향신료의 유산균 생장 촉진 효과와 홍고추(*Capsicum annuum* L.) 발효 산물의 HT-29 세포에서의 Tight Junction Protein 유전자 발현 조절 확인

김지현^{1*} · 신민재^{1*} · 정명준² · 김세현¹

¹고려대학교 생명공학과 시스템식품생명공학 전공

²(주)셀바이오텍

Identification of Spices Promoting the Growth of Lactic Acid Bacteria and Modulation of Tight Junction Protein at mRNA Level by the Fermented Product of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) in HT-29 Cell

Ji Hyun Kim^{1*}, Min Jae Shin^{1*}, Myung June Chung², and Sae Hun Kim¹

¹Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University

²Cell Biotech Co., Ltd.

ABSTRACT Spices are known to possess antibacterial activity against pathogens. In contrast, they also promote probiotic bacterial growth, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. In the current study, 10 strains isolated from Korean human feces and kimchi were screened for bacterial growth in the presence of spices mainly used in Korean foods, including garlic, onion, ginger, red pepper, and Chungyang pepper. Majority of the strains showed maximum growth in red pepper. In order to investigate properties of the candidate strains as probiotics, we evaluated the adhesion ability to intestinal epithelial HT-29 cells, acid and bile tolerance, and inhibition activity of gelatinase and urease. The functionality of the fermented product was subsequently studied, as most strains grew well in the presence of spices. The antioxidant activity was determined using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Fermented products of ginger and red pepper with strains showed higher free radical scavenging activity than the spices themselves. In addition, subsequent to lipopolysaccharides-induced impairment, the fermented products of red pepper with selected strains also exhibited increased mRNA expression of tight junction protein in HT-29 cells. Taken together, the results of this study indicate that strains isolated from Korean human feces and kimchi have a high growth rate in the presence of spices, and their fermented products exert increased anti-oxidant activity, thereby indicating the potential functionality in improving gut barrier functions.

Key words: spices, probiotics, fermentation, anti-oxidant, tight junction protein

서 론

우리가 살아온 환경과 식단, 그리고 장내 세균은 서로 밀접하게 연관되어 있다. 장내 미생물 군총과 관련하여 지리적(geography) 또는 민족적(ethnicity) 특성의 차이를 보여주는 많은 연구가 존재한다. 장내 미생물 군총은 숙주(host)의 생활양식, 유전적 특성, 연령, 영양 및 환경에 따라 변화할 수 있다(Gupta 등, 2017). 한국인은 3~4세기부터 무가 주

된 원료였던 김치를 섭취하고, 고춧가루가 포함된 김치는 18세기부터 섭취해 왔다(Park 등, 2014). 발효식품인 김치에는 고춧가루(*Capsicum annuum* L.), 마늘(*Allium sativum*), 생강(*Zingiber officinale*) 등의 향신료(spices)가 들어간다(Kim 등, 2012).

향신료는 *Pseudomonas fluorescens* 등과 같이 식품 부패에 관여하는 유해균이나 *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aspergillus flavus* 등과 같은 병원균에 대해 방부효과를 가져 식품 보존제로 사용되는 것으로 알려져 있다(Liu 등, 2017; Joe 등, 2009). 향신료는 유해균을 억제하는 기능 외에도 다양한 약리효과가 알려져 있으며 높은 항산화 효과를 가진다(Panpatil 등, 2013; Materska와 Perucka, 2005). 특히 홍고추는 다량의 비타민 C와 E 및 provitamin A와 carotenoid를 함유하고 있어 자유라디칼을 제거하는 높은 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 항고혈당

Received 3 Nov 2020; Revised 28 Dec 2020; Accepted 28 Dec 2020

Corresponding author: Sae Hun Kim, Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, 145, Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 02841, Korea, E-mail: saehkim@korea.ac.kr

Author information: Ji Hyun Kim (Graduate student), Min Jae Shin (Graduate student), Sae Hun Kim (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

및 항고혈압 효과를 나타낸다고 밝혀졌다(Ranilla 등, 2010). 홍고추 수용성 추출물은 lipopolysaccharide(LPS)로 염증이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 NO, PGE2 및 IL-6 생성을 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타냈다(Kwon 등, 2009).

유산균(lactic acid bacteria)은 내산성을 가지고 유산을 주로 생성하는 그람 양성균에 속하는 균을 의미하며 유산균 중 일부는 프로바이오틱 효과를 갖는다(Lin 등, 2016). 프로바이오틱스(probiotics)는 살아있는 생균으로서 적절한 양으로 투여될 때 숙주(host)에게 건강상의 이점을 주는 미생물로 정의된다(Ford 등, 2018). 염증성 장 질환(intestinal bowel disease) 환자에서 발견되는 TNF- α , IFN- γ , IL-1 및 IL-13 등과 같은 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)은 장 투과성(epithelial permeability)을 증가시켜 염증을 더 악화시킬 수 있으며(Ma 등, 2004), 이에 프로바이오틱스는 장내 미생물 군총 조성 및 장내 유전자 발현을 조절하여 밀착연접 단백질(tight junction protein)의 구조 변화 억제 등을 통하여 장벽 기능의 손상을 완화시킨다(Ohland와 MacNaughton, 2010). 유해균과 달리 프로바이오틱스는 향신료에서 생장한다는 연구 결과가 있다(Sharma 등, 2013; Deol 등, 2018; Li 등, 2016; Zhang 등, 2013).

김치 유래의 유산균 *Lactobacillus sakei* OK67 또한 밀착연접 단백질 유전자의 발현 증가 및 항염증의 효과를 통해 장벽 손상을 개선한 결과가 보고되었으며(Lim 등, 2016), 항암 기능성을 보이는 김치 유산균 *Weissella cibaria*는 김치에 고춧가루를 넣었을 경우 더 높은 생육 촉진을 보였다(Kwak 등, 2014). 이처럼 홍고추와 유산균의 연관성이 존재하지만 홍고추와 같은 단일 향신료와 유산균 간 상호작용으로 나타난 장벽 기능 개선에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 실험에서는 10종(한국 영유아 분변 유래 4종, 한국 성인 분변 유래 5종, 김치 유래 1종)의 유산균과 한국인이 자주 섭취(Lee 등, 2014)하는 마늘(*A. sativum*), 양파(*A. cepa*), 생강(*Z. officinale*), 홍고추와 청양고추(*C. annuum* L.) 등의 향신료 추출물이 유산균 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 균주의 프로바이오틱스로서의 안전성 및 기능성을 확인하고 항산화 효과를 측정하였다. 이후 선별된 향신료 발효물의 장벽 기능 개선 효과에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 향신료는 동결 건조한 분말 형태의 시중 제품으로 마늘과 양파는 (주)산마을(Changnyeong, Korea)에서 구입하였다. 생강은 가루랑(Seoul, Korea)에서 구입하였고 홍고추는 에디드컴퍼니(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 청양고추는 (주)금빛지엔씨(Gwangju, Korea)에서 구입하였다. 항산화 효과 분석에 사용된 1,1-di-

phenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)과 장 부착성 검사에 사용된 Triton X-100, 세포독성 평가에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide(DMSO), 세포염증 발현에 사용된 lipopolysaccharide(*Escherichia coli* strain O111:B4)는 모두 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험 균주

본 실험에서 사용된 실험 균주들은 (주)셀바이오텍(Seoul, Korea)에서 제공한 10개의 균주를 사용하였다. 균주는 한국 영유아 분변 유래 4종(*Bifidobacterium bifidum* CBT BF3, *B. longum* CBT BG7, *B. lactis* CBT BL3, *B. breve* CBT BR3)과 한국 성인 분변 유래 5종(*Lactobacillus acidophilus* CBT LA1, *L. casei* CBT LC5, *L. rhamnosus* CBT LR5, *Lactococcus lactis* CBT SL6, *Streptococcus thermophilus* CBT ST3), 발효 식품인 김치 유래 1종(*L. plantarum* CBT LP3)을 실험에 사용하였다.

향신료 수용성 추출물 제조

실험에 사용된 향신료는 3차 증류수에 특정 농도(마늘 50 mg/mL, 양파 10 mg/mL, 생강 100 mg/mL, 홍고추 100 mg/mL, 청양고추 50 mg/mL)에 맞춰 제조한 뒤, 저속 원심 분리기(Centrifuge 1248R, Labogene, Seoul, Korea)를 통해 원심분리(4,000 rpm, 4°C, 15분)를 진행하여 상층액만 Whatman No. 2 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 여과액을 얻었다. 이후 침전물을 제거한 여과액을 0.45 μ m syringe filter(Curebio, Seoul, Korea)를 통해 재여과를 거친 여과액을 실험에 사용하였다.

배양조건 및 생장성 측정

실험에 사용된 균주는 De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth(BD Co., Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였으며 활성을 위해 실험에 사용하기 전에 3번 계대배양 하였다. 각 향신료 수용성 추출물에 대한 생장성을 확인하기 위해서 3번째 계대배양을 진행한 배양액의 100 μ L를 각 향신료 수용성 추출물을 추가한 minimal media broth(Bacto proteose peptone No. 3 10 g/L, sodium acetate trihydrate 5 g/L, diammonium citrate 2 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L, Tween-80 1 g/L, magnesium sulfate heptahydrate 0.2 g/L) 10 mL에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 뒤 배양액에 대해 균수를 측정하여 나타내었다. 각 향신료에서의 균의 생장성을 비교하기 위해 4% glucose(w/v)를 추가한 minimal media broth 10 mL에서 균 생장성 대비 각 향신료에서의 균 생장성을 log(%)로 비교하여 나타내었다.

내산성 및 내담성 측정

실험에 사용한 유산균들의 낮은 pH와 담즙염에 대한 내성을 측정하기 위해 Jacobsen 등(1999)의 방법을 변형하여 내산성 및 내담성을 측정하였다. 내산성을 측정하기 위해 MRS broth에 1,000 units/mL의 pepsin(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 pH 2.5의 산성화된 MRS broth를 사용하였다. 내담성을 측정하기 위해 MRS broth에 0.3% Oxgall(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 만든 MRS broth를 사용하였다. MRS에서 24시간 동안 배양한 실험 균주를 약 1.0×10^8 CFU/mL의 농도가 되도록 10 mL의 각각 변형된 MRS broth에 100 μ L씩 접종하였다. 내산성은 37°C에서 3시간 배양한 후 생존율을 계산하여 측정하였고, 내담성은 37°C에서 24시간 배양한 후 생존율을 계산하여 측정하였다. 실험은 시료 100 μ L씩 MRS agar에 분주하여 평판도말법으로 생균수를 확인하였다.

안전성 평가

요소 분해효소의 활성을 평가하기 위해 urea-based agar(Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 배지에 실험 균주를 접종한 뒤 37°C에서 48시간 배양 후 황색에서 적색으로 배지의 색 변화를 통해 시각적으로 관찰하여 평가하였다. 젤라틴 분해효소 평가는 Hemraj 등(2013)의 방법을 변형하여 사용하였다. 젤라틴 배지를 사용하여 실험 균주를 접종한 뒤 37°C에서 48시간 배양 후 4°C에서 30분간 정지한 뒤 젤라틴의 액화 여부를 확인하여 평가하였다.

세포배양

HT-29 장 상피세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 100 units/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin과 10% fetal bovine serum이 함유된 HyClone RPMI 1640 medium(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일에 한 번 배지를 갈아주면서 배양하였고 세포밀집(confluence)이 80%에 도달했을 때 Trypsin EDTA solution(Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)을 첨가하여 세포를 분리한 뒤 RPMI 1640 medium으로 세척하였다. 이후 원심분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합한 후 계대배양 하여 사용하였다.

장 상피세포 부착능 측정

프로마이오틱스로써 실험 균주를 장 표면의 부착능에 대해 측정하기 위해서 장 상피세포 HT-29에 대한 Kim 등(2008)의 방법을 변형하여 사용하였다. 12-well cell culture plate(SPL Lifesciences, Gyeonggi, Korea)에 HT-29 장 상피세포를 1.4×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 plate에 약 1×10^8 CFU/mL의 농도가 되도록 100 μ L를 접종하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하였다.

배양 후 phosphate buffered saline(PBS)을 이용하여 5회 세척하여 부착되지 않은 실험 균주 제거 후 탈착을 유도하는 0.1% Triton X-100 1 mL를 첨가하였다. 탈착된 HT-29 장 상피세포를 MRS agar에 접종하여 평판도말법을 이용해 37°C에서 48시간 배양 후 생균수를 세어 부착능을 측정하였다.

$$\text{Adhesion ability (log\%)} = \frac{\log(\text{생균수})}{\log(\text{초기 생균수})} \times 100$$

DPPH 라디칼 소거능 측정

향신료 수용성 추출물과 실험 균주의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 응용하여 DPPH에 대한 향신료 및 향신료 발효물의 항산화 효과를 측정하였다. 실험 균주는 MRS broth에 1% 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음, OD 600 nm에서 0.3(= 1×10^8 CFU/mL)을 맞춘 후 향신료에 5%를 접종하여 24시간 배양하였다. 96-well plate에 향신료 발효물 800 μ L와 0.4 mM DPPH 용액 1 mL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 시료 200 μ L를 취하여 Microplate Reader(Versa Max Microplate Reader, Molecular Device, San Jose, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 양성 대조군으로 시료 대신 L-ascorbic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 혼합하여 사용했으며, 음성 대조군으로 시료를 첨가하지 않고 PBS를 혼합한 뒤 측정된 흡광도 차를 비교하여 자유라디칼의 제거 활성을 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} =$$

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

세포독성 평가

세포독성 실험은 Mosmann 등(1983)의 방법으로 MTT colorimetric reduction assay를 이용하여 선별된 향신료 수용성 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 96-well cell culture plate(SPL Lifesciences)에 HT-29 장 상피세포를 4.7×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 향신료 수용성 추출물을 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL의 농도로 100 μ L 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 100 μ L씩 처리한 뒤, 37°C에서 1시간 반응시켜 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상층액을 제거하였다. DMSO 100 μ L를 첨가하여 formazan을 녹인 다음 Microplate Reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HT-29 장 상피세포 RNA 추출 및 qRT-PCR assay

HT-29 장 상피세포에 대한 RNA 추출과 qRT-PCR을 진행하기 위해 12-well cell culture plate(SPL Lifesciences)

에 4.5×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 2 mL의 RPMI 1640 medium(GE Healthcare)을 첨가하였다. Plate에 10 μ g/mL의 농도로 LPS를 처리하기 전에 선별된 향신료의 세포독성 평가를 바탕으로 지정된 농도의 향신료와 향신료 추출물 배양액을 처리하였다. 단일 균처리는 Li 등(2009)의 방법을 응용하여 80°C에서 20분 동안 열처리를 진행하여 1×10^8 CFU/mL의 실험 균주를 사균체로 만들어 처리하였다. 이후 배양된 세포의 RNA 추출을 위해 TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 제조사 프로토콜을 따라 사용하였다. NanoDrop spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 추출된 RNA의 농도를 측정하고 희석하여 10 ng/ μ L의 농도로 맞추었다. The High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 PCR을 진행해 cDNA를 합성하였다. 본 실험에 사용된 프라이머와 염기서열에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. 유전자의 발현량을 측정하기 위해 MG 2 $\times$ qPCR MasterMix (SYBR green, MGmed, Seoul, Korea)를 이용한 qRT-PCR를 사용하였으며 Bio-Rad CFX manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다. 유전자 mRNA의 정량적 발현 정도를 비교하기 위해 보정인자로 GAPDH를 사용하여 배수변화도(fold change)를 나타내었다.

통계 분석

실험결과를 분석하기 위해 통계 SAS package(Statistical Analysis System, Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였고, 모든 실험은 3회 반복하여 각 실험 항목의 측정 결과를 평균±표준편차(mean±SE)로 표시하였다. 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test, Tukey's range test를 통해 $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

향신료에 대한 실험 균주의 생장성 변화

본 실험에서는 실제 섭취하는 향신료의 양이 유산균 생육에 미치는 영향을 확인하기 위해 향신료 수용성 추출물을 섭취 수준의 농도로 실험을 진행하였다(Ku 등, 2005). 향신료가 균주의 생장성에 미치는 영향을 확인하기 위해 10개의

실험 균주를 5개의 향신료 수용성 추출물에서 24시간 배양하였다. 결과적으로 10개의 실험 균주는 마늘, 양파, 생강, 홍고추, 청양고추 등 한국인이 많이 섭취하는 향신료에서 전반적으로 높은 생장성을 보였다(Fig. 1). 10개의 균주별로 5개의 향신료에서 가장 높은 생장성을 보인 향신료는 홍고추이며, 본 실험에서 *L. rhamnosus* CBT LR5를 제외한 9개의 균주는 홍고추 추출물에서 가장 높은 생장성을 보이고 향신료에 따른 유의미한 차이를 보였다. *L. rhamnosus* CBT LR5는 양파 수용성 추출물에 대해 가장 높은 생장성을 보였다. 홍고추 수용성 추출물에서 실험 균주의 생장성을 비교했을 때, 한국 영유아 분변 유래 분리 균주인 *B. bifidum* CBT BF3와 한국 성인 분변 유래 분리 균주인 *S. thermophilus* CBT ST3가 glucose 대비 112%, 106%로 홍고추 수용성 추출물에 대해 가장 높은 생장성을 보였다.

일부 향신료들은 몇몇 유해균 증식을 억제하지만 유산균 생육은 촉진하는 것으로 알려져 있다. 마늘, 양파, 생강, 고추 등의 향신료를 포함한 37개 종류의 식물 추출물은 미생물 생장에 선별적으로 작용해 *E. coli* O157 및 *E. coli* LF82의 생장은 억제하고 프로바이오틱스의 생장은 촉진하는 것으로 확인되었다(Sutherland 등, 2009). Özer 등(2005)은 *B. bifidum* BB-02의 생육이 락토로스(0.25%, 2.5%)에 의해 각각 4.6배, 7.5배 증가하고, 이눌린(0.5%, 1.0%)에 의해 각각 10배, 14배 증가하는 것을 보였다.

향신료에 의한 유산균의 생장성 증가와 관련해서는 이미 여러 연구에서 보고되었다. Sutherland 등(2009)은 *Capsicum annuum*, *C. frutescens* 같은 고추 종의 수용성 추출물이 *L. reuteri*, *B. lactis*, *L. rhamnosus* 등 유산균의 생장을 촉진하고, 마늘, 양파, 생강 수용성 추출물은 *B. lactis* 생장을 촉진하는 경향성을 보였다. 이와 마찬가지로 본 실험에서 *B. lactis* CBT BL3는 마늘, 양파, 생강 수용성 추출물에서 비교적 높은 생장성을 나타냈다(Fig. 1). Sharma 등(2013)은 *Capsicum annuum*이 *L. acidophilus* 생장을 증가시켜 젖산 등 대사물질이 증가한 것을 보고하였는데, 이는 향신료가 유산균의 생장을 촉진시켜 대사산물 생산을 증가시키는 것으로 보인다. 최근 연구 논문에 따르면 향신료의 주된 성분인 폴리페놀은 장내 미생물 군총에 영향을 끼칠 수 있다고 보고되었는데, 폴리페놀의 식이는 *Bifidobacterium* 및 *Lactobacillus* 균수를 상당히 증가시키고 *Clostridium* 균수를 감소시켰다(Ma와 Chen, 2020).

Table 1. Primer used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Tm (°C)	Reference
GAPDH	F: 5'-CCTGCTTCACCACTTCTTG-3' R: 5'-ATGACCACAGTCCATGCCATC-3'	61.4	Kim et al. (2015)
ZO-1	F: 5'-CAACATACAGTGACGCTTCACA-3' R: 5'-CACTATTGACGTTTCCCCACTC-3'	61.4	Oh et al. (2017)
Occludin	F: 5'-ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC-3' R: 5'-GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT-3'	61.4	Oh et al. (2017)

Fig. 1. Bacterial cell growth (log CFU/mL) in 4% (w/v) glucose and minimal broth with 5 spices; garlic, onion, ginger, red pepper, and Chungyang pepper. Results are mean of triplicate data. Post hoc test done using Tukey's range test; values with different letters (a-f) in the same strain are significantly different ($P < 0.05$). BF3, *Bifidobacterium bifidum* CBT BF3; BG7, *Bifidobacterium longum* CBT BG7; BL3, *Bifidobacterium lactis* CBT BL3; BR3, *Bifidobacterium breve* CBT BR3; LA1, *Lactobacillus acidophilus* CBT LA1; LC5, *Lactobacillus casei* CBT LC5; LR5, *Lactobacillus rhamnosus* CBT LR5; SL6, *Lactococcus lactis* CBT SL6; ST3, *Streptococcus thermophilus* CBT ST3; LP3, *Lactobacillus plantarum* CBT LP3.

실험 균주의 프로바이오틱스 특성 평가

실험에 사용된 10개의 균주에 대해 pH 2.5에 내산성과 0.3%의 담즙염에 대한 내담성을 확인했으며 Fig. 2에 나타내었다. 10개의 실험 균주 중 *L. casei* CBT LC5, *L. acidophilus* CBT LA1, *S. thermophilus* CBT ST3, *L. rhamnosus* CBT LR5가 85%, 83%, 83%, 80%로 80% 이상의 높은 내산성을 가졌다. 또한 높은 내산성을 가진 *L. acidophilus* CBT LA1, *L. casei* CBT LC5, *S. thermophilus* CBT ST3, *L. rhamnosus* LR5는 96%, 95%, 92%, 89%의 높은 내담성을 보였다.

프로바이오틱스의 기능을 나타내기 위해서는 내산성 및 내담성 외에도 실험 균주가 위장관에서 생존하여 장 상피세

포에 부착되어 있어야 한다. HT-29 장 상피세포에 대해 10개의 실험 균주의 부착능을 측정한 뒤 실험 균주의 장 세포 부착능을 log CFU 백분율로 나타내었다. 10개의 실험 균주에서 가장 높은 부착능을 보인 실험 균주는 한국 성인 분변 유래 분리 균주인 *L. lactis* CBT SL6로 나타났으며 87.6%의 부착능을 가졌다. 이외에도 *L. acidophilus* CBT LA1과 *B. breve* CBT BR3가 73.5%, 72.9%로 SL6를 제외한 실험 균주들과 비교하여 높은 장 세포 부착능을 보였고 유의미한 차이를 나타냈으며, 10개의 실험 균주는 전반적으로 양호한 장 부착능을 보이고 균주에 따라 37~87%까지 장 부착능을 보였다(Fig. 3). Lim 등(2018)에 따르면 배주김치로부터 분리된 유산균은 장 상피세포의 일종인 Caco-2 cell에서 72.9

Fig. 2. Acid and bile tolerance of the 10 bacterial strains used in experiments. Results are mean $\pm$ SE (n=3) of triplicate data. Post hoc test done using Duncan's multiple range test; values with different letters (a-h) above bars are significantly different ($P < 0.05$).

Fig. 3. Adhesion of 10 bacterial strains to human intestinal epithelial cells (HT-29) *in vitro*. Results are mean±SE (n=3) of triplicate data. Post hoc test done using Duncan's multiple range test; values with different letters (a-g) above bars indicate significant differences ($P<0.05$).

~90.1%의 장 세포 부착능을 나타냈다.

이후 10개의 실험 균주의 안전성을 평가하기 위해 유산균의 요소 분해효소 및 젤라틴 분해효소의 억제 활성을 평가하는 실험을 진행하였다(Markowiak과 Slizewska, 2017). 10개의 실험 균주 모두에서 요소 분해효소와 젤라틴 분해효소 활성이 음성으로 나타났다(Table 2).

유산균이 프로바이오틱스로서 기능을 하기 위해서는 장에 부착성을 나타낼 뿐만 아니라 위장관 내의 산 또는 담즙과 같은 체내 소화효소 등의 혹독한 조건에서의 생존력을 나타내어야 한다. 낮은 pH와 담즙염에 대한 저항성은 유산균이 프로바이오틱스로서 요구되는 조건 중 하나이다(Jin 등, 1998). 요소 분해효소 및 젤라틴 분해효소 활성을 갖지 않는 등의 체내 안전성을 갖는 것이 중요하다고 알려져 있다(Markowiak과 Slizewska, 2017).

향신료와 실험 균주의 항산화 효과

실험 균주 단일 및 실험 균주를 각 향신료 수용성 추출물에서 24시간 배양하여 생성된 균을 포함한 배양액의 DPPH 라디칼 소거능을 측정 후, ascorbic acid를 대조군으로

Table 2. Gelatinase and urease tests for the 10 lactic acid bacteria

Strain	Gelatinase test	Urease test
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CBT BF3	—	—
<i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7	—	—
<i>Bifidobacterium lactis</i> CBT BL3	—	—
<i>Bifidobacterium breve</i> CBT BR3	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CBT LA1	—	—
<i>Lactobacillus casei</i> CBT LC5	—	—
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CBT LR5	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> CBT SL6	—	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> CBT ST3	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> CBT LP3	—	—

비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 실험 균주 단일의 항산화 효과를 측정하기 위해 실험 균주 1.0×10^9 CFU/mL 농도의 시료를 사용하여 10개의 실험 균주 단일의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

실험 결과로 10개의 실험 균주 단일이 갖는 DPPH 라디칼 소거능은 *S. thermophilus* CBT ST3와 *L. plantarum* CBT LP3가 19.9%, 19.8%로 실험 균주 중 가장 높게 나타났다. 반면, *B. breve* CBT BR3와 *L. casei* CBT LC5의 경우, 음성 대조군인 PBS보다 낮아 실험 균주 단일이 갖는 항산화 효과가 없음을 나타내었다. 이후 각 향신료 수용성 추출물에서 배양된 10개의 실험 균주에 대해 측정된 항산화 효과를 통계를 통해 비교하였다. 각 향신료 수용성 추출물이 갖는 DPPH 라디칼 소거능은 마늘, 양파, 생강, 홍고추, 청양고추 순서대로 79.2, 80.9, 62.4, 63.3, 76.2%로 양파 수용성 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 제일 높게 나타났다.

마늘 수용성 추출물에서 배양된 10개의 실험 균주에 대해 가장 높은 항산화 효과를 보인 실험 균주는 *B. breve* CBT BR3로 81.4%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다. 반면, 양파 수용성 추출물에서 배양된 10개의 실험 균주에 대해 가장 높은 항산화 효과를 보인 실험 균주는 *L. lactis* CBT SL6로 80.6%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으나, 양파 수용성 추출물 단일이 갖는 소거능에 비해 낮게 나타났으며 유의미한 차이를 갖지 않았다. 한편, 생강 수용성 추출물의 경우, 62.4%의 가장 낮은 DPPH 소거능을 보였으나 10개의 실험 균주 중 *L. plantarum* CBT LP3의 배양액이 79.0%의 소거능을 가지며 수용성 추출물 단일의 소거능보다 큰 차이의 소거능을 보였다. 마찬가지로 홍고추 수용성 추출물 단일이 갖는 소거능 또한 63.3%로 상대적으로 낮은 소거능을 보였으나 73.6%로 배양액 중 가장 높은 소거능을 나타낸 *L. acidophilus* CBT LA1을 통해 향신료와 배양액 간의 큰 차이를 보였다. 반면, 청양고추 수용성 추출물의 배양액의 경우, *B. bifidum* CBT BF3의 소거능이 83.3%로 모든 그룹에서 가장 높은 소거능을 보였다. 하지만 청양고추 수용성 추출물 단일이 갖는 소거능인 76.2%와 차이를 비교했을 때, 생강 및 홍고추 수용성 추출물의 차이에 비해 상대적으로 낮은 폭으로 증가하였다(Fig. 4). Shen 등(2011)에 따르면 *B. animalis* 01 단일 균주의 DPPH 라디칼 소거능은 11.10%, 균주의 MRS 배지에서의 배양액은 73.11%로 나타나 이번 실험 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 10개의 실험 균주 모두 양파를 제외한 단일의 항산화 효과보다 향신료 수용성 추출물의 배양액이 항산화 효과가 더 높게 나타났다. 따라서 유산균의 항산화 효과는 향신료 수용성 추출물에 대한 배양을 통해 증진될 수 있음을 시사한다.

홍고추는 bioactive compounds로 다량의 비타민과 카로티노이드, 토코페롤, 캡사이시노이드 등의 성분을 함유하고 있어 높은 항산화능을 갖는 것으로 알려져 있다(Materska와 Perucka, 2005). Henderson 등(1999)은 홍고추 등의 주요 성분인 캡사이신이 분자의 페놀류 성분 때문에 항산화

Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of lactic acid bacteria fermented with the aqueous extract of 5 types at 37°C for 24 h. (A) garlic (*Allium sativum*), (B) onion (*Allium cepa*), (C) ginger (*Zingiber officinale*), (D) red pepper (*C. annuum* L.), and (E) Chungyang pepper (*C. annuum* L.). Results are mean±SE (n=3) of triplicate data. Post hoc test done using Tukey's range test; values with different letters (a-c) in the same strain indicate significant differences ($P<0.05$). One asterisk indicates significant differences ($P<0.05$) between ascorbic acid and other groups. White bar, ascorbic acid; light grey bar, CBT strains; dark grey bar, spices; black bar, fermented spices with lactic acid bacteria.

Fig. 4. Continued.

활성이 나타난다고 밝혔다. 프로바이오틱스는 알려진 여러 건강증진 기능 중 하나로 항산화 활성을 나타내는데, 알려진 기작으로 비효소적 항산화 물질인 글루타티온(GSH), 엽산, 비타민 B12 등의 대사산물을 생산하는 것이 있다(Wang 등, 2017). 본 실험에서는 각 향신료 수용성 추출물에서 배양한 유산균의 대사산물의 항산화 효과를 확인하기 위해 유산균 자체의 항산화 효과와 비교하였다. 프로바이오틱스의 항산화 효과는 널리 연구되었으며 단일 균주의 DPPH 라디칼 소거능은 *B. longum* ATCC 15708이 52.1%, *L. acidophilus* ATCC 4356이 43.2%를 나타낸 연구 결과가 있다(Lin과 Chang, 2000).

Yang 등(2000)은 유산균에 의해 발효된 두유가 발효되지 않은 두유에 비해 더 높은 항산화 효과를 가지며, 발효 대사산물이 항산화 효과와 초과산화물의 분해능을 가진다고 보고하였다. 홍고추와 메주로 발효시킨 고추장에서 발효기간이 증가할수록 항산화 효과가 증가하였고(Yang 등, 2018), 생강 추출물과 유산균을 같이 처리하여 균 또는 생강 추출물

단일로 처리한 것보다 *in vivo* 실험에서 항산화 효과가 높게 나타나(Deol 등, 2018), 발효를 통해 생산된 대사산물이 항산화 효과를 가질 수 있는 것을 시사한다.

향신료의 세포독성 평가

생강 및 홍고추 수용성 추출물의 세포독성은 MTT 분석을 통해 측정하였다. Ghazanfari 등(2013)에 따르면 생강 추출물 2 mg/mL에서도 시료를 처리하지 않은 그룹보다 높은 성장성을 보였다. 또한, Lin 등(2013)에 따르면 200 µg/mL 농도의 홍고추 추출물의 세포독성이 시료를 첨가하지 않은 DMSO와 같은 100%의 세포 생존율을 보였다. 본 실험에서는 선행논문의 결과를 바탕으로 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL 농도의 시료를 HT-29 장 상피세포에 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 시료를 처리하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 했을 때, 생강 추출물의 경우 낮은 농도 순으로 100.9, 107.8, 104.7, 97.9, 62.0, 56.6%의 세포 생존율

Fig. 5. Cytotoxicity was determined by MTT assay. Effects of (A) ginger (*Zingiber officinale*) and (B) red pepper (*C. annuum* L.) aqueous extract on cell viability in HT-29 cells. HT-29 cells were cultured for 24 h with various concentration of ginger and red pepper (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, and 5 mg/mL). Results are mean±SE of triplicate data. Post hoc test done using Tukey's range test; values with different letters (a-c) above bars indicate a significant difference between groups ($P < 0.05$).

을 나타냈고, 홍고추 추출물의 경우 102.0, 102.0, 106.7, 100.7, 81.3, 53.3의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 5A, 5B). 이후 진행한 세포실험에서 사용된 생강 및 홍고추 추출물 모두 대조군에 가까운 세포 생존율을 보이는 최대 농도인 1 mg/mL의 농도로 진행하였다.

선별된 균주 및 향신료 배양액 의한 밀착연접 단백질 발현량 확인

본 실험에서는 LPS로 염증 유도된 HT-29 장 상피세포에 향신료 수용성 추출물, 유산균을 향신료 수용성 추출물에 24시간 배양한 후 만든 균주의 향신료 추출물 배양액을 처리하여 밀착연접 단백질의 mRNA 발현량의 변화를 확인하였다. 세포실험에 사용된 균주는 향신료를 이용한 균 성장성 평가에서 높은 성장성을 보였던 *B. bifidum* CBT BF3, *B. longum* CBT BG7, *L. acidophilus* CBT LA1, *L. plantarum* CBT LP3 등의 4가지 균주가 선별되었다. 향신료는 균 성장성 평가에서 높은 성장성을 보이고 DPPH 라디칼 소거능 평가에서 높은 항산화 효과를 보였던 생강 추출물과 홍고추 추출물이 사용되었다. 앞서 DPPH 라디칼 소거능 평가를 통해 생강 추출물 및 홍고추 추출물에서의 배양액이 높은 항산화 효과를 보이는 것을 확인하였기에, 본 실험에서는 향신료 발효물의 다른 기능성을 평가하기 위해서, 생강 추출물 및 홍고추 추출물에서의 배양액이 HT-29 세포실험에서 밀착연접 단백질 증가 등의 다른 효과를 가져올 수 있는지 확인하고자 하였다. 높은 항산화 효과를 통해 세포 내 reactive oxidative species 등의 자유라디칼을 제거하여 세포 내 염증을 완화하고(Venancio 등, 2017) 세포 항상성 유지에 도움을 줄 수 있다고 알려진 바 있다(Barrera 등, 2012).

생강 및 홍고추 수용성 추출물을 1 mg/mL의 농도로 처리한 경우, 생강 추출물은 밀착연접 단백질 mRNA 발현량에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 홍고추 추출물은 밀착연접 단백질인 ZO-1, Occludin의 mRNA 발현량이 대조군과 비

교하여 유의미한 차이를 보이며 증가하는 것으로 나타났다. 홍고추 수용액 추출물을 *B. bifidum* CBT BF3 및 *L. plantarum* CBT LP3로 발효하여 만들어 HT-29 세포에 처리했을 때, 홍고추 추출물 배양액 처리군에서 ZO-1 혹은 Occludin의 발현량이 대조군 및 LPS 처리군보다 높게 나타났다. 향신료 및 실험 균주별로 밀착연접 단백질 발현량 차이를 비교한 결과, *B. bifidum* CBT BF3의 홍고추 추출물 배양액 처리 시 ZO-1 및 Occludin의 발현량이 대조군 및 LPS 처리군보다 증가하는 모습을 보였으며(Fig. 6A), *B. longum* CBT BG7의 홍고추 추출물 배양액 처리 시 ZO-1 발현량이 대조군 및 LPS 처리군보다 증가하는 모습을 나타냈다(Fig. 6B). *L. acidophilus* CBT LA1의 홍고추 추출물 배양액 처리 시 Occludin의 발현량이 대조군 및 LPS 처리군보다 증가하는 모습을 보였으며(Fig. 6C), *L. plantarum* CBT LP3의 홍고추 추출물 배양액 처리 시 ZO-1 및 Occludin 발현량이 대조군 및 LPS 처리군보다 증가하는 모습을 나타냈다(Fig. 6D). 실험은 선별된 균주 및 향신료별 독립적으로 최소 3번의 반복을 통해 진행되었다.

밀착연접 단백질은 장 상피세포 간 이음새를 조절함으로써 외부 물질의 장관 투과에 영향을 줄 수 있다. 병원균, 독소, 항원 등의 유해한 분자가 장 상피에 과량 투과되어 장 점막 손상으로 인해 tight junction이 느슨해져 장의 투과성이 증가한 상태를 장 누수증후군(leaky gut syndrome)이라 부르기도 한다(Levendoski 등, 2014). 프로바이오틱스는 스트레스, 감염, 염증성 사이토카인으로 인한 밀착연접 단백질의 구조 변화를 억제하여 장벽 손상을 완화할 수 있다고 알려져 있다(Chang 등, 2013). *S. thermophilus* 및 *L. acidophilus*가 HT-29 및 Caco-2 세포의 장 투과성을 감소시킨 것이 보고되었고(Resta-Lenert와 Barrett, 2003), *B. infantis*에 의해 발효된 배양 배지는 밀착연접 단백질 인자인 ZO-1 및 Occludin 발현량을 증가시킨 연구 결과가 있다(Ewaschuk 등, 2008).

선별된 균주의 홍고추 수용성 추출물에서 배양된 대사산

Fig. 6. The mRNA expression of ZO-1 and Occludin in human colon epithelial HT-29 cell was analyzed by real-time PCR. HT-29 cell was treated with 1 mg/mL of aqueous extract ginger (GIN) and red pepper (RED) and fermented spices with lactic acid bacteria. Data was normalized using GAPDH housekeeping gene. Heat-killed CBT strains involve (A) *B. bifidum* CBT BF3, (B) *B. longum* CBT BG7, (C) *L. acidophilus* CBT LA1, and (D) *L. plantarum* CBT LP3. The aqueous extract spices were incubated with each CBT strain at 37°C for 24 h in order to make fermented spices products. After the treatments, HT-29 cell was incubated with LPS 10 µg/mL. The results were expressed in mean±SE (n=3) values. Post hoc test done using Duncan's multiple range test; values with different letters (a-c) above bars indicate a significant difference between groups ($P<0.05$).

Fig. 6. Continued.

물은 대조군과 비슷하거나 증가한 밀착연접 단백질 발현량을 나타내어 본 실험 결과를 통해 LPS로 염증이 유도된 세포에 대해 유산균 및 유산균의 향신료 추출물 배양액이 장벽

기능 개선의 가능성이 있음을 시사하였다. 유산균의 장벽 기능 보호 효과는 *in vitro* 실험뿐만 아니라 *in vivo* 동물 실험에서도 기능성이 나타났는데, 대장염 마우스 모델에서 열

처리된 *L. rhamnosus* OLL2838 사균체를 처리했을 경우 ZO-1과 Occludin의 발현량이 증가한 것이 보고되었다 (Miyauchi 등, 2009). 그러므로 향후 실험에서 선별 균주인 *B. bifidum* CBT BF3, *B. longum* CBT BG7, *L. acidophilus* CBT LA1, *L. plantarum* CBT LP3를 홍고추 추출물로 배양하여 만든 유산균 대사물질을 *in vivo* 실험에서 처리한다면 장벽 기능 개선 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

한국인 분변 유래 균주 모두 홍고추 수용성 추출물에서 높은 생장성을 보였으며, 이는 장내 미생물 군총이 지리적, 민족적 특성에 따라 다른 것으로 미루어 보아 오랜 식이에 의한 것일 수 있다고 생각한다. 한국인 분변 유래 균주의 홍고추 추출물 배양액은 높은 항산화능을 보였으며, HT-29 세포실험에서 밀착연접 단백질의 발현량을 증가시키는 모습을 보였다. 따라서 본 실험 결과를 바탕으로 한국인 분변 유래 균주는 홍고추를 섭취하는 사람들에게 더 적합한 유산균으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 한식에서 많이 사용되는 마늘, 양파, 생강, 고추, 청양고추 등 향신료에서 한국 사람으로부터 분리된 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium* 등 10종(한국 영유아 분변 유래 4종, 한국 성인 분변 유래 5종, 김치 유래 1종)의 유산균이 높은 생장성을 보이는 것을 확인하였으며, 8개의 유산균이 5가지의 향신료 중 홍고추 수용성 추출물에서 가장 높은 생장성을 나타냈다. 실험 균주의 프로바이오틱스로서의 특성을 파악하기 위해 장 상피세포인 HT-29에 대한 부착능력, 내산성 및 내담성, 젤라틴 분해효소 및 요소 분해효소의 활성을 시험하였다. 또한, 실험 균주를 홍고추 수용성 추출물에서 24시간 배양하여 DPPH 라디칼 소거능을 통해 유산균의 항산화 효과를 평가하였다. 그 결과, 향신료에서의 생장성이 높고 프로바이오틱스로서의 우수한 특성을 나타낸 *B. bifidum* CBT BF3, *B. longum* CBT BG7, *L. acidophilus* CBT LA1, *L. plantarum* CBT LP3 균주 4가지를 선별하고, 향신료 추출물 배양액 중에서 높은 항산화 효과를 보였던 생강과 홍고추를 선정하여 세포실험을 진행하였다. LPS로 염증이 유도된 HT-29 세포에 선별된 균주의 향신료 추출물 배양액을 처리하여 밀착연접 단백질인 ZO-1 및 Occludin의 mRNA 발현량이 증가함을 확인하였다. 이는 홍고추 추출물 배양액이 높은 항산화 기능성을 보일 뿐만 아니라 장벽 기능을 향상시킬 수 있는 가능성이 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구에서 사용된 균주는 (주)셀바이오텍에 의해 제공되어 실험에 이용되었다.

REFERENCES

- Barrera GJ, Sanchez G, Gonzalez JE. Trefoil factor 3 isolated from human breast milk downregulates cytokines (IL8 and IL6) and promotes human beta defensin (hBD2 and hBD4) expression in intestinal epithelial cells HT-29. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012. 12:256-264.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958. 181:1199-1200.
- Chang B, Sang L, Wang Y, Tong J, Zhang D, Wang B. The protective effect of VSL#3 on intestinal permeability in a rat model of alcoholic intestinal injury. *BMC Gastroenterol.* 2013. 13:151. <https://doi.org/10.1186/147-230X-13-151>
- Deol PK, Khare P, Bishnoi M, Kondepudi KK, Kaur IP. Co-administration of ginger extract-*Lactobacillus acidophilus* (cobiotic) reduces gut inflammation and oxidative stress via downregulation of COX-2, i-NOS, and c-Myc. *Phytother Res.* 2018. 32:1950-1956.
- Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008. 295:G1025-G1034.
- Ford AC, Harris LA, Lacy BE, Quigley EMM, Moayyedi P. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018. 48:1044-1460.
- Ghazanfari T, Yaraee R, Shams J, Rahmati B, Radjabian T, Hakimzadeh H. Cytotoxic effect of four herbal medicines on gastric cancer (AGS) cell line. *Food Agric Immunol.* 2013. 24:1-7.
- Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol.* 2017. 8:1162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>
- Henderson DE, Slickman AM, Henderson SK. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. *J Agric Food Chem.* 1999. 47:2563-2570.
- Hemraj V, Diksha S, Avneet G. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare J Life Sci.* 2013. 1(1): 1-7.
- Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol.* 1999. 65:4949-4956.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol.* 1998. 27:183-185.
- Joe MM, Jayachitra J, Vijayapriya M. Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens. *J Med Plants Res.* 2009. 3:1134-1136.
- Kim J, Bang J, Beuchat LR, Kim H, Ryu JH. Controlled fermentation of kimchi using naturally occurring antimicrobial agents. *Food Microbiol.* 2012. 32:20-31.
- Kim SJ, Cho SY, Kim SH, Song OJ, Shin IS, Cha DS, et al. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT—Food Sci Technol.* 2008. 41:493-500.
- Kim Y, Koh JH, Ahn YJ, Oh S, Kim SH. The synergic anti-inflammatory impact of *Gleditsia sinensis* Lam. and *Lactobacillus brevis* KY21 on intestinal epithelial cells in a DSS-induced

- colitis model. Korean J Food Sci An. 2015. 35:604-610.
- Ku KH, Sunwoo JY, Park WS. Effects of ingredients on the its quality characteristics during Kimchi fermentation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005. 34:267-276.
- Kwak SH, Cho YM, Noh GM, Om AS. Cancer preventive potential of kimchi lactic acid bacteria (*Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*). J Cancer Prev. 2014. 19:253. <https://dx.doi.org/10.15430/JCP.2014.19.4.253>
- Kwon HS, Shin HK, Kwon SO, Yeo KM, Kim SM, Kim BN, et al. Antiinflammatory effect of aqueous extract from red pepper on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in murine macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009. 38:1289-1294.
- Lee DK, Park JE, Kim KT, Do MJ, Chung MJ, Lee GS, et al. Stability traits of probiotics isolated from Korean on spices and propolis. Korean J Microbiol. 2014. 50:216-222.
- Levendoski EE, Leydon C, Thibeault SL. Vocal fold epithelial barrier health and injury: a research review. J Speech Lang Hear Res. 2014. 57:1679-1691.
- Li N, Russell WM, Douglas-Escobar M, Hauser N, Lopez M, Neu J. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. Pediatr Res. 2009. 66:203-207.
- Li S, Ma C, Gong G, Liu Z, Chang C, Xu Z. The impact of onion juice on milk fermentation by *Lactobacillus acidophilus*. LWT – Food Sci Technol. 2016. 65:543-548.
- Lim JH, Yoon SM, Tan PL, Yang S, Kim SH, Park HJ. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* LRCC5193, a plant-origin lactic acid bacterium isolated from Kimchi and its use in chocolates. J Food Sci. 2018. 83:2802-2811.
- Lim SM, Jeong JJ, Woo KH, Han MJ, Kim DH. *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. Nutr Res. 2016. 36:337-348.
- Lin CH, Lu WC, Wang CW, Chan YC, Chen MK. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. BMC Complementary Altern Med. 2013. 13:46. <https://www.biomedcentral.com/1472-6882/13-46>
- Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Dig Dis Sci. 2000. 45:1617-1622.
- Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Tang GY, Li HB. Antibacterial and antifungal activities of spices. Int J Mol Sci. 2017. 18:1283. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- Ma G, Chen Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. J Funct Foods. 2020. 66:103829. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103829>
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004. 286:G367-G376.
- Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients. 2017. 9:1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.). J Agric Food Chem. 2005. 53:1750-1756.
- Miyauchi E, Morita H, Tanabe S. *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase *in vivo*. J Dairy Sci. 2009. 92:2400-2408.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983. 65:55-63.
- Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y, Kim SH. Enhancement of antioxidative and intestinal anti-inflammatory activities of glycated milk casein after fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* 4B15. J Agric Food Chem. 2017. 65:4744-4754.
- Ohland CL, MacNaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010. 298:G807-G819.
- Özer D, Akin S, Özer B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in Acidophilus-Bifidus yoghurt. Food Sci Tech Int. 2005. 11:19-24.
- Panpatil VV, Tattari S, Kota N, Nimgulkar C, Polasa K. *In vitro* evaluation on antioxidant and antimicrobial activity of spice extracts of ginger, turmeric and garlic. J Pharmacogn Phytochem. 2013. 2:143-148.
- Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily 3rd JW. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. J Med Food. 2014. 17:6-20.
- Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresour Technol. 2010. 101:4676-4689.
- Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). Gut. 2003. 52:988-997.
- Sharma S, Jain S, Nair GN, Ramachandran S. *Capsicum annum* enhances L-lactate production by *Lactobacillus acidophilus*: implication in curd formation. J Dairy Sci. 2013. 96:4142-4148.
- Shen Q, Shang N, Li P. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. Curr Microbiol. 2011. 62:1097-1103.
- Sutherland J, Miles M, Hedderley D, Li J, Devoy S, Sutton K, et al. *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. Int J Food Sci Nutr. 2009. 60:717-727.
- Venancio VP, Cipriano PA, Kim H, Antunes LM, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. Food Funct. 2017. 8:307-314.
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. Nutrients. 2017. 9:521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
- Yang HJ, Lee YS, Choi IS. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of fermented soybean-based red pepper paste, *Gochujang*, prepared with five different red pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. J Food Sci Technol. 2018. 55:792-801.
- Yang JH, Mau JL, Ko PT, Huang LC. Antioxidant properties of fermented soybean broth. Food Chem. 2000. 71:249-254.
- Zhang N, Huang X, Zeng Y, Wu X, Peng X. Study on prebiotic effectiveness of neutral garlic fructan *in vitro*. Food Sci Hum Wellness. 2013. 2:119-123.