

김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*의 프로바이오틱 효과

이경희¹ · 봉연주¹ · 이현아² · 김희영¹ · 박건영^{1,2}

¹부산대학교 식품영양학과

²부산대학교 김치연구소

Probiotic Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Kimchi

Kyung-Hee Lee¹, Yeon-Ju Bong¹, Hyun Ah Lee², Hee-Young Kim¹, and Kun-Young Park^{1,2}

¹Department of Food Science and Nutrition and

²Kimchi Research Institute, Pusan National University

ABSTRACT The probiotic effects of kimchi lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus plantarum* (*Lab. plantarum*) and *Leuconostoc mesenteroides* (*Leu. mesenteroides*), were studied. *Lab. plantarum* KCCM 11352P (LPpnu) and *Leu. mesenteroides* KCCM 11353P (LMpnu) were isolated from kimchi and were the predominant LAB. We compared their probiotic effects with *Lactobacillus rhamnosus* GG (LRgg), a well-known probiotic LAB. LPpnu showed better probiotic activities than LRgg. LMpnu also exhibited almost equal activities as LRgg. These two kimchi LAB strains exhibited resistance to gastric and bile acid, adhesion to intestines, and thermal stability. In particular, LPpnu showed excellent probiotic properties. In addition, LPpnu showed greater antioxidant activity by scavenging DPPH radicals or hydroxyl radicals than LMpnu or LRgg. LPpnu also inhibited growth of HT-29 human colon cancer cells by inducing apoptosis, increasing Bax and suppressing Bcl-2 expression compared to LMpnu or LRgg. Taken together, LPpnu and LMpnu could be used as probiotics, and LPpnu exhibited the most beneficial probiotic activities with anti-oxidant and anti-cancer properties.

Key words: probiotic, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, kimchi

서 론

김치는 십자화과 채소들이 유산균에 의해 발효된 건강식품이며 풍부한 비타민, 미네랄, 식이섬유 등이 함유된 한국의 대표적인 전통발효 식품으로 다양한 체내 생리활성 및 그 기능성이 연구, 보고되고 있다. 김치의 대표적인 건강 기능성으로는 항암, 항산화, 항당뇨, 항비만 활성 등이 있으며, 이는 김치 내 원재료들과 유산균의 발효에서 기인된다 하겠다(1,2). 일반적으로 김치 내 유산균은 10^{7-9} CFU/g 수준의 높은 생균수를 유지하며, 대표적인 유산균으로는 *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속, *Weissella* 속 등이 있다(2). 최근에는 이러한 김치 유산균의 항산화, 항암, 항돌연변이, 항비만 효과 및 면역기능 강화 등의 건강 기능성에 대한 과학적 입증들이 새롭게 시도되고 있다(1). 또한 김치와 같은 식물 원료의 발효 식품에서 분리된 식물성 유산균은 타 동물

성 발효식품과 비교하여 풍부하지 않은 영양소와 기타 열악한 환경조건에서 생육하기 때문에 영양소를 분해 또는 섭취하는 능력이 높아 다양한 미생물 환경 속에서 경쟁적으로 우점종을 차지하는 우수한 생존력을 가지며, 특히 천연 항균 물질 및 생리활성 물질의 생성능이 높은 것으로 알려져 있다(3). 또한 식물유래 유산균은 임상연구에서 변비 완화, 혈중 지질 및 간 기능을 증진시켜 동물유래 유산균보다 프로바이오틱 효과가 높음이 확인된 바 있다(4).

프로바이오틱은 적정량을 섭취하였을 때 인체에 이로운 역할을 하는 살아있는 균으로 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. 등이 대표적으로 보고되고 있는데, 이들은 대부분 유제품으로부터 분리된 동물성 유산균이며, 김치 유산균은 아직 세계적으로 그만큼 인정받고 있지 못하는 추세이다. 이 중 *Lactobacillus rhamnosus* GG는 프로바이오틱 효능이 뛰어난 가장 잘 알려진 균주로 유아의 로타바이러스 설사 또는 아토피 증세를 약화시키고 면역시스템을 조절한다(5,6). *Lab. plantarum*은 유가공 및 육가공 산업의 발효공정에 대표적인 유산균으로 활용되고 있으며, 항균 활성, 과민성 대장증후군과 관련한 설사 또는 변비 증상 완화 등의 장 관련 건강 기능성에 대한

Received 21 September 2015; Accepted 2 November 2015

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Korea

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

여러 연구들이 보고되고 있다(7,8). *Leu. mesenteroides*는 *Lab. plantarum*과 함께 대표적인 김치 유래 유산균으로 상업용 김치 제조 스타터 균주로 사용되며, 발효 중 김치의 시원한 맛과 전체적인 맛을 높여 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(9). 프로바이오틱은 장 면역계에 영향을 주어 장 질환을 예방 또는 개선하거나 병원성 미생물의 성장을 억제하여 장 건강을 유지하는 정상 작용 등이 대표적인 기능으로 알려져 있다(10). 미생물이 프로바이오틱으로 이용되기 위해서는 인간과 동물의 장내 환경에서 생존 가능하여야 하며, 추가적인 기능성을 위한 장내 세포 표면에 대한 부착성과 최종적인 산업화를 위한 제조 및 유통 과정에 대한 안정성 및 안전성 등이 확보되어야 한다(11).

본 연구에서는 김치에서 2종의 우점 유산균을 분리 동정하여(*Lab. plantarum*, *Leu. mesenteroides*) 김치 유산균의 프로바이오틱으로서의 이용 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 *Lab. rhamnosus* GG를 대조균으로 하여 2종의 김치 유산균의 위산과 담즙산에 대한 내성, 장내세포에 대한 부착성, 열 안정성을 비교하였으며, 추가적인 기능성을 확인하기 위하여 항산화 및 항암 활성을 평가하여 김치 유산균의 우수성을 과학적으로 입증하고자 하였다.

재료 및 방법

김치 유산균의 분리 및 동정

본 연구에서 사용한 *Lab. plantarum*은 전라북도 전주지역 김치 제조 전문인에 의해 제조된 배추김치에서, *Leu. mesenteroides*는 부산대학교 김치연구소의 항암김치 레시피(12)로 제조한 배추김치에서 각각 분리하였다. 각 배추김치를 5°C에서 숙성시키며 pH 4.3인 적숙기에 도달했을 때 착즙하여 멸균한 증류수로 단계별로 희석한 후, 이를 MRS (Difco, Sparks, MD, USA) 평판배지에 접종, 도말한 다음 37°C에서 2~3일간 혐기 배양하여 생성된 유산균 colony를 순수 분리하였다. 분리한 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열은 universal primer(27F, AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG; forward, 1492R, GGCTACCTTGTTACGACTT; reverse)를 이용하여 증폭시킨 후, GenoTech Corp.(Daejeon, Korea)에 염기서열의 상동성 분석을 의뢰하였다. 16S rDNA 염기서열을 NCBI의 database와 비교하여 분석한 결과 분리한 2종의 균주는 각각 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*와 99%의 상동성을 나타내어 *Lactobacillus plantarum* PNU(KCCM 11352P)와 *Leuconostoc mesenteroides* PNU(KCCM 11353P)로 명명하여 한국미생물보존센터(Seoul, Korea)에 기탁하였다.

본 연구에서는 김치 유산균의 프로바이오틱 효과를 검증하기 위해 현재 프로바이오틱으로 많이 이용되며 기능적으로 우수성이 증명된 *Lab. rhamnosus* GG(KCTC 5033; LRgg)를 미생물자원센터에서 구입하여 대조균으로 이용하였다. 각 균주는 MRS broth를 이용하여 37°C에서 혐기적으

로 3차 계대 배양하여 프로바이오틱 효능 확인 실험에 사용하였고, 항암 기능성 실험에서는 이를 원심분리(2,000×g, 10분) 한 후 phosphate buffered saline(PBS)에 2회 세척한 다음 100°C에서 1시간 사멸시켜 사용하였다(13).

내산성 및 내담즙성 측정

인공 위산에 대한 내성은 Kobayashi 등(14)의 방법에 따라 1 mg/mL pepsin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조정된 인공 위산을 제조하여 각 유산균을 접종한 후 37°C에서 3시간 배양하며 1시간마다 생균수를 측정하였다. 인공 담즙산에 대한 내성 평가는 0.02 M cholic acid, 0.02 M deoxycholic acid, 0.05 mg/mL lipase를 첨가한 0.02 mg/mL pancreatin(Sigma-Aldrich Co.) 용액을 1 N HCl 및 NaOH를 이용하여 pH 8.0으로 조정된 인공 담즙산에 각 유산균을 접종하여 37°C에서 6시간 배양하며 2시간마다 생균수를 측정하였다(15). 인공 위액 및 인공 담즙산에서의 생균수는 인공 위액 및 담즙산에서 배양한 각 균주를 멸균 증류수로 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하여 측정하였다.

장 부착능 및 열 안정성 측정

HT-29 cell(human colon adenocarcinoma cells)은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL penicillin-streptomycin 및 0.05% trypsin-0.02% EDTA는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. HT-29 cell은 10% FBS와 100 units/mL penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 김치 유산균의 HT-29 cell에 대한 부착능을 확인하기 위하여 cell을 각 well당 1.0×10⁴ cells/mL가 되도록 6-well plate에 분주하고, 각 균주를 1.0×10⁸ CFU/mL가 되도록 현탁하여 각 well에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2시간 배양하여 HT-29 세포에 부착시켰다. 배양이 완료된 후 PBS로 3회 세척을 하고 0.05% trypsin-0.02% EDTA를 10분간 처리하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 멸균 증류수로 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 접종하고 48시간 배양하여 생균수를 측정한 후, 다음과 같이 장 부착률을 측정하였다(16).

$$\text{장 부착률(\%)} = \frac{\text{Viable cell count}}{\text{Initial cell count}} \times 100$$

열 안정성 측정은 MRS broth에서 배양한 김치 유산균을 55°C에 2시간 방치하며 각 시간별로 생존한 생균수를 측정하여 계산하였다(17).

항산화 활성 측정

DPPH radical 소거 활성 측정: 김치 유산균의 DPPH

radical 소거 활성은 Blois(18)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 균주를 5.0×10^6 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 희석하여 15 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 용액과 1:1의 비율로 혼합하여 빛이 차단된 상태에서 30분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 흡광도 차이를 다음과 같이 백분율(%)로 나타내었다.

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

Hydroxyl radical 소거 활성 측정: Hydroxyl radical 소거 활성의 측정은 Halliwell 등(19)의 방법에 따라 5.0×10^6 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 희석한 균주 50 μ L에 2.5 mM 2-deoxy-D-ribose를 함유한 10 mM PBS 용액 345 μ L를 혼합하였다. 그리고 1 mM FeCl₃ 및 1.04 mM EDTA 용액 50 μ L, 1 mM ascorbate 50 μ L, 0.1 M H₂O₂ 5 μ L를 각각 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 2.8% trichloroacetic acid 500 μ L와 1% 2-thio-barbituric acid 250 μ L를 첨가하고 95°C에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 hydroxyl radical 소거 활성을 산출하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

항암 활성 측정

HT-29 cell 성장 억제 효과 측정: 배양된 HT-29 cell을 96-well plate에 1.0×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 5.0×10^6 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 희석한 균주를 배지에 혼합하여 첨가한 후 동일한 조건에서 48시간 배양하였다. 48시간 후 시료를 제거한 다음 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액과 혼합하여 4시간 추가 배양하였다. 배양 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상대조군과 비교하여 다음과 같이 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \left(\frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

RT-PCR을 이용한 Bax와 Bcl-2 유전자 발현 측정: mRNA 수준에서 김치 유산균에 따른 유전자의 발현을 측정하기 위해 HT-29 cell을 6 well-plate에 2.0×10^6 cells/mL로 분주하여 배양하였다. 배양한 cell에 균주를 5.0×10^6 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 처리한 후 trizol re-

agent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리한 다음 정량하여 oligo dT primer(Invitrogen Co.)와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 ss cDNA로 역전사 하였다. 이 cDNA를 template로 하여 Bax와 Bcl-2 유전자를 증폭시키고, internal control로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. Bax 유전자의 primer sequence는 5'-AAGC-TGAGCGAGTGTCTCCGGCG-3'(forward), 5'-CAGAT-GCCGGTTCAGGTACTIONCAGTC-3'(reverse)를 사용하였고, Bcl-2 유전자의 primer sequence는 5'-CTCGTCGTACCGTCGTGACTTGG-3'(forward), 5'-CAGATGCC-GGTTTCAGGTACTIONCAGTC-3'(reverse)를 사용하였으며, GAPDH 유전자의 primer sequence는 5'-CGGAGTCA-ACGGATTTGGTC-3'(forward), 5'-AGCCTTCTCCAT-GGTGGTGA-3'(reverse)를 사용하였다. 각 PCR 산물들은 2% agarose gel(Invitrogen Co.)을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

통계처리

본 실험 결과는 3번의 반복실험으로 수행하였으며, 그 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 PASW statistics 18(IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. 통계적 유의성은 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

김치 유산균의 내산성 및 내담즙성

유산균이 프로바이오틱으로서 인체에서 성장작용 및 여러 생리적 기능을 발휘하기 위해서는 위산과 담즙이 존재하는 환경에서의 생존이 요구된다(11). 순수한 위산의 pH는 1.0~2.0 정도로 유지되어 대부분의 미생물은 위산 내에서 사멸되거나 섭취한 음식물의 완충 작용에 의하여 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸을 어느 정도 감소시킬 수 있다(20). 김치 유산균의 위산에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 2.0 및 소화효소인 pepsin을 함유한 인공 위액에 각 균주를 접종하여 시간별로 생존수를 측정하였다(Fig. 1). 반응 1시간 후 생존수를 측정하여 반응 전과 비교한 결과 3가지 균주 모두 97% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 반응 2시간 후 LPnu는 $98.0 \pm 1.8\%$, LMpnu는 $96.3 \pm 0.7\%$, LRgg는 $94.0 \pm 2.9\%$ 의 생존율을 보였으며, 반응 3시간 후 LPnu는 $95.6 \pm 1.7\%$, LMpnu는 $94.3 \pm 1.8\%$, LRgg는 $87.3 \pm 2.0\%$ 의 생존율을 보였다. 2종의 김치 유산균 모두 인공 위액에 대해 LRgg보다 유의적으로 높은 생존율을 보였는데($P < 0.05$), 이는 본 연구에서 사용한 LPnu와 LMpnu가 식물성 유산균으로 김치와 같은 산성의 열악한 조건 속에서 우점종을 차지하

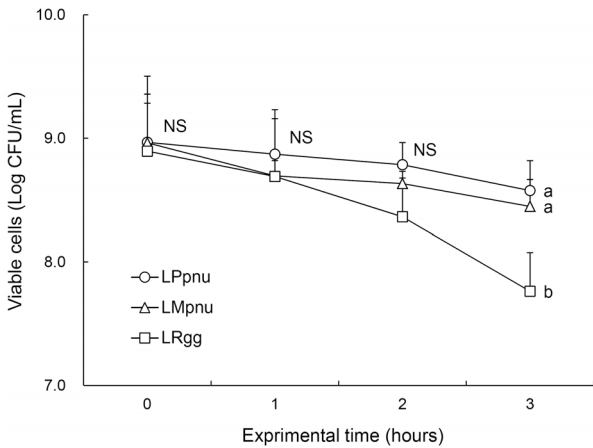


Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from kimchi. LPpnu, *Lactobacillus plantarum* PNU; LMpnu, *Leuconostoc mesenteroides* PNU; LRgg, *Lactobacillus rhamnosus* GG. Means with the different letters (a,b) at each time are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. NS: not significantly different.

는 우수한 생존력을 가졌기 때문으로 사료된다. 그중 가장 높은 생존율을 나타낸 유산균은 LPpnu로 프로바이오틱스로 섭취하였을 때 위산 환경에서 생존할 가능성이 가장 높을 것으로 판단된다. 높은 산성 조건에서도 생존 가능한 것으로 알려진 *Lab. plantarum*의 경우 세포 내 pH가 다른 내산성 균주보다 낮은 4.6~4.8로, 본 실험에 사용한 LPpnu 역시 강한 내산성을 보였다(21).

인공 담즙에 대한 내성 측정 결과(Fig. 2) 반응 후 2시간까지는 각 균주들 간에 큰 차이를 보이지 않았으나, 반응 4시간 후 LPpnu와 LMpnu가 LRgg보다 더 높은 생존율을 나타냈으며, 반응 6시간 후에는 LMpnu와 LPpnu가 초기 균수에 비해 60.4±2.1%, 56.5±2.6%가 생존하여 인공 담즙에 대해 LRgg(45.9±2.4%)보다 높은 내성을 보였다. 이는 내산

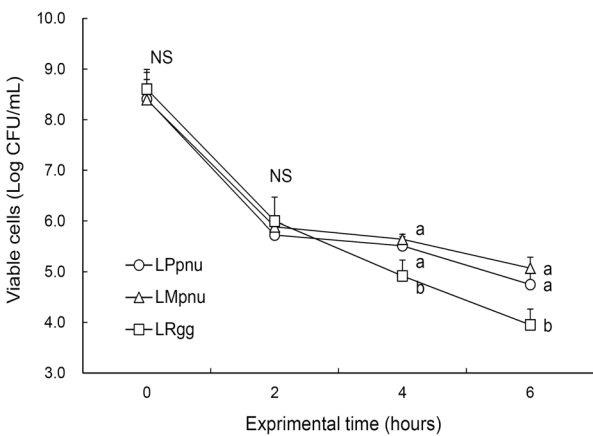


Fig. 2. Bile tolerance of LAB isolated from kimchi. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. Means with the different letters (a,b) at each time are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. NS: not significantly different.

성이 강한 *Lab. plantarum*, *Lab. casei*, *Lab. acidophilus* 등이 상대적으로 담즙에 대해 내성이 우수하여 프로바이오틱으로 이용 가능성이 높은 것으로 나타난 선행연구들(20, 22)과 동일한 연구 결과이다. 담즙산은 지질로 구성된 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물의 성장을 억제하는데, *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 유산균에서는 담즙산염 가수분해효소를 생성하여 담즙산을 가수분해하고 이 같은 억제작용을 감소시킨다(23). 본 연구 결과를 종합해 볼 때 김치에서 분리한 LPpnu 및 LMpnu 균주가 인공위액에서 생존이 가능하고 인공담즙에서도 내성을 가지는 것으로 보아 이들은 장내환경에 생존하기 적합한 균주로 프로바이오틱으로써 이용 가능할 것으로 판단된다. 또한 위산에 강한 내성을 갖는 LPpnu 균주와 담즙산에 강한 내성을 갖는 LMpnu를 혼합하여 이용할 경우 위산뿐만 아니라 담즙산 환경 모두에 강한 내성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

김치 유산균의 HT-29 cell에 대한 장 부착능

유산균이 프로바이오틱 효능을 나타내기 위해서는 위와 십이지장을 통과한 후 장에 부착해야 하므로 유산균의 장 부착성은 프로바이오틱 균주 선정에 중요한 선정 기준 중 하나이다(24,25). 장관 상피세포벽에 부착된 유산균은 mucin 생산을 촉진시키거나 병원균의 부착 및 장관 통과력을 감소시키고, 이들이 생산한 독성물질의 통과를 억제함으로써 장내 병원균에 의한 상피세포의 손상을 막아 숙주의 방어 체계 시스템을 강화한다(26). LRgg는 장상피 세포에 높은 부착능력을 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며 본 연구에서는 이를 대조군으로 사용하였다(27). 본 연구에서 HT-29 세포에 대한 부착능은 대조군 LRgg에서는 81.5±3.1%로 나타났고, LPpnu는 74.0±4.0%, LMpnu는 66.6±3.8%로 나타났다. LRgg와 비교하였을 때 김치 유산균인 LPpnu, LMpnu는 다소 낮은 부착능을 보였으나 LPpnu의 경우

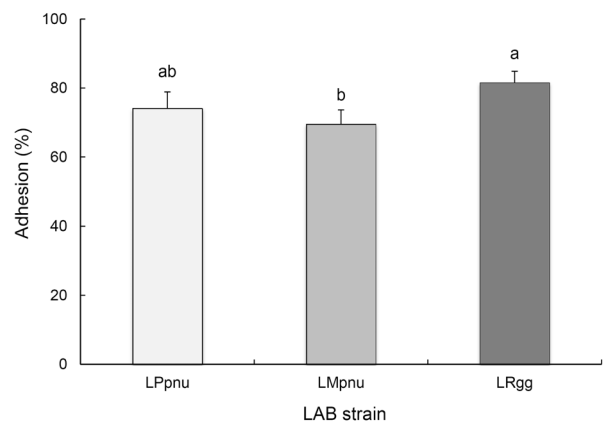


Fig. 3. Adhesion ability of LAB isolated from kimchi to HT-29 cells. The adherence percentage of LAB to HT-29 cells was calculated by comparing the counts between initial and adhered bacteria. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

LRgg와 통계적으로 유의성이 나타나지 않았다($P>0.05$, Fig. 3). Jung과 Kim(22)의 연구에 따르면 LRgg의 장부착능이 2.06%로 나타난 것에 비해 *Lab. plantarum* BSM-2와 EHJ-1은 4.01%와 4.62%로 LRgg보다 더 높은 장부착능을 보인 것으로 나타났다. 유산균의 세포부착능에 관여하는 인자는 정전기적 인력, 소수성 결합, 세포벽의 lipoteichoic acid와 같은 구조적인 특성 등을 들 수 있으며, 특히 S layer protein, teichoic acid 등의 유산균의 세포벽 물질로 인한 것으로 추정된다(25,28). 그러나 이러한 성질은 유산균의 종에 따라 차이를 나타내며, 본 연구의 유산균에 따른 부착능력의 차이 또한 균의 구조적 특성의 차이에서 기인한 것으로 추정된다.

김치 유산균의 열 안정성

유산균의 열 안정성은 55°C에서 2시간 정치 후 각 시간별로 생존하는 유산균의 수를 측정하였다(Fig. 4). 프로바이오틱은 제제화 공정인 분무건조 과정에서 고온의 환경에 노출

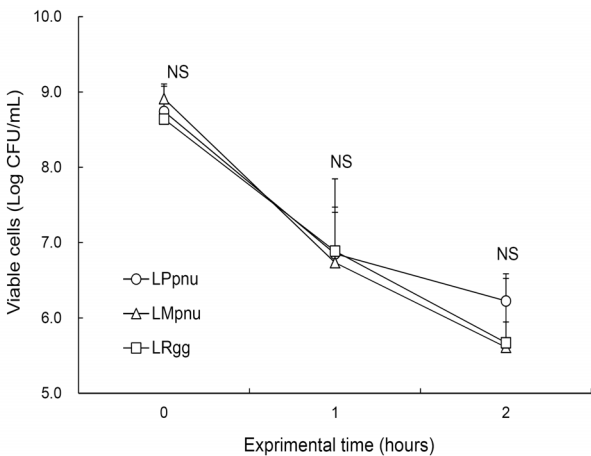


Fig. 4. Thermal stability of LAB isolated from kimchi at 55°C. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. NS: not significantly different.

되면 생존력이 급격히 감소할 수 있으므로 유산균의 열 안정성 또한 프로바이오틱 선별 조건으로서 매우 중요하다(29). 본 실험 결과 55°C에서 2시간 정치 후 대조구인 LRgg는 65.6±6.6%만이 생존하였으나, LPpnu는 71.2±4.1%, LMpnu는 63.0±3.9%가 잔존하였다. 이를 통해 균주 간 통계적인 유의성은 관찰되지 않았지만, LPpnu가 LRgg와 LMpnu보다 높은 열 안정성을 가지고 있는 것을 확인하였다($P>0.05$). 이는 LPpnu와 LMpnu의 내산성 결과에서와 마찬가지로 김치 유산균이 고염, 산성 등의 생육조건 하에서 성장하여 열악한 환경에서 생존할 가능성이 높기 때문일 것으로 사료된다.

김치 유산균의 항산화 활성

DPPH는 free radical을 가지고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 반응하게 되면 전자를 내어주면서 radical이 소멸되고 그 특유의 보라색이 투명하고 노란빛을 띠게 되며, radical을 환원시키는 능력, 즉 radical scavenging 활성이 클수록 항산화 활성이 높다고 할 수 있다(30). 3종 유산균의 DPPH radical 소거 효과를 측정한 결과(Fig. 5A), 이들 모두 처리 농도가 증가할수록 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 또한 5.0×10^6 CFU/mL 처리군과 1.0×10^7 CFU/mL 처리군 모두에서 LPpnu균이 DPPH radical 소거 효과가 각각 57.4±4.6%와 71.1±2.9%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 LRgg균(47.0±3.2%, 64.6±5.0%), LMpnu균(42.4±4.8%, 57.2±3.0%)의 순으로 나타났다. 따라서 LPpnu가 가장 큰 DPPH radical 소거능을 가짐으로써 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거 효과 측정 결과(Fig. 5B), DPPH radical 소거 활성 결과와 마찬가지로 유산균 처리 농도가 높을수록 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다. 특히 1.0×10^7 CFU/mL 처리군에서는 LPpnu가 37.7±2.1%로 유의적으로 가장 높은 소거능을 나타냈고, LRgg가 32.5±1.5%, LMpnu가 31.6±0.4%의 hydroxyl radical 소거능을 나타냈다($P<0.05$). DPPH radical 소거능 결과와 같은 경향으로 LPpnu가 가장 높은 hydroxyl radi-

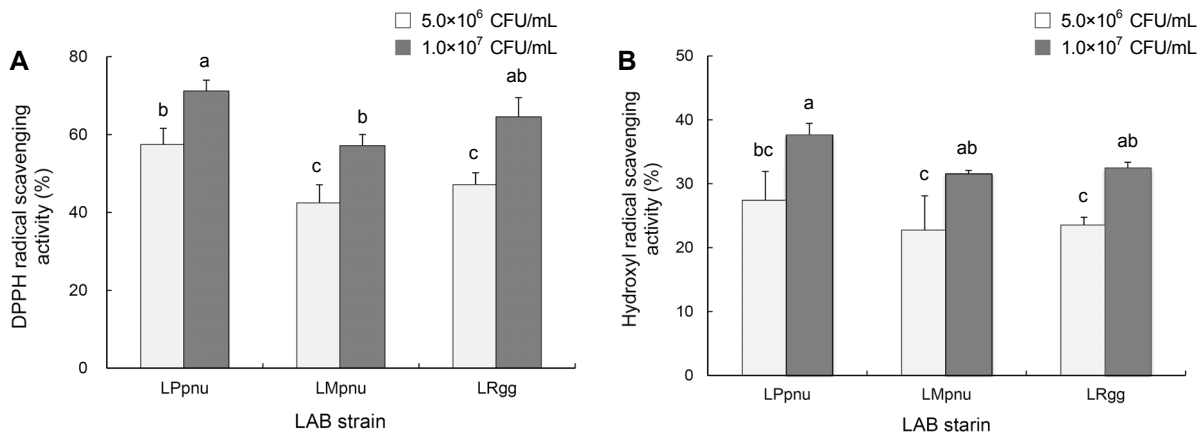


Fig. 5. DPPH radical (A) and hydroxyl radical (B) scavenging activities of LAB isolated from kimchi. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

cal 소거 활성을 가지며, 항산화 활성에서 가장 우수한 효능을 나타낸 것을 확인하였다.

활성산소는 체내에 축적될 경우 암, 간경변증, 관절염 등 각종 질병을 초래하게 되어 문제가 되고 있는데, 유산균은 활성산소로부터 자신을 보호할 수 있는 항산화 활성을 가지고 있다고 보고되고 있다(31). 이러한 유산균의 항산화 효과는 주로 금속 이온 chelating, free radical의 소거, 그리고 환원작용 등이 복합적으로 관여하여 나타나므로, 유산균은 활성산소에 의한 각종 질병을 예방하는 데 활성을 나타낼 수 있다고 하겠다(32). Cho 등(33)에 따르면 김치에서 분리한 *Lab. plantarum* YS712가 95.8%의 높은 DPPH radical 소거능을 나타냈으며, *Lab. plantarum* ATCC 8014가 95.3%, *Lab. plantarum* L155가 95.2%의 소거능을 나타내어 대체적으로 김치에서 분리한 *Lab. plantarum*은 높은 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 본 연구를 통해 항산화 효과가 뛰어난 LPpnu 및 LMPnu의 섭취는 체내 산화적 스트레스에 대하여 활성산소의 축적을 막는 데 도움을 줄 것으로 여겨진다.

김치 유산균의 HT-29 cell에서의 in vitro 항암 활성

HT-29 cell에서의 성장 저해 효과: MTT assay를 이용하여 김치 유산균의 HT-29 cell 성장 억제 효과를 측정하였는데(Fig. 6), 김치 유산균 처리군 모두에서 성장 억제 효과가 관찰되었다. 김치 유산균 농도를 5.0×10^6 CFU/mL로 처리하였을 때 LPpnu, LMPnu는 각각 20.4 ± 3.5 , 12.2 ± 2.8 %의 암세포 성장 억제 효과를 보여, 11.7 ± 4.0 %의 억제 효과를 나타낸 대조군 LRgg와 비교했을 때 LPpnu가 그중 가장 큰 암세포 성장 억제 효과를 가진 것으로 나타났다. 유산균 농도를 1.0×10^7 CFU/mL로 처리하였을 경우에도 LPpnu가 37.1 ± 3.2 %로, 같은 농도의 LRgg 처리군(21.2 ± 4.0 %)보다 더 높은 HT-29 cell의 성장 저해 효과를 나타냈다($P < 0.05$). 유산균에 의한 항암 기전은 정확하게 밝혀진 바가 없지만, 발암 관련 효소 작용 억제, 숙주 면역계의 활성화, 장내 pH 저하 등이 항암 기전에 관여할 것으로 생각되고 있다(34). Kim 등(35)의 연구에서도 김치 유산균 *Lab. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*가 sarcoma 180 cell을 처리한 ICR

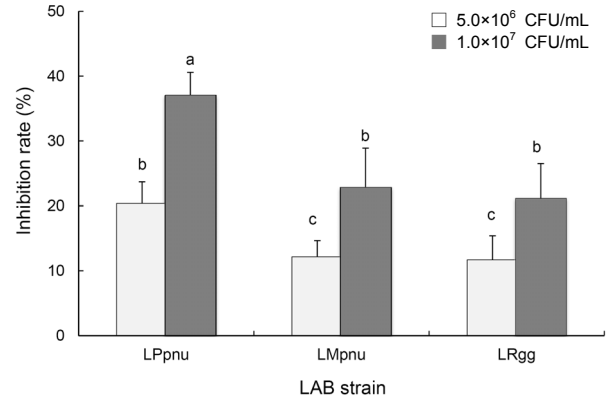


Fig. 6. Inhibitory activity of LAB isolated from kimchi against the growth of HT-29 cells by MTT assay. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

마우스와 Lewis lung carcinoma를 사용한 C57BL/6 마우스에서 종양 생성을 저해하는 효과가 있다고 보고하였다. 선행연구와 마찬가지로 본 연구에서도 김치유래 유산균인 *Lab. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*가 in vitro에서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

Bcl-2와 Bax 유전자의 발현에 미치는 효과: Bcl-2 family 관련 유전자는 apoptosis를 조절하는 인자로 pro-apoptosis 역할을 하는 인자(Bax, Bcl-xS)와 anti-apoptosis 역할을 하는 인자(Bcl-2, Bcl-xL)로 구성되어 있다(36). HT-29 cell에서의 Bax의 발현은 control군에 비하여 유산균을 처리한 군에서 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 그중 특히 LPpnu군에서 유의적으로 높은 증가율을 보였으며 다음으로 LMPnu, LRgg 순으로 나타났다($P < 0.05$; Fig. 7). 반면 Bcl-2 유전자 발현에서는 control군과 비교했을 때 유산균 처리군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인했으며, 대조군인 LRgg군보다 LPpnu와 LMPnu군에서 더 높은 억제 효과를 나타냈다. 이를 통해 김치 유산균 LPpnu와 LMPnu 중 특히 LPpnu는 Bax 발현을 증가시키고 Bcl-2의 발현을 억제시켜 HT-29 대장암세포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내었다고 하겠다.

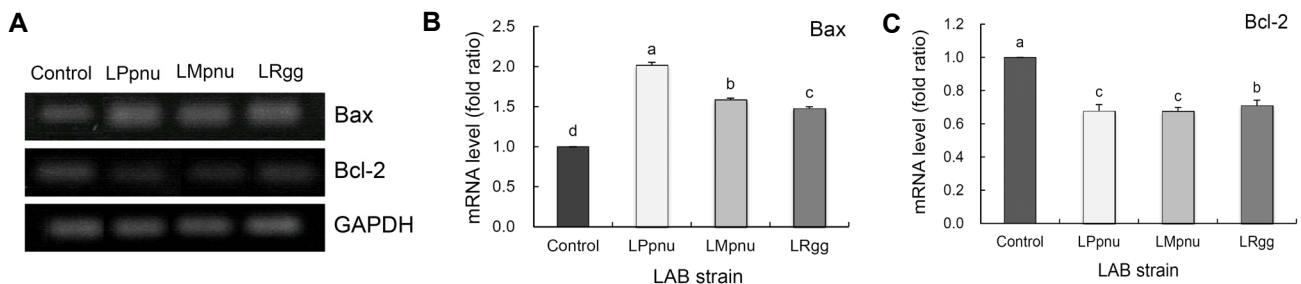


Fig. 7. Effects of LAB isolated from kimchi on the gene expressions of Bax and Bcl-2 in HT-29 cancer cells. Group abbreviations are as described in the Fig. 1. Means with the different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test. The band intensity on the gel (A) was calculated and presented on the bar graphs for the Bax gene expression (B) and for the Bcl-2 gene expression (C). Gene expression was quantified by using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

본 연구진은 선행연구에서 잘 익은 적숙기의 김치는 익지 않은 김치에 비하여 HT-29 cell에서 세포 성장을 억제하고, Bax, caspase-3, caspase-9의 발현을 증가시키는 한편, 염증인자 iNOS와 COX-2를 유의적으로 억제함을 확인하였다(37). 또한 대장암을 유발한 마우스에서도 김치의 항암 효능을 확인하였으며, 이는 염증 억제 및 암세포의 apoptosis로 인한 결과임을 확인하였다(38). 김치는 β -sitosterol, isothiocyanate와 같은 김치 내 활성성분이나 부재료뿐만 아니라 김치 유산균이 건강 기능성을 나타낸다고 밝혀졌는데, 특히 김치 유산균은 균체 중 peptidoglycan 또는 muramyl dipeptide와 같은 세포벽 성분이 항암 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(1). 따라서 본 연구에서 김치 유산균 중 우점종으로 나타났던 LPpnu 및 LMPnu는 암세포의 성장을 억제하고 apoptosis를 유도함으로써 김치의 항암 활성에 또한 기여한 것으로 판단된다.

결론적으로 김치에서 분리한 LPpnu, LMPnu는 모두 프로바이오틱의 기본 특성을 가지고 있으며, 특히 LPpnu는 내산, 내담즙성, 장 부착능, 열 안정성, 항산화 및 항암 효능에서 높은 효능을 나타내어 체내에 도움을 줄 수 있는 프로바이오틱으로서 이용 가능성이 충분하다고 판단된다. 김치는 한국인이 계속해서 즐겨 먹어왔던 발효식품으로 이로부터 분리한 유산균은 우수한 프로바이오틱 균주로 세계적으로 인정되어야 한다. 또한 김치와 함께 이들이 섭취되면 대장 건강에 도움을 주리라 생각되며, 이에 대한 후속 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 김치에서 분리한 우점유산균인 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11352P(LPpnu)와 *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 11353P(LMPnu)의 프로바이오틱 효과를 프로바이오틱 효과가 높기로 잘 알려진 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LRgg)의 효능과 비교하여 확인하였다. 그 결과 LPpnu는 *Lab. rhamnosus* GG(LRgg)보다 프로바이오틱 효과가 더 뛰어났으며, LMPnu 또한 LRgg와 거의 유사한 수준의 효능을 나타냈다. LPpnu와 LMPnu는 모두 내산, 내담즙성, 장 부착능, 열 안정성의 프로바이오틱의 기본 특성을 가지고 있었으며, 특히 LPpnu는 가장 높은 프로바이오틱 효과를 나타냈다. 또한 LMPnu 및 LRgg와 비교했을 때 LPpnu는 DPPH radical과 hydroxyl radical 소거능 측정에서 더 높은 항산화능을 보였고, Bcl-2 유전자 발현 억제와 Bax 유전자 발현 증가를 통해 apoptosis를 유도함으로써 HT-29 human colon cancer cell에서 높은 암세포 성장 저해 효과를 나타냈다. 이를 통해 김치유래 LPpnu와 LMPnu는 프로바이오틱으로서 이용 가능성이 충분하다고 판단되며, 특히 LPpnu는 항산화 및 항암 활성에 뛰어난 효능을 나타내었기에 중요한 프로바이오틱 균주라고 하겠다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily JW 3rd. 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* 17: 6-20.
2. Park KY, Kim BK. 2012. Lactic acid bacteria in vegetable fermentation. In *Lactic Acid Bacteria*. Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 187-211.
3. Jeong EJ, Moon DW, Oh JS, Moon JS, Eom HJ, Choi HS, Kim CS, Han NS. 2012. Composition optimization of cabbage extract medium for cell growth of *Lactobacillus plantarum*. *Korean Soc Biotechnol Bioengineering J* 27: 347-351.
4. Fumiko H, Masafumi N, Tomokazu A, Kazuhiro N, Hirota O, Masanori S. 2010. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition* 26: 367-374.
5. FAO/WHO. 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation (FAO Food Nutr Paper 85). World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italy.
6. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, Sarma S, Valtonen V, Järvinen A. 2002. *Lactobacillus bacteremia* during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35: 1155-1160.
7. Cebeci A, Gürakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol* 20: 511-518.
8. De Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, De Vos WM. 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* 16: 1018-1028.
9. Jung JY, Lee SH, Lee HJ, Seo HY, Park WS, Jeon CO. 2012. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol* 153: 378-387.
10. Choi HJ, Kim DW, Joo WH. 2014. Characteristics of *Paenibacillus* sp. BCNU 5016 as a novel probiotic. *J Life Sci* 24: 161-166.
11. Bang JH, Shin H, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. *J Life Sci* 22: 251-258.
12. Kil JH. 2004. Studies on development of cancer preventive and anticancer kimchi and its anticancer mechanism. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea.
13. Liu CT, Chu FJ, Chou CC, Yu RC. 2011. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat Res-Gen Tox En* 721: 157-162.
14. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Nippon Saikingu Zasshi* 29: 691-697.
15. Jung JK, Kil JH, Kim SK, Jeon JT, Park KY. 2007. Survival of double-microencapsulated *Bifidobacterium breve* in milk

- in simulated gastric and small intestinal conditions. *J Food Sci Nutr* 12: 58-63.
16. Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci Technol* 10: 405-410.
 17. Park DJ, An EY, Kim JS, Imm JY, Han KS, Kim SH, Oh SJ. 2002. Dry enteric coating process of lactic acid bacteria by hybridization system. *Korean J Food Sci Technol* 34: 856-861.
 18. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 19. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
 20. Sim JH, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 27: 101-104.
 21. Klaver FA, van der Meer R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* 59: 1120-1124.
 22. Jung SE, Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw *makgeolli*. *Korean J Food Sci Technol* 47: 44-50.
 23. Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 39: 681-687.
 24. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol* 59: 4121-4128.
 25. Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kernéis S, Bernet MF, Servin AL. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol* 58: 2034-2039.
 26. Saulnier DM, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol* 20: 135-141.
 27. Saito T, Lim KS. 2012. Immunogenicity and survival strategy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gut. *Korean J Dairy Sci Technol* 30: 31-36.
 28. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 71: 8344-8351.
 29. Gouesbet G, Jan G, Boyaval P. 2002. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. *Appl Environ Microbiol* 68: 1055-1063.
 30. Kim SS, Jeong MH, Seo YC, Kim JS, Kim NS, Woon WB, Ahn J, Hwang B, Park DS, Park SJ, Lee HY. 2010. Comparison of antioxidant activity by high pressure extraction of *Codonopsis lanceolata* from different production areas. *Korean J Med Crop Sci* 18: 248-254.
 31. Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J. 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol* 177: 5254-5260.
 32. Lin MY, Yen CL. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* 47: 1460-1466.
 33. Cho YH, Imm JY, Kim HY, Hong SG, Hwang SJ, Park DJ, Oh S. 2009. Isolation and partial characterization of iso-flavone transforming *Lactobacillus plantarum* YS712 for potential probiotic use. *Korean J Food Sci Ani Resour* 29: 640-646.
 34. Hirayama K, Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2: 681-686.
 35. Kim HY, Bae HS, Baek YJ. 1991. *In vivo* antitumor effects of lactic acid bacteria on sarcoma 180 and mouse Lewis lung carcinoma. *J Korean Cancer Assoc* 23: 188-196.
 36. Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. 2002. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 8: 1059-1062.
 37. Kim B, Song JL, Ju JH, Kang SA, Park KY. 2015. Anticancer effects of kimchi fermented for different times and with added ingredients in human HT-29 colon cancer cells. *Food Sci Biotechnol* 24: 629-633.
 38. Kim HY, Song JL, Chang HK, Kang SA, Park KY. 2014. Kimchi protects against azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colorectal carcinogenesis in mice. *J Med Food* 17: 833-841.