

## Note

# 김치 유래 유산균의 생리학적 활성

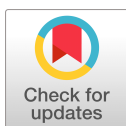
추동훈<sup>1</sup> · 국무창<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>콜마비엔에이치, <sup>2</sup>배화여자대학교 식품영양과

## Physiological Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Kimchi

Donghun Chu<sup>1</sup> and Moochang Kook<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Kolmarbnh, <sup>2</sup>Dept. of Food & Nutrition, Baewha Women's University



Received: Dec. 9, 2019  
 Revised: Dec. 16, 2019  
 Accepted: Dec. 18, 2019

\*Corresponding author :  
 Moochang Kook  
 Department of Food and Nutrition,  
 Baewha Women's University,  
 Seoul, 03039, Korea.  
 Tel: +82-2-399-0765,  
 E-mail: bmse153@gmail.com

### ORCID

Donghun Chu  
<https://orcid.org/0000-0002-6719-6234>  
 Moochang Kook  
<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

### Abstract

According to the previous study, *Lactobacillus pentosus* A67 and *L. plantarum* subsp. *plantarum* C2 were isolated and screened. In this study, culture broths of strains A67 and C2 were performed various physiological activity assays including antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity, cell proliferation activity. The remarkable anti-microbial activities using the culture broths of the two strains were showed by disc diffusion method, MIC tests. In the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) and superoxide dismutase (SOD) assays to verify antioxidant activity, culture broths of strains A67 and C2 significantly scavenged free radical maximum by 91.33% and 81.95% respectively compared with arbutin. Also, they showed equivalent activity same as 297.22 units and 255.56 units of SOD respectively. In RAW264.7 cells, culture broths of strain A67 and C2 showed no cytotoxicity. Moreover, they showed significant cell proliferative effects by 173.5% and 143.5% compared to control group respectively. Overall, this study showed that the culture broths of strain A67 and C2 had antimicrobial and antioxidant activities, which could synergically increase the physiological activities. And they had no cytotoxicity and cell proliferative effects. Therefore, it is expected that *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2 could be applied to a wide variety of functional materials including food and medicine as new probiotics.

### Keywords

*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, physiological activity, toxicity, antimicrobial activity, antioxidant activity, probiotics

## 서론

유산균은 발효과정동안 당을 분해하여 유기산과 박테리옌 등의 항균물질을 생산함으로써 식품의 풍미를 향상시키고, 부패균의 증식을 억제하여 식품의 저장성을 연장시킬 뿐만 아니라, 프로바이오틱스로서 장내 pH의 산성화를 통한 유해 세균의 증식을 저해시켜 장내 균총을 정상화시키는 것으로 알려져 있다

(Mercenier *et al.*, 2002). 또한 유산균은 유당 분해효소를 분비하여 유당불내증을 완화시키고, 장 점막 면역시스템의 기능을 강화시켜 변비, 설사, 궤양성 대장염이나 과민성 대장증후군을 예방하는 것으로 알려져 있으며, 면역증강, 항균, 항산화, 항염, 항암 등의 연구들이 보고되어 있다(Mercenier *et al.*, 2002).

발효된 김치는 다양한 유산균(CFU/g)을 함유하고 있으며, 김치 내 주요 발효 유산균은 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*와 *Pediococcus* 속 등이 보고되어 있다(Hansongyi *et al.*, 2014). 그 중에서 *L. plantarum*은 가장 널리 알려진 김치 내 프로바이오틱스 유산균으로, 가공 및 육가공 산업의 발효공정에 대표적인 유산균으로 활용되고 있으며, 항균 활성, 과민성 대장증후군과 관련된 설사 또는 변비 증상 완화 등의 장 관련 건강 기능성에 대한 여러 연구들이 보고되고 있다(Vaughan *et al.*, 2006).

따라서 본 연구에서는 선행된 연구(Chu and Kook, 2019)를 통하여 분리한 *Lactobacillus pentosus* A67과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* C2의 생리학적 활성을 확인하여 우수성을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 지시균주

식중독 및 염증유발 균주에 대한 항균활성 평가를 위해 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection (ATCC), USA)과 국립농업과학원 미생물은행 (Korean Agricultural Culture Collection (KACC), Korea)에서 식중독과 염증의 원인이 되는 8종의 지시균주 *E. coli* KCTC 2443, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* KCTC 3705, *Staphylococcus aureus* KACC 10778, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* KACC 10763, *Candida tropicalis* var. *tropicalis* KCTC 17762, *C. glabata* KCTC 7219, *C. albicans* KCTC 7270를 분양 받았다. 각각의 균은 최적조건에서 24시간 배양 후 시험에 사용하였다. 또한 *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 14917은 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection (ATCC), USA)에서 분양 받아 대조균으로 사용하였고, 모든 시험은 3회 반복 수행되었다.

### 생리활성 검토

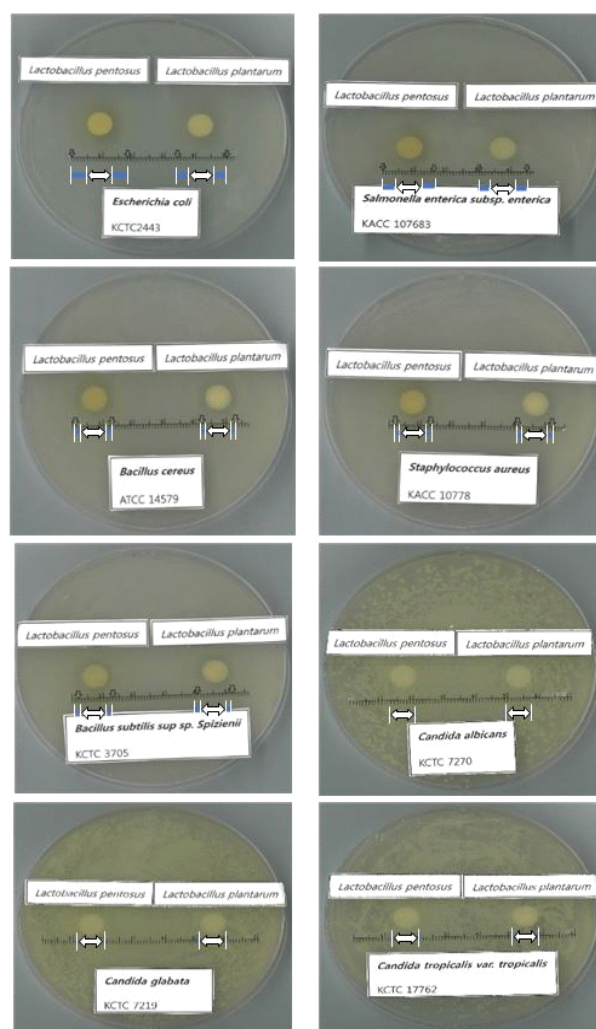
김치 유래 유산균의 항균 활성을 검토하기 위하여 식중독과 염증의 원인이 되는 8종의 지시균주에 대하여 한천배지확산법, 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration; MIC) 시험법 등을 이용하여 항균실험을 수행하였다(Clinic and Laboratory Standards Institute, 2012, Fatima *et al.*, 2012).

또한 김치 유래 유산균의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거능 시험 (Yoon *et al.*, 2014) 및 Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 시험 (Li *et al.*, 2012)을 수행하였으며, 시험균주의 세포증식률에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포주를 이용하여 검토하였다(Moeslinger *et al.*, 2001).

## 결과 및 고찰

### 항균활성 검토

*L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액을 처리한 한천배



**Fig. 1.** Anti-microbial activity of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2 using disc diffusion test. Each of plates showed the size of clear zone after treating supernatant of culture broth for 1 day against various indicators. Left disc, *L. pentosus* A67; Right disc, *L. plantarum* C2.

지화산법 실험결과(Fig. 1), *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* 등 5주의 지시균주에 대해 강한 항균활성을 보였으며, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* 등 진균류인 3주의 지시균주에서는 약한 항균활성을 보였다. *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 그람양성 세균보다 그람음성 세균에서 높은 항균활성을 보였으며, 진균류에서의 항균활성은 세균류에 비하여 낮은 결과를 보였다. 또한 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액에서 각 지시균주에 대한 생육저해 최소농도를 확인하였다(Table 1). *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액은 지시균주 8종의 생육을 대조균주 *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 14917보다 각각 더 효과적으로 저해하였다. 유산균은 박테리옌, 과산화수소 그리고 유기산과 같은 항균물질을 만들어낸다고 보고되어 있다(Douglas *et al.*, 2003). 따라서 본 연구들을 통해 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 우수한 항균물질을 생성하여 항균 효과를 보였고, 박테리옌이 주된 역할을 하였을 것으로 판단된다.

### 항산화 활성 검토

항산화 활성을 평가하기 위한 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거능 시험 (Yoon *et al.*, 2014) 및 Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 시험 (Li *et al.*, 2012)을 수행하였다. *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 DPPH

자유라디칼 소거능 시험 결과(Fig. 2), 가장 높은 활성을 보인 *L. pentosus* A67 상등액에서의 DPPH 자유라디칼 소거율은 91.33%로, 항산화 물질로 잘 알려진 arbutin 100 µg/mL에서의 항산화 활성 (67.06%)보다 24.27% 높은 활성을 보였으며, *L. plantarum* C2에서의 DPPH 자유라디칼 소거율은 81.95%로, arbutin 100 µg/mL에서의 항산화 활성 (67.06%)보다 14.89% 더 높은 활성을 보였다.

또한, *L. plantarum* C2의 배양액은 297.22 units, *L. plantarum* A67의 배양액은 255.56 units의 SOD 활성과 상응하는 항산화 활성을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 본 연구들을 통해 항산화 효과가 뛰어난 *L. plantarum* A67 및 *L. plantarum* C2의 섭취는 체내 산화적 스트레스에 대항하여 활성산소의 축적을 막는 데 도움을 줄 것으로 판단된다.

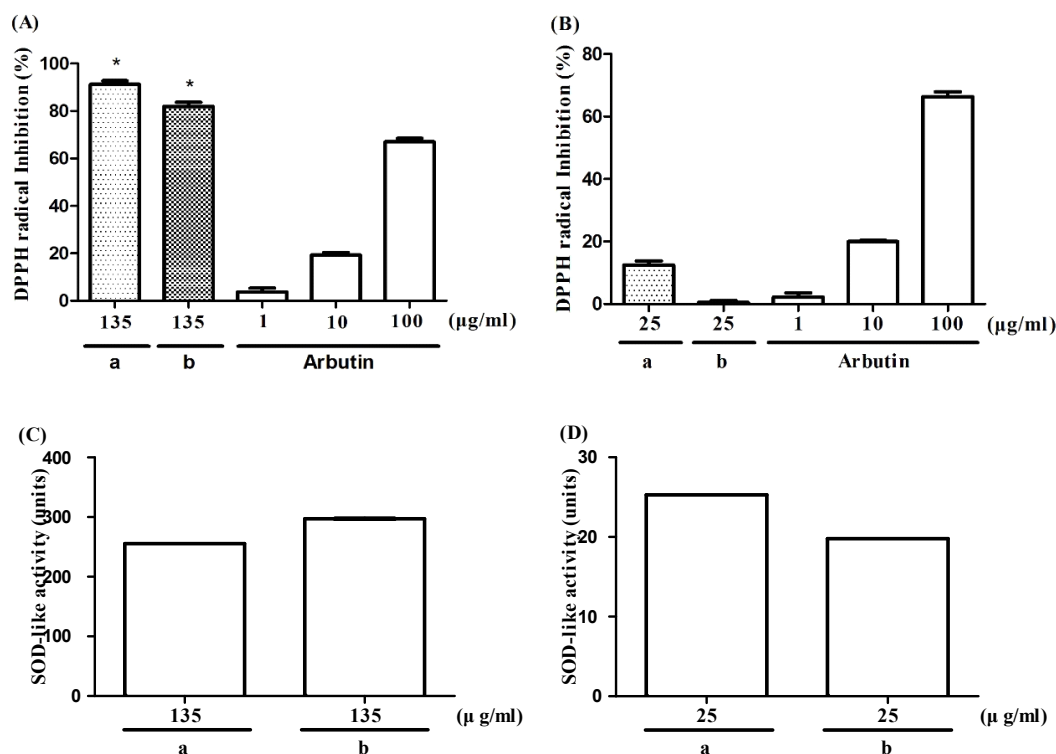
### 면역활성 및 세포독성 검사

시험균주의 세포증식률에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포주를 이용하여 검토하였다 (Moeslinger *et al.*, 2001). 실험결과, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액 처리 후의 세포의 수가 대조군에 비해 각각 유의적으로 증가하였다 (Fig. 3). 배양액과 동일한 농도의 유산균 증균 배지 (MRS)는 세포증식에 영향을 미치지 않았고, 배양액의 증식률은 *L. pentosus* A67의 배양액(B)과 *L. plantarum* C2의 배양액(C)에서 각각 173.5%, 143.5%의 결과를 얻었다. 유산균은 면역을 담당하는 세포의 분열

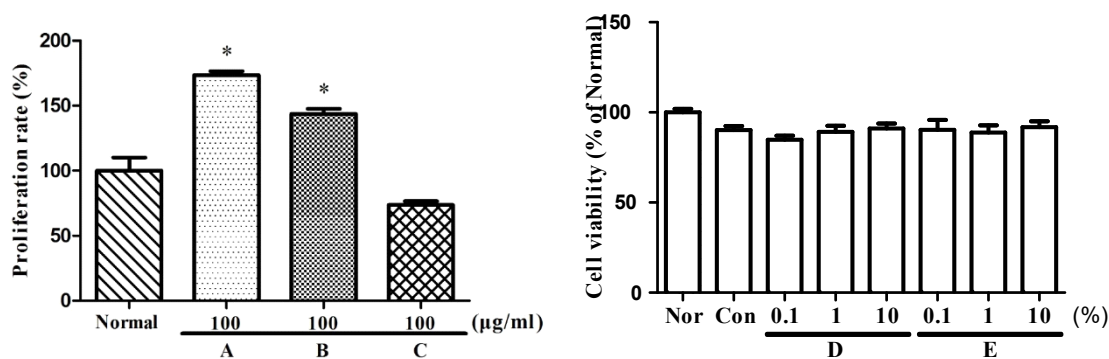
**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2

Indicator	MIC (µg/mL)			
	<i>L. pentosus</i>		<i>L. plantarum</i>	
	A67	ATCC 8041	C2	ATCC 14917
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	2.11	N.D	2.11	N.D
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizienii</i> KCTC 3705	2.11	16.88	4.22	8.44
<i>S. aureus</i> KACC 10778	4.22	67.50	4.22	67.50
<i>E. coli</i> KCTC 2443	8.44	N.D	8.44	67.50
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> KACC 10763	16.88	N.D	16.88	N.D
<i>C. albicans</i> KCTC 7270	67.50	N.D	67.50	N.D
<i>C. glabrata</i> KCTC 7219	67.50	N.D	67.50	N.D
<i>C. tropicalis</i> var. <i>tropicalis</i> KCTC 17762	67.50	N.D	67.50	N.D

The inoculation concentrations of indicators were CFU/mL from bacteria strains and CFU/mL from yeast strains. Those were cultured for 1 day at 30°C after treatment. N.D; not detected. Three independent experiments repeated.



**Fig. 2.** Antioxidation activity of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2. DHP assay : (A), (B); Superoxide dismutase (SOD) like activity : (C), (D). (A), Supernatant compared with arbutin; (B), Cell debris compared with arbutin; (C), Supernatant correspond to SOD; (D), Cell debris correspond to SOD; Concentrations of sample were defined as 1, 10, 100 μg/mL of arbutin and 135 and 25 μg/mL by Bradford protein assay. Values are mean±standard deviations (SDs). a, *L. pentosus* A67; b, *L. plantarum* C2. \*p<0.05 indicates significant differences.



**Fig. 3.** Cell proliferation and cell cytotoxicity by *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2. The results were expressed as percent of proliferation rate and each bar showed the mean ± SD of the three independent experiments repeated. The RAW 264.7 cells were incubated for 24 h in each of samples as calculating increased viable cell from initial seeded 1.5 x cells/well. A-C were diluted by DMEM media. Normal, no treatment; A, supernatant of *L. pentosus* A67 (100 μg/mL); B, supernatant of *L. plantarum* C2 (100 μg/mL); C, MRS broth control (100 μg/mL). \*p<0.05 indicated significant differences. The RAW 264.7 cells were incubated for 24 h in the various concentration of supernatant of *L. pentosus* A67 and *L. plantarum* C2. Viable cell numbers, determined using the MTT assay, were represented as the relative percentages (viable cell number obtained from the untreated control cells is 100). Each bar showed the mean±SD of the three independent experiments repeated. Nor, LPS negative; Con, LPS positive; D, culture broth of *L. pentosus* A67; E, culture broth of *L. plantarum* C2. \*p<0.05 indicated significant differences.



및 증식을 촉진시켜서 면역기능을 활성화시키는 기능(Garcia 등, 2014)을 갖는 것으로 보고되어 있으며, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액이 면역을 담당하는 RAW 264.7 대식세포 (macrophage cell)를 활성화시킨 것으로 사료된다. 또한 유산균 배양액의 안전성을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포주를 이용하여 세포독성을 확인하는 MTT 시험을 수행하였다 (Sylvester 등, 2011). 실험결과, *L. pentosus* A67의 배양액은 10%에서도  $91.03\% \pm 2.77\%$ 의 생존율을 보였고, *L. plantarum* C2의 배양액에서도 10%에서  $91.78\% \pm 3.22\%$ 의 생존율을 보였다(Figure 3). 따라서 두 유산균 배양액을 10%까지 처리하였음에도 불구하고 대조군과 비교하였을 때 10% 이상의 유의적인 세포독성이 없었으므로 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2 배양액의 안전성을 확인할 수 있었다.

## 요 약

김치에서 분리한 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 그람양성 세균보다 그람음성 세균에서 높은 항균활성을 보였으며, 진균류에서의 항균활성은 세균류에 비하여 낮은 결과를 보였고, 각 지시균주에 대한 생육저해 최소농도를 확인하였다. 뿐만 아니라 DPPH 시험에서 두 균주의 배양액이 각각 91.33%, 81.95%의 라디칼 소거능으로 양성 대조군인 arbutin보다 높은 항산화 활성을 보였으며, SOD 유사활성 시험에서는 두 균주의 배양액이 각각 255.56 units, 297.22 units의 SOD와 상응하는 항산화 활성을 보였다. 또한 *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2의 배양액은 RAW 264.7 세포에서 독성을 보이지 않았다.

*L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 장내환경에 생존하기 적합하고, 같은 종의 균주보다 우수한 내산성능 및 내담즙성능을 가진 프로바이오틱스이자 다양한 계열의 항생제에 대한 우수한 내성을 가진 프로바이오틱스로 보고되어 있다(Chu and Kook, 2019). 따라서, *L. pentosus* A67과 *L. plantarum* C2는 동일한 종의 균주들보다 우수한 항산화 및 항균활성 등의 생리학적 활성을 보유하고 있는 안전하고 유용한 기능성 프로바이오틱스로 판단되며, 추가적인 연구가 요구된다.

## 감사의 글

이 논문은 2019년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2019R1F1A10 58399).

## References

1. Ann YG (2011) [Lactic acid bacteria] Probiotic lactic acid bacteria. *Korean J. Food & Nutr.* **24**, 817-832.
2. Casado MMC, Benomar N, Ennahar S, Horvatovich P, Lavilla LL, Knapp CW, Gálvez A, and Abriouel H (2016) Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* **222**, 8-15.
3. Chu D and Kook MC (2019) Probiotics characterization of *Lactobacillus* species isolated from Kimchi. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* **5**(1), 33-37.
4. Francoise B, Anna C and Daniel KO *et al.* (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentinaensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1629-1634.
5. García RA, González LD and Esteban FA *et al.* (2014) Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* **44**, 220-225.
6. Georgieva R, Yocheva L and Tserovska L *et al.* (2015) Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Bio-technol. Equip.* **29**, 84-91.
7. Gueimonde M and Salminen S (2006) New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**, S242-S247.
8. Radulović Z, Miočinović J and Mirković N *et al.* (2017) Survival of spray-dried and free-cells of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in soft goat cheese. *Anim. Sci. J.* **88**, 1849-1854.
9. Saarela M, Mogensen G and Fonden R *et al.* (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**, 197-215.
10. Sahadeva RPK, Leong SF and Chua KH *et al.* (2011) Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int. Food Res. J.* **18**, 1515-1522.
11. Tulumoglu S, Yuksekdogan ZN and Beyatli Y *et al.* (2013) Probiotic properties of *Lactobacilli* species isolated from children's feces. *Anaerobe.* **24**, 36-42.