic effects, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 4-nitroquinoline-1-oxide, *Dongchimi*

서 론

유산균은 인간에 의해 오랜 세월동안 산업적으로 이용

되어온 매우 중요한 세균의 하나로서 발효유, 치즈, 버터 등의 우유 가공품과 우리 나라 정통 발효 식품인 김치, 간장, 된장 등의 숙성에 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며, 또한 인간의 장, 구강 등에 존재하는 미생물 군으로 장 내에서 인간에게 유익한 작용을 나타내어 건강 유지에도 큰 역할을 담당하고 있다[6,15]. 특히 항암 활성, 정장 작용,

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-950-6854, Fax : 053-950-6853
E-mail : gjjoo@knu.ac.kr

부패 세균 억제 작용, 숙주의 면역 작용 활성화 등 각종의 건강 증진 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[7,9,18,19,21,29,30].

유산균이 인간의 건강을 증진시킬 수 있다는 것은 Mechnikoff[25]의 연구에 의해 밝혀진 후 Bogdanov 등[5]은 *L. bulgaricus*가 생산하는 glycopeptide는 강력한 항암 효과를 가지고 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 실험 동물을 이용한 유산균의 항암 효과 및 유산균의 세포를 이용한 항돌연변이 효과에 관한 연구가 이루어져 왔다[2,5]. 지금까지 유산균이 생산하는 항암 물질과 항돌연변이 물질은 glycopeptide [3,5,34,35], polysaccharide[1,25,38] 및 phosphopolysaccharide [27,28] 등 3종류가 알려져 있다.

유산균의 항암 활성 및 항돌연변이 효과의 기작은 첫째, 유산균은 돌연변이원 전구체를 돌연변이원으로 전환시키는 효소를 저해함으로써 항암 및 항돌연변이 작용을 가진다. 장내 세균의 β -glucosidase와 β -glucuronidase는 glucoside 나 glucuronide 화합물로부터 발암성의 배당체를 형성하고, nitroreductase와 azoreductase는 발암 전구 물질을 여러 조직에서 최종 발암 물질로 알려진 nitroso 화합물로 전환될 수 있는 방향족 아민 형성에 관여하는데 유산균은 이들 효소의 작용을 억제한다고 하였다[20,22,23]. 둘째, 유산균은 개체의 방어체계를 활성화[8]시킴으로써 interferon 유도, 항체 생성 및 세포성 면역 활성화 등의 기작에 의해 항암 작용을 하는 것이 밝혀졌다[16,17,31,32]. 유산균은 대식 세포와 임파구의 활성을 크게 증진[30]시킴으로써 항암 및 항종양 기능 그리고 영양과 치료 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[3,4,33]. 또한 유산균은 nitrosamine류를 비롯한 많은 돌연변이원에 대하여 결합능[10-14]이 있으며, 유산균중의 일부는 아미노산 피롤 화합물과의 높은 결합 능력을 가지고 있는 것으로 보고되었다[39].

이러한 유산균의 항암 및 항돌연변이 효과에 관한 연구는 대부분 유럽을 중심으로 발달한 발효 유제품으로부터 분리한 유산균을 대상으로 하여 진행되었을 뿐 우리나라 전통 발효 식품인 동치미에 관여하는 유산균의 항돌연변이 효과에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 동치미로부터 항돌연변이 효과가 강한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19를 이용하여 변이원 MNNG와 4-NQO에 대한 항돌연변이

원성 물질생산의 최적 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 균주

본 실험에 사용한 공시 균주는 동치미에서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 균주를 사용하였고 항돌연변이 효과와 돌연변이 효과를 측정하기 위한 히스티딘 영양요구주로서 *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* TA100 (hisG46, rfa, Δ uvrB)과 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98 (hisD3052, rfa, Δ uvrB)을 사용하였다[31].

균의 배양 및 배양 상징액의 조제

Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* DLAB19의 배양은 MRS 배지(bactopeptone 1.0%, meat extract 1.0%, yeast extract 0.5%, glucose 2.0%, tween 80 0.1%, sodium acetate 0.5%, tri-ammonium citrate 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.005%)를 사용하여 종 배양액을 5% (v/v)되게 접종한 후 30°C에서 24시간 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 상징액은 배양액을 25,000×g에서 10분간 원심 분리한 후 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Ames test에 의한 항돌연변이 효과 조사

시료의 돌연변이 및 항돌연변이원성 조사는 Ames test를 개량한 preincubation 방법[24,36,37]에 따라 행하였으며 히스티딘 영양요구주로서 point mutant인 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100 (hisG46, rfa, Δ uvrB)과 frame shift mutant인 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98 (hisD3052, rfa, Δ uvrB)을 사용하였고 His⁺ 복귀 돌연변이 정도를 조사하였다. 변이원으로서 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100의 경우 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 plate당 5 μ g되게 사용하였으며, *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98의 경우 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)를 0.25 μ g되게 사용하였다. 항돌연변이 효과 조사를 위하여는 미리 건열시킨 glass cap tube에 시료 용액을 일정 농도로 첨가하고 변이원을 50 μ l 첨가한 다음 여기에 영양배지에서 16시간 배양시킨 *S. enterica* serovar *typhimur*

ium TA 배양액 100 μ l와 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.5 ml를 첨가하였다. 이것을 37°C에서 30분간 preincubation한 다음 소량의 histidine/biotin이 첨가된 top agar 3 ml를 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar상에 중층하여 평판 고화 시킨 다음 37°C에서 48시간 배양하였다. 항돌연변이 활성은 상기의 고체 배지에서 생육하는 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니를 계수한 후 다음식으로 환산하여 His⁺ 복귀 돌연변이 저해율(inhibition ratio)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

- a: 변이원에 의해 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수
- b: 변이원과 시료 처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수
- c: 변이원과 시료 무처리시 유도된 His⁺ 복귀 돌연변이 콜로니 수

항돌연변이원성 물질의 생산을 위한 최적 조건의 조사

Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* DLAB19의 항돌연변이원성 물질 생산을 위한 배지 조성의 최적 조건을 규명하기 위하여 MRA 배지를 기본으로 하여 탄소원의 종류와

농도, 그리고 질소원의 종류와 농도를 각각 달리 첨가하여 사용하였다. 또한 항돌연변이원성 물질의 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 배양 온도 30°C, 진탕 속도 150 rpm으로 하여 초기 pH를 4.0에서 8.0까지 1.0간격으로 조절하여 항돌연변이 효과를 비교하였으며, 배양 온도의 영향은 초기 pH 7.0, 진탕 속도 150 rpm으로 하여 배양 온도를 20, 25, 30 및 40°C에서 배양하여 항돌연변이 효과를 비교하였다. 진탕 속도의 영향을 조사하기 위하여는 회전 진탕 속도를 0, 50, 100, 150 및 200 rpm으로 각각 달리하여 초기 pH 7.0, 배양 온도 30°C에서 배양한 후 상정액의 항돌연변이 효과를 비교하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

동치미로부터 분리한 유산균 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19의 항돌연변이성 물질의 생산을 위한 탄소원의 효과를 측정된 결과 Table 1과 같이 glucose를 첨가한 실험구에서 변이원으로 MNNG를 사용한 경우, point mutant인 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100에 대한

Table 1. Antimutagenic effects of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) based on its carbon source

| Carbon source (2%) | <i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> TA100 | | <i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> TA98 | |
|--------------------|---|------------------------------------|--|----------------------|
| | Revertant number (CFU) | Inhibition ratio (%) ¹⁾ | Revertant number (CFU) | Inhibition ratio (%) |
| Glucose | 178 ²⁾ | 94.9 | 116 | 50.8 |
| Fructose | 217 | 91.3 | 150 | 32.4 |
| Galactose | 726 | 44.5 | 163 | 25.4 |
| Sucrose | 523 | 63.2 | 162 | 26.0 |
| Lactose | 227 | 90.4 | 135 | 40.5 |
| Positive control | 1209 | | 210 | |
| Negative control | 123 | | 25 | |

The bacteria were cultured at 30°C for 24 hours in a liquid medium containing 2% various carbon sources instead of 2% glucose in MRS broth (bactopeptone 1.0%, meat extract 1.0%, yeast extract 0.5%, glucose 2.0%, tween 80 0.1%, sodium acetate 0.5%, tri-ammonium citrate 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, MnSO₄ · 4H₂O 0.005%). Antimutagenic effects of the bacterial culture supernatant (100 μ l/plate) were determined using *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100 and TA98 and were expressed as inhibition ratio (%) of His⁺ revertant. For the reversion, MNNG (5 μ g/plate) was used for *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100 and 4-NQO (0.25 μ g/plate) was used for *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98. Positive and negative controls represent the revertant number (CFU) per plate with or without mutagen, respectively.

¹⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

²⁾The values represent the mean average of at least trials that were performed in triplicate.

효과가 94.9%, 4-NQO를 사용한 경우, frame shift mutant 인 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98에 대한 효과가 50.8%로 가장 높게 나타났다. *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100인 경우에는 galactose를 2% 첨가시 다른 종류의 탄소원보다 효과가 미약하였으며, *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98에서는 galactose와 sucrose를 2% 첨가시 항돌연변이 효과가 30% 이하로서 낮게 나타났다. 또한 효과가 가장 높게 나타난 glucose 농도의 영향을 조사하기 위하여 glucose의 최종농도가 0%, 1%, 2%, 3% 및 4%되게 첨가하여 항돌연변이 효과를 측정 한 결과 Fig. 1에서와 같이 glucose의 최종농도를 2% 첨가한 실험구에서 각 변이원에 대한 항돌연변이 효과가 91.5%와 51.6%로 가장 높게 나타났다.

질소원의 영향

항돌연변이원성 물질의 생산을 위한 질소원에 대한 영향을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 yeast extract와 bactopectone 첨가시 항돌연변이 효과가 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100과 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98의 경우 모두 70%와 35%이상으로 실험에 사용한 질소원 중에서 가장 높은 효과를 나타내었다. 그리고 활성이 두 균주에 공통적으로 높게 나타난 yeast extract와 bacto-

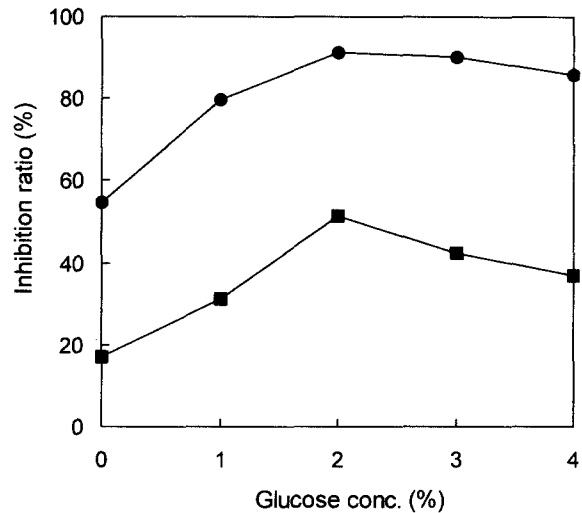


Fig. 1. Antimutagenic effects on the glucose concentrations as a carbon source for the culture of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

Bacteria were cultured in a liquid medium containing various concentrations of glucose instead of 2% in MRS broth. ●●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA 100, ■■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

ptone의 농도별 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. Yeast extract 농도별 항돌연변이 효과는 *S. enterica* serovar

Table 2. Antimutagenic effects of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO based on its nitrogen source

| Nitrogen source (1%) | <i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> TA100 | | <i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> TA98 | |
|----------------------|---|------------------------------------|--|----------------------|
| | Revertant number (CFU) | Inhibition ratio (%) ¹⁾ | Revertant number (CFU) | Inhibition ratio (%) |
| Yeast extract | 350 ²⁾ | 73.8 | 154 | 35.4 |
| Bactopectone | 376 | 71.4 | 152 | 36.4 |
| Polypeptone | 778 | 34.1 | 183 | 20.5 |
| Beef extract | 770 | 34.9 | 195 | 14.4 |
| Tryptone | 530 | 57.1 | 177 | 23.6 |
| Positive control | 1146 | | 223 | |
| Negative control | 68 | | 28 | |

The bacteria were cultured in a liquid medium containing various nitrogen sources instead of 1% bactopectone, 1% meat extract and 0.5% yeast extract in MRS broth. For the reversion, MNNG (5 µg/plate) was used for *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100 and 4-NQO (0.25 µg/plate) was used for *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98. Positive and negative controls represent the revertant number (CFU) per plate with or without mutagen, respectively.

¹⁾Significantly different from the control at the P<0.05 level.

²⁾The values represent the mean average of at least trials that were performed in triplicate.

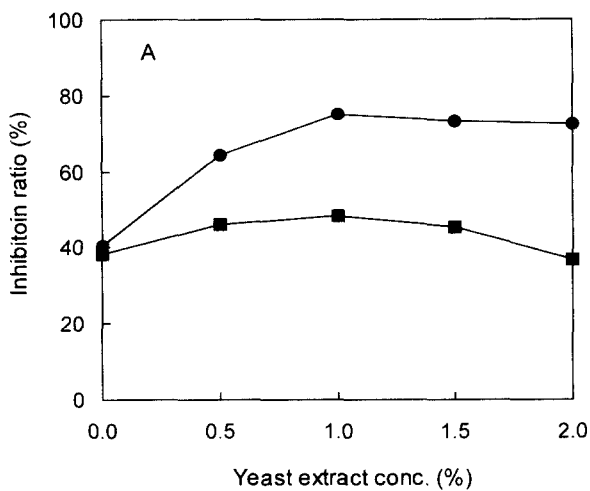


Fig. 2A. Antimutagenic effects on the yeast extract concentrations as a nitrogen source for the culture of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

Bacteria were cultured in a liquid medium containing various concentrations of yeast extract instead of 1% bacto-peptone, 1% meat extract and 0.5% yeast extract in MRS broth. ●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

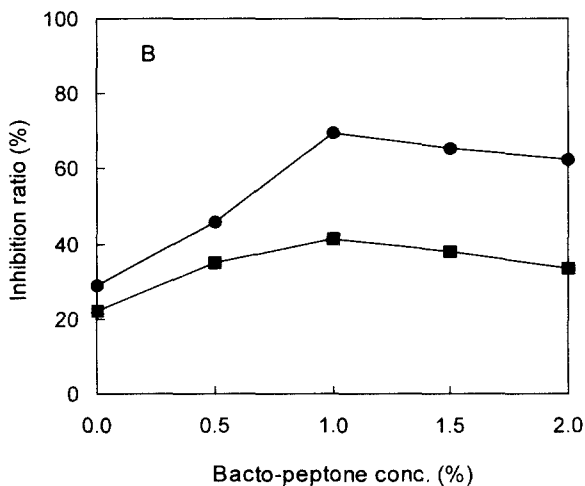


Fig. 2B. Antimutagenic effects on the bacto-peptone concentrations as a nitrogen source for the culture of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

Bacteria were cultured in a liquid medium containing various concentrations of bacto-peptone instead of 1% bacto-peptone, 1% meat extract and 0.5% yeast extract in MRS broth. ●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

typhimurium TA100인 경우 1.0% 첨가시 75.1%로 가장 높았으며, *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98인 경우에도 1.0% 첨가시 활성이 48.5%로 가장 높게 나타났다(Fig. 2A). Bacto-peptone 농도별 항돌연변이 효과도 yeast extract와 동일하게 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100인 경우에는 1% 첨가시 활성이 69.4%로 가장 높았으며, *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98인 경우에는 1.0% 첨가시 41.5%로 가장 높게 나타났다(Fig. 2B).

초기 pH의 영향

초기 pH를 4.0에서 8.0까지 1.0간격으로 조절한 배지에서 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 균주를 24시간 배양한 후 배양 상정액을 100 μ l/plate를 첨가하여 항돌연변이 효과를 측정하였다. 그 결과 실험에 사용한 두 균주 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100과 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98에 대하여 초기 pH가 7.0일 때 사용한 변이원에 대한 활성이 각각 92.9%와 51.5%로 가장 높게 나타났다(Fig. 3).

배양온도의 영향

항돌연변이 효과에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해 배양온도를 20°C에서 35°C까지 변화시키면서 *Leu.*

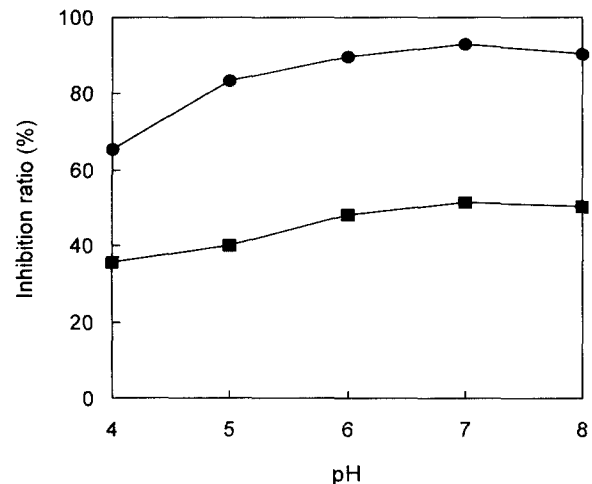


Fig. 3. Antimutagenic effects on the initial pH of the culture medium of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

mesenteroides subsp. *cremoris* DLAB19 균주를 24시간 배양한 후 배양 상정액을 100 μ l/plate를 첨가하여 항돌연변이 효과를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 실험에 사용한 두 균주 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100과 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98에 대하여 배양온도가 각각 30 $^{\circ}$ C일 때 각각 93.2%와 52.0%로 가장 높게 나타났다.

진탕속도의 영향

진탕속도가 항돌연변이 효과에 미치는 영향을 검토하기 위하여 초기 pH 7.0, 배양 온도 30 $^{\circ}$ C에서 진탕 속도를 0, 50, 100, 150 및 200 rpm으로 조절하여 배양한 후 배양 상정액을 100 μ l/plate를 첨가하여 항돌연변이 효과를 측정 한 결과 진탕 속도가 150 rpm일 때 각각 94.2%와 52.5%로 가장 높게 나타났다(Fig. 5).

배양시간에 따른 항돌연변이 효과의 변화

이상의 실험에서 얻어진 최적조건에서 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19의 배양시간에 따른 항돌연변이 효과를 경시적으로 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 항돌연변이 효과에 사용한 두 균주 모두 배양시간에 따라 항돌연변이 효과가 증가하였으나 36시간 배양시 각 균주에 대하여

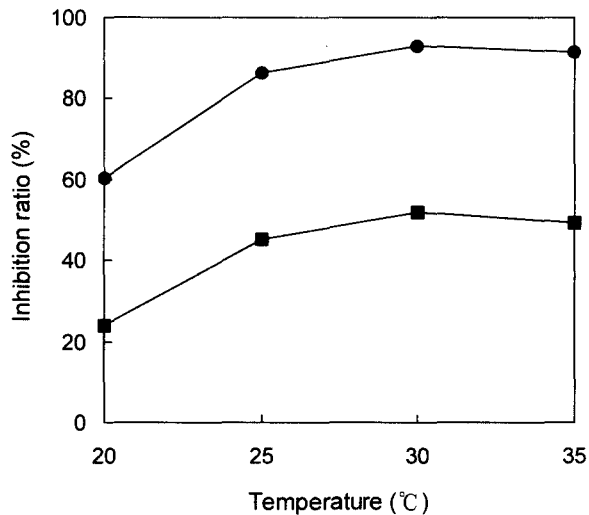


Fig. 4. Antimutagenic effects on the culture temperature of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

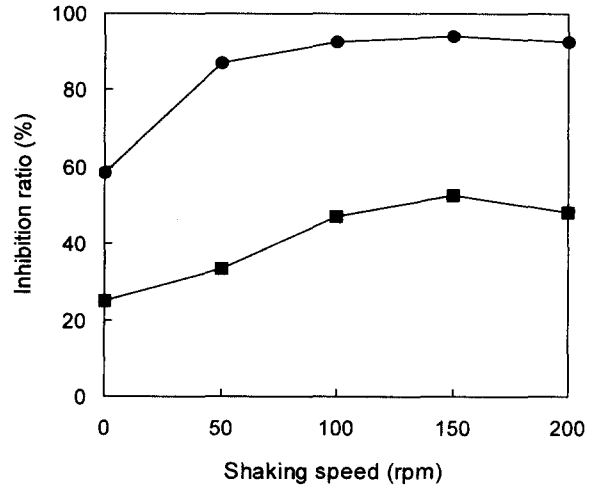


Fig. 5. Antimutagenic effects on the shaking speed of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

The bacteria were cultured at 30 $^{\circ}$ C for 24 hours in MRS broth (bactopectone 1.0%, meat extract 1.0%, yeast extract 0.5%, glucose 2.0%, tween 80 0.1%, sodium acetate 0.5%, tri-ammonium citrate 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, MnSO₄ · 4H₂O 0.005%).

●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98

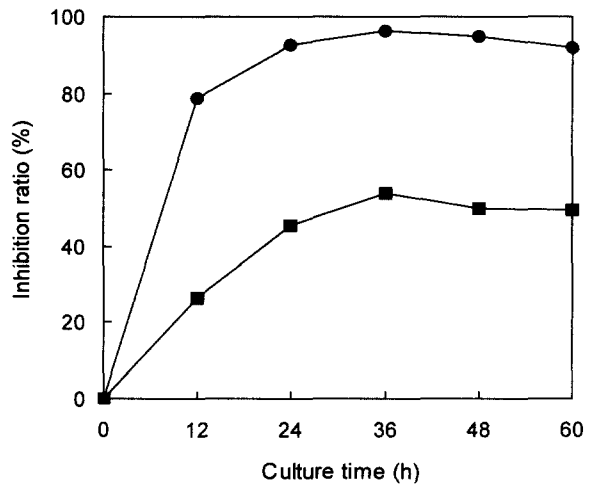


Fig. 6. Antimutagenic effects on the culture time of *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 against MNNG and 4-NQO.

●—●: MNNG on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100, ■—■: 4-NQO on *S. enterica* serovar *typhimurium* TA98. The bacteria were cultured at 30 $^{\circ}$ C for 24 hours in MRS broth (bactopectone 1.0%, meat extract 1.0%, yeast extract 0.5%, glucose 2.0%, tween 80 0.1%, sodium acetate 0.5%, tri-ammonium citrate 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, MnSO₄ · 4H₂O 0.005%).

96.4%와 53.8%로 최대 활성을 나타내었으며 그 이상의 배양시간에서는 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험의 조건에서 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 을 사용하여 항돌연변이성 물질의 생산은 36시간이 가장 적합할 것으로 생각된다.

요 약

동치미에서 분리한 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* DLAB19 균주의 MNNG와 4-NQO에 대한 항돌연변이원성 물질 생산을 위한 최적 조건을 조사한 결과, 탄소원으로 glucose를 첨가시 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 질소원으로는 yeast extract와 bactopectone 첨가시 항돌연변이 효과가 우수하였다. 탄소원으로 glucose의 농도를 2% 첨가시 MNNG와 4-NQO에 대한 항돌연변이 효과가 가장 우수하였으며, 질소원으로서 yeast extract와 bactopectone의 농도를 1% 첨가시 가장 우수한 항돌연변이 효과를 나타내었다. 항돌연변이원성 물질 생산을 위한 최적 배양 조건은 초기 pH, 배양 온도, 배양 속도가 각각 7.0, 30℃ 및 150 rpm이었다. 상기의 최적 조건에서 36시간 배양시 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었는데 *S. enterica* serovar *typhimurium* TA100과 TA98을 이용한 겨우 항돌연변이 효과가 각각 96.4%와 53.8%이었다.

참 고 문 헌

1. Adachi, S. 1990. Ecology of lactic acid bacteria with special reference to kefir granule formation by *Lactobacillus kefirgranulifer*. *J. Microorganism* **6**, 15-23.
2. Adachi, S. 1992. Lactic acid bacteria and the control of tumors, pp. 233-247. In B. J. B. Wood(ed), *The Lactic Acid Bacteria Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science, London.
3. Ayebo, A. D., K. M. Shahani and R. Dam. 1981. Antitumor component of yogurt: fractionation. *J. Dairy Sci.* **64**, 2318-2323.
4. Ayebo, A. D., K. M. Shahani and R. Dam. 1982. Ion exchange separation of the antitumor component of yogurt dialyzate. *J. Dairy Sci.* **65**, 2388-2394.
5. Bogdanov, I. G., P. G. Dalev, L. A. Gurevich, M. N. Kolosov, V. P. Malkove, L. A. Plemyannikova and I. B. Sorokina. 1975. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett.* **57**, 259-261.
6. Carr, J. G. 1975. *Lactic acid bacteria in Beverage and Foods*. pp. 234. Academic press, New York.
7. Dodds, K. L. and D. L. Collins-Thompson. 1985. Characteristics of nitrite reductase activity *Lactobacillus lactis* TS4. *Can. J. Microbiol.* **31**, 558-562.
8. Fernandes, C. F. and K. M. Shahani. 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary *Lactobacilli*. *J. Food Prot.* **53**, 704-710.
9. Hill, M. J. 1975. The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acid steroids and its relation to colon cancer. *Cancer* **36**, 2387-2395.
10. Hosono, A., A. Yoshimura and H. Qrani. 1988. Desmutagenic property of cell wall of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, **43**, 168-170.
11. Hosono, A., R. Wardojo and H. Qrani. 1990. Binding of amino pyrolyzates by lactic acid bacteria isolated from "Dadhi". *Lebensm-Wiss. U-Technol.* **23**, 149-156.
12. Hosono, A., R. Wardojo and H. Qrani. 1990. Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1639-1643.
13. Hosono, A., S. Sagae and F. Tokita. 1986. Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp^hr. *Milchwissenschaft*. **41**, 142-145.
14. Hosono, A., T. Kashina and T. Kada. 1986. Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.* **69**, 2237-2242.
15. Kada, T., K. Kaneko, T. Matsuzaki and T. Hara. 1985. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens: A case of the green tea factor. *Mutat Res.* **150**, 127-132.
16. Kato, I., T. Yokokawa and N. Mutai. 1984. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. *Microbiol. Immunol.* **28**, 209-217.
17. Kato, I., T. Yokokawa and N. Mutai. 1985. Induction of tumoricidal peritoneal exudate cells by administration of *Lactobacillus casei*. *Inter. J. Immunopharmacol.* **7**, 103-113.
18. Kato, L., Kobayashi, S., T. Yokokura and M. Mutai. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice.

- Gann.* **72**, 517-524.
19. Kimura, N. T., S. Tanguchi, K. Aoki and T. Baba. 1980. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer Res.* **40**, 2061-2068.
 20. Kinoshita, N. and H. V. Gelcoin. 1978. β -glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo(α)pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science* **199**, 307-314.
 21. Kohwi, Y., K. Imai, Z. Tamura and Y. Hashimoto. 1978. Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann.* **69**, 613-620.
 22. Laqueur, G. L. and M. Spatz. 1975. Oncogenicity of cycasin and methylazoxymethanol. *Gann. Mono. Cancer Res.* **17**, 189-196.
 23. Macdonald, I. A., R. G. Bussated, D. M. Hutdhinson and L. V. Holdelman. 1984. Rutin-induced β -glucuronidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus* sp. strain FRP-17 isolated from human feces. *Appl. Environ Microbiol.* **47**, 350-357.
 24. Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-219.
 25. Metchnikoff, E. 1908. *The Prolongation of Life*. pp.161-183, C. P. Putanama's sons, New York, USA.
 26. Mukai, T., T. Toba, T. Itoh and S. Adachi. 1990. Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranogaciens* K1. *Carbohydrate Res.* **204**, 227-234.
 27. Nakajima, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa and S. Adachi. 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy Sci.* **73**, 1472-1477.
 28. Nakajima, H., T. Toba, T. Itoh, S. Adachi and S. Toyoda. 1990. Structural analysis of a novel polysaccharide produced from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. Abstract papers of annual Meeting of Agricultural Chemistry Society of Japan, *Japan Society for Biosci. Biotech. and Agrichem.* 212.
 29. Penn, R. L., R. D. Maca and R. D. Berg. 1986. Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice. *Infect. Immun.* **47**, 793-801.
 30. Perdigon, G., M. E. N. de Macias, S. Alvarez, G. Medici, M. Oliver and A. P. de Ruiz Holgado. 1986. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. *J. Food Prot.* **49**, 986-989.
 31. Perdigon, G., S. Alvarez, M. E. Nadar, M. E. de Macias and M. Medidi. 1989. Effect of lactic acid bacteria orally administration and of yoghurt on the immune system. pp. 77-84. In: *Les lactis ferments, Actualite de la recherche. John Libbery Eurotext Ltd. Oaris. France.*
 32. Perdigon, G., W. E. Nacer, S. Alvarez, G. Oliver and P. de R. Golgado. 1988. Systematic augmentation of the immune response in mice feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunol.* **63**, 17-24.
 33. Reddy, G. V., K. M. Shahani and M. R. Banerjee. 1973. Inhibitory effect of yoghurt on Ehrlich ascites tumor-cell proliferation. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 815-820.
 34. Sasaki, T., Y. Maeda and S. Namioka. 1987. Immunopotentiator of the mucosa of the small intestine of weaning piglets by peptidoglycan. *Jap. J. Veter. Sci.* **49**, 235-239.
 35. Sekine, K., T. Toda, M. Saito, M. Kubouama, T. Kawashima and Y. Hashimoto. 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation(whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficiency on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Research.* **45**, 1300-1319.
 36. Yaghai, T., M. Degawa, Y. Seino, T. Matsushima, M. Nagao, T. Sugimura and Y. Hashimoto. 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* **1**, 91-98.
 37. Yaghai, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat Res.* **48**, 121-126.
 38. Yokoi, H., T. Watanabe, Y. Fujii, T. Toba and S. Adachi. 1990. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grainns. *J. Dairy Sci.* **73**, 1684-1692.
 39. Zhang, X. B., Y. Ohta and A. Hosono. 1990. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagen pyrolyzates. *J. Dairy Sci.* **73**, 2702-2707.

(Received July 3, 2001; Accepted August 24, 2001)