

Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp. Isolated from *Gajami Sikhae*

Eun-Yeong Bae¹, Gi-Un Cho¹, Ji-Hye Kim¹, Sung-Keun Jung^{1,2}, Young-Je Cho^{1,2} and Byung-Oh Kim^{1,2*}

¹School of Food Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Research Institute of Tailored Food Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Received October 26, 2022 / Revised April 13, 2023 / Accepted April 13, 2023

Forty species of lactic acid bacteria isolated from *gajami sikhae* were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, and *Weissella paramesenteroides*. 10 of the 40 strains were selected and used for the test. In this study, experiments such as those using acid and artificial gastric juice resistance, bile acid resistance, autoaggregation, coaggregation, and cell surface hydrophobicity were conducted to utilize lactic acid bacteria separated from *gajami sikhae* as probiotics. The separated lactic acid strains showed high survival rates through displaying resistance to acidic and artificial gastric juices; *L. plantarum* GS11 showed the best resistance. Also, as a result of a measurement of bile acid resistance, all lactic acid bacteria stocks showed survival of more than 100% with a probiotic number of 10^8 to 10^9 log CFU/ml. After evaluating cohesion to indirectly measure cell surface adhesion, autoaggregation ability was shown to be more than 46%. Measurement of xylene adhesion for cell surface hydrophobicity evaluation revealed better cell adhesion than *B. subtilis*, which has 32.2% hydrophobicity in isolated lactic acid strains. Antibacterial force measurement found antibacterial activity in lactic acid bacteria, excluding *L. plantarum* GS12 and *L. plantarum* GS13. Therefore, it was judged that lactic acid bacteria separated from *gajami sikhae* could be used as probiotics with various probiotic properties.

Key words : Antibacterial, Gajami Sikhae, lactic acid bacteria, probiotics

서 론

빠르게 이루어지는 산업 발전으로 과거보다 삶이 풍족해지면서 현대 사회에서 급부상한 관심 분야는 건강이다. 이에 따라 식품 산업에서도 영양을 공급하는 1차 기능과 외양, 향, 맛과 같은 기호를 만족시켜주는 2차 기능을 넘어 항상성, 면역 등 건강과 관련된 3차 기능에 관심을 가지게 되었다. 다양한 건강 기능성 식품 연구 분야에서 프로바이오틱스(probiotics)는 떠오르는 주제 중 하나이다.

프로바이오틱스란 사람과 동물에게 유익한 작용을 하는 하나 혹은 다수의 미생물 배양체를 의미하며 현재에도 다양한 프로바이오틱스 관련 제품들이 시장에 나와 있는 상황이다. 프로바이오틱스로 얻을 수 있는 다양한 이로인 효과는 병원성 세균의 증식을 방지하고 억제하며 길항작용을 하고, 면역작용을 증가 및 조절 시켜주며, 항암 및 항돌연변이 작용을 한다. 그리고, 유당을 분해하지 못하

는 현상을 완화 시켜주고, 혈중에 있는 콜레스테롤 수치를 저하 시켜주는 작용과 혈압을 낮추는 작용을 하며, 설사의 빈도를 줄여주고 지속되는 기간을 줄여주는 것과 자궁염(vaginitis)을 예방 시켜준다. 마지막으로, 장 점막을 정상 상태로 유지할 수 있도록 해준다[6, 7, 19, 20, 27].

국내에서는 발효식품을 이용하여 추출한 프로바이오틱스에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 하지만 김치, 막걸리 등 몇몇 발효식품에 치우쳐져 있고, 가자미 식해와 같은 전통 발효식품에 대해서는 제조 방법이나 그에 따른 저장 방법 및 숙성하는 조건 등에 관한 연구가 대부분이고 분리한 유산균에 관한 연구는 미비한 실정이다[16, 26].

가자미 식해 중 식해는 곡식을 뜻하는 식자와 어육으로 담근 것갈을 의미하는 해자를 합쳐서 표기한 것으로 가자미와 백합 등 다양한 어패류와 곡류를 사용하여 만든 수산 발효식품이다[12]. 주재료인 어패류들이 염지와 숙성 기간 중에 어느 정도 분해되며 부재료인 곡류 등의 성분 에 의해 발효되어 침투되는 과정을 통해 유산균이 증식한다. 이를 통해 식해는 풍부한 단백질과 미네랄을 가지게 되며 독특한 풍미를 가지게 된다[12].

따라서, 본 연구에서는 가자미식해에서 분리한 유산균의 산성 및 인공 위액 저항성, 담즙산 저항성, 응집력, 그리고 세포 표면 소수성과 같은 프로바이오틱 특성을 연구

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7756, Fax : +82-53-950-6772

E-mail : kimb@knu.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.

함으로써, 생균제로서의 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

가자미 식해로부터의 유산균의 분리와 동정

유산균을 분리하기 위해 경상북도 포항 지역의 가정집에서 제조한 가자미 식해를 수집하였다. 수집된 가자미 식해 시료는 마쇄 후 MRS (de Man, Rogosa and Shape) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에 10% (w/v)로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하여 증균하였다. 0.5% CaCO₃가 첨가된 MRS 고체 배지에 증균액을 도말하여 37°C, 24-48시간 동안 배양해 투명환을 형성하는 균주를 순수 분리하였다. 분리한 균주는 Gram 염색, API 50 CHL kit (Biomérieux, Auvergne-Rhône-Alpes, Lyon, France) test를 진행하였고, 16S rDNA 염기서열 분석으로 최종 동정하였다. 사용된 primer는 Petri 등[23]의 연구를 참고하여 사용하였으며, Table 1과 같다. 동정된 유산균주 중 활성도가 높은 10종을 선별하여 20% glycerol (Duksan Chem., Ansan, Gyeonggi-do, Korea)과 1:1 비율로 조성하여 -80°C에서 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

유산균 배양 상등액의 제조

가자미 식해에서 분리된 유산균을 MRS 배지에 1% 비율로 접종한 뒤 37°C에서 24시간 동안, 2회 계대 배양 후, 4,000× g에서 15분간 원심분리(Gyrozen, Gimpo, Gyeonggi-do, Korea)한 후 상등액을 분리한 후 배양 상등액을 멸균 0.45 μm syringe filter (Hyundai Mic., Jung-gu, Seoul, Korea)로 여과하여 제조하였다.

산성 및 인공 위액 저항성

균주의 산 저항성을 확인하기 위해 Tokath 등의 방법[27]을 변형하여 실험을 실시하였고, 인공 위액은 Kobayashi 등의 방법[14]을 변형해 0.1 N HCl를 사용하여 pH 2.5로

조정된 MRS 액체배지에 pepsin (Daejung Chem., Goryeong, Gyeongsangbuk-do, Korea) 1,000 units/ml를 첨가하여 인공 위액을 제조 후 실험에 사용하였다. MRS 액체배지에서 37°C에서 24시간동안 배양한 후 균주의 상등액을 제거하고 균체를 회수한 다음 초기 배양액과 동량으로 pH 2.5로 조정된 PBS 용액과 인공 위액을 첨가하여 현탁한 후 37°C에서 각각 2시간 배양한 다음 생존율을 계산식[Viability (%) = (log CFU of viable cells survived / log CFU of initial viable cells inoculated) ×100]에 따라 계산하였다.

담즙산 저항성

인공 담즙의 조제는 Tokath의 방법[27]을 변형하여 MRS 액체배지에 0.45 μm syringe filter로 여과, 제균된 oxgall (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 용액을 0.3%의 농도가 되도록 첨가하였다. 이후 산내성 측정과 동일하게 균주를 준비하여 인공 담즙액을 초기 배양액과 동량으로 첨가한 후 37°C에서 4시간 배양하였다. 생존율은 다음과 같이 계산하여 나타내었다. [Viability (%) = (log CFU of viable cells survived / log CFU of initial viable cells inoculated) ×100]

응집력 평가

장내 세포 부착능을 간접적으로 확인하기 위하여 Doyle과 Rosenberg의 연구 방법[6]을 변형하여 자가응집력(autoaggregation)과 공응집력(Coaggregation)을 알아보았다. MRS 액체배지에 24시간 배양한 유산균을 흡광도 600 nm에서 1.0으로 조정된 후 균주 현탁액을 10조간 진탕한 뒤 5시간 동안 방치하면서 autoaggregation을 확인하였다. 실험 시작 직후(A0)와 5시간까지 매 시간마다(A1)의 상등액을 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 다음 계산식 [Autoaggregation (%) = (A0 - A1) / A0 ×100]에 따라 계산하였다. 공응집력은 분리한 유산균과 병원성 균주인 *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* KCTC 2571, *L. monocytogenes* KCTC 13064, *S. aureus* KCTC 1916를 동일하게

Table 1. Primers used in this study

Species		Sequence	Target size (bp)
<i>L. brevis</i> sp.	F	GGA AGA TCA AGA ATA TCG GTG	1361
	R	GCG TCT CTA ATT CAC TGA GC	
<i>L. plantarm</i> sp.	F	GAA GAT TTG CCC ATC GGT G	1113
	R	CGT TTG ATG GTA GCG TTG C	
<i>Lc. mesenteroides</i> sp.	F	GTG GTC ATG GGT CTT AGC	886
	R	GGA TCA AGA CTA GCC AAT GG	
<i>W. paramesenteroides</i> sp.	F	GCT GAT GAA CCC ATA CCT C	641
	R	GAC CTG ATT CGC TCG TTG	
<i>H. pylori</i> 16S rDNA	F	CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC	110
	R	ATT ACT GAC GCT GAT TG T GC	

균수를 조정된 뒤 각각 동량의 균액을 혼합한 후(A(x+y)) 24시간 동안 방치하면서 2, 4, 20, 24시간 경과 후 상등액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정해 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Coaggregation (\%)} = \frac{\{(A_x + A_y)/2\} - A(x+y)}{(A_x + A_y)/2} \times 100$$

A_x, A_y = 각 두 균주의 초기 흡광도 측정값
 A_(x+y) = 혼합 후 흡광도 측정값

세포 표면 소수성

장내 세포 부착능력을 간접적으로 확인하기 위한 방법으로 Doyle과 Rosenberg의 microbial adhesion to solvents (MATS) 실험 방법[6]을 변형하여 측정하였다. MATS법은 단극성 용매와 극성용매에 대한 미생물 세포 친화성의 비교에 기초한다. 이를 바탕으로 미생물 세포의 산성 및 기본적인 특성을 결정하기 위해 산성용매로서 전자공여체의 특성을 나타내는 chloroform과 염기성 용매로 전자수용체의 특성을 나타내는 ethyl acetate와 같은 용매 쌍을 선택하여 실험을 진행하였다[3]. MRS 배지에 24시간 배양한 유산균을 흡광도 600 nm에서 1.0 (A0)으로 조정하였다. 현탁액에 동량의 소수성이 높은 유기용매인 xylene (Oriental Chem., Ansan, Gyeonggi-do, Korea)과 chloroform (Duksan Chem., Ansan, Gyeonggi-do, Korea) 및 ethyl acetate (Duksan Chem., Ansan, Gyeonggi-do, Korea)를 동량 가하여 1분간 진탕한 후 30분간 실온에 정지하였다. 현탁액의 흡광도를 600 nm에서 측정(A1)해 실험 균주가 용매에 부착하는 정도를 다음 식 [MATS (%) = (1-A1) / A0 × 100]에 따라 계산하였다.

항균 활성 평가

가자미 식해로부터 분리한 유산균의 병원균에 대한 항균 활성 여부를 확인하기 위해 *E. coli* KCTC 2571, *L. monocytogenes* KCTC 13064, *S. aureus* KCTC 1916, *C. albicans* ATCC 10231 등의 병원균에 대해 paper disk법을 이용하여 항균 활성을 측정하였다. 즉, LB broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 균을 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후, 흡광도 600 nm에서 0.1로 조절한 균액을 LB agar에 도말하고, 8 mm paper disk에 유산균 배양액 100 µl를 접종하여 LB agar 위에 올린 뒤 24-48시간 배양 후 생육억제환의 크기를 mm단위로 측정하였다.

통계 처리

각 항목에 따른 실험결과는 평균값과 표준오차는 3회 이상 반복 실험을 수행하여 얻어진 결과로, 통계 분석은 SPSS (Statistical package for Social Science, version 25, SPSS INC., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. 전

체 시료에 대한 차이의 통계적 유의성은 분산분석으로 분석하였고, 각 시료 간의 차이는 Tukey의 정직유의차 검정(Tukey HSD tests)으로 5% 범위(p<0.05) 내에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

가자미 식해로부터 유산균 분리 및 동정

가자미식해로부터 분리한 유산균 40종의 그람염색 결과 그람 양성(+)의 균으로 나타났고, 50CHL API kit (date not shown)와 16s rDNA sequencing 결과 균주는 *Lactobacillus brevis* spp., *Lactobacillus plantarum* spp., *Leuconostoc mesenteroides* spp., *Weisella paramesenteroides* spp.로 밝혀졌다(Fig. 1). 분리된 40종의 유산균 중 liquid inhibition assay를 통한 *H. pylori* 생육 억제 활성 실험에서 *H. pylori* 52에 대하여 생육 억제를 보이는 10종의 유산균을 선별하였고 (data not shown), 각각을 *L. plantarum* GS11, *L. plantarum* GS12, *L. plantarum* GS13, *L. plantarum* GS14, *L. brevis* GS21, *L. brevis* GS22, *Lc. mesenteroides* GS31, *Lc. mesenteroides* GS32와 *W. paramesenteroides* GS41, *W. paramesenteroides* GS42로 최종 명명하여 실험에 사용하였다.

인공 위 조건에서의 유산균의 내산성 평가

유산균이 프로바이오틱스로 작용하기 위해서 소화관 내의 조건에서 생존하는 것이 필수적이다. 따라서 섭취한 유산균이 pH 3.0 이하인 위의 극한 환경과 낮은 pH에서 활성화되는 효소인 pepsin이 있는 조건에서 생존하는지에 대한 결과는 각각 Table 2에 제시하였다. 단순 산에서 분리한 균체의 최초 균수는 10¹⁰ log CFU/ml ~10¹² log CFU/ml 이었으나, pH 2.5에 2시간 노출된 후 유산균의 균수가 전

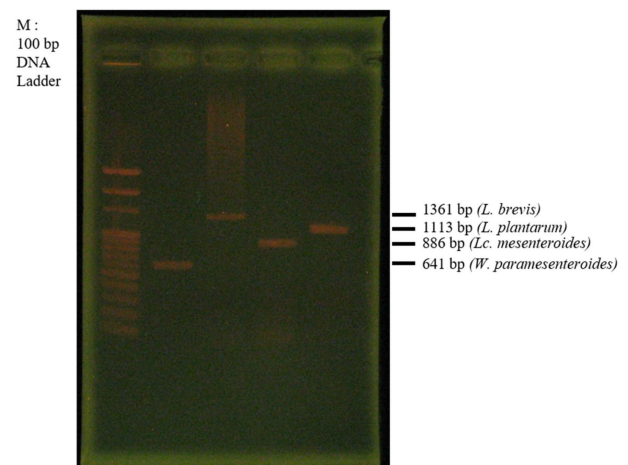


Fig. 1. Gel electrophoresis of lactic acid bacteria isolated from gajami sikhae.

Table 2. The survival rates of lactic acid bacteria in acid resistance, artificial gastric juice resistance, and bile acid resistance

Probiotic strains	Acid tolerance survival (%)	Artificial gastric juice survival (%)	Bile acid tolerance survival (%)
<i>L. plantarum</i> GS11	73.51 ± 0.04 ^f	58.57 ± 0.41 ^g	102.66 ± 0.21 ^c
<i>L. plantarum</i> GS12	41.77 ± 1.00 ^a	76.02 ± 1.12 ^j	102.52 ± 0.16 ^c
<i>L. plantarum</i> GS13	48.45 ± 0.12 ^b	71.62 ± 0.73 ⁱ	100.99 ± 0.11 ^a
<i>L. plantarum</i> GS14	58.18 ± 0.03 ^d	39.74 ± 0.86 ^a	102.78 ± 0.14 ^c
<i>L. brevis</i> GS21	48.67 ± 0.16 ^b	56.28 ± 0.07 ^f	102.78 ± 0.15 ^c
<i>L. brevis</i> GS22	61.89 ± 0.85 ^c	41.63 ± 0.08 ^b	104.03 ± 0.17 ^d
<i>Lc. mesenteroides</i> GS31	51.51 ± 0.19 ^{bc}	47.09 ± 0.62 ^c	102.04 ± 0.18 ^b
<i>Lc. mesenteroides</i> GS32	63.01 ± 2.61 ^e	65.50 ± 0.59 ^h	101.78 ± 0.08 ^b
<i>W. paramesenteroides</i> GS41	52.85 ± 0.18 ^c	50.93 ± 0.14 ^d	101.85 ± 0.08 ^b
<i>W. paramesenteroides</i> GS42	62.98 ± 2.63 ^e	53.46 ± 0.10 ^c	101.83 ± 0.19 ^b

The data were expressed as the mean ± SD (n=3). Means with differed letters (a-j) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

체적으로 감소하는 경향이였다. 그 중 *L. plantarum* GS11 은 2시간 후에도 10^7 log CFU/ml 이상의 균 수를 유지하여 73.51%의 생존율을 나타내었고, *L. brevis* GS22는 61.89%, *Lc. mesenteroides* GS32는 63.01%, *W. paramesenteroides* GS42는 62.98%의 생존율을 나타내어 모두 10^6 log CFU/ml 이상의 균 수가 유지되는 것으로 나타났다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [28]에 기재된 내용에 따르면 *Lc. Mesenteroides*의 최적 pH는 6~7 정도이다. 하지만 본 유산균들의 생리적인 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기재된 내용과 일치하지 않으므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. *L. plantarum* GS12는 41.77%, *L. plantarum* GS13는 48.45%, *L. plantarum* GS14는 58.18%의 생존률로 *L. plantarum* GS11과 같은 종임에도 불구하고 서로 다른 저항성을 나타내었으며, 다른 종의 균주 또한 각각 서로 다른 저항성을 가지는 것으로 관찰되었다. Mishra의 연구[19]에 따르면 프로바이오틱스로 사용되는 균주들은 일반적으로 pH 2에서 10^4 log CFU/ml 이하의 생존수를 보였으나, 본 연구에서 인공 위액 내성 측정 결과 모든 균주가 10^4 log CFU/ml 이상의 생존수를 나타내었으며, 특히 *L. plantarum* GS12, *L. plantarum* GS13은 10^8 log CFU/ml, *Lc. mesenteroides* GS32는 10^7 log CFU/ml 이상의 생존수를 보여 인공 위액에 우수한 내성을 보유한 것으로 생각되었다.

담즙산 저항성

구강으로 섭취된 유산균이 위를 거쳐 담즙산(염)이 분비되는 쓸개를 지나 장에 도달하기 때문에 쓸개에서 분비되는 담즙에 대한 내성이 필요하며 이에 대한, 가자미 식해에서 분리한 유산균들의 담즙산 저항성을 측정할 실험 결과는 Table 2와 같다. Lin 등의 연구[17]에 따르면 0.3%의 담즙염에서 유산균들의 생존수가 10^4 log CFU/ml 이하면 담즙염에 민감하다고 알려져 있는데, 본 연구의 실험

결과 모든 유산균 균주가 3%의 담즙염 농도에서 $10^8 \sim 10^9$ log CFU/ml의 생존수로 측정되었고, 100% 이상의 생존율을 보였다. 이는 0.3%의 농도에서 균의 생장이 억제되지 않고 증식이 가능하였음을 보여주는 것으로, 가자미 식해에서 분리한 균주는 담즙염에 매우 우수한 내성을 가진다고 판단되었다.

유산균의 장 상피 세포 표면 부착능 평가

프로바이오틱스로 사용되는 유산균이 체내에서 지속적으로 작용하기 위해 장내 세포에 부착할 수 있는 세포 부착능과 병원성 미생물의 장내 군집화를 막는 역할이 요구된다[5, 15]. 세포 부착능을 간접적으로 확인하기 위해 Autoaggregation을 측정하는 방법이 사용되고, autoaggregation 능력이 높을수록 실제 세포 부착 능력 또한 높다고 알려져 있다[5, 13]. Malik 등의 연구[18]에 따르면, *L. plantarum* CMPG5300의 *in vitro*상의 autoaggregation이 약 67%일 때, *in vivo*인 상피 세포에서 50%의 부착능을 보인 것으로 나타나 *in vitro*와 *in vivo*의 결과가 상관관계가 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서 분리한 모든 균주는 시간 경과에 따라 응집력이 높아지는 것으로 관찰되었으며(Fig. 2), 5시간 후 평균 43.05%의 부착능을 나타내었으며, 그 중 *L. brevis* GS22균주가 51.3%로 가장 높은 부착능을 확인하였다. *L. plantarum* GS11 (46%), *L. brevis* GS21 (41%), *Lc. mesenteroides* GS31 (45.5%), *Lc. mesenteroides* GS32 (46%)과 *W. paramesenteroides* GS41 (49.6%), *W. paramesenteroides* GS42 (47.7%)의 균주도 높은 부착능을 가져, 식해로부터 분리한 균주의 장내 부착 능력은 *in vivo*에서도 비슷하게 관찰될 수 있을 것으로 생각되었다. Coaggregation 측정 결과 분리 균주 모두 배양 시간이 경과할수록 지시균으로 사용된 모든 병원균에 대해 응집률이 증가하는 추세를 나타내었다(Table 3). 24시간 후 분리 균주와 *C. albicans* ATCC 10231의 응집률이 평균 85.0%이며 가장

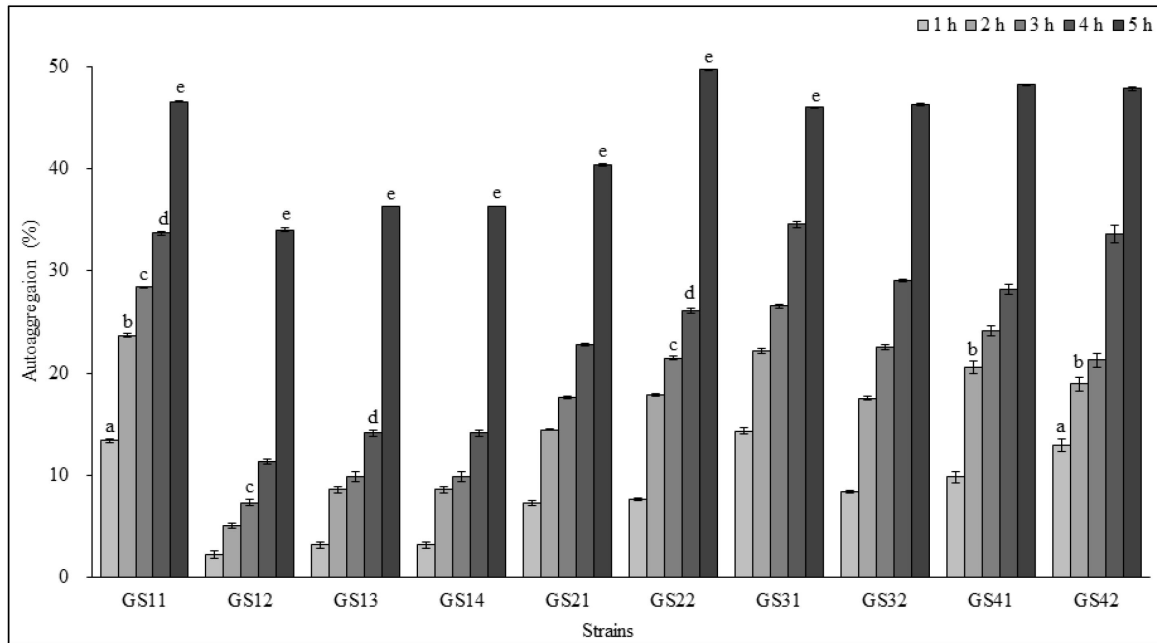


Fig. 2. Autoaggregation percentages for probiotics strains from Gajami Sikhae after incubation. The data were expressed as the mean \pm SD (n=3). Means with differed letters (a-e) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

Table 3. Coaggregation of probiotic strains from Gajami Sikhae with indicator strains

Probiotic strains	% of coaggregation				
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> KCTC 2571	<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	<i>S. aureus</i> KCTC 1916	
4h	GS11	61.09 \pm 0.02 ^b	93.02 \pm 0.10 ^b	95.87 \pm 0.04 ^b	26.34 \pm 0.14 ^b
	GS12	94.95 \pm 0.00 ^b	94.06 \pm 0.30 ^b	94.43 \pm 0.19 ^b	92.22 \pm 0.16 ^b
	GS13	93.41 \pm 0.06 ^b	95.01 \pm 0.58 ^b	97.48 \pm 0.18 ^b	93.25 \pm 0.10 ^b
	GS14	65.51 \pm 0.07 ^b	94.05 \pm 0.00 ^b	95.02 \pm 0.06 ^b	26.42 \pm 0.16 ^b
	GS21	56.59 \pm 0.18 ^b	93.68 \pm 0.05 ^b	93.86 \pm 0.05 ^b	22.99 \pm 0.18 ^b
	GS22	62.32 \pm 0.08 ^b	93.61 \pm 0.05 ^b	93.29 \pm 0.05 ^a	25.38 \pm 0.07 ^b
	GS31	61.92 \pm 0.18 ^b	95.09 \pm 0.09 ^b	92.56 \pm 0.11 ^b	94.36 \pm 0.11 ^b
	GS32	58.08 \pm 0.03 ^b	94.20 \pm 0.06 ^b	94.20 \pm 0.05 ^b	94.22 \pm 0.10 ^b
	GS41	62.86 \pm 0.04 ^b	93.81 \pm 0.10 ^a	94.09 \pm 0.06 ^b	95.62 \pm 0.51 ^b
	GS42	60.83 \pm 0.10 ^b	93.82 \pm 0.06 ^a	93.98 \pm 0.06 ^b	94.25 \pm 0.01 ^a
24h	GS11	81.52 \pm 0.06 ^d	97.48 \pm 0.05 ^d	98.46 \pm 0.05 ^d	85.23 \pm 0.05 ^d
	GS12	96.10 \pm 0.14 ^d	98.05 \pm 0.05 ^d	97.78 \pm 0.01 ^d	96.55 \pm 0.05 ^d
	GS13	96.89 \pm 0.06 ^d	97.82 \pm 0.10 ^c	98.27 \pm 0.01 ^d	97.43 \pm 0.09 ^d
	GS14	89.90 \pm 0.07 ^d	97.92 \pm 0.00 ^d	98.91 \pm 0.01 ^d	83.24 \pm 0.05 ^d
	GS21	85.41 \pm 0.04 ^d	98.52 \pm 0.00 ^d	98.75 \pm 0.01 ^d	81.89 \pm 0.03 ^d
	GS22	93.65 \pm 0.05 ^d	98.11 \pm 0.06 ^d	98.40 \pm 0.06 ^b	85.58 \pm 0.08 ^d
	GS31	90.12 \pm 0.05 ^d	98.64 \pm 0.10 ^c	98.84 \pm 0.06 ^d	98.22 \pm 0.20 ^d
	GS32	93.41 \pm 0.05 ^d	97.42 \pm 0.06 ^d	98.38 \pm 0.05 ^d	98.14 \pm 0.06 ^d
	GS41	94.22 \pm 0.07 ^d	98.35 \pm 0.06 ^b	98.63 \pm 0.10 ^c	97.32 \pm 0.15 ^c
	GS42	92.75 \pm 0.09 ^d	97.68 \pm 0.05 ^b	98.24 \pm 0.05 ^d	97.26 \pm 0.06 ^c

(a-d) significant differences ($p < 0.05$) among each pathogenic strains tested at same time. The data were expressed as the mean \pm SD (n=3).

높은 응집률을 나타낸 균주는 *L. plantarum* GS13으로 96.89%의 응집률을 보였다. *E. coli* KCTC 2571는 평균 80.0%이며 *Lc. mesenteroides* GS31 균주가 98.61%로 가장 높은 응집률을 나타냈다. *S. aureus* KCTC 1916는 평균 78.5%이며 *Lc. mesenteroides* GS31 균주가 98.22%로 가장 높은 응집률을 보였다. *L. monocytogenes* KCTC 13064 평균 84.7%이며 *L. plantarum* GS14 균주가 98.91%로 가장 높은 응집률을 나타냈다. Perumal의 연구[22]에서 *L. monocytogenes* MTCC657과 *L. plantuarum*의 공응집력이 약 60%, Jørgensen 등의 연구[6]에서 *C. albicans* CBS562NT와 *Lactobacillus reuteri*의 공응집력이 약 10~20%, Coelho 등의 연구[4]에서 *E. coli*, *S. aureus*와 *Lc. mesenteroides* LPBF2의 공응집력이 각각 약 50%, 0%으로 나타난 것에 비해 본 연구에서 분리한 유산균주가 더 우수한 응집률을 지닌 것으로 확인되었다.

세포 표면 소수성 평가

Kos 등의 연구[15]에 의하면, autoaggregation과 세포 표면의 소수성이 높으면 병원성 세균과의 부착 및 응집, 장내 세포의 흡착률 등 다양한 장내 현상과 상관관계가 있다고 알려져 있다. 용매에 대한 접착력을 테스트하여 박테리아 세포 표면의 부착능을 간접적으로 평가하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 ethyl acetate에서는 평균 25.6%의 부착능을 나타냈으며, chloroform에서는 평균 96.2%의 부착능을 보여주고 있다. 결과적으로 모든 균주는 염기성 용매로서 전자 수용체 특성을 나타내는 ethyl acetate보다,

산성 용매로서 전자 공유체 특성을 나타내는 chloroform에 더 강한 친화성을 나타내 균주가 세포 표면에 전자 공유체를 수용하고 있다고 생각된다. 세포의 소수성은 세포 표면에 단백질이 존재하는 것을 나타내고 단백질이 많을수록 autoaggregation 능력과 세포 부착능이 뛰어나다는 것을 나타내는데[13], 본 연구에서 xylene 부착능을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 선별된 균주는 종류에 따라 다르지만 평균 62.2%의 높은 소수성을 관찰할 수 있었으며, *L. plantarum* GS13 균주에서 89.18%로 가장 높은 소수성을 나타내었다. Sansawat과 Thirabunyanon의 연구[25]에서 xylene에 대하여 32.2%의 소수성을 가지는 *B. subtilis* P33의 Caco-2 세포 부착률이 4.2 log CFU/ml로 나타난 것과 비교했을 때, 본 연구에 이용된 유산균들은 xylene에 대하여 높은 소수성을 띄어 균주의 세포 부착률이 높을 것으로 생각된다.

유산균의 항균력 평가

유산균에 의해 생성된 유기산, 저급지방산, 박테리옌, 항생물질 등은 병원성세균과 부패 세균의 생육을 억제한다고 보고된 바 있다[11]. 본 연구를 통해 분리된 유산균주의 식중독 및 유해 병원균에 대한 항균 활성 측정 결과는 Table 4와 같다. 대조균으로 MRS배지를 사용하였으며, 생육억제현상은 나타나지 않았다. 각 유산균주와 병원균주는 항균 활성 정도가 다르게 나타났으며, 모든 균주가 *C. albicans* ATCC 10231에 대한 항균력을 보이지 않았다(data not shown.). *L. plantarum* GS12, *L. plantarum*

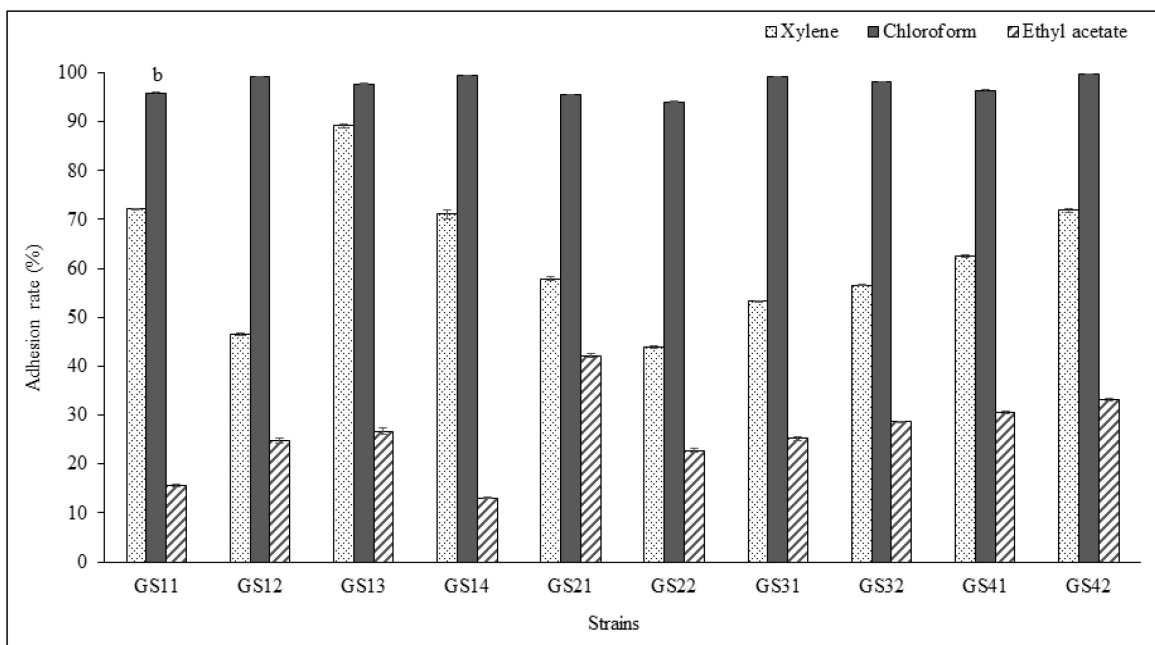


Fig. 3. Cellular hydrophobicity of probiotic strains from Gajami Sikhae. The data were expressed as the mean ± SD (n=3). Means with differed letters (a-c) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

Table 4 Antimicrobial activity of probiotic strains from Gajami Sikhae

Indicator strain	Diameter of inhibition (mm)		
	<i>E. coli</i> KCTC 2571	<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	<i>S. aureus</i> KCTC 1916
Probiotic strain			
<i>L. plantarum</i> GS11	13.0 ± 0.00 ^{bc}	12.5 ± 0.00 ^{abc}	11.6 ± 0.53 ^a
<i>L. plantarum</i> GS12	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> GS13	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> GS14	13.0 ± 0.00 ^{bc}	13.0 ± 0.00 ^c	12.0 ± 0.00 ^a
<i>L. brevis</i> GS21	12.3 ± 0.29 ^a	12.0 ± 0.00 ^{ab}	12.0 ± 0.00 ^a
<i>L. brevis</i> GS22	12.5 ± 0.00 ^{ab}	12.4 ± 0.35 ^{abc}	12.8 ± 0.29 ^b
<i>Lc. mesenteroides</i> GS31	13.5 ± 0.00 ^c	12.8 ± 0.29 ^{bc}	12.8 ± 0.29 ^b
<i>Lc. mesenteroides</i> GS32	13.5 ± 0.00 ^c	12.7 ± 0.29 ^{abc}	13.0 ± 0.00 ^b
<i>W. paramesenteroides</i> GS41	12.2 ± 0.29 ^a	12.2 ± 0.29 ^{ab}	11.5 ± 0.00 ^a
<i>W. paramesenteroides</i> GS42	12.5 ± 0.46 ^{ab}	12.8 ± 0.29 ^{bc}	12.0 ± 0.00 ^a

The data were expressed as the mean ± SD (n=3). Means with differed letters (a-c) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

GS13 등은 모든 병원균에 항균 활성을 나타내지 않았는데, 이는 유산균이 생산하는 유기산의 영향으로 *L. plantarum* GS11과 *L. plantarum* GS14의 상등액 pH가 약 3.0이고, *L. plantarum* GS12와 *L. plantarum* GS13의 상등액 pH가 약 4.0인 것에 병원균이 영향을 받은 것으로 추정되었다. *L. plantarum*의 최적 pH는 6.0 이상이지만 본 연구에 사용되어진 *L. plantarum* 상등액의 pH는 약 3.0~4.0으로 측정되었다. Hartke[8]에 따르면 *L. lactis*의 경우 지수성장기일 때 보다 정지기일 때 내산성도가 증가된다고 보고되고 있다. 이러한 이유로 본 연구에 사용되어진 *L. plantarum*의 배양 상등액의 pH가 최적 pH보다 낮게 측정되었다고 추측된다. *E. coli* KCTC 2571에 대한 유산균주의 항균 효과는 최대 13.5 mm의 생육억제환을 나타내었으며, *L. monocytogenes* KCTC 13064와 *S. aureus* KCTC 1916에서 최대 13.0 mm의 생육억제환을 관찰할 수 있었다. 이는 기존의 연구[1, 2, 24]에서 유산균주가 *E. coli* KCTC 2571, *L. monocytogenes* KCTC 13064, *S. aureus* KCTC 1916 등에 항균 효과가 있다고 보고된 것과 유사한 결과로, 본 연구에서 분리한 유산균주가 장내 유해 세균의 억제에 효과를 보일 것으로 판단된다.

따라서, 가자미 식해에서 분리한 유산균은 산성 및 인공 위액 저항력, 담즙산 저항력, 응집력, 세포 표면 소수성 기능과 항균 활성 평가를 진행한 결과, 위의 강한 산성 조건에서도 균의 성장이 억제되지 않고 10^4 log CFU/ml 이상의 생균수를 유지하였다. 또한 높은 세포 표면 소수성을 띄어 균주의 세포 부착능이 우수한 것으로 나타났다. 결과적으로, 본 연구에서 가자미 식해에서 분리한 유산균은 위와 같은 효과를 가진 프로바이오틱스 특성을 가진 기능성 식품의 원료로 사용 가능성이 있을 것으로 생각된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adesokan, I., Odetoynbo, B. and Olubamiwa, A. 2008. Biopreservative activity of lactic acid bacteria on suya produced from poultry meat. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 3799-3803.
- Adewale, O., Oyewole, O. and Sanni, L. 2006. Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava 'fufu'. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 620-623.
- Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J. and Van Oss, C. J. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces* **7**, 47-53.
- Bruna, d. O. C., Fiorda-Mello, F., Pereira, G. V. d. M., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Carvalho, J. C. d. and Soccol, C. R. 2019. *In vitro* probiotic properties and DNA protection activity of yeast and Lactic acid bacteria isolated from a honey-based Kefir beverage. *Foods* **8**, 485.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Let. Appl. Microbiol.* **31**, 438-442.
- Doyle, R. J. and Rosenberg, M. 1995. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrata. *Meth. Enzymol.* **253**, 542-550.
- Hajela, N., Nair, G. B. and Ganguly, N. K. 2010. Are probiotics a feasible intervention for prevention of diarrhoea in the developing world? *Gut Pathog.* **2**, 1-5.
- Hartke, A., Bouche, S., Gansel, X., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1994. Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* **60**, 3474-3478.
9. Hirayama, K. and Rafter, J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* **2**, 681-686.
 10. Jørgensen, M. R., Kragelund, C., Jensen, P. Ø., Keller, M. K. and Twetman, S. 2017. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*. *J. Oral Microbiol.* **9**, 1274582.
 11. Kang, C. H., Kim, Y. Y., Han, S. H., Jeong, Y. A. and Paek, N. S. 2017. Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria from Korean Intestine origin. *KSBB J.* **32**, 153-159.
 12. Kim, P. H., Kim, M. J., Kim, J. H., Lee, J. S., Kim, K. H., Kim, H. J., Jeon, Y. J., Heu, M. S. and Kim, J. S. 2014. Nutritional and physiologically active characterizations of the sea squirt *Hocynthia roretzi* Sikkhae and the seasoned sea squirt. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 1-11.
 13. Kim, Y. G., Han, S. H., Kim, J. S., Jeong, Y. A., Paek, N. S. and Kang, C. H. 2019. Probiotic properties and inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from vaginal microbiota of Korean women against *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans*. *KSBB J.* **34**, 91-98.
 14. Kobayashi, Y., Toyama, K. and Terashima, T. 1974. Biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of a multiple antibiotic resistant strain, *Lactobacillus casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Nihon Saikingaku Zasshi.* **29**, 691-697.
 15. Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J. and Matošić, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981-987.
 16. Lee, Y. and Chang, H. C. 2008. Isolation and characterization of Kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 106-114.
 17. Lin, W., Hwang, C., Chen, L. and Tsen, H. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* **23**, 74-81.
 18. Malik, S., Petrova, M. I., Claes, I. J. J., Verhoeven, T. L. A., Busschaert, P., Vanechoutte, M., Lievens, B., Lambrechts, I., Siezen, R. J., Balzarini, J., Vanderleyden, J. and Lebeer, S. 2013. The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4576-4585.
 19. Mishra, V. and Prasad, D. 2005. Application *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 109-115.
 20. Ouwehand, A. C. 2007. Antiallergic effects of probiotics. *J. Nutr.* **137**, 794S-797S.
 21. Pereira, D. I. and Gibson, G. R. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 259-281.
 22. Perumal, J., Agaliya, K. and Jeevaratnam, K. 2012. Screening of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented idli batter for probiotic properties. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 12856-12864.
 23. Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J. and König, H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol.* **33**, 48-54.
 24. Puttalingamma, V., Begum, K. and Bawa, A. S. 2006. Antimicrobial peptides-new weapons against enteric pathogens. *Pakistan J. Nutr.* **5**, 432-435.
 25. Sansawat, A. and Thirabunyanon, M. 2009. Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* **3**, 77-87.
 26. Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends. Biotechnol.* **15**, 270-274.
 27. Tokatlı, M., Gulgor, G., Bağder Elmacı, S., İşleyen, N. and Özçelik, F. 2015. *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 315819.
 28. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. and Whitman, W. B., et al. (eds.). 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media.
 28. Yeo, S. K. and Liang, M. T. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **61**, 161-181.

초록 : 가자미식해에서 분리된 유산균의 프로바이오틱스 특성

배은영¹ · 조기운¹ · 김지혜¹ · 정성근^{1,2} · 조영제^{1,2} · 김병오^{1,2*}
(¹경북대학교 식품공학부, ²경북대학교 특수식품연구소)

가자미식해에서 분리된 유산균 40종은 *Lactobacillus plantarum* spp., *Leuconostoc mesenteroides* spp., *Lactobacillus brevis* spp., and *Weissella paramenteroides* spp.로 확인됐으며, 40종 중 10종을 선별해 검사에 사용했다. 본 연구에서는 가자미식해에서 분리된 유산균을 프로바이오틱스로 활용하기 위해 산 및 인공 위액 저항성, 담즙산 저항성, 자가 응집성, 공동 응집성, 세포 표면 소수성 등의 프로바이오틱 연구를 수행하였다. 분리된 유산균주는 산성 및 인공 위액에 대해 저항성을 보여 높은 생존율을 나타내었으며, *L. plantarum* GS11이 가장 뛰어난 저항성을 보였다. 또한 담즙산 저항성 측정 결과 모든 유산균주가 $10^8 \sim 10^9$ log CFU/ml의 생균수로, 100% 이상의 생존력을 보여주었다. 그리고 세포 표면 부착능을 간접적으로 측정하기 위해 응집력 평가를 한 결과, autoaggregation 능력을 46% 이상 나타내었다. 세포 표면 소수성 평가를 위해 Xylene 부착능을 측정한 결과 분리된 유산균주에서 32.2%의 소수성을 가지는 *B. subtilis* 보다 더 뛰어난 세포 부착률을 보여주었다. 이와같이 유산균은 프로바이오틱스로 활용될 만한 유의미한 결과를 보였으며, *L. plantarum* GS12와 *L. plantarum* GS13을 제외한 유산균에서 항균 활성이 나타났다. 따라서 가자미 식해에서 분리된 유산균은 다양한 프로바이오틱스 특성을 가진 프로바이오틱스로 활용할 수 있을 것으로 판단되어진다.