

## 젖산균 발효를 통한 베리류 또는 과채류 주스의 항산화 활성 증진

박재범<sup>1†</sup>, 심현수<sup>2†</sup>, 하석진<sup>1\*</sup>, 김명동<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생물공학과

<sup>2</sup>강원대학교 식품생명공학과

Received: June 2, 2015 / Revised: August 12, 2015 / Accepted: August 12, 2015

### Enhancement of Antioxidative Activities of Berry or Vegetable Juices through Fermentation by Lactic Acid Bacteria

Jae-Bum Park<sup>1†</sup>, Hyun-Su Sim<sup>2†</sup>, Suk-Jin Ha<sup>1\*</sup>, and Myoung-Dong Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

Berry or vegetable juices contain a diverse range of antioxidants. Through oxygen radical absorbance capacity assays, acai berry, aronia, wild grape, blackberry, cranberry, and spinach juices were verified to possess high antioxidant activities. Lactic acid bacteria fermentation was applied to each juice as the sole medium to improve antioxidant activity. After fermentation by *Lactobacillus plantarum*, the antioxidant activities of acai berry, blackberry, and spinach juices increased by 20–30% from 943.2 to 1239.2, from 110.87 to 128.04, and from 77.92 to 107.20  $\mu\text{mol TE/g}$ , respectively. In this study, we found that the antioxidant activities of a number of juices were enhanced through lactic acid bacteria fermentation.

**Keywords:** Antioxidative activity, fermentation, lactic acid bacteria, berry and vegetable juice

최근 과학기술의 빠른 발달로 사람의 평균수명은 크게 증가되고 있는 추세이나 육식 위주의 식습관으로 인해 당뇨병, 비만, 암, 동맥경화, 고혈압 및 심혈관계 질환의 발생 연령은 점차 낮아지고 있다[13, 21]. 생명현상유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 생성되는 자유라디칼(free radical)은 노화를 비롯한 인체의 다양한 질병을 유발하는 원인으로 알려져 있으며, 스트레스, 환경오염, 흡연 등에 의해서도 생성이 증가되는 것으로 보고되고 있다[20, 23, 25]. 이에 따라 최근 생산되는 상당수의 건강관련 제품개발은 자유라디칼을 중화시키는 항산화 효능에 초점이 맞춰지고 있는 실정이다[5, 14]. 항산화 활성을 나타내는 과채류들에 대한 연구가 다수 진행되었으며, 그 중에서도 특히 베리류의 항산화 활성에 대한 연구결과가 지속적으로 보고되고 있다[14, 15, 24]. 미

국 농무부에서는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정을 통하여 항산화 성분을 다량 함유한 12개 식품을 선정하였는데, 이중 베리류가 6종류 포함되어 있었다[18, 19]. 블랙베리(blackberry), 라즈베리(raspberry), 크랜베리(cranberry), 블루베리(blueberry) 등의 항산화 활성에 대한 많은 연구결과가 보고되고 있으며, 최근에는 높은 항산화 활성을 가지고 있는 아사이베리(acai berry)에 대한 관심이 증가되고 있다[10, 11, 17–21]. 베리류의 주요 활성성분은 polyphenol 성분과 vitamin C 등으로 구성되어 있으며[1, 13], 이들 중 많은 부분이 배당체(glycoside) 형태로 존재한다고 알려져 있다[4, 26]. 이러한 배당체 형태의 항산화 활성성분들은 당쇄 분해효소(glycoside hydrolase)에 의해 당이 제거될 경우, 보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다[3, 17]. 최근에는 젖산균의 일종인 *Leuconostoc* 속 균주로부터 당쇄 분해효소의 일종인  $\beta$ -1,4-xylosidase의 높은 활성이 보고되기도 하였으며[7, 10] *Aspergillus kawachii*, 적색효모, 젖산균 등의 미생물을 이용한 발효를 통해 천연물질의 항산화 활성을 증진시켰다는 연구결과 또한 보고된 바 있다[12, 25].

본 연구에서는 당쇄 분해효소의 활성을 가지고 있는 것으로 예상되는 다양한 젖산균들을 이용한 발효를 통해 베리류

#### \*Corresponding authors

S.-J. H.

Tel.: +82-33-250-6278, Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sjha@kangwon.ac.kr

M.-D. K.

Tel.: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

또는 과채류들의 항산화 활성의 증대에 대한 연구를 수행하였다.

블랙베리, 블루베리, 크랜베리, 라즈베리, 아사이베리, 아로니아(aronia), 적포도(red grape), 산머루(wild grape), 양배추(cabbage), 시금치(spinach) 등의 8종의 베리류와 2종의 과채류 주스 중에 우수한 항산화 활성을 갖는 베리류 또는 과채류를 선정하기 위하여 각각 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 ORAC 방법을 사용하여 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 분석을 위해 베리 및 과채류 주스를 800 × g로 5분간 원심분리한 후, 그 상등액을 사용하여 항산화 활성을 평가하였으며 DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS (1958)의 방법을 이용하여 측정하였고 아래의 식을 사용하여 결정하였다[2].

DPPH 라디칼 소거능(%) =

$$\left[ \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{실험구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right] \times 100$$

ORAC 분석은 ORAC assay kit (Cell Biolabs, USA)를 사용하여 측정하였다[22]. DPPH 분석과 ORAC 분석은 각 실험구별로 3개의 시료를 사용하여 3회 반복 시행하였으며 통계처리는 SPSS 21.0 (IBM, USA)을 이용하여, Duncan의 다중범위검정법(multiple range test)으로 유의성을 검정하였다[6]. 분석방법에 따라 차이가 있었으나 DPPH를 이용한 방법과 ORAC을 이용한 방법 모두 공통적으로 아사이베리 주스가 상대적으로 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었으며 아로니아, 산머루, 블랙베리, 크랜베리, 시금치 주스의 순서로 항산화 활성을 나타내었다(Fig. 1). 이러한 결과는 이전에 보고된 천연 항산화 물질에 대한 연구 결과에서 아사이베리를 포함한 블랙베리, 크랜베리 등 베리류의 항산화 활성이 매우 높은 것으로 보고된 결과와 유사하였다[11]. 아사이베리 주스의 경우 DPPH 측정결과 IC<sub>50</sub> 값이 0.30 ± 0.03 mg/ml이며, ORAC 측정 결과 1,043.38 ± 27.36 μmol Trolox Equivalent (TE)/g로서 가장 우수한 항산화 활성을 나타내

었다. 아로니아 주스의 경우 아사이베리 주스보다 유의적으로 낮은 항산화 활성을 나타내었으나 DPPH와 ORAC 측정

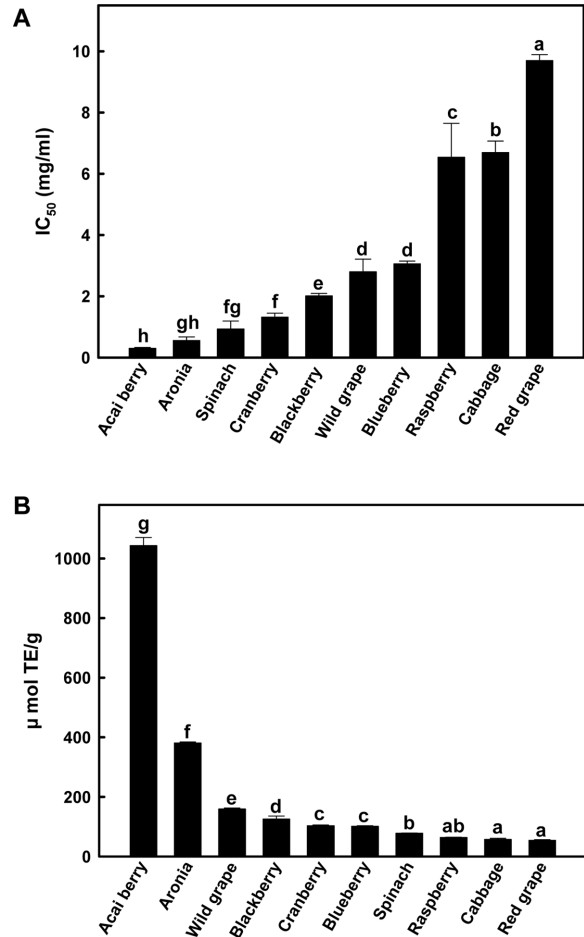


Fig. 1. Comparison of antioxidant activities of berry and vegetable juices including blackberry, blueberry, cranberry, raspberry, acai berry, aronia, red grape, wild grape, cabbage, and spinach by DPPH (A) and ORAC (B) methods. Trolox was used as a reference material in ORAC method.

Table 1. List of lactic acid bacteria used in this study.

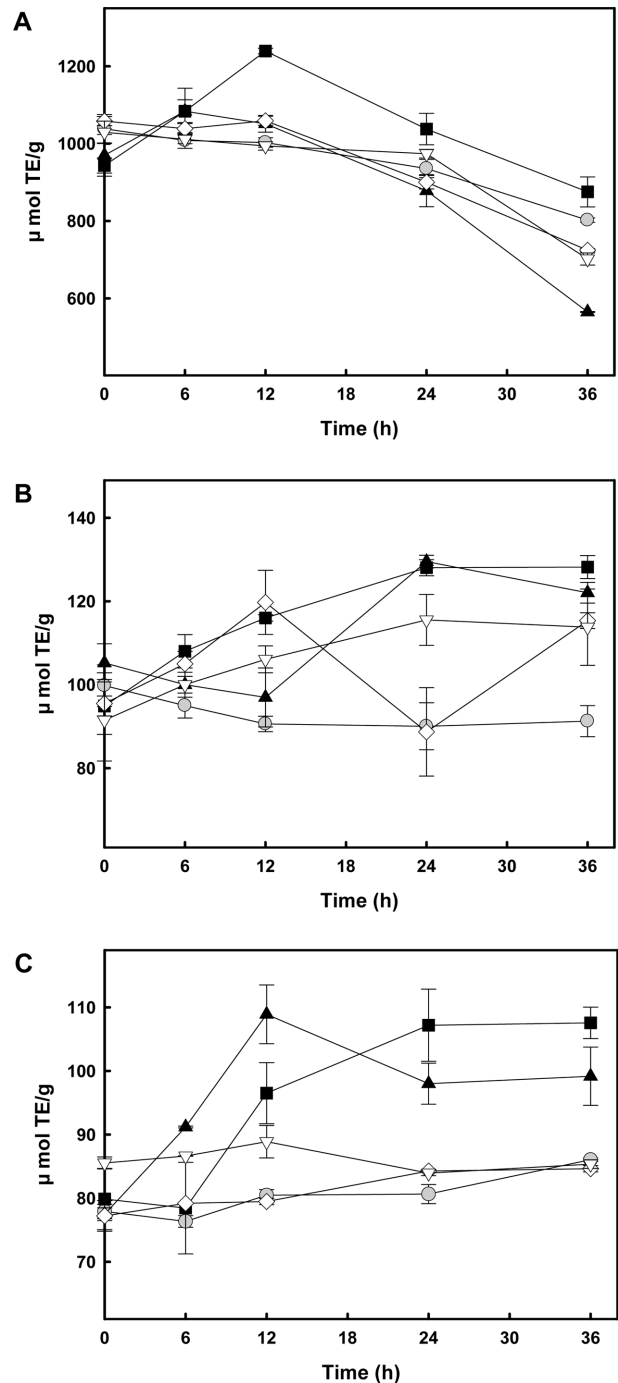
Product name	Component	Source
LP-115	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Danisco
YF-L811	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Christian Hansen
ABT-5	<i>Bifidobacterium</i> species <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Christian Hansen
ABY-3	<i>Bifidobacterium</i> species <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Christian Hansen

결과가 각각  $0.56 \pm 0.12$  mg/ml의  $IC_{50}$ 과  $380.78 \pm 3.53$   $\mu\text{mol TE/g}$ 으로 나타나 두 번째로 높은 항산화 활성이 확인되었다. 일반적으로 항산화 활성이 우수하다고 알려진 블루베리 또는 라즈베리 주스보다 과채류인 시금치 주스가 높은 항산화 활성을 나타내었다. 채소류 중 양파, 시금치, 케일 등이 높은 총 페놀 함량을 나타내며 이로 인해 우수한 항산화 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다[8]. Fig. 1의 결과를 통해 항산화 활성이 상대적으로 우수한 것으로 확인된 6종의 베리류 또는 과채류(아사이베리, 아로니아, 산머루, 블랙베리, 크랜베리, 시금치) 주스를 선정하였으며 젖산균 발효를 통해 이들의 항산화 활성을 증진시키기 위한 실험을 진행하였다.

젖산균 발효는 Table 1에서 제시된 상업적으로 판매되고 있는 단일 또는 혼합 젖산균 4가지 제품을 이용하여 발효 실험을 수행하였다. 제품명 LP-115의 경우 단일 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*이 사용되었으며 YF-L811, ABT-5, ABY-3의 경우는 두 종류 이상의 젖산균이 혼합된 형태이다. 배지 성분은 추가로 첨가하지 않았으며 베리 주스는 포도당 농도를 기준으로 10 g/l로 희석하고 5 M의 NaOH 용액을 이용하여 pH 7.0으로 조절한 후 500 ml 플라스크에 100 ml 부피로 제작하였다. 동결 건조된 형태의 젖산균은 건조중량을 기준으로 하여 1 g/l의 농도로 베리 또는 과채류 주스에 접종하여 발효를 진행하였다. 발효는 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 36시간 동안 수행하였다. Fig. 1의 결과와 같이 DPPH 법과 ORAC 법으로 각각 베리류 또는 과채류 주스의 항산화 활성을 측정된 결과 두 가지 방법 동일하게 아사이베리가 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며 아로니아가 그 다음으로 높은 항산화 활성을 나타내었고 라즈베리, 시금치, 적포도의 순서로 가장 낮은 항산화 활성을 나타내었으므로 두 가지 방법이 유의적인 차이를 나타내지 않는다고 판단하여 이후 실험에서는 ORAC 분석방법을 사용하여 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 1).

젖산균을 이용하여 발효를 수행한 결과 아사이베리의 경우 발효 전  $943.2 \pm 19.6$   $\mu\text{mol TE/g}$ 의 항산화 활성을 나타냈으나, 제품명 LP-115으로 발효한 경우 발효 12시간 후에  $1239.2 \pm 7.3$   $\mu\text{mol TE/g}$ 로 항산화 활성이 약 31% 증가하였으며 발효 24시간 이후에는 항산화 활성이 점차 감소하였다(Fig. 2A). 그러나 혼합 젖산균이 사용된 제품명 YF-L811, ABT-5, 또는 ABY-3의 경우는 발효시간의 경과에 따라 항산화 활성이 점차 감소하였으며, 이는 젖산균을 접종하지 않은 대조구와 유사한 경향을 나타내었다.

젖산균을 이용하여 블랙베리 주스를 발효한 경우 발효 전에  $110.87 \pm 6.17$   $\mu\text{mol TE/g}$ 이었던 항산화 활성이 ABY-3 또는 LP-115로 발효한 경우, 발효 24시간 후에 각각  $129.50 \pm 1.52$ 와  $128.04 \pm 1.94$   $\mu\text{mol TE/g}$ 로 약 16% 증가하였다(Fig. 2B). 블랙베리 주스를 이용하여 발효한 경우 아사이베리 주



**Fig. 2.** Changes in antioxidant activities of acai berry (A), blackberry (B), or spinach (C) through lactic acid bacteria fermentation. Symbols: control (grey circle, ●), LP-115 (black square, ■), YF-L811 (white inverted triangle, ▽), ABT-5 (white diamond, ◇), and ABY-3 (black triangle, ▲).

스와 달리 젖산균 발효에 의하여 증가된 항산화 활성이 발효 24시간 이후에도 감소하지 않고 36시간까지 유지되었

다. YF-L811 또는 ABT-5를 이용하여 젖산균 발효를 수행한 경우는 발효시간의 경과에 따라 항산화 활성의 유의적인 증가를 확인할 수 없었으며 젖산균을 접종하지 않은 대조구의 경우에도 시간의 경과에 따른 항산화 활성의 변화를 확인할 수 없었다.

시금치 주스는 발효 전에  $77.92 \pm 1.14 \mu\text{mol TE/g}$ 이었던 항산화 활성이 ABY-3를 이용하여 젖산균 발효를 수행한 결과 발효 12시간 경과 후  $108.90 \pm 4.62 \mu\text{mol TE/g}$ 로 항산화 활성이 약 40% 증가하였으며, LP-115를 이용하여 젖산균 발효를 수행한 결과 24시간 발효 후에  $107.20 \pm 5.67 \mu\text{mol TE/g}$ 로 약 38% 증가하였다(Fig. 2C). 따라서 젖산균 발효를 통해 시금치 주스의 항산화 활성( $107.20 \pm 5.67$ – $108.90 \pm 4.62 \mu\text{mol TE/g}$ )은 유의적으로 증가하였으며, 이는 젖산균 발효를 하지 않은 블랙베리 주스의 항산화 활성( $110.87 \pm 6.17 \mu\text{mol TE/g}$ )과 유사한 수준이었다. YF-L811 또는 ABT-5를 이용하여 젖산균 발효를 수행한 경우 발효시간의 경과에 따라 항산화 활성의 유의적인 증가를 확인할 수 없었으며 젖산균을 접종하지 않은 대조구의 경우에도 유사한 결과를 나타내었다. 그 외 아로니아, 산머루, 크랜베리의 경우 4종의 젖산균 제품(LP-115, YF-L811, ABT-5, ABY-3)을 통한 항산화 활성의 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(data not shown).

본 연구에서 사용된 4종의 젖산균 제품(LP-115, YF-L811, ABT-5, ABY-3) 중에 단일 젖산균(*Lactobacillus plantarum*)이 사용된 LP-115로 발효를 수행한 경우 아사이베리, 블랙베리, 시금치 주스의 항산화 활성이 약 16–38% 정도 증가하였으며, 4가지 젖산균(*Bifidobacterium* species, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*)이 혼합된 제품인 ABY-3의 경우 블랙베리와 시금치 주스의 항산화 활성을 약 16–40% 정도 향상시켰다. 그러나 YF-L811와 ABT-5의 경우는 발효에 의한 항산화 활성의 변화를 확인할 수 없었다. 따라서 모든 젖산균이 발효를 통해 베리 또는 과채류 주스의 항산화 활성을 증가시키는 것이 아니라 특정 젖산균의 당쇄 분해효소 또는 생물전환기에 의해 베리 또는 과채류 주스의 항산화 활성이 증가된 것으로 사료된다. 이전 연구 결과에 따르면 김치로부터 다양한 젖산균들을 선별하였으며 이들로부터 당쇄 분해효소 중 하나인  $\beta$ -glucosidase 활성이 크게 다르다는 결과가 보고된 바 있다[9].

## 요 약

베리 또는 과채류 주스에는 다양한 종류의 항산화물질들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Oxygen radical absorbance capacity 측정 결과 아사이베리, 아로니아, 산머

루, 블랙베리, 크랜베리, 시금치 주스로부터 높은 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 선별된 베리 또는 과채류 주스의 항산화 활성을 증가시키기 위해 젖산균을 이용한 발효를 수행하였다. 아사이베리, 블랙베리, 또는 시금치 주스의 경우 *Lactobacillus plantarum*를 이용한 발효 후에 항산화 활성이 각각  $943.2 \mu\text{mol TE/g}$ 에서  $1239.2 \mu\text{mol TE/g}$ 로  $110.87 \mu\text{mol TE/g}$ 에서  $128.04 \mu\text{mol TE/g}$ 로  $77.92 \mu\text{mol TE/g}$ 에서  $107.20 \mu\text{mol TE/g}$ 로 약 16–38% 향상되었다. 본 연구를 통해 아사이베리, 블랙베리, 또는 시금치 주스의 항산화 활성이 젖산균 발효를 통해 증가하는 것을 확인하였다.

## Acknowledgments

This work was supported by Korean Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through (High Value-added Food Technology Development Program), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA)(313-034-03).

## References

- Balogh E, Hegedus A, Stefanovits-Banyai E. 2010. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Sci. Hortic-Amsrerdam*. **125**: 332–336.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**: 1199–1200.
- Bokkenheuser V, Shackleton CHL, Winter J. 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem. J.* **248**: 953–956.
- Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Food Agric.* **84**: 1771–1782.
- Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxic.* **33**: 601–617.
- Harter HL. 1960. Critical values for Duncan's new multiple range test. *Biometrics*. **16**: 671–685.
- Hitomi O, Michiko O, Kenji S. 2006. Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 415–420.
- Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* **87**: 581–586.
- Jang MH, Kim MD. 2010. Exploration of  $\beta$ -glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Food Eng Prog.* **14**: 243–248.
- Jang MH, Kim MD. 2011.  $\beta$ -1,4-Xylosidase activity of leuconostoc lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korea J. Food*

- Sci. Technol.* **43**: 169–175.
11. Kang J, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. 2010. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem.* **122**: 610–617.
  12. Kang OJ. 2010. Production of fermented tea with *Rhodotorula* yeast and comparison of its antioxidant effects to those of unfermented tea. *Korean J. Food Cookery Sci.* **26**: 422–427.
  13. Kim DB, Shin GH, Cho JH, Baik SO, Lee OH. 2013. Antioxidant activities of beverage concentrates and purees. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 997–1002.
  14. Kim HS, Ham JS. 2003. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korea J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**: 186–192.
  15. Kim HY, Hwang IK, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korea J. Food Sci.* **40**: 166–170.
  16. Lee BH, Kim SY, Cho CH, Chung DG, Chun OK, Kim DO. 2011. Estimation of daily per capita intake of total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacities from fruit and vegetable juices in the Korean diet based on the Korea national health and nutrition examination survey 2008. *Korea J. Food Sci.* **43**: 475–482.
  17. Lindroth RL. 1988. Hydrolysis of phenolic glycosides by mid-gut  $\beta$ -glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. *Insect Biochem.* **18**: 789–792.
  18. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 4959–4969.
  19. Park HM, Yang SJ, Kang EJ, Lee DH, Kim DI, Hong JH. 2012. Quality characteristics and granule manufacture of mulberry and blueberry fruit extracts. *Korean J. Food Cookery Sci.* **28**: 375–382.
  20. Park SJ, Kim ES, Choi YS, Kim JD. 2008. Effects of *sophorae fructus* on antioxidative activities and lipid levels in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 1120–1125.
  21. Suh JH, Paek OJ, Kang YW, Ahn JE, Yun JS, Oh KS, et al. 2013. Study on the antioxidant activity in the various vegetables. *J. Food Hyg. Safety* **28**: 337–341.
  22. Ungvari Z, Ridgway I, Philipp EE, Campbell CM, McQuary P, Chow T, et al. 2011. Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sc.* **66**: 741–750.
  23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 44–84.
  24. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4113–4117.
  25. Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, et al. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**: 80–85.
  26. Zhu N, Sheng S, Li D, Lavoie EJ, Karwe MV, Rosen RT, et al. 2001. Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Lipids* **8**: 37–44.