

## 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* 균주들의 프로바이오틱 효과

이설매<sup>1</sup> · 이현아<sup>2</sup> · 권미라<sup>1</sup> · 박의성<sup>3</sup> · 박건영<sup>4</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강미생물학교실  
<sup>3</sup>연세대학교 식품영양학과, <sup>4</sup>차의과대학교 식품생명공학과

### Probiotic Effects of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Kimchi

Xue-Mei Lee<sup>1</sup>, Hyun Ah Lee<sup>2</sup>, Meera Kweon<sup>1</sup>, Eui-Seong Park<sup>3</sup>, and Kun-Young Park<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

<sup>2</sup>Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Pusan National University

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Yonsei University

<sup>4</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Cha University

**ABSTRACT** Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* pF1 NITE-P1462 (Lp-pF1), *L. plantarum* KCCM 11352P (Lp-PNU), *L. plantarum* CBT LP3 KCTC 10782BP (Lp-CB), and *L. plantarum* KCTC 3099 (Lp-3099) isolated from kimchi and *Lactococcus lactis* KFCC 11510P (L-lactis) isolated from Doenjang were studied. Resistance to gastric and bile acid, adhesion to intestines in colon cells, thermal stability, and antioxidative and *in vitro* anticancer effects in HT-29 cancer cells were evaluated. *L. plantarum* strains showed improved tolerance of gastric and bile acids than L-lactis. Lp-pF1 had better adhesion ability in the intestine than Lp-PNU, Lp-3099, and L-lactis. Lp-pF1 also showed better heat resistance at 50°C, 70°C, and 80°C than Lp-CB, Lp-3099, and L-lactis. In addition, Lp-pF1 exhibited greater antioxidant activity by scavenging DPPH radicals or hydroxyl radicals and anticancer effects in MTT assay than others. Taken together, these results suggest that *L. plantarum* isolated from kimchi showed higher probiotic activities with antioxidant and anticancer properties than *Lac. lactis* isolated from Doenjang. Lp-pF1 revealed the best probiotic activities among *L. plantarum* and could be used as a promising potential probiotics.

**Key words:** probiotics, *Lactobacillus plantarum*, kimchi, *Lactococcus lactis*

## 서 론

김치는 배추, 무 및 파 등 소금에 절인 채소를 다른 양념과 함께 버무린 후 일정 시간 동안 유산균이 발효하여 제조된 probiotic food이다(1). 김치는 항산화(2), 항암(3), 면역증진(4), 항비만(5), 항노화(6), 항당뇨(7) 등 다양한 건강 가능성이 있는 것으로 보고되어 있다. 이러한 기능성은 풍부한 비타민(vitamin C,  $\beta$ -carotene, vitamin B complex 등), 각종 미네랄(Na, Ca, K, Fe, P), 식이섬유, 김치에 포함된 phytochemicals, 유산균 그리고 유산균의 발효에서 유래된 발효 대사산물로 인해 이러한 기능성이 나타나는 것으로 알려져 있다(1). 적절히 발효된 김치는 많은 유산균( $10^{7-9}$  CFU/g)을 함유하고 있으며, 주요 발효 유산균은 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*와 *Pediococcus* 속 등이 알려져 있다(8). 이들 가운데 *L. plantarum*은 널리 알려진 프로바이오틱

틱스로서 대장암, 변비 증상 완화, 설사, 항비만 등의 건강 기능성을 가지는 것으로 연구되어 있다(9-11).

Lee 등(12,13)은 김치에서 분리한 *L. plantarum* pF1 NITE-P1462(Lp-pF1)를 나노화한 사균체와 생균인 Lp-pF1의 면역증진 효능 및 대장염, 대장암 억제에 대해 연구하였는데, 나노화된 Lp-pF1과 생균인 Lp-pF1은 높은 면역증진 효능을 나타냈으며, 또한 나노화된 Lp-pF1과 생균인 Lp-pF1을 김치에 첨가하였을 때 김치의 대장염 및 대장암 억제 효능을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 나노화된 Lp-pF1은 일반 생균인 Lp-pF1에 비해 더 높은 면역증진, 대장염, 대장암 억제 효과를 나타내었다. 전주 지역 김치에서 분리한 *L. plantarum* KCCM 11352P(Lp-PNU)는 현재 프로바이오틱 우수성이 증명된 *L. rhamnosus*나 *Leu. mesenteroides*보다 더 뛰어난 항산화 및 항암 활성을 나타냈다(14). 또 다른 김치에서 분리한 *L. plantarum* KCTC 3099 (Lp-3099)(15), *L. plantarum* CBT LP3 KCTC 10782BP (Lp-CB)(16) 역시 뛰어난 건강 기능성과 프로바이오틱 효과를 가지는 것으로 밝혀져 있다.

이러한 결과를 바탕으로 다양한 김치 유산균 중 *L. plantarum*이 강력한 프로바이오틱 효과를 나타내는 것으로 생

Received 9 June 2016; Accepted 18 November 2016

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Biotechnology, Cha University, Seongnam, Gyeonggi 13488, Korea  
E-mail: kunypark@cha.ac.kr, Phone: +82-31-881-7159

각하며, 이미 면역증진, 대장염, 대장암 억제에 증명된 Lp-pF1이 다른 선행연구에서 높은 기능성을 나타내었던 다른 *L. plantarum*과 비교하여 프로바이오틱 효과의 차이가 있는지 그리고 어떠한 프로바이오틱의 특징과 건강 기능성을 나타내는지 확인할 필요가 있다. 그리고 된장에서 유래한 대표적인 유산균(17)과 김치에서 유래한 유산균을 비교하기 위해 그 프로바이오틱 효과가 검증된 *Lactococcus lactis* KFCC 115109(L-lactis)(18)와도 비교하였다.

현재 우리나라의 유산균 시장은 생균을 중심으로 산업이 구성되어 있어 Lp-pF1을 나노화한 사균체가 건강 기능성에 유리하다고 하더라도 사균체보다는 유산균 생균의 프로바이오틱 효능을 확인할 필요가 있다. 따라서 생균체인 Lp-pF1의 우수성을 증명한 후 생균으로 만든 상품에 나노화된 Lp-pF1을 첨가한다면 단독으로 Lp-pF1을 섭취하는 것에 비해 높은 건강 기능성 및 프로바이오틱 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 *L. plantarum* pF1의 프로바이오틱 스토로서의 건강 기능성을 비교하기 위해 Lp-PNU, Lp-3099, Lp-CB와 된장에서 분리한 *L. lactis*를 대조균으로 하여 총 4종의 *L. plantarum* 균주와 *Lac. lactis* 균주의 프로바이오틱 효과를 내산성, 내담즙염성, 장내 부착성, 열에 대한 내성, 항산화 및 *in vitro* 항암 효과 측정을 통해 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 김치에서 유래된 *L. plantarum* 균주들의 선택 및 배양

본 연구에 사용한 *L. plantarum* pF1[NITE 생물자원센터(Tokyo, Japan)에서 수탁; Accession No: NITE-P1462]은 한국 김치에서 분리한 균으로 바이오제닉스코리아(주)(Seoul, Korea)에 의해 제공된 것을 사용하였으며, 다른 김치 *L. plantarum*는 전라북도 전주 지역 김치에서 분리한 *L. plantarum* KCCM 11352P(Lp-PNU), 그 외 *L. plantarum* KCTC 3099(Lp-3099), *L. plantarum* CBT LP3 KCTC 10782BP(Lp-CB)를 선택하였고, *Lac. lactis* KFCC 11510P(L-lactis)는 된장에서 분리한 균으로 미생물자원센터(Jeongeup, Korea)에서 구입하여 대조균으로 사용하였다. 각 균주는 MRS broth(Difco, Sparks, MD, USA)를 이용하여 37°C에서 혐기적으로 3차 계대배양하여 프로바이오틱 효능 확인 실험에 사용하였고, *in vitro* 항암 기능성 실험에서는 이를 원심분리(3,000×g, 5분) 한 후 phosphate buffered saline(PBS)에 2회 세척한 다음 100°C에서 20분 사멸시켜 사용하였다(19).

### 내산성 및 내담즙성 측정

인공 위산에 대한 내성은 1 mg/mL pepsin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 용액에 HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조정하여 인공 위산을 제조하였다. 여기에 MRS

broth에서 배양한 유산균을  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 수준으로 접종한 후 37°C에서 3시간 배양하며 1시간마다 생균수를 측정하였다(20). 인공 담즙산에 대한 내성 실험은 Cebeci와 Gürakan(10), Kim 등(21), Jung 등(22)의 방법을 변형하여 수행하였다. 0.02 M cholic acid, 1% deoxycholic acid, 0.05 mg/mL lipase, 0.02 mg/mL pancreatin 용액에 1 N HCl 및 NaOH를 이용하여 pH 8.0으로 조정하여 인공 담즙산을 준비하였다.

인공 담즙산에  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 수준의 각 유산균 현탁액을 접종하여 37°C에서 6시간 배양하며 2시간마다 생균수를 측정하여 인공 담즙산에 대한 내성을 측정하였다. 인공 위액 및 인공 담즙산에서의 생균수 측정은 인공 위액 및 담즙산에서 배양한 각 균주를 멸균한 증류수에서 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하고 배양 후 생균수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

### 장 부착성 측정

HT-29 cells(human colon adenocarcinoma cells)은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 10% FBS와 100 units/mL penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Forma, model 311S/N29035, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. HT-29 cell에 대한 부착능력을 확인하기 위하여 배양된 HT-29 cell을 각 well 당  $1.0 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 6-well plate에 분주하고 monolayer를 형성할 때까지 배양하여 실험에 사용하였다. 순수한 RPMI 1640 배지에 PBS로 2회 세척한 유산균을  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL가 되도록 현탁하여 각 well에 접종하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 배양하여 HT-29 cell에 부착시켰다. 배양이 완료된 후 부착되지 않은 유산균을 제거하기 위해 3분씩 200 rpm의 속도로 교반(Orbital shaker NB-101S, N-Biotek, Bucheon, Korea)하면서 PBS로 3회 세척을 실시하였다. 세척이 완료된 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 10분간 처리하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 멸균한 증류수로 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 접종하고 48시간 배양하여 생균을 counting 한 후 장 부착률을 측정하였다(23).

### 열 안정성 측정

열 안정성은 MRS broth에서 배양한  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL의 유산균을 50°C, 70°C 및 80°C에 1시간 방치하며 30분 단위로 배양된 배지 1 mL를 채취한 후 멸균한 증류수에서 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 접종한 다음, 37°C에서 48시간 동안 배양하고, 생균수를 측정하여 생존율을 계산하였다(24).

### 항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성 측정: 유산균을  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL

의 농도로 희석한 배지 500  $\mu$ L와 메탄올로 희석한 15 mM 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 용액 500  $\mu$ L를 1:1의 비율로 96-well plate에 혼합하여 빛이 차단된 상태에서 30분간 방치하였다. 1,200 rpm에서 3분간 원심분리 시킨 다음, 상층액을 200  $\mu$ L를 채취하여 96-well plate에 분주한 후 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Seoul, Korea)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 흡광도 차이를 다음과 같이 백분율(%)로 나타내었다(25).

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

**수산화 라디칼 소거 활성 측정:** 수산화 라디칼 소거 활성의 측정은  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL의 균주를 포함한 배지 100  $\mu$ L에 2.5 mM 2-deoxy-D-ribose를 함유한 10 mM PBS 용액 345  $\mu$ L를 혼합하였다. 그리고 1 mM  $\text{FeCl}_3$  및 1.04 mM EDTA 용액 50  $\mu$ L, 1 mM ascorbic acid 50  $\mu$ L, 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  5  $\mu$ L를 각각 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 2.8% trichloroacetic acid 500  $\mu$ L와 1% 2-thiobarbituric acid 250  $\mu$ L를 첨가하고 95°C에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각한 후 1,200 rpm에서 3분간 원심분리 시킨 다음, 상층액을 200  $\mu$ L를 채취하여 96-well plate에 분주하였다. ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 수산화 라디칼 소거 활성을 산출하였다(26).

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

**In vitro 항암 활성 측정**

배양된 HT-29 human colon cancer cell을 96-well plate에  $1.0 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL(저농도)와  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL(고농도)의 농도로 희석한 시료 유산균을 배지에 혼합하여 첨가한 다음 같은 조건에서 48시간 배양하였다. 48시간 후 시료를 제거하고, PBS에 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액과 배지를 혼합하여 4시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다(12).

**통계처리**

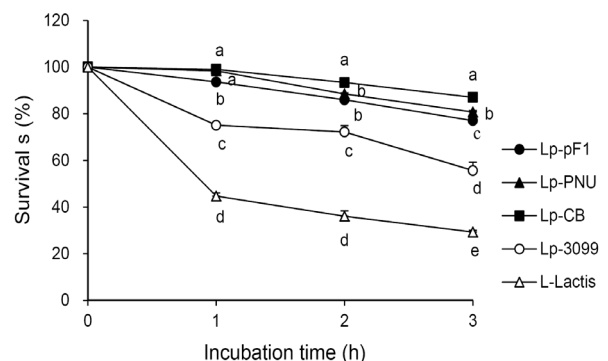
모든 실험 결과는 평균치와 표준편차(mean $\pm$ SD)를 사용하여 나타내었다. 각 군 간의 비교는 Duncan's multiple range test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 P 값이 5% 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다(13).

**결과 및 고찰**

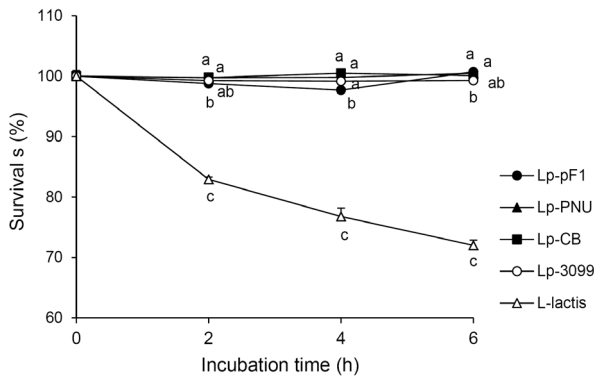
**내산성 및 내담즙성**

**내산성:** 유산균은 구강으로 섭취할 경우 위와 십이지장을 통과하여 장에 도달하게 되므로, pH 3 이하의 조건에서 생존이 가능한 유산균만이 장에 도달하여 프로바이오틱 기능을 발휘할 수 있다(27,28). 본 연구에서는 각 균주의 인공 위액에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 2.5의 산과 소화효소인 pepsin을 함유한 인공 위액에 각 균주를 접종하여 시간 별로 생존수를 측정하였다(Fig. 1). 반응 1시간 후 생존수를 측정하여 반응 전의 생존수와 비교한 결과, Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB 모두 90.0% 이상의 높은 생존율을 나타내었고, Lp-3099는  $75.1 \pm 1.0\%$ , L-lactis는  $44.7 \pm 1.4\%$ 만 생존하여 Lp-CB와 Lp-PNU와 Lp-pF1이 높은 생존율을 나타냈다. 반응 2시간 후 Lp-CB는  $93.4 \pm 0.8\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였고 Lp-pF1은  $86.0 \pm 0.2\%$ , Lp-PNU는  $88.5 \pm 0.5\%$ , Lp-3099는  $72.2 \pm 2.7\%$ , L-lactis는  $36.1 \pm 2.3\%$ 의 생존율을 나타냈다. 인공 위액 3시간 처리 후에도 비슷한 생존율을 보였다. 이를 통해 *Lac. lactis*보다 김치유산균 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB, Lp-3099의 4종의 *L. plantarum*이 인공 위액 내성이 더 높은 것을 확인하였으며, 특히 Lp-pF1과 Lp-PNU, Lp-CB는 인공 위액에 대하여 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB를 섭취하였을 때 다른 유산균에 비해 장까지 도달하여 건강기능성을 나타낼 확률이 높은 것으로 생각된다. 이는 김치의 *L. plantarum* 유산균은 김치발효 후반기에 나타나는 우점균으로 산에 저항성이 높으며 된장의 유산균보다 산에 견디는 내산성이 높은 것으로 나타났다.

**내담즙성:** 유산균이 장관에 도달하기 위해서는 위산 내성 뿐만 아니라 십이지장으로 분비되는 담즙산에 대한 내성 또한 중요하다(29,30). 담즙산과 2시간 반응 후 생존수를 측정하여 반응 전과 비교한 결과 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB,



**Fig. 1.** Acid tolerance of selected lactic acid bacteria in simulated gastric condition. Lp-pF1, *Lactobacillus plantarum* pF1; Lp-PNU, *L. plantarum* KCCM 11352P; Lp-3099, *L. plantarum* KCTC 3099; Lp-CB, *L. plantarum* CBT LP3 KCTC 10782BP; L-lactis, *Lactococcus lactis* KFCC 11510P. Mean values with different letters (a-e) at each incubation time are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

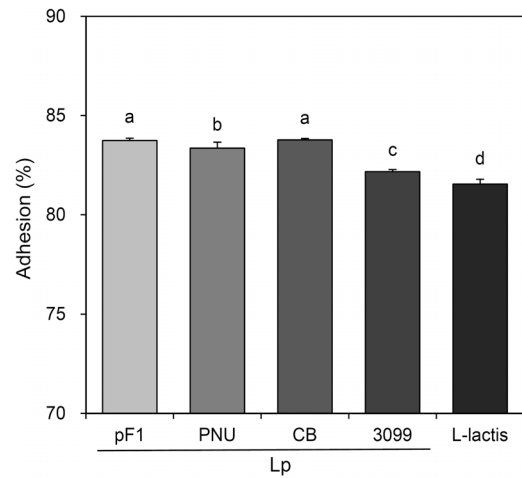


**Fig. 2.** Bile acid tolerance of selected lactic acid bacteria in simulated small intestinal condition. Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Mean values with different letters (a-c) at each incubation time are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

Lp-3099 모두 98.0% 이상의 높은 생존율을 나타내었으며, L-lactis는  $82.9 \pm 0.4\%$ 의 생존율을 보였다(Fig. 2). 4시간 후와 6시간 반응 후 4종의 *L. plantarum*(CB, PNU, pF1, 3099)은 생존율 98.0% 이상을 유지하며 담즙산에는 큰 영향을 받지 않는 것을 확인하였으며, 특히 6시간 후에는 Lp-pF1이  $100.7 \pm 0.2\%$  가장 높은 생존율을 나타내었다( $P < 0.05$ ). 반면 L-lactis는 4시간 후에  $76.8 \pm 1.4\%$ , 6시간 후에  $72.0 \pm 0.9\%$ 만 생존하여 위산에 대한 내성 결과와 비슷하게 담즙산에 대한 내성에서도 *Lac. lactis*는 낮았으나 4종의 *L. plantarum*은 높은 것으로 나타났으며, 특히 Lp-pF1이 담즙산 내성에 있어서는 가장 높은 안정성을 나타내었다. 이는 김치에서 분리한 *Lactobacillus* 속이 담즙산에 뛰어난 안정성을 가지고 있으며(31), 된장에서 나타난 유산균에 비해 담즙산에 높은 내성을 지니고 있는 것으로 생각한다. 따라서 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB는 내산성이 높을 뿐만 아니라 내담즙성도 높게 나타나 섭취하였을 때 장에서 프로바이오틱 효과를 나타내기에 유리할 것으로 생각된다.

### 장 부착능

각 유산균의 장 부착능을 확인하기 위해 HT-29 cells를 이용하여 유산균의 장 부착능을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 Lp-pF1, Lp-PNU와 Lp-CB가 각각  $83.7 \pm 0.1\%$ ,  $83.4 \pm 0.3\%$ 와  $83.8 \pm 0.1\%$ 로 높은 장 부착능을 보였으며, 그다음으로 Lp-3099가  $82.2 \pm 0.1\%$ , L-lactis가  $81.5 \pm 0.2\%$ 의 장 부착능을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 유산균이 프로바이오틱 효능을 지니려면 위와 십이지장을 통과하여 장내 상피세포에 부착하고 거기에서 colony를 생성한 후 다양한 활성 물질을 사람의 체내로 내어놓아 프로바이오틱 기능을 할 수 있으며, 많은 유산균은 섭취하더라도 장내에서 colony를 형성하기가 어려운 것으로 보고되어 있다(32). 특히 장내에 부착된 유산균은 장내 부착되지 못한 유산균에 비하여 면역 활성 증진 및 항암 효과가 크다고 보고되고 있으며(33), 이러한 사실을 비추어 볼 때 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB의 높은 장



**Fig. 3.** Adhesion ability of selected lactic acid bacteria to human HT-29 colon cells. Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Mean values with different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

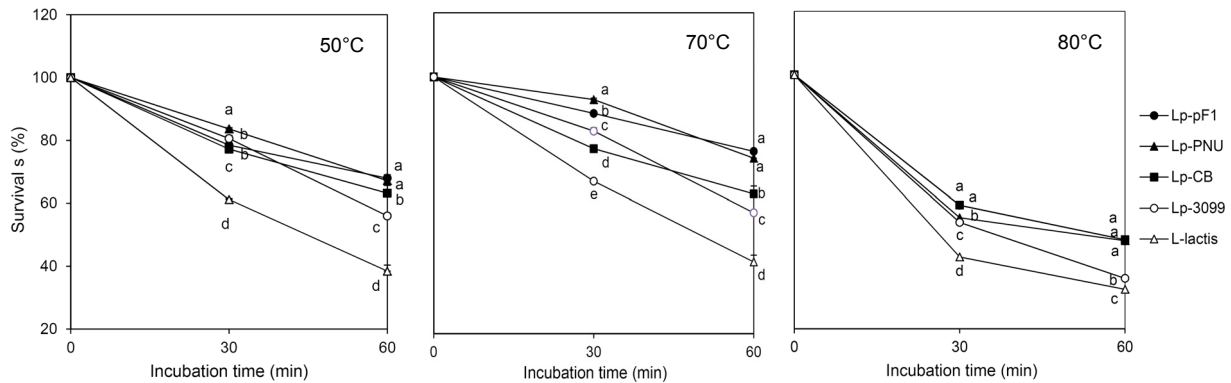
부착능은 사람이 섭취하였을 때 다른 유산균에 비해 장내에서 colony를 만들 가능성이 커져 프로바이오틱 기능성을 발휘하는 데 유리할 것으로 생각된다.

### 열 안정성

프로바이오틱스는 제제화 과정에서 고온의 환경에 노출되면 생존력이 감소할 수 있으므로 유산균의 열 안정성은 프로바이오틱스 균주 선정에 중요한 기준 중 하나이다(34). 각 유산균의 열 안정성은  $50^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 방치하며 30분 단위로 생존수를 측정하였다(Fig. 4).

$50^\circ\text{C}$ 에서의 열 안정성을 측정한 결과 열 처리 전과 비교하여 30분 열 처리 후 Lp-PNU가  $83.7 \pm 0.4\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였고, Lp-pF1은  $78.5 \pm 0.4\%$ , Lp-CB는  $77.3 \pm 1.0\%$ , Lp-3099는  $80.6 \pm 1.0\%$ , L-lactis는  $61.2 \pm 0.3\%$ 의 생존율을 나타냈다. 60분 열 처리 후에는 Lp-pF1, Lp-PNU와 Lp-CB가 각각  $68.0 \pm 0.6\%$ ,  $67.2 \pm 1.9\%$ ,  $63.2 \pm 2.4\%$  % 유의적으로 높은 생존율을 나타냈고, Lp-3099는  $56.0 \pm 0.8\%$ , L-lactis는  $38.4 \pm 1.9\%$ 의 생존율을 나타내어, Lp-pF1과 Lp-PNU가  $50^\circ\text{C}$  조건에서 가장 높은 열 안정성을 나타내는 것을 확인하였다( $P < 0.05$ ).

$70^\circ\text{C}$ 에서의 열 안정성 결과에서는 30분 열 처리 후 Lp-PNU가  $92.9 \pm 0.5\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였으며, Lp-pF1은  $88.6 \pm 0.5\%$ , Lp-CB는  $77.6 \pm 1.0\%$ , Lp-3099는  $83.1 \pm 1.0\%$ , L-lactis는  $67.5 \pm 0.4\%$ 의 생존율을 보였다. 60분 열 처리 후 Lp-pF1과 Lp-PNU가  $76.8 \pm 0.7\%$ 와  $74.7 \pm 2.1\%$ 로 가장 높은 생존율을 보였고, Lp-CB는  $63.5 \pm 2.4\%$ , Lp-3099는  $57.5 \pm 0.8\%$ , L-lactis는  $42.4 \pm 2.1\%$ 의 생존율을 보였다. 이를 통해  $70^\circ\text{C}$ 에서의 열 처리 조건에서도 Lp-pF1과 Lp-PNU가 유의적으로 가장 높은 열 안정성을 나타내는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Thermal stability of selected lactic acid bacteria at 50°C, 70°C and 80°C. Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Mean values with different letters (a-e) at each incubation time are significantly different ( $P<0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

80°C에서의 열 안정성을 측정한 결과 30분 열 처리 후 Lp-pF1과 Lp-CB가  $58.9\pm 0.2\%$ 와  $59.0\pm 0.9\%$ 로 높은 생존율을 나타냈고, Lp-PNU는  $55.0\pm 0.2\%$ , Lp-3099는  $53.5\pm 0.4\%$ , L-lactis는  $42.6\pm 0.9\%$ 의 생존율을 보였다. 60분 열 처리 후에는 Lp-pF1이  $48.0\pm 0.2\%$ , Lp-PNU가  $47.8\pm 0.4\%$ , Lp-CB가  $48.1\pm 0.6\%$ 로 다른 유산균에 비해 높은 생존율을 나타냈고, Lp-3099는  $35.9\pm 0.2\%$ , L-lactis는  $32.4\pm 0.4\%$ 의 생존율을 보였다.

Cho 등(24)의 연구에서는 김치에서 분리한 *L. plantarum* JK-01이 30°C에서  $1.6\times 10^7$  CFU/mL에서 60°C에서 10분간 열 처리 후에는  $3.3\times 10^3$  CFU/mL(0.02%)가 생존하였는데, 본 연구에서 Lp-pF1은 70°C에서 1시간 처리해도  $1.3\times 10^7$  CFU/mL(76.8%)가 생존하여 내열성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 Lp-pF1은 고온 환경에 노출되어도 다른 유산균에 비해 높은 생존율을 나타내는 것으로 생각한다.

이를 통해 50°C, 70°C, 80°C의 열 처리 조건에서 *L. plantarum*이 *Lac. lactis*보다 더 뛰어난 열 안정성을 가지고 있음을 확인하였고, 내산성, 내담즙성도 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 김치에서 자란 유산균은 된장에서 자란 유산균에 비해 낮은 pH(4.0~4.3) 및 저온 조건(4°C)에서 생존할 수 있는 것으로 생각된다. 그리고 *L. plantarum* 중 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB가 Lp-3099보다 내산성, 내담즙성이 높아 같은 종이라 하더라도 균의 종류에 따라 나타내는 프로바이오틱 효과가 다른 것으로 나타났다.

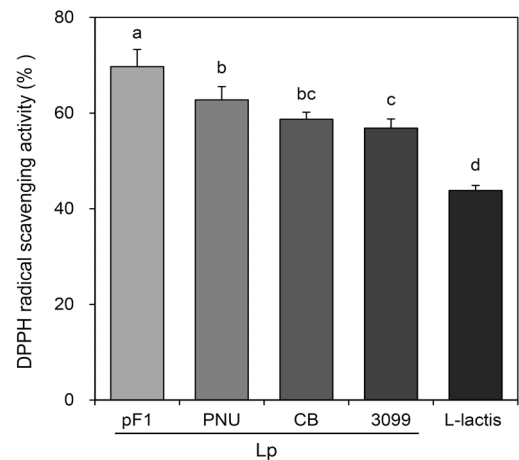
**항산화 활성**

**DPPH 라디칼 소거 활성:** 5종의 유산균의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과(Fig. 5), Lp-pF1이  $69.7\pm 3.6\%$ 로 유의적으로 가장 높은 소거 활성을 나타내었으며, Lp-PNU가  $62.8\pm 2.8\%$ 로 두 번째로 높은 소거 활성을 나타냈다( $P<0.05$ ). 다음으로 Lp-CB가  $58.7\pm 1.2\%$ , Lp-3099가  $56.9\pm 1.6\%$ 였고, L-lactis는  $43.8\pm 1.1\%$ 로 가장 낮은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 다른 프로바이오틱 효능과 비슷하

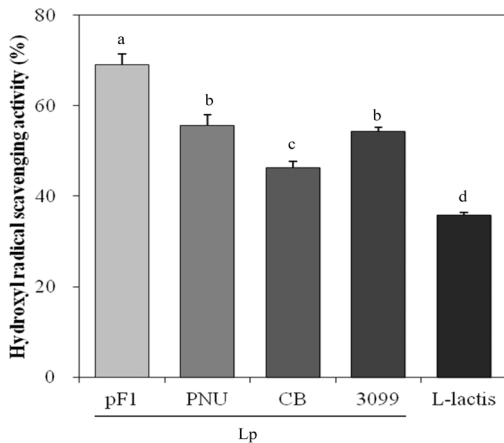
게 4종의 *L. plantarum*이 *Lac. lactis*에 비해 유의적으로 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

**수산화 라디칼 소거 활성:** 5종의 유산균의 수산화 라디칼 소거 활성 측정 결과(Fig. 6) DPPH 라디칼 소거 활성 결과와 비슷하였다. Lp-pF1이  $69.1\pm 2.3\%$ 로 5종의 유산균 중 유의적으로 가장 높은 수산화 라디칼 소거 활성을 나타내었고( $P<0.05$ ), Lp-PNU와 Lp-3099가 각각  $55.7\pm 2.3\%$ 와  $54.3\pm 0.9\%$ 로 두 번째로 높은 소거 활성을 나타냈다. 그다음으로 Lp-CB는  $46.2\pm 1.5\%$ , L-lactis는  $35.8\pm 0.6\%$ 로 더 낮은 소거 활성이 측정되었다. DPPH 라디칼 소거 활성 결과와 마찬가지로 4종의 *L. plantarum*이 *Lac. lactis*에 비해 유의적으로 높은 수산화 라디칼 소거 활성을 나타냈다( $P<0.05$ ).

유산균의 항산화 효능은 이미 다양한 선행 연구를 통해 보고되고 있다(35-39). 유산균이 항산화 효과를 나타내는 것은 유산균이 대사하면서 tocopherol, glutathione 등과 같은 제거제를 생산하는 것에도 연관이 있다(37). 또한, 유산균의 세포막에 있는 teichoic acid나 peptidoglycan 등은



**Fig. 5.** DPPH radical scavenging activity of selected lactic acid bacteria ( $1.0\times 10^9$  CFU/mL). Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Mean values with different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P<0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

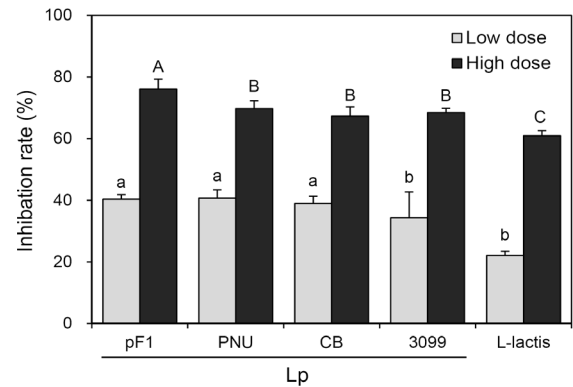


**Fig. 6.** Hydroxyl radical scavenging activity of selected lactic acid bacteria ( $1.0 \times 10^9$  CFU/mL). Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Mean values with different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

항암, 면역증진 등 기능성(40)이 알려져 이들의 기능이 항산화 활성화에 영향을 끼친 것으로 보인다. Jung과 Kim(37)에 따르면 생막걸리에서 분리한 *L. plantarum* BAM-2가 32.4%, *L. plantarum* EHJ-1이 24.7%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여 여타의 분리된 *Lactobacillus* 속(*L. casei*, *L. brevis*)에 비해 *L. plantarum*이 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되었다. 또한, Li 등(39)의 연구에서는 중국 전통 발효 식품인 발효두부와 pao-cai에서 분리한 *L. plantarum*의 DPPH 라디칼 소거 활성을  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/mL의 농도에서 측정하였는데, 대부분의 *L. plantarum*이 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었고 가장 높은 소거 활성은 53.1%로 나타났다. 이는 본 연구의 유산균 처리 농도보다 높은 농도로, 본 연구에서는 앞서 실험한 유산균의 농도보다 더 낮은 농도( $1.0 \times 10^9$  CFU/mL)에서 LP-pF1이  $69.7 \pm 3.6\%$ 의 DPPH 라디칼 소거능을 보이고 다른 균보다 뛰어난 항산화능을 나타내어 유산균이 증식할 때 다른 유산균에 비해 라디칼 제거효능이 높으며, Lp-pF1은 지금까지 알려진 *L. plantarum* 중 가장 높은 항산화 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, *L. plantarum*이 L-lactis에 비해 DPPH 라디칼 및 수산화 라디칼 소거능이 높은 항산화 활성을 가진 프로바이오틱 균주로 확인되어 섭취했을 때 된장에서 유래한 유산균보다 김치에서 유래한 유산균의 항산화 효과가 높을 것으로 기대된다.

#### HT-29 cell에서의 *in vitro* 항암 효과

유산균의 항암 효과는 MTT assay를 이용하여 HT-29 인체대장암 세포에서 성장 억제 효과를 측정하였다(Fig. 7). 저농도 처리군( $5.0 \times 10^7$  CFU/mL)에서는 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB가 각각  $40.3 \pm 1.5\%$ ,  $40.7 \pm 2.7\%$ ,  $39.0 \pm 2.3\%$ 의 억제율을 보였으며, L-lactis( $22.1 \pm 1.3\%$ )에 비해 높은 암세포 성장 억제를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 고농도 처리군



**Fig. 7.** Inhibitory activity of selected lactic acid bacteria against the growth of HT-29 colon cancer cells by MTT assay. Group abbreviations are same as described in the legend of Fig. 1. Low dose,  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL; high dose,  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL. Mean values with different letters (A-C) (a,b) above the bars at different dose are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

( $2.0 \times 10^8$  CFU/mL)에서는 Lp-pF1이  $76.1 \pm 3.2\%$ 로 가장 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다( $P < 0.05$ ). Lp-PNU, Lp-CB, Lp-3099는 각각  $69.7 \pm 2.6\%$ ,  $67.3 \pm 3.0\%$ ,  $68.4 \pm 1.4\%$ 로 전반적으로 높은 억제율을 나타내었고, L-lactis는  $60.9 \pm 1.7\%$ 로 *L. plantarum*군들에 비해 낮은 암세포 성장 억제율을 나타내었다( $P < 0.05$ ).

Shin 등(41)의 연구에서는 김치에서 분리한 *L. plantarum*이 Sarcoma-180 cell을 이용하여 유도한 복수암 마우스 모델과 spontaneous osteosarcoma를 이용하여 유도한 일차 고형암 및 허파 전이암 마우스 모델에서 높은 면역 활성 및 항암 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 본 연구진은 선행연구에서 Balb/c 마우스를 이용한 대장암 모델을 통해 Lp-pF1과 나노화된 Lp-pF1의 대장암 억제능을 확인하였으며(13), Lp-pF1과 나노화된 Lp-pF1은 대장 길이의 수축 억제, 종양개수 감소, 염증과 관련 iNOS, COX-2 유전자의 발현 감소, cell cycle 관련 p53, p21 인자 및 세포사멸 관련 Bax, Bcl-2 유전자의 발현을 조절하여 대장암의 억제 효능을 확인하였다. 따라서 본 연구에서도 Lp-pF1이 다른 *L. plantarum*과 L-lactis에 비해 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

본 실험에서 사용한 *L. plantarum*은 모두 김치에서 유래했으나 각각의 김치 담금의 방법과 발효되는 환경에 따라 다른 *L. plantarum*이 나타났을 것으로 생각되며, 결국 김치를 담그는 방법에 따라서 유산균의 종류가 달라져 김치를 섭취하였을 때 이로 인한 건강 기능성에도 차이가 나타날 것으로 생각된다. 따라서 김치의 맛과 발효 및 기능성에 관여하는 좋은 종균의 사용 및 이에 관련된 연구가 앞으로 더 필요하다고 하겠다.

결론적으로 내산성, 내담즙성, 장부착능, 내열성은 *L. plantarum*이 L-lactis에 비해 전반적으로 높게 나타났으며, *L. plantarum* 중 Lp-pF1, Lp-PNU, Lp-CB, Lp-3099의

순으로 높은 프로바이오틱 효과를 보였다. 또한, 항산화 및 항암 효과에서도 앞선 결과와 유사하게 *L. plantarum*이 *L. lactis*에 비해 전반적으로 높게 나타났으며, *L. plantarum* 중 Lp-pF1이 가장 효과가 높아 유산균을 섭취하였을 때 다른 유산균에 비해 충분히 살아남아 장까지 도달하여 높은 항산화 활성 및 항암 활성을 나타낼 것으로 생각한다.

## 요 약

본 연구에서는 김치에서 분리한 *L. plantarum* pF1 NITE-P1462(Lp-pF1), *L. plantarum* KCCM 11352P(Lp-PNU), *L. plantarum* CBT LP3 KCTC 10782BP(Lp-CB)와 *L. plantarum* KCTC 3099(Lp-3099)의 프로바이오틱 효과(내산 및 내담즙성 측정, 장 부착능과 열 안정성, 항산화 및 항암 기능성의 측정)를 된장에서 유래한 *Lac. lactis* KFCC 11510P(*L. lactis*)와 비교하여 측정하였다. 그 결과 4종의 김치 *L. plantarum*이 *Lac. lactis*보다 전반적으로 높은 프로바이오틱 효과를 나타내었다. 4종의 김치 *L. plantarum* 중 내산 및 내담즙성 측정에서 Lp-pF1이 유의적으로 가장 높은 안정성을 나타냈고, 장 부착능 측정에서도 Lp-pF1이 Lp-CB와 함께 가장 뛰어난 부착능을 보였으며, 열 안정성 측면에서는 Lp-pF1과 Lp-PNU가 가장 높은 안정성을 가진 것으로 나타났다. 또한, DPPH 라디칼 및 수산화 라디칼 소거 활성 측정을 통해 Lp-pF1이 모든 유산균 중 유의적으로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었고, HT-29 인체 대장 암세포에서도 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈다. 따라서 Lp-pF1의 프로바이오틱으로서의 이용가능성을 확인하였으며, Lp-pF1은 특히 높은 항산화 및 항암 활성을 가지고 있어 향후 기능성 프로바이오틱으로 활용할 가능성이 높다고 할 수 있다. 또한, Lp-pF1을 앞서 연구했던 나노화된 Lp-pF1과 함께 섭취하였을 때 단독으로 Lp-pF1만 섭취하는 것보다 더 높은 건강 기능적 효과가 기대되며, 이에 대한 연구도 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 한중 협력연구 사업(201600140001)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 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: 6-22.
2. Park KY. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 169-182.
3. 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.
4. Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee DI, Park ES, Min H, Park SY, Hwang KW. 2011. Modulation of Th1/Th2 balance by *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi via stimulation of macrophage cell line J774A.1 *in vitro*. *J Food Sci* 76: H55-H61.
5. Choi SM. 2001. Antiobesity and anticancer effects of red pepper powder and kimchi. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea.
6. Kim B, Park KY, Kim SH, Ahn SC, Cho EJ. 2011. Anti-aging effects and mechanisms of kimchi during fermentation under stress-induced premature senescence cellular system. *Food Sci Biotechnol* 20: 643-649.
7. Islam MS, Choi H. 2009. Antidiabetic effect of Korean traditional Baechu (Chinese cabbage) kimchi in a type 2 diabetes model of rats. *J Med Food* 12: 292-297.
8. 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.
9. Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol* 113: 358-361.
10. Cebeci A, Gürakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol* 20: 511-518.
11. 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.
12. Lee HA, Kim H, Lee KW, Park KY. 2016. Dead *Lactobacillus plantarum* stimulates and skews immune responses toward T helper 1 and 17 polarizations in RAW 264.7 cells and mouse splenocytes. *J Microbiol Biotechnol* 26: 469-476.
13. Lee HA. 2016. Dietary nanometric *Lactobacillus plantarum* exhibits immunostimulatory potential, anti-colitis and anti-colorectal cancer effects in mice. *PhD Dissertation*. Korea University, Seoul, Korea.
14. Lee KH, Bong YJ, Lee HA, Kim HY, Park KY. 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 12-19.
15. Lee J, Hwang KT, Heo MS, Lee JH, Park KY. 2005. Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from kimchi to oxidative stress. *J Med Food* 8: 299-304.
16. Lee DK, Park JE, Kim KT, Do MJ, Chung MJ, Lee GS, Kim JE, Ha NJ. 2014. Stability traits of probiotics isolated from Korean on spices and propolis. *Korean J Microbiol* 50: 216-222.
17. Lee JO, Ryu CH. 2002. Preparation of low salt doenjang using by nisin-producing lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 75-80.
18. Jeong JK, Zheng Y, Choi HS, Han GJ, Park KY. 2010. Catabolic enzyme activities and physiological functionalities of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional Meju. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1854-1859.
19. Liu CT, Chu FJ, Chou CC, Yu RC. 2011. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 721: 157-162.
20. Kobayashi Y, Toyama K, Terashima T. 1974. Tolerance of a multiple antibiotic resistant strain, *Lactobacillus casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn J Bacteriol* 29: 691-697.

21. Kim SJ, Ma SJ, Kim HL. 2005. Probiotic properties of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Korean traditional food. *Korean J Food Preserv* 12: 184-189.
22. 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.
23. Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collines K, Morelli L. 1999. Adhesion studies for probiotics; need for validation and refinement. *Trends Food Sci Technol* 10: 405-410.
24. Cho JK, Li GH, Cho SJ, Yoon YC, Hwang SG, Heo KC, Choe IS. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Anim* 27: 367-370.
25. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
26. 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.
27. Booth IR. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* 49: 359-378.
28. 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.
29. You SJ, Cho JK, Hwang SG, Heo KC. 2005. Probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from kefir. *Korean J Food Sci Anim Resour* 25: 357-364.
30. Gilliland SE. 1997. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J Food Prot* 42: 164-167.
31. Choi HJ, Lim BR, Kim DW, Kwon GS, Joo WH. 2014. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *J Life Sci* 24: 1231-1237.
32. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 73: 386S-392S.
33. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9: 43-52.
34. Gouesbet G, Jan G, Boyaval P. 2002. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. *Appl Environ Microbiol* 68: 1055-1063.
35. Zhang S, Liu L, Su Y, Li H, Sun Q, Liang X, Lv J. 2011. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *Afr J Microbiol Res* 5: 5194-5201.
36. Lin MY, Chang FJ. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci* 45: 1617-1622.
37. Kim HS, Jeong SG, Chae HS, Ham JS, Ahn CN, Lee JM. 2004. Antioxidant activity and tolerance to reactive oxygen species of *Lactobacillus* spp.. *J Anim Sci Technol* 46: 1007-1012.
38. Jung SE, Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw *Makgeolli*. *Korean J Food Sci Technol* 47: 44-50.
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. Chang JH, Shim YY, Cha SK, Chee KM. 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Appl Microbiol* 109: 220-230.
41. 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.