

ISSN 1229-8565 (print)

한국지역사회생활과학회지

Korean J Community Living Sci

<http://dx.doi.org/10.7856/kjcls.2017.28.1.131>

ISSN 2287-5190 (on-line)

28(1): 131~141, 2017

28(1): 131~141, 2017

## *Bacillus subtilis* SN7이 생성한 조항균 물질의 유전독성학적 안정성평가

장 해 춘 · 고 상 범<sup>1)</sup> · 이 재 준<sup>†</sup>

조선대학교 식품영양학과

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소<sup>1)</sup>

### Genotoxicological Safety Evaluation of Crude Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SN7

Hae-Choon Chang · Sang-Bum Koh<sup>1)</sup> · Jae-Joon Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, Korea

KOREA Testing & Research Health Care Research Laboratory, Institute, Hwasun, Korea<sup>1)</sup>

#### ABSTRACT

This study was carried out to perform genotoxicological safety evaluation of crude antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* SN7 (*B. subtilis* SN7) isolated from *meju*. Bacterial reverse mutation assay with *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537 or *Escherichia coli* WP2uvrA in the presence and absence of the S9 metabolic activation system was carried out, and the crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 showed no significant increase in the number of revertant colonies. In the chromosomal aberration tests using Chinese hamster lung (CHL) cells, sample treatment groups showed no increase in the frequency of chromosome aberrations compared to the negative control group. Furthermore, in the micronucleus formation test, the crude antifungal compounds showed no significance increase in the frequency of polychromatic erythrocytes with micronuclei. These results suggest that the crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 isolated from *meju* showed no harmful genotoxic effects.

**Key words:** *Bacillus subtilis* SN7, crude antifungal compounds, bacterial reversion assay, chromosomal aberration test, micronucleus assay

---

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

Received: 17 January, 2017 Revised: 23 February, 2017 Accepted: 24 February, 2017

<sup>†</sup>**Corresponding Author:** Jae-Joon Lee Tel: +82-62-230-7725 E-mail: [leejj80@chosun.ac.kr](mailto:leejj80@chosun.ac.kr)

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

## I. 서론

메주는 된장, 고추장, 간장 등의 전통장류 제조의 주원료로 숙성 시 세균, 곰팡이, 효모 등 다양한 미생물이 복합적으로 관련되어지는 우리나라 전통 대두발효 식품이다(Lee et al. 2003). 장류는 우리의 식탁에서 필수적인 식재료이기 때문에 식품으로서 안전성 확보는 무엇보다 중요하다. 특히 전통방식을 통해 제조한 장류는 발효과정 중 필연적으로 자연 환경에 노출되어 지기 때문에 숙성하는 동안 대기나 토양의 다양한 미생물들의 작용에 의해 개량식 장류 제품과 차별화된 독특한 향과 맛을 지닌 우수한 제품이 생산된다. 하지만 동시에 변패미생물이나 독소 생성균인 *Aspergillus flavus*(*A. flavus*), *A. fumigatus*, *A. petrakii*, *Penicillium spp* 등의 잡균도 검출되기 쉽다. 이와 같이 발효식품의 품질을 손상시키는 바람직하지 못한 미생물의 검출은 식중독을 비롯하여 각종 질환을 유발시킬 수 있어 심각한 건강유해요소가 될 수 있다(Bennett & Klich 2003; Melin et al. 2007; Moss 2008). 따라서 유해균의 증식을 억제하고 안전성 확보를 위한 천연 항균물질에 대한 연구가 필요하다.

Bacteriocin은 여러 미생물이 생성하는 천연 항균성 단백질 또는 단백질계의 물질로서, bacteriocin을 생산하는 미생물과 형태학 또는 계통학적으로 유사한 균에 대하여 살균작용을 갖는 물질을 의미하며, 생산균주와 근연관계미생물들의 생육을 저해하는 물질이다. Bacteriocin은 항균활성을 나타내는 범위가 넓어 전염병균, 부패균, 식중독균 및 포자 형성균 등의 증식을 억제하고 사멸시키는 효과가 있다고 보고되었다(Tagge et al. 1976; Drider et al. 2006). 기존의 항생제가 2차 대사산물인 것과 달리, bacteriocin은 플라스미드(plasmid)나 염색체(chromosome)로부터 직접 생합성되어 생산되는 것으로, 유전자조작 등에 의한 생물공학 응용이 쉽다는 장점이 있다. Bacteriocin의 분자는 아미노산으로 구성되어 있어 섭취하였을 때 체내 소화기관의 단백질 소화효소에 의해 분해될 수 있고, 잔류성이 낮아 인체에 무해하다는 점에서 식품에서 안

전한 천연방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(Schallmey et al. 2004). 따라서 bacteriocin은 체내에서 부작용을 발생시키지 않을 수 있으므로, 식품 등의 새로운 생물학적 보존제(biopreservative) 내지는 발효식품 등의 생물 제어제(bioregulator)로 그 효용이 크게 기대되고 있다.

*B. subtilis*은 오랜 세월 동안 우리나라의 된장이나 청국장 또는 일본의 낫또(natto)를 비롯하여 극동 아시아나 아프리카 지역의 전통음료나 알칼리 발효식품의 제조에 있어서 매우 중요한 발효미생물로 사용되고 있다. *Bacillus* 속은 다양한 효소와 bacteriocin, bacteriocin like substances을 비롯한 항균활성 물질들을 생산하는 것으로 알려져 있다(Schallmey et al. 2004; Lee 2014). 또한 European Food Safety Authority에 의하면 *B. subtilis* group 중 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. pumilus*와 같은 고초균은 Qualified Presumption of Safe(QPS)로 안전성이 인정된 균주(Tagge et al. 1976; Jack et al. 1995)이고, *B. subtilis*는 Generally Regarded As Safe(GRAS) 미생물로도 인정되었다(Sharp et al. 1989).

최근 천연 식품보존제를 찾기 위한 일환으로 발효식품에서 항균물질을 정제하여 식품에 응용하려는 연구 및 이들 항균물질의 안전성평가에 대한 연구도 이루어지고 있다. 된장에서 분리한 *Bacillus sp.* A9184 균주를 흰쥐에게 단회 투여 급성독성 연구결과, 임상적인 증상의 변화가 없어 안전하다고 보고하였고(Lim et al. 2004), 청국장에서 분리한 *B. subtilis* JNS의 probiotics로서의 활용 가능성을 검증하기 위해 ICR계 암수 마우스에게 단회경구투여 독성시험 실험 결과 독성학적인 변화가 없었다(Kim et al. 2015). 또한 전통 메주로부터 분리한 *B. subtilis* SN7이 생산한 조항진균 물질의 부분 정제물도 흰쥐에게 단회 또는 4주 반복 경구 투여한 독성연구 결과, 독성학적인 변화가 발생되지 않은 것으로 보고되었다(Chang et al. 2016).

본 연구는 전통 메주로부터 분리하여 항진균 활성을 보인 *B. subtilis* SN7이 생산한 조항진균 물질(Lee 2014)의 생체 내 안전성 확보를 위한 기초자료를 얻기

위하여 유전독성학적 안정성 평가를 실시하였다.

## II. 연구방법

### 1. 시험물질 및 조항진균 물질의 정제

매주로부터 분리한 항진균 활성이 있는 균주인 *B. subtilis* SN7 1%를 TSB(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 진탕 상태에서 배양하였다. 배양액 1%를 TSB 액체배지에 다시 접종하여 37°C, 24시간 동안 본 배양을 실시하였다. 본 배양액은 4°C 9,950 ×g에서 원심분리하여 상정액을 얻은 후, 0.20 μm membrane filter로 상정액을 제균하였다. 제균된 상정액은 50% aqueous acetonitrile에 용해시킨 다음 0.20 μm syringe filter를 통해 여과하였다. 여과액은 Preparative LC 9104 HPLC system (Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan)으로 분리하였으며, 분리된 시료는 Speed vacuum concentrator (CentraVac VS-802, Vision Co., Speed, Seoul, Korea)로 용매를 제거한 다음 시료로 사용하였다.

### 2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

본 시험은 식품의약품안전처 독성시험기준(Ministry of Food and Drug Safety, 2014)을 준하여 실시하였으며, 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium*의 histidine 요구성 균주(TA98, TA100, TA1535, TA1537)와 *Escherichia coli*의 tryptophan 요구성 균주(WP2uvrA)로 총 5균주를 이용하였다. 시험물질은 시험 당일 멸균 증류수로 농도별로 희석하여 용시 제조하여 사용하였으며, 음성대조균은 멸균증류수, 양성대조균은 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2), 2-aminoanthracene(2-AA), 9-aminocridine(9-AA) 및 sodium azide( $\text{NaN}_3$ )이었다. 복귀돌연변이시험은 유전독성에 대한 민감도가 비교적 높은 pre-incubation 방법으로 실시하였다(Ames et al. 1975; Maron & Ames 1983). 시험물질에 대한 농도 설정을 위한 예비 실험은 최고 농도인 5000 μg/plate를 공비 2로 5단계 농도(312.5, 625, 1250, 2500, 5000 μg/plate)로 각각

의 균주에 처리하였다. 직접법과 S-9 혼합액을 이용한 대사활성법으로 수행하였으며, 최고 농도까지 시험물질에 의한 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에서도 동일한 농도를 사용하였다. 각각의 균주를 nutrient broth(Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO USA)에 접종하여 37°C, 12시간 진탕 배양한 다음, 배양액( $1.0 \times 10^7$  cell/mL) 0.1 mL, 각 농도별 시험물질, 음성대조물질 혹은 양성대조물질 각각 0.1 mL, 0.1M sodium-phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL를 첨가 혼합하여 37°C, 20분간 preincubation하였다. 대사활성계 미적용(직접법, S9-) 시에는 S-9 혼합액 대신 sodium-phosphate buffer를 넣어 주었으며, 대사활성계 적용(S9+) 시에는 S-9 혼합액 0.5 mL를 넣었다. Preincubation을 실시한 후, top agar 2 mL 넣어 혼합하여 Vogel-Bonner medium glucose agar plate에 증정한 다음 37°C, 48시간 배양을 하였다. 배양 후 복귀돌연변이 콜로니 집락수를 계측하였으며, 육안과 현미경으로 시험물질의 침전, 분출, 균의 생육저해를 관찰하였다.

### 3. 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

부분 정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7) 조항균 물질의 염색체이상시험은 Chinese hamster lung (CHL) fibroblast를 이용하여 실시하였다(Ishidate et al. 1981; Dean & Danford 1984). CHL 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 10% heat-activated fetal bovine serum, 1% penicillin과 streptomycin을 포함한 Eagles MEM 배지에서 단층배양한 후, 배양된 세포는 0.5% trypsin-EDTA을 이용하여 2-3일 마다 계대 배양하였다. 시험물질의 농도는 최고 농도인 5000 μg/mL로부터 공비 2로 3단계(1250, 2500, 5000 μg/mL)로 설정하였다. 3일 동안 5 mL 배양액에  $4 \times 10^5$  CHL 세포를 배양하여 시험물질과 양성대조물질인 motocycin(0.05 μg/mL)을 농도별로 전처리하였다. 단시간 처리법(6시간)은 대사활성계 미적용(S9-) 혹은 적용(S9+) 두 처리 조건으로 실시하였으며, 연속처리법(24시간)은 대사활성계 미적용(S9-)인 경우만 실시하였다. 시험물질을 6시간 혹은 24시간 전처리한 후,

새로운 배양액으로 18시간 다시 배양하였다. 처리 종료 2시간 전에 colcemid를 최종 농도 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 첨가하여 분열중기세포를 축적하였다. 분열중기세포는 0.25% trypsin-EDTA를 넣어 세포를 박리한 후 수거하여 0.075M KCl 용액 4 mL에 넣은 다음 수욕상(37°C, 15분)에서 저장 처리하였다. 냉각한 고정액(메탄올:빙초산 = 3:1)을 넣어 수차례 원심분리하여 상정액을 제거하고, 세포 부유액은 slide glass에서 염색체 표본을 제작하였다. 5%(v/v) Gimesa 용액으로 5분간 염색 후, 수세, 건조한 다음 생세포계수기(BECKMAN COULTER, Indianapolis, IN, USA)로 세포수를 측정하였다. 관찰 세포 수의 결과는 각 농도군당 100개 이상(용량 당 200개)을 중기상으로 해석하였으며, 분열중기 세포의 선택 기준은 구조이상과 수적이상으로 나누어 판정하였다. 판정기준은 음성은 시험물질 처리군 중 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현 빈도가 5% 미만일 것, 의양성은 시험물질 처리군 중 1개 농도 이상에서 구조이상세포 또는 수적이상세포의 출현빈도가 5% 이상과 10% 미만일 것, 양성은 시험물질 처리군 중 1개 농도 이상에서 구조이상세포 또는 수적이상세포의 출현빈도가 10% 이상이며, 용량의존적인 증가 경향이 인정되어진 것으로 최종 판정하였다.

#### 4. ICR 마우스에 대한 소핵시험

특정 병원균 부재(SPF) 7주령된 수컷 Imprinting Control Region(ICR) 계통 마우스 30마리를 (주)오리엔트바이오(Gapyeong, Korea)로부터 구입하였다. 실험동물은 1주일간의 적응기간을 거친 후, 일반 증상과 체중을 측정한 다음 폴리카보네이트 케이지에 넣어서 SPF구역에서 사육하였다. 자외선으로 멸균시킨 정제수와 멸균된 실험동물용 사료를 자유 급여하였다. 실험군당 5마리를 사용하였으며, 시험물질 투여 용량은 예비시험을 바탕으로 경구 투여 가능 최고 농도인 2000 mg/kg B.W.로부터 공비 2로 3단계 농도(500, 1000, 2000 mg/kg B.W.)를 설정하였다. 음성대조물질은 멸균된 3차 증류수, 양성대조물질은 cyclophosphamide monohydrate(70 mg/kg B.W.)를 사용하였다. 시험물

질은 시험당일 멸균된 3차 증류수에 용해하여 사용하였다. 시험물질, 양성대조물질 및 음성대조물질은 24시간 간격으로 2회 경구 투여하였다. 최종 투여 후 24시간이 경과한 다음 마우스 골수로부터 채취한 혈액 5  $\mu\text{L}$ 를 acridine orange 용액 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 도포하여 공기 중에 건조시킨 slide glass에 떨어뜨리고, cover glass로 덮어 세포를 고정하였다(Hayashi 1991). 마우스 1마리당 2,000개의 망상적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 형광현미경 하에서 관찰하여 그 중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)를 측정하여 소핵생성 빈도를 계산하였다.

#### 5. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 19.0 P/C package를 이용하여 통계처리를 실시하였다. 결과는 평균과 표준편차(mean  $\pm$  standard deviation)로 나타냈으며,  $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다. HCL 세포를 이용한 염색체 이상시험과 소핵시험은 Scheffe 다중검정과 Dunnett's T3를 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

메주로부터 분리한 부분 정제한 고초균(*B. subtilis* SN7) 조항균 물질의 유전학적 안정성을 평가하기 위하여 먼저 세균을 이용한 돌연변이 유발성을 시험하였다(Table 1). 사용된 균주는 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA이었으며, 이들 균주에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사하였다.

예비실험을 통하여 시험물질 처리군은 최고 농도인 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  까지 대사활성계 미적용(S9-) 혹은 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 나타나지 않았으며, 복귀돌연변이 콜로니수도 음성대조군과 비교 시 증가하지 않았으며, 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 plate 위에 침전도 확인되지 않았다.

**Table 1.** Bacterial reverse mutation test of the antifungal compounds

Tester strain	Test substance	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Colonies/plate[Factor]	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Test solution	0	24 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3
		312.5	24 $\pm$ 1 [ 1.0]	32 $\pm$ 3 [ 0.9]
		625	23 $\pm$ 4 [ 1.0]	34 $\pm$ 3 [ 1.0]
		1250	23 $\pm$ 3 [ 1.0]	33 $\pm$ 2 [ 1.0]
		2500	24 $\pm$ 3 [ 1.0]	31 $\pm$ 3 [ 0.9]
		5000	23 $\pm$ 3 [ 1.0]	33 $\pm$ 3 [ 1.0]
TA100	Test solution	0	111 $\pm$ 2	128 $\pm$ 5
		312.5	111 $\pm$ 4 [ 1.0]	127 $\pm$ 2 [ 1.0]
		625	106 $\pm$ 6 [ 1.0]	123 $\pm$ 2 [ 1.0]
		1250	113 $\pm$ 3 [ 1.0]	127 $\pm$ 2 [ 1.0]
		2500	107 $\pm$ 7 [ 1.0]	123 $\pm$ 2 [ 1.0]
		5000	116 $\pm$ 1 [ 1.0]	126 $\pm$ 2 [ 1.0]
TA1535	Test solution	0	15 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3
		312.5	14 $\pm$ 1 [ 1.0]	18 $\pm$ 3 [ 1.1]
		625	14 $\pm$ 1 [ 0.9]	17 $\pm$ 2 [ 1.0]
		1250	15 $\pm$ 1 [ 1.0]	18 $\pm$ 2 [ 1.1]
		2500	15 $\pm$ 1 [ 1.0]	17 $\pm$ 1 [ 1.0]
		5000	16 $\pm$ 1 [ 1.0]	18 $\pm$ 3 [ 1.1]
TA1537	Test solution	0	11 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2
		312.5	11 $\pm$ 2 [ 0.9]	15 $\pm$ 2 [ 0.9]
		625	12 $\pm$ 3 [ 1.0]	17 $\pm$ 2 [ 1.1]
		1250	11 $\pm$ 1 [ 0.9]	16 $\pm$ 1 [ 1.0]
		2500	11 $\pm$ 1 [ 1.0]	16 $\pm$ 3 [ 1.0]
		5000	11 $\pm$ 2 [ 0.9]	16 $\pm$ 3 [ 1.0]
WP2 $uvrA$	Test solution	0	48 $\pm$ 4	56 $\pm$ 3
		312.5	47 $\pm$ 2 [ 1.0]	57 $\pm$ 4 [ 1.0]
		625	47 $\pm$ 1 [ 1.0]	57 $\pm$ 2 [ 1.0]
		1250	46 $\pm$ 2 [ 1.0]	56 $\pm$ 4 [ 1.0]
		2500	45 $\pm$ 2 [ 0.9]	54 $\pm$ 3 [ 1.0]
		5000	46 $\pm$ 3 [ 1.0]	57 $\pm$ 1 [ 1.0]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	474 $\pm$ 21 [19.8]	
TA100	AF-2	0.01	408 $\pm$ 14 [ 3.7]	
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	352 $\pm$ 15 [24.0]	
TA1537	9-AA	40.0	253 $\pm$ 7 [22.4]	
WP2 $uvrA$	AF-2	0.01	368 $\pm$ 14 [ 7.7]	
TA98	2-AA	0.5		234 $\pm$ 8 [ 6.8]
TA100	2-AA	1.0		482 $\pm$ 13 [ 3.8]
TA1535	2-AA	2.0		162 $\pm$ 5 [ 9.5]
TA1537	2-AA	2.0		178 $\pm$ 7 [11.1]
WP2 $uvrA$	2-AA	10.0		339 $\pm$ 11 [ 6.1]

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2-AA: 2-Aminoanthracene, 9-AA: 9-Aminocridine, NaN<sub>3</sub>: Sodium azide.

Each value presents the mean  $\pm$  S.D. of three plate.

본 시험결과에서도 시험물질처리군은 모든 농도 (312.5, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )에서 대사활성계 적용 유무와 상관없이 모든 처리 조건에서 생육 저해가 나타나지 않았다. 모든 조건과 농도에서도 시험물질 처리군이 음성대조군에 비하여 복귀돌연변이 콜로니수가 증가하지 않았다. 또한 음성대조군의 복귀변이 집락수도 본 시험에 사용된 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA의 복귀변이 집락수의 범위 내에서 나타났다. 김치에서 분리한 항진균 활성이 있는 유산균인 *L. plantarum* AF1과 *L. plantarum* HD1이 생산한 조항진균 물질부분 정제물도 세균을 이용한 복귀돌연변이시험에서 본 시험결과와 유사하게 돌연변이 유발성이 나타나지 않았다(Chang et al. 2016). 음성대조군의 집락은 자연 복귀돌연변이에 의해 형성되는 것이라 하였다(Maron & Ames 1983). 또한 대사활성계의 적용 유무와 상관없이 시험물질 처리군에서 침전도 확인되지 않았으며, 시험물질과 S9 mix의 무균시험 결과도 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않아 무균성을 확인하였다. 그러나 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수는유의하게 증가하였다. 돌연변이성을 판정할 경우 보통 음성대조군의 복귀변이 집락수 2배 이상일 경우 양성으로 제시하는데(Ames et al. 1975; Maron & Ames 1983), 본 연구에서 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수가 현저하게 증가하였으므로 본 시험이 적합하게 수행된 것을 알 수 있었다.

2. 포유류배양세포를 이용한 염색체 이상시험

염색체 이상시험은 포유동물 배양세포에 시험물질을 처리한 후 처음 유사분열 할 때 세포를 분석하여 독성유무를 평가하는 것으로 염색체 이상 검출을 목적으로 하고 있으며(Song et al. 2009), 세균을 이용한 복귀돌연변이시험에서 검출하기 어려운 물질도 양성으로 나타나기 때문에 복귀돌연변이시험의 보충시험 방법으로 많이 사용하고 있다(Dean & Danford 1984). 따라서 본 연구에서도 Chinese hamster 유래의 lung cell을 이용하여 직접법(S9-)과 대사활성법(S9+)으로 부분 정제한 고초균(*B. subtilis* SN7) 조항균 물질의 염색체 이상시험을 실시하였다. 본 시험에 앞서 예비시험을 실시하였는데, 시험물질 처리군은 모든 농도에서(1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 침전이 확인되지 않았다. S9 mix 미적용(S9- mix) 혹은 S9 mix 적용(S9+ mix) 단시간 처리법(6시간), S9 mix 미적용(S9- mix) 연속 처리법 (24시간 처리)으로 시료물질을 시험적용 용량인 1250~5,000 mg/kg의 범위로 처리한 후 MTT 분석을 실시하였다 그 결과, 모든 시험법에서 50 % 이상의 세포증식 억제능이 관찰되지 않아 IC<sub>50</sub>은 산출하지 않았다(Table 2).

단시간처리법(6시간)에 의한 염색체 이상시험 결과는 대사활성계 적용 유무에 상관없이 모든 농도에서 시험물질 처리로 인한 침전이 나타나지 않았다(Table 3, 4). 대사활성계 미적용(S9- mix) 혹은 적용(S9+)한 결과, 두 처리 조건에서 음성대조군과 시험물질 처리

Table 2. Cell growth inhibition test of antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* SN7

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cell growth index (%)		
	Short-term treatment test (6 hours exposure)		Continuous treatment test (24 hours exposure)
	- S9 mix	+S9 mix	
Negative control	100.0	100.0	100.0
156	97.76	99.75	97.17
313	87.31	102.48	103.74
625	91.11	104.09	97.78
1250	92.75	100.37	100.20
2500	88.95	96.03	103.44
5000	84.03	95.04	95.96
IC <sub>50</sub>	-	-	-

균은 이상중기상과 염색체 이상의 빈도가 0~1, polyploid의 빈도는 0.0 범위로 나와 통계적인 유의차가 없었으며, 핵내배화도 관찰되지 않았다. 그러나 양성대조군은 음성대조군과 시험물질 처리군에 비하여 이상중기상의 빈도가 통계적으로 유의하게 증가되었다. 표본관찰 결과를 살펴보면, S9 mix 미적용(S9-mix)하였을 경우 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 시험물질 처리군의 시험적용 용량인 1250, 2500 및 5000 µg/mL 농도에서 각각 0.0, 0.5 및 0.5%였으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.5, 0.0 및 0.0%로 나타났다. S9 mix 적용(S9+ mix)하였을 경우 시험물질 처리군의 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 1250,

2500 및 5000 µg/mL 농도에서 각각 0.0, 0.5 및 0.5%, 수적이상세포의 출현 빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0%로 나타났다. S9 mix 미적용(S9- mix) 혹은 S9 mix 적용(S9+ mix) 단시간 처리법(6시간)에서 음성대조군은 구조이상 세포 및 수적이상 세포의 출현빈도는 5% 미만 이었고, 양성대조군은 구조이상 세포의 출현빈도는 10% 이상 이었다.

단시간처리법(6시간) 시험결과 음성으로 판정이 되었기 때문에 연속처리법(24시간 처리)을 실시하였다 (Table 5). S9 mix 미적용(S9- mix) 연속처리법에 의한 염색체 이상시험 결과도 시험물질 처리군은 시험적용 용량인 1250~5,000 µg/mL의 범위에서 침전이 나타

**Table 3.** Chromosomal aberration test in the absence of S9 mix(Short-term treatment test)

Treatment recovery period(h)	S-9 Concentration mix (µg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)								Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)			
		Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)	Number of observed		Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	- Negative control (SDW)	100	0	0	0	0	0	0	0	99.7	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	100.3	100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	200	0	0
			(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)				(0.0)	(0.0)	(0.0)
6-18	- 1250	100	0	0	0	0	0	0	0	99.7	100	0	1	1
		100	0	0	0	0	0	0	1	93.6	100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	1	96.6	200	0	1
			(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)				(0.0)	(0.5)	(0.5)
6-18	- 2500	100	0	0	0	0	0	0	1	112.3	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	105.0	100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1	1	108.6	200	0	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)				(0.0)	(0.0)	(0.0)
6-18	- 5000	100	0	1	0	0	0	1	0	108.5	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	97.1	100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1	0	102.8	200	0	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)				(0.0)	(0.0)	(0.0)
6-18	- Positive control (MMC 0.1)	100	1	29	1	2	0	33*	1	-	100	1	0	1
		100	2	26	1	1	0	30*	1	-	100	0	0	0
		200	3	55	2	3	0	63*	2	-	200	1	0	1
			(1.5)	(27.5)	(1.0)	(1.5)	(0.0)	(31.5)				(0.5)	(0.0)	(0.5)

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

나지 않았다(Table 5). 음성대조군과 시험물질 처리군은 이상중기상과 염색체 이상의 빈도가 0~1, polyploid의 빈도는 0.0 범위로 나와 통계적인 유의차가 없었으며, 핵내배화도 관찰되지 않았다. 그러나 양성대조군은 음성대조군과 시험물질 처리군에 비하여 이상중기상의 빈도가 통계적으로 유의하게 증가되었다. 표본관찰 결과는 시험물질 처리군은 시험적용 용량인 1250, 2500 및 5000 µg/mL 농도 범위에서 염색체 구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.5%이었고, 염색체 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0%이었다. 음성대조군의 구조이상 세포와 수적이상 세포의 출현빈도는 5% 미만, 양성대조군의 구조이상세포

의 출현빈도는 10% 이상으로 나타났다. 이상의 결과 부분 정제된 고초균(*Bacillus subtilis* SN7)의 조항균 물질은 유의할 만한 염색체 이상이 나타나지 않았다.

### 3. ICR 마우스에 대한 소핵시험

생체 내 유전독성시험은 마우스를 이용한 소핵시험이 제시되었는데(Hayashi et al. 1989), 소핵시험은 골수에서 생산되는 적혈구 중에 출현되는 소핵을 관찰하는 방법으로 유전독성의 좋은 지표로 알려져 돌연변이성 물질을 쉽고 빠르게 검색할 수 있는 실험방법(Huang et al. 2014)이다. 소핵 생성과정은 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후, 탈핵과정을

**Table 4.** Chromosomal aberration test in the presence of S9 mix(Short-term treatment test)

Treatment recovery period(h)	S-9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)		Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	+	Negative control (SDW)	100	0	0	0	0	0	0	0	98.9	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	101.0	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	1	100.0	200	0	0	0
			(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)			(0.0)	(0.0)	(0.0)		
6-18	+	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	102.1	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	91.1	100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	1	96.6	200	0	0	0
			(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)			(0.0)	(0.0)	(0.0)		
6-18	+	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	108.2	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	99.6	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	103.9	200	0	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(0.0)	(0.0)		
6-18	+	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	92.6	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	83.7	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	88.1	200	0	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(0.0)	(0.0)		
6-18	+	Positive control (CPA5)	100	2	24	2	1	0	29*	2	-	100	0	2	2
			100	1	27	2	1	0	31*	1	-	100	0	1	1
			200	3	51	4	2	0	60*	3	-	200	0	3	3
			(1.5)	(25.5)	(2.0)	(1.0)	(0.0)	(30.0)			(0.0)	(1.5)	(1.5)		

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

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

거쳐 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)가 된 다음 10시간 정도 지나면 성숙 적혈구가 된다. 핵이 있는 미성숙 적혈구 상태에서 만약 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성을 가지고 있으면 염색체 변이가 발생하여 더 이상 성숙한 적혈구로 분화가 되지 못하게 되고, 다염성 적혈구 내에 파편으로 남아있게 되는데 이를 소핵이라 한다(Hong et al, 2008). 따라서 본 연구에서도 부분 정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균 물질을 수컷 ICR계통 마우스에 투여하여 소핵시험을 실시하였다. 시험물질 처리군과 음성대조군(멸균 증류수)은 임상 적용 예상 경로인 단회 경구 투여하였고, 양성대조군(CPA)은 복강 투

여하였다. 예비실험 결과 시험물질 처리군은 시험적용 용량인 500~2000 mg/kg의 범위에서 마우스에 경구 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수거하여 소핵유발을 평가하였는데, 음성대조군에 비하여 유의차가 없었으며, 부검 당일까지 사망동물도 없었다.

본 시험결과(Table 6) 모든 시험군에서 부검 당일까지 사망동물은 없었으며, 투여 시와 부검시의 체중을 비교한 결과 시험물질 투여군은 음성대조군에 비해 통계적인 유의성이 없었다. 개체 당 2000개 이상의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군 0.06 ± 0.04%, 500 mg/kg 투여군 0.02 ± 0.0%, 1,000 mg/kg 투여군 0.02 ± 0.03%, 2,000

**Table 5.** Chromosomal aberration test in the absence of S9 mix(Continuous treatment test)

Treatment recovery period(h)	S9 Concentration mix (μg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
		Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)		Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
24-0	- Negative control (SDW)	100	0	1	0	0	0	1	0	104.4	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	95.6	100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	0	1	0	100.0	200	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(0.0)	(0.0)	
24-0	- 1250	100	0	0	0	0	0	0	0	88.2	100	0	1	1
		100	0	1	0	0	0	1	0	102.2	100	0	1	1
		200	0	1	0	0	0	1	0	95.2	200	0	2	2
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(1.0)	(1.0)	
24-0	- 2500	100	0	1	0	0	0	1	1	93.4	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1	95.2	100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1	2	94.3	200	0	0	0
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(0.0)	(0.0)	
24-0	- 5000	100	0	1	0	0	0	1	0	96.5	100	0	1	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	92.1	100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1	0	94.3	200	0	1	1
			(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)			(0.0)	(0.5)	(0.5)	
24-0	- Positive control (MMC0.05)	100	2	28	0	1	0	31*	0	-	100	0	0	0
		100	1	26	0	1	0	28*	0	-	100	0	0	0
		200	3	54	0	2	0	59*	0	-	200	0	0	0
			(1.5)	(27.0)	(0.0)	(1.0)	(0.0)	(29.5)			(0.0)	(0.0)	(0.0)	

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

**Table 6.** Frequency micronuclei from marrow in ICR mice treated with antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* SN7

Sex	Test Compound	Dose (mg/kg)	No. of mice tested	MNPCE <sup>1)</sup> /2000 PCEs <sup>1)</sup> (%)	PCE/(PCE+NCE <sup>1)</sup> ) (%) <sup>1)</sup>
	Negative control (SDW) <sup>2)</sup>	0	5	0.06 ± 0.02 <sup>4)</sup>	60.07 ± 2.54
	Test substance	500	5	0.06 ± 0.07	58.32 ± 3.14
Male	Test substance	1000	5	0.10 ± 0.06	58.52 ± 1.75
	Test substance	2000	5	0.08 ± 0.04	58.98 ± 4.77
	Positive control (CPA) <sup>3)</sup>	70	5	3.98 ± 0.48*	41.58 ± 1.68*

<sup>1)</sup>MNPCE: PCE with one or more micronuclei, PCE: Polychromatic erythrocyte, NCE: Normochromatic erythrocyte.

<sup>2)</sup>SDW: Sterile distilled water(negative control).

<sup>3)</sup>CPA: Cyclophosphamide monohydrate(positive control).

<sup>4)</sup>Each value presents the meal ± S.D. of three plate.

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

mg/kg 투여군 0.05 ± 0.04%, 양성대조군 3.88 ± 0.43%로 나타났다. 시험물질 처리군은 음성대조군에 비해 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도가 증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의차도 없었다. 그러나 양성대조군은 음성대조군에 비해 소핵 출현빈도가 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 세포독성 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율도 측정하였는데, 그 결과 음성대조군 56.01 ± 1.61%, 500 mg/kg 투여군 56.78 ± 1.02%, 1,000 mg/kg 투여군 55.31 ± 1.48%, 2,000 mg/kg 투여군 58.98 ± 4.77%, 양성대조군 57.35 ± 2.25% 및 45.58 ± 0.94%로 나타났다. 시험물질 투여군은 음성대조군에 비해 PCE/(PCE+NCE) 비율이 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 양성대조군은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 낮은 경향이 있었다. 따라서 부분 정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7)의 조항균 물질은 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사려된다.

#### IV. 요약 및 결론

매주로부터 분리한 부분 정제한 고초균(*B. subtilis* SN7) 조항균 물질의 유전독성학적 안전성을 검토하기

위하여 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL 세포를 이용한 염색체 이상시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 시험물질은 시험적용 용량인 312.5~5,000 µg/plate 농도 범위에서 세균(TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA)에 대한 복귀변이 콜로니 수를 관찰한 결과, 대사활성계 도입 유무와 상관없이 모든 시험군주에 대하여 시험물질 처리군은 음성대조군에 비해 복귀돌연변이 콜로니 수가 농도 의존적으로 증가하지 않았다. 콜로니 수의 음성 및 양성 대조치는 적정 범위 내에 있었으며, 양성대조군은 콜로니 수가 대사활성계 도입 유무와 상관없이 모든 군주에 대해서 유의하게 증가하였다. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험에서 시험물질은 1,250~5,000 mg/mL의 시험적용 용량에서 대사활성화계 유무와 시간에 상관없이 염색체 구조이상과 수적 이상 세포의 출현빈도는 5% 미만이었어서 염색체 이상 유발능이 나타나지 않았다. ICR 마우스 망상적혈구를 이용한 소핵 유발성 유무를 검토한 결과는 시험적용 용량인 500~2,000 mg/kg의 범위에서 시험물질 투여로 사망동물이 확인되지 않았다. 다염성 적혈구의 출현 빈도와 비율 평균치는 시험물질 투여군과 음성대조군은 유의적인 차이가 없어 소핵이 유발되지 않았으며, historical background data 범위 내에 존재하였다.

양성대조군은 다염성 적혈구의 출현 빈도와 비율 평균치가 음성대조군에 비하여 유의한 차이를 보였다. 이상의 결과에서 부분 정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균 물질은 유전독성이 없는 것으로 나타났다.

## References

- Ames BN, McCann J, Yamasaki E(1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian - microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31(6), 347-364
- Bennett JW, Klich M(2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16(3), 497-516
- Chang HC, Koh SB, Lee JJ(2016) Single oral dose toxicity test and four weeks repeated oral dose determination test of crude antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* SN7 in rats. *Korean J Community Living Sci* 27(3), 437-449
- Dean BJ, Danford N(1984) Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *Mutagenicity testing - a practical approach*, Venitt S & Parry JM(Editors), IRL Press Limited, Eynsham, England pp187-232
- Drider D, Fimland G, Hechard Y., McMullen LH, Prevost H(2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2), 564-582
- Hayashi M(1991) The micronucleus test. *Science Press Inc.*, Tokyo, Japan. p 65-69
- Hayashi M, Yoshimura I, Sofuni T, Ishidate M Jr(1989) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ Mol Mutagen* 13(4), 347-356
- Hong SG, Chung SG, Hyun SH(2008) The micronucleus test of the diglyceride preparation with conjugated linoleic acid by using mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37(7), 853-857
- Huang YH, Jung DW, Kang IJ(2014) Genotoxicity safety evaluation of imported oranges irradiated with ionizing energy. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(6), 909-915
- Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K(1981) Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monogr Cancer Res* 27(1), 95-107
- Jack RW, Tagg JR, Ray B(1995) Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59(2), 171-200
- Kim KH, Jeong CH, Joo SJ, Park JH, Moon JY, Cho EJ, Lee HT, Kwon HJ, Kim BW, Eom SH, Lee EW(2015) Single dose oral toxicity of *Bacillus subtilis* JNS in ICR mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44(1), 24-28
- Lee SG(2014) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* harboring anti-*Bacillus cereus* activity from *meju* and purification of its antimicrobial compound. MS Dissertation, Chosun university
- Lee GG, Lee HD, Lee CH(2003) Changes in sensory characteristics during salt aging of *doenjang* (fermented soybean paste) made by different starters. *Food Eng Prog* 7(1), 13-19
- Lim JH, Park BK, Kim MS, Rhee MH, Park SC, Yun HI(2004) Acute oral toxicity and pathogenicity of a potential probiotic *Bacillus* sp. A9184 isolated from soybean paste. *J Toxicol Pub Health* 20(4), 359-363
- Melin P, Sundh I, Hakansson S, Schnurer J(2007) Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett* 29(8), 1147-1154
- Maron, DM, Ames BN(1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113(3-4): 173-215
- Ministry of Food and Drug Safety(2014) Guideline for toxicity tests of drugs and related materials notification. Chungbuk, MFDS
- Moss MO (2008) Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *J Appl Microbiol* 104(5), 1239-1243
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP(2004) Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50(1), 1-17
- Sharp RJ, Scawen MD, Atkinson T(1989) Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. *Biotechnology Handbooks 2*. Springer US, New York, USA pp255-292
- Song HP, Shin EH, Yun H, Cho C, Kim D(2009) Establishing the genotoxicological safety of gamma-irradiated egg white and yolk. *Korean J Food Preserv* 16(5), 782-788
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW(1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40(3), 722-756