



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주전통음식 쉼다리의 군집조사
및 프로바이오틱스로의 가능성

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

柳英秀

2021年8月



제주전통음식 쉼다리의 균집조사 및
프로바이오틱스로서의 가능성


指導教授 許文洙


柳英秀

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021 年 8 月

柳英秀의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 정준범 _____ 

委 員 _____ 최학선 _____ 

委 員 _____ 허문수 _____ 

濟州大學校 大學院

2021 年 8 月



**Phylogenetic diversity of Jeju traditional fermented food
Shindari and its possibility as probiotics**

Young-Soo Ryu
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

This thesis has been examined and approved.

Major of Marine Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

August, 2021



목 차

목 차	i
List of Tables	xii
List of Figures	vi
Abstract	vii
1. 제 1장 제주 전통음식 신다리에서 분리된 세균의 균집 탐색 및 항균조사 ...	
1.1. 서 론	1
1.2 재료 및 방법	4
1.2.1. 시료구입	4
1.2.2. 신다리 시료의 pH와 산도	4
1.2.3. 신다리 균주의 분리 및 배양	5
1.2.4. 16S rRNA 유전자의 염기서열 계통분석	8
1.2.4.1. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭	8
1.2.4.2. 염기서열 및 계통학적 분석	10
1.2.5. 신다리 세균의 항균 활성	11
1.3 결과 및 고찰	18
1.3.1. 신다리 시료의 pH와 산도 및 신다리 균주의 분리배양	18
1.3.2. 신다리 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통학적 분석	20
1.3.3. 신다리 세균의 항균 활성 탐색	25
4. 제 1장 종합고찰	29

II. 제 2장 선다리에서 분리된 세균의 프로바이오틱스로의 가능성 연구	32
2.1. 서론	32
2.2. 재료 및 방법	35
2.2.1. 용혈성 및 유해대사산물과 유해효소 생성여부 시험	35
2.2.2. 고분자 유기물질 분해여부 시험	37
2.2.3. 인공 위액 및 인공 담즙에서의 내성 시험	38
2.2.4. 온도, pH, NaC에서의 생육 시험	39
2.2.5. 장 부착능 시험	40
2.2.6. 그람염색 및 생화학적 특성	41
2.2.7. API Kit zym	42
2.2.8. API Kit 50 CHB	43
2.2.9. 항생제 시험(Antibiotic test)	44
2.3. 결과 및 고찰	45
2.3.1. 용혈성 및 유해대사산물과 유해효소 생성여부 시험	45
2.3.2. 고분자 유기물질 분해여부 시험	47
2.3.3. 인공 위액 및 인공 담즙에서의 내성 시험	49
2.3.4. 온도, pH, NaC에서의 생육 시험	52
2.3.5. 장 부착능 시험	55
2.3.6. Probiotics 선정	56
2.3.7. 그람염색 및 생화학적 특성	56
2.3.8. API Kit zym	57
2.3.9. API Kit 50 CHB	59
2.3.10. 항생제 시험(Antibiotic test)	61

2.4. 제 2장 최종 고찰	62
Ⅲ. 국문요약	66
Ⅳ. 참고 문헌	68
V. 감사의 글	87

List of tables

Table. 1. Composition of Tryptic soy agar (TSA)	5
Table. 2. Composition of Lactobacilli MRS agar (MRSA)	6
Table. 3. Composition of R2A Agar (R2A)	14
Table. 4. Composition of Yeast Mold Agar (YMA)	21
Table. 5. List of fish pathogene bacteria and experimental conditions and used in antibacterial activity test	22
Table. 6. List of human pathogene bacteria and experimental conditions and used in antibacterial activity test	23
Table. 7. Composition of Tryptic soy Broth (TSB)	28
Table. 8. Composition of Lactobacilli MRS Broth (MRSB)	29
Table. 9. Composition of R2A Broth (R2AB)	30
Table. 10. Composition of Yeast Mold Broth (YB)	32
Table. 11. Composition of Muller Hinton Agar (MHA)	39
Table. 12. Composition of Brain Heart Infusion Agar (BHIA)	41
Table. 13. Composition of 1.5 Brain Heart Infusion Agar (1.5 BHIA)	45
Table. 14. Composition of Nutrient Agar (NA)	46
Table. 15. Composition of Marine agar (MA)	46
Table. 16. Counts of the viable cells isolated from the <i>Shindari</i>	46
Table. 17. Bacterial diversity associated with <i>Shindari</i>	46
Table. 18. Origin and direct antibacterial activity against various human pathogens of selected strains isolated from fermented foods.	46
Table. 19. Origin and direct antibacterial activity against various human pathogens of selected strains isolated from fermented foods.	46
Table. 20. List of antibiotics used of antibiotic test	46
Table. 21. Comparison of hemolytic and harmful enzyme activities, and harmful substances productivities of selected strains	46

Table. 22. Comparison of hemolytic and harmful enzyme activities, and harmful substances productivities of selected strains	46
Table. 23. Temperature range for growth of selected strains.	46
Table. 24. pH range for growth of selected strains.	46
Table. 25. NaCl range for growth of selected strains.	46
Table. 26. Results of the API zym tests applied on <i>Bacillus siamensis</i> Y19 ^T	46
Table. 27. Carbohydrates utilization of <i>Bacillus siamensis</i> Y19 ^T	46
Table. 28. Antibiotics susceptibility of <i>Bacillus siamensis</i> Y19 ^T	46

List of figures

- Fig. 1. Pie-diagram showing the community structure and the diversity of bacterial community of *Shindari*. 27
- Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences of bacteria from the *Shindari*. GenBank accession numbers given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. 33
- Fig. 3. Resistance of selected strains to artificial bile acid. 33
- Fig. 4. Resistance of selected strains to gastric juice. 35
- Fig. 5. Attachment of the strains to the mucin surface. 36
- Fig. 6. (A) Colony morphology (B) Scanning electron micrograph of strain Y19^T 43

Abstract

The technology of the aquaculture industry is rapidly developing due to the problem of limited production, which is due to the increasing global demand for aquatic products. However, due to the indiscriminate use of antibiotics and high-density aquaculture to increase production, direct and indirect damage to the aquaculture industry is increasing. In order to solve this problem, a lot of research on natural antibiotics has been conducted recently. Specifically, quite a bit of research on makgeolli has already been conducted, but the amount of research on shindari, which is made from similar raw materials to makgeolli, is insufficient. Shindari is a traditional Jeju makgeolli made from leftover barley rice fermented with yeast. Accordingly, this researcher identified the bacterial community in shindari, a traditional Jeju fermented food, confirmed the groups with antibacterial activity, and tested the stability, acid resistance, base resistance, and intestinal adhesion properties to investigate the possibility of using it as a probiotic.

The hawthorn used in this experiment was found to have an acidity level of 1.9% and a pH of 4.94. As a result of counting the colonies of the hawthorn bacteria, the average count was MRS 1.8×10^6 CFU/g, YM 2.2×10^6 CFU/g, TSA 3.0×10^6 CFU/g and R2A 2.7×10^6 CFU/g. As a result of analyzing the nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of the bacteria isolated from fifty samples, using NCBI and EZbiocloud, it was divided into 2 phyla, 2 classes, 3 orders, 5 families, and 7 genera. With a total of 112 strains, Firmicutes was the dominant type, with 73% of the organisms being Firmicutes, and the remaining 27% being Proteobacteria. In addition, the genera *Pediococcus* and *Bacillus* were the most dominant, with 25% each, followed by the *Cronobacter* genus at 22%, the *Enterococcus* genus at 16%, the *Aneurinibacillus* genus at 5%, the *Klebsiella* genus at 4%, and the *Paenibacillus* genus at 2%.

The antibacterial activity of the isolate of shindari was observed with two gram-positive bacteria, *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis*, 6 gram-negative bacteria - *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Edwardsiella tarda*, fish disease bacteria, 2 gram-negative bacteria - *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, and 3 other types. Antibacterial

activity was measured using gram-positive bacteria cultures of *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, and *Listeria monocytogenes*. As a result, it was confirmed that growth inhibitory rings were formed for all bacteria except the fish disease *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *S. mutans*, which is a harmful bacterium found in the human body. In *S. parauberis*, a fish disease bacterium, Y19 (*Bacillus siamensis*) showed the largest growth inhibitory ring at 36.8 mm in length. In addition, T19, T25, and T21 showed remarkable antibacterial activity in the order of 33.7 mm, 33.6 mm, and 32.7 mm.

Among the 121 isolates, it was confirmed that 3 strains of the 15 strains with broad antibacterial activity produced β -hemolysis, 3 strains of α -hemolysis, and 8 strains of γ -hemolysis. In addition, it was confirmed that no carcinogen-related enzymes and substances were produced in all 9 strains having γ -hemolysis hemolysis in the harmful metabolites and harmful enzyme production experiments. Among the 9 strains, the casein hydrolysis ability was positive in 7 of them, DNase activity in 8 of them, and lipase activity in 7 of them. In addition, cellulase activity was shown in 6 strains, and in each medium containing Tween 20, Tween 40, Tween 60, and Tween 80, only 6 strains were shown to degrade all Tween medias of different molecular weights. As a result of resistance in artificial bile, M28 and Y19 had the best resistance, and as a result of resistance in artificial gastric juice, it was confirmed that R10, T19, and Y19 were the best. In addition, the optimum temperature of all candidate strains was 20-35°C, and most of the selected strains were able to grow in a NaCl environment of 0%-6% concentration. As a result of the intestinal adhesion test using Musin, the highest strain was 88%. Based on the above study results, *Bacillus siamensis* Y19 was selected as a candidate strain for probiotics.

Bacillus siamensis Y19 showed positive results from gram staining, and both catalase activity and oxidase activity tests showed positive results. It was confirmed that it was not active on the carcinogen β -glucuronidase, and it was found to be similar to the previously reported study on carbohydrate utilization of *Bacillus siamensis*.

Finally, *Bacillus siamensis* Y19 is a safe strain with excellent antibacterial properties for fish and human body, and it is judged that it could be used in various ways as a safe seed strain for the human body, and as a host

in the future by passing all the standards so that it may be used just as other probiotics are. In addition, it could be used as an eco-friendly alternative to antibiotics pending additional fish experiments, etc., and it is expected to be used and effective as a probiotic in various other fields.



I. 제 1장 제주 전통음식 언다리에서 분리된 세균의 균집 탐색 및 항균조사

1.1. 서론

우리나라 고유의 대표적인 발효주인 막걸리는 쌀, 보리, 찹쌀 등 다양한 전분질의 곡류에 누룩과 같은 발효제를 첨가하여 물과 함께 첨가한 후 일정 온도에서 발효시킨 발효 식품을 말한다 [18]. 막걸리는 추가되는 첨가물과 알코올 함량에 따라 차이가 있지만 보통 2-8도 내외로 낮은 알코올 함량으로 술이라고도 표현하지만, 음료로도 표현되어 그 경계가 모호한 경우도 있다. 최근에는 유자 [135], 오미자 [89], 청각 [54], 백년초 [104], 홍삼 [136] 등 지역적 특산물을 첨가하여 다양한 막걸리 제품이 생산되고 있다. 그 때문에 소비자의 기호를 높이고 우리나라 소비자뿐만 아니라 외국 소비자들에게도 각 지역과 우리나라를 알리는 대표적인 우리나라 전통주가 되었다 [81]. 또한, 최근 발효식품에 관한 관심이 높아지게 되면서 막걸리에 관한 연구는 활발하게 이루어지고 있으며, 막걸리 속 미생물의 발효 과정 동안 생성되는 생산물로부터 다양한 생리활성들이 밝혀지면서 막걸리의 이용 가치가 높게 평가되고 있다 [63].

전분인 곡물의 종류에 따라 차이가 나타나지만, 막걸리에는 식이섬유, 단백질 등이 풍부하게 존재하고 있으며, 특히 생막걸리의 경우 유산균과 효모가 다양으로 존재한다고 보고되어있다 [55]. 또한, 유산균과 효모의 발효 과정에서 다양한 유기산과 필수 아미노산, 리보플라빈, acetylcholine, inositol 등 각종 유용한 생리활성 물질과 비타민 B 복합체를 함유하고 있다고 보고되어 있으며 [62, 78], 발효 과정 동안 1H-indole-3-ethanol(tryptophol), ethanol(tyrosol), 2-(4-hydroxyphenyl), trans-ferulic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, cisferulic acid 등의 항산화 물질이 분리되었고 [108, 127, 56], 항암물질인 파네놀(farnesol)이라는 물질은 강한 항종양, 항염 효과를 가졌다고 밝혀졌다 [40, 41].

특히, 이전 연구에서는 막걸리에서 분리된 *Pediococcus acidilactici* M76 는 acetyl CoA carboxylase, fatty acid synthase 및 PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)의 활성을 억제하여 체지방 감소에도 탁월한 효과가 있다고 보고되어져 있다 [94, 121]. 그 외에도 여러 연구에 의하면 막걸리에서 분리된 미생물들은 암세포 성장 억제 [118], 심혈관계 질환 개선 [119], 피부 미백 효과 [79] 등 유익한 유산균 증식과 여러 유해균을 억제하는 역할을 한다고 보고되어 있다.

또한, 최근에는 막걸리에서 나온 생리활성 물질과 부산물들은 인체뿐만 아니라 전복, 감성돔, 넙치, 조피볼락 등 어류양식의 사료 원료나 [8] 가축의 사료원료 [50], 친환경 항생제 대체제 등으로서의 이용 가능성에 대한 연구가 수행된 바 있으며, 사료 섭취량 증가, 소화율 개선 및 항 영양인자 감소의 효과가 보고되었으며 [11, 28, 74], 현재까지도 다양한 활용 방식에 대한 연구는 진행 중이다.

제주도는 척박한 토질을 가진 사면이 바다로 둘러싸여 있는 화산섬이다. 또한, 돌이 많고 바람이 많이 불며 섬 한가운데 한라산을 중심으로 완만한 경사를 이루고 있는 특징이 있다. 이러한 토양과 지형적인 특징으로 인하여 예 부터 제주도에서는 주로 논농사보다 밭농사가 행해졌고, 이와 같은 이유로 생산되는 농작물의 종류와 식량자원에 한계가 있었다. 그 때문에 일찍부터 제주도민들은 식량 확보와 저장을 중요시했고 것갈, 음료, 빵 등에 식량을 저장하면서 다양한 형태로 발효음식이 발달하였다. 그중 제주 전통 막걸리인 선다리는 그 특징을 보여주는 하나의 예가 될 수 있다. 제주도는 벼농사가 어려운 토양, 지리, 지형적 특징으로 인하여, 보리를 주식으로 많이 사용하였다. 보란이 어려운 보리밭을 활용하기 위하여 식은 보리밭에 누룩을 첨가하여 단기간에 발효 시켜 그대로 음용하거나, 단맛을 위해 꿀 등을 첨가하여 발효식품으로 만들어 먹었다. 이렇게 만들어진 발효식품을 단술 또는 선다리라 불리는데, 알코올 도수가 1~2% 내외로 매우 낮으며 신맛과 함께 단맛을 느낄 수 있어 가볍게 음용이 가능하며 주로 여름철 음료로 이용하여 전통 발효음료라고도 표현한다 [99].

현재까지 당근을 첨가한 선다리 발효 특성, 선다리 제조 중 성분변화, 감귤을 첨가하여 제조한 선다리 특성 분석 등이 연구되어 있다. 선다리는 막걸리와 비슷

한 원료로 제조되며, 유사한 맛을 가지고 있으나, 막걸리보다 저농도의 알코올 함량을 가지고 있으며, 일반 막걸리와 다르게 짧은 시간 동안 발효하여 만들어진 다. 선다리에는 막걸리에서 나타나는 각종 유용 생리활성 물질이 유사하게 함유되어 있을 것이라 예상되지만, 아직 선다리에 관한 연구는 미비한 실정이다 [67].

이에 따라 본 연구에서는 제주 전통 발효 식품인 선다리 내의 세균의 군집을 파악하고, 이들 그룹 중 어류 질병 또는 인체 유해 세균들을 억제하는 항균 활성을 지닌 균들을 확인하고자 하였다. 또한, 추후 질병에 대한 예방 및 치료의 활용에 있어서 필요한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

1.2. 재료 및 방법

1.2.1. 시료구입

본 연구에서 사용된 제주 전통 발효식품 쑤다리는 제주도의 제주시 민속 오일장에서 구매하였으며, 시료는 제주도민의 전통적인 방식으로 36시간의 발효를 거쳐서 만들어진 쑤다리이다. 구매한 쑤다리 시료는 실험실로 옮긴 후, Clean bench 안에서 멸균된 50 ml Conical tube에 시료를 나누어 실험에 사용하였다.

1.2.2. 쑤다리 시료의 pH와 산도

구매한 쑤다리 시료를 가지고 pH와 산도를 측정하였다. pH meter (HM-30V, Toa, Japan)를 사용하여 pH를 측정하였고, 산도는 쑤다리 시료 20 mL에 5배 희석한 phenolphthalein 지시약을 2-3방울 떨어뜨린 후, 0.1 N NaOH로 적색이 나타날 때까지 적정하여 산도를 측정하였다. 이때 소비된 NaOH양을 환산하여 계산하였고, 식은 다음과 같다.

총 산도(%) =

$$\frac{\text{산도}(V(\text{적정량}) \times F(0.1N \text{ NaOH 역가})) \times 0.009 \times \text{희석배수} / \text{시료채취량}}{100}$$

1.2.3. 선다리 균주의 분리 및 배양

구매한 선다리는 50 ml Conical tube에 적정량을 나누어 담은 후, 0.85% 멸균된 생리식염수에 1 ml씩 옮겨 vortexing 해준 뒤 단계별(10^{-1} ~ 10^{-5})로 희석하는 연속 희석법을 사용하여 평판배지에 도말하였다.

본 실험에서 사용한 배지는 네 종류의 배지로 영양성분의 증식배지 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco., USA), 젖산균 선택배지 Lactobacilli MRS Agar (MRSa, Difco., USA), 변형양세균 증식배지 R2A Agar (R2A, Difco., USA), 효모, 곰팡이와 다른 산성 환경에서도 성장할 수 있는 진균을 분리 배양하기 위해 Yeast Mold Agar (YMA, Difco, USA) 배지를 사용하였고, TSA agar와 MRS agar배지는 37℃에서 R2A agar와 YM agar 배지는 25℃에서 일주일 동안 배양하였다.

그 후 배지마다 각각 colony-forming units per gram (CFU/g) 값을 측정하였고, 각 배지에서 자라난 colony를 Color, Size, Shape 등 형태적인 특징에 따라 선별하여, 동일한 균을 제외하면서 순수 분리를 위한 3회 이상의 계대배양을 실시하였다.

각 네 종류의 배지에서 분리된 균체는 20% (v/v) Glycerol로 -80℃에서 동결보관하여 실험에 사용하였다.

Table. 1. Composition of Tryptic soy agar (TSA)

Ingredient	Amounts
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Papaic Digest of Soybean	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1L
pH	7.3 ± 0.1

Table. 2. Composition of Lactobacilli MRS agar (MRSA)

Ingredient	Amounts
Proteose Peptone No. 3	10.0 g
Beef Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Dextrose	20.0 g
Polysorbate 80	1.0 g
Ammonium Citrate	2.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium phosphate	2.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1L
pH	6.5 ± 0.2

Table. 3. Composition of R2A Agar (R2A)

Ingredient	Amounts
Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone No. 3	0.5 g
Casamino acids	0.5 g
Dextrose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Sodium pyruvate	0.3 g
Dipotassium phosphate	0.3 g
Magnesium sulfate	0.05 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.2 ± 0.2

Table. 4. Composition of Yeast Mold Agar (YMA)

Ingredient	Amounts
Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Dextrose	10.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1 L
pH	6.2± 0.2

1. 2. 4. 16S rRNA 유전자의 염기서열 계통 분석

1. 2. 4. 1. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭

Color, Size, Shape 등 형태적인 특징에 따라 선별, 분리된 균주의 genomic DNA를 추출하기 위하여 다음과 같이 진행하였다 [131].

TE buffer를 이용하여 균체를 풀어준 다음 100 mg/ml lysozyme을 10 μ l를 첨가하여 inverting 한 뒤 실온에서 5분간 반응시켰다. 단백질을 제거를 위하여 10% SDS (sodium dodecyl sulphate) 30 μ l 와 10 mg/ml proteinase 6 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양시킨 후, 5M NaCl 80 μ l, CTAB/NaCl solution 80 μ l를 첨가하여 inverting하였고 65 $^{\circ}$ C water bath에서 10분간 반응시켰다. phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (v/v/v)을 750 μ l 분주 후 13,000 rpm에서 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 새 micro tube에 옮겨준 후 chloroform/isoamyl alcohol 24:1 (v/v)을 동량으로 첨가하고 원심분리 (13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분) 하였다. 상층액을 새 micro tube에 옮겨준 후 0.6배의 isopropanol을 첨가하여 5분간 원심분리 한 후 상층액을 모두 제거한 뒤 70% Ethanol을 첨가하여 세척한 후, 다시 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고, 남아있는 에탄올의 제거를 위하여 1시간 동안 건조하였고, 그 후, TE buffer 99 μ l와 10 mg/ml RNase 용액을 건조한 DNA micro tube에 30 μ l 첨가하여 잘 섞어 주었다. DNA를 녹여주기 위해 37 $^{\circ}$ C overnight 하였다. 추출된 genomic DNA는 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

genomic DNA의 농도를 확인하기 위하여 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 먼저 추출된 genomic DNA의 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해 27-Foward primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1522-Reverse primer (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')를 사용하였다 [129].

추출된 DNA 1 μ l, 10 pmol/primer 1 μ l, 10mM dNTPs, 10 X PCR buffer,

5 Unit Tap polymerase (TaKaRa, Japan), 멸균증류수 22 μ l을 첨가하여 최종 부피 25 μ l로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR의 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 초기 변성 단계(Initial denaturation) 5분 반응을 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 변성단계(Denaturation) 30초, 55 $^{\circ}$ C 결합단계(Annealing) 30초, 72 $^{\circ}$ C 합성단계(Extension) 30초 반응을 30 cycle 진행하였고 72 $^{\circ}$ C에서 최종 합성단계(Final extension) 5분 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose에서 전기영동(Sub-cell[®] Agarose Gel Electrophoresis System, Bio-rad., USA)을 하여 Band를 확인하였다.

1. 2. 4. 2. 염기서열 및 계통학적 분석

전기영동을 통해 증폭이 확인된 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석은 (주)솔젠트(Dajeon, Korea)에 의뢰하였다. 분석한 염기서열은 EzBioCloud[137]와 미국 국립생물정보센터 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program에서 Genbank database의 염기서열의 quality를 비교한 후 가장 근 연속이나 종으로 나타나는 homology를 확인하였다. 본 연구에서 분석된 염기서열과 EzBioCloud 와 NCBI 에서 확인된 표준 염기서열을 얻어 Clustal X program을 통해 multiple alignment로 정렬하였고 [47], 정렬된 염기서열의gap은 BioEdit program[42] 을 통해 수정한 뒤, Mega 6.0 software[124] 를 이용하여 neighbor-joining[113], maximum-parsimony, maximum-likelihood 방법 [123]을 통해 계통도 (Neighbor joining phylogenetic tree)를 작성하였다 [124]. 계통수의 신뢰성 조사는 1,000회 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 진행하였다 [35].

1. 2. 5. 선다리 세균의 항균 활성

선다리에서 순수 분리한 균주를 대상으로 인체 유해세균과 어류질병 세균에 대하여 agar spotted method[39, 115] 와 paper disc method[125]를 이용하여 항균 활성 실험을 수행하였다. 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 실험에 사용된 인체 유해 세균과 어류 질병 세균을 분양받아 사용하였고, 병어와 인체의 피부에서 각각 wild type을 분리하여 사용하였다(Table. 5, Table. 6). 어류질병 세균과 인체 유해세균은 25% glycerol에 현탁 후 -80℃에서 보관하여 사용하였다.

또한, 선다리에서 순수 분리된 균주를 각각의 액체배지인 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco., USA), Lactobacilli MRS Broth (MRSB, Difco., USA), R2A Broth (R2AB, Difco., USA), Yeast Mold Broth (YMB, Difco, USA) 에 접종 시켜 37℃ 와 25℃에서 48시간 동안 배양하여 준비하였다.

먼저, 항균 활성을 가지고 있는 균주를 1차로 선별하기 위하여 Muller Hinton Agar (MHA, Difco, USA) 배지 상에서 spotted method[39, 115]를 이용하여 항균 활성능을 조사하였다. 분양받은 어류질병 세균과 인체 유해세균을 MacFarland No. 0.4로 조절한 후 MHA 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 도말한 후, 배지 표면에 순수 분리된 균주를 5 µl 적하하였다. 균주의 각 배양 온도에 따라 24-48시간 배양 후에 억제 환의 유무를 확인하였다.

그 후, 1차 항균 실험 spotted method에서 억제 환이 생성된 균주를 선별하여 2차 항균 활성실험을 진행하였다. 1차 항균실험에서 생육 저해환의 생성이 확인되어 항균능이 있다고 판단된 각 균주들은 1.5 ml tube 안에 1ml씩 넣어 12,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상등액과 균체를 분리하였다. 상등액은 1N NaOH와 HCl를 이용하여 최종 pH를 7.0으로 조정된 후에 0.45 µm syringe filter (Whatman, UK)를 통해 여과시켰고, 균체는 0.85% 생리식염수 50 µl 을 넣어 풀어냈다.

다음 여과된 상등액과 현탁된 균체는 각각 멸균된 8 mm paper disc (ADVANTEC, Japan)에 100 μ l 씩 분주하고 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 24~30 시간 동안 건조하였다. 항균 활성에 사용한 병원성 세균은 각각의 최적 배지와 온도에서 배양되었고, 병원균은 MacFarland turbidity 0.4로 조절한 후 MHA 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 도말하였다. 건조된 paper disc를 도말된 MHA 배지에 접촉한 후, 적정 배양 온도에 맞추어 48시간 동안 배양하였다. 그 후, paper disc 주변부에 형성된 생육저해환(mm)을 측정하여 관찰하였다.

Table. 5. List of fish pathogene bacteria and experimental conditions and used in antibacterial activity test

	pathogenic Strain	Strain NO.	Growth conditions
Fish pathogenic bacteria	<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	1.5% BHIA, 25°C
	<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	1.5% BHIA, 25°C
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCCM 40513	MA, 37°C
	<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC 12724	MA, 24°C
	<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	1.5% BHIA, 25°C
	<i>Photobacterium damsela</i> <i>subsp. Damsela</i>	Wild type	MA, 25°C
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KCCM 32586	NA, 26°C
	<i>Hydrophila Listonella</i> <i>anguillarum</i>	KCTC2711	MA, 25°C

Table. 6. List of human pathogene bacteria and experimental conditions and used in antibacterial activity test

	pathogenic Strain	Strain NO.	Growth conditions
Human pathogenic bacteria	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1682	TSA, 37°C
	<i>Micrococcus luteus</i>	KCCM11211	NA, 26°C
	<i>Streptococcus mutans</i>	KCCM 40105	BHIA, 37°C
	<i>Salmonella enterica</i>	Wild type	BHIA, 37°C
	<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM 40307	1.5% BHIA, 37°C

Table. 7. Composition of Tryptic soy Broth (TSB)

Ingredient	Amounts
Pancreatic Digest of Casein	17.0 g
Papaic Digest of Soybean	3.0 g
Dextrose	2.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Dipotassium phosphate	2.5 g
pH	7.3 ± 0.2

Table. 8. Composition of Lactobacilli MRS Broth (MRSB)

Ingredient	Amounts
Proteose Peptone No. 3	10.0 g
Beef Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Dextrose	20.0 g
Polysorbate 80	1.0 g
Ammonium Citrate	2.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium phosphate	2.0 g
Distilled water	1L
pH	6.5 ± 0.2

Table. 9. Composition of R2A Broth (R2AB)

Ingredient	Amounts
Yeast extract	0.5 g
Meat peptone	0.5 g
Casamino acids	0.5 g
Glucose	0.5 g
starch	0.5 g
Dipotassium Hydrogen phosphate	0.3 g
Magnesium sulfate	0.05 g
Sodium pyruvate	0.3 g
Distilled water	1 L
pH	7.2 ± 0.2

Table. 10. Composition of Yeast Mold Broth (YB)

Ingredient	Amounts
Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Dextrose	10.0 g
Distilled water	1 L
pH	6.2± 0.2

Table. 11. Composition of Muller Hinton Agar (MHA)

Ingredient	Amounts
Beef Extract powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.3 ± 0.2

Table. 12. Composition of Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

Ingredient	Amounts
Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.4 ± 0.2

Table. 13. Composition of 1.5 Brain Heart Infusion Agar (1.5 BHIA)

Ingredient	Amounts
Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	1.5 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.4 ± 0.2

Table. 14. Composition of Nutrient Agar (NA)

Ingredient	Amounts
Beef Extract	3.0 g
peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	6.8 ± 0.2

Table. 15. Composition of Marine agar (MA)

Ingredient	Amounts
Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Ferric citrate	0.1 g
Sodium chloride	19.45 g
Magnesium chloride	8.8 g
Sodium sulfate	3.24 g
Calcium chloride	1.8 g
Potassium chloride	0.55 g
Sodium bicarbonate	0.16 g
Potassium bromide	0.08 g
Strontium chloride	0.034 g
Boric acid	0.022 g
Sodium silicate	0.004 g
Sodium fluoride	0.024 g
Ammonium nitrate	0.016 g
Disodium phosphate	0.080 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1L
pH	7.6 ± 0.2

1.3. 결과 및 고찰

1. 3. 1. 선다리 시료의 pH와 산도 및 선다리 균주의 분리배양

본 실험에서 사용된 선다리의 산도는 1.9%로 측정되었으며, pH는 4.94로 측정되었다. 제주 전통음식인 선다리는 평균적으로 발효 후 pH는 3-4 정도이며, 선다리 막걸리의 제조를 위한 적정 발효 온도는 30-40℃, 적정 산도는 1.8%로 알려져 있다[65, 68].

위 실험을 통하여 선다리 막걸리 안에는 다양한 미호기성, 호기성, 통성 혐기성 등 여러 중온균이 존재 할 것이라고 예상 할 수 있었으며, 선다리 속 세균 중에서도 특히 낮은 pH에서도 잘 성장하는 *Lactobacillus* 에 포함되는 균주들이 다수 존재할 것이라고 예상할 수 있었다. 또한, 선다리 막걸리 세균의 균집을 확인하기 위해 실험한 결과 각각의 평판 배지 위에서 colony를 계수한 결과는 Table 16.와 같다.

평균 계수는 MRS 1.8×10^6 CFU/g, YM 2.2×10^6 CFU/g, TSA 3.0×10^6 CFU/g 및 R2A 2.7×10^5 CFU/g로 영양성분의 증식배지인 TSA에서 가장 많은 colony 수가 관찰 된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 효모, 곰팡이와 다른 산성 환경에서도 성장할 수 있는 진균을 확인 및 분리배양하기 위하여 사용한 YMA 배지에서도 colony가 관찰되었다.

기존의 연구 결과에서 이미 김치, 막걸리 등 다양한 종류의 발효식품에서 여러 젖산균을 분리한 것을 확인 할 수 있다 [17, 76, 86, 110].

젖산균은 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로 과산화수소와 bacteriocin 같은 항균성 단백질을 생성하여 자신과 가까운 다른 미생물의 생장을 억제하고, 면역을 증가시킨다고 알려져 있다 [59, 93, 130].

이를 통해 발효식품에서 분리된 젖산균들은 인체뿐만 아니라 어류 병원균에서의 다양한 항균 효과가 나타난다고 보고되어있다[64, 75, 87, 96, 120, 138]. 기존 막걸리의 발효와 다르게 2일이라는 짧은 발효 기간을 가짐에도 불구하고, 선다리 막걸리에서는 다양한 젖산균이 존재한다는 것을 확인 할 수 있었다. 이리

한 결과로 미루어 봤을 때, 선다리에서 분리한 균주 역시 인체 질병, 어류 병원균에서 항균 활성을 나타낼 것을 기대해 볼 수 있었다. 또한, 본 실험을 통해 추후 연구에서 분리 균주를 이용하여 실제 양식장 내에서의 대체 항생제로의 이용에 대한 기초연구 자료가 될 것이라고 사료된다.

Table. 16. Counts of the viable cells isolated from the *Shindari*.

No.	Medium (CFU/g)			
	MRSA	YMA	TSA	R2A
1	1.4×10^6	2.8×10^6	3.3×10^6	2.4×10^6
2	1.8×10^6	1.2×10^6	2.6×10^6	3.1×10^6
3	2.3×10^6	2.6×10^6	3.1×10^6	2.7×10^6
Average count	1.8×10^6	2.2×10^6	3.0×10^6	2.7×10^6

1. 3. 2. 선다리 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통학적 분석

선다리에서 분리한 균의 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열을 NCBI와 EZbiocloud를 이용하여 분석한 결과 2문(Phylum) 2강(Class) 3목(Order) 5과(Family) 7속(Genus)으로 총 112 균주로 분석되었다(Table. 17). 그리고 염기서열을 분석하여 가장 가까운 속, 종의 계통수를 작성하였다(Fig. 2). 선다리에서 분리한 균주는 Firmicutes문 73%와 Proteobacteria문 27%로 Firmicutes문이 우점분인 것으로 나타났다. Firmicutes문에서 Bacilli강은 98.6-100%의 상동성을 나타내었다. 그 중 Lactobacillales목 Lactobacillaceae과 *Pediococcus*속은 99.4-99.8%의 상동성으로 Firmicutes문과 Proteobacteria문 전체에서 25%를 차지하였고, Lactobacillales목 Enterococcaceae과 *Enterococcus*속은 98.7-99.8%의 상동성으로 16%를 차지하였다. 또한, Firmicutes문의 Bacilli강 Bacillales목 Bacillales과 *Bacillus*속은 98.8-99.8%의 상동성으로 25%를 차지하였고, Paenibacillaceae과 *Aneurinibacillus*속은 99.9-100%의 상동성으로 5%, *Paenibacillus*속은 98.5-99.7%의 상동성으로 전체의 2%를 차지하는 것으로 나타났다. Proteobacteria문에서 Gammaproteobacteria강은 98.6-99.9%의 상동성을 나타내었다. 그 중 Enterobacteriales목 Enterobacteriaceae과 *Klebsiella*속은 99.5-99.7%의 상동성으로 전체의 4%를 차지하였고, *Cronobacter*는 98.6-99.9%의 상동성으로 전체의 22%를 차지하였다. 따라서, 염기서열 분석 결과 *Pediococcus*속, *Bacillus*속이 각각 25%로 가장 우세함을 알 수 있었고, 다음으로 *Cronobacter*속 22%, *Enterococcus*속 16%, *Aneurinibacillus*속 5%, *Klebsiella*속 4%, *Paenibacillus*속이 2% 순으로 구성되어 있는 것으로 나타나 있는 것을 알 수 있었다. 가장 우세했던 *Pediococcus*속에서는 *Pediococcus acidilactici* (GL397069), *Pediococcus pentosaceus* (JQBF01000022), *Pediococcus argentinus* (JQCQ01000064), *Pediococcus stilesii* (AJ973157)등 중에서 *Pediococcus acidilactici* (GL397069) 종이 40%를 차지했다. 또한 *Bacillus*속에서는 *Bacillus velezensis* (AY603658) ,

Bacillus licheniformis (AE017333), *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* (JHCA01000027) 등 중에서 *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* (JHCA01000027) 종이 25%를 차지하였다. *Cronobacter*속 중에서는 *Cronobacter sakazakii* (BAWU01000071) 종, *Enterococcus*속 중에서는 *Enterococcus lactis* (GU983697) 종, *Aneurinibacillus*속 중에서는 *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (KE952670) 종, *Klebsiella*속 중에서는 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* (HG933296), *Paenibacillus* 속 중에서는 *Paenibacillus residui* (FN293173) 종과 *Paenibacillus tumbae* (KX289440) 종이 가장 우세하였다. 이러한 결과는 기존의 생 막걸리의 주된 세균 군과 다른 결과임을 확인할 수 있다. 막걸리에 관한 이전 연구에서는 국내에서 판매되는 생 막걸리 7종에서 젖산균을 분리한 결과 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus arizonensis*가 우세하게 나타났고, 시중에서 판매되는 막걸리에서 공통적으로 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* 등이 주요 우점종으로 보고되어있다[51, 73, 82, 117]. 그 외 *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis*, *L. harbinensis*, *L. paracasei* 및 *L. plantarum*가 열쇄하게 보고되면서 *Lactobacillus*가 공통적으로 우점종임을 확인할 수 있었다[51, 73, 82, 117]. 또한, 4℃에 저장한 후 분리 동정된 시판 막걸리에서는 *Pediococcus sp*이 우점하였으나, 20℃에 저장하면서 분리 동정한 젖산균은 *L. plantarum*, *L. brevis*가 우세하다고 보고되었다[66, 69]. 일반 막걸리의 우점균이 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*인 것과는 다르게 본 실험의 결과에서는 *Pediococcus*속이 가장 우세하게 우점하는 것으로 나타났다. 이는 일반 막걸리보다 쉐다리에서는 비교적 낮은 온도에서 발효되고, 비교적 짧은 시간동안 발효되는 점이 다르기 때문에 우점종에 차이가 나타난 것으로 사료된다. 쉐다리는 짧은 발효이지만 막걸리에서 분리 동정한 젖산균 및 세균의 군집이 유사하게 형성되어 있는 것으로 보아, 이전의 막걸리의 미생물 활용 등[82]과 같이 쉐다리 역시 인체 및 어류 등에서 천연대체항생제 및 면역증강제 등 다양한 활용을 기대해 볼 수 있다. 다만, 쉐다리는 정량화 된 만드는 방법이 있는 것이 아니라 집집마다 첨가물을 더하기도 하고, 정해진 온도로 일정하게 발효시키는게 아니기 때문에 과학적 시료로 이용하기 위해서는 발효 시간과 온도, 첨가물을 정량화하

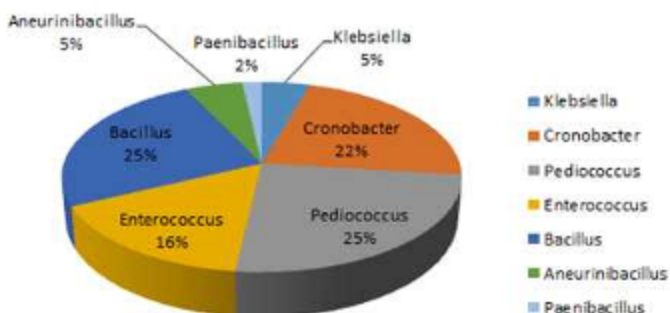
여 통합하는 것이 먼저 필요하다고 사료된다.



Table. 17. Bacterial diversity associated with *Shindari*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Microbacteriaceae	<i>Klebsiella</i>
				<i>Cronobacter</i>
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>
			Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>
		Bacillales	Bacillales	<i>Bacillus</i>
			Paenibacillaceae	<i>Aneurinibacillus</i>
		<i>Paenibacillus</i>		

Fig. 1. Pie-diagram showing the community structure and the diversity of bacterial community of *Shindari*.



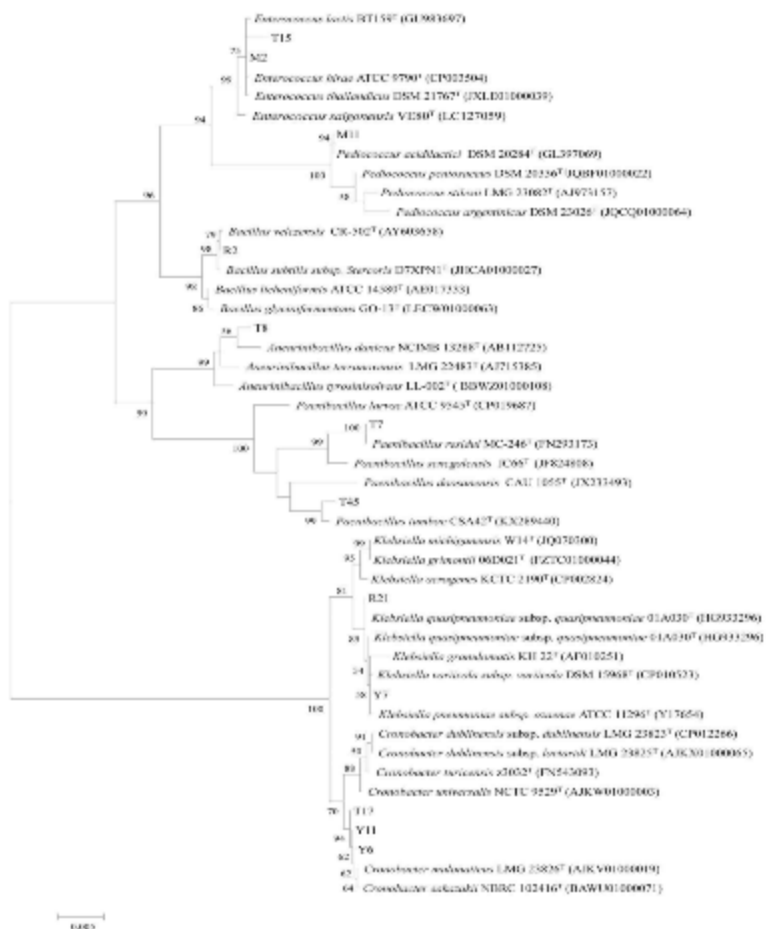


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences of bacteria from the *Shindari*. GenBank accession numbers given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown.

1. 3. 3. 선다리 세균의 항균 활성 탐색

선다리 분리 균주의 항균 활성은 2종의 그람양성균 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*와 6종의 그람음성균 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* 및 *Edwardsiella tarda* 등 어류질병 세균과 2종의 그람음성균 *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*와 3종의 그람양성균 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*균을 이용하여 agar spotted method[39, 115] 와 paper disc diffusion 방법 [125]으로 항균 활성을 측정하였다.

선다리 분리 균주의 1차 항균 실험인 agar spotted method결과 대부분의 피검 균주에 대해 저해 환을 형성하는 것은 *Bacillus*속이었다. *Bacillus*속은 bacteriocin을 포함한 다양한 항균물질들의 생산함으로써 항균 활성이 뛰어나다는 것과 함께 이미 전반적인 분야의 생균제로써 박테리오신의 활용에 관한 연구가 진행되고 있다 [2, 27, 52, 57, 90]. 이에 본 연구자는 추후 양식장 및 현장에서 선다리 균주가 생균제로서의 사용 가능성을 알아보기 위하여 *Bacillus* 종과 함께 항균 활성을 보인 균주를 가지고 2차 항균 실험으로 paper disc diffusion을 진행하였다. 선별된 분리 균주의 2차 항균 실험인 paper disc diffusion결과 어류질병 세균 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*와 인체 유해세균 *S.mutans*를 제외한 모든 균에 대해서 생육저해 환을 형성하였다 (Table 18, Table 19).

그 중 어류질병 세균에서는 넙치, 강도다리 등을 포함한 다양한 어종에서 어류의 대량 폐사를 초래하며 국내에서 다양한 지역의 양식 넙치로부터의 검출이 지속적으로 증가하고 있는 그람 양성균의 *S. parauberis*에서 가장 다양하게 항균 활성을 나타냈다[19, 105]. 인체 유해세균에서는 비병원성으로 사람의 피부, 토양, 우유와 치즈 등에서 분리되며, 면역력이 저하된 사람에게 기회 병원체로 작용하여 패혈증 등을 포함한 다양한 질병을 일으키는 *M. luteus*에서 가장 다양하게 항균 활성을 나타냈다[106]. 어류질병 세균인 *S. parauberis*에서 Y19

(*Bacillus siamensis*)가 균체에서 36.8 mm로 가장 큰 생육저해 환을 나타냈다. 그 외에도 T19, T25, T21 (*Bacillus siamensis*)가 33.7 mm, 33.6 mm, 32.7 mm 순으로 눈에 띄는 생육저해 환을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 항균 활성을 보인 싼다리 분리 균주는 *Pediococcus acidilactici*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis*로 총 4가지 종으로 나타났다. 기회주의적 인간 병원체로 영아의 생명을 위협하는 박테리아 감염의 원인으로 간주되는 그람 음성 간균인 *Cronobacter sakazakii*는 다양한 환경이나 음식에서 발견되었으나, *Cronobacter sakazakii*균주가 다른 병원균에서의 항균 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다[53]. 그러나, 흥미롭게도 본 실험에서 사용된 어류질병 세균과 인체 유해세균에 대하여 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 기회 병원균인 *Cronobacter sakazakii*가 어떻게 다른 어류질병 균에 대하여 항균효과를 나타내었는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 발효 야채, 유제품 및 육류에서 흔히 발견되는 그람 양성 구균인 *Pediococcus acidilactici*는 pediocin으로 알려진 bacteriocin의 분비를 통해 장내 병원체를 포함한 다른 미생물에 대해 다양한 항균 활성을 나타낸다고 알려져 있다[3, 10, 116].

발효식품에는 유용한 생리활성물질과 다양한 항균 활성 물질이 존재한다. 그 중 대표 항균 물질 bacteriocin은 항균 범위가 광범위하며, 자신을 제외한 다른 미생물의 세포막 및 DNA에 손상을 일으켜 성장을 억제하거나 사멸 시켜 항균효과를 나타낸다. 또한, bacteriocin은 단백질로 구성되어 있어 인체 내 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해될 수 있기 때문에 인체에 독성이 거의 없으며 생체 내 잔류의 위험 또한 거의 없다[21, 23, 25]. *Bacillus*종은 중요한 세균으로 간주되며, 낮은 독성으로 광범위하고 높은 항균효과를 가지는 것으로 알려진 CLP (cyclic lipopeptides)를 생산한다[92]. CLP는 surfactin, iturin, fengycin 등의 항균활성물질을 생산하며 생물학적 막을 직접 파괴함으로써 기존의 항생제보다 병원성 세균에 치명적인 영향을 미친다는 보고가 있다[6, 29, 36, 37, 101, 133, 134]. *Bacillus velezensis*와 *Bacillus siamensis*는 식물의 성장을 촉진하는 그람 양성, 내생 포자 형성 세균으로서, 2차 대사산물의 생합성과 관련된 균

주의 특이적 유전자 클러스터를 가지고 있으며, 이를 통해 식물 병원체 성장 촉진과 유해한 뿌리줄기 미생물 병원체의 억제에 중요한 역할을 한다[107, 108].

본 연구 결과에서 또한 *Bacillus velezensis*와 *Bacillus siamensis*는 가장 다양하고 큰 항균 활성을 보였다. 따라서 면역증강제, 대체 항생제 및 프로바이오틱스로서의 제주 전통 식품인 순다리의 이용 가능성에 대한 추가 연구가 이루어져야 할 것이며, 그 이후에 다양한 방법에서의 순다리의 활용 가능성을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

Table 18. Origin and direct antibacterial activity against various human pathogens of selected strains isolated from fermented foods.

Selected strains	Origin	Diameter of inhibition zone (mm)											
		1		2		3		4					
		supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet				
5R-2	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	9.45	-	-	-	-	-	5	-	
5R-5	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	15.2	-	-	-	-	-	7.5	-	
5R-7	<i>Bacillus velezensis</i>	-	11.7	13.4	18.9	-	10.7	-	-	-	-	-	
5R-8	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	18.3	6	-	-	-	-	-	-	
5R-9	<i>Comobacter sakazakii</i>	-	-	-	15.1	-	11.1	-	-	-	11.45	-	
5R-10	<i>Bacillus siamensis</i>	-	-	-	11.4	-	-	-	-	-	-	-	
5R-15	<i>Comobacter sakazakii</i>	-	-	-	21.6	-	9.2	-	-	-	-	-	
5T-8	<i>Comobacter sakazakii</i>	7.8	-	-	16.9	-	-	-	-	-	-	-	
5T-19	<i>Bacillus siamensis</i>	-	11.1	-	19.8	10.2	-	-	-	-	-	-	
5T-21	<i>Bacillus siamensis</i>	-	13	-	-	-	10.6	-	-	-	-	-	
5T-25	<i>Bacillus siamensis</i>	-	-	9	-	-	-	-	-	-	12.8	-	
5T-40	<i>Bacillus velezensis</i>	-	10.2	-	22.8	-	13.5	-	-	-	-	-	
5T-16	<i>Comobacter sakazakii</i>	-	-	-	17.6	-	-	-	-	-	-	-	
5T-19	<i>Bacillus siamensis</i>	4.2	-	16.7	19.85	11.9	14	-	-	-	-	-	
5T-20	<i>Comobacter sakazakii</i>	-	12.9	-	16.7	-	-	-	-	-	-	-	
5M-28	<i>Pedococcus acidilactici</i>	11.5	16.5	-	20.5	-	-	-	-	-	-	-	

1, E. coli; 2, *M. luteus*; 3, *S. enterica*; 4, *L. monocytogenes*.

Table. 19. Origin and direct antibacterial activity against various human pathogens of selected strains isolated from fermented foods.

Selected strains	Origin	Diameter of inhibition zone (mm)															
		1		2		3		4		5		6		7			
		supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet		
S10-28	<i>Medoroccus acidifaciens</i>	9.6	15.8	-	-	9	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9-2	<i>Bacillus velezensis</i>	-	11.2	-	11.7	-	-	-	-	-	-	-	-	20.5	-	-	-
S9-5	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	19.4	6	-	-
S9-7	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	22.5	31.9	-	16.1	-	-	10.9	-	8.8	13	-	-	-	-
S9-8	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	-	-	18.8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9-10	<i>Bacillus pumilus</i>	16.5	17.9	-	10.2	-	17.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9-15	<i>Coriobacter pleuraxii</i>	-	-	-	32.5	-	-	11.5	-	-	-	25.6	-	15.1	-	-	-
S1-16	<i>Coriobacter pleuraxii</i>	-	-	-	-	-	-	-	15.5	-	-	-	-	-	-	-	-
S1-19	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	33.7	-	12.5	-	-	-	-	-	20.3	14.8	-	-	-
S1-21	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	32.65	-	-	-	-	-	-	22.4	4	-	-	-	-
S1-25	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	33.55	-	11.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1-40	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5	-
S1-8	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	29.5	29.9	11.8	16.5	-	23.9	-	-	-	-	15.5	-	-	-
S1-16	<i>Coriobacter pleuraxii</i>	-	-	-	-	-	-	-	17.5	-	-	-	-	-	-	-	-
S1-19	<i>Bacillus pumilus</i>	21	22.6	26.5	36.8	-	13.6	18	19.8	21	21.7	9.9	15.7	11.2	11.7	-	-

1. *S. narae*, 2. *S. parvulus*, 3. *V. alginolyticus*, 4. *V. parvii*, 5. *E. ictalae*, 6. *A. hydrophila*, 7. *L. anguillar*

1.4. 1장 종합고찰

제주도는 척박한 토질을 가진 사면이 바다로 둘러싸여 있는 화산섬이라는 특징으로 인하여 논농사보다 밭농사가 주로 행해졌고, 생산되는 농작물의 종류와 식량자원에 한계가 있었다. 때문에 일찍부터 제주도민들은 식량 확보와 저장을 중요시했고 다양한 형태로 식량을 저장하며 발효음식이 발달하였다. 그 중 제주 전통 막걸리인 선다리는 그 특징을 보여주는 하나의 예이다. 제주도민들은 토양, 지리, 지형적 특징으로 인하여 보리를 주식으로 많이 사용하였다. 먹다 남은 보리밥을 활용하기 위하여 식은 보리밥에 누룩을 첨가하여 단기간에 발효시켜 발효식품으로 만들어 먹었다. 이렇게 만들어진 발효식품을 단술 또는 선다리라 불린다.

최근 발효식품에 대한 관심이 높아지게 되면서 막걸리에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있으며, 막걸리 속 미생물의 발효 과정 동안 생성되는 생산물로부터 다양한 생리활성들이 밝혀지면서 막걸리의 이용가치가 높게 평가되고 있다 [63]. 전분인 곡물의 종류에 따라 차이가 나타나지만, 막걸리에는 식이섬유, 단백질 등이 풍부하게 존재하고 있으며, 특히 생 막걸리의 경우 유산균과 효모가 다량으로 존재하고 있다고 보고 되어있다 [55]. 선다리는 막걸리와 비슷한 원료로 제조되며, 유사한 맛을 가지고 있다는 공통점을 가지고 있으나, 막걸리보다 저 농도의 알코올함량으로 짧은 시간동안 발효하여 만들어진다는 특징을 가지고 있다. 선다리에는 막걸리에서 나타나는 각종 유용 생리활성 물질이 유사하게 함유되어 있을 것이라 예상되지만, 아직까지 선다리에 대한 연구는 미비한 실정이다 [67].

이에 따라 본 연구에서는 제주 전통 발효 식품인 선다리 내의 세균의 군집을 파악하고, 항균 활성을 지닌 균들을 확인하여 추후 어류 및 인체질병에 대한 예방, 치료에 필요한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

본 실험에서 사용된 선다리의 산도는 1.9%로 측정되었으며, pH는 4.94로 측정되었다. 선다리 속 세균 중 다양한 균주들이 다수 존재할 것이라고 예상되지만 그중에서도 특히 낮은 pH에서도 잘 성장하는 *Lactobacillus*에 포함되는 균주들

이 존재할 것이라고 예상할 수 있었다. 또한, 선다리 막걸리 세균의 군집을 확인하기 위해 각각의 평균 배지 위에서 colony를 계수한 결과 평균 계수는 MRS 1.8×10^6 CFU/g, YM 2.2×10^6 CFU/g, TSA 3.0×10^6 CFU/g 및 R2A 2.7×10^6 CFU/g로 영양성분의 증식배지인 TSA에서 가장 많은 colony수가 관찰된 것을 확인할 수 있었으며, 효모, 곰팡이와 다른 산성 환경에서도 성장할 수 있는 진균을 확인 및 분리배양하기 위하여 사용한 YMA배지에서도 colony가 관찰됨을 확인할 수 있었다. 기존 막걸리의 발효와 다르게 2일이라는 짧은 발효 기간을 가짐에도 불구하고, 선다리 막걸리에서는 다양한 균주와 젖산균이 존재한다는 것을 확인할 수 있었다.

선다리에서 분리한 균의 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열을 NCBI와 EZbiocloud를 이용하여 분석한 결과 2분(Phylum) 2강(Class) 3목(Order) 5과(Family) 7속(Genus)으로 총 112 균주로 분석되었다. 선다리에서 분리한 균주는 Firmicutes분 73%와 Proteobacteria분 27%로 Firmicutes분이 우점분인 것으로 나타났다. 또한, *Pediococcus*속, *Bacillus*속이 각각 25%로 가장 우세하였고, 다음으로 *Cronobacter*속 22%, *Enterococcus*속 16%, *Aneurinibacillus*속 5%, *Klebsiella*속 4%, *Paenibacillus*속이 2% 순으로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

일반 막걸리의 우점균이 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*인 것과는 다르게 본 실험의 결과에서는 *Pediococcus*속이 가장 우세하게 우점하는 것으로 나타났다. 선다리는 기존 막걸리보다 비교적 낮은 온도에서 발효되고, 비교적 짧은 시간동안 발효되는 점이 다르기 때문에 우점종에 차이가 나타난 것으로 사료된다. 짧은 발효이지만 막걸리에서 분리 동정한 젖산균 및 세균의 군집이 선다리에 도 유사하게 형성되어 있는 것으로 보아, 이전의 막걸리의 미생물 활용 등 [82]과 같이 선다리 역시 인체 및 어류 등에서 천연대체항생제 및 면역증강제 등 다양한 활용을 기대해 볼 수 있다고 사료된다.

선다리 분리 균주의 항균 활성은 2종의 그람양성균 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*와 6종의 그람음성균 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* 및 *Edwardsiella tarda* 등 어류질병 세균과 2종의 그람양성균 *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*와 3종의 그람양성균 *Micrococcus*

luteus, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*균을 이용하여 agar spotted method[39, 115] 와 paper disc diffusion방법 [125]으로 항균 활성을 측정하였다. 원다리 분리 균주의 1차 항균 실험인 agar spotted method결과 대부분의 피집 균주에 대해 저해 환을 형성하는 것은 *Bacillus*속으로 확인되었다. *Bacillus*속은 bacteriocin을 포함한 다양한 항균물질들의 생산함으로써 항균 활성이 뛰어나다는 것과 함께 이미 전반적인 분야의 생균제로써 박테리옌의 활용에 관한 연구가 진행되어 있다[2, 27, 52, 57, 90]. 선별된 분리 균주의 2차 항균 실험인 paper disc diffusion결과 어류질병 세균 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*와 인체 유해세균 *S.mutans*를 제외한 모든 균에 대해서 생육저해 환을 형성하는 것을 확인하였다. 본 실험에서 항균 활성을 보인 원다리 분리 균주는 *Pediococcus acidilactici*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis*로 총 4가지 종으로 나타났으며, 어류질병 세균인 *S. parauberis*에서 Y19 (*Bacillus siamensis*)가 균체에서 36.8 mm로 가장 큰 생육저해 환을 나타냈다. 그 외에도 T19, T25, T21 (*Bacillus siamensis*)가 33.7 mm, 33.6 mm, 32.7 mm 순으로 눈에 띄는 생육저해 환을 확인할 수 있었다.

또한, 본 연구 결과에서 *Bacillus velezensis*와 *Bacillus siamensis*는 가장 다양하고 큰 항균 활성을 보였다. *Bacillus*종은 중요한 세균으로 간주되며, CLP (cyclic lipopeptides)를 생산한다고 알려져 있다. 낮은 독성으로 광범위하고 높은 항균효과를 가지는 것으로 알려진 CLP는 surfactin, iturin, fengycin 등의 항균활성물질을 생산하며 생물학적 막을 직접 파괴함으로써 기존의 항생제보다 병원성 세균에 치명적인 영향을 미친다는 보고가 있다[92, 6, 29, 36, 37, 101, 133, 134].

따라서 면역증강제, 대체 항생제 및 프로바이오틱스로의 제주 전통 식품인 원다리의 활용 가능성을 기대해 볼 수 있을 것이며, 이에 대한 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

II. 제 2장 선다리에서 분리된 세균의 프로바이오틱스로의 가능성 연구

2.1. 서론

내수면 어업은 크게 두 가지로 해양에서 포획 및 채취하는 어업인 어로어업과 기르는 어업인 양식어업으로 나뉠 수 있는데, 최근 전 세계적으로 환경오염, 전문인력 노령화, 기후변화, 한정적인 자원의 감소 및 미래의 단백질 공급원으로서의 기대, 건강에 대한 관심 증대로 인한 수요량 증가 등 늘어나는 수산물 수요에 따른 한정적인 생산량간의 불균형의 문제 해결하기 위해 기존의 어로어업에서 양식어업으로의 급속한 발전과 함께 양식 산업의 중요성이 점차 커지고 있다[32, 30, 33]. 또한, 현재 세계 수산양식 산업의 기술은 나날이 발전하고 있으며, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)에 통계에 의하면 2016년에는 세계 어업생산량이 약 1억 7,100톤 중 양식 어업의 생산량은 1억 1천만 톤으로 세계 어업생산량의 64.4%를 차지한 것으로 나타났다. 이렇게 이미 전 세계 수산물 소비량의 절반 이상은 양식 수산물이 차지하고 있다 [31, 100].

우리나라의 육상 양식 산업 역시 정부의 내수면 어업의 적극적인 장려와 함께 1970년대 내수면 개발 촉진법, 1980년대 새로운 품종 및 배합사료와 양식법 개발, 1990년대와 2000년대 양식기술 발전과 전반적인 국민소득의 향상으로 인한 수산물 수요증가 등을 통하여 빠르게 성장하였다[83].

그러나 급속하게 육상 양식 산업이 발전하면서 빠르게 생산량을 늘리기 위하여 수질 환경을 고려하지 않고 과도한 사료공급과 한정된 면적에서 고밀도 사육을 하여, 다양한 세균, 기생충 및 바이러스성 질병 발생의 직접적인 원인을 제공하고 있다[88, 91]. 어종에 따라 차이는 있으나, 양식 어류에서 발생하는 주요 세균성 질병은 에드워드병, 활주세균병, 스쿠티카병, 비브리오증, 연쇄구균증 등으로 알려져 있다[48, 61]. 이러한 질병들의 발생과 확산은 육상양식 산업의 생산성을 감소시키며 폐사로 인한 경제적 손실 등으로 인하여 수산 양식업에 막대

한 피해를 일으키는 요인이 된다. 이에 대한 구체적인 치료와 예방책은 미비한 실정이므로 예방과 치료법으로 오랫동안 광범위하게 다양한 항생제가 사용되어 왔다[38]. 그러나 일부 양식장에서는 예방, 치료 및 성장촉진 등의 목적으로 화학 항생제를 오남용하고 있는데 이로 인해 내성 균주의 출현, 양식 생물의 항생제 체내 축적으로 인한 수산생물의 안정성과 경제적 피해 및 식량안전문제, 하천과 연안으로 노출되는 육상오염원으로 부영양화 및 생태계 파괴 등 다양한 2차적인 문제들이 야기되고 있다[14, 15, 109]. 이에 따라 항생제 사용에 대한 생태계 악영향, 국민위생에 대한 우려 및 부정적인 인식과 함께 엄격한 규제들이 생겨나고 있다. 또한 항생제대체제에 대한 관심이 높아졌으며, 많은 연구진들은 미생물, probiotics, 다양한 발효식품, 천연식품 등에서 분리한 천연 항생물질로부터 천연 항생제 및 사료첨가제 개발에 대한 연구를 진행하고 있다[128, 139, 45, 46, 49].

일반적으로 probiotics란 적절한 양으로 투여 및 섭취될 시 숙주의 장내 미생물 군의 조절을 통해 면역반응을 개선시켜 실질적인 건강상의 이점을 제공하는 살아있는 미생물의 단독 또는 복합균주를 말한다[84]. 이미 probiotics에 대해 많은 연구는 면역반응 개선 등 숙주에게 유익한 효과를 나타낸다고 입증되어 있다. 투여되는 probiotics는 주변 환경의 미생물 또는 숙주내의 미생물의 균형을 개선하여 질병저항성, 소화효소활성 및 소화력을 향상시켜 스트레스반응 억제, 질병제어 및 수질 환경개선을 통해 숙주에게 이로운 효과를 보여준다고 입증되어 있다[26, 132, 71]. 이와 같은 이유로 probiotics는 안전한 사료첨가제로서 양식현장에서 사료 또는 사육수에 첨가되어 사용되고 있으며 그 외에 다양한 종류의 박테리아, 미세조류 및 효모 등이 활발히 연구되어 probiotics시장은 전 세계적으로 빠르게 성장하는 중이다.

그러나 일부 프로바이오틱스 제품의 표기되어있지 않은 균주의 오염, 부작용 및 안정성에 대해 보고되면서 제품의 품질관리와 안정성에 대한 요구가 높아지고 있다[141, 95, 60]. 때문에 프로바이오틱스로 주장되는 미생물이 이용되기 위해서는 세계보건기구(WHO)와 국제식량농업기구(FAO)의 명시된 조건에 따라 후보균주의 출처를 명확히 해야 하고 이를 섭취할 시 안정성을 갖추기 위해 유효물질을 생산할 가능성이 낮아야하며 비 병원성으로 독성이 없어야 한다. 또한,

숙주내의 미생물의 조절을 통해 유해세균을 저해 할 수 있는 항균물질을 생산하고 강한 위산과 담즙액에 견디 장까지 도달하여야 한다. 숙주에게 유익한 역할을 수행하기 위해 장내 세포 표면에 부착 및 증식을 할 수 있어야 한다[34, 114]. 이미 몇 가지 조건들을 통과하여 프로바이오틱스로서 *Lactobacillus*속, *Bacillus*속 *Bifidobacterium*속 등과 같은 유익 미생물이 흔히 사용되고 있으며, 그 중에서도 특히 *Bacillus*는 다른 미생물에 대해 항 미생물질을 생산하고 다른 균주에 비해 높은 내열성과 생존성을 가지고 있으며, 세포의 효소의 활성이 높아 섬유질 등 유기물을 분해시켜 사료의 효율을 높이고, 소화율증가, 면역관련 유전자의 발현을 통한 숙주의 면역강화 및 가축의 증체율 등에 효과가 뛰어나 사료 첨가제로서 활용도가 높은 균주로 알려져 있다[7, 58, 1, 98].

선다리에서 분리한 균의 항균활성을 탐색한 이전 연구 결과 피검 균주에 대해 저해 환을 형성하는 것은 *Pediococcus acidilactici*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis*로 총 4가지 종으로 확인 되었으며, 그 중에서도 *Bacillus velezensis*와 *Bacillus siamensis*는 가장 크고 광범위하게 항균 활성이 나타났다. 따라서 본 실험에서는 항균활성이 높은 결과를 보인 몇 가지 균주에 대하여 프로바이오틱스 적합성을 파악하여 후보균주로 적합한 균주가 어떤 것인지 파악하고 추후 제주 전통 음식인 선다리의 프로바이오틱스로의 활용 가능성을 제시해 하고자 한다.

2. 2. 재료 및 방법

2. 2. 1. 용혈성 및 유해대사산물과 유해효소 생성여부 시험

선다리 분리균주들의 항균활성 실험을 통해 항균활성이 나타난 분리균주의 용혈성 여부를 확인하였다. 용혈성 여부를 확인하기 위하여 sheep blood agar 배지에 streaking하여 분리균주 각각의 온도 (25℃, 37℃)에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 균체 주변부에 clear zone을 확인하였다. clear zone의 종류와 집락형성 유무, 색 등에 따라 α , β , γ 로 구별하였다. 알파 용혈(α -hemolysis)은 집락 주변 녹색 환, 베타용혈(β -hemolysis)은 집락 주변 황색 투명환 생성을 보고 판단하였고, 집락 주변 환이 생성되지 않은 것은 감마용혈(γ -hemolysis)로 판단하였다.

또한, 유해대사 산물인 indole, phenylpyruvic acid와 유해효소인 urease의 생성 여부를 확인하기 위해 이와 같이 실험을 진행하였다.

유해대사 산물인 indole 생성 여부는 각 균주조건에 맞는 broth 배지에 접종 후 37℃에서 24시간 진탕배양 후 indole reagent dropper (Difco, Detroit, MI, USA)를 첨가하여 배지 표면의 색 변화로 생성여부를 확인하였다. 붉은색을 띠면 양성, 무색 또는 노란색을 띠면 음성으로 판단하였으며 48시간까지 배양 후 확인하였다. phenylpyruvic acid 생성여부는 phenylalanine agar (Fluka, Buchs, Switzerland) 배지에 후보균주를 접종하고 25℃와 37℃에서 24, 48시간동안 배양한 후 10% ferric chloride (MBcell, Seoul, Korea)를 3방울 첨가 후 콜로니 주변의 색 변화를 관찰하여 생성여부를 확인하였다. 푸른색 또는 녹색을 띠는 경우 양성 무색 또는 노란색을 띠는 경우 음성으로 판단하였다.

유해효소인 urease의 생성 여부는 urea가 첨가된 배지에 선다리 분리균주를 접종한 후 2,4,6,8,10,18,24 시간 관찰하여 반응을 확인하였고, 반응이 확인되지 않은 것은 7일간 매일 관찰하여 반응을 확인하였다. 분리균주가 urease를 분

비할 경우 배지의 pH를 상승시켜 알칼리 상태로 변화하게 된다. 배지 성분 중 phenol red는 pH가 6.8이하이면 노란색을 8.4이상이면 적색을 나타낸다. 이에 따라 배지에 접종된 분리균주 주변으로 적색으로 색 변화를 나타내면 양성으로 판정하였다. 진행된 용혈성 및 유해대사산물과 유해효소 생성 실험은 In vitro 조건에서 *Escherichia coli* ATCC 10798를 대조균으로 사용하여 실험을 진행하였다.

2. 2. 2. 고분자 유기물질 분해여부 시험

원래 분리균주의 유기물질 분해능을 확인하기 위하여 DNase, carboxy methyl cellulose, Casein, starch, Tween 20, 40, 60, 80를 TSA, MRSA, R2A, YMA배지에 각각 1%씩 첨가 후 배지를 제조하였다. 각 배지에 분리균주를 접종한 후 분리 균주 25℃ 와 37℃ 에서 48시간 동안 배양한 후 분해능 확인 실험을 진행하였다.

DNase test는 DNase agar배지에 분리된 균주를 접종하고 1N HCl를 첨가하여 핵산분해효소의 생산을 확인하는 실험으로 분리균주 집락 주변으로 투명대가 생성되면 양성으로 판정하였다.

Carboxy methyl cellulose test는 분리균주가 배양되어 있는 배지에 0.1% congo red용액으로 염색 후 1M NaCl로 세척하였고, cellulose생성여부를 판단하였다. 분리균주 주변으로 투명대의 형성 유무를 확인하여 투명대가 생성되면 양성으로 판정하였다.

Casein Hydrolysis Test는 Casein단백질 가수 분해능을 판단하는 실험으로 Casein 배지에 Skin milk 1%를 첨가한 후 분리균주를 배양하였다. 그 후, 투명대의 유무에 따라 투명대가 형성되면 양성으로 판단하였다.

starch test는 녹말의 가수 분해능을 판단하는 실험으로 1% starch를 첨가시킨 배지에서 분리균주를 배양시킨 후, 분리균주 주변으로 iodine을 떨어트렸다. iodine은 녹말배지 안에서 분비된 amylase의 작용으로 인하여 iodine을 적하 하였을 때, 가수분해되지 않은 부분은 보라색으로 나타나며 가수분해가 된 부분은 투명하게 나타난다. 이에 따라 분리균주 주변의 투명대가 형성되면 양성으로 판단하였다.

2. 2. 3. 인공 위액 및 인공 담즙에서의 내성 시험

섭취한 유산균이 효능을 보려면 살아있는 상태로 장까지 도달해야한다. 유산균이 장까지 살아있는 상태로 도달하려면 장과 위의 범위인 pH2에서 pH8의 범위 안에서 생존할 수 있어야 한다[43]. 따라서 헨다리 분리균주의 인공위액과 인공담즙에서의 생존력 및 내성을 확인하기 위해 Lee 등(2015)의 실험을 약간 변경하여 진행하였다[77].

우선, 인공 위액과 담즙에서 사용된 균주는 각 균주에 맞는 조건의 액체배지에서 120 rpm에서 25℃ 와 37℃에서 48시간씩 배양하였다. 그 후, 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4℃)를 10분간 하여 균체를 회수하고 PBS로 세척하여 상층액을 버리는 단계를 2회 반복하여 O.D 값이 0.4가 되도록 현탁하여 실험에 사용하였다.

인공위액의 조제는 1N HCl을 0.85% NaCl에 첨가하고 각각 3mg/ml의 농도로 pepsin(Sigma Co., U.S.A)를 첨가한 후, pH를 2.0 or 3.0으로 조정하여 인공위액을 제조하였다. 제조된 인공위액 1ml에 현탁한 균체를 100 μ l 첨가하여 각각의 agar 배지에 100 μ l씩 도말하여 30℃에서 3시간동안 배양한 후 생존율을 확인하였다.

인공 담즙의 조제는 각각의 액체배지를 pH 2 or 3 으로 조정한 뒤 Bile salt를 0.5%, 1%, 2% 각각 첨가하였고, 균주를 1% (배양액 100 μ l) 집중하여 37℃에서 소화시간인 3시간 동안 배양하였다. 각각의 배지에서 원액과 10³~10⁴ 희석액을 짚아 100 μ l씩 도말하여 생존율을 확인하였다. 또한, 처음에 집중한 균과 인공 위, 담즙에서 배양 후의 균수를 측정하여 백분율로 바꾸어 그래프에 나타내었다.

2. 2. 4. 온도, pH, NaCl에서의 생육 시험

원다리 분리균주의 항균활성 실험을 통해 항균활성이 나타난 분리균주의 생육이 가능한 pH, NaCl의 범위를 확인하였다. 또한 분리균주의 성장 온도 범위를 확인하기 위해 5-45℃ (5℃ 간격)에서 배양하여 생육을 확인하였다.

분리 균주의 성장 pH의 범위를 관찰하기 위해 각 균주별 broth 배지인 TSB, R2B, MRSB, YMB배지에 1N HCl와 0.1M NaOH를 첨가하여 pH 3.0-12.0 (pH 1 간격)으로 조정하였고, agar (15 g/L)를 첨가하여 agar배지로 제조한 후, 분리 균주를 각 agar배지에 접종하여 생육을 관찰하였다.

다양한 범위의 NaCl에서의 성장을 확인하기 위해 0-10% (1% 간격) NaCl로 각각의 agar 배지인 TSA, R2A, MRSA, YMA 에 첨가하여 배지를 제조하였고, 원다리 분리균주를 각 agar 배지에 접종하여 생육을 관찰하였다.

2. 2. 5. 장 부착 능 시험

미생물은 위와 소장을 지나 대장에 도달하였을 때 체외로 배출되지 않고 부착되어 있는 상태로 존재해야 프로바이오틱스로의 기능을 수행할 수 있다. 따라서 미생물이 프로바이오틱스로 사용되기 위한 충족 조건 중 하나는 장 부착능이다. 본 실험에서는 Musin을 이용한 장내 부착능을 실험은 Bengoa 등(2018)의 방법을 변형하여 실시하였다[9]. musin을 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, pH 7.2; Gibco, Grand Island, NY, USA)에 용해시켜 3 mg/mL 농도로 제조한 다음 96-well plate (Corning Inc., Corning, NY, USA)에 100 μ L씩 분주하여 4°C에서 overnight incubation하였다. 96-well Plate바닥에 부착됨을 확인한 후 DPBS 200 μ L씩 2회에 걸쳐 세척하였다. 균주 현탁액의 농도는 OD=0.5(6-8 log CFU/mL)로 맞추어 각 96-well에 100 μ L씩 균주 현탁액을 분주 한 후, mucin과 잘 결합할 수 있도록 2시간 동안 37°C에서 incubation 하였다. 다음 DPBS 100 μ L로 6회에 걸쳐서 세척한 뒤 0.05% Triton X-100 으로 200 μ L로 처리하여 37°C에서 30분 동안 mucin에 부착된 균주를 탈착시킨 후 현탁액을 회수하였다. 마지막으로 회수한 현탁액을 DPBS로 연속 희석한 후 MRS Agar 배지에 도말한 후 18시간동안 37°C에서 배양한 후 생균수를 측정하였다. 장 부착의 결과는 Musin 처리 전 측정된 생균수(log CFU/mL)와 musin 처리 후 회수된 생균수(log CFU/mL)의 차이로 Musin에 부착이 얼마나 되었는지 판단하였으며 이를 백분율로 환산하여 그래프로 나타냈다.

2. 2. 6. 그람염색 및 생화학적 특성

후보 균주의 그람염색은 gram-staining kit (BBL, Difco., USA)를 사용하여 실험을 진행하였다. 분리균주에서 한 개의 colony를 slide glass에 옮겨 도포하여 열 고정시킨 후, crystal violet용액으로 1분간 염색 한 뒤 증류수로 세척하였다. 다음 Iodine 용액으로 다시 1분간 반응시킨 뒤 95% Ethanol용액으로 20초간 탈색 하였고, Safranin O용액으로 1분 동안 대조 염색을 한 후 세척하여 광학현미경을 통하여 세포의 형태학적 특성 및 그람 염색성을 관찰하였다.

Catalase activity tests는 분리된 균주를 slide glass에 옮겨 3% (w/v) hydrogen peroxide(H₂O₂)가 함유되어 있는 Catalase agent (BioMérieux., France)를 2-3 방울 떨어뜨려 기포 생성 유무를 확인하여 산소발생 유무를 관찰하였다. 기포가 발생하면 양성으로 판정하였고, 기포가 발생하지 않으면 음성으로 판정하였다.

Oxidase activity test는 균주가 배양된 plate안에서 Oxidase reagent (BioMérieux., France)를 2-3 방울 떨어뜨려 보라색으로 발색 유무를 확인하였다. 색변화는 1분 안에 관찰하였으며 보라색을 띄면 양성으로 판정하였다.

2. 2. 7. API kit zym

미생물의 경우 각각 고유의 유해 효소 및 유용 효소에 대한 억제와 생성에 대한 특성이 일반적으로 상이하게 나타난다. 따라서 칸다리 분리균주의 효소활성을 검사하기 위하여 총 19종의 각종 효소의 기질 이용성을 기초로 제작된 API kit zym Strip을 사용하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

먼저 API zym은 Suspension medium (2ml)에 균주를 풀어 5-6 McFaland로 탁도를 맞춰 검체를 준비하고, 준비된 각 API zym Strip 각각의 Cupule 부분에 65 μ l씩 접종한다. 접종 후 밝은 빛에 최대한 노출시키지 않고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양한다. 배양 후, 표현 활성 증가와 용해를 도와주는 ZYM A와 ZYM B 시약을 각각 Cupule 부분에 한 방울씩 떨어트린 후, 5분 동안 실온에서 반응 시킨 후 색의 변화를 관찰하여 효소활성 정도를 측정하여 기록하였다.

효소활성은 표준 색상 표를 비교하여 0-5의 수치로 표시하였다. 0은 음성반응(-), 5는 최대 강도의 반응이며, 1,2,3,4,는 중간반응 값으로 3 이상이면 양성반응(+)으로 1,2는 약한 양성(W)로 판정하였다.

2. 2. 8 API kit 50 CHB

API kit zym Strip과 함께 분리균주의 효소활성, carbohydrates의 산화, 발효 등 탄수화물 대사를 검사하기 위해 API kit 50 CHB Strip을 사용하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

API kit 50CHB Strip은 49가지 탄수화물의 발효여부를 연구하는데 사용됨으로 50CH 배지에 pH indicator가 들어 있어 색의 변화로 탄수화물의 발효여부결과를 관측할 수 있다.

API 50 CHB는 Suspension medium (2ml)에 일회용 백금이를 이용하여 colony를 채취해 heavy suspension을 만들어 준 후, Suspension medium (5ml)에 위의 접종액을 넣어 탁도를 2 McFcland로 맞추어 준다. 그 후 API 50 CHB/E medium 10ml에 진한 균 현탁액을 넣어 2 McFcland로 탁도를 맞추어 실험에 사용하였다. 현탁액은 튜브에 접종하였다.

그 후, 37℃에서 48시간동안 배양하였으며, 24-48시간 간격으로 색의 변화를 관찰 후 기록하였다.

2. 2. 9 항생제 시험(Antibiotic test)

프로바이오틱스 후보 균주로 선정된 *Bacillus siamensis* Y19^T의 항생제 감수성과 저항성을 평가하기 위해 디스크 확산법 (disc diffusion method)를 이용하여 Ampicillin, Lincomycin, Streptomycin, Tetracycline, Gentamicin, Kanamycin, Oxytetracycline, Penicillin에 실험을 진행하였다(Table 20). MRS broth 배지에서 배양된 *Bacillus siamensis* Y19^T 균주를 2 McFcland 0.4의 농도를 맞추어 멸균된 면봉을 사용하여 MHA (Mueller-Hinton agar) 배지에 전체 도말한 후, 각 항생제 disc (BD BBL, USA)를 올려놓은 후 37℃ 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 disc 주변에 형성된 생육 저해환 (clear zone)의 크기 (mm)를 측정하여 분리균주의 항생제에 대한 감수성과 저항성 유무를 확인하였다.

Table. 20. List of antibiotics used of antibiotic test.

Antibiotic	Concentration
Ampicillin	10 µg
Lincomycin	2 µg
Streptomycin	10 µg
Tetracycline	30 µg
Gentamicin	10 µg
Kanamycin	30 µg
Oxytetracycline	30 µg
Penicillin	10 IU

2. 3. 결과 및 고찰

2. 3. 1. 용혈성 및 유해요소분해효소 생성여부 시험

선다리에서 분리된 균주 121균주 중 넓은 항균활성을 나타낸 15균주를 대상으로 용혈성과 유해요소 분해효소 생성 여부를 확인하였다. 미생물이 probiotics로 활용되기 위해서는 필요 충족조건 중 하나는 안전성이다. 특히 면역시스템에 대한 병원성과 내성, 돌연변이 유발 발암성이 없어야 하며 인체 또는 숙주가 섭취하였을 시 건강상에 문제가 없어야 한다[97]. 때문에 여러 안정성 평가 중에서도 독소생성 및 용혈 가능성의 여부는 프로바이오틱스 활용균주로의 선택과정에서 가장 중요한 요건이 된다.

용혈이란 적혈구의 막 파괴 현상 또는 적혈구 막 표면 물질에 변화를 주어 내부 물질 유출, 분해시키는 작용으로 미생물에 의해 만들어지는 독성물질을 말한다. 세포내에서 용혈현상이 나타나면 산소운반이 제대로 작동하지 않아 생체의 치명적인 문제가 될 수 있다. 병원성 미생물에 종종 나타나는데 알파 용혈(α -hemolysis)은 적혈구의 불완전한 용해를 일으켜 세균 집락 주변에 녹색의 불투명한 환이 생성되고, 베타용혈(β -hemolysis)은 적혈구의 완전한 용해를 일으켜 세균 집락 주변에 황색 투명 환을 생성한다. 이 두 가지 용혈은 독성과 병원성을 가지고 있다고 판단할 수 있다. 감마용혈(γ -hemolysis)은 용혈활성이 없어 세균 집락 주변에 환이 생성되지 않는 것으로 확인할 수 있으며 독성과 병원성이 없어 안전하다고 판단된다. 집락 주변 황색 투명환 생성을 보고 판단하였고, 집락 주변 환이 생성되지 않은 것은 감마용혈(γ -hemolysis)로 판단하였다[103]. hemolysin을 유리하여 적혈구를 용해 또는 변색 시키는 용혈성을 파악한 결과 15균주 중 3균주가 β -hemolysis 3균주가 α -hemolysis 8균주가 γ -hemolysis을 생성하는 것으로 확인되었다.

유해 대사산물과 유해 효소생성 실험에서는 프로바이오틱스 후보균주가 tryptophanase에 의해서 tryptophane을 분해하여 생성되는 유해대사 산물이자

발암 관련 물질인 indol 및 phenylpyruvic acid를 생성여부를 확인하였다. 또한 유해효소이자 발암 관련 효소인 urease를 생성여부를 확인하였다. 그 결과 Table. 21와 같이 나타났다. 본 실험결과 γ -hemolysis 용혈을 가지는 9균주가 독성이 없고 인체 또는 숙주에 무해한 것으로 프로바이오틱스 균주로서 사용하였을 시 안정성이 있을 것으로 여겨진다. 따라서 9균주를 가지고 추가적으로 고분자 유기물질 분해실험과 내열, 내산성 등 실험을 진행하여 프로바이오틱스 후보 균주를 선별하였다.

Table. 21. Comparison of hemolytic and harmful enzyme activities, and harmful substances productivities of selected strains

Isolate	Hemolysis	Indole	Phenylpyruvic acid	Urea
M28	γ	-	-	-
R2	α	+	+	+
R5	γ	-	-	-
R7	α	+	-	+
R8	β	-	-	+
R10	γ	-	-	-
R15	α	-	+	-
T16	γ	-	-	-
T19	γ	-	-	-
T21	γ	-	-	-
T25	γ	-	-	-
T40	β	-	+	+
Y8	γ	-	-	-
Y16	β	-	+	+
Y19	γ	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>				
ATCC 10798	β	+	+	+

2. 3. 2. 고분자 유기물질 분해여부 시험

원다리로부터 분리한 균주를 대상으로 프로바이오틱스 활성을 갖는 우수 균주를 선별하기 위하여 고분자 유기물질 분해능 실험을 진행하였고 결과는 다음과 같이 Table. 22에 나타냈다. 고분자 유기물질 분해능에 관련된 DNase, cellulase, amylase, protease, lipase 효소 활성이 있는지 알아보기 위해 균주별 적합한 agar배지에 Starch, casein, DNA, cellulose, Tween 20, 40, 60, 80을 첨가 하였다. 그 후 항균활성을 띤 후보균주를 접종하여 후보 균주들의 고분자 유기물질 분해능을 조사하였다.

9균주 중 Casein가수 분해능은 7균주에서 양성으로 나타났고, DNase활성은 8균주에서 lipase활성은 7균주에서 나타났다. 또한, cellulase활성은 6균주에서 나타났고 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80이 포함된 각각의 배지에서는 6균주만이 분자량이 다른 tween을 모두 분해하는 것으로 나타났다. 실험결과 DNase, cellulase, amylase, protease, lipase모두를 분해하는 활성을 나타낸 균주는 M28, R5, R10, T19, Y8, Y19 총 6가지 균주로 대부분의 균주는 Bacillus species로 확인되었다.

Bacillus species은 이미 많은 연구를 통해 cellulase, amylase, protease와 같은 유용한 효소들을 생산하는 균주로 생물 산업의 다양한 분야에서 연구 및 사용되어지고 있다고 알려져 있다[24, 5, 16, 112, 111, 70]. 또한, Bacillus species미생물이 생산하는 효소가 첨가된 사료를 섭취할 경우 숙주의 소화활동에 도움을 주어 소화 장애 감소, 질병 저항성의 증진, 사료효율 증가, 전분과 섬유질 등 유기물의 분해력증가와 같은 효능이 있는 것으로 알려져 있다[126, 140, 4].

Table. 22. Comparison of hemolytic and harmful enzyme activities, and harmful substances productivities of selected strains

Isolate	Starch	Casein	Dnase	Cellulose	Tween			
					20	40	60	80
M28	+	+	+	+	+	+	+	+
R5	+	+	+	+	+	+	+	+
R10	+	+	+	+	+	+	+	+
T16	+	-	+	-	-	-	+	+
T19	+	+	+	+	+	+	+	+
T21	-	+	+	-	-	-	-	+
T25	-	+	-	-	-	-	-	+
Y8	+	+	+	+	+	+	+	+
Y19	+	+	+	+	+	+	+	+

2. 3. 3. 인공 위액 및 인공 담즙에서의 내성 시험

신다리로부터 분리한 균주 중 항균활성이 뛰어나며 용혈성을 띄지 않고 고분자 유기물 분해능이 탁월한 M28, R5, R10, T19, Y8, Y19 6가지 균주들을 대상으로 프로바이오틱스 활성을 갖는 우수 균주를 선별하기 위하여 인공위액 및 인공 담즙에서의 저항성을 확인하였다.

균주가 probiotics로서 기능을 발휘하기 위해서는 구강을 통해 섭취 후 위액과 다양한 효소가 존재하는 위를 통과하여 담즙이 있는 십이지장을 지나 최종적으로 장까지 도달해서 살아남아야 한다[13]. 이 때 위는 낮은 pH인 위산을 분비하며 음식을 또는 먹이의 섭취에 따라 pH가 2에서 8까지 큰 가변성을 가지고 있어 위를 지나가는 미생물 대부분은 본래 가지고 있던 활성이 저하되거나 사멸된다[44, 22]. 또한 장까지 도달한 미생물은 담즙에 대한 기본적인 저항성을 가지고 있어야 하며 장내 담즙 농도(0.3%)보다 고농도의 oxgall이 함유된 배지에서 생육할 수 있어야만 장내에서 생존하고 증식할 수 있다고 알려져 있다[85, 102]. 따라서 담즙과 강한 위산 환경에서 생존이 가능해야하기 때문에 미생물이 프로바이오틱스로서 활용되기 위해 갖춰야할 조건 중 하나는 내산성 담즙에 대한 내성이다. 음식을 섭취할 경우 pH 3.0 이상으로 중화되는 것과 평소 위산의 강한 산성조건을 고려하여 Bile salt (%) 2%와 3%로 인공위액을 제조하였고 0.5%, 1%, 2% 3%의 pepsin을 첨가하여 인공 담즙 조건에서의 내성을 측정하였다. 대조군으로 아무처리하지 않은 pH 7.0 조건에서의 생균수를 측정 후 백분율로 나타내었다.

본 연구에서 선별된 균주의 산성 및 담즙에서의 내성을 측정한 결과는 Fig 3, Fig 4 와 같다. 대부분의 후보균주에서 인공 담즙에서의 내성은 뛰어난 것으로 나타났다. 그 중에서도 M28, T19, Y19가 모든 농도의 인공 담즙에서 40% 이상의 생육을 보이며 뛰어난 내성을 가진 것으로 나타났다. 인공위액에서의 내성을 측정할 결과 R10, T19, Y19가 2%의 강한 인공 위액 조건에서도 다른 균주에 비해 높은 내성을 가지는 것으로 나타났다. 인공 위액과 담즙에서 모두 뛰어난 저항성을 보인 Y19로 나타났다. 위액과 담즙에서의 높은 저항성을 나타내는 균

주는 EPS의 생성으로 인한 균체의 보호막 작용에 관한 결과이며, 이런 EPS를 생성하는 균주들은 우수한 probiotics로 활용될 수 것으로 판단된다. 본 연구에서 분리된 선택균주 역시 우수한 담즙과 위액에서의 내성을 나타내어 프로바이오틱스 생균제로서 활용될 수 있다고 판단된다.

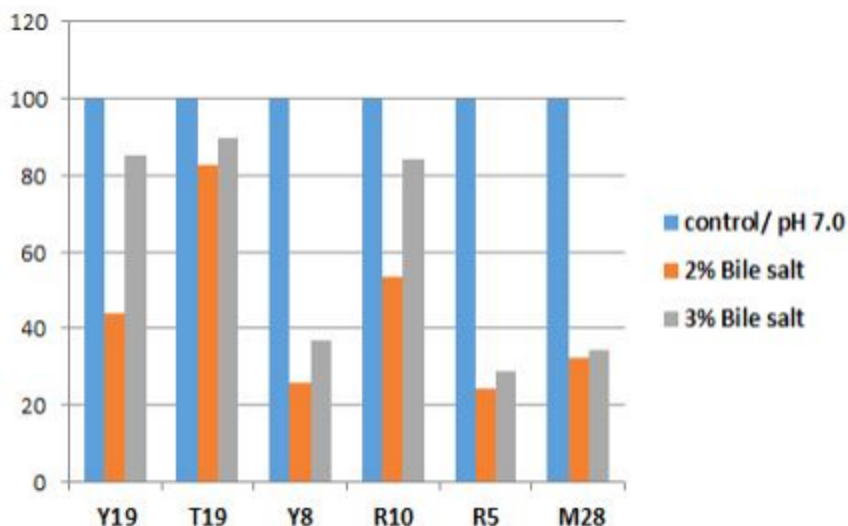


Fig. 3. Resistance of selected strains to artificial bile acid.

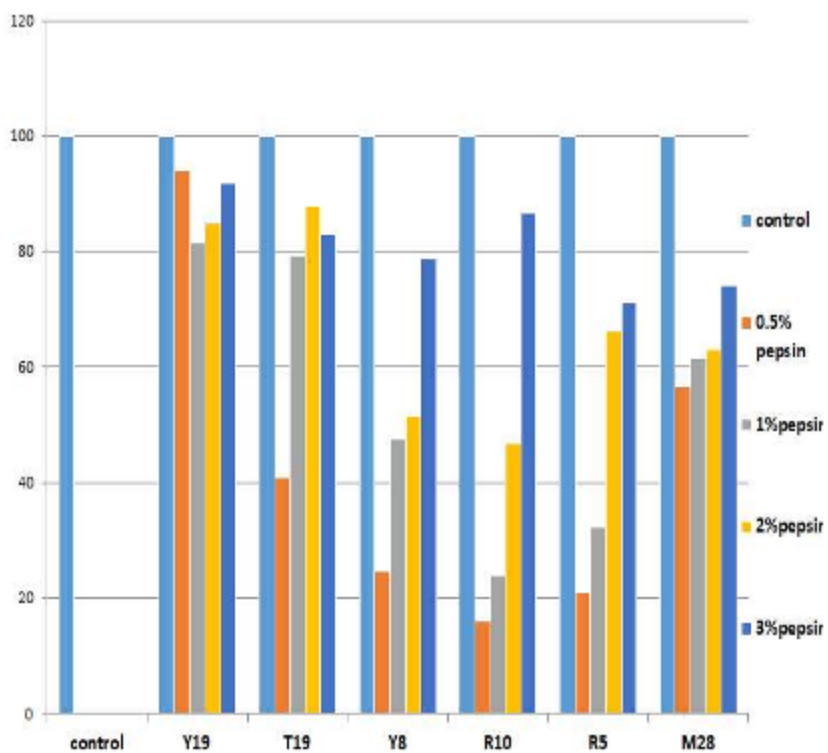


Fig. 4. Resistance of selected strains to gastric juice.

2. 3. 4. 온도, pH, NaCl에서의 생육 시험

항균활성을 확인한 선다리 균주의 생장특성을 확인하기 위하여 후보균주에 맞는 각 배지에 pH 3.0-12.0 (pH 1 간격)으로 조정하고, 0-10% (1% 간격) NaCl를 첨가하여 균주를 도말한 후 각각 25℃와 37℃의 온도에서 48시간 동안 배양하면서 생육을 관찰하였다. 또한 생장 온도 범위를 확인하기 위하여 5-45℃ (5℃ 간격)에서 생육을 관찰하였다. 배양생육온도, pH, NaCl의 결과는 다음과 같이 나타났다(Table. 23 - Table. 25).

선별균주 M28, R5, R10, T19, Y8, Y19 중 대부분이 5℃에서 자라지 않았다. 20-35℃에서 모든 선별 균주는 잘 자랐으며 따라서 최적온도는 20-35℃임을 알 수 있었다. Y19와 M28균주는 5-45℃의 넓은 온도의 조건에서 모든 생육을 하였다.

위산의 낮은 pH 환경에서도 생존이 가능해야 프로바이오틱스로의 효과를 나타낼 수 있기 때문에 낮은 pH 조건에서도 생장이 가능해야 한다. 따라서 음식물 섭취 후 위산의 가변성에 맞춰 pH3부터 pH12까지의 조건에서 실험을 진행하였다. Table. 24와 같이 R10, T19, Y19 균주는 낮은 산성조건인 pH3의 환경에서도 생장이 가능했다. 그 외 모든 선별균주는 pH 6에서 pH 9 사이에서 생장이 가능한 것으로 나타났다. 따라서 선별균주들의 적정 pH조건은 pH 6.0-9.0임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 적절한 농도의 NaCl은 선별균주의 성장에 있어서 이로운 역할을 수행하였다. 이는 NaCl의 구성이온인 Na⁺와 Cl⁻은 미생물의 성장에서 촉매제 역할 한다는 연구 결과와 유사한 것으로 확인할 수 있었다[80]. 0% 농도의 NaCl 첨가 배지에서 6% 농도의 NaCl 환경까지 대부분의 선별균주는 생장이 가능함을 확인 할 수 있었고, 대부분의 균주는 NaCl의 농도가 7%가 넘어가는 조건에서는 낮은 생장을 띄거나 생장할 수 없음을 확인하였다.

이러한 pH와 NaCl 조건에서의 이전 연구 결과에 따르면 *Bacillus species*은 0~5% 농도의 NaCl 조건에서 생육이 가능하고 7% 이상의 NaCl 농도에서는 균의 증식이 어려운 것으로 나타나 최적 NaCl의 농도는 2~3%로 보고되었다.

또한, *Bacillus species*의 최적 pH는 7.0~7.5로 측정되었고, pH 5.0 이하와 pH 9.0 이상에서는 생육이 급격히 저하된다고 보고되어있다[20]. 이는 본 실험 결과와 유사한 결과를 나타내었으며 본 실험에서 사용된 헨다리 분리균주는 이전 연구결과 보다 낮은 pH 조건에서 높은 생존율을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구결과의 분리균주는 폭 넓은 배양 온도의 조건 및 내산성과 내염기성에 내성이 우수한 것으로 확인 할 수 있었다.

Table. 23. Temperature range for growth of selected strains.

Isolate	Temperature (°C)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Y19	w	+	+	+	+	+	+	+	+
T19	-	w	+	+	+	+	+	+	w
Y8	-	w	w	+	+	+	+	w	-
R10	-	-	w	+	+	+	+	-	-
R5	-	w	+	+	+	+	+	+	w
M28	w	+	+	+	+	+	+	+	+

Table. 24. pH range for growth of selected strains.

Isolate	pH									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Y19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
T19	+	+	+	+	+	+	+	w	-	-
Y8	-	w	w	+	+	+	+	w	w	w
R10	+	+	+	+	+	+	+	w	w	-
R5	-	w	w	+	+	+	w	-	-	-
M28	-	w	w	+	+	+	+	-	-	-

Table. 25. NaCl range for growth of selected strains.

Isolate	NaCl (%)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y19	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w
T19	+	+	+	w	w	-	-	-	-	-	-
Y8	+	+	+	+	+	+	+	w	w	-	-
R10	+	+	+	+	+	w	w	w	-	-	-
R5	+	+	+	+	+	+	w	w	w	-	-
M28	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w

2. 3. 5. 장 부착 능 시험

미생물이 프로바이오틱스로 작용하기 위해서는 위와 소장을 거쳐 대장에 도달하였을 때 체외로 배출되지 않고 부착된 상태로 존재하여야 한다. 따라서 프로바이오틱스 균주로 선별하기 위해서는 장 부착 능력을 평가하는 것이 필요하다. 장 부착능이 우수한 후보 균주를 선별하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. mucin에 결합 전 생균수와 결합 후 회수된 생균수의 차이를 백분율로 환산하여 그래프로 나타내었다. 본 연구에서 분리 선발된 균주의 mucin 결합력은 23.6-88.2% 로 확인 되었으며 그 중에서도 Y19, Y8, M28 세 균주가 70% 이상의 높은 부착 능을 보였다. 특히 Y19 균주는 88%의 높은 결합을 보였으며 인공 위액, 장액 및 내산성 등의 조건에서 프로바이오틱스 조건에 가장 뛰어나게 적합 하는 것으로 확인 되었다.

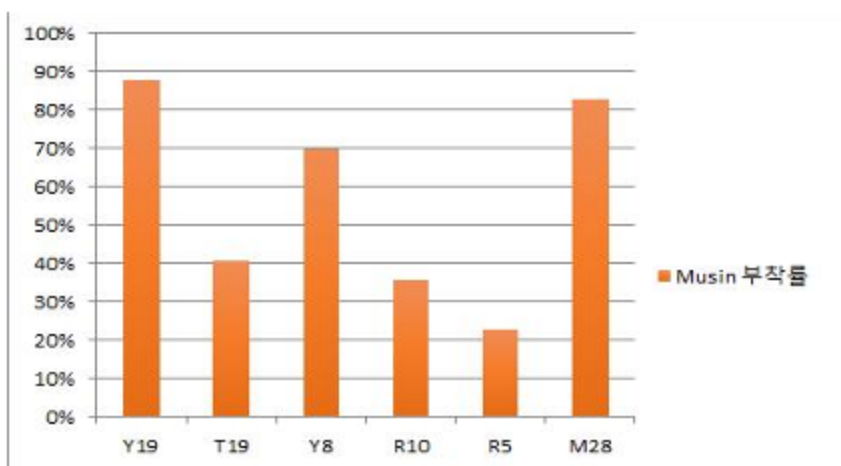


Fig. 5. Attachment of the strains to the mucin surface.

2. 3. 6. Probiotics 선정

인체 및 어류 질병에서의 항균력, 용혈능, 고분자 유기물질 분해능, 인공위역 및 인공 담즙액에서의 저항성, 온도, pH, NaCl에서의 성장, 장 부착능을 토대로 *Bacillus siamensis* Y19^T를 probiotics 후보 균주로 선정하였다. 이후 후보균주의 그람염색 및 생화학적 특성, 항생제 내성, 탄수화물 분해능과 효소활성을 알아보았다.

2. 3. 7. 그람염색 및 생화학적 특성

Probiotics 후보 균주로 선정된 *Bacillus siamensis* Y19^T 37℃에서 YM, MRS, TSA에서 모두 자랐으며 크림색의 점성을 가진 콜로니로 다발성 집락을 형성하는 특성을 보여주었다.

또한, 그람염색 결과 양성균의 막대모양의 간균으로 나타났으며, Catalase activity tests의 결과 양성, oxidase activity test의 결과 양성으로 나타났다. 이는 이전연구에서의 *Bacillus siamensis*의 형태 생화학적 결과와 비슷하지만 oxidase activity test에서 차이가 있음을 확인할 수 있었다[122].

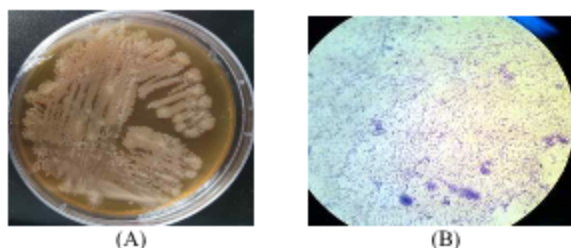


Fig. 6. (A) Colony morphology (B) Scanning Gram staining of strain Y19^T.

2. 3. 8. API kit zym

미생물의 효소 활성 또한 프로바이오틱스로 사용되기 위해 확인되어야 하는 주요한 요소 중 하나이다. 선다리 분리 균주의 효소 활성측정 결과는 Table. 26에 나타내었다. 실험 결과 Alkaline phosphatase에 약한 효소활성을 나타냈고, Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase, β -glucosidase, Esterase(C4), Esterase Lipase(C8)에서 강한 효소활성을 나타내었다. β -glucosidase효소는 lactose를 glucose와 galactose로 분해시키는 활성을 가지는데 이는 유당을 분해하여 소화흡수율을 높여주는 이점을 가지고 있다[72]. 본 연구에서 사용된 Probiotics 후보 균주 또한 β -glucosidase에 강한 활성을 가지는 것으로 보아 소화흡수에 강점을 가지고 있을 것으로 판단된다.

또한, 한 미생물이 Probiotics균주로서 안정성을 가지기 위해서는 β -glucuronidase를 생성하지 않아야 한다. β -glucuronidase는 발암효소로서 벤조피렌을 발암물질로 전환하는 효소를 말한다[12]. 본 실험에서 선별된 균주는 발암효소인 β -glucuronidase에 대한 활성을 지니지 않았다. 따라서 발암에 대한 안정성이 있다고 판단되며 앞서 실험한 용혈성 및 유해효소분해 실험과 비교하여 확인해 보았을 시 인체 및 숙주에 향후 안전한 종균으로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table. 26. Results of the API zym tests applied on *Bacillus siamensis* Y19^T

Enzyme	Reactivity
Alkaline phosphatase	W
Esterase(C4)	+
Esterase Lipase(C8)	+
Lipase(C14)	-
Leucine arylamidase	-
Valine arylamidase	-
Crystine arylamidase	-
Trypsin	-
α -chymotrypsin	-
Acid phosphatase	-
Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	+
α -galactosidase	-
β -galactosidase	-
β -glucuronidase	-
α -glucosidase	+
β -glucosidase	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-
α -mannosidase	-
α -fucosidase	-

2. 3. 9. API kit 50 CHB

49개 탄수화물에 대한 당 이용성을 조사한 결과 선다리에서 분리된 균주는 단당인 L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, mannose와 당알콜인 mannitol, sorbitol, 다당류인 α -Methyl-D-mannoside, 배당체인 N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, bitol, 당산화물인 gluconate를 이용하여 산을 생성하는 특성을 조사하여 Table. 27 에 결과를 표기하였다. 이는 이전에 보고된 *Bacillus siamensis*의 연구결과와 유사한 결과로 나타났다[122].

Table. 27. Carbohydrates utilization of *Bacillus siamensis* Y19^T

Substrate	Reactivity	Substrate	Reactivity
Glycerol	+	Esculin	w
Erythritol	-	Salicin	+
D-Arabinose	-	Celliobiose	+
L-Arabinose	+	Maltose	+
Ribose	+	Lactose	+
D-Xylose	+	Melibiose	w
L-Xylose	-	Sucrose	+
Adonitol	-	Trehalose	-
β -Methyl-xyloside	-	Inulin	-
Galactose	-	Melezitose	-
D-glucose	+	D-Raffinose	+
D-Fructose	+	starch	+
D-Mannose	-	Glycogen	+
L-Sorbose	-	Xylitol	-
Rhamnose	-	β -Gentiobiose	+
Dulcitol	-	D-Turanose	-
Inositol	+	D-Lyxose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamin	-	Gluconate	w
Amygdalin	+	2-keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-gluconate	-

2. 3. 10. 항생제 시험(Antibiotic test)

프로바이오틱스로 최종 선별된 *Bacillus siamensis* Y19^T 균주에 대해 8종의 항생제에 관하여 항생제 감수성과 저항성을 평가하였다. *Bacillus siamensis* Y19^T 는 Lincomycin (2 µg)을 제외한 Ampicillin (10 µg), Streptomycin (10 µg), Tetracycline (30 µg), Gentamicin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Oxytetracycline (30 µg), Penicillin (10 IU) 항생제에서 10mm 이상의 생육 저해 환을 나타낸 것으로 확인 되었으므로 이들 항생제에 대해서 감수성이 있다고 판단했다. 그러나 Lincomycin (2 µg)에는 내성을 가지는 것으로 나타났다.

Table. 28. Antibiotics susceptibility of *Bacillus siamensis* Y19^T

Antibiotic	Susceptibility (mm)
Ampicillin (10 µg)	+ (25mm)
Lincomycin (2 µg)	-
Streptomycin (10 µg)	+ (26mm)
Tetracycline (30 µg)	+ (23mm)
Gentamicin (10 µg)	+ (17mm)
Kanamycin (30 µg)	+ (13mm)
Oxytetracycline (30 µg)	+ (31mm)
Penicillin (10 IU)	+ (34mm)

2. 4. 2장 최종고찰

현재 전 세계적으로 수산양식 산업의 기술은 나날이 발전하고 있는 추세이며, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)에 통계에 따르면 2016년에는 세계 어업생산량이 약 1억 7,100톤 중에서 양식 어업의 생산량은 1억 1천만 톤으로 세계 어업생산량의 64.4%를 차지한 것으로 보고되었다 [31, 100].

그러나 빠르게 발전하는 육상 양식 산업에서는 생산량을 증가시키기 위하여 과도한 고밀도 사육과 사료공급 구분별한 항생제 사용으로 인하여 다양한 질병 발생의 원인을 일으키고 있으며, 이로 인하여 양식 산업에서의 생산량 감소와 양식생물들의 폐사로 인한 막대한 경제적인 손실까지 이어지게 된다[88, 91]. 또한, 양식생물 내 항생제 축적 및 내성균주의 출현으로 인한 수산생물의 안정성 문제와 연안으로 노출되는 항생제로 인한 생태계파괴 등 다양한 2차적인 문제들이 야기되고 있는 실정이다[14, 15, 109]. 이러한 문제를 해결하기 위해 연구진들은 항생제를 대체할 수 있는 천연물질 등에 관심이 높아졌으며 실제로 다양한 식품, 생태계 등에서 분리한 천연 항생물질로부터 항생제 대체 사용 및 사료 첨가 등에 관한 연구가 진행되고 있다[128, 139, 45, 46, 49].

일반적으로 probiotics란 적절한 양으로 투여 및 섭취될 시 숙주의 장내 미생물 군의 조절을 통해 면역반응을 개선시켜 질병저항성 및 소화력을 향상시킴으로서 실질적인 건강상의 이점을 제공하는 살아있는 미생물의 단독 또는 복합균주를 말한다[105]. 프로바이오틱스로서 미생물이 이용되기 위해서는 세계보건기구(WHO)와 국제식량농업기구(FAO)에 명시된 기준에 따라 유해물질을 생산할 가능성이 낮아야하며 비 병원성으로 독성이 없어 섭취 시 안정성을 갖추어야 한다. 또한, 기본적으로 유해세균을 저해 할 수 있는 항균물질을 생산해야하며 강한 위산 환경과 장내 환경에서 견디 장에 도달하여 부착하여 증식할 수 있어야만 프로바이오틱스로서의 효능을 수행할 수 있다고 알려져 있다[34, 114].

따라서 이전 연구에서는 제주도의 삼의 지혜를 반영한 전통발효식품인 선다리를 이용하여 세균균집을 조사하여 항균활성을 조사하였고, 본 연구에서는 항균활

성이 뛰어난 균주를 대상으로 probiotics로 사용 가능성을 알아보기 위하여 probiotics로서의 조건인 유해대사산물 및 유해효소생성여부, 인공위액과 담즙에서의 저항성, 장 부착능 등을 통해 probiotics 후보균주를 선별하였다. 그 후 후보 균주의 생태학적, 효소활성 및 항생제 실험을 연구하여 제주 전통 발효식품인 선다리 항생제 대체물질로서의 사용 가능성을 알아보려고 하였다.

선다리에서 분리된 균주 121균주 중 폭 넓은 항균활성을 보인 15균주를 대상으로 용혈성과 유해효소생성 여부를 조사한 결과, 15균주 중 3균주가 β -hemolysis 3균주가 α -hemolysis 8균주가 γ -hemolysis을 생성하는 것으로 확인되었다. 용혈이란 적혈구의 막 파괴 현상으로 인하여 만들어지는 독성물질을 이야기 한다. α -hemolysis, β -hemolysis과 다르게 γ -hemolysis은 세균 집락 주변에 환 생성이 되지 않는 것으로 독성과 병원성이 없어 안전하다고 판단된다. 유해대사산물과 유해효소생성 실험에서는 유해대사 산물이자 발암 관련 물질인 indol 및 phenylpyruvic acid와 유해효소이자 발암 관련 효소인 urease를 생성 여부를 확인하였다. 그 결과 γ -hemolysis 용혈을 가지는 9균주에서 모두 발암관련 효소와 물질이 생성되지 않는 것을 확인하여 probiotics 후보 균주로 사용할 시 인체 및 숙주에 무해한 것으로 판단되었다. 따라서 9균주를 가지고 추가적으로 고분자 유기물질 분해실험과 내열, 내산성 등 실험을 진행하여 probiotics 후보 균주를 선별하였다. 균주별 Agar배지에 Starch, casein, DNA, cellulose, Tween 20, 40, 60, 80을 첨가 하여 고분자 유기물질 분해능에 관련된 DNase, cellulase, amylase, protease, lipase효소 활성을 알아보았다. 그 결과 9균주 중 Casein가수 분해능은 7균주에서 양성으로 나타났고, DNase활성은 8 균주에서 lipase활성은 7균주에서 나타났고, 또한, cellulase활성은 6균주에서 나타났고 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80이 포함된 각각의 배지에서는 6균주만이 분자량이 다른 tween을 모두 분해하는 것으로 나타났다. 실험에서 활성을 나타낸 대부분의 균주는 Bacillus species로 확인되었으며, Bacillus species은 이미 많은 연구를 통해 cellulase, amylase, protease와 같은 유용한 효소들을 생산하는 균주로 다양한 분야에서 사용되고 있다[24, 5, 16, 112, 111, 70]. 또한 Bacillus species 미생물이 생산하는 효소가 첨가된 사료를 섭취할 경우 소화 장애 감소, 질병 저항성의 증진, 사료효율 증가 등의 효능이 있

는 것으로 알려져 있다[126, 140, 4].

항균활성이 뛰어나며 용혈성을 띄지 않아 안전성의 조건에 적합하며 고분자 유기물 분해능이 뛰어난 M28, R5, R10, T19, Y8, Y19 6가지 균주들을 대상으로 인공위액, 인공담즙에서의 저항성 및 생육온도, 내산성, NaCl에서의 생육을 확인하였다. 그 결과 6균주 대부분이 인공 담즙에서의 내성은 뛰어났으며, 그 중에서도 M28, Y19이 가장 뛰어난 내성을 가진 것을 확인할 수 있었다. 인공위액에서의 내성을 측정한 결과 R10, T19, Y19가 가장 뛰어났으며 이 세 균주는 내산성 실험결과 똑같이 높은 결과가 나타남을 확인하였다. 모든 선별 균주의 최적 온도는 20-35℃임을 알 수 있었다. 또한, 0% 농도의 NaCl 첨가 배지에서 6% 농도의 NaCl 환경까지 대부분의 선별균주는 생장이 가능하였으며 7%의 NaCl의 농도가 넘어가는 조건에서는 낮은 생장을 띄거나 생장할 수 없음을 확인하였다. 이전 연구 결과에 따르면 *Bacillus species*은 0-5% 농도의 NaCl 조건에서 생육이 가능하고 7% 이상의 NaCl 농도에서는 균의 증식이 어려우며 최적 pH는 7.0-7.5로, pH 5.0 이하와 pH 9.0 이상에서는 생육이 급격히 저하된다고 보고되어 있다 [20]. 이는 본 실험결과와 유사한 결과를 보였으며 싼다리 분리균주는 이러한 연구 결과에서 보다 낮은 pH 조건에서 높은 생육하는 것을 확인 하였다. 따라서 본 연구결과와 분리균주는 폭 넓은 배양 온도의 조건 및 내산성과 내염기성에 내성이 우수한 것으로 확인되었다. musin을 이용한 장 부착 실험 결과 3균주에서 70% 이상의 부착함을 보여주었고, Y19의 경우 88%로 높은 부착 능력을 보였다. 위 연구 결과를 토대로 probiotics 기준에 적합한 *Bacillus siamensis* Y19^T를 probiotics 후보 균주로 선정하였다. 이 후 후보 균주의 그람 염색 및 생화학적 특성, 항생제내성, 탄수화물 분해능과 효소 활성을 알아보았다.

Probiotics 후보 균주로 선정된 *Bacillus siamensis* Y19^T는 그람염색 결과 양성으로 나타났으며, catalase activity, oxidase activity 실험 결과 모두 양성을 나타냈다. 또한 선정된 균주는 크림색의 점성을 가진 콜로니로 다발성 집락을 형성하는 특성을 보여주었다. *Bacillus siamensis* Y19^T의 효소활성과 탄수화물 분해능을 알아보기 위해 API kit zym 과 API kit 50 CHB를 진행한 결과 β -glucosidase, Esterase(C4), Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase, Esterase

Lipase(C8) 에서 강한 효소활성을 나타내었고, 발암효소인 β -glucuronidase 에는 활성을 띄지 않았다. 또한 이전에 보고한 *Bacillus siamensis*의 탄수화물 이용 연구결과와 유사한 것으로 나타났다[122]. 항생제 실험에서는 Lincomycin (2 μ g)에 내성을 보였으며 그 외 나머지 항생제에서는 10mm이상의 생육 저해환을 확인하여 감수성이 있는 것으로 나타났다.

따라서, 향후 인체 및 수주에 안전한 종균으로 다양하게 활용이 가능할 것이며 어류병원균에서 뛰어난 항균활성을 보인 것으로 보아 추가적인 어류 실험을 통해 어류의 친환경적인 항생제 대체제로도 이용이 가능할 수 있다고 판단되었다.

Ⅲ. 종합 국문요약

전 세계적으로 늘어나는 수산물 수요에 따른 한정적인 생산량의 문제로 수산 양식 산업의 기술은 빠르게 발전하고 있다. 그러나 부분별한 항생제 사용과 생산량을 늘리기 위한 고밀도 양식 등으로 인하여 직·간접적으로 수산 양식 산업에서 막대한 피해가 증가하고 있다. 이를 해결하기 위하여 최근 천연항생물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중 막걸리에 대한 연구는 많은 연구되어 있으나 막걸리와 비슷한 원료로 제조되는 원다리에 대한 연구는 미비한 실정이다. 원다리는 먹다 남은 보리밥을 활용하여 누룩을 첨가하여 발효시킨 제주 전통 막걸리를 이야기 한다. 이에 따라 본 연구자는 제주 전통 발효식품인 원다리 내의 세균의 균집을 파악하고 항균 활성을 지닌 균들을 확인하였으며, 안정성 및 내산성, 내염기성, 장부착능 등을 실험하여 프로바이오틱스로서의 사용 가능성을 알아 보았다.

본 실험에서 사용된 원다리의 산도는 1.9%, pH는 4.94로 측정되었으며, 원다리에서 분리한 균의 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열을 NCBI와 EZbiocloud를 이용하여 분석한 결과 2문(Phylum) 2강(Class) 3목(Order) 5과(Family) 7속(Genus)으로 총 112 균주로 Firmicutes문 73%와 Proteobacteria문 27%로 Firmicutes문이 우점문인 것으로 나타났다. 또한, *Pediococcus*속, *Bacillus*속이 각각 25%로 가장 우세하였고, 다음으로 *Cronobacter*속 22%, *Enterococcus*속 16%, *Aneurinibacillus*속 5%, *Klebsiella*속 4%, *Paenibacillus*속이 2% 순으로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

원다리 분리 균주의 항균 활성은 2종의 그람양성균 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*와 6종의 그람음성균 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* 및 *Edwardsiella tarda* 등 어류질병 세균과 2종의 그람음성균 *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*와 3종의 그람양성균 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*균을 이용하여 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 어류질병 세균 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*와 인체 유해세균 *S.mutans*를 제외한 모든 균에 대해서 생육지해 환을

형성하는 것을 확인하였다. 어류질병 세균인 *S. parauberis*에서 Y19(*Bacillus siamensis*)가 균체에서 36.8 mm로 가장 큰 생육저해 환을 나타냈다. 그 외에도 T19, T25, T21 가 33.7 mm, 33.6 mm, 32.7 mm 순으로 눈에 띄는 항균활성 능력을 보여주었다.

분리균주 121균주 중 넓은 항균활성을 보인 15균주 중 3균주가 β -hemolysis 3균주가 α -hemolysis 8균주가 γ -hemolysis을 생성하는 것으로 확인되었다. 또한, 유해대사산물과 유해효소생성 실험에서 γ -hemolysis 용혈을 가지는 9균주에서 모두 발암관련 효소와 물질이 생성되지 않는 것을 확인하였다. 9균주 중 Casein가수 분해능은 7균주에서 양성으로 나타났고, DNase활성은 8 균주에서 lipase활성은 7균주에서 나타났다. 또한, cellulase활성은 6균주에서 나타났고 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80이 포함된 각각의 배지에서는 6균주만이 분자량이 다른 tween을 모두 분해하는 것으로 나타났다. 인공담즙에서의 저항성결과 M28, Y19이 가장 뛰어난 내성을 가졌으며 인공위액에서의 내성 결과 R10, T19, Y19가 가장 뛰어난 내성을 확인할 수 있었다. 또한 모든 후보 균주의 최적온도는 20-35℃ 로 0%-6% 농도의 NaCl 환경에서 대부분의 선별균주는 생장이 가능하였다. musin을 이용한 장 부착 실험 결과 가장 높은 균주는 88%로 나타났다. 위 연구 결과를 토대로 *Bacillus siamensis* Y19^T를 probiotics 후보 균주로 선정하였다.

Bacillus siamensis Y19^T는 그람염색 결과 양성으로 나타났으며, catalase activity, oxidase activity 실험 결과 모두 양성을 나타냈다. 발암효소인 β -glucuronidase에는 활성을 띄지 않음을 확인할 수 있었으며, 이 전에 보고된 *Bacillus siamensis* 의 탄수화물 이용 연구결과와 유사한 것으로 나타났다.

최종적으로 *Bacillus siamensis* Y19^T는 어류 및 인체 항균에 뛰어나며 안정성을 가진 균주로 다른 probiotics로 사용될 수 있는 기준을 모두 통과하여 향후 인체 및 수주에 안전한 종균으로 다양하게 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 추가적인 어류 실험 등을 통하여 친환경적인 항생제 대체제로도 이용이 가능할 수 있으며 그 외 다양한 분야에서 생균제로 사용 및 효과가 있을 것으로 사료된다.

IV. 참고 문헌

1. Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35(1), 201-232.
2. Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., and Gálvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201-232.
3. Albano, H., Todorov, S. D., van Reenen, C. A., Hogg, T., Dicks, L. M., and Teixeira, P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 239-247.
4. Alexopoulos, C., Georgoulakis, I. E., Tzivara, A., Kritas, S. K., Siochu, A., & Kyriakis, S. C. (2004). Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 88(11-12), 381-392.
5. Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U., & Legge, R. L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Eng.* 79(3), 950-955.
6. Aspri, M., O'Connor, P. M., Field, D., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C., and Papademas, P. 2017. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *Int. Dairy J.* 73, 1-9.
7. Bae, H. C., Choi, S. H., Na, S. H., & Nam, M. S. (2012). Characteristics of α -amylase and protease produced from *Bacillus*

- amyloliquefacies CNL-90 isolated from malt grain. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 54(2), 133-139.
8. Bae, K. M., & Lee, S. M. (2015). Effects of dietary inclusion of distillers dried grain as a partial replacement for fish meal on growth performance of juvenile rockfish *Sebastes schlegeli*. *Mar Technol Soc J.* 27(2), 390-398.
 9. Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., de los Angeles Serradell, M., ... & Abraham, A. G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Res. Int.* 103, 462-467.
 10. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. microbial.* 65, 261-268.
 11. Borgeson, T. L., Racz, V. J., Wilkie, D. C., White, L. J., and Drew, M. D. 2006. Effect of replacing fishmeal and oil with simple or complex mixtures of vegetable ingredients in diets fed to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac Nutr.* **12**, 141-149.
 12. Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 36(6), 775-780.
 13. Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2008). Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *J. Dairy Sci.* 91(2), 500-512.

14. Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8(7), 1137-1144.
15. Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Dölz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127-e133.
16. Chang, C. T., Wang, P. M., Hung, Y. F., & Chung, Y. C. (2012). Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. *Food Chem.* 133(4), 1611-1617.
17. Chang, J. H., Shim, Y. Y., Cha, S. K., and Chee, K. M. 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 109, 220-230.
18. Chang, K. J., and Yu, T. J. 1981. Studies on the components of sokokju, and commercial yakju. *Korean J. Food Sci. Technol.* **13**, 307-313.
19. Cho, M. Y., Lee, J. I., Kim, M. S., Choi, H. J., Lee, D. C., and Kim, J. W. 2008. Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. *J. Fish. Pathol.* 21, 209-217.
20. Choi, K. K., Chi, C. B., Ham, S. S., & Lee, D. S. (2003). Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*
21. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
22. Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal

- cells. *J. Dairy Sci.* 70(1), 1-12.
23. Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777-788.
 24. Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
 25. De Vuyst, L., and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194-199.
 26. De, B. C., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Mohapatra, P. D., & Sharma, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish physiology and biochemistry*, 40(3), 921-971.
 27. Diez-Gonzalez, F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr Issues Mol Biol.* 8, 15-24.
 28. El-Saidy, D. M., and Gaber, M. M. 2003. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquac. Res.* **34**, 1119-1127.
 29. Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., and Avis, T. J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 39, 869-878.
 30. FAO (2010). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*, 86 - 188.
 31. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. *The state of world fisheries and aquaculture*. FAO Fisheries Report, Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf> on Aug 15, 2019.

32. FAO. 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Report of the sustainability in action. FAO Fisheries Report, 176.
33. FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture 2014. Report of the sustainability in action. FAO Fisheries Report, 223.
34. FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Accessed June 15, 2019. Available from: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
35. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.
36. Galica, T., Hrouzek, P., & Mareš, J. 2017. Genome mining reveals high incidence of putative lipopeptide biosynthesis NRPS/PKS clusters containing fatty acyl-AMP ligase genes in biofilm-forming cyanobacteria. *J. Phycol.* 53, 985-998.
37. Galica, T., Hrouzek, P., and Mareš, J. 2017. Genome mining reveals high incidence of putative lipopeptide biosynthesis NRPS/PKS clusters containing fatty acyl-AMP ligase genes in biofilm-forming cyanobacteria. *J. Phycol.* 53, 985-998.
38. Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C., Lauro, L., Ciappelloni, R., & Petracca, G. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res.* 27(1), 471-479.
39. Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol*, 16, 57-69.
40. Ha, J., Shim, Y. S., Cho, Y., Seo, D., Jang, H., and Jang, H. 2014. Analysis of E, E-farnesol and squalene in Makgeolli using stir bar sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass

- spectrometry. *J Anal Sci Technol.* **27**, 60-65.
41. Ha, J., Wang, Y., Jang, H., Seog, H., and Chen, X. 2014. Determination of E, E-farnesol in Makgeolli (rice wine) using dynamic headspace sampling and stir bar sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **142**, 79-86.
 42. Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
 43. Hood, S. K., & Zoitola, E. A. (1988). Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53(5), 1514-1516.
 44. Hood, S. K., & Zoitola, E. A. (1988). Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53(5), 1514-1516.
 45. Hoseinifar, S. H., Zou, H. K., Van Doan, H., Harikrishnan, R., Yousefi, M., Paknejad, H., & Ahmadifar, E. (2019). Can dietary jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit extract alter cutaneous mucosal immunity, immune related genes expression in skin and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*)?. *Fish Shellfish Immunol.* 94, 705-710.
 46. Jang, Y. D., Oh, H. K., Piao, L. G., Choi, H. B., Yun, J. H., & Kim, Y. Y. (2009). Evaluation of probiotics as an alternative to antibiotic on growth performance, nutrient digestibility, occurrence of diarrhea and immune response in weaning pigs. *Journal of Animal Science and Technology*, 51(1), 25-32.
 47. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in*

- biochemical sciences, 23(10), 403-405.
48. Jee, B. Y., Shin, K. W., Lee, D. W., Kim, Y. J., & Lee, M. K. (2014). Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *J. Fish Pathol.* 27(1), 77-83.
49. Jeong, C. W., Choi, H. J., Yoo, G. Y., Lee, S. H., Kim, Y. C., OKorie, O. E., ... & Kong, I. S. (2006). Effects of dietary probiotics supplementation on juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci.* 39(6), 460-465.
50. Jeong., C. D., Ko., J. Y., Sung., H. G., Park., E. K., Lee., E. K., & Lee., S. S., (2016). Rumen fermentation and performance of Hanwoo steers fed total mixed ration with Korean rice wine residue. *Animal Industry and Technology*, 7(1), 1-1.
51. Jin, J., Kim, S. Y., Jin, Q., Eom, H. J., and Han, N. S. 2008. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Takju, Korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1678-1682.
52. Jin, S. R., Lee, H. M., Nam, K. W., and Park, K. S. 2018. Biological Control of White Stain Symptom on Grape Fruit by *Bacillus velezensis* MWS28. *Korean. J. Pestic. Sci.* 22, 345-355.
53. Joseph, S., and Forsythe, S. J. 2011. Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg Infect. Dis.* 17, 1713.
54. Jun, E. B., Choi, M. S., & Park, S. Y. (2019). Quality and Antioxidant Effects of the Korean Traditional Rice Wine Makgeolli Supplemented with *Codium fragile* during Fermentation. *Korean J Fish Aquat Sci.* 52(3), 224-231.
55. Jung, S. E., & Kim, S. H. (2015). Probiotic properties of lactic acid

- bacteria isolated from commercial raw makgeolli. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 47(1), 44-50.
56. Kang, S. M., Kim, S. J., Ko, K. H., and Nam, S. 2016. Formation of biogenic amines and bioactivities of Makgeolli under different fermentation conditions. *Korean J. Food Preserv.* **23**, 402-412.
 57. Karthikeyan, V., and Santhosh, S. W. 2009. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pak J Nutr.* 8, 335-340.
 58. Kavitha, M., Raja, M., & Perumal, P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquac. Res.* 11, 59-69.
 59. Kelly, W. J., Asmundson, R. V., and Huang, C. M. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 209-218
 60. Kim, B. Y. (2019). Recent research technologies for quality control of commercial probiotics. *KSLABP.* 5(2), 39-46.
 61. Kim, J. W., Lee, H. N., Jee, B. Y., Woo, S. H., Kim, Y. J., & Lee, M. K. (2012). Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *J. Fish Pathol.* 25(3), 271-277.
 62. Kim, J. Y., Sung, K. W., Bae, H. W., and Yi, Y. H. 2007. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added Takju during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 266-271. Makgeolli (Korean Rice Wine): A Literature Review. *J Korean Soc*
 63. Kim, M. K., & Park., S. S., (2019). Research Trends on Quality Characteristics and Physiological Functions of Korean Traditional

- Food Sci Nutr. 48(2), 149-160.
64. Kim, M. S., Moon, S. W., Lee, Y. D., Kim, S. J., Kim, Y. J., Lee, J. W., ... and Ahn, S. C. 2007. Effect of Citrus Fermented by *Lactococcus lactis* W-44 Isolated from Kimchi on Growth of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Microbiol.* 43, 124-129.
 65. Kim, S. C., Kim, H. S., & Kang, Y. J. (1999). Changes of components in the rice-porridge fermented by Nuruk. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 28(5), 1017-1021.
 66. Kim, S. Y., Yoo, K. S., Kim, J. E., Kim, J. S., Jung, J. Y., Jin, Q., Eom, H. J., and Han, N. S. 2010. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Korean rice wines by culture-independent method using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Sci Biotechnol.* 19, 749-755.
 67. Kim, S., and Park, E. J. 2015. Fermentation characteristics of Shindari added with Carrot. *Korean J. Food Cook. Sci.* **31**, 9-17.
 68. Kim, S., and Park, E. J. 2015. Fermentation characteristics of Shindari added with Carrot. *Korean J. Food Cook. Sci.* 31, 9-17.31. Kim, S., and Park, E. J. 2015. Fermentation characteristics of Shindari added with Carrot. *Korean J. Food Cook. Sci.* 31, 9-17.
 69. Kim, Y. H., Min, J. H., Kang, M. G., Kim, J. H., Ahn, B. H., Kim, H. K., and Lee, J. S. 2012. Physicochemical properties, lactic acid bacteria content and physiological functionalities of Korean commercial makgeolli. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 40, 325-332.
 70. Konsula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 39(11), 1745-1749.
 71. Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the

- application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 87, 820-828.
72. Kumar, M., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2012). Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(2), 703-711.
 73. Kwon, S. J., Ahn, T. Y., and Sohn, J. H. 2012. Analysis of microbial diversity in makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* 22, 232-238.
 74. Lanari, D., and D'Agaro, E. 2005. Alternative plant protein sources in sea bass diets. *Ital. J. Anim. Sci.* 4, 365-374.
 75. Lee, A. R., Niu, K. M., Kang, S. K., Han, S. G., Lee, B. J., and Kim, S. K. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of *Lactobacillus*-fermented *Artemisia annua* L. as a potential fish feed additive. *J. Life Sci.* 27, 652-660.
 76. Lee, H. L., Kang, K. W., Seo, D. H., Jung, J. H., Jung, D. H., Kim, G. W., Park, S. Y., Shin, W. C., Shim, H. S., and Park, C. S. 2015. Diversity of lactic acid bacteria (LAB) in makgeolli and their production of γ -aminobutyric acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47, 204-210.
 77. Lee, N. K., Han, K. J., Son, S. H., Eom, S. J., Lee, S. K., & Paik, H. D. (2015). Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT.* 64(2), 1036-1041.
 78. Lee, S. J., Kim, J. H., Jung, Y. W., Park, S. Y., Shin, W. C., Park, C. S., Hong, S.Y., and Kim, G. W. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial Makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43, 206-212.

79. Lee, S. J., Kwon, Y. Y., Cho, S. W., Kwon, H. S., & Shin, W. C. (2013). Effects of Ehwa Makgeolli containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 42(4), 550-555.
80. Lee, S. Y., Kim, J. Y., Baek, S. Y., Yeo, S. H., Koo, B. S., Park, H. Y., & Choi, H. S. (2011). Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat sokseongjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43(6), 735-741.
81. Lee, Y. S., Kim, J. Y., Park, J. H., Shim, M. J., & Moon, G. S. (2012). Foreign student's preference and recognition of Makgeolli in Korea. *J. Korean Soc. Food Cult.* 27(6), 627-635.
82. Lee, Y., Seol, J., Jeong, D., and Kim, S. R. 2016. Application of functional microbial strains isolated from traditional rice wine in Korea. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44, 229-235.
83. Lee., J. S., & Kim., D. Y., (2006). The current status and future directions of Korean inland freshwater aquaculture. *The Journal of Fisheries Business Administration.* 37(3), 12.
84. Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147(3659), 747-748.
85. Lim, H. J., Kim, S. Y., & Lee, W. K. (2004). Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci,* 5(4), 391-395.
86. Liu, S. N., Han, Y., and Zhou, Z. J. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Res. Int.* 44, 643-651.
87. Mezaini, A., Chihib, N. E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N., and Hornez, J. P. 2009. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2009, 1-6.

88. MIFAFF (Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries). 2003. Statistical yearbook of maritime affairs and fisheries. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries Report, MIFAFF, Gwacheon, Korea.
89. Mi-Jung Kim, K. W. J., Ahn, I. S., & Ahn, D. H. (2007). Effect of *Glycyrrhiza uralensis* on Shelf-life and Quality of Takju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(11), 1436-1443.
90. Mills, S., Stanton, C., Hill, C., and Ross, R. P. 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2, 299-329.
91. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries. 2015. Statistical year book of maritime affairs and fisheries.
92. Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., and Ghribi, D. 2016. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6690-6699.
93. Moon, G. S., Kang, C. H., Pyun, Y. R., and Kim, W. J. 2004. Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application to kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 924-931.
94. Moon, Y. J., Baik, S. H., and Cha, Y. S. 2014. Lipid-lowering effects of *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from Korean traditional makgeolli in high fat diet-induced obese mice. *Nutrients.* 6, 1016-1028.
95. Morovic, W., Hibberd, A. A., Zabel, B., Barrangou, R., & Stahl, B. (2016). Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of

- commercial probiotic products reveals composition biases. *Front. Microbiol.* 7, 1747.
96. Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., Herranz, C., and Cintas, L. M. 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 13, 15.
97. Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.* 334(1), 1-15.
98. Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 29(1), 2-14.
99. Oh, Y. J. 2009. Jeju Traditional Food Fermentation culture in environment of east asia. *J Cheju Studies.* 32, 157-203.
100. Oh., D. H., Kim., M. G., Yoon., G. S., & Lee., K. J., (2019). Evaluation of Diacylglycerol as an Alternative to Dietary Fish Oil in Diets for Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci.* 52(4), 366-373.
101. Otdak, A., and Zielińska, D. 2017. Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics. *Postepy Hig Med Dosw.* 71, 328-338.
102. Paik, H. D., Jung, M. Y., Jung, H. Y., Kim, W. S., & Kim, K. T. (2002). Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(1), 73-78.
103. Park, H. Y., Park, S. K., Kim, B. G., Ryu, D. G., Lim, E. S., & Kim,

- Y. M. (2017). Isolation and characterization of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49(4), 377-382.
104. Park, S. S., Kim, J. J., Yoon, J. A., Lee, J. H., Jung, B. O., & Chung, S. J. (2011). Preparation and quality characteristics of Takju (Rice Wine) with *Opuntia ficus-indica* var., saboten and Chito-oligosaccharide. *J Chitin Chitosan.* 16(3), 164-169.
105. Park, Y. K., Nho, S. W., Shin, G. W., Park, S. B., Jang, H. B., Cha, I. S., ... and Jung, T. S. 2009. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vet. Res.* 136, 76-81.
106. Peces, R., E. Gago, F. Tejada, A. S. Laures, and J. Alvarez-Grande. 1997. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a perm-cath catheter. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 2428-2429.
- 107.** Qian-Qian, C., Bo, L., Jie-Ping, W., Jian-Mei, C., Guo-Hong, L., Hai-Yan, G., and Xiong, G. 2016. Anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus siamensis* FJAT-28592. *J. Agric.* 24, 261-269.
108. Rabbee, M. F., Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., and Baek, K. H. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules.* 24, 1046.
109. Rasul, M. G., & Majumdar, B. C. (2017). Abuse of antibiotics in aquaculture and it's effects on human, aquatic animal and environment. *Saudi J Biol Sci.* 2(3), 81-88.
110. Rhee, S. J., Lee, J. E., and Lee, C. H. 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microb. Cell Factories.* 10, 55-68.

111. Roy, J. K., & Mukherjee, A. K. (2013). Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochem. Eng. J.* 77, 220-230.
112. Roy, J. K., Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2012). Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *Int. J. Biol. Macromol.* 50(1), 219-229.
113. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425
114. Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., ... & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44(1-2), 93-106.
115. Schillinger, U., and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
116. Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y., and Juven, B. J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Pure Appl Microbiol.* 74, 67-77.
117. Seo, D. H., Jung, J. H., Kim, H. Y., Kim, Y. R., Ha, S. J., Kim, Y. C., and Park, C. S. 2007. Identification of lactic acid bacteria involved in traditional Korean rice wine fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16, 994-998.
118. Shin, M. O., Kang, D. Y., Kim, M. H., & Bae, S. J. (2008). Effect of

- growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of Makgeoly fractions in various cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37(3), 288-293.
119. Shin, M. O., Kim, M. H., & Bae, S. J. (2010). The effect of makgeolli on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE in vitro. *Journal of Life Science*, 20(5), 710-716.
120. Sim, H.S., Kim, M. D. 2016. Antipathogenic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Korean traditional rice wine. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44, 98-105.
121. Song, Y. R., Jeong, D. Y., Cha, Y. S., and Baik, S. H. 2013. Exopolysaccharide produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Korean traditional rice wine, Makgeolli. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 681-688.
122. Sumpavapol, P., Tongyongk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., & Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(10), 2364-2370.
123. Takahashi, K., & Nei, M. (2000). Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular biology and evolution*, 17(8), 1251-1258.
124. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
125. Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., and Smânia Jr, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural

- products. *Braz. J. Microbiol.* 38, 369-380.
126. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4), 655.
127. Wang, S. J., Lee, H. J., Cho, J. Y., Park, K. H., and Moon, J. H. 2012. Isolation and identification of antioxidants from makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**, 14-20.
128. Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1-4), 1-4.
129. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173, 697-703.
130. Welman, A. D., and Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21, 269-274.
131. Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria: miniprep of bacterial genomic DNA. In *Current protocols in Molecular Biology*, pp. 2.4.1-2.4.2. Edited by F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. new York: Wiley.
132. Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y., & Li, Z. (2013). Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *SpringerPlus*, 2(1), 1-5.
133. Xu, B. H., Lu, Y. Q., Ye, Z. W., Zheng, Q. W., Wei, T., Lin, J. F., and Guo, L. Q. 2018. Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15. *PLOS ONE.* 13, e0202893.

134. Xu, H. M., Rong, Y. J., Zhao, M. X., Song, B., and Chi, Z. M. 2014. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 127-136.
135. Yang, H. S., Hwang, S. J., Lee, S. H., & Eun, J. B. (2011). Fermentation characteristics and sensory characteristics of Makgeolli with dried citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43(5), 603-610.
136. Ye, E. J., Kim, S. J., Park, C. H., & Bae, M. J. (2005). Antioxidant and Anticancer Activities of Ginseng Treated with Traditional Rice Wine Steam Process Method. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(5), 599-604.
137. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613.
138. Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., and Suzuki, C. 2013. Inhibition of *Paenibacillus* larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 62-67.
139. Yu, W., Wen, G., Lin, H., Yang, Y., Huang, X., Zhou, C., ... & Li, T. (2018). Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of Coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepede, 1802). *Fish Shellfish Immunol.*

74, 649-655.

140. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R., & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2-4), 516-524.
141. Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., ... & Elinav, E. (2018). Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell*, 174(6), 1388-1405.

V. 감사의 글

석사 졸업까지의 진학에 있어 많은 가르침과 도움을 주신 허문수 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 또 논문심사를 위해 애써주시고 조언해주신 정준범 교수님과 최학선 교수님께 감사드립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 이승현 교수님, 정식근 교수님, 박상용 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 같은 실험실에서 부족한 저를 이끌어 주신 박소현 박사님, 문재운 박사님께 감사드립니다. 또한 항상 저를 옆에서 도와준 이해리, 김지현, 최원선 실험실 친구들 제주도에서의 모든 것을 공부하는 것에 힘들지 않게 옆에서 항상 도와주고 나서준 언니 같은 윤혜, 미리, 향희, 다연, 시완, 진이, 보라 와 제주도의 어머니 아버지였던 하나언니, 성혁오빠에게도 감사합니다.

특히 지켜봐 주던 우리엄마, 아빠, 오빠, 새언니 그리고 부산엄마, 아빠, 동생, 사랑하는 장규오빠 모두 감사드립니다.