

Lactobacillus spp.의 항산화 효과 및 활성산소에 대한 내성

김현수 · 정석근 · 채현석 · 함준상 · 안종남 · 이종문

농촌진흥청 축산연구소

Antioxidant Activity and Tolerance to Reactive Oxygen Species of Lactobacillus spp.

H. S. Kim, S. G. Jeong, H. S. Chae, J. S. Ham, C. N. Ahn and J. M. Lee

National Livestock Research Institute, RDA

ABSTRACT

The four *Lactobacillus* spp. were investigated for their antioxidant properties, including antioxidant activity, tolerance to reactive oxygen species, hydroxy radical scavenging activity and ferrous iron chelating activity. Also, activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were investigated. From the results of this work, the intact cell and cell lysate of *L. casei* KCTC 3260 were exhibited highest antioxidant activity. *L. casei* KCTC 3260 also showed strong tolerance to reactive oxygen species. This strain showed highest glutathione peroxidase activity among the tested strains.

(Key words : *Lactobacillus* spp., Reactive oxygen species, Tolerance, Antioxidant activity)

I 서 론

우리 몸의 세포가 에너지를 얻을 때 산소가 필요하며, 이 과정에서 활성산소가 생긴다(Thannickal과 Fanburg, 2000). 이러한 활성산소는 체내에 유입되는 바이러스나 유독물질 등을 살균하는 긍정적인 효과도 있으나 급속한 현대화로 인한 잘못된 식습관과 대기오염, 식품 첨가물, 농약, 자외선, 스트레스 등으로 인해 과잉 생산된 활성산소는 당뇨, 심장질환, 동맥경화 등 성인병 외에도 노화를 촉진시키는 직접적인 원인으로 알려져 있다.

항산화물은 free radical에 의한 지질, 단백질, 핵산 등의 손상을 차단, 억제하거나 지연시키는 물질로서 최근에는 미생물 유래의 안전하고 강한 천연 항산화물을 찾고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며(Rash 등, 1993; Chung 등, 2002), 유산균의 항산화 활성에 대하여 보

고된 바 있다(Korpela 등, 1997, Kullisaar 등, 2002, Lin과 Yen, 1999),

Lactobacillus spp.는 사람의 건강한 장내 미생물 군중에 중요한 미생물일 뿐 만 아니라(Sandine, 1979) 항미생물 효과, 면역증강 효과, 항종양 효과 등 인체에 유익한 영향을 주는 것으로 잘 알려져 있다(Holzapfel 등, 1998).

본 연구에서는 *Lactobacillus* spp.의 항산화 효과, 활성산소에 대한 내성, hydroxy radical 소거능, ferrous iron 흡착능 및 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase 활성을 측정하고자 하였다.

II 재료 및 방법

1. 공시 균주

본 시험에서 사용한 균주 *Lactobacillus casei*

Corresponding author : H. S. Kim, National Livestock Research Institute, RDA, Suwon, 441-350, Korea. Tel : 031-290-1682, Fax : 031-290-1697, E-mail : khs0208@rda.go.kr

KCTC 3260, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus lactis* KCTC 3034 및 *Lactobacillus helveticus* KCTC 3545는 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받아 사용하였다. 이들 균주는 MRS broth(Difco)에 37 °C에서 48시간 혐기적(BBL GasPack anaerobic system)으로 배양하였다.

2. Intact cell 및 cell lysate

균주들은 MRS broth에 37 °C에서 배양 후 원심분리(4,000 × g, 10분) 하여 cell을 회수하였다. 회수된 cell은 20mM sodium phosphate buffer (SPB, pH 7.4)로 2회 세척 후 다시 SPB에 현탁하여 intact cell은 10⁹ CFU/ml로 맞추어 사용하였다. Cell lysate는 현탁한 cell을 초음파 처리로 파쇄하고 원심분리(7,000 × g, 10분)한 후 상등액을 0.45µm filter(Milipore)로 여과하였으며, 단백질 함량은 Bradford 법(Bio-Rad Laboratories)으로 측정하고 약 1 mg/ml로 조정하여 사용하였다.

3. 항산화 효과

항산화 효과는 Lin과 Chang(2000)의 방법을 사용하여 측정하였다. Linoleic acid emulsion은 0.1 ml linoleic acid(Sigma, 99%), 0.2 ml tween 20 그리고 19.7 ml의 증류수를 혼합하여 제조하였다. 시료 0.4 ml, 20 mM PBS 0.5 ml을 1 ml의 linoleic acid emulsion과 혼합 후 0.01%의 FeSO₄ 0.2 ml을 첨가하여 잘 혼합하였다. 여기에 0.56 mM H₂O₂ 0.2 ml을 첨가하고 37 °C 암실에서 배양하였다. 6시간 배양 후 0.4% butylated hydroxytoluene(BHT) 0.2 ml과 4% trichloroacetic acid(TCA) 0.2 ml 및 0.8% TBA 2 ml을 첨가하고 100 °C에서 20분간 가열하였다. n-butanol(Sigma) 2 ml을 가하여 추출하고 원심분리하여 상등액을 취하여 532 nm(Jasco V530 spectrophotometer, Japan)에서 흡광도를 측정하여 linoleic acid peroxidation 억제 정도를 항산화 효과(%)로 나타내었다. Positive control로서 일반적으로 잘 알려진 수용성 vitamin E 유도체인 Trolox(Sigma)를 사용하였다.

4. 활성산소에 대한 내성

활성산소에 대한 내성은 Kullisaar 등(2002)의 방법으로 측정하였다.

Hydrogen peroxide에 대한 내성을 측정하기 위하여 cell(10⁷ cfu/ml)에 1mM hydrogen peroxide(30%, Wako)를 첨가한 후 37 °C에서 배양하면서 1시간 간격으로 MRS plate agar에 생균수를 측정하였다.

Hydroxy radical에 대한 내성 측정을 위하여 100mM의 CuSO₄ × 5H₂O와 10 mM terephthalic acid(THA, Sigma)를 혼합하고, 1 mM hydrogen peroxide를 첨가하여 반응을 개시하고 cell(10⁷ cfu/ml)과 배양하면서 위와 동일한 방법으로 생균수를 측정하였다.

Superoxide radical에 대한 내성은 superoxide radical을 paraquat(1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridium, Sigma)을 사용하여 유도하고 diffusion assay (Barreto 등, 1995)로 측정하였다. Cell suspension(10⁷ cfu/ml)을 MRS agar에 도말 한 후 10 mM paraquat 10µl가 함유된 paper disk를 agar plate에 정치하고 37 °C에서 overnight 배양 후 성장저해환(mm)을 측정하였다.

5. Hydroxy radical 소거능

Hydroxy radical 소거능은 Kullisaar 등(2002)의 방법으로 측정하였으며, hydroxy radical은 THA를 사용하여 Fenton reaction으로 유도 하였다 (Barreto 등, 1995). 10mM THA 2 ml을 0.1 ml의 시료와 혼합하고, 0.1 ml CuSO₄ × 5H₂O와 0.1 ml hydrogen peroxide를 최종농도가 10 mM이 되도록 첨가하였다. 이 반응으로 생성된 THA와 hydroxy radical의 반응물을 Fluorescence spectrophotometer(Bio-TEK instrument SMF25, Switzerland)를 사용하여 312 nm excitation, 426 nm emission에서 측정하여 hydroxy radical 소거능(%)을 구하였다.

6. Ferrous iron 흡착능

Ferrous iron의 흡착능은 Yen과 Wu(1999)의 방법으로 측정하였다. 2 mM ferrous chloride

(Sigma) 0.1 ml과 5mM ferrozine(Sigma) 0.2 ml 그리고 증류수 4.6 ml에 시료 0.1 ml을 첨가하고 10분간 실온에서 반응 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous iron 흡착능은 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Ferrous iron 흡착능(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$$

7. Superoxide dismutase(SOD), Glutathione peroxidase(GPX) 활성

SOD와 GPX 활성은 각각 상업적 kit 인 RANSOD(Randox Laboratories, UK)와 RANSEL(Randox Laboratories, UK)을 사용하여 측정하였다.

8. 통계처리

측정값은 평균±표준오차로 나타내었고, Duncan's multiple range test(SAS, release 8.01, SAS Institute Inc, Cary, NC)로 5% 신뢰수준에서 유의차를 검정하였다.

III 결과 및 고찰

1. 항산화 효과

본 실험에서는 일반적으로 사용되고 있는 linoleic acid peroxidation system(Wanasundrara 등, 1994)을 사용하여 *Lactobacillus* spp.의 intact cell과 cell lysate의 항산화 효과를 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 intact cell의 경우 5.3%~36.9%, cell lysate의 경우 23.6%~79.8%의 효과를 나타내었다. Positive control로서 사용한 Trolox(10 mM)의 항산화 효과는 89.23%이었다. *L. casei* 3260이 본 실험에 사용한 균주들 중 intact cell과 cell lysate에서 각각 36.9%와 79.8%로서 가장 높은 항산화 효과를 나타내었다. 이것은 Lin과 Chang(2000)이 보고한 *L. acidophilus* ATCC 4356의 지질과산화 억제 효과(intact cell; 28%, cell lysate; 48%)나 Kullisaar 등(2002)이 보고한 *L. fermentum*의 항산화 효과

(intact cell; 21%, cell lysate; 59%)와 비교하여 높았다.

Table 1. Antioxidant activities of *Lactobacillus* spp. and Trolox

Strains	Antioxidant activity (%)	
	Intact cells	Cell lysate
Trolox	89.23 ± 5.4 ^a	
<i>L. casei</i> KCTC 3260	36.9 ± 5.4 ^b	79.8 ± 3.5 ^b
<i>L. casei</i> KCTC 3109	5.3 ± 7.6 ^c	45.1 ± 3.4 ^c
<i>L. lactis</i> KCTC 3034	ND	23.6 ± 5.4 ^d
<i>L. helveticus</i> KCTC 3545	ND	75.6 ± 2.0 ^b

Trolox, a known antioxidant, was used as positive control at the concentration of 10 mM.

^{a-d} Values in the same column with different superscripts letters are significantly different(P < 0.05).

2. 활성산소에 대한 내성

항산화 효과가 높은 균주는 활성산소 존재 하에서 항산화 효과가 낮은 균주에 비하여 더 오래 동안 생존 할 것으로 사료되며, *Lactobacillus* spp. 의 활성산소에 대한 내성을 측정하였다.

Hydrogen peroxide에 대한 내성을 Fig. 1에 나타내었다. Intact cell과 cell lysate 모두에서 항산화 효과가 높은 균주인 *L. casei* 3260은 9시간 이상 생존하였고, cell lysate에서 항산화 효과가 높았지만 intact cell에서 항산화 효과가

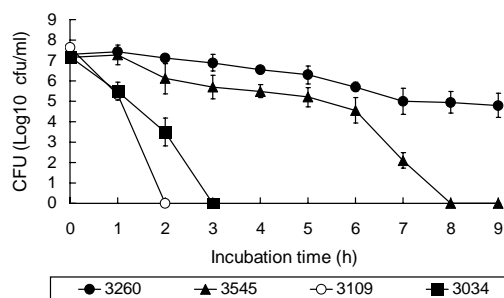


Fig. 1. The survival of *Lactobacillus* spp. in the presence of hydrogen peroxide. —●— *L. casei* KCTC 3260, —▲— *L. helveticus* KCTC 3545, —○— *L. casei* KCTC 3109, —■— *L. lactis* KCTC 3034.

측정되지 않은 *L. helveticus* 3545 또한 8시간 동안 생존하였다. Intact cell과 cell lysate 모두에서 항산화 효과가 낮은 균주인 *L. lactis* 3034와 *L. casei* 3109는 각각 3시간과 2시간 동안 생존하였다. Hydrogen peroxide의 축적은 세포 생존성에 나쁜 영향을 주며(Deutsch, 1998), *E. coli*의 경우 1~3mM의 농도에서 사멸하는 것으로 보고되어 있다(Imlay와 Linn, 1988). 본 실험에서 *L. casei* 3260은 1mM의 hydrogen peroxide에 대하여 그 생존성에 직접적으로 영향을 받지 않아 높은 내성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Hydroxy radical에 대한 내성을 Fig. 2에 나타내었다. Fenton reaction을 통해 hydroxy radical을 유도하고 *Lactobacillus* spp. cell과 배양하면서 생존성을 조사한 결과 항산화 효과가 높은 균주인 *L. casei* 3260은 7시간 동안 생존한 반면 항산화 효과가 낮은 *L. lactis* 3034는 2시간 후에는 모든 균이 사멸하였다. 이상의 결과에서 항산화 균주인 *L. casei* 3260은 hydroxy radical에 대해서도 높은 내성을 갖는 것을 알 수 있었다.

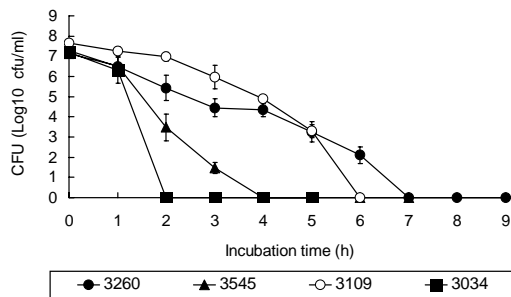


Fig. 2. The survival of *Lactobacillus* spp. in the presence of hydroxy radical.
 —●— *L. casei* KCTC 3260, —▲— *L. helveticus* KCTC 3545, —○— *L. casei* KCTC 3109, —■— *L. lactis* KCTC 3034.

Lactobacillus spp.의 superoxide radical에 대한 내성은 superoxide radical에 대해 성장저해환이 나타나지 않았으므로 superoxide radical에 대하여 내성이 있음을 알 수 있었다.

3. Hydroxy radical 소거능

Lactobacillus spp.의 hydroxy radical 소거능을

측정하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 항산화 균주인 *L. casei* 3260은 intact cell에서 53.1%, cell lysate에서 77.2%로 높은 hydroxy radical 소거능을 나타내었다. 미생물이 hydroxy radical 소거능을 나타내는 것은 ascorbic acid, α -tocopherol, uric acid, bilirubin, glutathione 등과 같은 scavenger를 생산하기 때문이다(Halliwell과 Gutteridge, 1999). Hydroxy radical은 가장 반응성이 강한 radical로서 hydroxy radical 소거능은 지질과산화 억제에 가장 중요한 메커니즘으로 간주되고 있다(Namiki, 1990). 따라서 *Lactobacillus* spp.의 항산화 효과가 hydroxy radical 소거능과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되었으나 *L. casei* 3109와 *L. lactis* 3034 같이 항산화 효과가 낮은 균주의 cell lysate의 hydroxy radical 소거능이 각각 74.7%와 68.8%로 높게 측정되어 본 실험에서는 hydroxy radical 소거능과 항산화 효과 사이의 어떠한 연관성을 설명하기는 어려웠다.

Table 2. Hydroxy radical scavenging activities of *Lactobacillus* spp. and Trolox

Strains	Hydroxy radical scavenging activity (%)	
	Intact cells	Cell lysate
Trolox	96.0 ± 0.2 ^a	
<i>L. casei</i> KCTC 3260	53.1 ± 4.9 ^b	77.2 ± 3.7 ^b
<i>L. casei</i> KCTC 3109	38.8 ± 2.8 ^c	74.7 ± 0.9 ^b
<i>L. lactis</i> KCTC 3034	25.1 ± 6.5 ^d	68.8 ± 3.3 ^c
<i>L. helveticus</i> KCTC 3545	32.7 ± 3.5 ^c	74.4 ± 3.5 ^b

Trolox was used as positive control at the concentration of 10 mM.

^{a-d} Values in the same column with different superscripts letters are significantly different (P < 0.05).

4. Ferrous iron 흡착능

미생물의 금속 이온 흡착능은 세포내 추출물에 존재하는 EDTA, penicillamine과 desferriamine 같은 생리적 chelator에 의한 것으로 이들은 금속이온을 포집하여 산화 축진을 저지한다(Gutteridge 등, 1979). *Lactobacillus* spp.의 ferrous iron 흡착능을 조사한 결과 Table 3에 나타

낸 바와 같이 intact cell에서는 *L. casei* 3109가 67.4%로 가장 높은 흡착능을 나타내었고, *L. lactis* 3034는 34.1%로서 가장 낮았다. Cell lysate에서는 *L. casei* 3260, *L. lactis* 3034 및 *L. helveticus* 3545는 각각 69.0, 67.0과 74.3%로 높았고, *L. casei* 3109는 52.2%로 낮았다. Hydroxy radical 소거능 측정에서와 같이 ferrous iron 흡착능 또한 항산화 효과와 연관성을 설명할 수는 없었다.

Table 3. Ferrous iron chelating activities of *Lactobacillus* spp. and EDTA

Strains	Ferrous iron chelating activity (%)	
	Intact cells	Cell lysate
EDTA	99.9 ± 0.0 ^a	
<i>L. casei</i> KCTC 3260	42.7 ± 3.6 ^d	69.0 ± 1.9 ^b
<i>L. casei</i> KCTC 3109	67.4 ± 2.1 ^b	52.2 ± 2.4 ^c
<i>L. lactis</i> KCTC 3034	34.1 ± 2.6 ^e	67.0 ± 4.5 ^b
<i>L. helveticus</i> KCTC 3545	54.2 ± 0.7 ^c	74.3 ± 3.1 ^b

EDTA was used as positive control at the concentration of 600 ppm.

^{a-e} Values in the same column with different superscripts letters are significantly different ($P < 0.05$).

5. SOD 및 GPX activity

SOD 활성을 측정한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 모든 균주에서 매우 낮은 효소 활성

Table 4. SOD and GPX activities of *Lactobacillus* spp.

Strains	SOD	GPX
	(U/g protein)	(U/mg protein)
<i>L. casei</i> KCTC 3260	11.7 ± 0.1 ^a	9.8 ± 0.7 ^a
<i>L. casei</i> KCTC 3109	11.0 ± 0.1 ^a	7.6 ± 0 ^c
<i>L. lactis</i> KCTC 3034	6.7 ± 0 ^b	8.3 ± 0.2 ^b
<i>L. helveticus</i> KCTC 3545	10.4 ± 1.6 ^a	0.3 ± 0 ^d

^{a-d} Values in the same column with different superscripts letters are significantly different ($P < 0.05$). SOD: superoxide dismutase, GPX: glutathione peroxidase.

을 나타내었다. SOD는 superoxide radical을 hydrogen peroxide로 변환시켜 세포 내 superoxide radical 함량을 줄임으로써 독성인 superoxide radical을 직접 제거한다(Fridovich, 1989). 항산화 유산균에서 SOD 활성이 측정되지 않았다는 Lin과 Yen(1999)의 보고 등으로 미루어 보아 지질과산화 억제에 SOD는 적게 관여하는 것으로 생각된다. Akaike 등(1992) 또한 peroxy radical에 대한 미생물의 항산화 작용은 SOD에 의한 것이 아닌 α -tocopherol과 L-ascorbate에 의한 저해라고 보고 하였다.

GPX는 free radical을 소거하거나 glutathione (GSH)의 수준을 일정하게 유지함으로써 산화적 손상으로부터 세포를 보호한다. 즉, 세포내 GPX의 농도가 증가하면 산화적 스트레스에 대항하여 cell의 내성도 증가한다(Tabatabaie와 Floyd, 1994). GPX의 활성을 조사한 결과 *L. casei* 3260이 9.8U/mg protein으로서 가장 높았고 *L. helveticus* 3545는 0.3U/mg protein으로 낮았다. 따라서 활성산소 하에서 *L. casei* 3260의 높은 생존성은 GPX 활성과 관련이 있을 것으로 생각된다.

IV 요 약

본 연구에서는 4종류의 *Lactobacillus* spp.의 항산화 효과와 활성산소에 대한 내성을 측정하였다. 그 결과 *L. casei* KCTC 3260의 항산화 효과가 intact cell에서 36.9%, cell lysate에서 79.8%로서 높은 항산화 효과를 나타내었다. 또한 1mM 농도의 hydrogen peroxide에서 생존성에 직접적으로 영향을 받지 않는 등 활성산소에 대해서 높은 내성을 나타내었다. 또한 높은 GPX 활성이 활성산소 하에서 *L. casei* KCTC 3260의 생존성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

V 인용 문헌

1. Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kondo, M., Ando, M. and Maeda, H. 1992. Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals gen-

- erated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 294:55-63.
2. Barreto, J. C., Smith, G. S., Strobel, N. H. P., McQuillin, P. A. and Miller, T. A. 1995. Terephthalic acid : a dosimeter for the detection of hydroxy radicals *in vitro*. *Life Sci.* 56:89-96.
 3. Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F. and Chou, S. T. 2002. Antioxidant activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Agric. Food. Chem.* 50:2454-2458.
 4. Deutsch, J. C. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Analytical Biochem.* 255:1-7.
 5. Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 264:7761-7764.
 6. Gutteridge, J. M. C., Richmond, R. and Halliwell, B. 1979. Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroxy radicals from superoxide of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 184:469-472.
 7. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press.
 8. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Intl. J. Food Microbiol.* 41:85-101.
 9. Imlay, J. A. and Linn, S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240:1302-1309.
 10. Korpela, R., Peuhkuri, K., Lähteenmäki, T., Sievi, E., Saxelin, M. and Vapaatalo, H. 1997. *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft*, 52:503-505.
 11. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Intl. J. Food Microbiol.* 72:215-224.
 12. Lin, M. Y. and Chang, F. J. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium logum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Diges. Diseases and Sci.* 45:1617-1622.
 13. Lin, M. Y. and Yen, C. L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47:1460-1466.
 14. Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in foods. *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 29:273-300.
 15. Rashid, M. H. O., Kato, F., Murata, A. and Kondo, M. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus oryzae*. *Bull. Fac. Agr. Saga University.* 75:45-53.
 16. Sandine, W. E. 1979. Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Pro.* 42:259-262.
 17. Tabatabaie, T. and Floyd, R. A. 1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Archives of biochem. and Biophys.* 314:112-119.
 18. Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279:L1005-L1028.
 19. Wanasundara, U., Amarowicz, R. and Shahidi, F. 1994. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food. Chem.* 42:1285-1290.
 20. Yen, G. C. and Wu, J. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* 65:375-379.
- (접수일자 : 2004. 8. 26. / 채택일자 : 2004. 12. 6.)