

## 다시마(*Saccharina japonica*)김치에서 분리한 유산균의 항산화 및 콜레스테롤 감소 효과

류대규<sup>1</sup> · 박슬기<sup>2</sup> · 강민균<sup>1</sup> · 정민철<sup>1</sup> · 정희진<sup>1</sup> · 강동민<sup>1</sup> · 이재화<sup>1</sup> · 김영목<sup>1,2</sup> · 이명숙<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품공학과, <sup>2</sup>부경대학교 식품연구소, <sup>3</sup>부경대학교 미생물학과

### Antioxidant and Cholesterol-lowering Effects of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kelp *Saccharina japonica* Kimchi

Dae-Gyu Ryu<sup>1</sup>, Seul-Ki Park<sup>2</sup>, Min-Gyun Kang<sup>1</sup>, Min-Chul Jeong<sup>1</sup>, Hee-Jin Jeong<sup>1</sup>, Dong-Min Kang<sup>1</sup>, Jae-Hwa Lee<sup>1</sup>, Young-Mog Kim<sup>1,2</sup> and Myung-Suk Lee<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>2</sup>Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Previous studies have suggested that microbial fermentation is an attractive process to develop food products using seaweed. The objective of this study was to isolate and characterize lactic acid bacteria (LAB), which are used as starters for seaweed fermentation. The isolation of LAB strains was conducted using kelp *Saccharina japonica kimchi*, a well-known fermented seaweed in southeastern Korea. Based on the assay of acid tolerance, bile tolerance and antioxidant activity, 15 strains of LAB were selected for further study. The LABs exhibited cholesterol lowering activity in the range of 15.50 to 94.77%. Among the LABs suitable for food production, *Lactobacillus plantarum* D-11 had the highest antioxidant and cholesterol lowering activities. This probiotic strain will be applied to develop various kelp fermentation products.

Keywords: Anti-cholesterol activity, Antioxidant activity, Lactic acid bacteria, *Saccharina japonica*

### 서론

다시마(*Saccharina japonica*)는 갈조류에 속하는 해조류로서 섬유소가 풍부하고 다양한 무기질이 함유되어 있다. 또한 해조류는 다양한 생리활성을 가진 물질이 분리되어 각광받고 있는 원료소재이다. 해조류 발효를 이용한 연구에는 다시마 물 추출액과 발효액의 항산화 및 항염증 활성(Jung et al., 2019), 복합 해조류 발효추출물의 항산화, 미백 활성(Kang et al., 2018), 유산균 발효에 의한 톳(*Hizikia fusiforme*) 추출액의 항산화 및 항염증 활성 증가(Song et al., 2011), 유산균 발효 다시마 추출물의 기억력 및 인지능력 개선 기능성 효과(Ryu et al., 2016) 등의 보고한 바와 같이 다양한 원료와 균주 등을 이용하여 다양한 생리활성 등이 보고된 바 있다. 특히, 다시마의 경우 유산균을 이용하여 발효하였을 때  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 등의 생리

활성 물질이 생성되어 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있다. 그러나 다시마 발효를 이용한 연구의 대부분이 GABA 생성 및 GABA 생리활성에 대한 연구에 치우쳐 있어 새로운 다시마 발효 관련 연구가 필요하다(Choi et al., 2012; Kang et al., 2012; Kim et al., 2018). 이에 본 연구에서는 국내 전통 해조류 발효 제품 중의 하나인 다시마김치에서 유산균(lactic acid bacteria, LAB)를 분리하고, 분리된 LAB 균주들로부터 probiotics로서의 가능성 확인 및 항산화능과 콜레스테롤 감소 효과 등의 건강기능성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 다시마김치 제조

부산시 기장군 소재 전통시장에서 다시마를 구매하여 사용하였고 탈염을 위해 30분간 물에 침지 한 후 80°C의 증류수에 10

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5615 Fax: +82. 51. 629. 5619

E-mail address: leems@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0351>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 351-360, June 2020

Received 14 April 2020; Revised 11 May 2020; Accepted 10 June 2020

저자 직위: 류대규(대학원생), 박슬기(연구원), 강민균(대학원생), 정민철(대학원생), 정희진(대학원생), 강동민(대학원생), 이재화(대학원생), 김영목(교수), 이명숙(교수)

분간 침지 시킨 후 상수로 수세하여 원료로 사용하였다. 다시마 김치에 사용된 김치소는 Kim and Kang (2017)의 방법을 변형하여 사용하였으며 그 구성성분은 Table 1과 같다. 탈염 과정을 마치고 세척한 다시마를 절단한 후(5 mm × 10 mm) 절단한 다시마 500 g과 제조한 김치소 152 g을 혼합한 후 플라스틱 용기에 담아 10°C에서 저장하면서 발효를 진행하였다.

### 유산균 분리 및 동정

발효된 다시마김치로부터 LAB 분리하기 위하여 제조한 다시마김치에서 총 3회 시료를 채취하였다. 시료 채취는 다시마김치 제조 직후, 발효 1개월 및 발효 2개월차에 수행하였다. 채취된 다시마김치 시료로부터 유산균을 분리하기 위해 다시마김치 25 g과 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) 225 mL로 10배 희석하여 스토마커(Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France)로 3분간 균질화한 후 bromocresol purple (BCP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0.002% (w/v) 첨가한 deMan Rogosa Sharpe (MRS; Difco, Detroit, MI, USA) 평판 배지에 도말 후 37°C에서 24시간에서 48시간까지 배양하였다. 단일 집락의 주위가 노란색으로 변한 것을 산을 생성하는 유산균이라 판단하여 분리하였다. 분리균주와 비교분석을 위해 Korean collection for type cultures (KCTC; Daejeon, Korea)에서 분양 받은 표준균주 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033을 양성 대조구로 시험에 사용하였다.

다시마김치로부터 분리된 LAB 균주는 MRS broth에서 24시간 배양 후 genomic DNA (Chelex bead; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 추출한 후 27F와 1492R primer (sense: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; antisense: 5' GGT-TACCTG TTACGACTT 3')를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 염기서열 분석은 바이오닉스(Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, national center for biotechnology information의 database 자료(BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)와 비교하여 동정하였다.

Table 1. Composition of kelp *Saccharina japonica* Kimchi preparation

Ingredient	Weight (g)
Kelp <i>Saccharina japonica</i>	500.0
Red pepper powder	25.0
Crushed garlic	12.5
Crushed ginger	2.5
Salted anchovy juice	15.0
Salted shrimp juice	15.0
Radish	50.0
Green onion	12.5
Sugar	2.5

### 내산성 및 내담즙성 측정

분리한 LAB의 내산성 측정은 Clark et al. (1993)의 방법을 변형하여 진행하였다. HCl (Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea)을 이용하여 pH 2.0, 3.0 및 6.4로 조정된 0.1 M PBS 10 mL에 분리균주를 10<sup>8</sup> CFU/mL 되게 접종하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 배양한 각 균주를 PBS로 단계별로 희석하여 MRS agar 사용하여 주입평판법으로 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 계수하여 내산성을 확인하였다. 내담즙성 측정은 Gilliland and Walker (1990)의 방법을 변형하여 진행하였다. 0.3% oxgall (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 포함한 MRS broth 10 mL에 분리균주를 10<sup>8</sup> CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 7시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 반응액을 PBS를 이용하여 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 주입평판법으로 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 계수하여 내담즙성을 확인하였다.

### DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거 활성은 Brand et al. (1995)의 방법을 변형하여 분석하였다. 분리한 LAB는 37°C에서 24시간 배양한 뒤 원심분리(10,000 g, 15 min, 4°C)하여 얻어진 상등액을 0.2 µm cellulose acetate hydrophilic filters (Advantec; Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 여과한 시료를 사용하였다. 시료 0.5 mL에 0.15 mM의 DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)용액 1 mL을 첨가 후 혼합하여 30분간 상온의 암실에서 반응시켜 상등액 200 µL를 취해 96 well plate에 분주하여 GENios® microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 통해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로 시료와 동량의 증류수, 양성 대조구로 0.2 mM의 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 DPPH radical 소거 활성은 아래의 식으로 계산하였다.

Radical scavenging activity (%) =

$$\frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

### ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성은 Roberta et al. (1999)의 방법을 변형하여 분석하였다. 분석 시료인 LAB 무균 배양액은 DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 것과 같은 방법으로 준비하였다. 2.4 mM potassium persulfate를 포함하는 7 mM의 ABTS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 제조한 후 암실에서 16시간 보관하고, 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.005

가 되도록 희석하여 사용하였다. ABTS 용액 1 mL와 LAB 무균 배양액 10 µL를 혼합하여 6분간 상온의 암실에서 반응 후 상등액 200 µL를 취해 96 well plate에 분주하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로 시료와 동량의 증류수, 양성 대조구로 5 mM의 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 ABTS radical 소거 활성은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

### Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

ORAC 측정은 Zulueta et al. (2009)의 방법에 따라 분석하였다. 분석 시료인 LAB 무균 배양액을 100배 희석하여 시험에 사용하였다. 96 black well plate에 시료 50 µL와 78 nM fluorescein 50 µL를 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 25 µL의 221 mM의 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 반응시켰다. 반응용액에서 형광물질의 감소 정도를 37°C에서 485 nm에서 전자가 여기 되고, 535 nm에서 방출되게 조절하여 60분동안 5분에 한번씩 측정하였다. 표준물질로는 trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 농도를 0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 µM로 하여 표준곡선을 작성하여 trolox equivalents (µM TE/50 µL)로 나타내었다.

### Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

FRAP 측정은 Benzie and Strain (1996)의 방법에 따라 분석하였다. FRAP 용액은 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)과 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution, 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 실험 직전에 제조하여 사용하였다. 시료 10 µL에 FRAP 용액 190 µL를 96 well plate에 넣고 30분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준 물질로 하여 ascorbic acid equivalents (µM AE/mg)로 나타내었다.

### 콜레스테롤 감소 활성 측정

분리균주의 콜레스테롤 감소능을 확인하기 위해서 Rudel and Morris (1973)의 방법을 일부 변형한 ortho-phthalaldehyde 정색반응을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 0.3% oxgall을 첨가한 MRS broth에 water-soluble cholesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 각각 0.0, 0.125, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 해당하는 농도로 준비하여 550 nm에서 흡광도를 측정하

여 표준곡선을 작성하였다. 분리한 LAB를 0.3% oxgall (w/v)과 water-soluble cholesterol (0.1 g/L)이 포함된 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 원심분리(10,000 g, 15 min, 4°C)하여 얻어진 상등액을 0.2 µm cellulose acetate hydrophilic filters (Advantec; Toyo, Tokyo, Japan)을 이용하여 여과한 무균 용액 1 mL에 2 mL의 50% KOH (w/v)와 3 mL의 95% ethanol (v/v)을 첨가한 후 1분간 혼합하고 60°C의 항온수조에서 10분간 방치하였다. 이후 흐르는 물로 시료를 냉각시키고 5 mL의 n-hexane을 첨가하여 혼합하였다. 그리고 1 mL의 증류수를 첨가하여 혼합 후 10분간 방치하였다. 분리된 상층의 hexane층 3 mL를 유리 시험관에 옮긴 후 60°C의 항온수조 상에서 질소가스로 농축하였다. 농축시킨 시료에 4 mL ortho-phthalaldehyde 반응액(0.5 mg ortho-phthalaldehyde/glacial acetate in 1 mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 혼합 후 상온에서 10분간 방치한 다음 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하여 섞어주고, 10분 후 상등액 200 µL를 96 well plate에 넣고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계분석

본 연구에서 실시한 모든 실험 측정은 3회 반복하였으며, 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 수행한 후, P<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS (v.23.0, SPSS Inc., USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

### 결론 및 고찰

#### 다시마김치에서 유산균의 분리 및 동정

본 연구에서 제조한 다시마김치로부터 분리한 유산균주는 총 15종이며 Table 2에 나타내었다. 15종의 LAB는 16S rRNA gene의 염기서열을 분석한 결과, *Lactobacillus plantarum* 6종, *Lactobacillus alimentarius* 1종, *Lactobacillus paraplantarum* 2종, *Lactobacillus brevis* 3종, *Pediococcus acidilactici* 1종, *Pediococcus pentosaceus* 1종 및 *Weissella halotolerans* 1종으로 나타났다.

Kwon et al. (2002)은 김치에는 30종 이상의 유산균종이 있으며 그 중 우점종으로는 *L. plantarum*, *L. brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*으로 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 이와 유사한 LAB가 분리 되었음을 확인하였다. 국내 건강기능식품에 probiotics로 사용할 수 있는 균주로는 *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. 및 *Bifidobacterium* sp.에서 총 19종의 세균이 건강기능식품 기능성원료 인정 현황에 등록되어 있으며, 본 연구에서 분리한 15종의 LAB중 9종이 probiotics로 분류되는 LAB로 확인되었다(Korea Food Standards Codex, 2019).

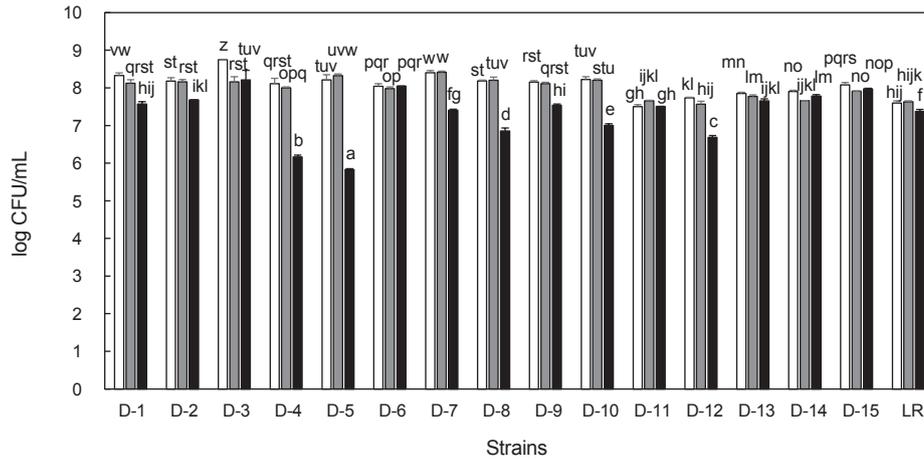


Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica Kimchi* in 0.1 M phosphate buffer saline adjusted to pH 6.5 (□), 3.0 (■) and 2.0 (■). LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at P<0.05.

다시마김치에서 분리된 유산균주의 내산성

LAB가 probiotics로 사용하기 위해서는 위장내 환경인 pH 3.0 이하의 산성조건에서 생존할 수 있어야 한다고 보고되어 있으나, 대부분의 미생물은 위액의 낮은 pH 1.4-2.0에서 사멸 또는 활성 저하가 나타난다(Mcdonald et al., 1990; Ouwehand et al., 1999). 본 연구에서는 분리된 LAB 균주들의 pH 2.0, 3.0 및 6.4로 조정된 PBS에서의 내산성 결과를 Fig. 1에 나타냈다.

대조균으로 사용한 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 pH 6.4에서 7.60 log CFU/mL, pH 3.0에서 7.63 log CFU/mL, pH 2.0에서 7.38 log CFU/mL로 우수한 내산성을 가진 것으로 나타났다. 분리한 LAB 대부분이 pH 3.0에서는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으나 pH 2.0에서는 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 분리한 LAB 중에서도 LAB D-06, 11 및 15의 경우 pH 에 따른 큰 영향을 미치지 않고, 생존율이 높은 것으로 분석되었다. Radulović et al. (2017)의 연구에 따르면 유산균의 내산성

Table 2. Identification of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica Kimchi* based on 16S rRNA analysis

Strains.	Source	Subject	Length	Bit	Identities (%)
LAB D-1		<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149 16S ribosomal RNA gene	1436	2647	99
LAB D-2		<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 10315116S ribosomal RNA gene	1420	2614	99
LAB D-3		<i>Lactobacillus alimentarius</i> DSM 20249 16S ribosomal RNA gene	1436	2610	99
LAB D-4		<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667 16S ribosomal RNA gene	1440	2654	99
LAB D-5		<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene	1439	2630	99
LAB D-6		<i>Weissella halotolerans</i> NRIC 1627 16S ribosomal RNA gene	1425	2627	99
LAB D-7		<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene	1437	2636	99
LAB D-8	Kelp Kimchi	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149 16S ribosomal RNA gene	1443	2654	99
LAB D-9		<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151 16S ribosomal RNA gene	1440	2654	99
LAB D-10		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284 16S ribosomal RNA gene	1449	2643	99
LAB D-11		<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149 16S ribosomal RNA gene	1420	2612	99
LAB D-12		<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151 16S ribosomal RNA gene	1438	2645	99
LAB D-13		<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 16S ribosomal RNA gene	1450	2656	99
LAB D-14		<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667 16S ribosomal RNA gene	1421	2619	99
LAB D-15		<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene	1442	2641	100
LR		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033			

LAB, lactic acid bacteria; LR, *Lactobacillus rhamnosus*.

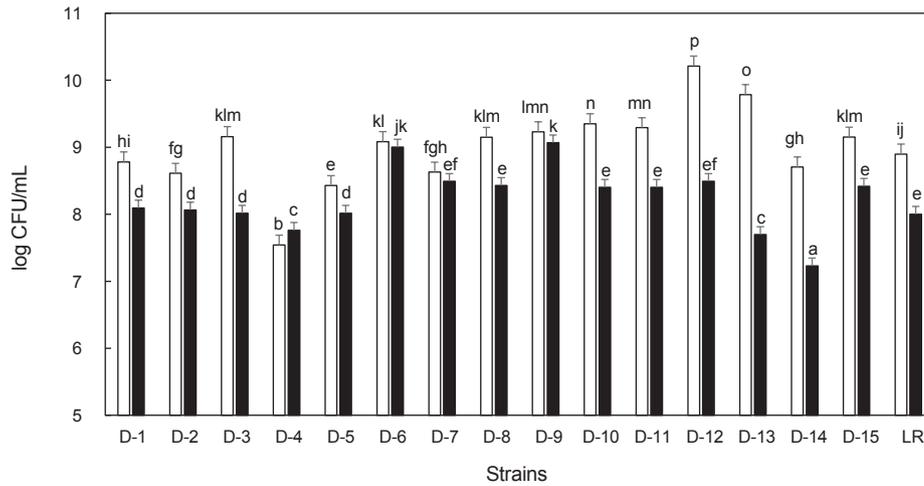


Fig. 2. Bile tolerance of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi in the presence of 0% (□) and 0.3% (■) oxgall. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

은 당분해 과정 흐름의 변화, 세포내 pH 조절 능력과 세포막의 ATPase와 관련이 있으며, 식품의 성분에 의해 저항성은 유의하게 증가하는 것으로 보고되었다. Mishra and Prasad (2005)은 probiotics로 사용되는 여러 균주들이 pH 2.0에서  $10^4$  CFU/mL 이하로 생존하고, McDonald et al. (1990)은 *L. plantarum*이 우수한 내산성을 지니고 있다고 보고하였다. 이 외에도 *L. casei* (Gilliland, 1979) 및 *L. brevis* (Jin et al., 1998; Maria et al., 2008)도 높은 내산성을 나타내는 균주라고 보고되어 있다. 본 연구에서 분리한 LAB 균주들은 pH 2.0에서  $10^4$  CFU/mL 이상으로 생존하였으며 특히 LAB D-06, 11 및 15는 우수한 내산성을 나타내었다.

### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 내담즙성

담즙산은 지질로 구성된 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물의 생장을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 유산균들은 담즙산염 가수분해효소를 이용하여 담즙산을 가수분해하고 억제 작용을 감소시키는 것으로 보고되어 있다(Sybesma et al., 2006). 따라서, LAB가 probiotics로써 사용되기 위해서는 소화관 내의 조건에서 생존할 수 있어야 하며, 이를 위해서 담즙에 대한 내성이 요구된다(Saarela et al., 2000). 분리균주의 내담즙성을 확인하기 위해 0.3% oxgall을 첨가한 액체 배지에서 내담즙성 확인 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 분리 균주들중에서 LAB D-04 (*L. paraplantarum*)는 담즙과 같은 환경에 노출되어도 생존수가 증가하는 결과를 나타내어 담즙 내성이 매우 높은 것으로 나타났다. LAB D-06 (*W. halotolerans*), 07 (*L. brevis*) 및 09 (*L. plantarum*)는 양성 대조구(*L. rhamnosus* KCTC 5033)에 비해 인공 담즙에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Fhoula et al. (2018)에 따르면 낙타 장내 및 개미의 위에서 분리한 여러 *W. halotolerans*가 담즙에서 3시간 동안 노출된 경우 생존률이

약 42-96%로 매우 다양한 결과로 나타났다. 또한 Kang et al. (2012)의 보고에 따르면 *L. brevis* KCCM 40399의 내담즙성은 약 48% 생존율을 나타냈으며, Park et al. (2017)의 연구에서 분리한 *L. plantarum*의 내담즙성은 79.9-91.6% 생존율로 나타났다. 한편 다시마김치에서 분리한 LAB D-06, 07 및 09의 내담즙성은 약 90% 이상으로 비교적 높게 나타났다. 또한, Fhoula et al. (2018)이 보고한 것처럼 같은 종에 속하는 LAB 일지라도 분리원에 따라 probiotics로서의 특성이 다소 차이가 있다고 판단된다.

### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 DPPH radical 소거 활성

다시마김치에서 분리한 LAB 배양액의 DPPH radical 소거 활성 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 양성 대조구인 0.2 mM ascorbic acid는 90.7%로 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, LAB 배양액의 DPPH radical 소거 활성의 경우 75.40-83.14%의 범위로 나타났다. 대조구로 사용된 표준균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 DPPH radical 소거 활성은 79.49%로 나타났으며, 대조균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033 보다 높은 소거 활성을 보인 균주는 LAB D-08 (80.85%), 09 (82.82%) 및 10 (83.14%) 균주로 확인되었다. Jung and Kim (2015)의 보고에 따르면 시판 생막걸리에서 분리한 LAB의 DPPH radical 소거 활성의 경우 10.60-32.44%로 확인되었다. 본 연구에서 다시마김치에서 분리한 LAB의 DPPH radical 소거 활성이 75.40-83.14%로 상대적으로 더 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다. Kang et al. (1996)의 연구에 따르면 DPPH radical 소거 활성이 높으면 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높아져 활성산소와 같은 free radical의 소거 작용을 증가시켜 항산화 활성이 증진된다고 보고되었다. 따라서 분리한 LAB

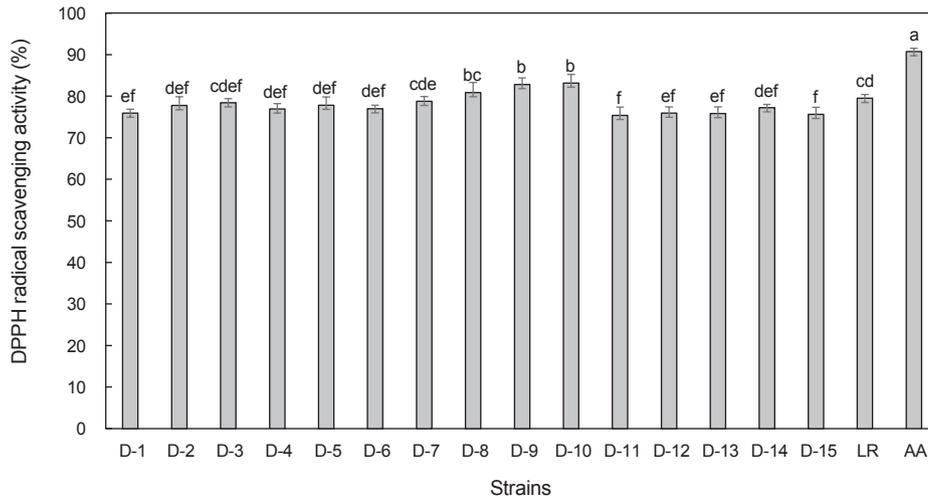


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033; AA, 0.2 mM L-ascorbic acid. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

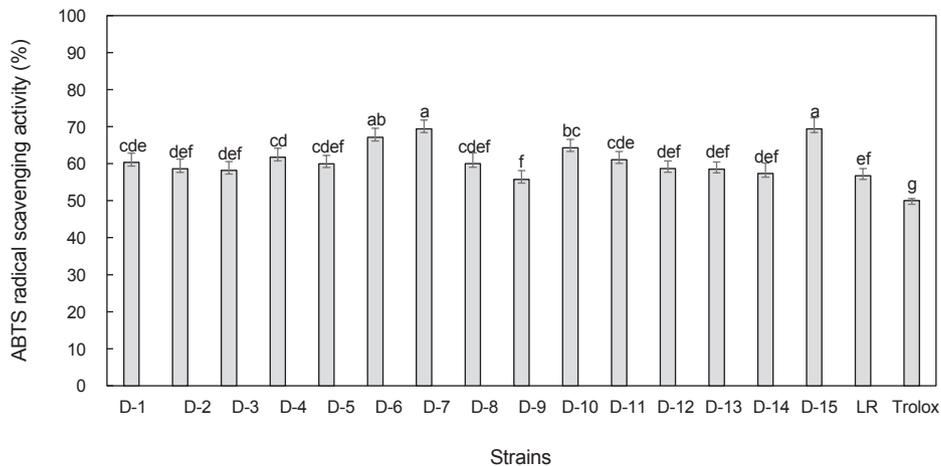


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033; Trolox, 5 mM Trolox. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

중 3종(*L. plantarum* D-08, *L. plantarum* D-09 및 *P. acidilactici* D-10)은 free radical을 환원 및 상쇄시키는 능력이 높다고 판단된다.

#### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 ABTS radical 소거 활성

다시마김치에서 분리한 LAB 배양액의 ABTS radical 소거 활성 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 양성 대조구인 5 mM trolox는 49.30%로 확인 되었으며, LAB 배양액의 ABTS radical 소거 활성은 55.75-69.38%의 범위로 확인 되었다. 대조구로 사용된 표준균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 ABTS radical 소거활성은 56.72%로 다시마김치에서 분리한 모든 LAB는 양성 대조

균주보다 높은 활성을 가진 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리된 *L. plantarum*로 동정된 LAB D-01, 02, 08, 09, 11 및 12 균주의 ABTS radical 소거 활성은 평균적으로 약 60%로 나타났다. Cho and Oh (2010)에 의해 보고된 바에 따르면 김치 및 유아의 분변 등에서 분리된 유산균의 ABTS radical 소거 활성은 약 74%로 본 연구의 결과보다 10% 이상 높게 분석되었으며, Yang et al. (2019)의 연구에 따르면 양배추 김치에서 분리한 *L. plantarum*의 경우 ABTS radical 소거 활성이 약 38%로 본 연구 결과보다 약 20% 이상 낮게 분석되었다. 이를 고려하더라도 본 연구에서 분리된 LAB 균주들의 ABTS 소거 활성이 우수한 것으로 판단된다. 한편, 다시마김치에서 분리한 LAB D-08과 09의 경우 높은 수준의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈지만

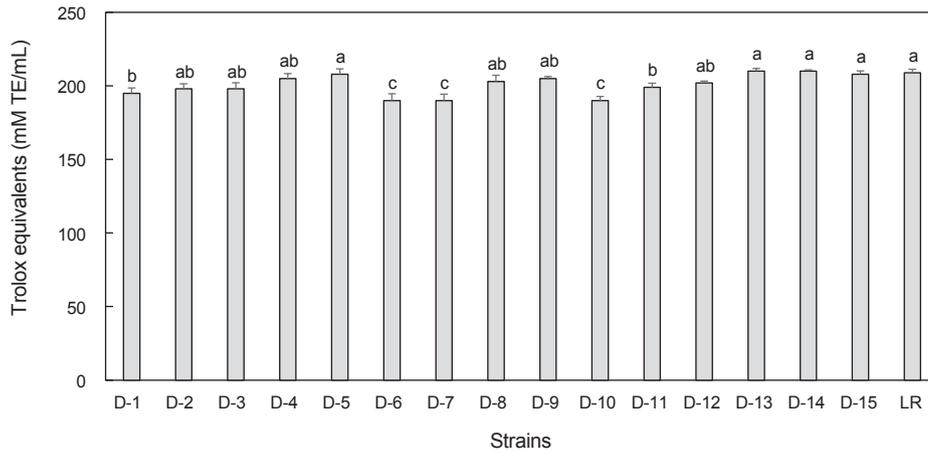


Fig. 5. Oxygen radical antioxidant capacity of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

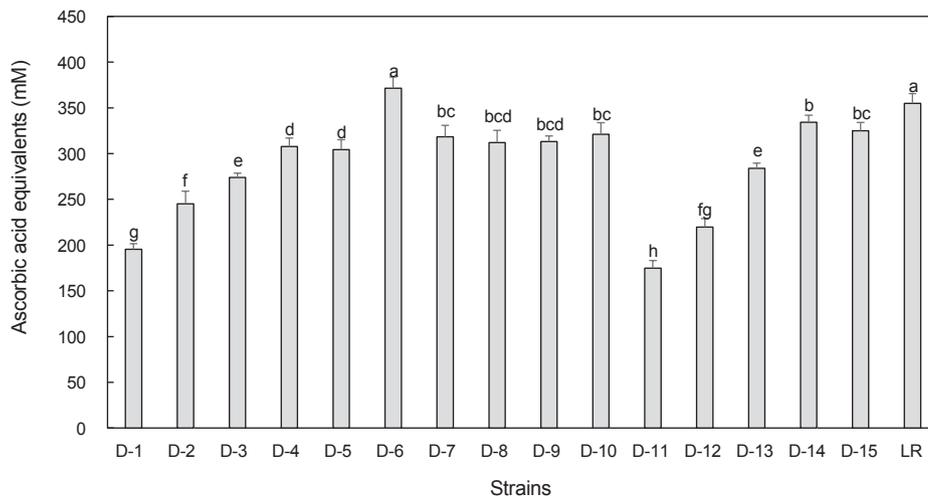


Fig. 6. Ferric reducing antioxidant power of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

ABTS radical 소거 활성은 높지 않았다. 이 같은 결과는 DPPH radical 소거 방법과 ABTS radical 소거 방법의 경우 free radical을 소거한다는 것은 유사하지만 radical 생성 원리가 비슷하더라도 생성된 radical의 입체 선택성과 제거 작용 등의 요소가 다르기 때문이라고 판단된다(Yu et al., 2002).

#### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 ORAC 측정

ORAC은 peroxy radical에 의한 fluorescence 감소를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법으로 시간의 경과에 따라 시료의 ORAC을 측정한다. 다시마김치에서 분리한 LAB 배양액의 ORAC 결과는 Fig. 5에 나타내었으며, LAB 배양액의 ORAC은 193.44-213.65 mM TE/mL의 범위로 나타났다. 대조군으로

사용된 표준균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 212.54 mM TE/mL의 활성을 나타내었으며 본 연구에서 분리된 LAB의 경우 *L. rhamnosus* KCTC 5033과 유사한 ORAC을 나타내어 분리된 LAB 균주들은 모두 우수한 ORAC을 가진 것으로 확인되었다. Yamamoto (2017)은 *L. casei*, *L. sakei*, *L. plantarum* 등의 LAB의 ORAC은 422-572 mmol TE/g인 것으로 보고하였다. 분리 LAB의 ORAC은 분리원 및 종에 따라 약간의 차이가 있지만 그 중 *L. plantarum*에서 422-469 mmol TE/g로 다른 LAB 보다 ORAC이 낮은 것으로 나타났다. 상기의 연구와 본 연구의 분석 방법의 차이로 LAB의 ORAC에 대한 비교분석이 어렵지만, peroxy radical 제거 활성을 측정하는 ORAC 분석은 생체 세포내에서의 항산화 작용과 유사하므로 다시마김치에서

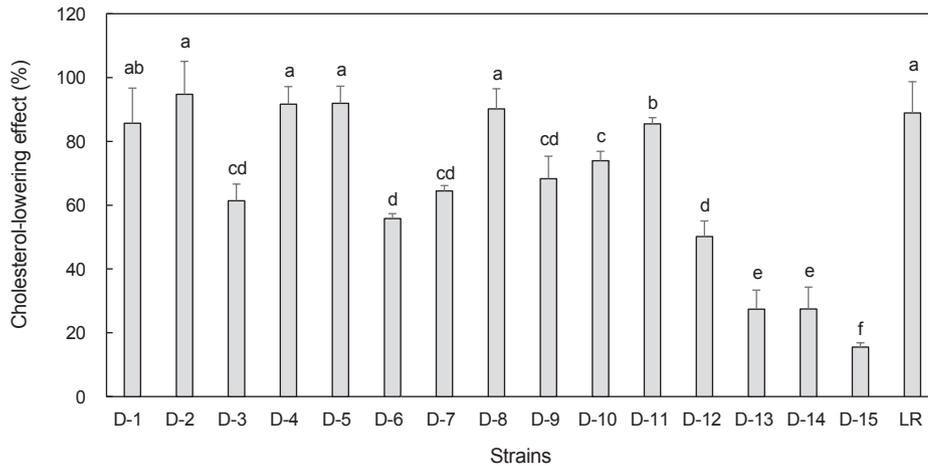


Fig. 7. Cholesterol removal efficacy of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi in MRS broth containing 0.1% cholesterol and 0.3% oxgall. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. MRS, deMan Rogosa Sharpe. Means followed by the same lower-case letter are not significantly different at  $P < 0.05$ .

분리한 LAB는 생체 내에서도 높은 항산화 활성을 나타낼 것으로 기대된다(Huang et al., 2002).

#### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 FRAP 측정

다시마김치에서 분리한 LAB 배양액의 FRAP 측정 결과는 Fig. 6에 나타내었다. LAB 배양액의 FRAP 측정은 174.81-371.46  $\mu\text{M AE/mg}$ 의 범위로 다양하게 나타났으며, 대조구로 사용된 표준균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 354.88  $\mu\text{M AE/mg}$ 의 활성을 가진 것으로 확인되었다. *W. halotolerans* D-06은 분리균주들 중에서 가장 높은 FRAP 측정으로 371.46  $\mu\text{M AE/mg}$ 로 나타났으며 이는 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033 만큼 높은 FRAP을 갖는 것으로 판단된다. Su et al. (2015)도 LAB의 일종인 *Oenococcus oeni*이 36.03-128.66  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$  범위에서 FRAP을 나타낸다고 보고하고 있다. 분석 방법의 차이로 본 연구결과와 비교 분석이 어렵지만, ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ)으로 환원되는 활성을 측정하는 FRAP을 고려하였을 때 다시마김치에서 분리한 LAB는 생체 내에서도 높은 항산화 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

Lonkar et al. (2005)의 보고에 따르면 LAB는 활성산소 및 free radical로부터 보호할 수 있는 항산화 활성을 나타내며, 세포막에 존재하는 teichoic acid와 세포벽에 존재하는 peptidoglycan 등에서 주로 금속이온의 chelating과 free radical 소거 및 환원 작용이 복합적으로 나타나므로 다시마김치에서 분리한 LAB의 항산화 활성이 균주 별 차이가 나는 것은 이러한 작용에 의한 것으로 판단된다.

#### 다시마김치에서 분리된 유산균주의 콜레스테롤 감소 활성

다시마김치에서 분리한 LAB의 콜레스테롤 감소 활성 결과

는 Fig. 7에 나타내었다. 분리한 LAB의 콜레스테롤 감소 활성은 15.50-94.77%의 범위로 다양하게 나타났으며, 대조구로 사용된 표준균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 콜레스테롤 감소 활성은 88.90%로 확인되었다. 분리한 LAB 중 가장 높은 콜레스테롤 감소 활성을 나타낸 4종은 모두 90%가 넘는 콜레스테롤 감소 활성을 가졌으며 각각 *L. plantarum* D-02 (94.77%), *L. brevis* D-05 (91.90%), *L. paraplantarum* D-04 (91.65%) 및 *L. plantarum* D-08 (90.20%)로 나타났으며 양성대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 콜레스테롤 감소 활성과 유사한 것으로 판단된다. Choi and Chang (2015)의 보고에 따르면 김치에서 분리한 50종의 LAB의 콜레스테롤 감소 활성이 3.51-80.86%의 범위로 나타났다고 보고하였고, Lim et al. (2004)은 7종의 *Streptococcus* sp.가 평균 17.3%, 11종의 *Lactobacillus* sp.가 평균 55.9% 그리고 7종의 *Bifidobacterium* sp.가 평균 29.1%의 콜레스테롤 감소 능력을 가지고 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리한 LAB 중 4종(D-02, 04, 05 및 08)은 상대적으로 우수한 콜레스테롤 감소 활성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합해 보면 다시마김치에서 분리한 LAB 균주들의 내산성 및 내담즙성 결과로 probiotics로서의 가능성을 확인했고, 이들 균주들의 항산화 및 콜레스테롤 감소 활성 분석을 통해 probiotics의 특성을 가지고 있으면서 항산화 및 항콜레스테롤 활성이 우수한 LAB 균주를 선별할 수 있었다. 향후 이들 LAB 균주들은 발효 기법을 이용하여 기능성 강화된 다양한 형태의 해조류 발효 제품 개발에 응용 될 수 있을 것을 기대된다.

## 사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의하

여 연구되었음.

## References

- Benzie IF and Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76.
- Brand WW, Cuvelier ME and Berset C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Int* 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Cho YH and Oh SJ. 2010. Comparative study of lactic acid bacteria for antioxidative activities. *Korean J Dairy Sci Technol* 28, 31-39.
- Choi EA and Chang HC. 2015. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from *kimchi*. *LWT- Food Sci Technol* 62, 210-217.
- Choi JI, Yun IH, Jung Y, Lee EH, Nam TJ and Kim YM. 2012. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-enriched sea tangle *Laminaria japonica* extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse macrophage (RAW 264.7) cells. *Fish Aquatic Sci* 15, 293-297.
- Clark PA, Cotton LN and Martin JH. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult Dairy Prod J* 28, 11-14.
- Fhoula I, Rehaïem A, Najjari A, Usai D, Boudabous A, Sechi LA and Hadda-Imene O. 2018. Functional probiotic assessment and *in vivo* cholesterol-lowering efficacy of *Weissella* sp. associated with arid lands living-hosts. *Biomed Res Int* 2018, 11. <https://doi.org/10.1155/2018/1654151>.
- Gilliland SE and Walker DK. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci* 73, 905-911.
- Gilliland SE. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: *Candidate microorganisms* for use as dietary adjuncts. *J Food Prot* 42, 164.
- Huang D, Ou B, Hampsch WM, Flanagan JA and Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50, 4437-4444.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N and Jalaludin S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol* 27, 183-185.
- Jung KI, Kim BK, Kang JH, Oh GH, Kim IK and Kim MY. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle *Saccharina japonica*. *Korean J Life Sci* 29, 596-606.
- Jung SE and Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw *Makgeolli*. *Kor J Food Sci Technol* 47, 44-50.
- Kang MR, Kim DR, Kim TW, Park SH, Kim HJ, Jang JY and Han ES. 2012. Selection of probiotic bacteria from Yulmoo *Kimchi* using a stimulated human intestinal model system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41, 396-401. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.3.396>.
- Kang SW, Kim EJ, Jung YR and Ko HJ. 2018. The anti-oxidant and whitening activities of seaweed mixture fermentation extracts. *J Soc Cosmet Sci Korea* 44, 327-334.
- Kang YM, Lee BJ, Kim JI, Nam BH, Cha JY, Kim YM, Ahn CB, Choi JS, Choi IS and Je JY. 2012. Antioxidant effects of fermented sea tangle *Laminaria japonica* by *Lactobacillus brevis* BJ20 in individuals with high level of  $\gamma$ -GT: a randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical study. *Food Chem Toxicol* 50, 1166-1169.
- Kang YH, Park YK and Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28, 232-239.
- Kim DH, Dasagrandhi C, Park SK, Eom SH, Huh MK, Mok JS and Kim YM. 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation. *LWT-Food Sci Technol* 90, 636-642.
- Kim HS and Kang SA. 2017. Study of quality characteristics of *Kimchi* added with Yangha *Zingiber mioga* *Rosc.* *J Korea Acad Industr Coop Soc* 18, 400-407.
- Korea Food Standards Codex. 2019. Health functional foods act. Retrieved from [http:// https://mfds.go.kr/brd/m\\_211/view.do?seq=14416](http://https://mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14416) on Dec 30, 2019.
- Kwon MS, Ryoo CR, Kang CH, Min KH, Kim WJ. 2002. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in *kimchi* and its characteristics. *J Microbiol Biotech* 12, 96-105.
- Lim HJ, Kim SY and Lee WK. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci* 5, 391-395.
- Lonkar P, Harne SD, Kalorey DR and Kurkure NV. 2005. Isolation, *in vitro* antibacteria activity, bacteria sensitivity and plasmid profile of lactobacilli. *Asian-Australas J Anim Sci* 18, 1336-1342.
- Maria GK, Evdokia KM, Ioannis GO and Adamantini AK. 2008. *In vitro* assessment of probiotic properties of *Lactobacillus* strains from infant gut microflora. *Food Biotechnol* 22, 1-17.
- McDonald LC, Fleming HP and Hassan HM. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 56, 2120-2124.
- Mishra V and Prasad DN. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* 103, 109-115.
- Ouweland AC, Kirjavainen PV, Shortt C and Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9, 43-52.
- Park HY, Park SK, Kim BG, Ryu DG, Lim ES and Kim YM.

2017. Isolation and characterization of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from *kimchi*. Korean J Food Sci Technol 49, 377-382.
- Radulović Z, Miočinović J, Mirković N, Mirković M, Paunović D, Ivanović M and Seratlić S. 2017. Survival of spray dried and free-cells of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in soft goat cheese. Anim Sci J 88, 1849-1854.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Anath P, Min Y and Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26, 1231-1237.
- Rudel LL and Morris MD. 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. J Lipid Res 14, 364-366.
- Ryu JK, Jo YH, Chang SJ and Lee BJ. 2016. Memory-improving effects of fermented sea tangle *Saccharina japonica* in normal mice. Korean J Fish Aquat Sci 49, 131-136. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0131>.
- Saarela M, Mogensen G, Fondén, R, Mättö J and Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol 84, 197-215.
- Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD and Kim YM. 2011. Change of physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by the fermentation of lactic acid bacteria. Korean J Fish Aquat Sci 44, 104-110. <https://doi.org/10.5657/kfas.2011.44.2.104>.
- Su J, Wang T, Li YY, Li J, Zhang Y, Wang Y, Wang H and Li H. 2015. Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. Appl Microbiol Biot 99, 5189-5202. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6425-4>.
- Sybesma W, Hugenholtz J, de Vos WM and Smid EJ. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food, bridging the gap between consumers, green groups and industry. Electron J Biotechnol 9, 424-448.
- Yamamoto Y. 2017. Identification of antioxidant (s) from lactic acid bacteria and screening of high antioxidative strain. Noda Institute for Scientific Research. Retrieved from <http://www.nisr.or.jp/englishHP/report2009/NISR09Yamamoto> on Jan 27, 2020.
- Yang SJ, Lee JE, Lim SM, Kim YJ, Lee NK and Paik HD. 2019. Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from *kimchi*. Food Sci Biotechnol 28, 491-499. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0473-3>.
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J and Qian M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. J Agr Food Chem 50, 1619-1624.
- Zulueta A, Esteve MJ and Frígola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 114, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.