

Research Article

백김치로부터 분리된 *Limosilactobacillus fermentum* 생균과 열처리 사균체의 항산화 및 항염 효과

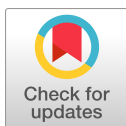
이가영 · 이민경 · 최지우 · 윤혜진 · 조현희 · 박 훈*

선문대학교 식품과학과

Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Live and Heat-Killed *Limosilactobacillus fermentum* isolated from Baekkimchi

Ga-Young Lee, Min-Kyeong Lee, Ji-Woo Choi, Hye-Jin Youn, Hyun-Hee Cho and Hoon Park*

Department of Food Science, Sun Moon University, Asan 31460, Republic of Korea



Received: Oct. 21, 2024

Revised: Oct. 28, 2024

Accepted: Oct. 28, 2024

*Corresponding author :

Hoon Park

Department of Food Science,

Sun Moon University,

Asan 31460, Republic of Korea

Tel: +82-41-530-2262

E-mail: hpark@sunmoon.ac.kr

ORCID

Ga-Young Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7050-7101>

Min-Kyeong Lee

<https://orcid.org/0000-0002-4802-5739>

Ji-Woo Choi

<https://orcid.org/0009-0000-4451-356X>

Hye-Jin Youn

<https://orcid.org/0009-0001-2899-5850>

Hyun-Hee Cho

<https://orcid.org/0009-0007-4358-2513>

Hoon Park

<https://orcid.org/0000-0002-8965-8196>

Abstract

This study aimed to evaluate the probiotic properties of *Limosilactobacillus fermentum* SMF680 and *Limosilactobacillus fermentum* SMF709, which were isolated from Baekkimchi, and to assess the antioxidant and anti-inflammatory activities of live and heat-killed cells. The selected SMF680 and SMF709 strains showed similar acid resistance, bile resistance, and intestinal cell adhesion compared to *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG), a commercial probiotic strain. The live and heat-killed cells of SMF680 and SMF709 did not show toxicity at a concentration of 1 mg/mL against intestinal cells (HT-29) and macrophages (RAW 264.7). The heat-killed cells of SMF680 and SMF709 showed significantly higher DPPH and ABTS radical scavenging activities as well as β -carotene bleaching inhibitory activity than those of LGG ($p < 0.05$). Moreover, the heat-killed cells of SMF680 and SMF709 showed significantly higher ABTS radical scavenging and β -carotene bleaching inhibition activities compared to the live cells ($p < 0.05$). The treatment of live or heat-killed cells of SMF680 and SMF709 significantly suppressed the expression of TNF- α , IL-6, iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages ($p < 0.05$). The live and heat-killed cells of SMF680 and SMF709 exhibited superior inhibitory activities on the expression of TNF- α , IL-6, iNOS and COX-2 compared to those of LGG. In particular, the heat-killed cells of SMF709 showed the most potent anti-inflammatory effect by inhibiting IL-6, iNOS and COX-2 expression by 73.86%, 81.93%, and 65.75%, respectively. Therefore, the results of this study suggest that the heat-killed cells of *L. fermentum* SMF680 and *L. fermentum* SMF709 strains could be utilized as natural antioxidant and anti-inflammatory agents in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.

Keywords

Limosilactobacillus fermentum, heat-killed probiotics, paraprobiotics, antioxidant activity, anti-inflammatory activity

서 론

서구화된 식습관의 확산으로 비만, 당뇨, 고혈압, 아토피 등 만성 질환의 발생이 증가하고 있다. 동시에 인구 고령화와 사회 환경의 변화로 건강에 대한 관심이 높아지면서 건강기능성식품의 중요성이 부각되고 있다(Ryu *et al.*, 2017). 특히, 장 건강과 밀접하게 연관된 프로바이오틱스(probiotics) 시장이 전 세계적으로 급성장하고 있으며, 건강 증진과 질병 예방을 위한 핵심적인 분야로 주목받고 있다.

프로바이오틱스는 인간 또는 동물 숙주의 건강에 이로한 역할을 하는 살아있는 미생물로, 기본적으로 유익균 증식, 유해균 억제, 배변 활동 원활 등 장 건강에 도움을 주며, 균주의 특성에 따라 과사성 장염, 위장 감염, 과민성 대장증후군의 예방과 치료에 효과가 있다고 알려졌다(Bang *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2019). 최근 연구에서는 프로바이오틱스가 장 건강 개선뿐만 아니라 면역 조절, 체지방 감소, 항고혈압, 항암, 항산화, 아토피 개선, 콜레스테롤 저하 등 다양한 기능성 효과를 발휘하는 것으로 보고되고 있다(Ghoneim and Moselhy, 2016). 프로바이오틱스 균주로는 *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 속 등의 미생물이 주로 이용된다. 이들 미생물은 비병원성, 비용혈성, 무독성 등의 안전성이 필수적으로 보장되어야 하며, 산성과 담즙에 대한 내성을 갖추어 위장관 환경에서 생존할 수 있어야 하고, 장세포에 잘 정착하여 기능성을 발휘해야 한다(Shin *et al.*, 2021). 그러나 프로바이오틱스로 이용되는 생균은 열과 산에 취약하며, 산업화를 위한 제품 제조 공정과 유통 과정에서 안정성을 확보하기 위해 충분한 양을 투여해야 하는 문제점이 있다(Ardestani *et al.*, 2019). 최근 프로바이오틱스의 오남용 및 과잉 섭취로 인한 설사, 복통, 두통, 변비, 알레르기 등의 부작용 사례가 증가하고 있으며, 신생아와 면역이 저하된 환자에게 투여할 경우 국소 조직과 혈액으로 침투하여 균혈증과 패혈증을 일으킬 수 있다는 우려가 보고된 바 있다(Pique *et al.*, 2019). 따라서 생균보다 안전하며 유사한 생리활성을 나타내는 사균체가 기능성식품 소재로 큰 관심을 받고 있다.

파라프로바이오틱스(paraprobiotics)는 사멸 처리를 통해 비활성화된 프로바이오틱스의 사균체로, 최근 여러 연구를 통해 생균과 유사한 건강상의 이점을 제공한다는 것이 밝혀지면서 차세대 기능성 소재로 많은 주목을 받고 있다. 특히, 사균체는 생균보다 안전하여 생균 처방이 어려운 고위험군도 섭취가 가능하며, 안정성과 운반의 편리성을 갖춘 천연 첨가물로서 건강기능식품, 일반식품, 제약, 화장품 등 광범위한 분야에 적용할 수 있는 장점이 있다. 파라

프로바이오틱스의 제조 방법으로는 열처리, 초음파, 자외선, 감마선, 화학물질 등 다양한 방법이 있으나, 일반적으로 열처리 방법이 가장 널리 이용되고 있다. 열처리 방법은 공정이 단순하고, 미생물의 균일한 멸균이 가능하며, 온도 조건에 따라 세포벽의 파괴 정도를 조절할 수 있는 장점이 있다(Almada *et al.*, 2016). 파라프로바이오틱스의 생리활성 성분으로는 열처리 과정에서 용출된 exopolysaccharide, teichoic acid, peptidoglycan, cell surface protein 등이 알려지고 있다(Lee *et al.*, 2023). 현재까지 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 속 프로바이오틱스의 사균체를 이용한 연구를 통해 항산화, 항염, 항암, 면역 조절, 인지능력 향상 등의 건강 기능성이 보고되고 있으나(Averina *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2021), 다양한 프로바이오틱 유산균주를 이용한 생리활성 연구는 부족한 실정이다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 생체 대사 과정에서 미토콘드리아, 소포체 및 퍼옥시좀에서 생성되며, 적절한 수준의 농도에서는 세포신호 전달에 작용하여 세포 증식, 세포 분화, 세포의 생존 등 항상성을 유지하는데 관여한다. 그러나 지속적으로 과도한 산화적 스트레스에 노출되면 과잉의 ROS 생성으로 불포화지방산, 단백질, DNA 등과 같은 생체분자에 산화적 손상을 일으켜 세포 사멸과 과사를 일으킨다(Yeon *et al.*, 2013). 이러한 산화적 손상은 염증 반응을 초래하고, 염증 반응이 지속되면 만성염증으로 발전하여 각종 질환의 발병 요인으로 작용한다(Wang *et al.*, 2017). 염증(inflammation)은 외부의 감염이나 조직의 손상으로부터 생체를 보호하고 회복하기 위한 반응으로 세포의 손상 억제, 과사된 세포 제거, 파괴된 조직 재생 등 신체를 방어하기 위한 작용이다. 대식세포(macrophage)는 염증 반응에 중요한 역할을 하는 세포로 외부 자극에 반응하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) 등의 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 분비하고, nitric oxide(NO)와 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증매개 물질을 생성한다. 이를 통해 다른 면역세포들을 활성화하고, 염증 원인을 제거하며, 손상된 부위를 정상적으로 복구하는 조절자 역할을 수행한다. 하지만 산화적 스트레스 또는 lipopolysaccharide(LPS) 등에 의해 과도하게 활성화된 대식세포는 전염증성 사이토카인과 염증매개 물질의 분비를 촉진하여 염증 반응을 지속시키고 만성염증으로 발전시켜 암, 대사증후군, 심혈관 질환, 관절염, 퇴행성 뇌질환 등 각종 질환을 유발할 수 있다(Zong *et al.*, 2012). 현재까지 프로바이오틱스로 활용되고 있는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 속의 생균이 항산화 및 항염 활성을 나타낸다는 많은 연구 결과들이 보고되었다(Plaza-Diaz *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). 하지만, 프로바이오틱스의 사균



체를 활용한 항산화 및 항염 연구는 매우 부족한 편이며, 김치 등 전통 발효식품에서 분리되고 있는 *Limosilactobacillus fermentum* 균주의 생균과 열처리 사균체를 활용한 연구는 미흡하여 이에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 백김치에서 분리된 유산균 중 내산성, 내담즙성, 장 부착능이 우수한 2종의 *L. fermentum* 균주를 선별하고, 이들의 프로바이오틱스 활성을 평가하였다. 또한, 선별된 유산균을 열처리하여 사균체를 제조하고, 생균과 비교하여 항산화와 항염 활성을 측정함으로써 항산화 및 항염 활성을 지닌 기능성 소재로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

유산균의 분리 및 동정

충남 천안과 아산 지역의 전통시장에서 수집한 백김치에서 유산균을 분리하여 사용하였다. 백김치 시료를 멸균된 0.85% saline에 1:9(w/v) 비율로 첨가한 후, stomacher(BagMixer 400W, Interscience, Saint Nom, France)를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 10배수로 희석하여 De Man-Rogosa-Sharpe agar(MRS, Difco™, MD, USA) 고체배지에 도말하고 37℃에서 overnight 배양하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 단일 콜로니를 Bromocresol Purple(BCP, Eilken chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 고체배지에 도말하여 배양한 후 노란색 환이 생성된 콜로니를 유산균으로 판단하고 선별하였다. 선별한 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 universal rRNA gene primer(27F와 1492R)를 이용하여 증폭하였고, BIOFACT사(Daejeon, Korea)에서 염기서열 분석을 의뢰하여 수행되었다. 분석된 16S rRNA 염기서열 데이터는 National Center for Biotechnology Institute(NCBI)의 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank 데이터베이스와 비교하였다. 대조균으로 사용된 상업용 프로바이오틱스 유산균주인 *Lactobacillus rhamnosus* GG(KCTC 5033)는 생물자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양받았다.

생균 및 사균체 제조

선별한 유산균주를 MRS 액체배지(Difco, BD Biosciences, USA)에 접종하고 37℃에서 18시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(12,000×g, 4℃, 10 min)한 후 phosphate buffered saline(PBS, Welgene, Korea) 용액(pH 7.4)으로 세척하고 동결건조(FDU-12000, EYELA, Korea)하였다. 동결건조된 생균을 PBS 용액(pH 7.4)을 사용하여 약 1×10⁹ CFU/mL의 농도인 1 mg/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 사균체 시료는 위와 동일한 방법

으로 1 mg/mL 농도의 동결건조된 생균을 121℃에서 15분간 고압멸균(AC-12, JEIO TECH, Korea)하여 제조한 후 사용하였다.

세포 배양

본 연구에 사용된 세포주인 HT-29 세포(KCLB30038)와 RAW 264.7 세포(KCLB40071)는 한국세포주은행에서 구입하였다. 인간 결장 유래 HT-29 세포는 1% penicillin-streptomycin 용액(Cytiva, Marlborough, USA)이 함유된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute 1640, Welgene, Korea) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가하여 배양하였으며, dish에 세포가 90% 이상 자랐을 경우 새로운 dish에 계대배양하였다. 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포는 1% penicillin-streptomycin solution(Cytiva, Marlborough, USA)이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Welgene, Gyeongsan, Korea) 배지에 10% FBS를 첨가하여 배양하였으며, 2일 주기로 새로운 dish에 계대배양하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO₂ 조건을 유지하는 incubator(Thermo Fisher, Massachusetts, USA)에서 수행되었다.

유산균의 내산성 및 내담즙성 측정

유산균의 내산성과 내담즙성 측정은 Bae 등(2023)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 선별한 유산균을 MRS 액체배지에서 배양(37℃, overnight)한 후 1×10⁹ CFU/mL 수준의 농도로 조정하였다. 내산성 평가를 위하여 pH 2.5로 조정한 MRS 액체배지에 0.3% pepsin(Sigma-Aldrich, MO, Wyoming, USA)을 첨가한 후 유산균 농도가 약 1×10⁷ CFU/mL 수준이 되도록 배양액(1×10⁹ CFU/mL)을 1%(v/v) 접종하고 37℃에서 3시간 반응하였다. 반응액을 MRS 고체배지에 도말하고 37℃에서 배양한 후 생존율을 확인하였다. 내담즙성 평가의 경우, 0.3% oxgall(Difco™, MD, USA)이 첨가된 MRS 액체배지에 배양액을 1%(v/v) 접종하여 37℃에서 24시간 반응시킨 후 MRS 고체배지에 도말하고 37℃에서 배양한 다음 생균수를 측정하였다. 생존율은 다음의 계산식을 사용하여 계산하였다.

Survival rate(%)

$$= \{ \text{Viable cell (CFU/mL)} / \text{Initial cell (CFU/mL)} \} \times 100$$

유산균의 용혈성 측정

유산균의 용혈성은 Kim 등(2019)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 5% defibrinated sheep blood가 첨가된 sheep blood agar(Kisan Bio co., Seoul, Korea)를 제조한 후 실험에 사용하

였다. 선별된 유산균을 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 배양한 후 Sheep blood agar에 희선 도말하여 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 콜로니 주변에 생긴 색상의 변화를 비교하여 용혈 활성 유무를 확인하였다. β -용혈능에 대한 양성 대조균으로 *Staphylococcus aureus*를 사용하였다.

유산균의 세포독성 측정

인간 결장 유래 장세포(HT-29)와 마우스 유래 대식세포(RAW 264.7)에 대한 유산균 시료의 독성 평가는 MTT (methylthiozyl-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법을 이용하였다 (Park and Lee, 2022). 장세포는 RPMI 배지를 사용하였으며, 대식세포는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^5 cell/well의 농도로 접종한 후 5% CO₂ 농도의 배양기에서 37℃, 24시간 배양하였다. 배양액으로부터 상등액을 제거한 후 배지 180 μ L와 유산균 시료 20 μ L를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양액을 PBS 용액으로 3번 세척한 후 배지 180 μ L와 MTT(5 mg/mL) 20 μ L를 첨가하고 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 반응에 의해 생성된 MTT-formazan 생성물을 Dimethyl sulfoxide(DMSO, Daejung, Siheung, Korea)를 첨가하여 용해시킨 후 Microplate reader(SPECTRO star Nano, BMG LABTECH, Germany)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 다음 계산식을 이용하여 계산하였으며, 대조균으로 PBS 용액을 사용하였다.

$$\text{Cell viability}(\%) = (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

유산균의 장세포 부착능 측정

장세포 부착능은 Jung과 Kim(2015)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. MRS 액체배지에서 배양(37℃, overnight)한 유산균을 PBS 용액으로 2회 세척한 후 1×10^9 CFU/mL로 농도를 조절한 현탁액을 실험에 사용하였다. 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 RPMI 배지를 첨가하고 HT-29 세포를 1×10^6 cell/well의 농도로 접종한 후 5% CO₂ 농도의 배양기에서 37℃, 24시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 RPMI 배지 1 mL와 유산균 현탁액 1 mL를 첨가하여 1시간 반응하였다. PBS 용액으로 HT-29 세포를 3회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거하였다. 이후 0.1% Triton X-100 용액(Samchun, Seoul, Korea) 1 mL를 첨가하여 세포에 부착된 유산균을 회수하였다. 회수한 유산균을 MRS 고체 배지에 접종하고 배양하여 생균수를 측정한 후 다음의 계산식에 따라서 장부착능(%)을 계산하였다.

$$\text{Adhesion}(\%) = (\text{Viable cell count} / \text{Initial cell count}) \times 100$$

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Kim 등(2013)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(Sigma, Milano, Italy)과 에탄올을 혼합하여 0.4 mM DPPH 시약(OD_{517nm}=1.2)을 제조한 후, 유산균 시료와 1:1로 혼합하여 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응액을 원심분리(12,000 \times g, 4℃, 5 min)한 후 회수한 상등액의 흡광도를 517 nm에서 측정하고, 다음의 계산식을 통해 DPPH 라디칼 소거능(%)을 계산하였다. 대조균으로 PBS 용액을 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = \{1 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}})\} \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능은 Cheon 등(2020)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. pH 7.4로 조정된 0.2 M sodium phosphate buffer 용액에 7 mM ABTS와 5 mM potassium persulfate 시약을 혼합하고 암실에서 16시간 반응하여 ABTS⁺ 라디칼을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 조정하였다. ABTS 시약 1.35 mL와 유산균 시료 150 μ L를 혼합하여 반응(37℃, 10 min)시킨 후 원심분리(12,000 \times g, 4℃, 5 min)하여 회수한 상등액의 흡광도를 734 nm에서 측정하였다. 다음의 계산식을 통해 ABTS 라디칼 소거능(%)을 계산하였으며, 대조균은 PBS 용액을 사용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity}(\%) = \{1 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}})\} \times 100$$

β -Carotene bleaching 억제능 측정

β -Carotene bleaching 억제능 측정은 Bibi 등(2020)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. 감압플라스크에 linoleic acid(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 66 μ L, β -carotene 3 mg, tween 80(Sigma-Aldrich) 300 μ L, chloroform 10 mL를 가하여 혼합한 후 회전감압농축기(SB-1200, EYELA, Bohemia, USA)를 이용하여 40℃의 진공 상태에서 chloroform을 증발시켰다. 이후 증류수를 75 mL를 가하여 β -carotene-linoleic acid 시약을 제조하고, 시약의 농도를 OD_{470nm}=2.0으로 조정하여 사용하였다. 유산균 시료 200 μ L와 β -carotene-linoleic acid 용액 4 mL를 혼합하



여 50℃의 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음의 계산식에 따라 β -carotene bleaching 억제능(%)을 계산하였으며, 대조군으로 PBS 용액을 사용하였다.

β -Carotene bleaching inhibitory activity(%)

$$= (\text{OD}_{\text{sample } 2\text{h}}^{1}) - \text{OD}_{\text{control } 2\text{h}}^{2} / \text{OD}_{\text{control } 0\text{h}}^{3} - \text{OD}_{\text{control } 2\text{h}}^{2}) \times 100$$

¹⁾ OD_{sample 2h} : absorbance of sample for 2 h

²⁾ OD_{control 2h} : absorbance of after control for 2 h

³⁾ OD_{control 0h} : absorbance of control for 0 h

TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 유전자 발현 측정

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 이용하여 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 유전자 발현을 측정하였다(Cheon *et al.*, 2020). RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1×10^6 cell/well의 농도로 접종한 후 5% CO₂ 농도의 배양기에서 37℃, 24시간 배양하였다. 상등액을 제거하고 각 well 당 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS가 첨가된 DMEM 배지와 유산균 시료 (1×10^9 CFU/mL)를 첨가하고 24시간 반응시켰다. 반응 후 PBS 용액으로 세척한 다음, 세포를 Trizol(Life technologies, carlsbad, california, USA)용액을 사용하여 회수하였다. RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 세포로부터 total RNA를 추출하고 NanoDrop(biochrom, Cambridge, USA)을 사용하여 농도를 정량하였다. cDNA는 cDNA synthesis kit(TAKARA, Shigaken, Japan)를 이용하여 합성하였으며,

primer는 코스모진텍(Seoul, Korea)에서 합성하여 사용하였다 (Table 1). StepOnePlus™ Real-time PCR System(Thermo Fisher, Massachusetts, USA)을 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 반응액은 primer 2 μL , cDNA 2 μL , SYBR green(Cosmogenetech, Seoul, Korea) 10 μL , 증류수 6 μL 를 혼합하여 총량이 20 μL 가 되도록 하였다. PCR은 95℃에서 15초 (denaturation), 60℃에서 60초(annealing/extension) 반응으로 40회 반복하여 진행하였다. Reference gene으로 GAPDH를 사용하였으며, 각 유전자의 threshold cycle(Ct) 값을 비교하여 delta-delta C_t($\Delta\Delta C_t$)법으로 계산하고 결과를 분석하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복하여 수행되었으며, 실험 결과는 평균 (mean)±표준편차(SD)로 표시하였다. 통계분석은 Prism 9.3 (Graphpad software, San Diego, USA)을 이용하여 일원 분산 분석(one-way ANOVA), 이원 분산 분석(two-way ANOVA), Tukey's test로 분석하였다. 대조군과 비교하였을 때, $p < 0.05$ 수준으로 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

유산균의 분리 및 선별 균주의 동정

백김치 시료를 BCP 고체배지에 접종하여 배양한 후, 산 생성에 의해 노란색의 환을 형성한 콜로니를 유산균으로 간주하였다. 이 중

Table 1. Primer sequences used for quantitative real-time PCR

Gene ¹⁾	Sequences	References
TNF- α	F : 5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'	You <i>et al.</i> , 2022
	R : 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'	
IL-6	F : 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	
	R : 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
iNOS	F : 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3'	
	R : 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'	
COX-2	F : 5'-CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3'	
	R : 5'-CCTCGCTTCTGATCTGTCTT-3'	
GAPDH	F : 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3'	
	R : 5'-GGATGCAGGGATGATGTT-3'	

¹⁾TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; and GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

크기가 큰 70개의 콜로니를 선별하여 내산성, 내담즙성, 장부착능, 항산화 활성(DPPH, ABTS radical scavenging activity)을 측정하였고, 프로바이오틱스 특성이 가장 우수한 2종을 균주(SMF680, SMF709)를 최종 선별하였다. 최종 선별된 2종의 균주는 간균 형태의 Gram 양성균으로 catalase 음성을 나타내는 것이 확인되었다. 16S rRNA sequencing 분석을 바탕으로 NCBI database를 통해 염기서열의 상동성을 분석한 결과, 2종의 균주는 *Limosilactobacillus fermentum*과 각각 98.94%, 96.42%의 높은 상동성을 나타내어 *Limosilactobacillus fermentum* SMF680과 *Limosilactobacillus fermentum* SMF709로 명명하였다.

유산균의 내산성 및 내담즙성

유산균이 프로바이오틱스로서 효능을 발휘하기 위해서는 소화관에서 생존하여 장까지 도달해야 하므로, 위액과 담즙염에 대한 저항성을 갖추어야 한다(Park *et al.*, 2013). 선별된 유산균의 내산성 및 내담즙성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. Pepsin이 첨가된 pH 2.5의 인공 위액 조건에서 *L. fermentum* SMF680과 *L. fermentum* SMF709는 각각 102.14%와 103.46%의 생존율을 나타내어, 상업용 프로바이오틱스 균주인 *Lactocaseibacillus*

rhamnosus GG(LGG, 102.44%)와 유사한 결과를 보였다. 3종의 유산균 모두 100% 이상의 생존율을 나타내어, 위산에 대한 저항성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. Oxgall이 0.3% 첨가된 배지에서 LGG, SMF680, SMF709 균주의 생존율을 측정한 결과, 각각 103.15%, 100.82%, 100.74%의 생존율을 보여 3종의 균주 모두 담즙염에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다. Seo와 Lee(2007)는 *Lactobacillus acidophilus* DDS-1과 *Lactobacillus acidophilus* B-3208 균주가 pH 2.5의 산성에서 50% 이상의 생존율을 나타내었다고 보고하였다. Bae 등(2023)은 발효식품에서 분리된 유산균이 $10^8 \sim 10^9$ log CFU/mL의 농도에서 담즙염에 대하여 100.99%~104.03%의 생존율을 보였으나, 10^4 log CFU/mL 이하의 농도에서는 민감성을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구결과, 선별된 SMF680과 SMF709 균주는 위산과 담즙염에 대한 높은 저항성을 나타내어 프로바이오틱스의 선별 조건에 부합한다고 판단된다.

유산균의 용혈성 측정

선별된 유산균주가 적혈구를 분해하거나 파괴하는 용혈성을 보유하고 있는지를 확인하기 위한 검사를 진행하였다(Table 3).

Table 2. Acid and bile acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) strains

Strains	Acid tolerance (pH 2.5, 0.3% pepsin)			Bile salt tolerance (0.3% oxgall)		
	Initial (Log CFU/mL)	3h (Log CFU/mL)	Survival rate (%)	Initial (Log CFU/mL)	24h (Log CFU/mL)	Survival rate (%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	7.73±0.02	7.92±0.01	102.44±0.24	7.75±0.02	7.99±0.01	103.15±0.2
<i>L. fermentum</i> SMF680	7.73±0.01	7.90±0.01	102.14±0.15	7.74±0.03	7.80±0.04	100.82±0.92
<i>L. fermentum</i> SMF709	7.74±0.02	8.01±0.03	103.46±0.55	7.68±0.03	7.74±0.07	100.74±0.55

Data are presented as mean ± standard deviation (n=3).

Table 3. Hemolytic activities of tested LAB strains

Contents	Strains		
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>L. fermentum</i> SMF680	<i>L. fermentum</i> SMF709
Hemolysis	α	-1)	-
	β	-	-
	γ	+	+

1)+, positive activity; -, negative activity.

Sheep blood 배지의 성분인 hemoglobin이 미생물의 용혈 활성으로 인해 분해될 경우 주변 환의 형성 유무 및 색상에 의해 α 형, β 형, γ 형으로 구분된다. 적혈구를 불완전 용해하는 경우 녹색 환을 생성하는 α 형, 적혈구를 완전 용해하여 투명 또는 노란색 환을 생성하는 β 형, 용혈 활성이 없어 환을 생성하지 않는 γ 형으로 판단하였다(Woo *et al.*, 2022). 대조군으로 사용된 *S. aureus* 균주는 녹색 환을 생성하여 α 형을 나타낸 반면, LGG, SMF680, SMF709 균주는 색상 변화가 관찰되지 않아 용혈 현상이 없는 γ 형의 안전한 균주임을 확인하였다.

장세포 독성 측정

MTT assay를 이용하여 선별된 유산균주에 따른 HT-29 세포의 생존율을 분석하였다(Fig. 1). HT-29 세포에 각 유산균의 생균과 사균체를 1 mg/mL(약 1×10^9 CFU/mL)의 농도로 처리한 후 HT-29 세포의 생존율을 분석한 결과, 모든 생균 및 사균체 시료에 대하여 100% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 사용한 유산균 시료는 장세포에 대해 세포 독성을 나타내지 않는 안전한 균으로 판단된다.

유산균의 장부착능

유산균이 위와 십이지장을 통과한 후 장에 정착하여 유용한 효과를 발휘하기 위해서는 장 상피세포에 부착할 수 있는 능력이 요구된다(Lee *et al.*, 2016). 인간 결장 유래 HT-29 세포를 이용하여 유산균의 장부착능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. SMF680과 SMF709의 장세포 부착능은 각각 10.59%, 10.12%로 상업균주인

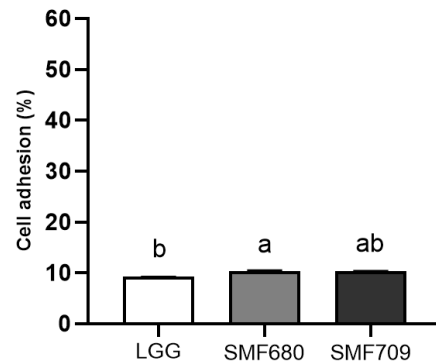


Fig. 2. Adhesion ability of LAB strains to HT-29 cells. LGG; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, SMF680; *Limosilactobacillus fermentum* SMF680, SMF709; *Limosilactobacillus fermentum* SMF709. Data are presented as mean \pm standard deviation (n=3). ^{a,b}Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

LGG(9.36%)와 비교하여 우수한 장부착능을 나타내었다. Lee 등(2014)은 김치에서 분리된 *L. plantarum* SY11 균주와 *L. plantarum* SY12 균주가 각각 7.2%와 5.3%의 장부착능을 나타내었다고 보고한 바 있다. 프로바이오틱스는 장 점막세포에 부착하고 군락을 형성하여 mucin 생성 촉진, 면역 조절, 병원균 억제, 장 투과성 감소 등 유용한 작용을 한다고 알려졌다(Liu *et al.*, 2010; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). 본 연구결과, 선별된 SMF680과 SMF709는 내산성, 내담즙성, 장세포 부착능이 우수하여 프로바이오틱스 선별 조건에 부합된다고 사료된다.

유산균의 항산화 활성

유산균의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능 및 β -carotene bleaching 억제능을 측정하여 평가하였다. DPPH는 보라색의 매우 안정한 free radical로 항산화 물질에 의해 탈색되는 원리를 이용한다(Park *et al.*, 2018). SMF680 사균체(24.93%)는 생균(30.02%)과 비교하여 유의적으로 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으나($p < 0.05$), SMF709 사균체(29.91%)는 생균과(31.01%) 유사한 소거능을 나타내었다(Fig. 3A). 상업 균주인 LGG와 비교하여, SMF680과 SMF709의 생균과 사균체 모두 유의적으로 높은 소거능을 보였다($p < 0.05$). Jang 등(2018)은 *Lactiplantibacillus plantarum* Ln1 생균과 *Lactiplantibacillus plantarum* KCTC 3108 생균이 각각 24.16%와 21.13%의 DPPH 라디칼 소거능을, Hyun 등(2024)은 *Lactobacillus sakei* KU15041 사균체와 *Lactobacillus curvatus* KU15003 사균체가 각각 15.29%와 18.84%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다고 보고한 바 있다.

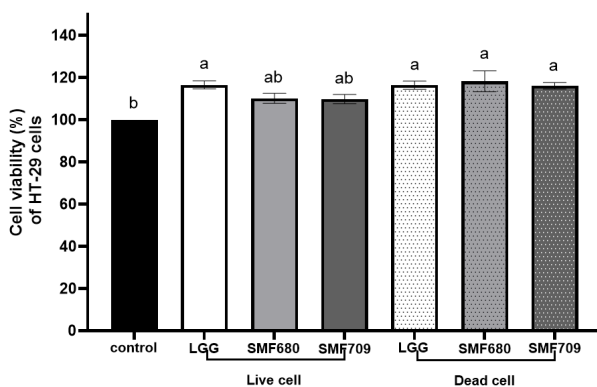


Fig. 1. Cytotoxicity of LAB strains on the viability of HT-29 cells. LGG; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, SMF680; *Limosilactobacillus fermentum* SMF680, SMF709; *Limosilactobacillus fermentum* SMF709. Data are presented as mean \pm standard deviation (n=3). ^{a,b}Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

ABTS 라디칼 소거능은 potassium persulfate와 ABTS의 반응에 의해 생성된 청록색의 ABTS 라디칼이 항산화 물질에 의해 탈색되는 원리를 이용한다(Yang *et al.*, 2014). LGG, SMF680, SMF709 사균체의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 51.06%, 62.95%, 54.43%로 생균과 비교하여 1.9배, 2.2배, 2배 유의적으로 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며, SMF680 사균체에서 가장 높은 소거능이 확인되었다(Fig. 3B)($p<0.05$). Song 등(2019)은 ABTS 라디칼 소거능 평가에서 LGG 사균체와 *Levilactobacillus brevis* KCCM 12203P 사균체가 생균보다 각각 1.6배와 1.7배 높은 소거활성을 나타내었다고 보고한 바 있다. 본 연구 결과, 생균과 사균체의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능에서 유사한 반면, ABTS 라디칼 소거능에서 뚜렷한 차이점을 나타내었다. 이와 같은 결과는 자유 라디칼인 DPPH와 양이온 라디칼인 ABTS의 구조적 차이에서 비롯된 것으로 DPPH는 비극성 물질과만 반응하는 반면, ABTS는 극성 및 비극성 물질에 모두 반응할 수 있어 이러한 차이가 라디

칼 소거 활성에 영향을 미친 것으로 보인다(Kim *et al.*, 2013). β -Carotene bleaching 억제능은 리놀레산의 산화에 의해 β -Carotene이 탈색되는 현상을 이용하는데, 항산화 물질이 탈색 현상을 억제하는 원리를 기반으로 지질과산화 억제 능력을 측정하는 방법이다(Loucif *et al.*, 2020). LGG의 생균 및 사균체와 비교하여, SMF680과 SMF709의 생균 및 사균체는 각각 유의적으로 높은 소거능을 보였다($p<0.05$). SMF680과 SMF709 사균체의 β -carotene bleaching 억제능은 각각 32.66%와 34.03%로, 생균의 27.60%와 29.98% 보다 높은 지질과산화 억제능을 나타내었다(Fig. 3C). Jang 등(2018)은 *Lactiplantibacillus plantarum* Ln1의 사균체(58.33%)가 생균(49.97%)보다 높은 β -carotene bleaching 억제능을 나타내었다고 보고하였다.

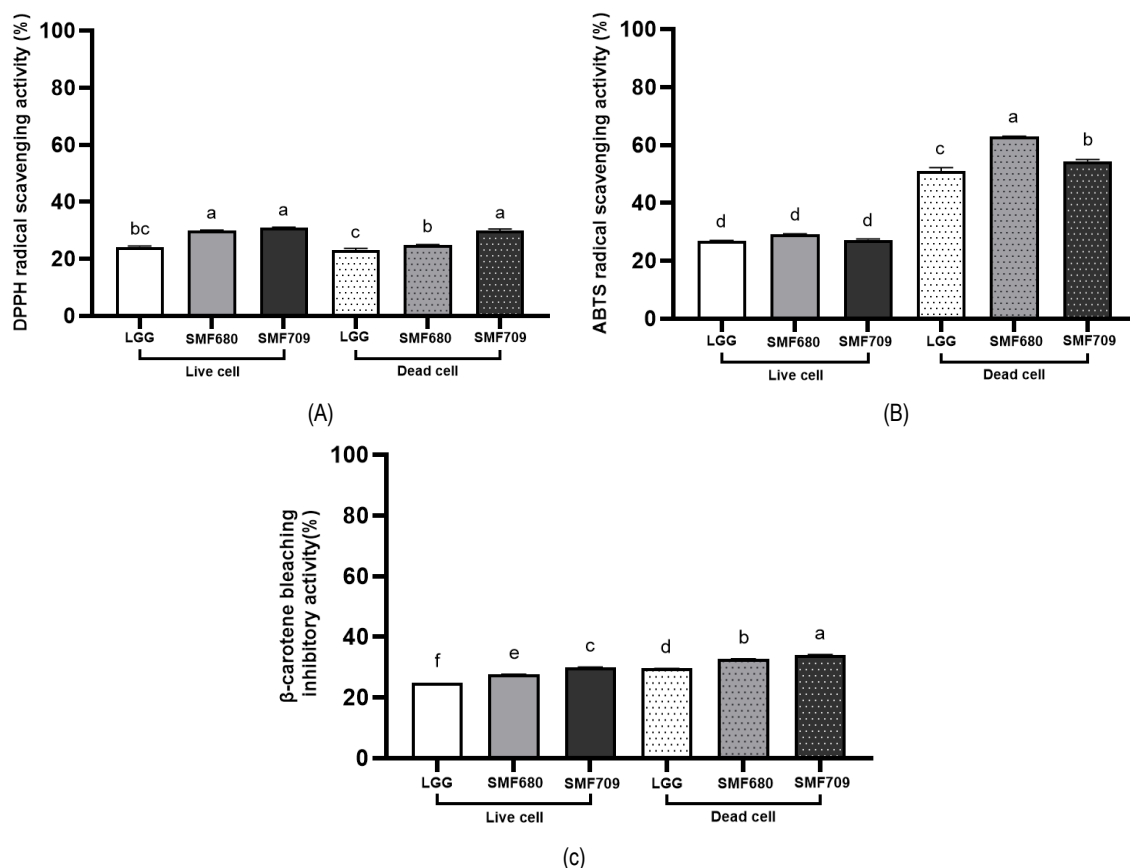


Fig. 3. Effect of live and heat-killed cells of LAB strains on DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), and β -carotene bleaching inhibitory activity (C). LGG; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, SMF680; *Limosilactobacillus fermentum* SMF680, SMF709; *Limosilactobacillus fermentum* SMF709. Data are presented as mean \pm standard deviation (n=3). a-f Different letters indicate significant difference ($p<0.05$).

유산균의 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성 평가

항염증 효과를 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 각 유산균의 생균과 사균체를 1 mg/mL(약 1×10^9 CFU/mL)의 농도로 처리한 후 RAW 264.7 세포의 생존율을 측정하였다(Fig. 4). 모든 생균과 사균체 시료에 대하여 RAW 264.7 세포는 95% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 RAW 264.7 세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 1 mg/mL 농도의 생균과 사균체를 이용하여 항염 활성을 평가하였다.

qRT-PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

RAW 264.7과 같은 대식세포는 LPS의 자극에 의해 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인과 NO, COX-2 등의 염증성 매개인자들의 생성을 촉진하여 염증을 악화시키고 암, 죽상경화증, 염증성 장질환, 신경퇴행성 질환, 류마티스 관절염 등 각종 질환의 발병 요인으로 작용한다(Monteagudo *et al.*, 2019). TNF- α 와 IL-6는 주로 활성화된 대식세포에서 분비되는 사이토카인으로 염증 자극에 반응하여 숙주의 염증 촉진 및 면역 조절에 관여한다(Umare *et al.*, 2014). NO는 주로 iNOS의 효소작용에 의해 생성되어 혈관 확장과 면역 조절에 관여하지만, 과도한 생성은 COX-2 등 염증 매개체의 생성성을 촉진하고 염증을 심화시킨다. COX-2는 arachidonic acid로부터 통증과 발열을 일으키는 물질인 PGE₂의 생성을 촉진하는 효소로 염증 반응에서 중요한 역할을 한다(Kurumbail *et al.*, 2001). 따라서 LPS의 자극에 의해 대식세포에서 과도하게 생성되는 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현 억제는 염증성 질환의 예방과 치료를 위한 주요 표적으로 이용된다.

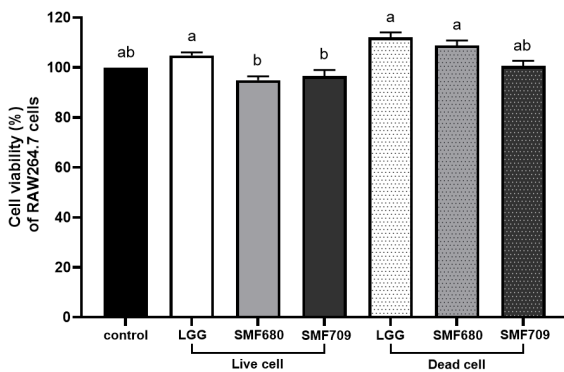


Fig. 4. Cytotoxicity of live and heat-killed cells of LAB strains on the viability of RAW 264.7 cells. LGG; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, SMF680; *Limosilactobacillus fermentum* SMF680, SMF709; *Limosilactobacillus fermentum* SMF709. Data are presented as mean \pm standard deviation (n=3).
^{a,b}Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

본 연구에서는, LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 유산균 생균 또는 사균체를 첨가하고 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현을 평가하였다(Fig. 5). LPS 단독처리군(+)과 비교하여, LGG, SMF680, SMF709의 생균 또는 사균체 첨가군에서 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 유의적으로 억제되는 것이 확인되었다($p < 0.05$). LPS 단독처리군(+)과 비교하여, SMF680 생균 첨가군에서 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 각각 66.35%, 71.08%, 52.78%, 48.02% 억제되었으며, 사균체 첨가군에서는 각각 66.91%, 68.11%, 57.11%, 50.12% 억제되는 것으로 나타났다. SMF709의 경우, TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 생균 첨가군에서는 각각 50.41%, 78.46%, 71.66%, 61.04%, 사균체 첨가군에서는 각각 58.27%, 73.86%, 81.93%, 65.75% 억제되었다. 반면, LGG 생균 첨가군에서 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 각각 45.52%, 62.37%, 47%, 42.44%, 사균체 첨가군에서는 각각 44.03%, 61.19%, 51.37%, 48.41% 억제되었다. 본 연구에서 선별된 유산균(SMF680, SMF709)의 생균과 사균체 모두 상업균주인 LGG보다 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현 억제 활성이 높았으며, 특히 SMF709 사균체는 iNOS와 COX-2의 발현 억제 활성이 가장 우수한 것으로 확인되었다. You 등(2022)은 *Lactiplantibacillus plantarum* KCTC3108의 열처리 사균체가 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현을 각각 34.86%, 51.67%, 44.36%, 28.06% 억제하였다고 보고한 바 있다. 현재까지 열처리 사균체의 항염 작용 기작이 명확히 밝혀지지 않았지만, 유산균의 세포 성분인 EPS, peptidoglycan, lipoteichoic acid 등이 면역 조절에 관여한다고 알려졌다(Pique *et al.*, 2019). Kwon 등(2020)은 *Lactiplantibacillus plantarum* L-14에서 분리된 EPS가 LPS 처리에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 TLR4와 MyD88의 신호전달을 억제하고 NF- κ B와 MAPK 경로를 하향 조절하여 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2와 같은 염증성 매개체의 발현을 억제하였다고 보고하였다.

본 연구 결과, 백김치에서 분리된 *L. fermentum* SMF680과 *L. fermentum* SMF709 균주는 내산성, 내담즙성 및 장세포 부착능이 우수하여 프로바이오틱스 균주의 조건에 부합하였다. 이들의 생균과 열처리 사균체 모두 항산화 및 항염 활성이 우수하여 항산화제 및 항염제로 개발이 가능할 것으로 판단된다. 특히, 선별된 유산균의 열처리 사균체는 안전하게 섭취할 수 있는 천연 첨가물로서 식품, 제약 및 화장품 산업에서의 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

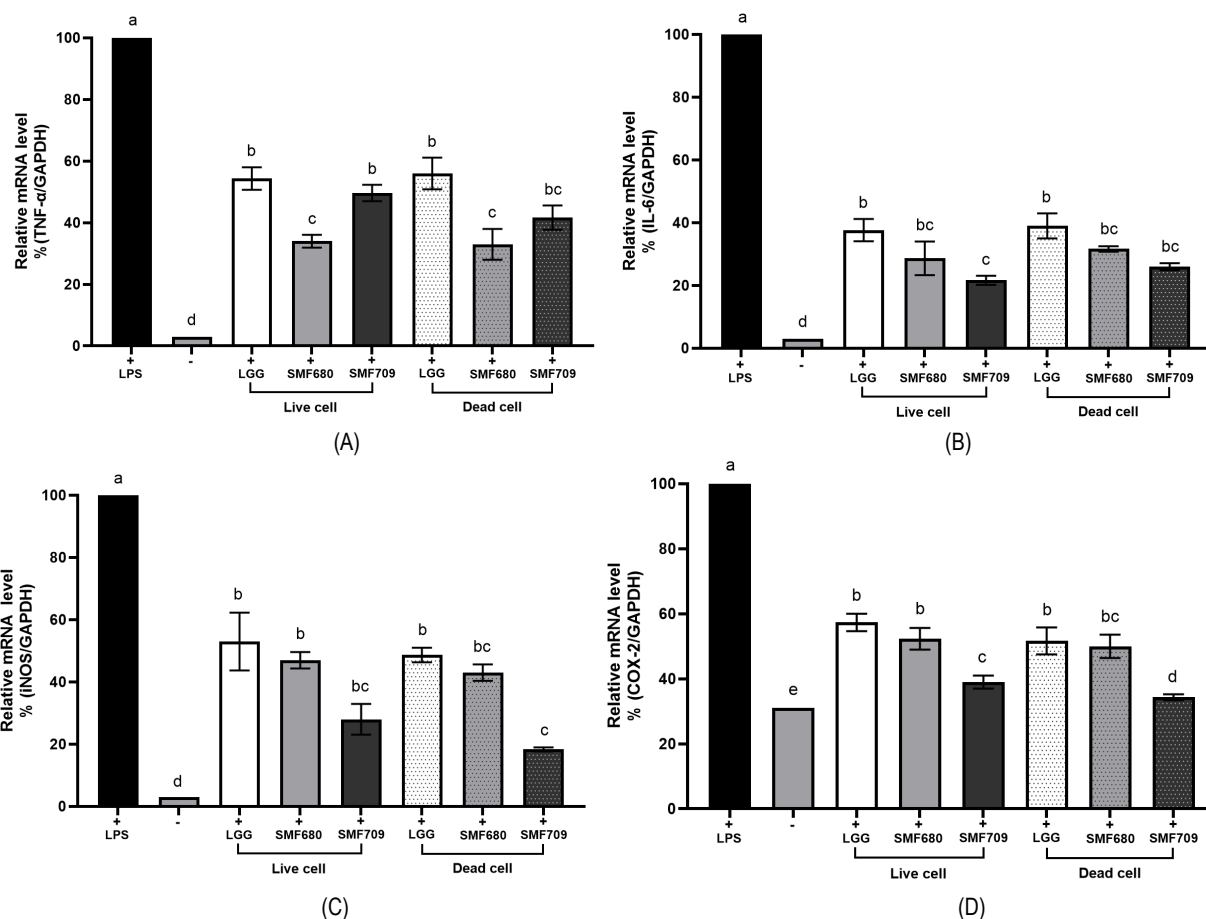


Fig. 5. Effect of live and heat-killed cells of LAB strains on gene expression of TNF- α (A), IL-6 (B), iNOS (C) and COX-2 (D) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. +; LPS (1 μ g/mL), -; without LPS. LGG; *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, SMF680; *Limosilactobacillus fermentum* SMF680, SMF709; *Limosilactobacillus fermentum* SMF709. Data are presented as mean \pm standard deviation (n=3). ^{a-e}Different letters indicate significant difference ($p<0.05$).

요 약

백김치에서 프로바이오틱스 활성이 우수한 2종의 유산균 (*Limosilactobacillus fermentum* SMF680과 *Limosilactobacillus fermentum* SMF709)을 선별하여, 생균과 열처리 사균체의 항산화 및 항염 활성을 평가하였다. 선별된 SMF680과 SMF709 균주는 상업용 프로바이오틱스 균주인 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG(LGG)와 비교하여 내산성, 내담즙성, 장부착능에서 유사한 결과를 나타내었다. SMF680과 SMF709의 생균과 사균체는 1 mg/mL 농도에서 장세포(HT-29)와 대식세포(RAW 264.7)에 대해 독성을 나타내지 않아 안전성이 확인되었다. SMF680과 SMF709 사균체는 LGG 사균체보다 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, β -carotene bleaching 억제능)이 유의적으로 높았다($p<0.05$). 또한 SMF680

과 SMF709 사균체는 생균과 비교했을 때도 ABTS 라디칼 소거능과 β -carotene bleaching 억제능이 유의적으로 높은 것이 확인되었다($p<0.05$). SMF680과 SMF709의 생균 또는 사균체 처리에 의해 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 유의적으로 억제되었다($p<0.05$). SMF680과 SMF709의 생균과 사균체는 LGG의 생균과 사균체보다 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2의 발현 억제 활성이 우수하였으며, 특히 SMF709 사균체는 IL-6, iNOS, COX-2의 발현을 각각 73.86%, 81.93%, 65.75% 억제하여 가장 우수한 항염 효과를 보였다. 따라서 본 연구 결과, *L. fermentum* SMF680과 *L. fermentum* SMF709 균주의 열처리 사균체는 식품, 제약 및 화장품 산업에서 천연 항산화제 및 항염제로 활용 가능할 것으로 기대된다.



Acknowledgments

이 논문은 한국연구재단 기본연구지원사업(2021R1F1A1056371)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Ardestani SK, Tafvizi F, and Ebrahimi MT (2019) Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway. *Hum. Exp. Toxicol.* **38**, 1069-1081.
- Averina OV, Poluektova EU, Marsova MV, and Danilenko VN (2021) Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* as representatives of the human gut microbiota. *MDPI*. **9**, 1340.
- Bae EY, Cho GU, Kim JH, Jung SK, Cho YJ, and Kim BO (2023) Probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from Gajami sikhae. *J. Life Sci.* **33**, 334-342.
- Bang MS, Lee SD, and Oh SJ (2012) Probiotics and intestinal health. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **30**, 139-143.
- Bibi S, Anwar M, Hashmi HF, and Khan MR (2020) Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory potency of *Lepidium pinnatifidum* ledeb. *Clin. Phytosci.* **6**, 21.
- Cheon MJ, Lim SM, Lee NK, and Paik HD (2020) Probiotic properties and neuroprotective effects of *Lactobacillus buchneri* KU200793 isolated from Korean fermented foods. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1227.
- de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, and Sant'Ana AS (2016) Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **58**, 96-114.
- Ghoneim MA and Moselhy SS (2016) Antioxidant status and hormonal profile reflected by experimental feeding of probiotics. *Toxicol. Ind. Health* **32**, 741-750.
- Hyun JH, Woo IK, Kim KT, Park YS, Kang DK, Lee NK, and Paik HD (2024) Heat-treated paraprobiotic *Latilactobacillus sakei* KU15041 and *Latilactobacillus curvatus* KU15003 show an antioxidant and immunostimulatory effect. *J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 358-366.
- Jang HJ, Song MW, Lee NK, and Paik HD (2018) Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *J. Food Sci. Technol.* **55**, 3174-3180.
- Jung SE and Kim SH (2015) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw Mmakgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* **47**, 44-50.
- Kang CH, Kim YG, Han SH, Jeong Y, Park HM, and Paek NS (2019) Probiotic properties of *Bifidobacteria* isolated from feces of infants. *J. Milk Sci. Biotechnol.* **37**, 40-48.
- Kim EJ, Jo SW, Kim Jk, and Jeong DY (2019) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated traditional fermented foods. *J. Life Sci.* **29**, 697-704.
- Kim KH, Kim DM, Byun MW, Yun YS, and Yook HS (2013) Antioxidant activity of *Panax ginseng* flower-buds fermented with various microorganisms. *Korean J. Food Sci. Nutr.* **42**, 663-669.
- Kurumbail RG, Kiefer JR, and Marnett LJ (2001) Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Struct. Biol.* **11**, 752-760.
- Kwon M, Lee J, Park S, Kwon OH, Seo J, and Roh S (2020) Exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 has antiinflammatory effects via the toll-like receptor 4 pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9283.
- Lee NK, Kim SY, Han KJ, Eom SJ, and Paik HD (2014) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from Kimchi for yogurt starters. *LWT-Food Sci. Technol.* **58**, 130-134.
- Lee NK, Park YS, Kang DK, and Paik HD (2023) Paraprobiotics: definition, manufacturing methods, and functionality. *Food Sci. Biotechnol.* **32**, 1981-1991.
- Lee XM, Lee HA, Kweon M, Park ES, and Park KY (2016) Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum*

- strains isolated from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1717-1724.
20. Liu C, Zhang ZY, Dong K, and Guo XK (2010) Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. *World J. Gastroenterol.* **16**, 2283-2290.
21. Loucif K, Benabdallah H, Benchikh F, Mehloos S, Souici CB, and Smain A (2020) Total phenolic contents, DPPH radical scavenging and β -carotene bleaching activities of aqueous extract from *ammoides atlantica*. *J. Drug Deliv. Ther.* **10**, 196-198.
22. Ma X, Shin YJ, Jang HM, Joo MK, Yoo JK, and Kim DH (2021) *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* alleviate colitis and cognitive impairment in mice by regulating IFN- γ to IL-10 and TNF- α to IL-10 expression ratios. *Sci. Rep.* **11**, 20659.
23. Monteagudo Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, and Chatzifragkou A (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6463-6472.
24. Park M, Jeong ES, Oh S, Song MH, Doo JK, Jeong YS, Moon YI, and Kim Y (2013) Rapid *in vivo* colonization screening of probiotic bacteria isolated from human infants using *Caenorhabditis elegans* surrogate host. *Korean J. Food Sci. An.* **33**, 522-530.
25. Park SN and Lee OH (2022) Effects of *Saccharomycopsis fibuligera* fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Kerria japonica* flower extract. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* **54**, 209-216.
26. Park YE, Kim BH, Yoon YC, Kim JK, Lee JH, Kwon GS, Hwang HS, and Lee JB (2018) Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lactic-acid bacteria fermentation. *J. Life Sci.* **28**, 547-554.
27. Pique N, Berlanga M, and Galbis DM (2019) Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2534.
28. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, and Gil A (2017) Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients* **9**, 555.
29. Ryu MS, Yang HJ, Kim JW, Jeong SJ, Jeong SY, Eom JS, and Jeong DY (2017) Potential probiotics activity of *Bacillus* spp. from traditional soybean pastes and fermentation characteristics of Cheonggukjang. *Korean J. Food Preserv.* **24**, 1168-1179.
30. Seo JH and Lee H (2007) Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 681-687.
31. Shin SJ, Ha G, Jeong SJ, Ryu MS, Yang HJ, Kim Y, Oh S, and Jeong DY (2021) Evaluation of probiotic characteristics of *Lactobacillus pentosus* SRCM103472 isolated from traditional fermented food using *Caenorhabditis elegans in vivo* model. *Korean J. Microbiol.* **57**, 255-264.
32. Song MW, Jang HJ, Kim KT, and Paik HD (2019) Probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus brevis* KCCM 12203P isolated from Kimchi and evaluation of immune-stimulating activities of its heat-killed cells in RAW 264.7 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1894-1903.
33. Umare V, Pradhan V, Nadkar M, Rajadhyaksha A, Patwardhan M, K. Ghosh K, and Nadkarni A (2014) Effect of Proinflammatory Cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) on Clinical Manifestations in Indian SLE patients. Hindawi Publishing Corporation. **2014**, 385297.
34. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, Wang Y, and Li W (2017) Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* **9**, 521.
35. Woo JB, Han JY, Seo ES, Seo MY, and Kim BY (2022) Safety assessment of *Bifidobacterium breve* BB077 as probiotics. *J. Food Hyg. Saf.* **37**, 306-309.
36. Yang HS, Chol YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW, and Huh CK (2014) Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 80-85.
37. Yeon SH, Ham H, Sung J, Kim Y, Namkoong S, Jeong



- HS, and Lee J (2013) Antioxidant activities of hot water extract from *cornus walteri* wanger against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 1525-1532.
38. You CB, Lee ES, Lee MK, Lee GY, and Park H (2022) Antioxidant and anti-inflammatory activities of heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics.* **8**, 66-78.
39. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, and Lu D (2012) Resveratrol inhibits LPS-Induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PLoS ONE.* **7**, e44107.