

열처리 조건에 따른 김치 유래 유산균 사균체의 항산화 및 항염 효과

이은수 · 유청빈 · 이민경 · 황운식 · 박훈*
선문대학교 식품과학과

Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi by Heat Treatment Condition

Eun-Su Lee, Cheong-Bin You, Min-Kyeong Lee, Un-Sik Hwang, and Hoon Park*

Department of Food Science, Sun Moon University

Abstract

This study aimed to investigate the effects of antioxidant and anti-inflammatory activities of heat-killed lactic acid bacteria (LAB) produced under different temperature conditions. Regarding probiotic properties, *Limosilactobacillus fermentum* SMF743 and *Lactiplantibacillus plantarum* SMF796 isolated from kimchi showed strong acid and bile salt resistance, adhesion activity onto HT-29 cells, and antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Based on the results of thermal death time and temperature, heat-killed LAB cells (1 mg/mL) were prepared by heating at 70°C (180 min), 80°C (120 min), 100°C (30 min), and 121°C (15 min). The heat-killed SMF743 and SMF796 showed significantly higher DPPH and ABTS radical scavenging activities than live cells ($p < 0.05$). The heat-killed SMF743 and SMF796 at 70°C or 121°C revealed stronger DPPH and ABTS radical scavenging activities and inhibition of nitric oxide production than those at 80°C or 100°C. Furthermore, heat-killed SMF743 and SMF796 at 121°C significantly reduced the gene expression levels of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, and cyclooxygenase-2 up to 53.33%, 58.67%, and 83.67%, respectively, in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells ($p < 0.05$). These results suggest that heat-killed *L. fermentum* SMF743 and *L. plantarum* SMF796 can be used as natural antioxidants and anti-inflammatory agents.

Keywords: heat-killed probiotics, paraprobiotics, heat treatment, antioxidant, anti-inflammatory

서 론

고령화 사회의 가속화와 더불어 건강에 대한 소비자들의 관심이 증대됨에 따라 건강증진과 질병예방의 목적으로 기능성식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 특히 세계적으로 광범위한 연구를 통하여 장내마이크로바이옴(intestinal microbiome)이 장 질환뿐만 아니라 대사질환, 아토피, 노화, 정신질환 등 다양한 질병과 관련이 있다는 연구 결과가 보고되면서, 장내미생물 및 장건강과 밀접하게 연관된 프로바이오틱스(probiotics) 시장이 급성장 하고 있다. 프로바이오틱스는 ‘적정량을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 유용한 작용을 하는 살아있는 미생물’로 장내 균총 개선, 장 점막 기능 강화, 변비 개선, 아토피 개선, 콜레스테롤 감소, 항비만, 항산화, 항염증, 면역조절, 중추신경계 기능 향상 등 다양한 생리활성 효능이 있는 것으로 보고되고 있다(Jayaprakasha

et al., 2005; Ohashi & Ushida, 2009; Choi, 2019). 대표적으로 이용되는 프로바이오틱스 균주는 *Lactobacillus* 속, *Bifidobacterium* 속, *Enterococcus* 속 등으로, 프로바이오틱스로 이용되기 위해서는 인체에 무해한 안전한 generally recognized as safe (GRAS) 균주로 인정을 받아야 하며, 섭취 후 장까지 도달하여 유용한 효과를 나타내야 하므로 기본적으로 위산과 담즙에 대한 내성, 장 점막과 상피세포에 대한 부착능, 병원균에 대한 항균활성을 갖고 있어야 한다(Lee et al., 2016). 하지만 생균의 경우 열과 산에 취약하다는 단점을 갖고 있고 생균의 과다 복용에 따른 부작용 발생 사례가 증가하고 있어, 생균보다 안전한 사균체(파라프로바이오틱스)와 대사산물(포스트바이오틱스)을 이용한 연구가 주목을 받고 있다.

파라프로바이오틱스(paraprobiotics)는 비활성화된 프로바이오틱스 균주의 사균체로 생균에 비하여 매우 안전하고 생균 처방이 어려운 고위험군에게 대체제로 처방할 수 있으며, 보관이 용이하며, 천연첨가물로서 건강기능식품, 일반식품, 제약, 화장품 등 광범위한 분야에 적용을 할 수 있는 장점이 있다(Kim et al., 2018; Piqu et et al., 2019). 최근에는 프로바이오틱스의 열처리 과정에서 용출되는

*Corresponding author: Hoon Park, Department of Food Science, Sun Moon University, Asan-si, Chungcheongnam-do 31460, Korea
Tel: +82-41-530-2262; Fax: +82-41-530-2917
E-mail: hpark@sunmoon.ac.kr
Received October 12, 2022; revised November 17, 2022; accepted November 18, 2022

peptidoglycan, nucleic acid, lipoteichoic acid, lipoprotein, exopolysaccharide (EPS), cell wall protein 등의 세포 성분이, 항산화, 항염, 면역조절, 장내 미생물 균총 조절, 장내 세포장벽 강화, 콜레스테롤 저하, 인지기능 향상 등 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되었다(Lee et al., 2015; Kim, 2018; Akter et al., 2020; Nataraj et al., 2020). 사균체의 제조 방법으로 열처리, 자외선, 고압, 초음파 처리, 음가열 기술 등이 있으며, 그 중에서 열처리에 의한 방법은 공정이 단순하고 멸균처리가 가능하며 온도에 따라 세포벽의 파괴 정도를 조절할 수 있는 장점이 있어 가장 널리 이용되고 있다(Adams, 2010; de Almada et al., 2016). 하지만 현재까지 유산균을 완전히 사멸시키는 온도조건을 설정하여 사균체를 제조한 후 열처리에 따른 생리활성 효과를 평가한 연구는 거의 전무한 실정이다.

생체 대사과정에서 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 스트레스, 흡연, 환경오염, 질병 등에 의해 체내에 과도하게 축적되면 세포의 구성성분인 지방, 단백질, DNA 등이 산화적으로 손상되어 염증을 유발하고 암, 심혈관계질환, 당뇨, 뇌졸중, 알츠하이머 등과 같은 다양한 질병을 유발할 수 있다(Reddy et al., 2009). 염증(inflammation)은 내독소, 세균 감염 등 외부 자극에 의한 손상으로부터 신체를 방어하기 위한 작용기작으로, 정상적인 염증반응은 nitric oxide (NO), cyclooxygenase 2 (COX-2)에 의해 생성되는 prostaglandin E2, 염증성 cytokine 등 염증성 매개인자들이 관여하는 대식세포의 활성화에 의해 조절된다. 하지만 과량의 산화적 스트레스 또는 그람음성 세균의 외막 성분인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 과도하게 활성화된 대식세포는 염증성 매개인자들의 발현을 촉진하여 염증을 악화시키고 만성 염증을 유발하여 암, 심혈관질환, 뇌졸중, 퇴행성신경질환 등 각종 질환의 발병 요인으로 작용한다. 현재까지 우리나라의 전통발효식품에서 분리한 유산균이 항산화 및 항염 효능을 갖고 있다는 여러 연구 결과가 보고되었지만, 유산균의 열처리 사균체를 활용한 생리활성 연구는 매우 부족하므로 이에 대한 광범위한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 김치로부터 분리한 유산균 중 내산성, 내담즙성, 항산화 활성 및 항균 활성이 우수한 2종의 균주를 선별하고 프로바이오틱스 활성을 평가하였다. 또한 선별한 2종의 유산균을 다양한 온도 조건에서 열처리 하여 멸균된 사균체를 제조하고 항산화 활성과 항염 활성을 측정함으로써 사균체 연구의 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 유산균은 천안과 아산지역의 전통시장에서 수집한 김치로부터 분리하여 사용하였다. 프로바이오틱스 유산균 *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917

(KCTC3108)과 병원성 지시균주인 *Escherichia coli* KCTC1039, *Staphylococcus aureus* KCCM11335는 생물자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 인간 결장 유래 HT-29 세포(KCLB30038)와 마우스 유래 RAW264.7 세포(KCLB40071)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Pepsin, DPPH (1, 1-diphenyl 1-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), LPS (lipopolysaccharide) 등 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

유산균의 분리 및 동정

김치시료에 멸균 생리식염수를 1:9 (w/v) 비율로 첨가하고 Stomacher (BagMixer 400W, Interscience, Saint Nom, France)를 이용하여 5분간 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 십진법으로 희석하여 EdMan Rogosa Sharpe (MRS, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 고체배지에 도말하고 37°C, overnight 배양하였다. MRS 고체배지에서 분리된 단일 콜로니를 BCP 고체배지(Eiken chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 도말하여 배양한 후 노란색 환을 생성하는 콜로니를 유산균으로 간주하고 선별하였다. 선별된 유산균주의 Gram 염색성과 catalase 활성을 확인하였으며, 현미경(AE31 Trinocular, Microscope World, Carlsbad, USA)을 이용하여 형태학적 특성을 관찰하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의해 선별된 유산균주를 동정하였다. 선별된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 universal rRNA gene primer (27F and 1492R)를 이용하여 증폭하였으며, BIOFACT사(Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 16S rRNA 염기서열 데이터는 National Center for Biotechnology Institute (NCBI)의 BLAST online program을 이용하여 Genbank database와 비교하였다.

세포 배양

인간 결장 유래 HT-29 세포는 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Welgene, Gyeongsan, Korea)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GW Vitek, Seoul, Korea)과 1% penicillin-streptomycin solution (Cytiva, Marlborough, MA, USA)을 혼합하여 배양하였다. 마우스 유래 RAW264.7 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene)에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin solution을 혼합하여 배양하였다. 두 세포주 모두 37°C, 5% CO₂ 환경을 유지하는 incubator (Thermo Fisher, Weltham, MA, USA)에서 배양하였다.

유산균의 내산성 및 내담즙성 측정

유산균의 내산성과 내담즙성 평가는 Lertcanawanichakul

et al. (2015)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. MRS 액체배지에서 37°C, overnight 배양한 유산균 배양액을 실험에 사용하였다. 내산성 평가를 위하여 0.3% pepsin (Sigma-Aldrich)이 첨가된 MRS 액체배지(pH 2.5)에 유산균을 약 1×10^7 CFU/mL 수준이 되도록 1% (w/v) 접종하고 3시간 반응시켰다. 반응액을 MRS 고체배지에 도말하여 배양한 후 생균수를 측정하여 균의 생존율을 확인하였다. 내담즙성 평가를 위하여 0.3% oxgall (Difco™)이 첨가된 MRS 액체배지에 유산균을 약 1×10^7 CFU/mL 수준이 되도록 1% (w/v) 접종하고 24시간 반응시킨 다음 MRS 고체배지에 도말하여 배양한 후 생균수를 측정하여 균의 생존율을 확인하였다.

$$\text{Survival rate (\%)} = (\text{Viable cell}/\text{Initial cell}) \times 100$$

유산균의 항균활성 측정

유산균의 항균활성은 Kim et al. (1999)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. MRS 액체배지에서 배양(37°C, overnight)한 유산균 배양액을 원심분리(12,000×g, 4°C, 10 min, CT15RE, Hitachi Chemical Co., Tokyo, Japan)하여 균체를 제거하고 0.45 µm syringe filter로 여과한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 병원성 지시균주(*E. coli* KCTC1039, *S. aureus* KCCM11335)를 tryptic soy broth (TSB, Difco™)에 각각 접종하고 37°C, overnight 배양한 다음 0.85% saline 용액으로 약 1×10^6 CFU/mL 수준으로 희석하여 사용하였다. 희석한 지시균주를 Nutrient agar (NA, Difco™)에 100 µL씩 균일하게 접종하고 멸균한 면봉으로 도말한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 예비 배양한 평판배지 위에 paper disc (8 mm)를 올려놓고 유산균 상등액을 100 µL씩 균일하게 분주하여 흡수시킨 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 유산균의 항균활성은 paper disc 주변에 형성된 억제환의 크기를 측정하여 평가하였다.

유산균의 장세포 부착능 측정

결장 유래 HT-29 세포에 대한 유산균의 부착능은 Shin et al. (2015)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. MRS 액체배지에서 배양(37°C, overnight)한 유산균을 PBS 용액(pH 7.2)으로 두 번 세척한 후 1×10^9 CFU/mL 수준으로 조정된 현탁액을 사용하였다. HT-29 세포를 6 well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd, Pocheon, Korea)의 RPMI 배지에 1×10^6 CFU/mL 수준으로 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 후 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 HT-29 세포에 RPMI 1 mL와 현탁액 1 mL를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 반응하였다. 세포를 PBS 용액으로 3회 세척하여 부착되지 않은 유산균을 제거한 후 Triton X-100 (Samchun, Seoul, Korea) 200 µL를 가하여 세포에 부착된 유산균을 회수하였다. 회수한

유산균을 십진법으로 희석하고 MRS 고체배지에 도말하여 배양한 후 생균수를 측정하고 다음의 계산식에 따라 유산균의 장부착능(%)을 계산하였다.

$$\text{Adhesion (\%)} = (\text{Viable cell count}/\text{Initial cell count}) \times 100$$

열처리에 의한 유산균 사멸 측정 및 열처리 사균체 제조

MRS 액체배지에서 배양(37°C, overnight)한 유산균을 PBS 용액으로 두 번 세척하고 약 1×10^9 CFU/mL 수준이 되도록 조정된 후 70°C, 80°C, 100°C, 121°C의 온도에서 각각 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 동안 Autoclave (AC-12, eion Tech, Daejeon, Korea)를 이용하여 열처리하였다. 열처리한 균액을 주입평판법(pour plate method)을 이용하여 MRS 평판배지에 1 mL씩 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정하여 사멸율을 확인하였다. 열처리 조건에 따른 유산균의 사멸율을 파악하기 위해 생균수가 10배 감소할 때 걸리는 시간인 D값(D-value, decimal reduction time)을 계산하였다. 유산균이 완전히 사멸되는 열처리 조건인 70°C (180분), 80°C (120분), 100°C (30분), 121°C (15분)에서 열처리 후 동결건조하였으며, 이후 사균체 실험은 동결건조된 사균체를 1 mg/mL (약 1×10^9 CFU/mL)의 농도로 PBS 용액(pH 7.4)에 현탁하여 사용하였다.

사균체의 세포독성 측정

사균체의 세포독성 평가는 HT-29 세포를 사용하여 MTT 방법에 의해 측정하였다(Chuah et al., 2019). HT-29 세포(약 1×10^5 cell/mL)를 RPMI 배지에 접종하고 96 well plate에 100 µL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 세포 상등액을 제거한 후 RPMI 배지 180 µL와 유산균 사균체(1, 2, 5, 10 mg/mL) 20 µL를 가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 PBS 용액으로 3번 세척한 다음 RPMI 배지 180 µL와 MTT 시약(5 mg/mL) 20 µL를 가하고 37°C, 5% CO₂에서 4시간 반응하였다. 반응 후 상등액을 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Daejung, Siheung, Korea) 100 µL를 가하여 반응에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 PBS 용액(pH 7.4)을 사용하였으며 다음의 계산식에 따라 세포 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{Survival rate (\%)} = (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

사균체의 항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Wang et al. (2016)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. 유산균 사균체(1 mg/mL) 2 mL와 OD_{517nm} = 1.2로 조정된 0.4 mM DPPH 용액 2 mL를 혼합하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 혼합액을 원심분리

(12,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액의 흡광도를 OD_{517nm}에서 측정하고 다음의 계산식에 따라 DPPH 라디칼 소거능(%)을 계산하였다. 대조구는 PBS 용액(pH 7.4)을 사용하였다.

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

ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 라디칼 소거능은 Re et al. (1999)의 방법을 일부 수정하여 진행하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 3.9 mg/mL의 7 mM ABTS와 1.3 mg/mL의 5 mM Potassium persulfate를 혼합하고 암실에서 16시간 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 만들었다. 증류수를 이용하여 ABTS⁺ 라디칼의 농도를 OD_{734nm} = 0.7로 조정 한 후 실험을 진행하였다. ABTS⁺ 라디칼 용액 1.35 mL에 유산균 사균체 150 µL를 첨가하고 호일로 감싸 37°C에서 10분간 반응한 후 원심분리(12000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액의 흡광도를 OD_{734nm}에서 측정하고 다음의 계산식에 따라 ABTS 라디칼 소거능(%)을 계산하였다. 대조구는 PBS 용액(pH 7.4)을 사용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (1 - \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

사균체의 Nitric oxide 생성 억제 활성 측정

유산균 사균체의 NO 생성 억제 활성은 RAW264.7 세포를 이용하여 진행하였다(Son & Kang, 2021). RAW264.7 세포를 96 well plate의 DMEM (1% penicillin, 10% FBS) 배지에 1 × 10⁵ cell/well 수준으로 접종하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 LPS (1 µg/mL)가 첨가된 DMEM 배지 180 µl와 유산균 사균체 20 µl를 가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 세포 상등액 100 µl에 griess 시약(0.1% naphthylethyl : 1% sulfanilic cid : 5% phosphoric acid) 100 µl를 가한 후 15분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용

하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 계산식에 따라 NO 생성 억제 활성(%)을 계산하였다. 공시험은 PBS 용액 (pH 7.4)을 사용하였다.

$$\text{NO production (\%)} = (1 - \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

사균체의 TNF-α, iNOS, COX-2 유전자 발현 억제 활성 측정

TNF-α, iNOS, COX-2 mRNA 발현은 quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) 방법을 이용하여 진행하였다 (Cheon et al., 2020). RAW264.7 세포를 6 well plate에 1 × 10⁶ cell/well 농도로 접종한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 1 µg/mL의 LPS가 첨가된 DMEM 배지와 1 mL의 사균체(1 mg/mL)를 첨가한 후 12시간 반응하였다. 반응 후 세포를 PBS 용액으로 두 번 세척하고 세포를 회수하여 PCR 분석에 사용하였다. Total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였으며 NanoDrop (Biochrom)을 이용하여 농도를 정량하였다. cDNA는 2 µg의 RNA를 주형으로 cDNA synthesis kit (TAKARA, Shigaken, Japan)를 이용하여 합성하였다. cDNA 합성과 PCR은 StepOnePlus™ Real-time PCR System (Thermo Fisher)을 이용하였으며 SYBR green (Cosmogenetech, Seoul, Korea) 10 µL, cDNA 2 µL, primer (Cosmogenetech) 2 µL, 증류수 6 µL를 혼합하여 총 20 µL의 용량으로 PCR을 수행하였다. Reference gene으로 GAPDH를 사용하였으며, delta-delta C_i (ΔΔC_i) 법으로 계산하여 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 코스모진텍 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며 Table 1과 같다.

통계 분석

모든 결과의 통계분석은 3회 반복 실험한 결과를 평균 (mean)±표준편차(SD)로 표시하였다. 통계처리의 유의성 분석은 Prism 9.3 (Graphpad software, USA)을 이용하여 one-way, two-way ANOVA로 분석하였다. 유의수준은 대조군과 비교하였을 때, p<0.05이면 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Table 1. Primer sequences used for quantitative reverse transcription PCR

Gene ⁽¹⁾	Direction	Sequence
TNF-α	Forward	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
	Reverse	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
iNOS	Forward	5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3'
	Reverse	5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'
COX-2	Forward	5'-CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3'
	Reverse	5'-CCTCGCTTCTGATCTGTCTT-3'
GAPDH	Forward	5'-TGCACCACTCAACTGCTTA-3'
	Reverse	5'-GGATGCAGGGATGATGTT-3'

⁽¹⁾TNF-α, tumor necrosis factor α; iNOS, inducible nitric oxygen synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; and GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

결과 및 고찰

유산균주의 분리 및 동정

BCP 고체배지에서 노란색 환을 형성하고 크기가 상대적으로 큰 200개의 콜로니를 유산균으로 간주하고 1차 선별하였다. 1차 선별균주 중에서 생육능, 내산성, 내담즙성, 항산화활성(DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능)이 우수한 20종의 균주를 2차 선별한 후 생균과 비교하여 사균체의 항산화 활성이 우수한 2종의 균주(SMF743, SMF796)를 최종 선별하였다. 최종 선별된 2종 균주의 형태학적 및 생화학적 특성을 분석한 결과, Gram 양성의 간균으로 catalase 음성 반응을 나타내는 것이 확인되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 NCBI nucleotide BLAST search를 진행하였으며, Genbank database에서 상동성을 비교한 결과, 분리한 2종의 균주는 *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*과 각각 99.79%, 99.05%의 높은 상동성을 나타내어 *Limosilactobacillus fermentum* SMF743과 *Lactiplantibacillus plantarum* SMF796으로 명명하였다.

유산균의 내산성 및 내담즙성

유산균이 프로바이오틱스로서 기능을 발휘하기 위해서는 낮은 pH 조건인 위산과 담즙이 존재하는 환경에서 생존하여 최종 목적 부위인 장에 도착해야 하므로, 유산균의 내산성과 내담즙성은 프로바이오틱스 균주 선정에 가장 중요한 요소 중의 하나이다(Sim et al., 1995). 선별된 유산균의 내산성과 내담즙성은 Table 2와 같다. pH 2.5의 인공위액에서 *Limosilactobacillus fermentum* SMF743과 *Lactiplantibacillus plantarum* SMF796의 생존율은 각각 98.99%, 97.61%로 상업용 프로바이오틱스 균주인 *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917 (100.21%)과 유사한 생존율을 나타내었다. Oxgall이 0.3% 첨가된 배지에서 SMF743과 SMF796의 생존율은 각각 95.33%, 105.05%로 ATCC1491 (100.40%)과 유사하거나 높은 생존율을 보였다(Table 2). Lee et al. (2016)은 pH 2.5의 조건에서 4종의 *Lactiplantibacillus plantarum* 유산균이 72.2-93.4%의 생존율을 나타내었다고 보고하였으며, Tulumoglu et al. (2013)은 0.3% bile salt 환경에서 *Lactiplantibacillus pentosus* T13과

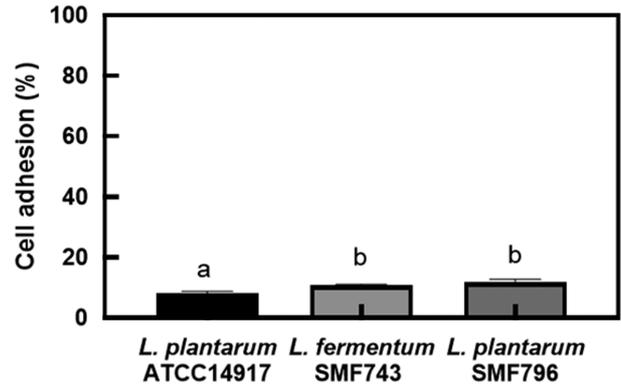


Fig. 1. Adhesion ability of LAB strains to human intestinal epithelial cells (HT-29). Data are mean±standard deviation of triplicate experiments. ^{a-b} Different superscript letters on each bar represent significant differences ($p<0.05$).

Lactiplantibacillus plantarum T15 균주가 각각 96%와 93%의 생존율을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 선별한 2종의 유산균은 내산성과 내담즙성이 우수한 균주로 프로바이오틱스 선별 조건에 부합한다고 볼 수 있다.

유산균의 HT-29 세포에 대한 장부착능

유산균이 장내에서 생존하면서 인체에 유용한 효과를 발휘하기 위해서는 위와 십이지장을 통과한 후 장에 도달하여 장세포에 부착할 수 있는 능력이 요구된다(Dunne et al., 2001). 인간 결장 유래 HT-29 세포에 대한 유산균의 장부착능은 Fig. 1과 같다. SMF743과 SMF796의 장부착능은 각각 10.78%와 10.59%로, ATCC14917 (8.18%)와 비교하여 높은 장부착능을 나타내었다. Jung & Kim (2015)은 프로바이오틱스 활성을 나타내는 *L. plantarum* BSM-2와 EHJ-1 균주의 HT-29 세포에 대한 장부착능이 각각 4.01%, 4.62%로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 선별된 SMF743과 SMF796 균주는 내산성과 내담즙성이 우수하고 장세포에 대한 부착능이 우수하여 프로바이오틱스 균주의 조건에 부합하는 것으로 사료된다. 유산균은 장관 상피세포벽에 부착되어 mucin 생산을 촉진하고 병원균의 부착을 억제함으로써 상피세포의 손상을 막아 장내 병원균으로부터 숙주의 방어체계 시스템을 강화한다고 알려졌다(Saulnier et al., 2009).

Table 2. Acid and bile acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) strains

Strains	Acid tolerance (pH 2.5, 0.3% pepsin)			Bile salt tolerance (0.3% oxgall)		
	Initial (Log CFU/mL)	3 h (Log CFU/mL)	Survival rate (%)	Initial (Log CFU/mL)	24 h (Log CFU/mL)	Survival rate (%)
<i>L. plantarum</i> ATCC14917	7.59±0.04	7.60±0.03	100.21±0.91	7.43±0.00	7.46±0.09	100.40±0.14
<i>L. fermentum</i> SMF743	7.82±0.01	7.74±0.01	98.99±0.27	7.38±0.09	7.03±0.04	95.33±0.67
<i>L. plantarum</i> SMF796	7.79±0.01	7.60±0.04	97.61±0.53	7.43±0.03	7.81±0.03	105.05±0.54

All values are mean±standard deviation of triplicate experiments.

유산균의 항균활성

병원성 지시균주인 *E. coli* KCTC1039와 *S. aureus* KCCM11335에 대한 유산균주의 항균활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. SMF743은 *E. coli* KCTC1039에 대하여 10 mm의 저해환을 생성하였으며, SMF796은 ATCC14917 (12.0 mm) 보다 우수한 15.00 mm의 저해환을 생성하였다. *S. aureus* KCCM11335에 대하여 SMF743, SMF796, ATCC14917은 각각 16.67, 14.83, 17.00 mm의 높은 저해환을 생성하였다. 따라서 본 연구에서 선별된 SMF743과 SMF796 균주는 항균활성이 우수하여 프로바이오틱스 균주의 조건에 부합하는 것으로 확인되었다. 프로바이오틱스 활성이 있는 유산균은 장내에서 젖산, 아세트산, 박테리옌, H₂O₂ 등의 항균물질을 생산하여 유해균의 증식을 억제하고 장내 균총을 개선하는 등의 정장작용을 갖고 있다고 보고되었다(Herich & Levkut, 2002).

사균체 제조를 위한 열처리 조건 설정

완전히 사멸된 유산균체를 제조하기 위한 열처리 조건을 설정하기 위하여 다양한 온도조건에서 유산균을 열처리한 후 생균수를 측정하였다. 즉, MRS 액체배지에서 배양(37°C, overnight)한 유산균을 PBS 용액으로 두 번 세척하고 균체(1 mg/mL = 약 1×10^9 CFU/mL)를 회수한 후 70, 80, 100, 121°C의 온도 조건에서 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 동안 열처리하여 생균수의 변화를 측정하였다(Fig. 2A). 3종의 유산균 균체(1 mg/mL) 모두 70°C에서 180분, 80°C에서 120분, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분의 열처리에 의해 완전히 사멸되는 것이 확인되었다. 열처리에 따른 각 균주의 D값(일정한 온도에서 90%의 미생물을 사멸하는데 걸리는 시간)은 Fig. 2(B)에 나타내었다. 70, 80, 100, 121°C의 온도에서 처리한 SMF743의 D값은 각각 17.96, 11.98, 2.99, 1.50분, SMF796의 D값은 각각

Table 3. Antimicrobial activity of LAB strains

Indicator strains	Inhibitory zone (mm)		
	<i>L. plantarum</i> ATCC14917	<i>L. fermentum</i> SMF743	<i>L. plantarum</i> SMF796
<i>E. coli</i> KCTC1039	12.00±1.00 ^b	10.00±1.15 ^a	15.00±1.00 ^c
<i>S. aureus</i> KCCM11335	17.00±0.00 ^b	16.67±0.58 ^b	14.83±0.58 ^a

All values are mean±standard deviation of triplicate experiments.

^{a-c} Values with different superscript letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

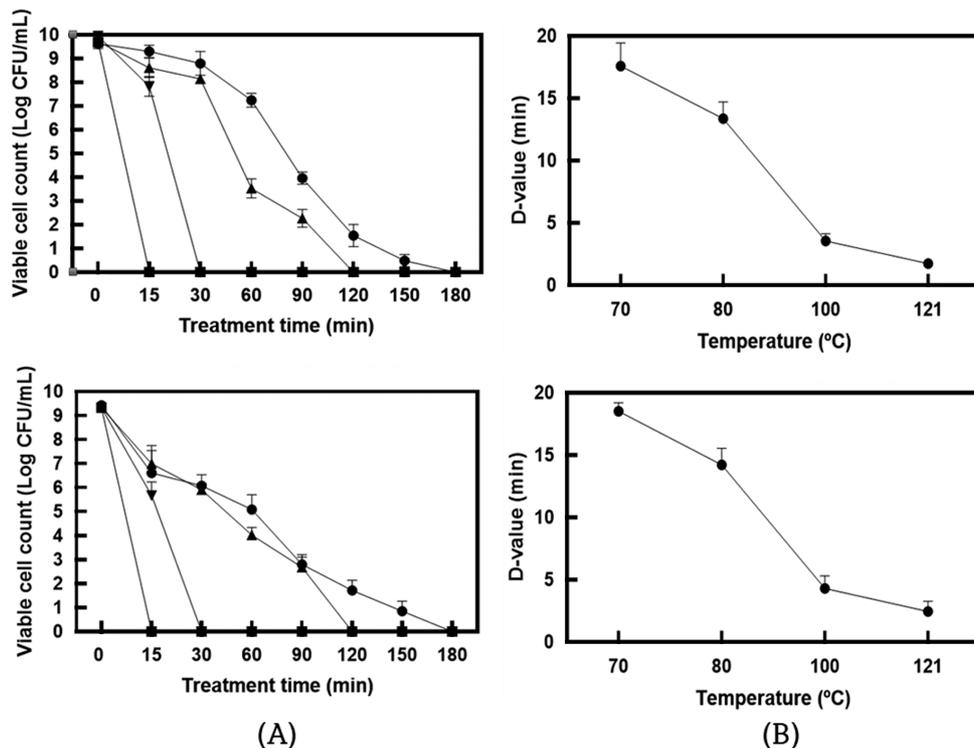


Fig. 2. Changes in viable cells (A) and thermal death curve (B) of *L. plantarum* SMF796 and *L. fermentum* SMF743 at several temperature conditions. Data are mean±standard deviation of triplicate experiments. (●), 70°C; (▲), 80°C; (▼), 100°C; (■), 121°C. D-value (decimal reduction time) indicates the number of minutes to reduce viable cells by 90%.

19.15, 12.77, 3.19, 1.60분으로 나타났다. Kim et al. (2017)은 70, 80, 90°C에서 증탕 열처리한 *Lactocaseibacillus rhamnosus* IDCC3201 균주의 D값이 각각 21.0, 9.8, 4.9분으로 보고한 바 있다. 본 연구 결과 70°C (180분), 80°C (120분), 100°C (30분), 121°C (15분)을 유산균 사균체 제조를 위한 열처리 조건으로 선정하고 이후 실험을 진행하였다.

열처리 사균체의 세포 독성 평가

MTT assay를 이용하여 열처리 사균체의 농도에 따른

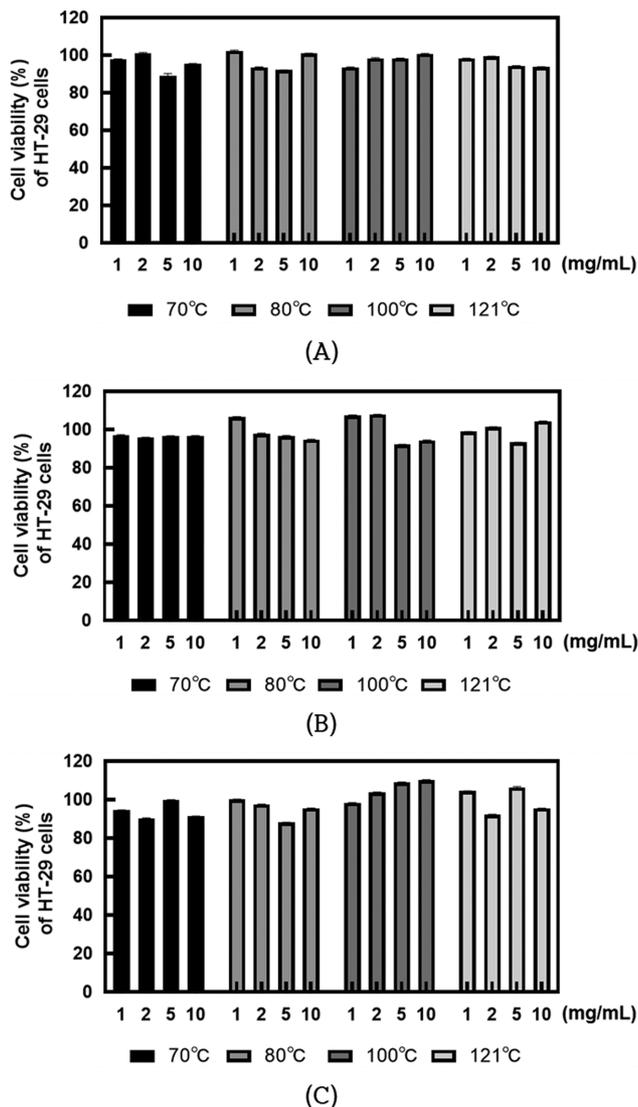


Fig. 3. Effect of heat-killed *L. plantarum* ATCC14917 (A), *L. fermentum* SMF743 (B), and *L. plantarum* SMF796 (C) on the viability of HT-29 cells. Heat-killed cells (1, 2, 5, 10 mg/mL) of LAB were prepared by heating at 70°C for 180 min, 80°C for 120 min, 100°C for 30 min, or 121°C for 15 min. Data are mean±standard deviation of triplicate experiments. (■), 70°C (180 min); (▤), 80°C (120 min); (▥), 100°C (30 min); (□), 121°C (15 min).

HT-29 세포의 세포 생존율을 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. HT-29 세포에 SMF743, SMF796, ATCC14917 균주의 열처리 사균체를 1, 2, 5, 10 mg/mL의 농도로 처리한 후 HT-29 세포의 생존율을 평가하였다. 3종의 균주 모두 열처리 온도 및 사균체 농도에 따른 뚜렷한 세포 생존율의 변화는 없었으며, 10 mg/mL의 고농도에서도 90% 이상의 높은 생존율을 보였다.

열처리 사균체의 항산화 활성

70°C (180분), 80°C (120분), 100°C (30분), 121°C (15분)의 열처리에 의해 제조한 유산균 사균체(1 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 측정할 결과는 Fig. 4와 같다. SMF743, SMF796, ATCC14917의 사균체 모두 80°C와 100°C 보다 70°C와 121°C에서 항산화 활성이 우수하였으며, 동일한 온도 조건에서 사균체가 생균 보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. SMF743 사균체, SMF796 사균체는 각각 70°C에서 19.46%, 21.12%, 121°C

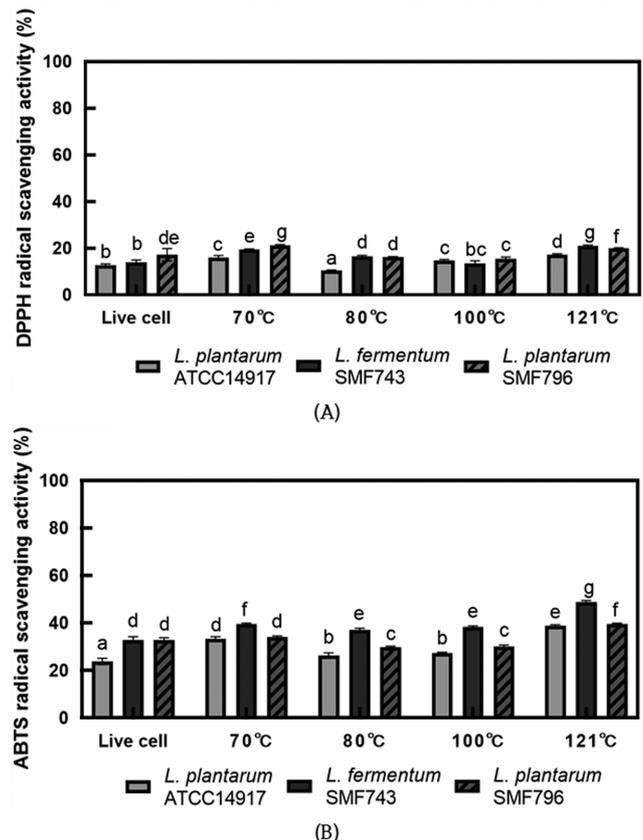


Fig. 4. Effect of live and heat-killed cells of LAB on DPPH radical scavenging activity (A) and ABTS radical scavenging activity (B). Heat-killed cells (1 mg/mL) of LAB were prepared by heating at 70°C for 180 min, 80°C for 120 min, 100°C for 30 min, or 121°C for 15 min. Data are mean±standard deviation of triplicate experiments. ^{a-g} Different letters indicate significant difference ($p<0.05$). (□), *L. plantarum* ATCC14917; (▤), *L. fermentum* SMF743; (▥), *L. plantarum* SMF796.

에서 20.89%, 20.03%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, SMF743 생균(13.85%), SMF796 생균(17.21%)과 비교하여 유의적으로 높은 소거능을 보였다($p < 0.05$). ABTS 라디칼 소거능의 경우에도 70°C와 121°C에서 열처리된 사균체의 라디칼 소거능이 높은 것으로 확인되었다. SMF743 사균체, SMF796 사균체는 각각 70°C에서 39.43%, 34.08%, 121°C에서 48.79%, 39.60%의 소거능을 보였으며, SMF743 생균(32.91%), SMF796 생균(32.70%)과 비교하여 유의적으로 높은 소거능을 나타내었다($p < 0.05$).

Cho et al. (2021)은 121°C에서 15분 열처리한 26종의 유산균 사균체(1 mg/mL)가 0.13-35.88% 범위의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, Son & Kang (2021)은 121°C에서 15분 열처리한 8종의 *L. plantarum* 사균체(1 mg/mL)가 15.14-31.29%의 ABTS 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 선별된 SMF743 사균체와 SMF796 사균체가 높은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 나타낸다는 것을 알 수 있으며, 향후 기능성 항산화제로 활용 가능할 것으로 판단된다. 유산균의 항산화 활성은 대사과정에서 생성된 glutathione과 α -tocopherol, 세포질에 존재하는 polysaccharide, 세포 표면의 EPS 물질 등이 관여한다고 알려져 있다(Kim & Park, 2021). 또한 열처리에 의해 세포에 존재하는 당류와 단백질이 반응하여 항산화활성을 갖는 Maillard 반응물을 생산하는 것으로 보고되었다(Liu et al., 2011). 본 연구에서 온도 조건에 따라 사균체의 항산화 활성에서 뚜렷한 차이가 보였는데, 이는 열처리 온도에 따라 세포질과 세포벽에서 용출되는 항산화물질과 생성된 Maillard 반응물의 농도 및 구조적인 차이에 기인되는 것으로 생각된다.

열처리 사균체의 Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

LPS 등 외부자극에 의해 과도하게 활성화된 대식세포는 inducible nitric oxide synthases (iNOS) 발현에 의해 L-arginine으로부터 nitric oxide (NO)의 생성을 촉진시키며, 과도한 NO 생성은 염증 반응을 촉진하여 조직의 손상 및 병적 반응을 일으킨다(Kim et al., 2009). 유산균 사균체의 NO 생성 억제 활성을 측정하기 위하여 RAW264.7 대식세포에 LPS (1 μ g/mL)가 첨가된 DMEM 배지와 사균체 시료 (1 mg/mL)를 첨가하여 NO 생성량을 분석하였다(Fig. 5). LPS로 처리한 대조군(+)이 LPS 비처리군(-)에 비해 NO 생성량이 많은 것으로 나타나 염증이 유도된 것을 확인하였다. ATCC14917 사균체와 비교하여, SMF743 사균체는 모든 열처리 조건에서 유의적으로 높은 NO 생성 억제 활성을 보였으며($p < 0.05$), SMF796 사균체는 70°C와 121°C의 열처리 조건에서 유의적으로 높은 억제 활성을 보였다($p < 0.05$). 특히 70°C에서 SMF743과 SMF796 사균체는 각각 65.08%와 66.14%의 높은 억제 활성을 나타내었으며, 121°C에서는 각각 63.76%와 58.99%의 억제 활성을 나타내었다. Son & Kang (2021)은 121°C에서 15분 열처리한 *L. plantarum* 사균체(1 mg/mL)가 22.32%의 NO 생성 억제 활성을 나타내었다고 보고하였으며, 이와 비교하여 SMF743과 SMF796 사균체의 NO 생성 억제 활성이 매우 우수하다는 것을 알 수 있다.

본 연구 결과 70°C (180분) 또는 121°C (15분)의 열처리가 80°C (120분), 100°C (30분)의 열처리와 비교하여 사균체의 항산화활성과 NO 생성 억제 활성에서 우수하였다. 따라서 70°C (180분)와 121°C (15분)의 열처리 조건을 기능성 유산균 사균체 제조를 위한 최적의 열처리 조건으로 선

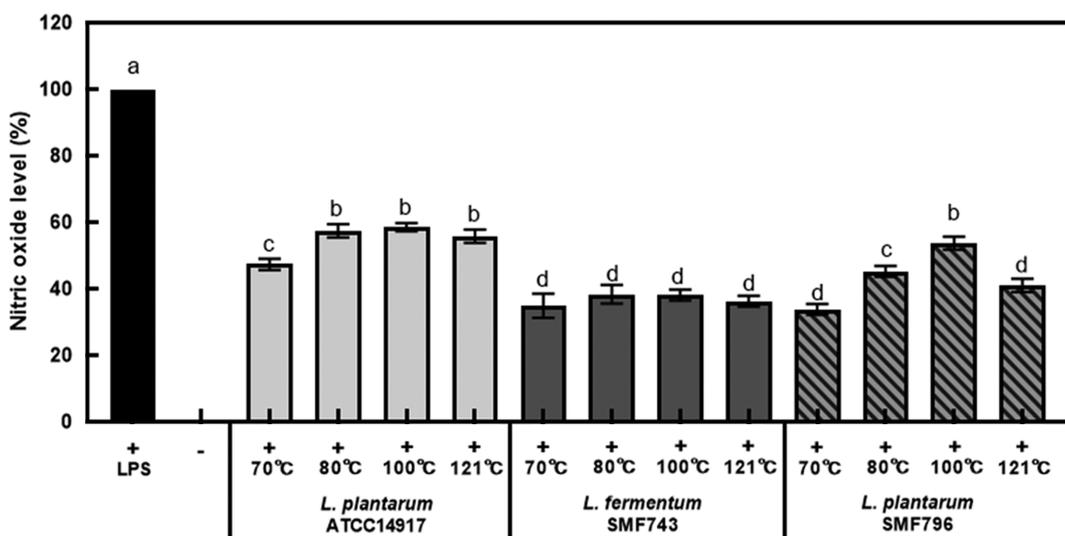


Fig. 5. Effect of heat-killed LAB on production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Heat-killed cells (1 mg/mL) of LAB were prepared by heating at 70°C for 180 min, 80°C for 120 min, 100°C for 30 min, or 121°C for 15 min. Data are mean±standard deviation of triplicate experiments. ^{a-d} Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$). (□), *L. plantarum* ATCC14917; (■), *L. fermentum* SMF743; (▨), *L. plantarum* SMF796.

정하였다.

열처리 사균체의 TNF- α , iNOS, COX-2 유전자 발현 억제 활성

정상적인 염증반응은 염증성 매개인들이 관여하는 대식세포의 활성화에 의해 조절되지만, LPS와 같은 면역자극 물질에 노출될 경우 과도하게 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 염증성 cytokine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2 (COX-2)의 과도한 발현을 촉진하여 염증을 악화시키고 조직을 손상시킨다(Lawrence et al., 2002). TNF- α 는 염증성 cytokine으로 염증성 자극에 노출될 경우 염증을 촉진하며, 염증반응의 대표적인 지표물질인 nitric oxide (NO)는 iNOS의 효소 작용에 의해 L-arginine으로부터 합성된다(Kim & Kim, 2015). 또한 COX-2는 arachidonic acid로부터 통증과 발열에 관여하는 염증 매개물질인 PGE2의 합성을 유도하는 효소로 iNOS와 더불어 염증반응에 주요 역할을 한다(Liden et al., 2000). 따라서 염증성 cytokine, iNOS, COX-2의 발현 억제는 염증성 질환의 치료와 예방을 위한 주요 목표가 된다.

유산균 사균체의 항염 활성을 알아보기 위하여 LPS의 자극으로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에 사균체(1 mg/mL)를 첨가한 후 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현 변화를 qRT-PCR을 이용하여 측정하였다(Fig. 6). 사균체 시료는 항산화 활성과 NO 생성 억제 활성이 가장 우수한 70°C와 121°C에서 열처리한 시료를 이용하였으며, 세포와 환경의 여러 조건에서도 발현 정도에 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 내부 대조군으로 사용하였다. LPS 비처리군(-)에 비해 LPS로 처리한 대조군(+)에서 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현이 현저하게 증가되었으며, 유산균 사균체 첨가에 의해 LPS에 의해 증가된 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현이 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). 모든 유산균 사균체 시료에서 70°C (180분)와 비교하여 121°C (15분)에서 열처리한 사균체의 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현 억제 활성이 높았다. LPS를 처리한 대식세포에 121°C (15분)에서 열처리한 SMF743과 SMF796 사균체를 첨가하였을 경우, LPS 단독처리군과 비교하여 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현이 각각 최대 53.33%, 58.67%, 83.67% 저해되는 것으로 나타났다.

본 연구 결과, 김치에서 분리된 *L. fermentum* SMF743과 *L. plantarum* SMF796 균주는 프로바이오틱스 활성을 나타내었으며, 70°C (180분) 또는 121°C (15분)의 열처리에 의해 항산화 및 항염 활성이 우수한 사균체를 얻을 수 있었다. 따라서 선별된 SMF743과 SMF796 균주는 프로바이오틱스 생균제 또는 스타터로 활용 가능하며, 사균 처리 시 안전하게 섭취할 수 있는 항산화제 및 항염제료의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

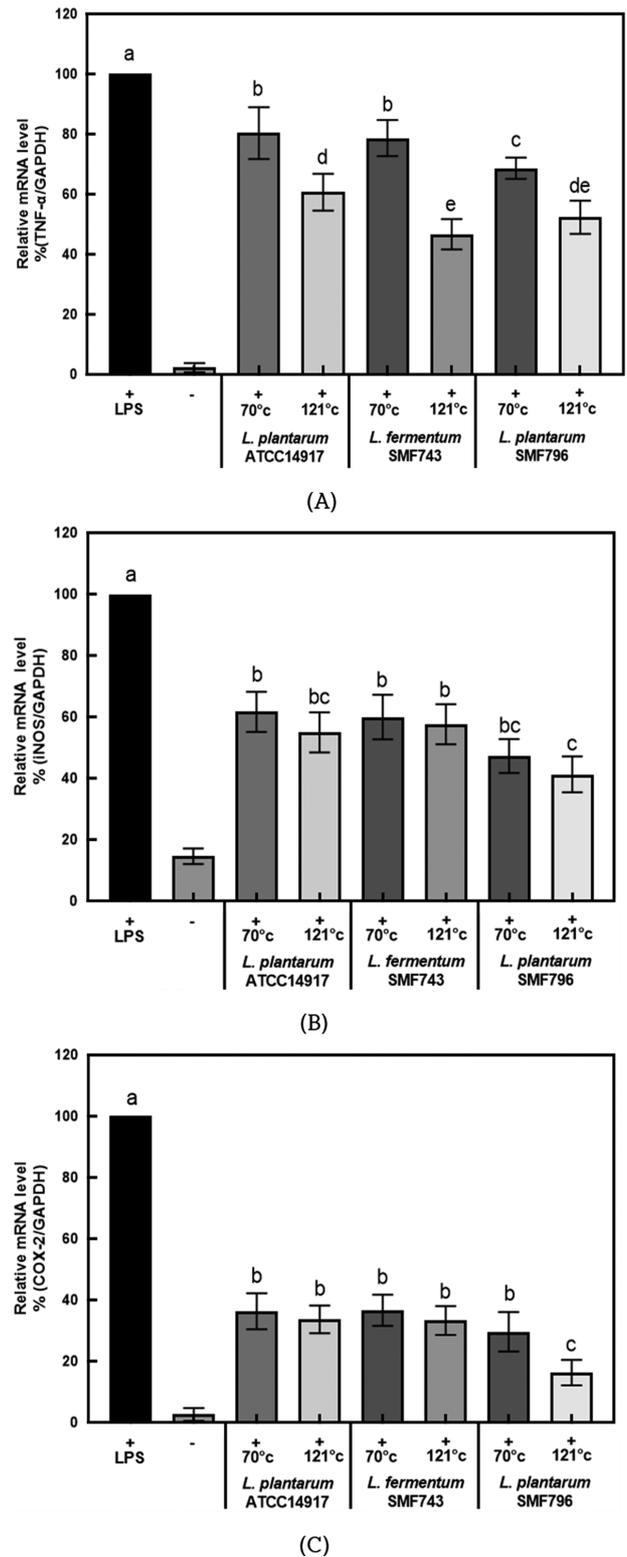


Fig. 6. Effect of heat-killed LAB on gene expression of TNF- α (A), iNOS (B), and COX-2 (C) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Heat-killed cells (1 mg/mL) of LAB were prepared by heating at 70°C for 180 min or 121°C for 15 min. All values are mean \pm standard deviation of triplicate experiments. ^{a-e} Different superscript letters on each bar represent significant differences ($p < 0.05$).

요 약

김치로부터 분리된 유산균 중 프로바이오틱스 활성이 우수한 2종의 유산균을 선별하여 다양한 온도 조건에서 사균체를 제조하고 항산화 및 항염 활성을 평가하였다. *Limosilactobacillus fermentum* SMF743과 *Lactiplantibacillus plantarum* SMF796 균주는 위산과 담즙염에 대한 저항성 및 장세포(HT-29)에 대한 부착능이 우수하였으며, *E. coli* KCTC1039와 *S. aureus* KCCM11335에 대한 강한 항균활성을 나타내었다. 열처리 조건에 따른 유산균의 사균율과 세포독성을 측정된 결과, 70°C에서 180분, 80°C에서 120분, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분의 열처리에 의해 완전히 사멸된 사균체(1 mg/mL)를 얻을 수 있었으며, 장세포는 10 mg/mL의 고농도에서도 90% 이상의 높은 생존율을 보였다. SMF743과 SMF796 사균체는 생균과 비교하여 유의적으로 높은 항산화 활성(DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능)을 보였으며($p < 0.05$), 70°C (180분) 또는 121°C (15분)의 열처리에 의해 항산화활성과 NO 생성 억제 활성이 높은 사균체를 얻을 수 있었다. SMF743과 SMF796 사균체 처리에 의해 LPS를 처리한 RAW264.7 대식세포에서 염증성 매개인자들의 유전자 발현을 유의적($p < 0.05$)으로 감소시켰으며, 121°C (15분)의 열처리에 의해 제조된 사균체는 TNF- α , iNOS, COX-2의 발현을 각각 최대 53.33%, 58.67%, 83.67% 억제하였다. 따라서 본 연구 결과, 김치에서 분리한 *L. fermentum* SMF743과 *L. plantarum* SMF796 균주는 프로바이오틱스 생균제로 활용 가능하며, 70°C (180분) 또는 121°C (15분)에서 열처리 시 항산화 및 항염 활성이 우수한 기능성 사균체로의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단 기본연구지원사업(2021R1F1A1056371)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Adams CA. 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nut. Res. Rev.* 23: 37-46.
- Akter S, Park JH, Jung HK. 2020. Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30(4): 477-481.
- Cheon MJ, Lim SM, Lee NK, Paik HD. 2020. Probiotic properties and neuroprotective effects of *Lactobacillus buchneri* KU200793 isolated from Korean fermented foods. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1227.
- Cho KK, Lee SH, Choi IS, Lee SW. 2021. Next-generation probiotics, paraprobiotics, and postbiotics. *J. Life Sci.* 31(6): 595-602.
- Choi HJ. 2019. Recent advances on next-generation probiotics linked to the gut microbiome. *Food Sci. Ind.* 52(3): 261-271.
- Chuah LO, Foo HL, Loh TC, Alitheen NBM, Yeap SK, Mutalib NEA, Rahim RA, Yusoff K. 2019. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complem. Altern. M.* 19: 114.
- de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. 2016. Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends. Food Sci. Technol.* 58: 96-114.
- 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 finding. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 386-392.
- Herich R, Levkut M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. -Czech.* 47(6): 169-180.
- Jayaprakasha HM, Yoon YC, Paik HD. 2005. Probiotic functional dairy foods and health claims: An overview. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 523-528.
- Jung SE, Kim SH. 2015. Probiotic Properties of lactic acid bacteria Isolated from commercial raw makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47(1): 44-50.
- Kim UB, Park SS. 2021. The concepts and applications of postbiotics for the development of health functional food product. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics.* 7(1): 14-22.
- Kim MJ, Yu SM, Kim DY, Heo TI, Lee JW, Park JA, Park CS, Kim YS. 2018. Physicochemical characterization of fermented *Rhododendron micranthum* Turcz. extract and its biological activity. *J. Life Sci.* 28(8): 938-944.
- Kim MK, Kim DY. 2015. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. *Korean J. Food Preserv.* 22(5): 735-743.
- Kim SI, Kim IC, Chang HC. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 526-533.
- Kim WJ. 2018. Understanding of killed lactic acid bacteria as a probiotics. *Korean J. Clin Pharm.* 4(2): 115-122.
- Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38(4): 462-469.
- Kim YH, Lee B, Kang JH, Kang DJ. 2017. Development of tyndallized *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 with immunomodulation: optimization, validation, and in vitro evaluation. *KSBB Journal* 32(4): 271-278.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Rev. Immunol.* 2: 787-795.
- Lee SH, Kwon MJ, Kang HT, Chung CW, Kim BO, Kim JS. 2015. The anti-inflammatory effects of probiotic-produced exopolysaccharide. *J. Life Sci.* 25(6): 709-714.
- Lee XM, Lee HA, Kweon M, Park ES, Park KY. 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45(12): 1717-1724.
- Lertcanawanichakul M, Kannai J, Wongmuang P, Tharaporn S. 2015. Cholesterol lowering potentials of lactic acid bacteria with potential probiotic properties. *Int. J. Pharmtech. Res.* 7(3): 463-470.
- Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S. 2000. Gluco-

- corticoid effects on NF- κ B binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 1008-1014.
- Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J. Sci. Food Agr.* 91(12): 2284-2291.
- Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadav H. 2020. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb. Cell Factories.* 19: 168.
- Ohashi Y, Ushida K. 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim. Sci. J.* 80(4): 361-371.
- PiquéN, Berlanga M, Miñana-Galbis D. 2019. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics. *Int. J. Mol. Sci.* 20(10): 2534.
- Re R, Pellefrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. 2009. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 16: 763-774.
- Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Cur. Opin. Biotechnol.* 20(2): 135-141.
- Shin JH, Lee JS, Seo JG. 2015. Assessment of cell adhesion, cell surface hydrophobicity, autoaggregation, and lipopolysaccharide-binding properties of live and heat-killed *Lactobacillus acidophilus* CBT LA1. *Korean J. Microbiology* 51(3): 241-248.
- 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(1): 101-104.
- Son HR, Kang SM. 2021. Evaluation of the antioxidant activity of lactic acid bacteria heat-killed cells derived from mulkimchi. *J. Kor. Soc. Cosmetol.* 27(4): 868-879.
- Tulumoglu S, Yuksekdog ZN, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B, Yasar E. 2013. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe.* 24: 36-42.
- Wang Y, Zhou J, Xia X, Zhao Y, Shao W. 2016. Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* FM-LP-4 isolated from Xinjiang camel milk yoghurt. *Int. Dairy J.* 62: 28-34.

Author Information

- 이은수: 선문대학교 식품과학과 대학원생(석사과정)
 유청빈: 선문대학교 식품과학과 대학원생(석사과정)
 이민경: 선문대학교 식품과학과 학부생(학·석사 연계과정)
 황운식: 선문대학교 식품과학과 대학원생(석사과정)
 박 훈: 선문대학교 식품과학과 정교수