

프로바이오틱스 유산균에 의한 질소 산화물 전환 및 철 이온 환원활성

김세림¹ · 홍정일^{1,*}

¹서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Bioconversion of nitrogen oxides and reduction of ferric ions by probiotic lactic acid bacteria

Selim Kim¹ and Jungil Hong^{1,*}

¹Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Many lactic acid bacteria (LAB) have probiotic properties that exert various health benefits. In this study, the reduction potential of nitrogen oxide compounds and ferric ions by six LAB, including *Lactobacillus kimchicus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* GG, and *Leuconostoc mesenteroides* were evaluated. The *L. kimchicus* strain produced a substantial amount of nitrite reduced from nitrate added to the media, whereas the other five LAB strains did not. *L. kimchicus* also showed the most potent reducing activity of ferric to ferrous ions. However, the reduction potential of the autoclaved *L. kimchicus* was little pronounced. The scavenging activities of viable LAB or their cell lysates against different radicals were not consistent with the potency of the LAB's reducing ability. The present results indicate that *L. kimchicus* has a strong reduction potential for nitrogen oxides in viable status, and that this ability can be used as a probiotic property for various health benefits.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactobacillus kimchicus*, probiotics, nitrogen oxide, reduction potential

서 론

다양한 발효식품의 제조 및 숙성과정에 필수적인 역할을 하는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* 등의 유산균은 대표적인 프로바이오틱스 균주로 광범위하게 이용된다(Isolauri 등, 2004). 이들은 생균제 형태로 섭취되어 인체 내에서 장관 및 비노생식기의 정상 미생물 균총 유지, 유당불내증 완화, 혈중 콜레스테롤 감소, 항암 및 면역 증강작용 등 다양한 건강 증진 효과를 부여한다고 보고되었다(Gill, 2003; Jayaprakasha 등, 2005; Saarela 등, 2002; Sanders, 1999). 생균의 경우, 열과 산에 취약하여 장에 도달하기 전에 대부분 사멸될 수 있어, 장내 정착능과 증식능은 물론 내산성 및 내담즙성에 대한 다양한 연구도 진행되어 왔다(Saarela 등, 2000; Seo와 Lee, 2007).

또한, 프로바이오틱스 균주의 대사 과정을 통해 생산되는 부산물 또는 non-viable bacterial products로 숙주에서 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미하는 포스트바이오틱스가 주목받고 있다(Petal와 Denning, 2013). 단쇄지방산, 아미노산, 항균 펩타이드 등의 포스트바이오틱스 성분은 세포, 혈액, 호르몬 등 생산을 위한 원료로 보충되기도 하며, 면역 및 소화와 같은 대사활동에 도움을 주어 다양한 생리활성 효과를 가진다고 보고되었다(Aguilar-

Toala 등, 2018; Sanchez 등, 2017). 이와 같이 유용한 프로바이오틱스 발굴과 새로운 포스트바이오틱스 개발에 있어서 미생물의 활성에 대한 연구가 지속적으로 요구되고 있다.

질소 산화물은 식품 중 다양한 형태로 체내에 유입되며 산화환원 반응을 통해 전환되어 인체 내 중요한 영향을 미치게 된다. Nitrate는 채소류 및 근채류와 같은 식품에 높은 함량으로 존재하며, 이는 식품 저장과정이나 체내 타액 및 소화관에서 질산환원효소 및 nitrifying bacteria의 작용에 의해 nitrite로 환원된다. Nitrite는 육가공품의 발색과 *Clostridium botulinum* 성장저해 등의 목적으로 허가되어 사용되고 있는 식품첨가물이지만, 산성 조건 하에서 2차 아민(amines)과 반응하여 발암물질인 니트로사민(nitrosoamine)을 형성한다. 또한, 과다 질소 시비로 인해 특정 식품의 nitrate 농도가 지나치게 높아지며 이로 인해 생체 내에서 니트로사민의 생성이 촉진될 수도 있다고 보고된 바 있다(Chung 등, 2003). 따라서, 비타민 C를 비롯하여 α -tocopherol, 페놀성 화합물 등에 의한 nitrite 소거, 니트로사민 생성 억제 및 그 기전에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다(Chung 등, 2003; Lee 등, 2006).

하지만 최근에는 nitrite가 오히려 체내에 부족할 수 있는 일산화질소(nitric oxide, NO)를 보충해 줌으로써 다양한 생리기능 개선 효과를 이끌어낸다는 연구들이 보고되고 있어 이에 대한 관심이 높아지고 있다. NO는 심혈관계에서는 혈관 상피세포 활동에 영향을 주고 혈류량과 혈압을 조절하여 동맥경화와 혈전증을 예방할 수 있고(Carpenter와 Schoenfish, 2012), 위에서는 위내 점막 유지를 위한 조절기능을 나타내며, 생체방어 기능의 강화에도 관여한다(Berg 등, 2004; Duncan 등, 1995). 한편, nitrite는 위의 산성조건 및 금속 이온 등과 반응하여 NO로 환원될 수 있어, 식품을 통한 nitrite의 섭취가 NO의 결핍에 따른 부작용을 예방하

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea
Tel: +82-2-970-5639
Fax: +82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received October 1, 2021; revised November 9, 2021; accepted November 9, 2021

거나 완화할 수 있다고 보고된 바 있다(Benjamin 등, 1994; Lundberg 등, 1994).

현재까지 자연의 질소순환 과정 중의 미생물의 역할과 일부 장내미생물에 의한 nitrate 및 nitrite 등 질소산화물의 전환에 대해서는 연구된 바 있지만, 생균제로 섭취될 수 있는 프로바이오틱스 균주로서 이들 질소산화물에 대한 환원 및 소거활성과 nitrate 환원을 통한 NO와 같은 포스트바이오틱스 성분의 생산에 관한 연구는 거의 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 프로바이오틱스로 널리 사용되는 유산균에 의한 nitrate 및 nitrite의 전환 활성을 평가하고, 이를 통한 유산균의 활용 및 포스트바이오틱스 생산가능성을 제시하고자 하였다. 이를 위해 현재 식품 분야에서 다양하게 이용되고 있는 5종의 프로바이오틱스 유산균과 이전 연구에서 resazurin 및 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)에 대해 월등히 높은 환원활성을 보인 *Lactobacillus kimchicus* (Lee 등, 2021b)를 선정하여 이들의 질소산화물에 대한 환원 및 전환활성을 비교 평가하였다. 또한, 이들에 의한 ferric ion에서 ferrous ion에 대한 환원활성을 평가하고 생균과 균체 자체의 산화방지활성에 대해서도 조사하여 프로바이오틱스로서 적용 시 생리활성 증진 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

사용배지 및 시약

유산균 배양에 사용된 Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) broth 및 agar는 Difco (Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 nitrate (NaNO_3) 및 nitrite (NaNO_2)은 Duksan chemical Co. (Ansan, Korea)에서, ferric sulfate는 Hayashi Chemical Industries (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Ferrous chloride는 Yakuri chemical Co. (Osaka, Japan)에서 구입하였고, 단백질 정량에 사용된 BCA protein assay reagent는 Thermo scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Phosphate buffered-saline (PBS) tablet, sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED), 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt (ferrozine), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 및 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

사용 균주 및 배양 조건

실험에 사용된 프로바이오틱스 기능을 가진 유산균 중 *Lactobacillus kimchicus* (KCTC 12976)와 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 3530)는 Korean Collection for Type Cultures (Seoul, Korea)에서, *Lactococcus lactis* (ATCC 11454), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 모든 균주는 MRS broth와 MRS agar를 사용하여 배양하였고, *Leu. mesenteroides*는 28°C에서 다른 5종의 균주는 37°C에서 2-3회 계대하여 활성화시킨 뒤 사용하였다.

Nitrate 환원능 및 nitrite 소거능 평가

각 균주를 MRS broth 배지에 1% (v/v)씩 접종하여 *Leu. mesenteroides*는 28°C에서 다른 5종의 균은 37°C에서 48시간 배양 후, 배양액을 원심분리(10,000×g, 5 min)하여 균체를 회수하였다(1248R; Gyrozen Co., Gimpo, Korea). 회수한 균체는 PBS로 2

회 세척하고, 5% MRS broth가 함유된 PBS 용액(v/v)에 재현탁하였다. 생균수 확인을 위해, 동일한 현탁액 일부를 멸균생리식염수로 단계별 희석하고 MRS agar에 도말평판 배양법으로 48-72시간 동안 배양하여 계수하였다. 이 균 희석용액(8-10 log CFU/mL)에 NaNO_3 (nitrate) 또는 NaNO_2 (nitrite)의 최종농도가 각각 2 mM 및 50 μM 이 되도록 혼합하여(50:1, v/v), *Leu. mesenteroides*는 28°C에서, 다른 5종의 균주는 37°C에서 72시간 동안 반응시켰다. 이 때 생성되거나 잔류하는 nitrite는 sulfanilamide와 NED에 의해 적색의 azo화합물로 전환되는 Griess 반응을 이용하여 (Lee 등, 2021a; Gray and Dugan, 1975) 분석하였다. 즉, 각 시간별로 시료를 취하여 원심분리(8,000×g, 3 min) (Mini; Gyrozen Co.)한 상등액 150 μL 와 5% phosphoric acid (v/v)에 녹인 1% sulfanilamide (w/v) 용액 50 μL 를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 이후, 0.1% NED (w/v) 50 μL 와 혼합하여 10분간 실온의 암소에서 더 반응시킨 후, 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M3; Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사균에 의한 nitrate 환원 및 nitrite 소거활성 분석을 위하여, 균 현탁액에서 회수한 균체를 증류수로 2회 세척하고, 증류수에 재현탁하여 고온가압처리(121°C, 1.2 atm, 15 min)를 통해 멸균처리하였다(VS 1221; Vision Scientific Co., Daejeon, Korea). 멸균처리 시료의 단백질 함량은 소혈청알부민을 표준물질로 하여 BCA 방법에 의해 정량하고(Smith 등, 1985), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 해당하는 동일한 단백질량으로 희석하여 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

Ferric ion [Fe(III)] 환원능 평가

각 균주들의 ferric ion에 대한 환원활성을 ferrozine을 이용하여 평가하였다. 각 균주를 1% (v/v) 접종하여 48시간 동안 배양한 뒤, 위와 동일한 방법으로 생균 및 사균 시료를 제조하였다. 생균 희석액(8-10 log CFU/mL) 및 균주 간 동일한 단백질 함량의 사균 희석액(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 최종농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 ferric sulfate를 혼합한 후 *Leu. mesenteroides*는 28°C에서 다른 5종의 균은 37°C에서 반응시켰다. 각 시간별로 원심분리(8,000×g, 3 min) (Mini)하여 상등액을 회수한 후, 상등액 150 μL 와 1 mM ferrozine 50 μL 를 혼합하여 상온의 암소에서 20분동안 반응시키고 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원된 ferrous ion [Fe(II)]의 양은 ferrous chloride로 검량곡선을 작성하여 환산하였다.

산화방지활성 평가

균체의 산화방지활성은 기존 방법에 따라 ABTS (Lee 등, 2021a; Re 등, 1999)와 DPPH 라디칼(Blois, 1958; Lee 등, 2021a)에 대한 소거활성으로 분석하였다. 먼저 각 균주를 1% (v/v) 접종하여 48시간 동안 배양하고 이를 멸균증류수로 2회 세척하여 얻은 생균의 단백질함량과 위와 동일한 방법으로 제조된 사균 용액의 단백질함량이 일정하도록 농도별로 희석하였다. 각 희석용액을 50과 100 μL 를 취하여, 각각 150 μL ABTS 용액 및 100 μL DPPH와 혼합하여 30분동안 상온의 암소에서 반응시킨 후, 각각 734와 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 3회 이상 분석하여 평균±표준편차로 나타냈다. 각 실험별 대조군과의 유의차는 Student's *t*-test로 95%의 유의수준에서 검정하였으며 필요에 따라 세 군 이상의 다중비교의 경우 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey's HSD test를 실시하여 95%의 유의수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

프로바이오틱스 유산균에 의한 nitrate 환원활성

다양한 유산균들이 생체에 유익한 영향을 미치는 프로바이오틱스로 제시되고 있는 가운데, 본 연구에서는 현재 프로바이오틱스로 사용되고 있거나 사용가능성이 있는 유산균 6종을 선별하여 각 균주별 nitrate에 대한 환원활성을 평가하였다. 각 5% MRS broth (v/v)로 조성된 배지에 2 mM의 nitrate를 첨가하여 배양한 결과, 6종의 유산균 중 5종의 균주에서 72시간 배양시간 동안 nitrite가 배지 중에 전혀 검출되지 않았으나, *L. kimchicus*의 72시간 배양액에서는 132.2-155.3 μM으로 높은 수준의 nitrite가 발견되었고 환원된 nitrite의 양은 초기 균수에 크게 영향받지 않았다 (Fig. 1A). *L. kimchicus*에 대한 72시간 배양시간 동안 시간별 nitrite 생성양상을 분석한 결과, 배지에 첨가한 nitrate의 환원은 6-24시간 이내에 급속도로 진행되었으며, 7.7 log CFU/mL 균 농도에서 7.1이나 7.4 log CFU/mL에 비해 유의적으로 높은 nitrite 생성량을 보이면서 48시간 이후에는 생성된 nitrite 농도가 포화되는 현상이 나타났다(Fig. 1B). 이러한 *L. kimchicus*의 nitrate 환원활성이 생균의 대사와 관련하여 진행되는지 확인하기 위하여, 고압증기로 멸균 처리한 균의 환원활성을 비교하였다. 그 결과, 배지성분만 포함된 대조군과 고압멸균 처리군에서는 nitrite가 거의 검출되지 않았으며, 생균에 의해서만 nitrate의 환원을 통한 nitrite 생성결과가 나타났다(Fig. 1C). 본 결과는 배지성분 자체의

환원력이나 균체에 포함된 환원성 화학성분이 아닌, 생균 상태의 *L. kimchicus* 대사에 의해 nitrate의 환원활성이 발휘되는 것임을 시사한다. 선행 연구에 의하면 *L. plantarum*과 *Staphylococcus carnosus*가 10% 시금치 발효액에서 각각 1600과 1350 ppm의 nitrite를 생성하는 것으로 나타났다(Kim 등, 2017). 하지만 본 실험 조건에서 *L. plantarum*이 NaNO₃로부터 nitrite로의 두드러진 환원활성을 보이지 못하는 것을 감안할 때, *L. kimchicus*에 의한 질소산화물 환원능이 훨씬 더 포괄적이며 효과적일 것으로 판단된다.

프로바이오틱스 유산균에 의한 nitrite 소거활성

Nitrate의 환원에 의해 생성된 nitrite는 이어지는 환원반응을 통해 nitric oxide (NO) 및 질소 기체(N₂)로 전환 등의 탈질화 과정(denitrification), 또는 질소고정(nitrogen fixation)을 위한 환원과정이 진행되어 암모니아(NH₃)로 전환될 수 있다(Tiso와 Schechter, 2015). 따라서 이어지는 실험에서는 각 균의 5% MRS 배양액(v/v)에 nitrite를 첨가하여 0-72시간 배양 중 잔류하는 nitrite 수준을 분석하였다. 그 결과, 7.7 log CFU/mL의 *L. kimchicus*는 24시간 반응 시에 55.3%의 nitrite를 소거하여 6종의 균주 중 가장 높은 활성을 보였으며, 이어서 LGG와 *L. plantarum*이 유의적인 소거활성 함께 균수에 비례하는 nitrite 소거능의 변화를 나타냈다(Fig. 2A). 배양시간별 nitrite 소거활성의 변화를 분석한 결과, *L. kimchicus*를 포함한 모든 균주에서 24시간 이후에 활성이 포화된 양상을 보였다(Fig. 2B).

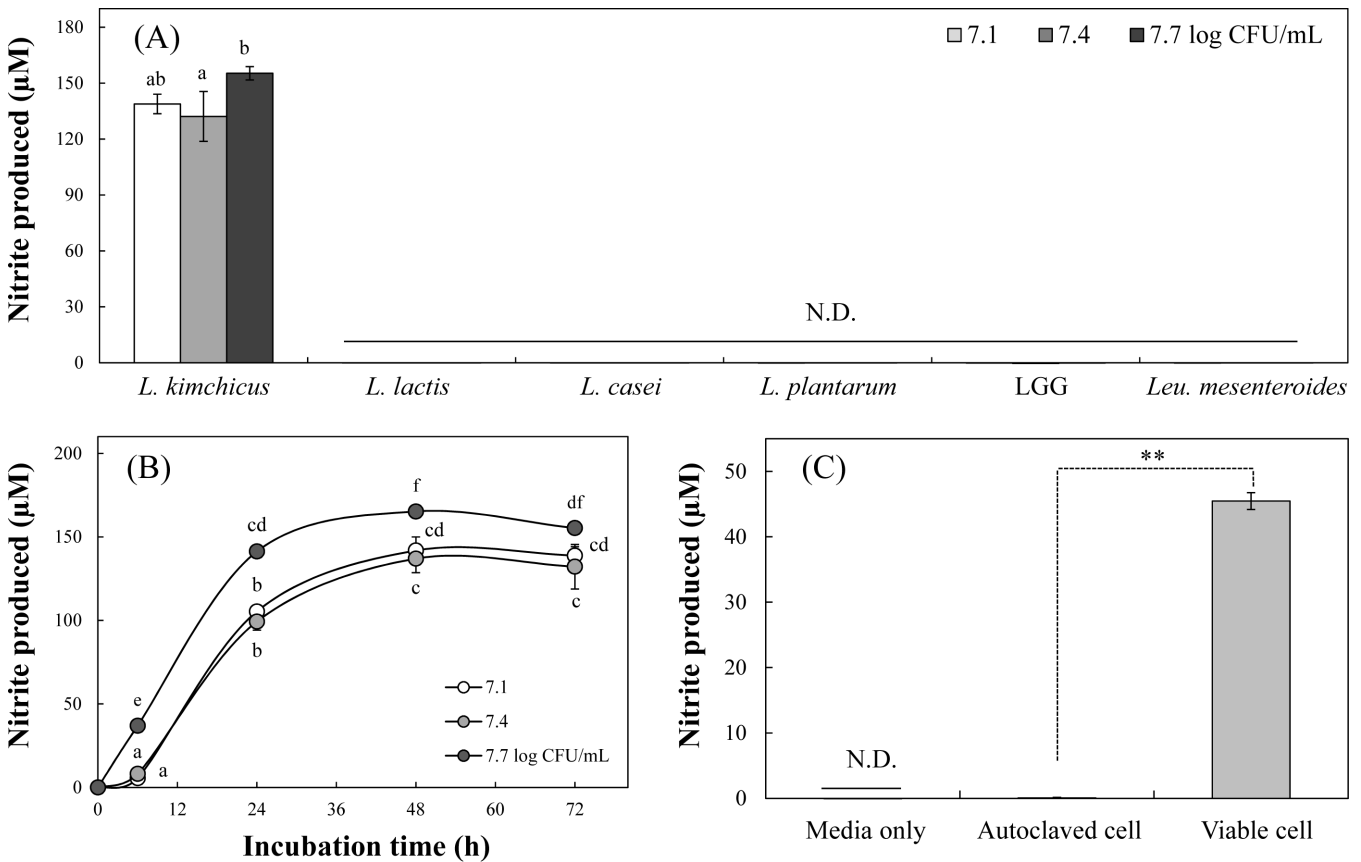


Fig. 1. Nitrate reducing activities of different LAB. Different numbers of LAB were grown in 5% (v/v) MRS broth containing 2 mM NaNO₃, and nitrite levels formed in culture broth were analyzed at 72 h (A). Time-dependent production of nitrite by *L. kimchicus* was measured during 72 h (B). Nitrite levels produced by viable and autoclaved *L. kimchicus* were also compared at 24 h (C). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. ** indicates a significant difference (p<0.01) based on Student's t-test (in C). N.D.; Not Detected

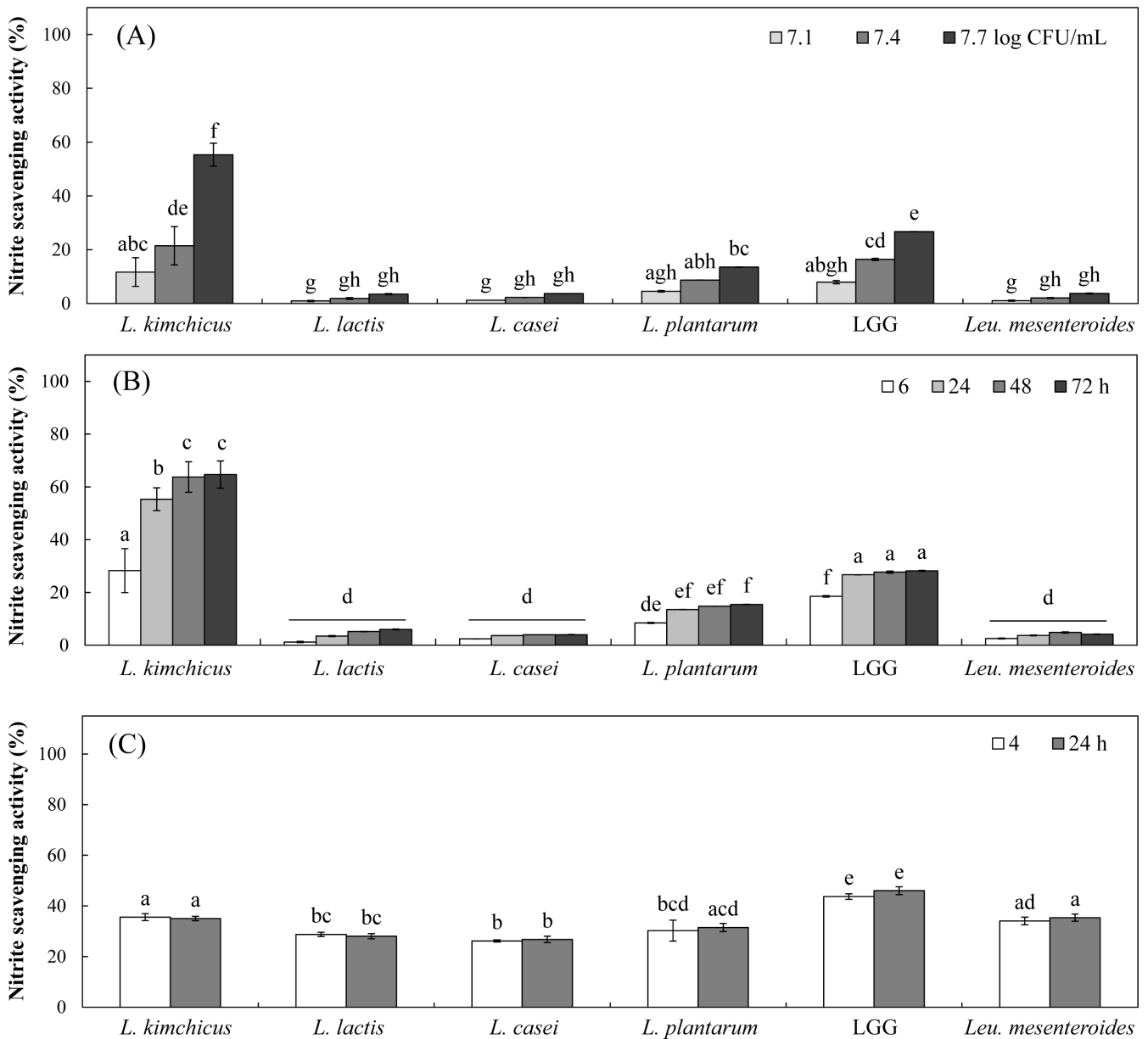


Fig. 2. Nitrite scavenging activities of different LAB. Each bacterium was grown in 5% (v/v) MRS containing 50 μM NaNO_2 , and changes in nitrite levels were analyzed at 24 h (A). The growth period-dependent changes of nitrite level by different LAB were analyzed during 72 h (B). Nitrite scavenging activities of autoclaved LAB were compared after 4 and 24 h incubation (C). Each value represents the mean \pm SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

한편, 생균의 대사관련 활성이 아닌 균체에 포함된 다양한 화학성분에 의해서도 nitrite 소거활성이 나타날 수 있을 것으로 예상되어, 고압증기 멸균 처리 후 동일한 단백질량으로 조정하여 각 균주별 nitrite 소거능을 확인하였다. 그 결과 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 균체 단백질 농도에서 시간에 따른 변화없이 26.2-46.0%의 nitrite 소거활성이 나타났으며, LGG>*Leu. mesenteroides*>*L. kimchicus*>*L. plantarum*>*L. lactis*>*L. casei* 순의 활성을 보였다(Fig. 2C). 하지만 가장 높은 소거활성을 보인 LGG의 경우에도 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 균체 단백질 농도에 해당하는 균수가 Fig. 2A에서 최대 활성을 나타낸 7.7 log CFU/mL의 10배 이상으로 계산되어 생균에 비해 멸균처리균의 활성은 매우 미약한 것으로 나타났다. 따라서 이 결과는 균체 중의 특정 화학물질들이 nitrite의 소거에 일부 관여할 수 있으나, *L. kimchicus*를 포함한 유산균들의 nitrite 소거활성은

대부분 생균이 갖는 대사관련 활성에 근거한 것임을 의미한다. 한편, nitrite의 소거는 NO로의 환원과 이후에 추가적인 환원을 통한 질소고정 과정 뿐만 아니라(Tiso와 Schechter, 2015), nitration이나 nitrosation과 같은 화학결합을 통한 소거(Lu 등, 2016) 및 산화에 의한 nitrate로의 전환을 통해서도 가능하다(Wagner 등, 1996). 본 결과에서 나타난 *L. kimchicus*에 의한 높은 nitrite 소거활성은 Fig. 1의 nitrate에 대한 환원능력이나 기존 연구에서 보고된 MTT tetrazolium에 대한 높은 환원활성을 고려할 때(Lee 등, 2021b) 환원적 소거활성으로 예상된다. 이러한 *L. kimchicus*의 생균으로서 대사적 특징은 식품 중에 비교적 높은 함량으로 존재하는 nitrate를 nitrite와 NO로 전환시켜 체내에 공급할 수 있다는 측면에서 장관계뿐만 아니라 구강 프로바이오틱스로서 높은 활용 가능성을 시사한다(Rosier 등, 2020).

Table 1. Reducing abilities on ferric to ferrous ion by different LAB

Cell counts (Log CFU/mL)	Levels of ferrous ion (μM) formed by LAB ¹⁾					
	<i>L. kimchicus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	LGG	<i>Leu. mesenteroides</i>
7.1	116.12±21.27 ²⁾	0.25±0.02 ^d	0.13±0.03 ^d	0.66±0.05 ^d	0.67±0.72 ^d	0.15±0.07 ^d
7.4	218.90±20.49 ^b	0.28±0.01 ^d	0.40±0.05 ^d	0.61±0.09 ^d	0.38±0.44 ^d	0.47±0.02 ^d
7.7	522.34±58.34 ^c	0.34±0.07 ^d	0.93±0.05 ^d	1.24±0.14 ^d	0.63±0.39 ^d	0.70±0.10 ^d

¹⁾Each bacterium was grown in 5% (v/v) MRS containing 100 $\mu\text{g/mL}$ of ferric sulfate, and the formation of ferrous ion by different populations of 6 LAB was analyzed at 24 h.

²⁾Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD.

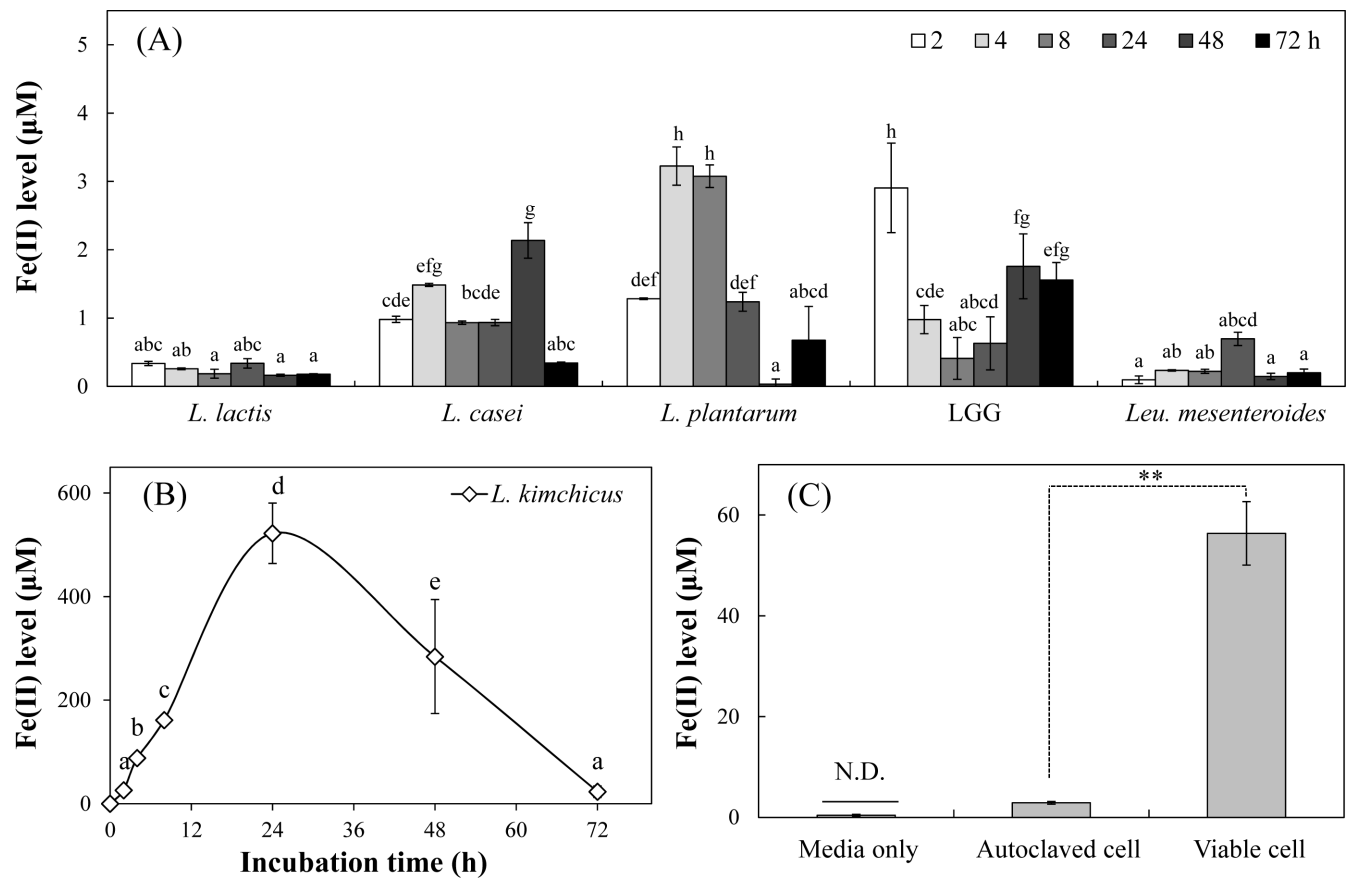


Fig. 3. Reducing abilities on ferric to ferrous ion by different LAB. Each bacterium (7.7 log CFU/mL) was grown in 5% (v/v) MRS containing 100 $\mu\text{g/mL}$ of ferric sulfate, and time-dependent changes of ferrous ion level in culture broth of 5 LAB (A) or *L. kimchicus* (B) were analyzed during 72 h. Ferrous ion levels produced by viable and autoclaved *L. kimchicus* were also compared after 24 h incubation (C). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD. ** indicates a significant difference ($p<0.01$) based on Student's t-test (in C).

유산균에 의한 철 이온 환원활성

이어지는 실험에서는 본 연구에 사용된 유산균들의 철 이온에 대한 환원 특성을 평가하였다. 이를 위하여 5% MRS broth (v/v) 로 조성된 각 균의 성장배지에 ferric sulfate를 첨가하고 ferric ion [Fe(III)]이 균에 의해 ferrous ion [Fe(II)]으로 환원된 후 ferrozine 과 반응하여 생성되는 Fe(II)-ferrozine 복합체의 발색도를 분석하였다. 우선, 7.1, 7.4와 7.7 log CFU/mL의 서로 다른 균수로 배양한 유산균 배양액에서 24시간 동안 ferric 이온으로부터 환원된 ferrous ion의 수준은 균수의 증가에 따라 의존적으로 증가하였다 (Table 1). 그러나 *L. kimchicus*를 제외한 5종의 유산균들이 24시간 동안 대부분 1 μM 이하의 ferrous ion을 생성한 반면, *L.*

*kimchicus*의 배양액에서는 다른 균에 비해 무려 420-1500배 이상 높은 116-522 μM 수준의 ferrous ion이 검출되어 nitrate에 대한 탁월한 환원활성과 유사한 양상을 보였다(Table 1). *L. kimchicus*를 제외한 5종의 유산균의 배양액 중 생성된 ferrous ion의 수준의 변화를 72시간 동안 관찰한 결과, 시간의 경과에 따른 일관된 증가 또는 감소현상은 나타나지 않았으며, 대부분 24시간 이내에 3 μM 이하의 최고 농도에 도달하였고 그 이후에 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3A). *L. kimchicus*의 ferrous ion 생성에 대한 시간별 변화에서는 24시간 이내에 급격하게 증가하다가, 그 이후에는 지속적으로 감소하여 72시간 배양시에는 ferrous ion이 거의 존재하지 않는 초기 수준으로 유지되었다(Fig. 3B). 이는 *L. kimchicus*를

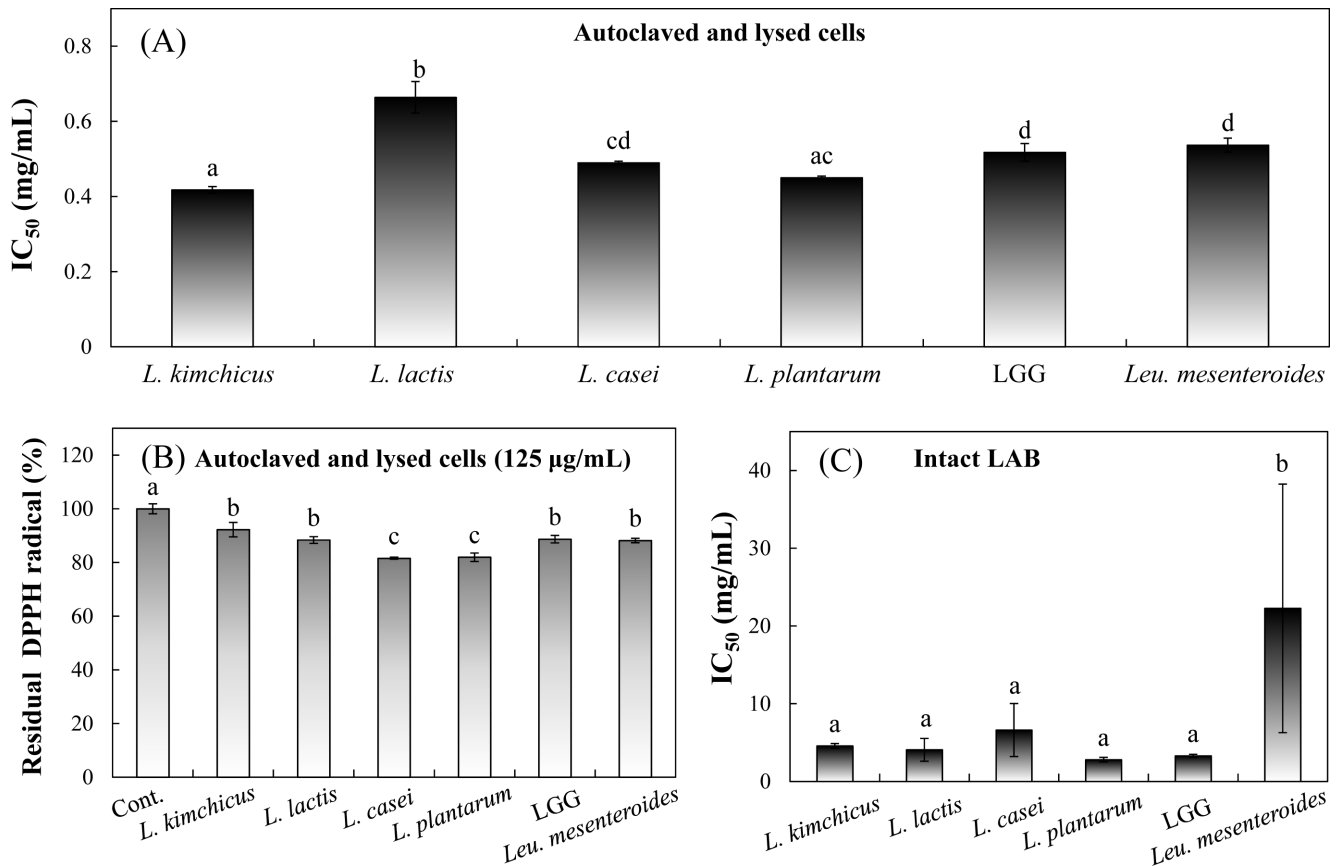


Fig. 4. Radical scavenging activities of LAB bacterial lysates and intact LAB. Scavenging activities of LAB lysates against ABTS (A) and DPPH (B) radicals were analyzed. ABTS radical scavenging activity of intact LAB was also analyzed (C). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

비슷한 대부분의 균주가 초기 성장기에 ferric ion을 ferrous ion으로 환원시키지만 이후 이를 다시 사용하거나, 배양액 환경의 산화물 축적에 의한 ferrous ion의 재산화가 일어나는 것으로 보인다. 또한, *L. kimchicus*의 고압멸균 처리 균체에 의한 ferric ion 환원활성을 측정된 결과, 균체 성분에 의해 일부 환원활성이 나타났으나 생균의 활성에 비해 대단히 미약하였으며(Fig. 3C), 따라서 철 이온에 대한 환원활성은 nitrate 환원능과 마찬가지로 생균에 의한 대사활성에 의한 것으로 판단된다.

균체 용해물과 생균체의 산화방지활성 평가

이와 같은 질소화합물 및 금속이온에 대한 환원력의 차이는 생균이 가지는 환원활성을 이외에도 균체에 포함된 환원성 화학성분에 의해서도 나타날 수 있을 것으로 판단되어, 고압멸균 처리하여 제조한 균체 용해물(lysate)과 생균체 자체에 의한 ABTS 및 DPPH라디칼 소거능을 평가하였다(Fig. 4). ABTS라디칼에 대한 균주들의 소거방지활성을 해당 라디칼을 50% 감소시키는 균체 용해물의 단백질량으로 환산한 IC₅₀값으로 비교한 결과, *L. kimchicus*와 *L. plantarum*의 균체 용해물이 각각 0.418, 0.450 mg/mL의 IC₅₀값을 나타내어 유의적으로 강한 라디칼 소거활성을 보였다. 반면, *L. lactis*는 0.664 mg/mL의 IC₅₀값으로 가장 낮은 활성을 나타냈다(Fig. 4A). DPPH라디칼에 대한 멸균 추출액의 산화방지활성을 측정된 결과, ABTS라디칼 소거활성에 비해 현저히 낮은 활성을 나타냈으며, 125 µg/mL의 단백질에 해당하는 균체 용해물을 첨가하였을 때 최대 20% 미만의 소거활성을 보였

다. 가장 높은 활성을 나타낸 *L. casei*와 *L. plantarum*이 각각 18.4와 18.0%의 소거활성을 나타냈으며, *L. kimchicus*는 오히려 7.8% 소거활성으로 11.3-11.8%의 활성을 갖는 *L. lactis*, LGG, *Leu. mesenteroides*와 통계적으로 유의차 없이 가장 낮은 활성을 보였다(Fig. 4B). 또한 생균의 대사에 의한 영향은 아니지만 가열 처리에 의해 손상되지 않은 생균의 균체성분에 대한 영향을 평가하기 위해 생균 자체를 직접 ABTS라디칼 소거활성 시스템에 첨가하여 활성을 측정하였다. 그 결과, 생균의 단백질량 기준으로 고압멸균 처리 후의 균체 추출물에 비해 5종의 균주가 6-13 배 증가한 IC₅₀값을 보였으며, 특히 *Leu. mesenteroides*는 41.5배 높은 IC₅₀값을 나타내어 멸균 처리한 균체 추출액보다도 현저히 낮은 ABTS라디칼 소거활성을 보였다(Fig. 4C).

이상의 결과를 종합할 때, 다른 프로바이오틱스 균주에 비해 *L. kimchicus*는 전반적으로 생균으로써 월등한 환원관련 대사능력을 갖고 있는 것으로 판단되며, 이는 *L. kimchicus*가 다른 균주들과 상당한 차이를 보이며 높은 resazurin 환원능력을 보였다는 선행연구 결과와도 일치한다(Lee 등, 2021b). 이러한 *L. kimchicus*의 생균으로서의 환원특성은 생체 내 건강 상 이점을 부여할 수 있는 프로바이오틱스의 기능으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 nitrate나 nitrite의 환원을 통해 체내에 유해물질로 작용할 수 있는 성분의 직접적 소거는 물론, 이 과정을 통해 생성된 NO 등은 포스트바이오틱스로서 심혈관계 질환 등의 예방에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다. 한편, 생균이 갖는 환원력의 차이가 현저하게 나타난 본 실험 결과에 근거

하면, 체내로 유입된 식품 성분에 대한 프로바이오틱스의 환원활성을 통해 대사산물의 차이가 발생할 것으로 판단된다. 따라서 이와 같은 대사산물이 인체에 유익할 경우 해당 프로바이오틱스의 경구섭취를 통해 체내에서 프로바이오틱스로서의 직접적인 효과뿐만 아니라, NO 이외의 포스트바이오틱스 생산 등에도 관련 환원활성을 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

다양한 유산균들이 생체에 유익한 영향을 주는 프로바이오틱스로 제시되고 있는 가운데, 본 연구에서는 *L. kimchicus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, LGG 및 *Leu. mesenteroides* 등 유산균 6종을 선별하여 균주별 nitrate의 환원과 nitrite의 소거, 그리고 철이온에 대한 환원활성을 분석하였다. 사용된 6종의 유산균 중, 5종의 균주에서 72시간 배양시간 동안 nitrate에 대한 환원현상이 나타나지 않았으나, *L. kimchicus*는 nitrate의 환원을 통해 과량의 nitrite를 생성했다. 한편, nitrite 소거활성은 균주별로 상당한 차이를 보였으며, 특히 *L. kimchicus*는 nitrate와의 반응과 마찬가지로 가장 높은 소거능을 나타내어 반응시간과 균수에 따른 급격한 배지 중 nitrite 수준 감소를 유도하였다. Ferric ion의 ferrous ion으로의 환원에 있어서도 *L. kimchicus*가 다른 5종의 균주에 비해 420-1500배의 높은 활성을 보였다. *L. kimchicus*의 환원활성은 멸균처리 균주나 균체 용해물에서는 거의 발현되지 않아 생균의 대사능력에 의한 것으로 나타났다. 이러한 *L. kimchicus*의 활성은 프로바이오틱스로서의 효과뿐만 아니라, 관련 환원활성에 의한 NO 등 유용 포스트바이오틱스 대사물에 의한 효과도 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원의 한국연구재단 중견연구자 지원사업 (NRF-2016R1A2B1007540와 NRF-2019R1A2C1089617)과 서울여자대학교 산학협력 특별연구비(2021-0187) 지원에 의해 수행되었음.

References

- Aguilar-Toala JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, Gonzalez-Cordova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernandez-Mendoza A. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 75: 105-114 (2018)
- Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature* 368: 502-502 (1994)
- Berg A, Redeen S, Ericson AC, Sjostrand SE. Nitric oxide-an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. *BMC Gastroenterol.* 4. doi: 10.1186/1471-230X-4-16. (2004)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- Carpenter AW, Schoenfish MH. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* 41: 3742-3752 (2012)
- Chung MJ, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. Screening of effective components from kale to inhibit *N*-nitrosodimethylamine formation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 223-229 (2003)
- Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M, Benjamin N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med.* 6: 546-551 (1995)
- Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Cl. Em.* 17: 755-773 (2003)
- Gray JJ, Dugan LR. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984 (1975)
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. *Best Pract. Res. Cl. Em.* 18: 299-313 (2004)
- Jayaprakasha HM, Yoon YC, Paik HD. Probiotic functional dairy foods and health claims: An overview. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 523-528 (2005)
- Kim TK, Seo DH, Sung JM, Ku SK, Jeon KH, Kim YB, Choi YS. Study of optimization of natural nitrite source production from spinach. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 459-461 (2017)
- Lee NH, Jung DS, Hong J. Antioxidant properties and protective effects of aerial parts from *Cnidium officinale* Makino on oxidative stress-induced neuronal cell death. *Prev. Nutr. Food Sci.* 26: 200-208 (2021a)
- Lee SYH, Munerol B, Pollard S, Youdim KA, Pannala AS, Kuhnle GGC, Debnam ES, Rice-Evans C, Spencer JPE. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against *N*-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 323-334 (2006)
- Lee HW, Oh YJ, Hong J. Chemical changes in resazurin by probiotics and its application for evaluating living bacterial cell counts and their reduction potentials. *Korean J. Food Sci. Technol.* 53: 204-212 (2021b)
- Lu Y, Dong Y, Li X, He Q. The nitrite-scavenging properties of catechol, resorcinol, and hydroquinone: a comparative study on their nitration and nitrosation reactions. *J. Food Sci.* 11: C2692-C2696 (2016)
- Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, K Alving. Intrasagric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 35: 1543-1546 (1994)
- Patel RM, Denning PW. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin. Perinatol.* 40: 11-25 (2013)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Rosier BT, Moya-Gonzalez EM, Corell-Escuin P, Mira A. Isolation and characterization of nitrate-reducing bacteria as potential probiotics for oral and systemic health. *Front. Microbiol.* 11:555465 (2020)
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215 (2000)
- Saarela M, Lahteenmaki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 78: 99-117 (2002)
- Sanchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, Lourenco A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 61. doi: 10.1002/mnfr.201600240. (2017)
- Sanders ME. Probiotics. *Food Technol.-Chicago* 53: 67-77 (1999)
- Seo JH, Lee H. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 681-687 (2007)
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985)
- Tiso M, Schechter AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One* 10: e0119712 (2015)
- Wagner M, Rath G, Koops HP, Flood J, Amann R. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 34: 237-244 (1996)