

# 한국전통발효식품에서 분리한 Probiotics의 특징 및 Synbiotics 항균활성 효과

문채윤, 허문수\*

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Received: June 8, 2021 / Revised: July 23, 2021 / Accepted: August 9, 2021

## Characteristics of Probiotics Isolated from Korean Traditional Foods and Antibacterial Activity of Synbiotics

Chae-Yun Moon and Moon-Soo Heo\*

Department of Aquatic Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

Traditional foods are manufactured according to the characteristics of each region for the nations of the world. Korea has mainly farmed, and seasonings have developed around rice and vegetables. In fermented foods, lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* sp. and *Pediococcus* sp. and *Bacillus* sp. were isolated and identified from fermented foods. In this study, lactic acid bacteria were isolated and identified from commercially available traditional Korean fermented foods, and candidate strains were selected through antibacterial activity tests on human and fish disease bacteria. Thereafter, the final strain was selected by examining the resistance to simulated gastric and intestinal fluids, and hemolysis. The three (M1, K1, C13) final selected lactic acid bacteria were mixed with prebiotics and the antibacterial activity of synbiotics was evaluated. As for the first antibacterial activity result, C13 showed high antibacterial activity in human diseases and fish diseases. Then, M1, K1 and C13, which did not produce  $\beta$ -haemolysis and were resistant to simulated gastric and intestinal fluids, were subjected to the second antibacterial activity of synbiotics. When the three prebiotics (FOS, GOS, Inulin) and probiotics (M1, K1, C13) were mixed, the antibacterial activity was increased or inhibited. Based on the 16S rRNA gene sequencing results, K1 and M1 were analyzed as *Bacillus tequiensis* 99.72%, *Bacillus subtilis* 99.65%, *Bacillus inaquosorum* 99.72%, *Bacillus cabrialesii* 99.72%, *Bacillus stercoris* 99.58%, *Bacillus spizizenii* 99.58%, *Bacillus halotolerans* 99.58%, and *Bacillus mojavensis* 99.51%. And C13 was analyzed as *Bacillus velezensis* 99.71%, *Bacillus nematocida* 99.36%, *Bacillus amyloliquefaciens* 99.44%, *Bacillus atrophaeus* 99.22%, and *Bacillus nakamurai* 99.44%.

**Keywords:** Synbiotics, probiotics, prebiotics, phylogenetic analysis, 16S rDNA, antibacterial activity

## 서론

전통식품은 자신의 국토의 삶과 기후, 풍토 및 지역 특산 산물에 따라 식습관과 식생활 등에 따라 만들어진다.

한국은 오랫동안 농경을 중심으로 먹거리를 해오며 쌀과 함께 채소류를 중심으로 조미료가 발달되었고, 염절임 기법을 통해 발효식품을 만들었다[1]. 대표적인 예로 김치가 있으며, 수산식품으로는 어패류를 소금에 절여 발효하고 숙성시켜 젓갈로 만들어 식용해왔다[2]. 젓갈은 단백질과 칼슘,

지방이 풍부하며 호염성 또는 염분성 미생물에 의해 발효되어 김치의 주원료 중 하나로 쓰이기도 한다[3]. 이러한 발효 식품에서 주로 찾아볼 수 있는 종은 *Lactobacillus* sp.과 *Pediococcus* sp. 및 *Bacillus* sp. 등을 분리할 수 있고 다양한 방법으로 동정 되어왔다[4]. WHO/FAO에서 유산균 (probiotics)은 적절하게 사용할 때 숙주의 건강에 이로움을 주는 살아있는 생균제로 정의하였다. 이들은 상피 장내 벽 강화 및 점막의 점착력을 증가시켜 병원균의 침입을 억제한다. 또한 병원성 미생물을 배제시키는 항 물질을 생산함으로써 면역 조절에 관여하게 된다[5].

Prebiotics는 특정 식품 속에 있는 섬유질 성분으로 장내 유익 세균의 성장을 도와주며 장 안의 유해세균과 유익세균

\*Corresponding author

Tel.: +82-64-754-3473, Fax: +82-64-756-3493

E-mail: msseo@jejunu.ac.kr

의 균형을 유지시켜준다[6]. 또한 면역계의 biomarker와 활동을 조절하는데 관련되어 장내 세균의 불균형 상태인 ‘dysbiosis’ 및 장내 염증 질환을 줄이는데 도움이 된다. Synbiotics는 이러한 probiotics와 prebiotics를 혼합한 것으로 단일로 사용했을 때보다 높은 시너지 효과를 발생한다. 이는 유산균의 생존능력을 강화시켜주고 특정된 건강에 이로인 효과를 나타낸다고 알려져 있다[7]. 돼지의 경우 영양소 소화 개선, 유해 가스 배출을 감소시키며 유해세균의 감염을 방지하며[8], 육계의 경우 사료 전환율과 체중이 증가하는 신바이오틱스의 긍정적 효과가 입증되었다[9]. 또한 양식 산업에서의 신바이오틱스는 수생 생물의 질병을 저항과 소화율을 증진시키는데 도움을 준다고 알려져 있으며[10] 지속적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 시장에서 시판되고 있는 한국전통발효식품을 통해 유산균을 분리 및 동정하였고, 유해세균에 대한 항균능력이 우수한 균주를 선별하였다. 그리고 우수 후보 균주의 인공위액 및 담즙액에 대한 내성과 용혈능 등을 검토하여 최종 균주를 선별하였다. 최종 선별된 유산균은 3종의 prebiotics와 혼합한 synbiotics로서의 항균활성 능력을 평가하였다. 이는 추후 양식 산업에서 일어나는 질병에 대한 예방 및 치료를 위한 응용 실험을 하는데 기초 자료로 사용될 것이라 생각된다.

**재료 및 방법**

**시료 준비**

본 실험에 사용된 한국전통발효식품은 제주도 제주시와 서귀포시에서 판매되고 있는 김치, 멸치 젓갈, 명란 젓갈, 갈치 젓갈, 창란 젓갈을 구매하여 아이스박스에 담아 -4℃를 유지시켜 운송시킨 후 실험에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

**유산균 분리**

한국전통발효식품에 존재하는 유산균을 분리하기 위해 멸균된 가위로 김치(K)와 젓갈류(M; 멸치 젓갈, R; 명란 젓갈,

K; 갈치 젓갈, C; 창란 젓갈)를 잘게 잘라내어 1g만 떠내어 멸균된 0.85% 생리식염수에 담아 단계별( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ )로 희석시켜 MRS agar (MRS, Difco., USA)에 각각 100 μl씩 도말하였다. 배지 상에서 자라난 균은 단일 colony로 순수 분리하여 같은 배지 상에 48시간 동안 재 배양시킨 후 25%(v/v) glycerol에 현탁시켜 -80℃에서 보관하였다.

**단일 유산균과 synbiotics 항균 활성 탐색**

항균 활성 탐색은 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 인체유해세균과 어류질병세균을 각각 분양 받아 사용하였고(Table 1), Wild type은 인체의 피부를 통해 분리하였다. 그리고 25% glycerol에 현탁시켜 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 유해 세균은 알맞은 배지 안에서 배양되었고, 한국전통식품에서 분리한 균주는 MRS에 접종시켜 35℃에서 48시간 동안 배양하였다. 각각 배양한 균주는 1.5 ml tube 안에 넣어 14240 ×g로 원심 분리한 뒤 상등액과 균체로 나누어 분리하였다. 상등액은 0.45 μm syringe filter (Whatman, UK)를 통해 여과시켰고 균체는 0.85% 생리식염수 50 μl를 넣어 풀어냈다. 다음 여과된 상등액과 현탁된 균체는 각각 멸균된 8 mm paper disc (Advantec, Japan)에 50 ul씩 분주하고 35℃에서 24시간동안 건조시켰다. 병원균은 MacFarland turbidity 0.4로 조절한 후 Muller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말하여 각각의 배양 온도에 맞추어 48시간 동안 형성된 억제환의 크기를 측정하였다.

유산균과 prebiotics의 혼합(synbiotics)은 용혈성과 인공위액 및 담즙액에서 안전성을 가진 균주를 선별하여 실험에 사용되었다. Prebiotics는 Galactooligosaccharides (GOS, Carbosynth., UK), Fructooligosaccharide (FOS, Carbosynth., UK) 및 Inulin from chicory (Inulin, Carbosynth)을 각각 1-5%로 농도를 조정하여 사용하였다. 다음 0.45 μm syringe filter (Whatman)를 통해 여과시키고 유산균은  $10^5$ - $10^7$  cfu/g<sup>-1</sup>으로 맞추어 동일하게 혼합한 후 균체만 획득하여 위와 같은 실험방법으로 진행되었다.

**Table 1. List of strains used of antibacterial experiment.**

Information	Strain	No.	Medium	Temperature (°C)	Type
Fish pathogen	<i>Straptococcus iniae</i>	KCTC3657	1.5BHIA	25	-
	<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC3651	1.5BHIA	25	-
	<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC12267	1.5BHIA	25	-
Human pathogen	<i>Escherichia coli</i>	KCTC1682	TSA	37	-
	<i>Micrococcus luteus</i>	KCCM11211	NA	26	-
	<i>Streptococcus mutans</i>	KCCM40105	BHIA	37	-
	<i>Salmonella enterica</i>	-	BHIA	37	Wild type

### 인공 위액 및 담즙액 내성

항균활성에서 우수한 결과를 나타낸 균주를 선별하여 인공 위액 및 담즙액 내성을 측정하였다. 인공 위액은 Brinques 등(2010), 인공 담즙액은 Charteris 등(1998)의 방법을 이용하였다. 인공 위액은 제조된 0.5% 멸균 생리식염수와 3.0 g/l의 농도로 제조된 pepsin (Sigma-Aldrich P7000, pH 2.0)을 이용하였다. 인공 담즙액은 0.5% 멸균된 생리식염수와 1 g/l pancreatin (Sigma-Aldrich P-1500)을 혼합시킨 뒤 4.5% bile salts (Oxoid, UK)를 첨가하여 최종 pH를 8.0으로 조정하여 사용하였다. 준비된 위액과 장액은 10 ml 코니칼튜브에 담아 유산균 1 ml cell suspension을 부드럽게 코니칼튜브에 넣어 잘 혼합시켜 주었다. 다음 37°C에서 0, 30, 60, 90, 120분에서 각각 배양시켰다. 시간 별로 배양된 혼합물은 MRS agar plate에 100 µl씩 분주하여 35°C에서 24시간 배양한 뒤 아래 식을 적용하여 생존율을 체크하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{[\text{생존 균 수(CFU/g)}]}{[\text{초기 균 수(CFU/g)}]} \times 100$$

### 용혈성 테스트

인공 위액과 담즙액에서 내성 결과가 우수했던 균주를 선별하여 5% (w/v) human blood 평판 배지에 접종하여 35°C에서 48시간 배양하였다. 그리고 배지가 어두워지고 녹색을 띠면 α-haemolysis, 콜로니 주변으로 적혈구가 완벽하게 용해되면 β-haemolysis, 용혈성을 띄지 않으면 γ-haemolysis로 각각 검토하였다.

### 16S rRNA 염기서열 분석

최종 선별된 균주는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)로 DNA를 추출하였다. 다음 genomic DNA 1 µl와 27F/1492R universal primer는 각각 0.5 µM primer와 DNA polymerase, reaction buffer, dNTPs가 포함된 20 µl PreMix (Bioneer)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

PCR 반응 조건은 Initial denaturation (95°C, 2분), Denaturation (95°C, 30초), Annealing (55°C, 30초), Extension (72°C, 30초)으로 총 30 cycle로 수행하고 마지막으로 다시 한번 Extension (72°C, 5분) 하였다. 증폭된 PCR 산물은 Red safe (Intron, USA)가 첨가된 1% agarose (Promega Co., USA) gel로 전기영동하여 확인하였다. 다음 Accuprep™ PCR purification Kit (Bioneer)를 사용하여 PCR 산물에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거 및 정제하고 elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 30 µl로 용출하였다. PCR products의 염기서열의 분석은 (주)솔젠트 (Korea)에 의뢰하여 결과를 얻었다. 분석된 염기서열은 EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)을 이용하여 homology를 확인하였다. 다음 ClustalX로

multiple alignment를 수행한 뒤 MEGA 6.0로 계통도 (phylogenetic tree)를 작성하였다.

### 결과 및 고찰

#### 분리된 유산균 및 synbiotics 혼합물 항균 활성 탐색

한국전통식품으로 분리된 유산균의 항균 활성 탐색 결과, C13은 인체유해세균 *E. coli*에서 11 mm, *M. luteus*는 12 mm의 저해환을 보였고 어류질병세균 *S. iniae* 22 mm, *S. parauberis* 26 mm 그리고 C14는 *E. coli* 14 mm, *S. enterica* 11 mm, *S. iniae* 19 mm, *E. tarda* 20 mm으로 2종은 가장 넓은 항균 스펙트럼을 보였다(Table 2). M1은 *E. coli* 11 mm, *S. iniae* 24 mm, *S. parauberis* 21 mm으로 나타났고 K1은 인체유해세균에서는 항균 활성을 나타내지 않았으나, 어류질병세균인 *S. iniae* (20 mm), *S. parauberis* (20 mm)와 *E. tarda* (14 mm)에서는 항균 활성을 나타냈다. R1은 *S. iniae* 18 mm, *S. parauberis* 25 mm이었고 C2는 *E. coli* 13.5 mm, *S. parauberis* 21 mm으로 보였고 C4는 *S. iniae* 20 mm, *S. parauberis* 16 mm, C8은 *E. coli* 16 mm, *S. parauberis*에서는 모든 균주 중 34 mm로 가장 높은 저해환을 보였다. C9는 *E. coli* 12 mm, *S. iniae* 9 mm이었으며, M2, M3, R2, R3, K5와 C16은 *S. parauberis*에서 각각 27 mm, 26 mm, 25 mm, 25mm, 18 mm 및 21 mm, C10은 *E. coli* 11 mm, C15는 *S. iniae* 14 mm로 각각 저해환이 측정되었고 나머지는 항균 활성이 관찰되지 않았다.

유산균은 일반적인 식품을 제조하는데 유통 기한을 늘리기 위한 화학적 물질을 대신하여 bacteriocin과 같은 천연 생체 활성 peptide로서 식품 부패와 병원균을 예방하고 품질 유지를 도모한다[13]. 인체같은 경우 구강에 700종 이상의 세균이 서식[14-16]하고 있는데 이들의 생태계 불균형을 막기 위해 probiotics는 유용하게 사용될 수 있다고 알려져 있다. 양식업은 수생 생물의 질병 치료 및 예방에 있어 오랜 시간 동안 항생제를 사용해 왔다. 그 결과, 염색체의 돌연변이에 의해 plasmid의 매개 저항성을 지닌 내성균주가 증가하게 되었고[17], 이를 대체할만한 안전요법으로 probiotics를 이용한 낚치[18], 돌돔[19] 및 가자미[20] 등의 여러 수생 생물에게 적용하였다. 그 결과 유산균의 이용은 성장을 증진 및 비특이적 면역을 활성화시키는 등 유익한 결과를 입증해 왔다. 이러한 probiotics의 대표 항균 물질은 bacteriocin으로 2차 대사산물이 아닌 단백질 또는 단백질 복합체로 살균 활성을 가지며[21, 22], 항균 범위가 매우 넓고 유해 세균의 억제 및 사멸 시키는데 효과적으로 알려져 있다[23, 24].

Synbiotics의 항균 활성은 기존의 유산균에 대한 저해환 크기가 측정되는 균주를 선별한 뒤, 인공 위액과 담즙액 및 용혈성에서 안정성을 보인 균주로 실험이 진행되었다. 우수

**Table 2. Antibacterial activity of LAB isolated from Korean traditional food.**

Isolated strain	Diameter of inhibition zone (mm)													
	Pathogenic bacteria													
	<i>E. coli</i>		<i>S. mutans</i>		<i>S. enterica</i>		<i>M. luteus</i>		<i>S. iniae</i>		<i>S. parauberis</i>		<i>E. tarda</i>	
Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	Super-natant	Pellet	
M1	-	11	-	-	-	-	-	-	-	24	-	21	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-	-
R1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	18	-	25	-	-
R2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	25	-	-
R3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	25	-	-
R7	-	11	-	+	-	-	-	-	-	20	-	18	-	-
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	20	-	14
K5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	18	-	-
K6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C2	-	13.5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	21	-	+
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	20	-	16	-	-
C5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	+	-	-
C8	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34	-	-
C9	-	12	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-
C10	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C13	-	11	-	-	-	-	-	12	-	22	-	26	-	-
C14	-	14	-	-	-	11	-	-	-	19	-	+	-	20
C15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	+	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	21	-	-

후보 균주로 선발된 M1, K1과 C13은 3종의 prebiotics를 농도 별로 혼합하고 어류질병세균을 타겟으로 실험을 진행한 결과, *E. tarda*에서는 항균능을 나타내지 않았다(No Data). M1같은 경우 *S. iniae*에서 혼합하기 전보다 낮은 23 mm를 보였으나 *S. parauberis*에서는 기존의 항균능력보다 높게 FOS 3%에서 24 mm의 항균 활성을 나타냈다(Table 3). K1은 기존의 *E. tarda*에서 보였던 저해환이 혼합을 통해 살균 능력을 잃었으나, *S. iniae*에서 미미하게 혼합물로 인해 저해환이 1 mm 늘어났고, *S. parauberis*에서는 Inuline 3%와 혼합 시 25 mm으로 기존 보다 5 mm의 증진된 항균 능력을 보였다. C13은 *S. parauberis*에서 Inuline 1%와 혼합 시 27 mm의 가장 높은 항균 활성을 보였으나 *S. iniae*에서는 미비한 저해환을 나타내었다. 다른 연구에서는 FOS와 *Lactobacillus* sp.과 혼합 시 항균 활성이 증가됨을 시사했

고[25, 26], Inulin은 bifidogenic prebiotics로 많이 알려져 있는데[27, 28] *Lactobacillus paracasei* CMGB16 [29]의 bacteriocin의 분비를 자극시킨다고 보고되었다. 본 연구에서는 Prebiotics와 probiotics의 혼합은 항균 활성 능력을 증가시킬 수도 저해할 수도 있었다. 이러한 결과는 신바이오틱스가 영양원의 흡수능력이 떨어져 발생된 것으로 추측된다. 이와 관련된 연구는 아직 미비한 실정으로 지속적인 연구가 필요할 것이다. 이외에도 추후 *in vitro*을 통한 추가 시험으로 synbiotics의 효과를 입증하는데 도움될 것이라 생각된다.

**인공 위액과 담즙액 내성 및 용혈성 테스트**

인공 위액과 담즙액 결과, 30분 뒤에는 C16과 C15가 가장 높은 생존율을 보였으나, 60분 뒤 내성을 잃는 것을 확인하였다. 120분 뒤 C13이 71.0 ± 11.9%로 가장 높은 생존율을

**Table 3. Antibacterial activity of synbiotics (probiotics + prebiotics) treated with different concentrations.**

Pathogenic bacteria	Diameter of inhibition zone (mm)														
	Prebiotics														
	FOS					GOS					Inuline				
<i>S. parauberis</i>	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%
Isolated strain	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%
M1	23	22	24	22	21	20	20	20	23	22	22	22	23	23	23
K1	23	22	24	22	24	21	20	23	23	22	22	24	25	24	23
C13	23	22	22	23	22	22	23	23	22	25	27	23	23	25	24

Pathogenic bacteria	Diameter of inhibition zone (mm)														
	Prebiotics														
	FOS					GOS					Inuline				
<i>S. iniae</i>	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%
Isolated strain	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%
M1	21	20	23	21	23	20	19	18	20	20	21	22	22	23	21
K1	20	21	17	21	19	15	18	18	18	20	20	19	21	21	18
C13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

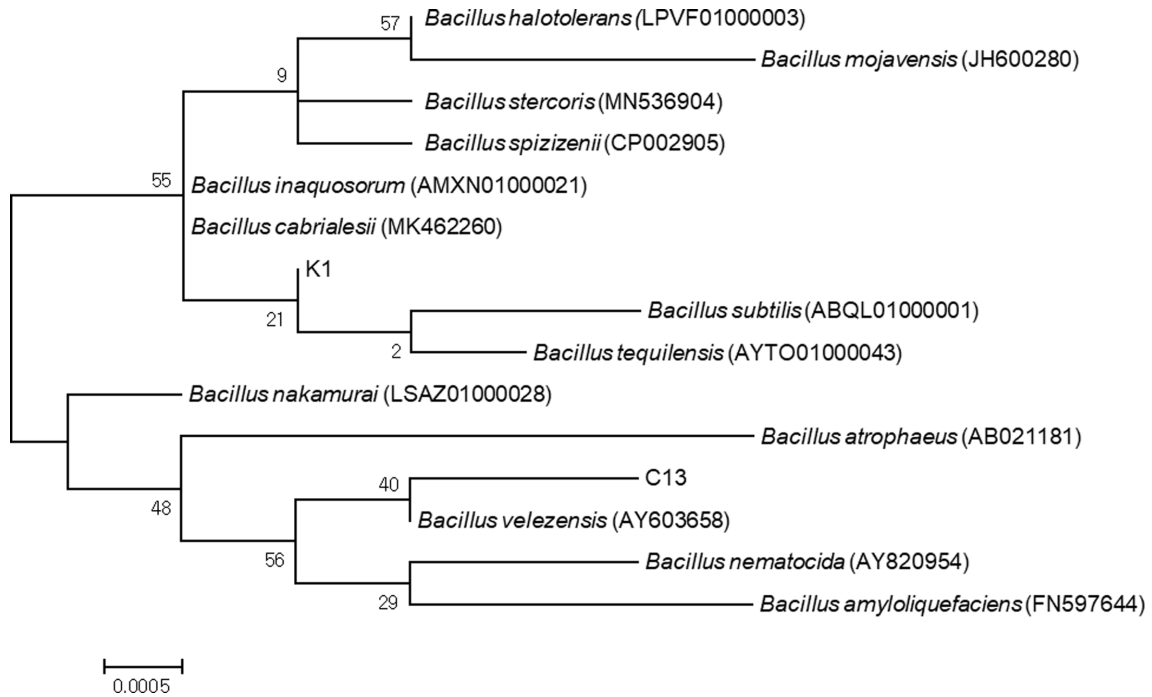
보였고 다음 K1이  $55.4 \pm 5.9\%$ , R3  $42.8 \pm 7.5$  그리고 M1이  $16.4 \pm 1.8$  순으로 인공 위액의 내성을 나타내었다. 나머지 균주는 5% 미만 또는 인공 위액에서 생존하지 못했다. 인공 담즙액에서는 최종적으로 가장 생존율이 높았던 균주는 C13으로  $48.9 \pm 2.9\%$ 을 보였고, 다음 C15  $45.1 \pm 13.3\%$ , C16  $40.5 \pm 7.0\%$ , C7  $36.5 \pm 1.4\%$ , R1  $26.2 \pm 3.9\%$ , M1  $23.7 \pm 3.7\%$  및 K1  $20.5 \pm 3.9\%$  순으로 나타났다(Table 4). 그 외 나머지는 3% 미만의 생존율을 보였다. 몇몇의 균주는 인공 위액에

서 생존하지 못했으나 인공 담즙액에서는 생존하는 것을 관찰할 수 있었다. 숙주 체내 안에서의 인공위액과 담즙액 내성은 probiotics로서의 필수 요건으로 알려져 있다. 용혈성 결과에서는 K1, C8, C13 및 C15가  $\gamma$ -haemolysis를 보였고, M1, R2, R3와 R4는  $\alpha$ -haemolysis로 나타났고, 나머지는  $\beta$ -haemolysis를 생산하였다. 결과적으로  $\beta$ -haemolysis를 생산하지 않고 인공위액과 담즙액의 내성을 지닌 M1, K1 및 C13이 probiotics로 이용할 수 있다 판단되었다.

**Table 4. Simulated gastric juice and intestinal juice tolerance and hemolytic test of LAB isolated from Korean traditional food.**

Isolated strain	Survival (%)								Haemolysis
	Gastric juice				Intestinal juice				
	30 min	60 min	90 min	120 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
M1	$17.6 \pm 2.2$	$15.5 \pm 2.3$	$14.4 \pm 3.6$	$16.1 \pm 1.8$	$29.0 \pm 7.3$	$50.7 \pm 8.1$	$36.0 \pm 9.0$	$23.7 \pm 3.2$	$\alpha$
M2	$0.5 \pm 0.1$	ND	ND	ND	$1.0 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.1$	ND	ND	$\beta$
R1	$3.9 \pm 0.8$	$3.3 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.9$	$52.2 \pm 1.7$	$40.6 \pm 0.6$	$26.7 \pm 6.7$	$26.2 \pm 3.9$	$\beta$
R2	$34.1 \pm 7.7$	$29.1 \pm 3.9$	$3.8 \pm 1.3$	$5.2 \pm 0.7$	$11.4 \pm 0.7$	$5.8 \pm 0.6$	$4.0 \pm 0.4$	$1.8 \pm 0.7$	$\alpha$
R3	$28.8 \pm 3.5$	$41.6 \pm 1.4$	$38.7 \pm 2.4$	$42.8 \pm 7.5$	$9.5 \pm 1.3$	$3.9 \pm 1.1$	$3.4 \pm .5$	$2.1 \pm 0.4$	$\alpha$
R4	ND	ND	ND	ND	$0.9 \pm 0.5$	$0.5 \pm .5$	$0.3 \pm 0.2$	$0.1 \pm 0.2$	$\alpha$
K1	$59.8 \pm 2.6$	$47.2 \pm 10.1$	$50.0 \pm 8.3$	$52.0 \pm 8.0$	$55.4 \pm 5.9$	$41.4 \pm 2.4$	$40.1 \pm 6.6$	$20.5 \pm 3.9$	$\gamma$
K2	ND	ND	ND	ND	$4.1 \pm 1.8$	$3.8 \pm 1.3$	$2.9 \pm 1.0$	$3.0 \pm 0.8$	$\beta$
C7	$26.9 \pm 7.8$	$23.7 \pm 7.5$	ND	ND	$53.3 \pm 4.7$	$1.2 \pm 0.2$	$40.6 \pm 7.2$	$36.5 \pm 1.4$	$\beta$
C8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$\gamma$
C13	$30.9 \pm 4.1$	$33.1 \pm 6.8$	$31.6 \pm 3.4$	$23.8 \pm 6.5$	$71.0 \pm 11.9$	$92.3 \pm 6.3$	$36.9 \pm 4.0$	$48.9 \pm 2.9$	$\gamma$
C15	$83.0 \pm 20.2$	ND	ND	ND	$54.0 \pm 18.1$	$55.9 \pm 14.7$	$37.5 \pm 12.7$	$45.1 \pm 13.3$	$\gamma$
C16	$133.3 \pm 22.0$	ND	ND	ND	$65.3 \pm 3.0$	$50.2 \pm 6.0$	$47.0 \pm 5.9$	$40.5 \pm 7.0$	$\beta$

\*ND: No data.



**Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences of probiotics from the Korean traditional fermented food.** GenBank accession numbers given in parentheses. Bootstrap values (> 50%) based on 1,000 replications are shown.

**16S rRNA 염기서열의 계통학적 분석**

Probiotics로서의 연구할 수 있는 최종 균주 3종은 16S ribosomal RNA PCR로 증폭하여 염기 서열을 얻었다. 다음 EZbiocloud을 통해 분석한 결과, K1과 M1은 *Bacillus tequiensis* 99.72%, *Bacillus subtilis* 99.65%, *Bacillus inaquosorum* 99.72%, *Bacillus cabrialesii* 99.72%, *Bacillus stercoris* 99.58%, *Bacillus spizizenii* 99.58%, *Bacillus halotolerans* 99.58%, *Bacillus mojavensis* 99.51%로 분석되었다. 그리고 C13은 *Bacillus velezensis* 99.71%, *Bacillus nematocida* 99.36%, *Bacillus amyloliquefaciens* 99.44%, *Bacillus atrophaeus* 99.22%, *Bacillus nakamura* 99.44%로 분석되었고, 가장 가까운 종의 계통수를 작성하였다(Fig. 1).

**요 약**

세계 각국의 민족은 자신의 국토의 삶과 기후 풍토, 지역 특산 산물과 식습관 및 식생활 등에 따라 색다른 전통식품이 만들어 진다. 한국은 오랫동안 농경을 중심으로 먹거리를 해오며 쌀과 함께 결들일 채소류를 중심으로 조미료가 발달되었고, 염절임 기법을 통해 발효식품을 만들었다. 이러한 발효식품에서 주로 찾아볼 수 있는 종은 *Lactobacillus* sp.과 *Pediococcus* sp. 및 *Bacillus* sp. 등과 같은 유산균을 분리할

수 있었고 다양한 방법으로 동정 되어왔다. 본 연구에서는 시장에서 시판되고 있는 한국전통발효식품을 통해 유산균을 분리 및 동정하였고, 유해세균에 대한 항균능력이 우수한 균주를 선별하였다. 그리고 우수 후보 균주의 인공위액 및 담즙액에 대한 내성과 용혈능 등을 검토하여 최종 균주를 선별하였다. 최종 선별된 유산균은 3종의 prebiotics와 혼합한 synbiotics로서의 항균활성 능력을 평가하였다. 1차 항균 활성에서 C13은 인체 및 어류질병세균에서 가장 넓은 항균 스펙트럼을 보였고, β-haemolysis를 생산하지 않고 인공위액과 담즙액의 내성을 지닌 M1, K1 및 C13을 synbiotics의 2차 항균 활성을 수행하였다. Prebiotics 3종(FOS, GOS, Inulin)과 선별된 균주가 혼합된 synbiotics에서는 이전 보다 항균 활성이 증진 또는 저해됨을 알 수 있었다. 16 rDNA 염기서열 결과, K1과 M1은 *Bacillus tequiensis* 99.72%, *Bacillus subtilis* 99.65%, *Bacillus inaquosorum* 99.72%, *Bacillus cabrialesii* 99.72%, *Bacillus stercoris* 99.58%, *Bacillus spizizenii* 99.58%, *Bacillus halotolerans* 99.58%, *Bacillus mojavensis* 99.51%로 분석되었다. 그리고 C13은 *Bacillus velezensis* 99.71%, *Bacillus nematocida* 99.36%, *Bacillus amyloliquefaciens* 99.44%, *Bacillus atrophaeus* 99.22%, *Bacillus nakamura* 99.44%로 분석되었다.

## Acknowledgments

This work was supported by the research grant of Jeju National University in 2021.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflict of interest to declare.

## References

- Shin DH. 2010. Globalization trends and prospect of Korean traditional fermented foods. *Food Sci. Ind.* **43**: 69-82.
- Kim SM. 2020. The present condition and development prospect of the fermented fishery products. *Food Sci. Biotechnol.* **53**: 200-214.
- Lee KW, Park JY, Sa HD, Jeong JH, Jin DE, Heo HJ, et al. 2014. Probiotic properties of *pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe* **28**: 199-206.
- Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily 3<sup>rd</sup> JW. 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J. Med. Food.* **17**: 6-20.
- Miriam BB, Julio PD, Sergio MQ, Carolina GL, Angel G. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* **61**: 160-174.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **104**: S1-S63.
- Sekhon BS, Jairath S. 2010. Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *J. Pharm. Educ. Res.* **1**: 13-36.
- Ziggers-Anim D. 2000. A new prebiotic derived from whey. *Anim. Feed Sci. Technol.* **5**: 34-36.
- Li X, Xu C. 2008. Effects of supplementation of fructooligosaccharide and/or *Bacillus subtilis* to diets on performance and on intestinal microflora in broilers. *Arch. Tierz.* **51**: 64-70.
- Dehaghani PG, Baboli MJ, Moghadam AT, Ziaei-Nejad S, Pourfarhadi M. 2015. Effect of symbiotic dietary supplementation on survival, growth performance and digestive enzyme activities on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Czech J. Anim. Sci.* **60**: 224-232.
- Brinques GB, Ayub MAZ. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *J. Food Eng.* **103**: 123-128.
- Zanjani MAK, Tarzi BG, Sharifan A, Mohammadi N. 2014. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iran J. Pharm. Res.* **13**: 843-852.
- Khochamit N, Siripornadulsil S, SuKon P, Siripornadulsil W. 2015. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. *Microbiol. Res.* **170**: 36-50.
- Paster BJ, Olsen I, AAS JA, Dewhirst FE. 2000. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* **2000**. **42**: 80-87.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. 2000. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol.* **2000**. **55**: 16-35.
- Samot J, Badet C. 2013. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* **19**: 34-38.
- Lewin CS. 1992. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. pp.288-301. In: Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality (Michel C and Alderman DJ eds). Iffice international des Epizooties, Paris, France.
- Byun JW, Park SC, Benno Y, Oh TK. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 305-308.
- Kim DH, Subramanian D, Heo MS. 2017. Dietary effect of probiotic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*-JFP2 on growth and innate immune response in rock bream *oplegnathus fasciatus*, challenged with *Streptococcus iniae*. *Isr. J. Aquac.* **69**: 11.
- Tapia-Paniagua ST, Chabrilion M, Diza-Rosales P, Banda IGD I, Lobo C, Balebona C, et al. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (kaup, 1858) following probiotic administration. *Microb. Ecol.* **60**: 310-319.
- Bergan T, Ekstron B, Nord CE. 1986. Ecological impacts of antibacterial agents: Stockholm. *Scand J. Infect. Dis.* **18**: 1-203.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Res.* **40**: 722-756.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.
- Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 564-582.
- Mandadzhieva T, Ignatova-ivanova T, Kambarev S, Iliev I, Ivanova I. 2011. Utilization of different prebiotics by *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **25**: 117-120.
- Munoz M, Mosquera A, Almeciga-Diaz CJ, Melendez AP, Sanchez OF. 2012. Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe* **18**: 321-330.
- Bosscher D, Loo JV, Franck A. 2006. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. *Nutr. Res. Rev.* **19**: 216-226.
- Patel S, Goyal A. 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech.* **2**: 115-125.
- Vamanu E, Vamanu A. 2010. The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**: 534-537.