

Probiotic 유산균 발효에 의한 다시마(*Saccharina japonica*) 추출액의 항산화 활성

류대규¹ · 박슬기² · 강민균¹ · 정민철¹ · 조두민¹ · 장유미¹ · 정희진¹ · 이도하¹ · 김영목^{1,2*}

¹부경대학교 식품공학과, ²부경대학교 식품연구소

Antioxidant Activity of Kelp *Saccharina japonica* Extract Fermented by Probiotic Lactic Acid Bacteria

Dae-Gyu Ryu¹, Seul-Ki Park², Min-Gyun Kang¹, Min-Chul Jeong¹, Du-Min Jo¹, Yu-Mi Jang¹, Hee-Jin Jeong¹, Do-Ha Lee¹ and Young-Mog Kim^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

The objective of this study was to investigate the effect of lactic acid bacteria (LAB) fermentation on the antioxidant activity of kelp *Saccharina japonica* water extract. Three LAB strains that had exhibited superior antioxidant activity in a previous study were selected for the kelp fermentation starter. The antioxidant activity of the fermented extracts was analyzed during fermentation. After 48 h of fermentation, the extract-fermented *Lactobacillus plantarum* D-11 strains showed the highest antioxidant activity in terms of DPPH (2,2-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical scavenging, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical scavenging, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assay. Furthermore, the analysis of total phenolic and flavonoid contents revealed that the enhanced antioxidant activity was mainly due to the increased antioxidant content from fermentation. Thus, this study suggests that probiotic LAB fermentation is an attractive approach for the development of various kelp fermentation products.

Keywords: Antioxidant activity, Fermentation, Lactic acid bacteria, *Saccharina japonica*

서 론

최근 소비자의 생활수준 향상과 더불어 건강에 대한 인식이 증가하면서 건강기능식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 따라 다양한 생리활성을 가진 농산물 및 해양생물 등을 이용한 식품소재개발, 기능성 소재 연구 및 건강 기능성식품 개발이 활발하게 이루어지고 있다(Han et al., 2015; Lee et al., 2017; Kang et al., 2018). 특히, 최근 해양생물자원의 양식이 용이해짐에 따라 해조류를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다. 해조류는 항종양성, 항바이러스성, 항혈액응고 및 면역력 증진 등의 생리기능을 갖는 것으로 알려져 있으며, 이러한 해조류의 특이성에 착안하여 다양한 생리활성 물질들이 탐색되고 있다(Han et al., 2015; Lee et al., 2017). 해조류 중 많이 알려진 다시마

(*Saccharina japonica*)는 아시아 해안에서 많이 분포하는 갈조식물군 중 다시마과에 속하며, 우리나라의 경우에는 남해안에 많이 서식하고 있으며 아미노산(glutamic acid, aspartic acid 등)과 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 등 무기질이 풍부한 알칼리 식품으로 알려져 있다(Lee et al., 2017). 또한 다시마는 알긴산, 후코이단 등의 해조 다당류도 풍부하게 함유하고 있어 건강 기능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 항균성, 항바이러스 활성, 항암 활성 및 항산화 활성 등 다양한 활성을 가지고 있는 천연소재로서 각광을 받고 있다(Eom et al., 2010; Kang et al., 2018; Jung et al., 2019). 이러한 해조류의 유용성분을 추출하여 이용할 때에는 해조류를 열수 추출이나 알칼리, 산 또는 효소처리 등에 의하여 추출 후 가공하는 방법들이 대부분으로 알려져 있으나 이러한 추출공정은 탄수화물 및 여러가지 생체 활

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: ymkim@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.2020.0361>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 361-367, June 2020

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

저자 직위: 류대규(대학원생), 박슬기(연구원), 강민균(대학원생), 정민철(대학원생), 조두민(대학원생), 장유미(대학원생), 정희진(대학원생), 이도하(대학원생), 김영목(교수)

성 물질을 변질 및 파괴시키는 단점이 존재한다(Kim and Bae, 2002). 또한 해조류 추출공정에서 발생하는 알긴산 등의 점질 다당류와 해조류 특유의 향, 풍미 및 조직감 등이 해조류를 이용한 제품 개발의 문제점으로 지적되고 있다(Eom et al., 2010).

이에 따라 해조류가 가지고 있는 단점을 극복하기 위하여 발효를 이용한 연구가 다양하게 수행되고 있다. 발효는 고분자 유기물질을 상대적으로 단순한 물질로 분해할 수 있는 미생물과 그 효소를 이용하여 식품의 영양을 증진시키고 생리활성 물질을 개선하는 등의 작용을 통해 기능적 및 영양학적 특성 향상에 매우 중요한 작용을 할 수 있다(Jung et al., 2019). 이에 따라 최근 유산균 등의 미생물을 이용한 발효를 통해 해조류 추출물이 prebiotics로 이용될 수 있다고 보고되고 있으며, 이러한 유용 미생물에 의한 발효를 통해 새로운 생리활성 물질이 생성되고 유용 성분이 증가될 수 있다고 보고되고 있다(Song et al., 2011; Lee et al., 2016b; Bae et al., 2019). 본 연구는 다시마김치에서 분리된 유산균(Lactic acid bacteria, LAB)을 이용하여 다시마 발효 추출물을 제조하였으며 발효 추출물의 생리활성 물질과 항산화 활성의 확인을 통하여 해조류 발효연구에 대한 기초 연구결과를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

다시마 발효 추출물 제조

본 연구에 사용된 건 다시마는 2018년 2월에 기장산 다시마를 구입하여 사용하였다. 다시마의 염을 제거하기 위해 물로 3회 세척한 후 일광 건조하였다. 건조된 다시마를 분쇄기(HMF-1000A; Hanil Electronics, Seoul, Korea)를 통해 분쇄한 후 -70°C 심온동결고(CLN-52U; Nihon Freezer Co., Ltd., Saitama, Japan)에 보관하며 실험에 사용하였다. 다시마 추출물 제조는 Eom et al. (2010)이 보고한 방법에 따라 건조된 다시마 분쇄물에 20배의 증류수(w/v)를 첨가하고 121°C에서 15분간 열수 추출하였다.

다시마 추출액 발효를 위해 2017년 8월 다시마김치에서 분리하여 부경대학교 식품공학과 식품미생물실험실에서 보유하고 있는 LAB 중에서 항산화 활성이 우수한 3종의 분리 균주(*Lactobacillus plantarum* D-01, *L. plantarum* D-02 및 *L. plantarum* D-11)를 선정하였으며 다시마 열수 추출액을 0, 12, 24 및 48시간 동안 발효하여 실험을 진행하였다(Ryu et al., 2020). LAB를 첨가하지 않은 다시마 추출액을 음성 대조구로 선정하여 시험을 진행하였으며, 산업용으로 많이 사용되며 기능적으로 우수성이 보고된 probiotic LAB인 *L. rhamnosus* KCTC 5033 (LR, Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)를 양성대조구로 사용하였다(Lee et al., 2016a). 본 연구에 사용된 LAB는 deMan Rogosa Sharpe medium (MRS; Difco, Detroit, MI, USA)에서 37°C으로 24시간 배양한 뒤 균체가 포함된 배양액을 다시마 추출액에 10% 접종하였다. 시간 조건 별로 37°C

에서 진탕 배양(120 rpm)한 발효액을 94% 에탄올로 추출 후 여과하여 진공회전증발농축기(Eyela; Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 농축한 뒤 동결 건조하여 분말화 한 후에 10 mg/mL의 농도로 증류수에 녹인 것을 본 연구에 사용하였다.

총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

다시마 발효 추출물의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법(Waterman and Mole, 1994)을 일부 수정한 Kim et al. (2006)의 방법에 따라 gallic acid를 표준물질로 하여 총 페놀 함량을 측정하였다. Hu et al. (2018)의 총 폴리페놀 함량 측정시 사용되는 대표 표준 물질은 탄닌산, 카테킨, 갈릭산 등이 사용되는데 보고를 바탕으로 본 연구에서는 gallic acid를 표준 물질로 하여 검량곡선에 대조 후 측정하는 방법을 사용하여 총 페놀 함량을 측정하였다. 시료 100 µL에 400 µL의 1 N Folin and Ciocalteu 시약(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 첨가하고 실온에서 3분간 방치한 다음 7.5% Na₂CO₃ (Junsei Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan) 320 µL를 첨가 후 암실에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 상등액 200 µL를 형광분광 광도계(GENios® microplate reader, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 통해 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 페놀 화합물 함량은 gallic acid (Sigma-Aldrich)를 표준 물질로 하여 gallic acid equivalents (mg GAE/g)로 나타내었다.

다시마 발효 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno et al. (2000)의 방법을 응용하여 분석하였다. 각 시료 100 µL에 증류수 300 µL와 5% NaNO₂ 30 µL를 첨가하여 5분간 방치한 뒤 10% AlCl₃ 30 µL를 가하고 잘 혼합한 후 실온에 5분간 방치한다. 방치가 끝난 각 혼합액에 1 M NaOH 200 µL를 첨가 후 혼합액 200 µL를 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 검량곡선에 대조하여 측정하였으며 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone (quercetin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 표준 물질로 하여 quercetin equivalents (mg QE/g)로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 측정

다시마 발효 추출물의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 분석은 각 시료 20 µL와 150 µM DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액 180 µL를 30분간 상온의 암실에서 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH radical 소거 활성은 0.2 mM의 L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 하여 작성한 검량곡선과 대조하여 결과로 나타내었으며 아래의 식으로 계산하여 ascorbic acid equivalents (mg AE/g)로 나타내었다.

$$\text{DPPH (mg AE)} = \frac{C_{\text{L-ascorbic acid}} \times (\text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}) \times k}{\text{AUC}_{\text{L-ascorbic acid}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}}$$

ABTS radical 소거능 측정

다시마 발효 추출물의 ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] radical 소거 활성 분석은 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 흡광도값을 0.700 ± 0.005 가 되도록 희석하여 사용하였다. ABTS 용액 190 μ L과 시료 10 μ L를 혼합하여 6분간 상온의 암실에서 반응 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS radical 소거 활성은 5 mM의 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준 물질로 하여 작성한 검량곡선과 대조하여 결과로 나타내었으며 아래의 식으로 계산하여 trolox equivalents (mg TE/g)로 나타내었다.

$$\text{ABTS (mg TE)} = \frac{C_{\text{Trolox}} \times (\text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}) \times k}{\text{AUC}_{\text{L-ascorbic acid}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}}$$

Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 측정

다시마 발효 추출물의 ORAC 측정은 Zulueta et al. (2009)의 방법에 따라 분석하였다. 5배 희석한 시료 50 μ L와 78 nM의 fluorescein 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 μ L를 혼합하여 37°C에서 15분간 반응한 후, 25 μ L의 221 mM의 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 반응시켰다. 형광 분광 광도계로 반응액에서의 형광물질의 감소 정도를 37°C에서 60분(5분간 1회, 총 12회) 동안 485 nm에서 전자가 여기되고, 535 nm에서 방출되게 조절하여 측정하였다. 시료의 ORAC 측정값은 trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준 물질로 하여 trolox equivalents (μ M TE/g)로 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

다시마 발효 추출물의 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 (TPTZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution 및 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 실험 직전에 제조하여 사용하였다. 시료 100 μ L에 FRAP 용액 2 mL를 넣고 30분간 반응시킨 후 96 well plate에 상등액 200 μ L를 옮기고 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, L-ascorbic acid를 표준 물질로 하여 ascorbic acid equivalents (mg AE/g)로 나타내었다.

통계분석

본 연구에서 실시한 모든 실험 측정은 3회 반복하였으며, 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후, $P < 0.05$ 수준

에서 사후검증으로 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)를 실시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS (v.23.0, SPSS Inc., USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

LAB 발효에 의한 다시마 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 변화

본 연구에서는 선행연구에서 분리한 LAB 균주들 중에서 항산화 활성이 우수하면서 probiotics 로 분류되는 3종의 LAB (*L. plantarum* D-01, *L. plantarum* D-02 및 *L. plantarum* D-11)를 이용하여 다시마 추출물을 발효하고 그 특성에 대하여 분석하였다(Ryu et al., 2020). LAB 다시마 발효 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 결과는 Table 1에 나타내었다. LAB을 통해 발효시킨 모든 다시마 발효 추출물의 총 페놀 함량은

Table 1. Changes of total phenolic and flavonoid contents in kelp *Saccharina japonica* water extract by the fermentation of probiotic lactic acid bacteria

LAB strains	Time (h)	Total phenolic contents (mg GAE/g)	Total flavonoid contents (mg QE/g)
Control	0	9.57 \pm 0.31 ^{Lc}	8.39 \pm 0.96 ^{Kc}
	12	10.10 \pm 0.20 ^{Lc}	9.50 \pm 0.03 ^{JKbc}
	24	15.23 \pm 0.76 ^{Ja}	12.28 \pm 0.96 ^{Aa}
	48	12.10 \pm 0.40 ^{Kb}	10.06 \pm 0.96 ^{GHJb}
<i>Lactobacillus plantarum</i> D-01	0	18.57 \pm 0.23 ^{Hc}	10.61 \pm 3.47 ^{HIJKb}
	12	20.50 \pm 0.35 ^{EFb}	13.39 \pm 0.96 ^{EFGHab}
	24	22.17 \pm 0.12 ^{BCDa}	15.06 \pm 0.96 ^{ABa}
<i>L. plantarum</i> D-02	48	21.03 \pm 0.50 ^{DEb}	13.39 \pm 0.57 ^{EFGab}
	0	18.90 \pm 0.40 ^{GHb}	9.50 \pm 0.10 ^{JKb}
	12	18.90 \pm 0.53 ^{GHb}	12.83 \pm 1.67 ^{GHla}
	24	22.03 \pm 0.31 ^{BCDa}	14.50 \pm 0.05 ^{DEFGa}
<i>L. plantarum</i> D-11	48	21.23 \pm 1.27 ^{CDEa}	13.94 \pm 0.96 ^{EFGa}
	0	19.57 \pm 0.31 ^{FGHc}	10.61 \pm 0.46 ^{IJKc}
	12	20.50 \pm 0.20 ^{EFc}	10.61 \pm 0.96 ^{HIJKc}
	24	24.50 \pm 0.53 ^{Aa}	18.39 \pm 0.96 ^{ABCa}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	48	22.43 \pm 1.33 ^{BCDb}	13.94 \pm 0.96 ^{DEFGb}
	0	15.50 \pm 0.40 ^{Jd}	11.72 \pm 2.55 ^{HIJKb}
	12	16.77 \pm 0.50 ^{lc}	16.17 \pm 0.05 ^{CDEFa}
	24	21.83 \pm 0.12 ^{BCDa}	17.28 \pm 0.96 ^{ABCDa}
	48	19.70 \pm 0.53 ^{FGb}	16.72 \pm 0.96 ^{BCDEa}

LAB, lactic acid bacteria. Each value represented mean \pm SD; values sharing the same lowercase letters within each strain are not significantly different at $P < 0.05$; values sharing the same uppercase letters within a column are not significantly different at $P < 0.05$.

24시간까지 증가하는 경향을 보였으며 이후 48시간에서 감소되는 경향으로 나타났다. 양성대조구인 LR은 발효 24시간에서 21.83 ± 0.12 mg GAE/g으로 나타났으며, 분리균주 3종의 발효 24시간 후 페놀 함량은 D-11 균주에서 24.50 ± 0.53 mg GAE/g, D-01 균주에서 22.17 ± 0.12 mg GAE/g 및 D-02에서 22.03 ± 0.31 mg GAE/g 순으로 나타났다. 분리균주 3종의 경우 모든 균주에서 발효 24시간에서 가장 높은 총 페놀함량을 나타내었으며 0, 12, 24 및 48시간의 발효 과정에서의 총 페놀 함량이 모두 표준균주보다 높게 나타났다.

다시마 발효 추출물의 플라보노이드 함량도 총 페놀 함량과 유사한 경향으로 나타났다. 표준균주인 LR은 발효 24시간에서 17.28 ± 0.96 mg QE/g으로 측정되었으며, 발효 24시간에서 D-11은 18.39 ± 0.96 mg QE/g, D-01은 15.06 ± 0.96 mg QE/g, D-02은 14.50 ± 0.12 mg QE/g의 순서로 플라보노이드 함량이 측정되었다. D-11의 경우 총 페놀함량과 플라보노이드 함량이 가장 높은 수치로 증가하는 것으로 나타났다. Lee and Hong (2016)는 블루베리 발효에서 플라보노이드 함량은 발효 전 0.49 ± 0.09 g/100 g으로 나타났으나 발효 후 0.91 ± 0.22 g/100 g으로 플라보노이드 함량이 증가한다는 경향으로 분석되었고 보고하여 발효 중 미생물에 의해 분해산물로서 플라보노이드 함량이 증가되었다고 보고하였다. 본 연구의 결과에 따르면 다시마 추출물이 LAB에 의해 발효가 진행됨에 따라 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량이 증가하는 것은 LAB에 의한 발효 중에 생성되는 protease, amylase, lipase 등의 효소로 인한 페놀 및 플라보노이드 화합물의 당화, 탈당화, 고리열림, 메틸화, 글루크론산화 등의 대사에 의한 것으로 판단된다(Park et al., 2012; Huynh et al., 2014). 또한, Kim et al. (2000)의 보고에 따르면 항산화 효과 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있는 페놀 화합물의 총 함량이 높을수록 일반적으로 항산화 활성 또한 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 LAB를 이용한 다시마 발효 추출물은 시간에 의존적으로 발효가 진행됨에 따라 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량 및 항산화 활성이 증가되어 고부가가치 제품 개발 및 원료로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

LAB 발효에 의한 다시마 발효 추출물의 항산화 활성의 증가

LAB를 이용한 다시마 발효물의 DPPH radical 소거 활성, ABTS radical 소거 활성, ORAC 및 FRAP에 대한 실험결과는 Table 2에 나타내었다. DPPH radical 소거 활성 측정 결과 24시간까지 증가하는 경향을 보였으며 이후 48시간에서 감소되는 경향으로 나타났다. 음성 대조구의 경우 발효 24시간에 19.93 ± 4.04 mg AE/g으로 나타났으며 양성대조구와 분리 균주 3종과 비교 시 유의적으로 낮게 나타났다. 양성 대조구 LR은 24시간 발효에서 39.55 ± 4.16 mg AE/g으로 분석되었다. 분리 균주 3종의 경우 24시간 발효에서 가장 높은 활성을 나타낸 균

주는 D-11로 발효 24시간에서 53.46 ± 1.25 mg AE/g로 나타났으며, D-02는 43.08 ± 1.15 mg AE/g으로 D-01은 40.31 ± 1.59 mg AE/g의 순서로 나타났다. 하지만 D-01은 시간의존적으로 DPPH radical 소거 활성의 유의적 증가가 나타나지 않았으며, D-02와 LR의 경우 발효 24시간 이후에는 유의적으로 활성이 증가했다.

본 연구 결과는 Han et al. (2002)의 보고된 바와 같이 본래 항산화 활성을 가지고 있는 다시마 추출물에 LAB를 접종하여 발효가 진행됨에 따라 DPPH radical 소거 활성이 증가된 것으로 판단되며 Eom et al. (2010)도 *Saccharomyces cerevisiae* SC-2를 이용하여 다시마 추출액을 발효하였을 때 양성 대조구로 사용된 butylated hydroxyanisole의 50 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 48.7%와 83.8%를 나타낸 반면 정제된 화합물이 아닌 다시마 발효액에서는 같은 농도에서 67.4%와 80%의 높은 활성을 나타내어 미생물 발효를 통하여 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다고 보고하였다.

Song et al. (2011)은 7종의 *Lactobacillus brevis* 균주를 이용하여 톳 추출액을 48시간 발효하였을 때 대조구보다 증가된 DPPH radical 소거 활성을 나타났다고 보고 되었으며 Jeon et al. (2011)도 인삼 열매 추출물과 LAB 인삼 열매 발효 추출물의 DPPH free radical 소거 활성을 비교한 결과 LAB 인삼 열매 발효 추출물에서 인삼 열매 추출물보다 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

LAB를 이용한 다시마 발효 추출물의 ABTS radical 소거 활성 측정 결과는 DPPH radical 소거 활성 측정과 유사한 경향으로 24시간까지 유의적으로 증가하다 소거 활성이 48시간에서 감소하는 경향으로 나타났다. 음성 대조구의 ABTS radical 소거 활성은 발효 24시간에 61.11 ± 6.13 mg TE/g으로 나타났으며 양성 대조구인 LR은 24시간 발효에서 77.45 ± 5.67 mg TE/g으로 분석되었다. 분리균주 3종의 경우 24시간 발효에서 가장 높은 ABTS radical 소거 활성을 나타낸 균주는 D-11로 발효 24시간에서 84.98 ± 0.81 mg TE/g이며, D-01의 경우 78.74 ± 1.71 mg TE/g로 나타났지만, D-02에서는 ABTS radical 소거활성이 통계적으로 유의한 증가가 나타나지 않았다. 본 연구 결과는 LAB 발효를 통한 버섯 추출물의 ABTS radical 소거 활성이 증가하였다고 보고한 Yang et al. (2014)의 연구결과와 Kim et al. (2016)의 *L. plantarum*을 이용하여 다시마를 발효한 균에서 ABTS 소거 활성이 유의적으로 증가하였다고 보고한 결과와 유사한 결과로 확인되었다. ABTS radical 소거 활성 측정 결과 DPPH radical 소거 활성 보다 증가폭이 다소 높은 것으로 측정되었는데, Jeng et al. (1994)은 DPPH는 free radical을 ABTS는 양이온 radical을 소거하는 점에서 서로 차이가 나며 두 기질과 반응물과의 결합 정도가 달라 radical 제거 능력에서도 차이가 나타난다고 보고하였다.

LAB을 이용하여 발효시킨 다시마 추출물의 ORAC 측정 결

과도 Table 2에 나타내었으며 모든 실험군 중 D-11 균주 24시간에서만 유의적인 활성이 나타났다. 그 외 음성 대조군, 양성 대조군, D-01, 및 D-02의 ORAC 측정값은 유의적 차이가 나타나지 않았다. 분리균주 3종 중에서 가장 높은 ORAC 측정값을 보인 분리 균주는 D-11로 발효 24시간에서 $268.82 \pm 9.34 \mu\text{M TE/g}$ 으로 나타났으며 발효 48시간에서는 소폭 감소하여 $262.57 \pm 10.30 \mu\text{M TE/g}$ 으로 나타나 다른 시험구와 유의적 차이가 나타나지 않았다.

LAB 다시마 발효 추출물의 FRAP 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. 음성 대조군의 FRAP 측정값은 0시간에서 $102.13 \pm 1.15 \text{ mg AE/g}$ 으로 나타났으며 발효 24시간에서 $164.80 \pm 2.00 \text{ mg AE/g}$ 및 발효 48시간 후 $152.13 \pm 1.15 \text{ mg AE/g}$ 으로 나타났지만, 유의적으로 큰 차이가 나타나지 않았다. 양성 대조군 LR의 FRAP 측정값은 시간의존적으로 증가하여 발효 48시간에서 가장 높은 $258.13 \pm 1.15 \text{ mg AE/g}$ 으로 측정되었으며, 발효 24시간부터 FRAP 측정값에 유의적인 증가가

나타났다. 모든 분리균주의 발효 24시간에서 양성대조군 LR보다 높은 FRAP 측정값을 보였으며, 그 중 가장 높은 활성을 보인 D-11 균주는 발효 24시간에서 $409.47 \pm 2.31 \text{ mg AE/g}$ 로 나타났으며 다음으로 D-01이 발효 24시간에서 $298.80 \pm 2.00 \text{ mg AE/g}$ 으로 D-02가 발효 24시간에서 $284.80 \pm 0.15 \text{ mg AE/g}$ 의 순서로 확인되었다. Park et al. (2017)에서는 *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei* 및 *L. plantarum*를 이용하여 발효한 여주에서 24시간 내에 FRAP 측정값이 크게 증가하였다고 보고하였으며, Lee and Hong (2016)는 무발효 블루베리에서 $191.52 \mu\text{M}$ 의 FRAP 측정 값으로 나타났으나 LAB를 이용한 블루베리 발효물에서는 $256.42 \mu\text{M}$ 로 무발효 블루베리보다 높은 FRAP 측정 값이 나타났다고 보고 하였다. 이는 본 연구의 LAB 다시마 발효 추출물에서의 FRAP 측정 값이 증가한 경향과 일치하는 것으로 판단되며 본 연구에 사용된 양성 대조군을 포함한 LAB 4종(*L. plantarum* D-01, *L. plantarum* D-2, *L. plantarum* D-11 및 *L. rhamnosus* KCTC 5033)은 높은 항산화 활성을 가지는 대

Table 2. Changes of antioxidant activity in in kelp *Saccharina japonica* water extract by the fermentation of probiotic lactic acid bacteria

LAB strains	Time (h)	Antioxidant activity			
		DPPH radical scavenging activity(mg AE/g)	ABTS radical scavenging activity (mg TE/g)	ORAC ($\mu\text{M TE/g}$)	FRAP (mg AE/g)
Control	0	$8.98 \pm 1.15^{\text{c}}$	$46.70 \pm 3.31^{\text{f}}$	$240.40 \pm 10.38^{\text{DEa}}$	$102.13 \pm 1.15^{\text{ld}}$
	12	$13.74 \pm 1.51^{\text{hb}}$	$48.20 \pm 4.21^{\text{fb}}$	$236.04 \pm 7.93^{\text{Ea}}$	$120.80 \pm 0.15^{\text{kc}}$
	24	$19.93 \pm 4.04^{\text{Ga}}$	$61.11 \pm 6.13^{\text{CDEa}}$	$246.37 \pm 7.25^{\text{BCDEa}}$	$164.80 \pm 2.00^{\text{la}}$
	48	$17.65 \pm 2.14^{\text{GHab}}$	$58.53 \pm 1.89^{\text{DEa}}$	$244.42 \pm 6.47^{\text{CDEa}}$	$152.13 \pm 1.15^{\text{lb}}$
<i>Lactobacillus plantarum</i> D-01	0	$38.31 \pm 2.44^{\text{BCDa}}$	$62.08 \pm 1.66^{\text{CDEc}}$	$257.82 \pm 7.53^{\text{ABCDa}}$	$230.13 \pm 2.31^{\text{Gc}}$
	12	$37.27 \pm 3.38^{\text{CDEa}}$	$64.98 \pm 3.45^{\text{CDEc}}$	$254.86 \pm 8.47^{\text{ABCDa}}$	$230.13 \pm 1.15^{\text{Gc}}$
	24	$40.31 \pm 1.59^{\text{BCDa}}$	$78.74 \pm 1.71^{\text{ABa}}$	$260.99 \pm 9.77^{\text{ABCa}}$	$298.80 \pm 2.00^{\text{Ba}}$
	48	$38.89 \pm 0.99^{\text{BCDa}}$	$70.57 \pm 3.57^{\text{BCb}}$	$261.82 \pm 11.56^{\text{ABCa}}$	$270.13 \pm 1.15^{\text{Db}}$
<i>L. plantarum</i> D-02	0	$29.17 \pm 1.74^{\text{fb}}$	$58.63 \pm 4.57^{\text{DEa}}$	$258.32 \pm 8.87^{\text{ABCDa}}$	$200.80 \pm 2.00^{\text{hd}}$
	12	$35.84 \pm 0.87^{\text{CDEab}}$	$65.09 \pm 8.00^{\text{CDEa}}$	$261.70 \pm 8.20^{\text{ABCa}}$	$243.47 \pm 8.08^{\text{Gc}}$
	24	$43.08 \pm 1.15^{\text{BCDa}}$	$71.11 \pm 16.69^{\text{BCa}}$	$262.44 \pm 11.15^{\text{ABCa}}$	$284.80 \pm 0.15^{\text{Ca}}$
	48	$39.74 \pm 7.24^{\text{BCDa}}$	$63.47 \pm 2.27^{\text{CDEa}}$	$258.92 \pm 14.77^{\text{ABCDa}}$	$268.80 \pm 3.46^{\text{Db}}$
<i>L. plantarum</i> D-11	0	$32.89 \pm 3.51^{\text{EFc}}$	$63.37 \pm 2.61^{\text{CDEc}}$	$257.94 \pm 9.23^{\text{ABCDa}}$	$232.13 \pm 1.15^{\text{Gc}}$
	12	$34.98 \pm 1.74^{\text{BCDc}}$	$74.87 \pm 0.65^{\text{BCb}}$	$257.51 \pm 10.06^{\text{ABCDa}}$	$267.47 \pm 1.15^{\text{Dc}}$
	24	$53.46 \pm 1.25^{\text{Aa}}$	$84.98 \pm 0.81^{\text{Aa}}$	$268.82 \pm 9.34^{\text{Aa}}$	$409.47 \pm 2.31^{\text{Aa}}$
	48	$38.89 \pm 0.49^{\text{BCDb}}$	$76.38 \pm 3.31^{\text{ABb}}$	$262.57 \pm 10.30^{\text{ABCa}}$	$267.47 \pm 1.15^{\text{Db}}$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	0	$34.98 \pm 2.93^{\text{BCDab}}$	$51.86 \pm 1.52^{\text{EFc}}$	$259.37 \pm 10.39^{\text{ABCa}}$	$247.47 \pm 0.81^{\text{Fc}}$
	12	$32.70 \pm 1.19^{\text{EFb}}$	$60.46 \pm 0.67^{\text{DEb}}$	$259.11 \pm 7.78^{\text{ABCDa}}$	$247.47 \pm 2.31^{\text{Fc}}$
	24	$39.55 \pm 4.16^{\text{BCDa}}$	$77.45 \pm 5.67^{\text{ABa}}$	$263.37 \pm 10.60^{\text{ABa}}$	$254.80 \pm 1.15^{\text{Eb}}$
	48	$35.17 \pm 1.03^{\text{CDEab}}$	$70.57 \pm 4.84^{\text{BCa}}$	$265.53 \pm 9.80^{\text{ABCa}}$	$258.13 \pm 1.15^{\text{Ea}}$

LAB, lactic acid bacteria; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); ORAC, oxygen radical absorbance capacity; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching. Each value represented mean \pm SD; values sharing the same lowercase letters within each strain are not significantly different at $P < 0.05$; values sharing the same uppercase letters within a column are not significantly different at $P < 0.05$.

사산물 생성에 관여하는 효소 활성을 가지고 있어 다시마 추출물 발효 과정에서 발효가 진행됨에 따라 FRAP 측정값이 증가하는 경향으로 나타난 것으로 판단된다.

Hur et al. (2014)에 따르면 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. plantarum* 및 *L. rhamnosus* 등의 *Lactobacillus* 속은 공통적으로 amylase, lactate dehydrogenases, peptidases 및 proteinase의 효소 활성이 있다고 보고하여 발효 과정 중 다양한 산물을 생성하는 것으로 판단된다. 또한 Bae et al. (2019)은 LAB의 효소 활성으로 인하여 발육조건에 따라 생성되는 대사산물의 차이로 인해 항산화 활성이 차이를 나타내는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 사용된 LAB에 의해 다시마 발효 추출물에서 항산화 활성이 높아지는 결과는 다시마 추출물과 LAB들이 가지고 있는 항산화 활성 이외에 LAB 발효가 진행됨에 따라 LAB의 효소 활성에 의해 생성된 다시마 분해산물들도 항산화 활성에 기여한 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 LAB 발효에 의한 다시마 발효 추출물의 총 페놀 함량, 플라보노이드 함량과 항산화 활성이 발효 24시간까지는 증가하는 경향으로 나타났으나 발효 48시간에서는 감소하는 경향으로 나타났다. Kim et al. (2016)은 다시마를 기질로 한 LAB 배양에서 24시간까지는 균수의 증가가 관찰되었으나 24시간 이후부터 균수가 유지가 되거나 감소가 되는 경향으로 나타났다고 보고하여 본 연구결과의 LAB를 첨가한 다시마 발효의 항산화 활성 측정에서 나타난 경향성과 유사한 것으로 나타났다. 이는 다시마를 기질로 한 발효 과정 중의 균수의 유지 및 감소로 인한 총 페놀 함량, 플라보노이드 함량과 항산화 활성이 유지, 감소 및 증가의 추세를 보인 본 연구결과의 경향성과 일치한 것으로 판단되어 다시마를 기질로 한 발효에서는 24시간이 최적의 발효 조건이라고 판단된다. 또한, Gupta et al. (2011)는 *L. plantarum*를 첨가한 갈조류 발효에서 24시간부터 *L. plantarum*의 생균수가 시간이 지남에 따라 2 log CFU/mL씩 감소하는 경향으로 나타났으며, 이는 초기 당류의 양이 유산균의 성장에 중요하기 때문이라고 보고하였다. 이에, LAB를 이용한 다시마 발효의 최적의 발효 조건에서의 항산화 활성 물질 등의 증가로 인한 고부가가치 제품 개발의 가능성이 있다고 판단된다. Kim et al. (2016)은 다시마와 같은 해조류는 대부분 건조 등 단순 가공형태로 유통되어 활용성이 낮은 실정이며 해조류 가공에서는 단단한 조체와 세포벽 층진 물질인 유용 성분을 추출하기 어려운 문제점이 있다고 보고하였으며 발효기법을 이용한 기능성 소재화를 통해 식품에 응용할 수 있다면 다양한 형태의 기능성 제품이 개발될 수 있다고 제시하였다. 또한, 미역, 다시마 그리고 톳 등의 해조류에 대해 LAB를 이용하여 발효하였을 때 항산화 활성이 증가하는 경향이 나타났다고 보고하여 발효를 이용한 해조류 고부가가치 제품개발에 대한 가능성을 제시하고 있다(Song et al., 2011; Kim et al., 2016; Kang et al., 2018). 본 연구 결과는 probiotic LAB 발효를 이용한 다시마의 기능성 강화와 고부가가치 제품개발 가능성을 제시하고 있으며

향후 다양한 해조류 제품 개발에 probiotic LAB 발효가 유용하게 적용될 수 있다는 점을 시사한다.

사 사

이 논문은 2019년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(영남씨그랜트사업).

References

- Bae DB, Kim KH and Yook HS. 2019. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of fermented *Gynura procumbens*. J Kor Soc Food Sci Nutr 48, 1214-1222. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2019.48.11.1214>.
- 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. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Eom SH, Lee BJ and Kim YM. 2010. Effect of yeast fermentation on antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. Korean J Fish Aquat Sci 43, 117-124. <http://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.2.117>.
- Gupta S, Abu-Ghannam N and Scannell AG. 2011. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. Food Bioprod Process 89, 346-355. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.001>.
- Han EJ, Um JH, Park SY, Lim JS, Lim DH, Ahn CB and Ahn GN. 2015. Antioxidant effects of the enzymatic extracts from *Lactobacillus plantarum*-fermented *Saccarina japonica*. J Chitin Chitosan 20, 202-209. <http://doi.org/10.17642/jcc.20.3.8>.
- Han J, Kang S, Choue R, Kim H, Leem K, Chung S, Kim C and Chung J. 2002. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. Fitoterapia 73, 710-712. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00236-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00236-8).
- Hu SJ, Kim JA, Moon MH, Lee SH, Yoon HS and Hong JH. 2018. Standardization for analysis method of total polyphenol in complex of picao preto. J Food Hyg Saf 33, 44-49. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.1.44>.
- Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I and Kim GB. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chem 160, 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>.
- Huynh NT, Van Camp J, Smagghe G and Raes K. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. Int J Mol Sci 15, 19369-19388. <https://doi.org/10.3390/ijms151119369>.
- Jeng JW, Lee YC, Jung SW and Lee KM. 1994. Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. Kor J Food Sci Technol 26, 709-712.
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW and Lee HS.

2011. Antioxidant and antiaging effect of Ginseng Berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J Soc Cosmet Sci Kor* 37, 75-81. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2011.37.1.075>.
- Jung KI, Kim BK, Kang JH, Oh GH, Kim IK and Kim MH. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle *Saccarina japonica*. *J Life Sci* 29, 596-606. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.5.596>.
- 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. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.3.327>.
- Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY and Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29, 1127-1132.
- Kim HS and Bae TJ. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application-I. Screening of microfloras involved in hydrolysis of sea tangle *Laminaria japonica* and sea mustard *Undaria pinnatifida*. *Korean J Fish Aquatic Sic* 35, 438-444. <https://doi.org/10.5657/kfas.2002.35.4.438>.
- Kim JH, Park LY and Lee SH. 2016. Seaweed fermentation and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional foods. *J Korean Soc Food Scid Nutr* 45, 1481-1487. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.10.1481>.
- Kim KH, Tsao R, Yang R and Cui SW. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem* 95, 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>.
- Lee KH, Bong YJ, Lee HA, Kim HY and Park KY. 2016a. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from *Kimchi*. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 45, 12-19. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.1.012>.
- Lee DH and Hong JH. 2016. Physicochemical properties and antioxidant activities of fermented Mulberry by lactic acid bacteria. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 45, 202-208. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.2.202>.
- Lee W, Oh JY, Kim EA, Kang N, Kim KN, Ahn G and Jeon YJ. 2016b. A probiotic role of *Ecklonia cava* improves the mortality of *Edwardsiella tarda*-infection zebrafish models via regulating the growth of lactic acid bacteria and pathogen bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 54, 620-628. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.018>.
- Lee YJ, Kim WS, Lee BJ, Jeon YJ and Kim YT. 2017. Quality characteristics and antioxidant activities of gruel containing *Saccharina japonica* powder. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 707-713. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0707>.
- Moreno MIN, Isla MI, Sanpietro AR and Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71, 109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0).
- 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*. *Kor J Food Sci Technol* 49, 1-6. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2017.49.4.1>.
- Park MR, Yoo C, Chang YN and Ahn BY. 2012. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Kor J Plant Res* 25, 379-386. <http://doi.org/10.7732/kjpr.2012.25.4.379>.
- Ryu DG, Park SK, Kang MG, Jeong MC, Jeong HJ, Kang DM, Lee JH, Kim YM and Lee MS. 2020. Antioxidant and cholesterol-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica Kimchi*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 351-360. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0351>.
- Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD and Kim YM. 2011. Change in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 104-110. <https://doi.org/10.5657/kfas.2011.44.2.104>.
- Waterman PG and Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., 83-91.
- Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW and Huh CK. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43, 80-85. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.1.080>.
- 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>.