

ORIGINAL ARTICLE

## 김치유래 *Lactobacillus plantarum* K-21의 DPPH 라디칼 제거활성 증진 및 다양한 항산화 효과

김예린 · 김예담 · 전채민 · 박규림 · 이오미<sup>1)</sup> · 손홍주\*

부산대학교 생명환경화학학과 및 생명산업융합연구원, <sup>1)</sup>농림축산검역본부 조류세균과

## Enhanced DPPH Radical Scavenging Activity of *Lactobacillus plantarum* K-21 Isolated from Kimchi and its Various Antioxidant Effects

Yerin Kim, Yedam Kim, Chae-Min Jeon, Gyulim Park, O-Mi Lee<sup>1)</sup>, Hong-Joo Son\*

Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Life and Industry Convergence Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

<sup>1)</sup>Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

### Abstract

Lactic Acid Bacteria (LAB) are among the representative probiotics that have been used for a long time in fermented food. Although there are many studies on detecting the radical scavenging activity of LAB, few studies have been conducted on the environmental factors that improve scavenging activity. This study investigated the environmental factors affecting the DPPH radical scavenging and various antioxidant activities of Kimchi-derived *Lactobacillus plantarum* K-21 with antihypertensive and radical scavenging activities. The optimal conditions for scavenging DPPH radicals were glucose 2%, bactopectone 0.5%, Tween 80 0.05%, L-cysteine 0.05%, and an initial pH 6.5 at 35°C. Under optimal conditions, the DPPH radical scavenging activity was  $94.8 \pm 2.2\%$ , which was 1.5 times higher than that of the basic medium. In addition, *L. plantarum* K-21 had other antioxidant activities: ABTS radical scavenging ( $93.6 \pm 1.5\%$ ), hydroxyl radical scavenging ( $8.5 \pm 0.9\%$ ), metal chelating ( $65.9 \pm 0.5\%$ ), NO scavenging ( $53.1 \pm 19\%$ ), SOD-like ( $25.1 \pm 1.5\%$ ), and reducing power ( $11.7 \pm 1.4\%$ ) activities were detected. Therefore, *L. plantarum* K-21 may act not only as a starter for lactic acid-fermented foods with improved functionality but also as a drug for various diseases caused by oxidative stress.

**Key words** : Antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity, *L. plantarum*, Starter

### 1. 서론

지난 수십 년 동안의 연구를 통하여 산화 스트레스(oxidative stress)와 항산화 효과(antioxidative effect)가 세포의 스트레스 반응 조절의 핵심 포인트로

밝혀졌다(Demple et al., 1999). 산화 스트레스는 식품이나 세포 내에서 비정상적으로 높은 수준의 산소가 없는 라디칼(oxygen-free radical) 및 활성산소(reactive oxygen species)가 생성되어 DNA, 단백질 및 지질 손상을 일으킬 때 발생한다(Shehata et al.,

Received 5 July, 2022; Revised 20 July, 2022;

Accepted 29 July, 2022

\*Corresponding author : Hong-Joo Son, Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Phone: +82-55-350-5544

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

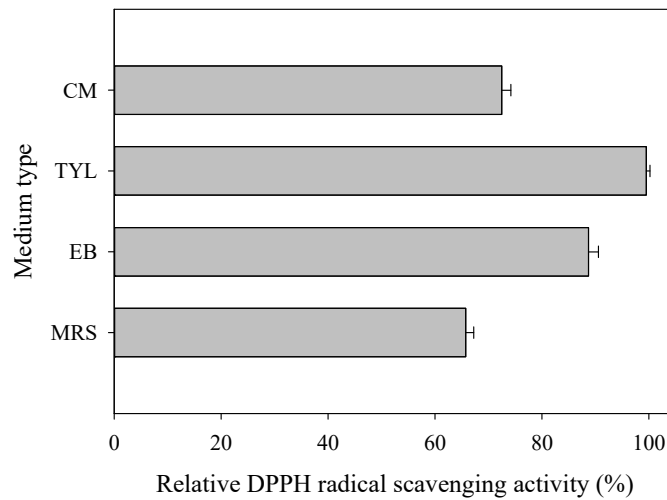


Fig. 1. Influence of medium type on DPPH radical scavenging activity of *L. plantarum* K-21.

2019). 사람을 포함한 생체는 라디칼의 산화적 손상 효과를 완화하기 위한 환원된 glutathione, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 및 catalase와 같은 항산화 방어 시스템을 가지고 있으나 과도하게 생성된 라디칼을 제거하는데 충분하지 않다 (Halliwell et al., 1992; Kullisaar et al., 2002). 결과적으로 이러한 라디칼은 식품의 변질을 유발하는 지질 과산화뿐만 아니라, 생체분자의 산화적 손상에 의한 노화, 동맥경화, 암, 알츠하이머병, 폐기종, 간경화, 관절염과 같은 세포사멸 및 조직 손상을 유발한다 (Aruoma, 1994; Ridnour et al., 2005; Valko et al., 2007). Butylated hydroxyanisole이나 butylated hydroxytoluene을 포함한 몇몇 합성 항산화제가 산화적 손상을 지연시키는데 널리 사용되었지만 최근 간 손상 및 발암성으로 인해 안전성에 의문이 제기되었다 (Hettiarachy et al., 1996). 따라서 합성 항산화제를 대체할 수 있는 보다 안전한 천연 항산화제를 개발하는 것이 최근 몇 년 동안 많은 관심을 받고 있다 (Luo and Fang, 2008).

식물성 페놀 화합물(GöktürkBaydar and Yasar, 2007)이나 감자(Wang and Xiong, 2005), 콩(Chen et al., 1998) 및 유청(Pena-Ramos et al., 2004) 단백질 등이 활성산소로부터 인체를 보호하고, 많은 만성 질환의 진행을 늦출 수 있다고 보고되었기에 이러한 항산화 물질에 대한 연구가 증가하고 있다. 동시에 건강

한 식단에 대한 대중의 관심이 높아짐에 따라 미생물을 이용한 새로운 기능성 제품 개발이 촉진되고 있는데, 특히 젖산균(lactic acid bacteria)이 주목받고 있다(Chiang and Pan, 2012). 젖산균은 건강한 사람의 주요 장내 미생물군인 동시에 대표적인 생균제(probiotics)이다(Angmo et al., 2016). 젖산균은 숙주의 미생물 밸런스 개선, 소화력 향상, 항균 활성, 면역 강화 및 항종양 활성과 같은 여러 가지 유익한 생리학적 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Fuller, 1991; Salminen et al., 1998). 또한 일부 젖산균과 젖산발효식품은 항산화 활성을 가지며, 음식 섭취 중 활성산소의 축적을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다(Kaizu et al., 1993). 따라서 세계 기능성 식품 시장의 약 65%를 차지하는 요구르트 및 기타 발효유에 첨가될 정도로 상업제품 개발 응용과 사람 건강에 대한 유익한 효과라는 두 가지 중요한 가치를 모두 가지고 있는 미생물이다(Figueroa-González et al., 2011).

항산화 활성이 있는 미생물이나 천연물질에 대한 평가와 선별은 생물학, 의학, 식품과학의 새로운 연구 트렌드이다. 지금까지 발효식품에서 분리된 젖산균의 항산화 활성 및 활성을 향상시키는 환경조건에 대해서는 연구가 많이 이루어져 있지 않다. 저자들은 이전에 한국 전통 발효식품인 김치에서 항고혈압 및 라디칼 제거 활성을 가진 *Lactobacillus plantarum* K-21을 분리하여 보고한 바 있는데, 이 균주는 인공위생과 인공담즙에

Table 1. Influence of carbon and nitrogen sources on DPPH radical scavenging activity of *L. plantarum* K-21.

Carbon source (0.5%)	Relative DPPH radical scavenging activity (%)	Nitrogen source (1.5%)	Relative DPPH radical scavenging activity (%)
Fructose	89.6±1.5	Bacto peptone	100.0±1.6
Galactose	90.4±1.7	Beef extract	73.6±1.2
Glucose	100.0±1.2	Casein	93.1±2.7
Lactose	96.1±2.6	Malt extract	83.4±2.0
Maltose	92.4±2.5	Polypeptone	92.5±3.5
Sucrose	93.3±1.8	Skim milk	88.1±1.7
Xylose	0.0±0.0	Soytone	93.7±1.1
None	90.9±1.4	Tryptone	94.2±3.2
		Yeast extract	92.3±3.7
		Tryptone + yeast extract	96.5±2.4
		None	22.8±1.6

내성을 가지고 있으며, 동시에 항균능도 보유하고 있는 등 생균제로서의 특성이 우수하였다(Park et al., 2011). 따라서 본 연구에서는 *L. plantarum* K-21에 의한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 제거를 위한 환경요인과 다양한 라디칼 제거 및 항산화 활성을 조사함으로써 보다 가능성이 향상된 젓산발효 식품을 위한 종균(starter)을 확보하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 실험균주는 한국 전통식품인 김치에서 분리된 후, 생균제로서의 특성과 항고혈압 활성이 우수한 것으로 판명된 *L. plantarum* K-21이었다(Park et al., 2011). 실험균주는 통상 MRS 평판배지에 접종하여 37°C, 24시간동안 배양한 후, 4°C에 보관하면서 사용하였다.

### 2.2. 실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 대한 환경요인의 영향

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 영향을 미치는 환경요인(배지성분, 배지 pH 및 배양온도)을 최적화하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 먼저, 실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 효과적인 기본배지를 조사하였으며, 이후 선정배지에 함유된 각 영양원 및 초기 pH (pH 4-9)와 배양온도(25-45°C)의 영향을 조사하였

다. 사용된 기본배지는 젓산균의 배양에 널리 이용되는 CM, EB, MRS, TYL broth이었다. EB broth와 MRS broth는 시판되고 있는 BD Difco사의 제품을 사용하였다. CM broth (sucrose 1%, peptone 1%, yeast extract 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, NaCl 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%) 및 TYL broth (lactose 0.5%, tryptone 1%, yeast extract 0.5%, Tween 80 0.1%, L-cysteine 0.01%)는 실험실에서 각각 조제하여 사용하였다. 다른 언급이 없는 한, 배지의 초기 pH는 6.5로 조정하였다.

전배양은 MRS 평판배지에서 보관 중인 균주를 MRS 액체배지 50 ml에 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 전배양액 2% (v/v)를 본배지 200 ml가 함유된 250-ml medium bottle에 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 배양액을 13000 rpm, 4°C에서 30분동안 원심분리한 후, 상등액의 DPPH 라디칼 제거능을 측정하였으며, 제거효율은 상대활성으로 나타내었다. 또한 최적화된 조건에서 DPPH 라디칼 제거능 외의 다양한 라디칼 [2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) 및 수산화 (OH) 라디칼] 제거능 및 항산화능[nitric oxide (NO) 제거능, 금속 킬레이트능 (metal chelating activity), SOD 유사 활성(SOD-like activity), 환원력(reducing power)]을 측정하였다.

### 2.3. 라디칼 제거 활성 및 항산화 활성 측정법

DPPH 라디칼 제거능은 배양 상등액 500 µl와 200 µM DPPH 용액 500 µl를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응

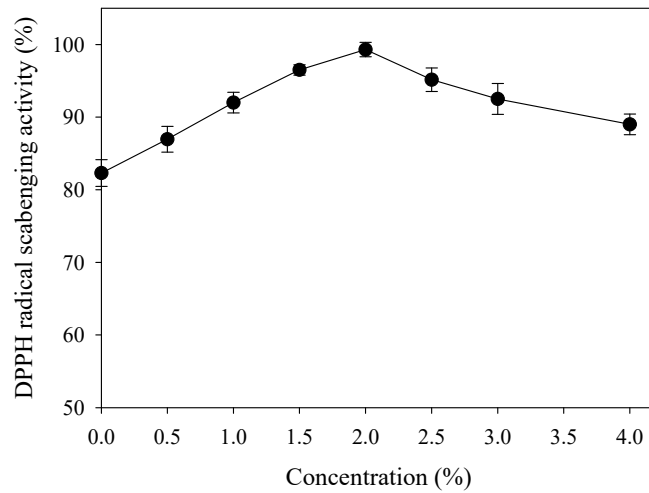


Fig. 2. Influence of glucose concentration on DPPH radical scavenging activity of *L. platarum* K-21.

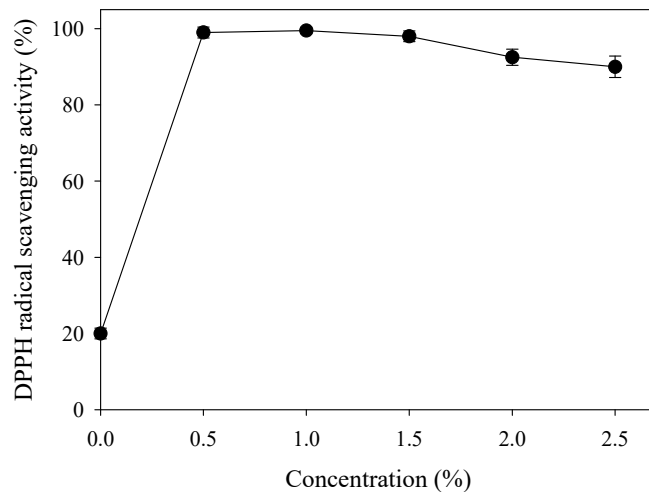


Fig. 3. Influence of bactopectone concentration on DPPH radical scavenging activity of *L. platarum* K-21.

시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois, 1958). ABTS 라디칼 제거능은 배양 상등액 100  $\mu$ l와 ABTS 라디칼 용액 1 ml를 혼합하여 30°C에서 1분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(Re et al., 1999). 수산화 라디칼 제거능 측정을 위하여 배양 상등액 200  $\mu$ l에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 ml와 10 mM  $H_2O_2$ , 10 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 mM  $Na_2$ -EDTA, 10 mM 2-deoxyribose를 각각 200  $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다.

Trichloroacetic acid 1 ml를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(Halliwell et al., 1987). Nitric oxide 제거능은 배양 상등액 500  $\mu$ l에 10 mM sodium nitroprusside 500  $\mu$ l, sulfanilamide 용액 500  $\mu$ l 및 N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 용액 500  $\mu$ l를 연속적으로 첨가하여 25°C에서 각각 150분, 10분 및 10분간 반응시킨 후, 546 nm에서 흡광도를 측정하였다(Marocci et al., 1994). 금속 킬레이트능은 배양 상등액

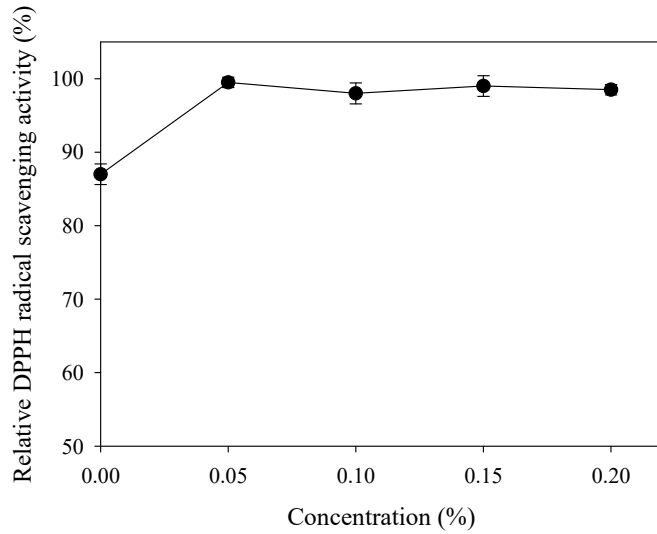


Fig. 4. Influence of Tween 80 concentration on DPPH radical scavenging activity of *L. plantarum* K-21.

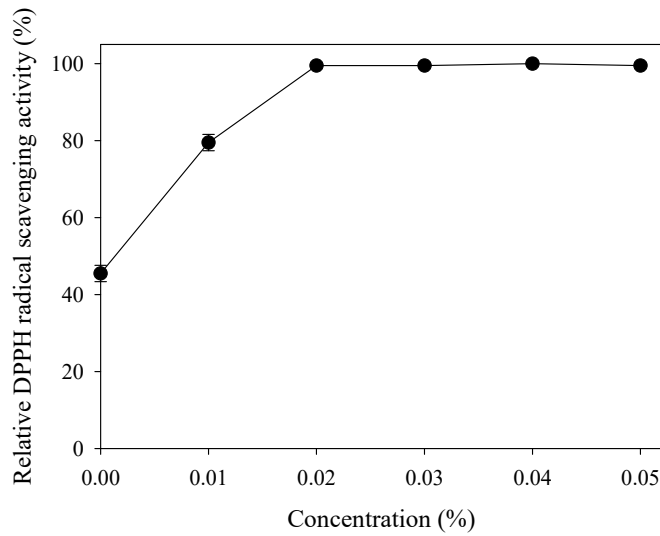


Fig. 5. Influence of L-cysteine concentration on DPPH radical scavenging activity of *L. plantarum* K-21.

1 ml와 5 mM ferrozine 200  $\mu$ l, 2 mM  $FeCl_2$  100  $\mu$ l를 혼합하여 30  $^{\circ}C$ 에서 10분간 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다(Dinis et al., 1994). SOD 유사 활성은 배양 상등액 200  $\mu$ l와 7.2 mM pyrogallol 200  $\mu$ l, 50 mM Tris-HCl 3 ml를 혼합하여 25 $^{\circ}C$ 에서 10분간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Marklund and Marklund, 1974). 환원력을 측정하기

위하여 배양 상등액 250  $\mu$ l에 1% potassium ferricyanide와 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6)를 각각 250  $\mu$ l씩 첨가하여 50 $^{\circ}C$ 에서 20분동안 반응시켰다. 반응 상등액 250  $\mu$ l에 0.1% ferric chloride 50  $\mu$ l와 증류수 250  $\mu$ l를 첨가하여 30 $^{\circ}C$ 에서 10분간 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(Oyaizu, 1986). 상기의 모든 라디칼 제거능 및 항산화능은 실험

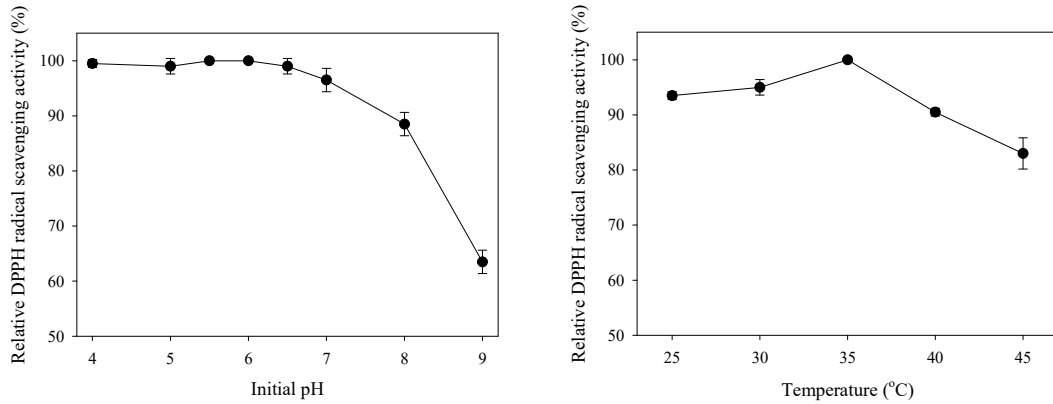


Fig. 6. Influence of initial pH (A) and temperature (B) on DPPH radical scavenging activity of *L. plantarum* K-21.

구와 대조구(배양 상등액 대신 3차 증류수를 첨가)간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하였다.

세포 생육도는 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 세 번 반복하였으며, 그 결과는 평균값±표준편차로 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. DPPH 라디칼 제거능을 위한 환경요인 최적화

미생물이 생산하는 다양한 생리활성은 배지의 종류와 그 성분에 크게 좌우되는 것이 보편적이다(Vyas et al., 2014). 지금까지 젯산균의 DPPH 라디칼 제거 활성은 주로 MRS broth를 대상으로 조사되었으며(Kullisaar et al., 2002; Li et al., 2012; Chooruk et al., 2017; Kim et al., 2020), 배지 성분이 라디칼 제거 활성에 미치는 영향을 검토한 보고는 거의 찾아볼 수 없다.

먼저 실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 배지의 종류가 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 실험에 사용된 모든 배지는 실험균주의 분리에 사용되었던 MRS broth보다 높은 라디칼 제거능을 보여주었으며, 그 중 TYL broth에서 가장 높은 제거능을 나타내었다. TYL broth에는 배지의 산화화원전위를 감소시키는 L-cysteine이 함유되어 있다. 따라서 내기성 세균(aerotolerant bacteria)인 *L. plantarum* K-21은 산소가 제한된 조건에서 대사를 원활하게 수행할 수 있기에 TYL broth에서 가장 높은 라디칼 제거능을 나타낸 것으로 판단된다(Pedersen et al., 2012). 따라서 TYL broth를 기본배지로 선정할 후, 배지성분

및 배양조건이 라디칼 제거능에 미치는 영향을 조사하였다.

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 탄소원이 미치는 영향을 검토하기 위하여 다양한 탄소원(0.5%)을 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가하지 않은 대조구에서도  $90.9 \pm 1.4\%$ 의 DPPH 라디칼 제거능이 나타나 탄소원은 라디칼 제거를 위한 향산화물질의 생산에 반드시 필요한 것이 아님을 알 수 있었다. Xylose를 첨가한 실험구에서는 DPPH 라디칼 제거능이 나타나지 않았으며, 대조구보다 높은 라디칼 제거능은 glucose ( $100 \pm 1.2\%$ )와 lactose ( $96.1 \pm 2.6\%$ )에서 나타났다. 일반적으로 *L. plantarum*은 xylose를 탄소원으로 이용할 수 없는 것(Gubelt et al., 2020)로 알려져 있으므로 DPPH 라디칼 제거능이 검출되지 않은 것으로 판단된다. 최적 탄소원인 glucose의 농도가 DPPH 라디칼 제거능에 미치는 영향을 검토한 결과, 2%까지 농도 증가에 따라 제거효율이 증가하다가 그 이상의 영역에서 감소하는 전형적인 inhibition type을 나타내었다(Fig. 2). 젯산균의 DPPH 라디칼 제거에 최적인 배지 성분에 대한 연구는 찾아볼 수 없다. 따라서 직접적인 비교가 어려움에도 불구하고 다른 세균의 DPPH 라디칼 제거능에 대한 결과를 살펴보면, *Bacillus methylotrophicus*는 sucrose (Lee et al., 2013), *Bacillus polyfermenticus*는 fructose (Lee et al., 2009), *Bacillus* sp. FF-7는 galactose (Cha et al., 2003)에서 최고의 DPPH 라디칼 제거능을 나타내었다. 따라서 DPPH 라디칼 제거능에 영향을 미치는 탄소원은 strain-specific함을 알 수 있었다.

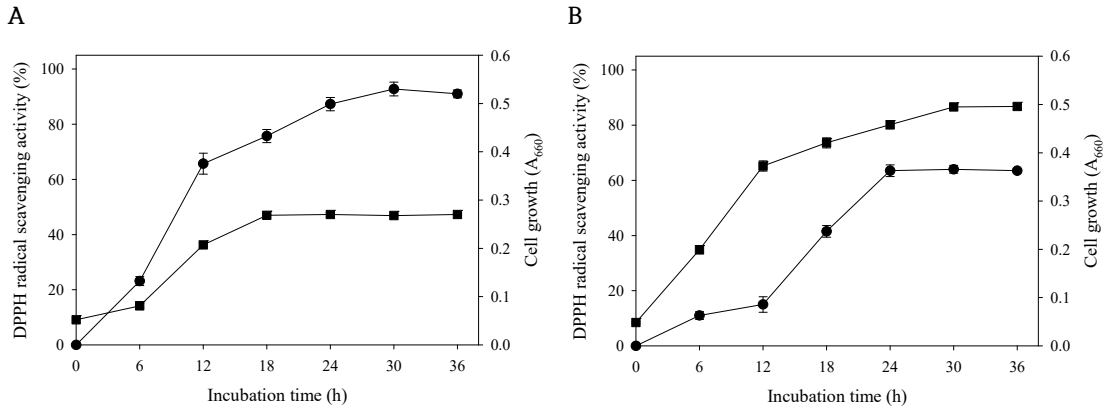


Fig. 7. Time curves of DPPH radical scavenging activity and cell growth in optimized (A) and basic (B) media. ●, DPPH radical scavenging activity; ■, cell growth.

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 질소원이 미치는 영향을 검토하기 위하여 다양한 탄소원(1.5%)을 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 질소원은 DPPH 라디칼 제거를 위한 항산화물질의 생산을 효과적으로 향상시킬 수 있음을 알 수 있었으며, beef extract, malt extract, skim milk를 제외한 질소원은 90% 이상의 높은 라디칼 제거능을 나타내었다. 그중 DPPH 라디칼 제거능이 가장 높았던 bactopectone의 라디칼 제거능에 미치는 영향을 검토한 결과, 0.5%까지 농도 증가에 따라 제거효율이 증가하다가 그 이상의 영역에서 일정해지는 전형적인 activation type을 나타내었다(Fig. 3). 한편, *Bacillus* sp. FF-7과 *B. polyfermenticus*는 tryptone에서 최적 DPPH 라디칼 제거능을 보인 반면(Cha et al., 2003; Lee et al., 2009), *B. methylotrophicus*는 bactopectone (Lee et al., 2013)에서 가장 높은 라디칼 제거능을 나타내었다고 보고되어 본 실험결과와 비슷하였다.

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 Tween 80의 농도가 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Tween 80을 첨가하지 않은 대조구에서  $86.2 \pm 1.8\%$ 의 높은 DPPH 라디칼 제거능을 보여주었으나 0.05% 이상의 농도 영역에서 일정하지만 더 높은 라디칼 제거능을 나타내었다. Tween 80은 비이온성 계면활성제의 일종으로, 0.5% 이상의 농도에서 미생물의 막 단백질을 손상시켜 생육을 저해한다. 그러나 0.05-0.1% 범위에서 젖산균 및 반추위 미생물의 생육과 각종 생리활성물질의 세포외 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다

(Lee et al., 2007; Chang et al., 2015).

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 L-cysteine 농도가 미치는 영향을 검토한 결과, 무첨가 대조구에서  $45.4 \pm 0.8\%$ 의 라디칼 제거능을 보여주었으며, 0.01%까지 농도 증가에 따라 제거효율이 증가하다가 그 이상의 영역에서 일정하였다. 앞에서 서술한 바와 같이 L-cysteine은 배지의 산화환원전위를 감소시킴으로써 젖산균의 대사를 원활하게 진행시킬 뿐만 아니라 *Lactobacillus* 등의 젖산균과 *Bifidobacterium* sp.의 생육과 우유의 젖산발효에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Kim et al., 1992; Song et al., 2002).

실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 배지의 초기 pH가 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 6A에 나타내었다. 초기 pH 4-6.5의 영역에서 DPPH 라디칼 제거능이 가장 높았고, 일정하였다. 그러나 중성 영역에서 DPPH 라디칼 제거효율이 감소하기 시작하여 알칼리성 영역에서 아주 급격하게 낮아졌다. 실험균주의 DPPH 라디칼 제거능에 배양온도가 미치는 영향을 검토한 결과, 25-45°C 영역에서 80% 이상의 라디칼 제거능을 보여주었으며, 그중 35°C에서 가장 높았다(Fig. 6B). 본 저자들이 파악한 바에 의하여, 배지 성분과 마찬가지로 pH, 배양온도 등 배양조건이 젖산균의 DPPH 라디칼 제거 활성에 미치는 영향은 보고되지 않았다. 그러나 젖산균의 세포 생육과 항산화력이 있는 exopolysaccharide (EPS) 생산에 미치는 일부 배양조건의 영향은 소수가 보고되었다. *L. plantarum* KC21은 pH 6 및 37°C에서 가장 높은 세포 생육을 보였으며

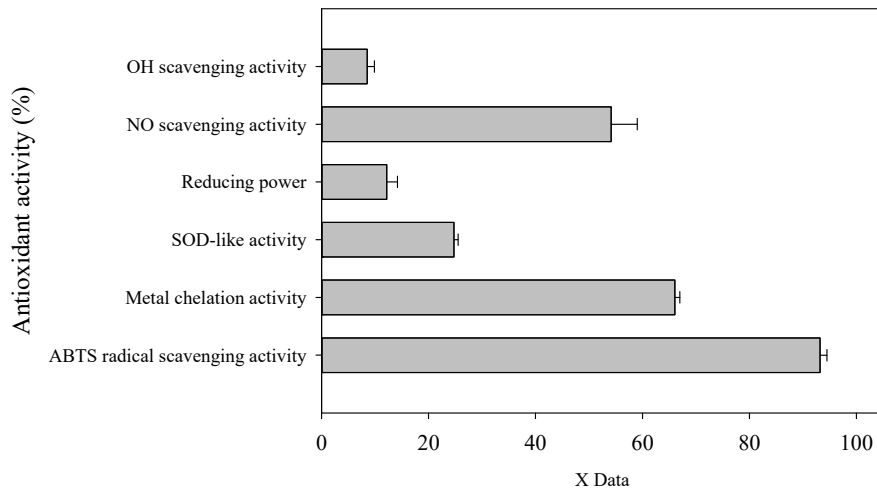


Fig. 8. Various antioxidant activities of *L. plantarum* K-21 cultivated in an optimized medium.

(Lee, 2010), *L. plantarum* SP8은 DPPH 라디칼 제거 능이 있는 EPS를 35.6°C에서 가장 많이 생성하였다 (Zhang et al., 2020).

### 3.2. 최적조건에서 시간에 따른 DPPH 라디칼 제거활성

이상의 실험을 통하여 확립된 DPPH 라디칼 제거를 위한 최적조건은 glucose 2%, bactopectone 0.5%, Tween 80 0.05%, L-cysteine 0.05%, pH 6.5 및 35°C 이었다. 최적배지와 기본배지에 실험균주를 접종하여 배양하면서 배양시간에 따른 DPPH 라디칼 제거능과 세포 생육을 비교한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 최적 배지 및 기본배지에서 세포 생육은 각각 배양 18시간 및 30시간 경에 정지기에 돌입했다. 최적배지의 경우, 정지기 이후에도 DPPH 라디칼 제거능은 계속 증가하여 30시간에 94.8±2.2%의 라디칼 제거효율은 나타내었다. 반면, 기본배지에서는 배양 24시간에 최대 61.1±2.1%의 DPPH 라디칼 제거효율을 보여주었다. 따라서 본 연구를 통해 수행된 최적화 실험에 의하여 실험균주의 DPPH 라디칼 제거능은 기본배지 대비 1.5배 이상 향상되었음을 알 수 있었다. 중국 전통발효식품에서 분리된 *L. plantarum* C88은 MRS broth에서 54% (Li et al., 2012), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* 및 *Lactobacillus rhamnosus*는 > 60% (Chooruk et al., 2017)의 DPPH 라디칼 제거능을 나타낸다고 보고되었다. 따라서 본 실험균주인 *L.*

*plantarum* K-21의 DPPH 라디칼 제거능이 훨씬 우수함을 알 수 있었다.

### 3.3. 실험균주의 다양한 라디칼 제거 및 항산화 활성

실험균주를 상기의 최적조건에서 DPPH 라디칼 제거능이 가장 높았던 30시간동안 배양한 후, 배양액의 다양한 라디칼 제거능 및 항산화능을 검토하였다. Fig. 8에서 나타낸 바와 같이 ABTS 라디칼 제거능은 93.6±1.5%로 DPPH 라디칼 제거능과 비슷한 제거효율을 보였으나 수산화 라디칼 제거능은 8.5±0.9%로 아주 낮았다. 금속 킬레이트 활성 및 NO 제거능은 각각 65.9±0.5% 및 53.1±19%로 비교적 높았으나 SOD 유사활성 및 환원력은 각각 25.1±1.5% 및 11.7±1.4%로 활성이 낮았다. 한편, *L. plantarum* C88 및 *L. paracasei* DKGF1은 MRS broth에서 각각 44.3% 및 60%의 수산화 라디칼 제거능을 나타내었으며, *L. paracasei* DKGF1은 약 40%의 ABTS 라디칼 제거능을 나타내어 향후 항산화능이 우수한 생균제로서 유용할 것이라고 보고되었다(Kim et al., 2020; Li et al., 2012). 수산화 라디칼은 모든 형태의 활성산소 중에서 가장 산화활성이 강하다. 수산화 라디칼의 세포내 주요 공급원은 이온화 방사선으로, 대부분의 세포들은 여기에 거의 노출되지 않으므로 수산화 라디칼은 세포에서 일시적으로만 나타난다(Brock et al., 2003).



#### 4. 결 론

젖산균은 오랜 세월동안 산업적으로 이용되어 온 중요한 세균의 하나로서, 유제품과 육제품뿐 만 아니라 우리나라의 김치와 젓갈 등 자연발효식품에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 대표적인 생균제이다. 젖산균의 라디칼 제거능 검출에 대한 연구는 많지만 제거능 향상을 위한 환경요인에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 한국 전통 발효식품인 김치에서 분리된 항고혈압 및 라디칼 제거 활성을 가진 *L. plantarum* K-21의 DPPH 라디칼 제거 활성에 영향을 미치는 환경요인과 다양한 항산화 활성을 조사하였다. DPPH 라디칼 제거를 위한 최적배지 조성은 glucose 2%, bactopectone 0.5%, Tween 80 0.05%, L-cysteine 0.05%이었으며, 최적 배양조건은 pH 6.5 및 35°C이었다. 최적조건에서 DPPH 라디칼 제거능은  $94.8 \pm 2.2\%$ 로, 기본배지보다 1.5배 증가되었다. 또한, 최적조건에서 ABTS 및 수산화 라디칼의 제거능은 각각  $93.6 \pm 1.5\%$  및  $8.5 \pm 0.9\%$ 이었으며, 금속 킬레이트 활성은  $65.9 \pm 0.5\%$ , NO 제거능은  $53.1 \pm 19\%$ , SOD 유사활성은  $25.1 \pm 1.5\%$ , 환원력은  $11.7 \pm 1.4\%$ 이었다. 따라서 *L. plantarum* K-21는 기능성이 향상된 젓산발효 식품을 위한 종균으로서의 역할뿐 만 아니라 산화적 스트레스에 의해 초래되는 다양한 질병을 위한 의약품으로서의 역할도 기대된다.

#### REFERENCES

- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, Bhalla, T. C., 2016, Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh, LWT, 66, 428-435.
- Aruoma, O. I., 1994, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, Food Chem. Toxicol., 32, 671-754.
- Blois, M. S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181, 1199-1200.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2003, Brock biology of microorganisms, Upper Saddle River (NJ), Prentice-Hall, New Jersey.
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Jun, B. S., Park, J. C., Ok, M., Cho, Y. S., 2003, Antioxidative activity and produced condition of antioxidative substance by *Bacillus* sp. FF-7, J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 46, 165-170.
- Chang, B. Y., Han, J. H., Kim, J. H., Cha, B. S., Ann, S. H., Kim, S. Y., 2015, Application of a *Undaria pinnatifida* for industrial cultivation of *Lactobacillus*, Kor. J. Food Preserv., 22, 251-255.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K., 1998, Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein, J. Agric. Food Chem., 46, 49-53.
- Chiang, S. S., Pan, T. M., 2012, Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products, Appl. Microbiol. Biotechnol., 93, 903-916.
- Chooruk, A., Piwat, S., Teanpaisan, R., 2017, Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains, J. Appl. Microbiol., 123, 271-279.
- Demple, B., Hidalgo, E., Ding, H., 1999, Transcriptional regulation via redox-sensitive iron-sulphur centres in an oxidative stress response, Biochem. Soc. Symp., 64, 119-128.
- Figuroa-González, I., Cruz-Guerrero, A., Quijano, G., 2011, The benefits of probiotics on human health, J. Microbial. Biochem. Technol. S1, 1948-5948.
- Frlich, I., Riederer, P., 1995, Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidant treatment, Drug Res., 45, 443-449.
- Fuller, R., 1991, Probiotics in human medicine, Gut, 32, 439-451.
- GöktürkBaydar, Ö. G., Yasar, S., 2007, Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts, Food Control, 18, 1131-1136.
- Gubelt, A., Blaschke, L., Hahn, T., Rupp, S., Hirth, T., Zibek, S., 2020, Comparison of different Lactobacilli regarding substrate utilization and their tolerance towards lignocellulose degradation products, Curr. Microbiol., 77, 3136-3146.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I., 1987, The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, Anal. Biochem., 165, 215-219.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., Cross, C., 1992, Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J. Lab. Clin. Med., 119, 598-615.
- Hettiarachy, N. S., Glenn, K. C., Gnanasambandam, R., Johnson, M. G., 1996, Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) for ground beef patties, J. Food Sci., 61, 516-519.
- Kaizu, M., Sasaki, M., Nakajima, H., Suzuki, Y., 1993, Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E, J. Dairy Sci., 76, 2493-2499.

- Kim, D. Y., Kim, H. S., Yoo, J. S., Cho, Y. A., Kim, C. H., 2020, Antioxidant activity of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional food Kimchi, Dairy Sci. Biotechnol., 38, 89-97.
- Kim, G. Y., Park, J. I., Kwon, I. K., Ahn, J. K., Goh, J. S., 1992, Stimulated fermentation of ultrafiltration retentate of milk by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, Kor. J. Dairy Sci., 14, 148-158.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002, Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics, Int. J. Food Microbiol., 72, 215-224.
- Lee, J. H., Chae, M. S., Choi, G. H., Lee, N. K., Paik, H. D., 2009, Optimization of medium composition for production of the antioxidant substances by *Bacillus polyfermenticus* SCD using response surface methodology, Food Sci. Biotechnol., 13, 959-964.
- Lee, N. R., Woo, G. Y., Jang, J. H., Lee, S. M., Go, T. H., Lee, H. S., Hwang, D. Y., Son, H. J., 2013, Antioxidant production by *Bacillus methylotrophicus* isolated from Chungkookjang, Korean traditional fermented food, J. Environ. Sci. Int., 22, 855-862.
- Lee, S. J., Kim, W. Y., Moon, Y. H., Kim, H. S., Kim, K. H., Ha, J. K., Lee, S. S., 2007, Effects of non-ionic surfactant Tween 80 on the *in vitro* gas production, dry matter digestibility, enzyme activity and microbial growth rate by rumen mixed microorganisms, J. Life. Sci., 17, 1660-1668.
- Lee, S. M., 2010, Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21, Food Sci. Biotechnol., 19, 793-802.
- 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.
- Luo, D., Fang, B., 2008, Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities, Carbohydr. Polym., 72, 376-381.
- Marcocci, L., Maguire, J. J., Droylefaix, M. T., Packer, L., 1994, The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761, Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 748-755.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, Eur. J. Biochem., 47, 469-474.
- Oyaizu, M., 1986, Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine, Jpn. J. Nutr., 44, 307-315.
- Park, S. B., Kim, J. D., Lee, N. R., Jeong, J. H., Jeong, S. Y., Lee, H. S., Hwang, D. Y., Lee, J. S., Son, H. J., 2011, Isolation and characterization of lactic acid bacteria with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities, J. Life Sci., 21, 1428-1433.
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. A., Gruss, A., 2012, Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology, Annu. Rev. Food Sci. Technol., 3, 37-58.
- Pena-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., Arteaga, G. E., 2004, Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein, J. Sci. Food Agric., 84, 1908-1918.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biol. Med., 26, 1231-1237.
- Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., Wink, D. A., 2005, Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102, 13147-13152.
- Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y., Gorbach, S. L., 1998, Lactic acid bacteria in health and disease, Marcel Dekker, New York.
- Shehata, M. G., Abu-Serie, M. M., El-Aziz, M. A., El-Sohaimy, S. A., 2019, In vitro assessment of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of lactic acid bacteria, Int. J. Pharmacol., 15, 651-663.
- Song, S. U., Kim, T. B., Ji, G. E., Oh, H. I., Oh, D. K., 2002, High density cell culture of *Bifidobacterium* by optimization of medium composition and culture conditions, Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 30, 63-67.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007, 39, 44-84.
- Vyas, P., Rahi, P., Chadh, B. S., Gulati, A., 2014, Statistical optimization of medium components for mass production of plant growth-promoting microbial inoculant *Pseudomonas trivialis* BIHB 745 (MTCC5336), Ind. J. Microbiol., 54, 239-241.
- Wang, L., Xiong, Y. L., 2005, Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability, J. Agric. Food Chem., 53, 9186-9192.

Zhang, L., Zhao, B., Liu, C. J., Yang, E., 2020, Optimization of biosynthesis conditions for the production of exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the exopolysaccharides antioxidant activity test, Ind. Microbiol., 60, 334-345.

- 
- Graduate student. Ye-Rin Kim  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
shvc2966@pusan.ac.kr
  - Undergraduate student. Ye-Dam Kim  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
kyd43888@pusan.ac.kr

- 
- Undergraduate student. Chae-Min Jeon  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
che2237@pusan.ac.kr
  - Graduate student. Gyu-Lim Park  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
alswn940809@pusan.ac.kr
  - Researcher. O-Mi Lee  
Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine  
Agency  
lomi78@korea.kr
  - Professor. Hong-Joo Son  
Department of Life Science and Environmental  
Biochemistry, Pusan National University  
shjoo@pusan.ac.kr