J Korean Soc Food Sci Nutr
43(7), 1009~1016(2014)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.7.1009

묵은지 스타터 *Lactobacillus curvatus* ML17의 생균제적 특성 및 기능성 조사

김효주[1] · 성혜미[1] · 신현경[1] · 김기명[2] · 양은주[1]

[1](재)전남생물산업진흥원 식품산업연구원
[2]호남대학교 식품영양학과

Characterization of Probiotic and Functional Properties of *Lactobacillus curvatus* ML17, a Mukeunji Starter

Hyo Ju Kim[1], Hea Mi Sung[1], Hyun-Kyung Shin[1], Ki Myong Kim[2], and Eun Ju Yang[1]

[1]*Food Research Institute, Jeonnam Bioindustry Foundation*
[2]*Dept. of Food and Nutrition, Honam University*

ABSTRACT This study investigated the probiotic and functional characteristics of Mukeunji starter, *Lactobacillus curvatus* ML17, isolated from Mukeunji. *Lb. curvatus* ML17 was confirmed as a safe microorganism due to its non-hemolytic activity and non-production of harmful β-glucuronidase and β-glucosidase. Tolerance to artificial gastric and bile juice of *Lb. curvatus* ML17 was investigated. After incubation in artificial gastric and bile juice, the number of surviving cells was 1.38×10^8 CFU/mL. According to the results of adhesion assay, this strain also exhibited good adhesion to Caco-2 cells. *Lb. curvatus* ML17 showed good antimicrobial activity against food borne pathogens, especially *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Cell-free extract of *Lb. curvatus* ML17 exhibited high levels of DPPH scavenging capacity and inhibitory effects on growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells and HT-29 human colon carcinoma cells. These results suggest that *Lb. curvatus* ML17 has potential for application in functional foods.

Key words: Mukeunji, *Lactobacillus curvatus*, adhesion to Caco-2, antimicrobial activity, anticancer activity

서 론

김치의 발효를 주도하는 유산균은 장내 바람직한 미생물로서 오래전부터 발효식품의 제조에 이용되어 왔으며 인체에 안전한 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로 인식되고 있다(1). 현재까지 김치로부터 다양한 종류의 유산균이 분리 동정되고 있으며, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* 속 등이 김치 발효에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2). 김치 유산균의 대사산물 중 유기산은 김치의 조직감을 향상시키고 바람직한 풍미를 부여하며, 박테리오신 등 유해세균을 억제하는 항균물질은 김치의 보존성을 증가시키는 역할을 한다(3,4). 뿐만 아니라 김치 유산균의 probiotic 활성(5), 항산화 및 항암 활성(6,7), 항고혈압 활성(8), 항비만 활성(9), 면역조절 활성(10) 등의 건강기능성에 대한 우수한 연구 결과가 보고되면서 김치 유산균을 산업적으로 이용하려는 노력들이 활발하다. 기능성 김치 유산균의 활용은 식품뿐만 아니라 의약, 화장품 및 사료 산업까지 그 분야가 확대되고 있다.

Received 20 March 2014; Accepted 11 June 2014
Corresponding author: Eun Ju Yang, Food Research Institute, Jeonnam Bioindustry Foundation, Naju, Jeonnam 520-330, Korea
E-mail: rootage@hanmail.net, Phone: +82-61-339-1217

묵은지는 전통식품인 김치의 한 종류로서 적어도 6개월에서 1년 이상 저온에서 숙성시켜 익은 김치를 말한다. 묵은지는 일반 김치와 달리 배추가 물러지는 것을 방지하기 위하여 소금을 더 많이 쓰고 양념을 최소화하여 장기간 숙성시킴으로써 독특한 풍미와 조직감을 나타내는 별미 김치이다. 최근에는 상업용 김치 시장의 확대로 김치 시장의 세분화와 함께 소비자의 기호도가 다양해지면서 묵은지에 대한 수요가 증가하고 있다(11). 그러나 묵은지에 대한 학술 연구는 매우 미흡한 실정이며 관능적 특성 분석(3), 저장조건에 따른 품질특성(12), 묵은지 첨가 제품 개발(13) 외에 묵은지로부터 분리한 유산균의 기능성에 대한 연구보고는 2건에 불과하다(14,15).

그러므로 본 연구에서는 묵은지 유래 유산균의 기능적 특성 분석을 통하여 주로 적숙기 김치에 집중되어 있는 학술연구를 다양한 김치로 확장시키는 토대를 마련하고자 하였다. 전보에서는 묵은지로부터 분리한 *Lactobacillus curvatus* ML17 유산균을 묵은지 스타터로 개발하고 종균 묵은지의 특성을 보고하였다(11). 본 연구에서는 묵은지 스타터 *Lb. curvatus* ML17의 생균제로서의 특성 및 기능성을 조사하기 위하여 안전성 평가, 장내 생존성 및 부착성, 항균 활성, 항산화 및 항암 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 균주는 묵은지에서 분리한 유산균으로 본 연구실에서 묵은지 발효용 스타터로서 개발한 *Lactobacillus curvatus* ML17을 사용하였다(11). 균주의 배양은 MRS broth(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 30°C, 24시간 정치 배양하여 사용하였으며 2회 계대배양한 후 실험에 사용하였다.

용혈성 및 효소 활성 측정

Lb. curvatus ML17의 β-용혈성 여부 조사는 Sheep blood agar plate(Hanil Komed Co., Ltd., Sungnam, Korea)에 균주를 streaking 한 후 30°C에서 48시간 배양하여 균체 주위에 용혈 현상에 의한 투명환의 생성 여부를 판단하였으며 양성반응 대조군으로 *Bacillus cereus* KCCM 11204를 사용하였다. 유해 효소 활성 측정은 API ZYM kit(BioMerieux SA, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 평가하였다. 균주는 suspension medium(BioMerieux SA)에 5~6 McFarland로 탁도를 맞춘 후 스트립의 각 큐플에 65 μL씩 분주하여 30°C에서 4시간 배양하였다. 반응 확인은 ZYM A와 ZYM B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨린 후 5분 후에 색의 변화 정도를 관찰하여 효소 활성을 측정하였다.

인공위액 및 인공담즙 저항성

체내 소화관 조건과 유사한 환경을 만들기 위한 인공위액의 조제는 Kobayashi 등(16)의 방법을 변형한 것으로 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정한 MRS broth에 pepsin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1,000 unit/mL를 첨가하여 사용하였다. 인공담즙의 조제는 MRS 액체배지에 0.45 μm membrane filter(DISMIC-13CP, Adventec, Tokyo, Japan)로 여과된 oxgall(Sigma-Aldrich Co.) 용액을 0.3%로 첨가하여 사용하였다. *Lb. curvatus* ML17은 MRS broth에 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(9,950×*g*, 15 min, 4°C) 하여 상등액을 제거하고 균체를 회수한 다음 인공위액 및 인공담즙을 제거한 상등액과 동량 첨가하였다. 인공위액은 37°C에서 2시간 처리하였으며 인공담즙은 37°C에서 24시간 처리한 후 생균수를 측정하여 각각의 저항성을 확인하였다. 또한 인공위액 처리 후 회수된 균체에 다시 인공담즙을 처리한 조건의 저항성을 함께 평가하였다. 대조군으로 *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103을 사용하였다.

장내부착능 측정

장내부착능 측정을 위한 Caco-2 세포주는 KCTC(KCTC HC20001, Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Caco-2 cell은 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco, Rockville, MD, USA), 1% penicillin(Gibco), 100 mg/mL streptomycin (Gibco)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium, Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 하에서 배양하였다. *Lb. curvatus* ML17은 30°C에서 24시간 배양한 후 균체를 회수하여 PBS(phosphate buffer solution, Gibco)로 2회 세척한 후 DMEM 배지에 희석하고 Caco-2 cell에 접종하여 37°C에서 2시간 동안 배양하여 부착시켰다. 생균수 측정을 위하여 PBS로 3회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거하고 1% Triton X-100(Sigma-Aldrich Co.) 200 μL를 넣고 10분간 교반한 후 다시 800 μL의 PBS를 첨가하였다. 이를 희석하여 MRS 평판배지에 도말하고 30°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 부착율(%)은 Caco-2 cell에 접종한 초기 균수에 대하여 부착된 균수의 비율로 계산하였다. 장내 세포에 대한 부착능이 우수하다고 보고된 *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103을 양성 대조군으로 사용하여 부착능을 비교하였다.

항균 활성 측정

Lb. curvatus ML17을 100 mL MRS broth에서 30°C, 24시간 배양한 후 원심분리(9,950×*g*, 15 min, 4°C) 하여 상등액을 회수한 후 0.45 μm membrane filter(Adventec)로 제균하였다. 제균한 상등액은 동결건조(PVTFD10R, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongduchun, Korea) 한 후 3차 증류수 20 mL에 녹여 조항균 물질로 사용하였다. 조항균 물질을 이용한 감수성 균주에 대한 항균 활성은 disc diffusion method(17)로 측정하였다. 감수성 균주는 그람 양성균인 *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Listeria monocytogenes* KCTC 40307, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621과 그람 음성균인 *Escherichia coli* KCTC 12119, *Escherichia coli* O157 ATCC 43895, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* KCTC 2515, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다. *L. monocytogenes* KCTC 40307은 BHI 배지에서 37°C, 16시간 배양하여 사용하였고 나머지 다른 균주는 LB 배지에서 37°C, 16시간 배양하여 사용하였다. 항균 활성 측정은 감수성 균주를 1×10^6 CFU/plate로 도말하여 준비한 후 paper disc(diameter 8 mm, Advantec)를 배지 위에 올려놓고 조항균 물질을 100 μL 떨어뜨린 후 37°C, 24시간 배양하면서 항균 물질에 의한 생육저해환 생성 여부를 측정하였다.

항산화 활성 측정

항산화 활성 측정은 Brand-Williams 등(18)의 방법을 변형하여 DPPH radical 소거능을 측정하여 확인하였다. 항산화 활성 측정을 위한 시료는 *Lb. curvatus* ML17을 MRS broth에서 30°C, 24시간 배양한 후 원심분리(9,950×*g*, 15 min, 4°C) 하여 상등액을 회수한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 양성 대조군으로서 0.1 mg/mL

ascorbic acid를 사용하여 활성을 비교하였다. 시료 0.5 mL에 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl, Sigma-Aldrich Co.) 0.95 mL를 혼합하여 빛이 차단된 상태로 상온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 DPPH radical 소거능을 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

암세포 성장 억제 효과 측정

암세포 배양: 암세포 성장 억제 효과 측정을 위한 AGS 인체 위암세포(AGS 21739 human gastric adenocarcinoma cell)와 HT-29 인체 결장암세포(HT-29 30038 human colon carcinoma cell)는 KCLB(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. AGS와 HT-29 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640(Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 배양된 각 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding 하고 6~7일마다 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

XTT assay: 암세포 증식 정도는 XTT assay로 측정하였다(19). 시료로 사용된 *Lb. curvatus* ML17 배양 상등액은 항산화 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 준비하였다. 배양된 각각의 암세포는 48 well plate에 well당 5×10^4 cells/mL가 되도록 0.5 mL씩 seeding 하고 incubator에서 24시간 동안 부착한 후 배지를 제거하였다. 암세포에 *Lb. curvatus* ML17 배양 상등액이 10 μL/mL, 20 μL/mL, 40 μL/mL, 80 μL/mL 농도로 첨가된 배지 0.5 mL를 각각 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 XTT-phenazine methosulfate(PMS) 용액(1 mg XTT-10 μg PMS/mL of RPMI without phenol) 125 μL를 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader(MQX200R, BioTek Instruments, Windooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양세포의 생존율은 시료가 첨가되지 않은 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였으며 각 실험구의 결과 비교는 Duncan's multiple range test로 $P<0.05$ 수준에서 유의수준을 검정하였다.

세포 관찰: 암세포를 culture dish(100×20 mm, Falcon Co., Franklin Lakes, NJ, USA)에 1×10^5 cells/mL가 되도록 seeding 하고 incubator에서 24시간 동안 부착시킨 후 *Lb. curvatus* ML17 배양 상등액을 80 μL/mL 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 광학현미경(TMS-F, Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

용혈성 및 효소 활성

장내 세균의 대사 작용으로 분비되는 β-glucosidase와 β-glucuronidase의 경우 β-glucoside 배당체 화합물과 glucuronic acid 화합물을 유해화합물로 변형시키는 발암 유발 효소로 알려져 있다(20,21). 이들 효소들은 또한 아민류와 독성물질, 변이원 등을 생성하여 장점막에 손상을 주어 대장암을 일으키고 장관 내로 흡수된 유독 물질들은 체내를 순환하면서 암 유발, 동맥경화, 간장 장해, 면역기능 저하 현상을 일으킨다(22,23). 용혈성 및 효소 활성 실험 결과 *Lb. curvatus* ML17은 적혈구 파괴 현상인 용혈 독성을 나타내지 않았으며, 발암 유발 효소인 β-glucosidase와 β-glucuronidase의 활성이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

Lb. curvatus 종은 유럽식품안전청(EFSA)의 식품 적용을 위한 미생물학적 안전성 평가를 통하여 QPS(Qualified Presumption of Safety) 인증 목록에 포함되어 있다(24). *Lb. curvatus* 종은 발효 육가공품의 숙성에 관여하는 주요 균주로 알려져 있으며(25), 서구의 발효소시지 스타터 및 육가공품의 천연보존제로 개발되어 있다(26,27). 또한 *Lb. curvatus* 종은 김치의 주요 발효 균주 중 하나로서 프로바이오틱스로 개발되어 항염증 활성 및 비만 억제 활성에 대한 연구 결과가 보고되었다(28,29). 따라서 묵은지에서 분리된 *Lb. curvatus* ML17 균주는 산업적으로 이용하기에 안전한 것으로 생각된다.

인공위액 및 인공담즙 저항성

Lb. curvatus ML17의 식품용 프로바이오틱 생균으로서

Table 1. Hemolytic and enzyme activities of *Lb. curvatus* ML17

	B. cereus[1)]	ML17
Hemolysis[2)]	+	−
Enzyme activity[3)]		
Control		0
Alkaline phosphatase		1
Esterase (C4)		0
Esterase lipase (C8)		0
Lipase (C14)		0
Leucine arylamidase		5
Valine arylamidase		5
Crystine arylamidase		0
Trypsin		0
α-Chymotrypsin		0
Acid phosphatase		1
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase		1
α-Galactosidase		0
β-Galactosidase		0
β-Glucuronidase		0
α-Glucosidase		0
β-Glucosidase		0
N-Acetyl-β-glucosaminidase		0
α-Mannosidase		0
α-Fucosidase		0

[1)]Positive control: *B. cereus* KCCM 11204.
[2)]+: positive reaction, −: negative reaction.
[3)]Enzyme activity was determined by using color-strength values: 0, negative control; 1~2, negative reaction; 3, weak positive reaction; 4~5, strong positive reaction.

Table 2. Survival of *Lb. curvatus* ML17 in artificial gastric juice and bile juice

Strains	Initial cell	Gastric juice		Bile juice		Bile juice after treated with gastric juice	
	Cell number (CFU/mL)	Cell number (CFU/mL)	Survival (%)	Cell number (CFU/mL)	Survival (%)	Cell number (CFU/mL)	Survival (%)
Lb. curvatus ML17	(1.12±0.14)[2)]×10^9	(2.95±0.28)×10^7	2.63	(4.32±0.92)×10^7	3.86	(1.38±0.06)×10^8	12.30
Lb. rhamnosus GG[1)]	(1.16±0.33)×10^{10}	(5.25±0.91)×10^9	45.26	(3.17±0.48)×10^8	2.73	(3.52±0.26)×10^8	3.03

[1)]Positive control. [2)]Values are mean±SD (n=3).

의 가능성을 조사하기 위해 장내 생존성을 확인하였다. 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액과 십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다. *Lb. curvatus* ML17의 인공위액 저항성 확인 결과 초기 1.12×10^9 CFU/mL 인공위액에서 37°C, 2시간 처리 후 2.95×10^7 CFU/mL의 생균수가 측정되어 2.63%의 생존율을 보였다(Table 2). 인공담즙 저항성에서는 0.3% oxgall에서 37°C, 24시간 처리 후 4.32×10^7 CFU/mL의 생균수가 측정되어 3.86%의 생존율을 보였다(Table 2). 대조군인 *Lb. rhamnosus* GG는 인공위액 처리 후 초기 균수 대비 45.26%의 높은 생존율을 나타내었으나 인공담즙 처리 후에는 2.73%의 생존율을 나타내어 *Lb. curvatus* ML17의 인공담즙에 대한 저항성에 비해 다소 낮은 생존율을 나타내었다(Table 2).

프로바이오틱 균주는 섭취 시 위를 통과하여 장내에 도착해서 생존할 수 있어야 한다. 프로바이오틱 활성을 평가하기 위한 *in vitro* 실험에서 인공위액과 인공담즙을 2단계로 처리하여 *in vivo* 위장 환경과 유사한 조건으로 균주의 생존성을 평가하기 위한 연구들이 보고되고 있다. Cebrián 등(30)은 *Enterococcus faecalis* UGRA10을 0.3% HCl(pH 3) 용액에서 1시간 처리한 후 0.3% oxgall에 연속으로 처리한 결과 생균수는 초기 9.15 log unit CFU/mL에서 4.53 log unit CFU/mL로 감소하였다. Park 등(31)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus sakei* Pribio 65를 인공위액에서 1시간 처리한 후 인공담즙에서 3시간 처리하여 생존율을 측정한 결과 초기 균수 대비 79.21%의 높은 생존율을 나타내었다. *Lb. curvatus* ML17을 인공위액에서 2시간 처리한 후 인공담즙에서 24시간 처리하여 생존율을 측정한 결과 Table 2와 같이 12.30%의 생존율을 나타내어 동일한 실험에서 *Lb. rhamnosus* GG의 생존율(3.03%)보다 더 높은 것으로 나타났다.

Lb. curvatus ML17이 인공위액과 인공담즙을 각각 처리한 결과보다 인공위액과 인공담즙을 순차적으로 처리한 경우 더 높은 생존율을 나타내었는데 이는 강산의 인공위액 조건에서 생균수가 감소되었다가 인공담즙 조건에서 다소 생존율을 회복하여 증식한 것으로 생각된다. Lee 등(32)의 연구에서도 젓갈에서 분리한 유산균들 중 인공위액 처리 시 4.39~52.6%의 생존율을 나타낸 균주들이 인공위액 처리 후 인공담즙을 처리하여 생존율을 측정한 결과 6.0~200%의 증가된 생존율을 나타내었다. Gilliland 등(33)은 유산균이 생균제적 효과를 나타내는데 담즙산염에 대한 저항성을 강조하였는데 담즙산에 대한 저항성이 강할수록 급여 시 소화기관 내 유산균의 수가 유의적으로 증가한다고 보고하였다. *Lb. curvatus* ML17은 인공위액과 담즙을 연속으로 처리한 후에도 10^8 CFU/mL 이상의 생균수를 나타내므로 발효 종균 및 생균제의 형태로 섭취할 경우 장내환경에서 유익한 작용을 할 수 있을 것으로 생각된다.

장내 부착능

장내 부착능은 프로바이오틱 균주가 갖추어야 하는 중요한 요소로서 위산과 담즙을 통과해 최종 목적 부위인 장에 도달하였을 때 장내 부착능이 있어야 그 효능을 제대로 발휘할 수 있다(34). Caco-2 cell을 이용하여 *Lb. curvatus* ML17과 양성 대조군인 *Lb. rhamnosus* GG의 장내 부착능을 측정한 결과 초기 접종균수(약 10^7, 10^8, 10^9 CFU/mL)에 따라 *Lb. curvatus* ML17은 9.71%, 10.07%, 17.31%의 부착율을 나타내었으며, *Lb. rhamnosus* GG는 18.12%, 19.36%, 20.78%의 부착율을 나타내었다(Table 3). *Lb. curvatus* ML17은 초기 접종균수가 많을수록 높은 부착율을 나타내어 Caco-2 cell에 결합된 유산균수는 첨가된 유산균수와 직선적으로 증가한다는 Lehto와 Salminen(35)의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 유산균의 장내 세포에 대한 부착능은 유산균의 생존 여부보다는 세포 표면의 구조와 조성에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(36,37). 프로바이오틱 균주의 선발 기준으로 장관세포에 대한 부착성은 유해균의 장내 정착 억제와 정장작용에 많은 영향을 주는 매우 중요한 요소 중 하나이므로 우수한 장내부착능을 나타내는 *Lb. curvatus* ML17의 식품용 프로바이오틱 균주로서의 활용 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Table 3. Adhesion of *Lb. curvatus* ML17 to Caco-2 cell *in vitro*

Strains	CFU/mL		Adhesion rate (%)
	Initial cell	Adhered cell	
Lb. curvatus ML17	(5.66±0.34)[2)]×10^9	(9.8±0.45)×10^8	17.31±0.25
	(5.66±0.34)×10^8	(5.7±0.36)×10^7	10.07±0.03
	(5.66±0.34)×10^7	(5.5±0.28)×10^6	9.71±0.09
Lb. rhamnosus GG[1)]	(5.63±0.52)×10^9	(1.17±0.26)×10^9	20.78±2.73
	(5.63±0.52)×10^8	(1.09±0.13)×10^8	19.36±0.53
	(5.63±0.52)×10^7	(1.02±0.12)×10^7	18.12±0.46

[1)]Positive control.
[2)]Values are mean±SD (n=3).

Table 4. Antimicrobial activity of *Lb. curvatus* ML17

	Indicator species	Antimicrobial activity[1)]
Gram-positive bacteria	*Micrococcus luteus* ATCC 10240	+++
	Enterococcus faecalis ATCC 19433	+
	Bacillus cereus KCCM 11204	+++
	Listeria monocytogenes KCTC 40307	+
	Staphylococcus aureus KCTC 1621	++
Gram-negative bacteria	*Escherichia coli* KCTC 12119	++
	Escherichia coli O157 ATCC 43895	++
	Salmonella enterica subsp. *enterica* KCTC 2515	+++
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	+++

[1)]Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. −, no inhibition; +, below 14.0 mm; ++, 14.0～16.0 mm; +++, above 16.0 mm.

항균 활성

그람 양성균과 음성균 9종을 대상으로 *Lb. curvatus* ML17의 항균 활성을 측정한 결과 모든 감수성 균주에 대한 생육저해 활성을 나타내었으며, 특히 *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* KCTC 2515, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 대한 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다(Table 4). 유산균은 유기산에 의한 pH 저하와 함께 H_2O_2, CO_2, diacetyl, bacteriocin 및 다양한 항균 활성 물질을 생산하여 유해 미생물을 저해하는 것으로 알려져 있다(38). 김치 유래 유산균의 항균 활성 및 항균 물질에 대한 연구들은 많이 이루어지고 있으나 묵은지 유래 유산균의 항균 활성에 대한 연구는 식중독 균주에 대한 항균 활성을 나타내는 *Lb. sakei* JK-17 균주 단 1건에 불과하다(15). *Lb. sakei* JK-17은 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *S. aureus*에 대한 항균 활성이 우수하였다(15). 본 연구 결과 넓은 항균 스펙트럼을 나타내는 *Lb. curvatus* ML17은 묵은지를 포함한 발효식품의 종균으로써 발효과정에서 유해균주를 억제하여 보존성과 안전성을 높일 수 있으며, 생균의 형태로 섭취될 경우 장내 유해세균을 억제하여 정장작용에 도움이 될 것으로 생각된다. 차후 항균 물질에 대한 추가 연구를 통하여 천연 식품보존제로서의 활용 가능성도 기대할 수 있을 것이다.

항산화 활성 측정

체내 대사과정 중에 발생하는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 활성산소는 체내에 축적될 경우 산화적 스트레스를 야기하며 각종 질병을 초래하게 된다(39). 따라서 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 소거할 수 있는 항산화제에 대한 탐색이 활발하게 이루어지고 있다. 유산균은 활성산소로부터 자신을 보호하기 위한 항산화메커니즘을 가지고 있다고 알려져 있으며, 효소적 그리고 비효소적 메커니즘을 통하여 활성산소에 대하여 방어 및 소거작용을 한다(40,41).

Lb. curvatus ML17의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH를 이용한 radical 소거능을 측정한 결과 72.88%의 소거능을 나타내었다(Table 5). 양성 대조구인 0.1 mg/mL ascorbic acid가 62.57%의 소거능을 나타내는 것과 비교했을 때 *Lb. curvatus* ML17의 항산화 효과가 상당히 높은 결과임을 확인할 수 있었다. 묵은지 유래 유산균들의 항산화능에 대한 보고에서 묵은지에서 분리한 *Lb. sakei* JK-17의 항산화능은 배양 72시간 후 53.8%로 측정되었으며(15), Kim 등(14)의 연구 결과 묵은지 유래 유산균들의 항산화 활성은 38.1～67.3% 범위로 나타났다.

Table 5. Antioxidant activity of the cell-free extract from *Lb. curvatus* ML17 on the DPPH free radical

	Lb. curvatus ML17	Ascorbic acid[1)] (0.1 mg/mL)
DPPH radical scavenging activity (%)	72.88±0.51[2)]	62.57±1.25

[1)]Positive control.
[2)]Values are mean±SD (n=3).

지금까지 개발된 항산화제들은 약한 활성과 사용상의 한계로 문제점을 드러내고 있으며 특히 합성 항산화제는 활성은 우수하나 독성에 의한 문제점으로 인하여 천연 항산화제의 개발이 적극적으로 진행되고 있다(42). 활성산소 제거능이 우수한 유산균의 개발은 인체 내 활성산소를 제거할 수 있으므로 이들 균주의 탐색은 산업적으로 매우 가치가 있다. 본 연구 결과를 통하여 *Lb. curvatus* ML17 균주는 천연 산화방지제로서의 개발 가능성도 높을 것으로 생각된다.

암세포 성장 억제 효과

Lb. curvatus ML17의 배양 상등액을 AGS 위암세포와 HT-29 결장암세포에 처리하여 성장 억제 효과를 관찰하였다. AGS 위암세포에 대한 성장 억제 효과는 배양 상등액을 10～40 μL/mL 농도로 처리하였을 때 대조구와 유의적 차이를 보이며 31～38%의 억제율을 나타내었으며, 80 μL/mL 농도 처리 시 82.91%의 높은 억제율을 나타내었다(Fig. 1). HT-29 결장암세포에 대한 성장 억제 효과에서는 배양 상등액을 40 μL/mL 이상의 농도로 처리하였을 때 대조구와 유의적 차이를 보이면서 40 μL/mL 농도 처리 시 9%의 억제율을 나타내었고, 80 μL/mL 농도 처리 시 79.35%의 억제율

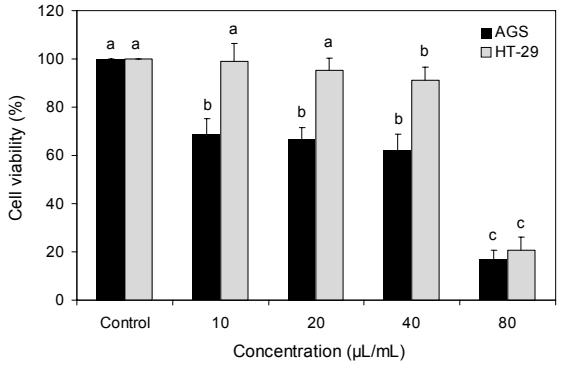

Fig. 1. Inhibitory effects of the cell-free extract from *Lb. curvatus* ML17 on the growth of AGS and HT-29 cells. Cells were exposed to different concentration of the cell-free extract for 48 hr and then cell viability was assessed by XTT assay. The values were calculated as a relative percentage of cell viability of the control cells. Values are mean±SD (n=3). Different letters above the bar indicate statistically significant differences by Duncan's multiple range test (P<0.05).

을 나타내었다(Fig. 1). *Lb. curvatus* ML17의 균체만을 암세포에 처리한 경우에는 생육저해 활성이 나타나지 않아(data not shown) 항암 활성을 나타내는 물질이 *Lb. curvatus* ML17의 세포벽 성분이 아닌 세포 밖으로 분비하는 대사물질로 추정된다. 추후 *Lb. curvatus* ML17이 생산하는 항암 활성 기전과 물질 규명에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

유산균과 유산균 발효제품의 항암 활성에 대한 연구는 많이 보고되어 있으나(43-46), 유산균의 항암 활성에 대한 메커니즘은 정확히 규명되어 있지 않다(47). Kato 등(43)은 유산균의 장내 미생물 균총 개선에 의한 발암 물질의 생성 억제와 장내 면역계의 활성화에 의해 암세포 증식이 억제된다고 보고하였으며, Friend와 Shahani(44)는 가열 살균한 유산균이 실험동물에서 육종, 유종암, 백혈병의 성장을 강력하게 억제한다고 보고하였다. 유산균의 세포벽 성분이나 대사산물에 의한 암세포 저해 활성도 보고되고 있으며, Yeo 등(45)은 *Lb. casei* LAFTI L26의 배양액으로부터 항암 활성 물질을 분리하여 복수암과 고형암에 대한 항암 활성을 보고하였다. 또 다른 보고에서는 *Lb. plantarum* 70810이 생산하는 c-EPS(cell-bound exopolysaccharides)가 간암, 위장암, 결장암세포에 대하여 저해 활성을 나타내었다(46).

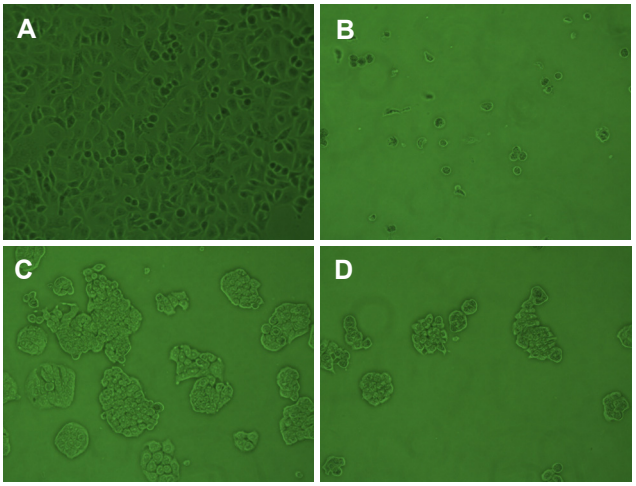

Fig. 2. Photomicrographs (×100) of AGS and HT-29 cells treated with the cell-free extract from *Lb. curvatus* ML17. A: AGS cells (control), B: treated AGS cells, C: HT-29 cells (control), D: treated HT-29 cells.

Lb. curvatus ML17의 배양 상등액을 처리한 AGS 위암세포 및 HT-29 결장암세포의 형태 변화를 관찰한 결과 대조구 세포에 비해 세포 밀도가 현저하게 감소하였으며 세포 수축 현상도 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 본 연구 결과를 통하여 묵은지 유래 *Lb. curvatus* ML17 균주 및 이를 이용한 발효식품의 암 예방 효과를 기대할 수 있으며 향후 천연 바이오 의약 소재로서의 활용도 기대할 수 있을 것이다.

요 약

묵은지 스타터로 개발된 *Lb. curvatus* ML17의 생균제적 특성 및 기능성 조사를 통하여 기능성 소재로서의 개발 가능성을 검토하였다. *Lb. curvatus* ML17은 용혈현상을 일으키지 않았으며 β-glucosidase와 β-glucuronidase의 발암효소 활성이 없는 것으로 나타나 균주에 대한 안전성을 확인하였다. 장내 생존성 확인 실험에서는 인공위액에서 2시간 처리한 다음 인공담즙에서 24시간 처리한 결과 초기 균수 대비 12.30%의 생존율을 나타내었다. Caco-2 cell에 대한 부착율은 초기 접종균수가 많을수록 높게 나타났으며, 5.66×10^9 CFU/mL로 처리 시 17.31%의 부착율을 나타냈는데 20.78%의 부착율을 나타낸 양성 대조군 *Lb. rhamnosus* GG에 근접하게 높은 부착율을 나타내어 장내환경에서 바람직한 작용을 할 수 있음을 보여주었다. 유해균주에 대한 생육저해 활성 측정에서는 *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내었다. DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 활성 측정 결과 72.88%로 양성 대조군인 0.1 mg/mL ascorbic acid보다 높은 free radical 소거능을 나타내었다. AGS 위암세포 및 HT-29 결장암세포에 대한 성장 억제 효과에서는 *Lb. curvatus* ML17의 배양 상등액 80 μL/mL 처리 시 각각 82.91% 및 79.35%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과로 *Lb. curvatus* ML17이 묵은지를 포함한 발효 스타터로 사용되었을 경우 식품의 보존성 향상과 품질 유지 및 균주에 의한 건강 기능성을 부여할 수 있으며 식품, 사료, 의약 분야의 다양한 산업적 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 연구개발과제(110127-3)로 수

행한 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sandire WE, Muralidhara KS, Elliker PR, England DC. 1972. Lactic acid bacteria in food and health; a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J Milk Food Technol* 35: 691-702.
2. Yu JJ, Park HJ, Kim SG, Oh SH. 2009. Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from kimchi. *Korean J Microbiol* 45: 339-345.
3. Chung HJ, Kim HR, Yoo MJ. 2005. Changes in texture and sensory properties of low-temperature and long-term fermented *Baechu* kimchi during the fermentation. *Korean J Food Culture* 20: 426-432.
4. Lee KH, Park JY, Jeong SJ, Kwon GH, Lee HJ, Chang HC, Chung DK, Lee JH, Kim JH. 2007. Characterization of paraplantaricin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 isolated from *kimchi*. *J Microbiol Biotechnol* 17: 287-296.
5. Kang MR, Kim DR, Kim TW, Park SH, Kim HJ, Jang JY, Han ES. 2012. Selection of probiotic bacteria from Yulmoo Kimchi using a stimulated human intestinal model system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 396-401.
6. Lim SM. 2010. Resistance to reactive oxygen species and antioxidant activities of some strains of lactic acid bacteria from the mustard leaf *kimchi*. *Korean J Microbiol* 46: 375-382.
7. Shin K, Chae O, Park I, Hong S, Choe T. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 357-363.
8. Yu MH, Im HG, Im NK, Hwang EY, Choi JH, Lee EJ, Kim JB, Lee IS, Seo HJ. 2009. Anti-hypertensive activities of *Lactobacillus* isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 41: 428-434.
9. Yoon JY, Jung KO, Kim SH, Park KY. 2004. Antiobesity effect of *baek-kimchi* (whitish *baechu kimchi*) in rats fed high fat diet. *J Food Sci Nutr* 9: 259-264.
10. Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue R. 2008. Effects of probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Nga mice. *Korean J Food Sci Technol* 40: 82-87.
11. Kim HJ, Shin HK, Yang EJ. 2013. Production and fermentation characteristics of mukeunji with a mixed starter. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1467-1474.
12. Ji SH, Han WC, Lee JC, Cheong C, Kang SA, Lee JH, Jang KH. 2009. Effect of low temperature on the qualities of long-term fermented kimchi (Korean pickled cabbage). *Korean J Food Preserv* 16: 804-809.
13. Lee JJ, Jung HO, Lee MY, Chang HC. 2012. Characteristics of *mandu* with ripened Korean cabbage *kimchi*. *Korean J Food Preserv* 19: 209-215.
14. Kim SE, Kim YH, Lee H, Kim DO, Kim HY. 2012. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from *mukeunji*, a long-term ripened kimchi. *Food Sci Biotechnol* 21: 1135-1140.
15. Kim DS, Cho HW, Kim DH, Oh KH. 2013. Functional characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 isolated from long-term fermented Kimchi, *Muk Eun Ji*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 28: 18-23.
16. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. Ⅱ. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain *Lactobacillus casei* PSR 3002 to artificial digestive fluids. *Japan J Bacteriol* 29: 691-697.
17. Yang EJ, Chang HC. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 339-346.
18. Brand-Williams W, Cufelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT－Food Sci Technol* 28: 25-30.
19. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83: 519-548.
20. Hawksworth G, Drasar BS, Hill MJ. 1971. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J Med Microbiol* 4: 451-459.
21. Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by β-glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Micribiol* 22: 351-355.
22. Cumming JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Microbiol* 70: 443-459.
23. Goldin BR. 1990. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Ann Med* 22: 43-48.
24. EFSA. 2007. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 587: 1-16.
25. Hebert EM, Saavedra L, Taranto MP, Mozzi F, Magni C, Nader ME, Font de Valdez G, Sesma F, Vignolo G, Raya RR. 2012. Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. *J Bacteriol* 194: 538-539.
26. Casaburi A, Di Monaco R, Cavella S, Toldrá F, Ercolini D, Villani F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiol* 25: 335-347.
27. Castellano P, González C, Carduza F, Vignolo G. 2010. Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci* 85: 394-401.
28. Hong HJ, Kim E, Cho D, Kim TS. 2010. Differential suppression of heat-killed lactobacilli isolated from kimchi, a Korean traditional food, on airway hyper-responsiveness in mice. *J Clin Immunol* 30: 449-458.
29. Park DY, Ahn YT, Park SH, Huh CS, Yoo SR, Yu R, Sung MK, McGregor RA, Choi MS. 2013. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One* 8: e59470.
30. Cebrián R1, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol* 30: 59-67.
31. Park CW, Youn M, Jung YM, Kim H, Jeong Y, Lee HK, Kim HO, Lee I, Lee SW, Kang KH, Park YH. 2008. New functional probiotic *Lactobacillus sakei* probio 65 alleviates atopic symptoms in the mouse. *J Med Food* 11: 405-412.
32. Lee NK, Kim HW, Choi SY, Paik HD. 2003. Some probiotic properties of some lactic acid bacteria and yeasts isolated from jeot-gal. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31: 297-300.
33. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. 1984. Importance of bile

tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci* 67: 3045-3051.
34. Ann YG. 2011. Probiotic lactic acid bacteria. *Korean J Food & Nutr* 24: 817-832.
35. Lehto EM, Salminen S. 1997. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus*, and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci Microflora* 16: 13-17.
36. Lee J. 2005. Adhesion of kimchi *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell membrane and sequestration of aflatoxin B_1. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 581-585.
37. Lim KS, Huh CS. 2006. Adhesion of bifidobacteria to Caco-2 cells and in relation to cell surface hydrophobicity. *Korean J Food Sci Ani Resour* 26: 497-502.
38. Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng Rev* 4: 124-140.
39. Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z, Wang Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem* 135: 1914-1919.
40. Zitzelsberger W, Götz F, Schleifer KH. 1984. Distribution of superoxide dismutases, oxides, and NADH peroxides and various streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 21: 243-246.
41. Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J Dairy Sci* 75: 3296-3306.
42. Kim HS, Ham JS. 2003. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci Ani Resour* 23: 186-192.
43. Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, Mutai M. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* 72: 517-523.
44. Friend BA, Shahani KM. 1984. Antitumor properties of lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli. *J Food Prot* 47: 717-723.
45. Yeo MH, Kim DM, Kim YH, Kim JH, Baek H, Chung MJ. 2008. Antitumor activity of CBT-AK5 purified from *Lactobacillus casei* against Sarcoma-180 infected ICR mice. *Korean J Dairy Sci Technol* 26: 23-30.
46. Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M. 2014. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int J Biol Macromol* 63: 133-139.
47. Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G, Vacante M, Drago F, Biondi A. 2012. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery* 12(Suppl 1): S35.