creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:21031-200000334057

공학 석사 학위 논문

식해에서 분리한 유산균의 특성과 유산균 배양액의 항산화 작용 및 콜레스테롤 저감 활성

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

강 동 민

공학 석사 학위 논문

식해에서 분리한 유산균의 특성과 유산균 배양액의 항산화 작용 및 콜레스테롤 저감 활성

지도교수 김 영 목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

강 동 민

강동민의 공학석사 학위논문을 인준함.

2020년 8월

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

위 원 장 농학박사 김 선 봉 (인)

위 원 농학박사 양 지 영 (인)

위 원 약학박사 김 영 목 (인)

목 차

목 차 i
Abstract iii
I. 서 론 1
II. 재료 및 방법 3
1. 실험 재료 3
2. 실험 방법 3
2.1. 유산균 분리 및 동정 3
2.1.1. 유산균 분리 3
2.1.2. 분리균의 분자생물학적 동정 4
2.1.3. 분리균의 생화학적 특성 분석 6
2.2. 분리균주의 probiotics 특성 분석 6
2.2.1. 내산성 분석 6
2.2.2. 내담즙성 분석 7
2.2.3. 내염성 분석 7
2.3. 항산화 활성 분석 8
2.3.1. DPPH radical 소거 활성 측정 8
2.3.2. ABTS radical 소거 활성 측정 8
2.3.3. Ferric reducting antioxidant power (FRAP) 활성 측정 9
2.3.4. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 활성 측정 10
2.4. 안전성 분석 11
2.4.1. 용혈성 분석 11
2.4.2. 항생제 내성 분석 11
2.4.3. Biogenic amine 생성능 분석 12
2.5. 단백 분해능 분석 12

2.6. Cholesterol 감소능 측정 13
2.7. 통계 분석 14
III. 결과 및 고찰 15
1. 식해에서의 유산균 분리 및 동정 15
2. 식해에서 분리된 유산균의 생화학적 특성 17
3. 식해에서 분리된 유산균의 probiotics 특성 21
3.1. 식해에서 분리된 유산균의 내산성 특성 21
3.2. 식해에서 분리된 유산균의 내담즙성 특성 23
3.3. 식해에서 분리된 유산균의 내염성 특성 25
4. 식해에서 분리된 유산균의 항산화 활성 및 특성 27
4.1. 식해에서 분리된 유산균의 DPPH radical 소거 활성 27
4.2. 식해에서 분리된 유산균의 ABTS radical 소거 활성 28
4.3. 식해에서 분리된 유산균의 FRAP 활성 30
4.4. 식해에서 분리된 유산균의 ORAC 활성 32
5. 식해에서 분리된 유산균의 안전성 확인 36
5.1. 식해에서 분리된 유산균의 용혈 독성 분석 36
5.2. 식해에서 분리된 유산균의 항생제 내성 분석 38
5.3. 식해에서 분리된 유산균의 biogenic amine 생성능 분석 41
6. 식해에서 분리된 유산균의 단백 분해 활성 43
7. 식해에서 분리된 유산균의 cholesterol 감소 활성 45
IV. 요약 48
V. 참고문헌 50

Characteristics of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolated from *Sik-hae*, and Antioxidant and Cholesterol-lowering Activities of LAB Supernatants

Dong-Min Kang

Department of Food Science and Technology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

The objective of this study was aimed to evaluate the biological functions such as antioxidant and cholesterol-lowering activities of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Korean traditional fermented seafood, *Sik-hae*. A total of nine LAB strains were isolated from the fermented seafood, which was purchased from traditional markets in Gyeongju-city, Pohang-city, Yeongdeok-gun, and Gangneung-city. These LAB isolates were identified based on the biochemical analysis using the API 50 CHL system and 16S rRNA gene sequencing technique. The probiotic characteristics of LAB isolates were carried out by several assays such as acid, bile, and salinity resistance, and also the antioxidant activity. The antioxidant activities of LAB isolates were analyzed using 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid radical scavenging assay as well as ferric reducing antioxidant power assay and oxygen radical absorbance capacity assay. The safety of LABs was also evaluated by determining the hemolysis assay, antibiotic resistance, and amino acid decarboxylase activity. Results show that LABs did not exhibit α- or β-hemolysis on the blood agar

plate. The antibiotic resistance properties of LABs were examined using erythromycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, penicillin G, and ampicillin. Furthermore, it was not observed the productions of any biogenic amines from LAB isolates. Except for *Leuconostoc citreum* S-02, LAB isolates also showed a proteolytic activity. The cholesterol-lowering effect by LAB isolates was observed at varying levels ranging from 45.30 to 81.61%. Among all LAB isolates, *L. mesenteroides* S-09 was found to have excellent acid resistance, bile resistance, salinity resistance, antioxidant activity, and cholesterol reduction ability. Thus, the present study suggests that the LAB strains isolated from *Sik-hae* can be used as a potential microbial source for the development of fermented seafood products in the future.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

I. 서 론

유산균은 자연계에 널리 분포하며 여러 나라의 전통 발효식품 제조 및 가공에 사용되며 이중 일부의 유산균은 probiotics로 분류된다(Park et al., 2017). Probiotics는 적절한 양으로 투여 될 때 숙주에게 건강상의 이점을 주는 미생물로 정의되며(Sanders, 2008), probiotics의 주요 기능으로는 유당불내증 완화, 혈중 콜레스테롤 수치 감소, 장내 균총의 안전화, 항암 작용, 위장장애 완화 등의 기능성이 보고되어 있다(AFRC, 1989; Saarela et al., 2000; Agrawal, 2005). 이러한 probiotics는 체내에 유입되면 위장을 통과하는 동안 강산인 위액의 영향에서 생존해야 하며 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙산에 대한 저항성도 가지고 있어야 한다. 이 같이 체내 환경에서 생존 가능해야 하는 필수적인 요건 외에 probiotics는 비용혈 활성, biogenic amine 미생성 등과 같은 인체 안전성이 확보되어야 한다(Lim et al., 2016). 현재, 국내에서 probiotics는 건강기능식품으로 인정되어 매년 관련 매출액이 증대하고 있고 국외에서도 관련 시장이 지속적으로 성장하고 있다(Lim et al., 2015; Seo et al., 2019; Seong and Park, 2019). 국내 프로바이오틱스 시장의 매출액은 2012년 519억원에서 2016년 1,903억 원을 달성하였다(Seo et al., 2019). 이러한 이유로 유용 probiotics를 다양한 식품원으로부터 분리하고 이를 자원화 및 산업화하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Hai, 2015; Zhao et al., 2019; Seo et al., 2019)

우리나라의 전통 발효식품 중에 다양한 곡류와 혼합되어 만들어지는 대표적인 전통 발효 수산 식품으로 식해(*Sik-hae*)가 있다(Choe et al., 2006; Han et al., 2013a; Han et al., 2013b). 식해는 어육에 쌀, 조, 고춧가루, 무, 마늘, 생강, 엿기름, 소금 등의 부재료를 혼합하여 숙성시킴으로서 젖산균을 비롯한 미생물에 의하여 생성된 유기산에 의한 부패방지는 물론 식용에 적합한 조직감이 생성되며 단백질 분해효소에 의하여 생성된 다양한 아미노산을 함유한다(Lee et al., 2005; Han et al., 2013a). 식해의 주원료인 생선류는 숙성을 통하여 뼈가 연화되어 섭취할 수 있어 칼슘 및 단백질의 우수한 공급원이 되며 부원료로 첨가된 마늘, 생강, 고춧가루 등의 생리적 기능이 더해져 기호성 및 영양학적인 측면에서 우수하다(Jeong et al., 2015). 또한, 다른 수산발효식품과 달리 식해 발효에는 유산균이 많이 관여한다고 보고 되고 있다(Kim et al., 2008; Han et al., 2013b). 하지만, 다른 젓갈류와 비교하였을 때 식해와 관련된 학문적인 연구는 상대적으로 적으며 특히 식해에서 분리된 유용 유산균의 분리와 기능에 대한 연구는 미미하다.

본 연구는 경주시, 포항시, 영덕시, 강릉시의 전통시장에서 구매한 11건의 식해류에서 유산균을 분리하였으며 표준화된 식해의 개발에 이용하기 위해 분리된 유산균을 대상으로 내산성, 내담즙성, 내염성, 항산화 활성, 안전성 실험 및 cholesterol 감소능 등에 대한 특성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에서는 2019 년 2 월에 경주시 소재 재래시장인 감포시장에서 2 종의 식해(가자미, 가오리)를, 포항시 소재 죽도시장에서 3 종의 식해(오징어, 가자미, 홀떼기)를, 영덕군 소재 영덕시장에서 1 종의 식해(오징어)를, 강릉시 소재 중앙시장에서 2 종의 식해(명태초, 가자미 2 건)를 그리고 강릉시 소재 주문진 시장에서 1 종의 식해(가자미 2 건) 등 총 11 건 식해를 구매하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1. 유산균 분리 및 동정

2.1.1. 유산균 분리

식해에서 유산균을 분리하기 위하여 식해 시료 25 g을 채취하여 225 mL의 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)과 혼합하여 스토마커

(Interscience, Saint-Nom, France)를 이용하여 3분간 균질화하였다. 균질액 1 mL를 취하여 9 mL PBS에 십진희석법으로 단계별로 희석하여 PCA with BCP (Bromocresol Purple; Mbcell, Korea)에 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 single colony 주위에 노란색 환이 생긴 colony를 선별하여 백금이로 deMan Rogosa Sharpe medium (MRS; Difco, St. Louise, MI) 평판배지에 획선도말법 (streaking)으로 도말 후 30℃에서 48시간 배양하여 2차 분리하였다. 총 9종의 유산균을 분리하였으며 분리된 유산균 9종과 Korean Collection for Type Cultures (KCTC; Daejeon, Korea)에서 분양받은 표준균주 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033을 대조구로 분석에 사용하였다(Table 1). 분리된 유산균은 MRS broth 배지에 배양(30℃, 24 h)하여 glycerol과 50대 50으로 섞어 stock을 제조하였다. 이후 -70℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

2.1.2. 분리균의 분자생물학적 동정

분리된 유산균의 분자생물학적 동정은 다음과 같이 실시되었다. Genomic DNA는 Chelex bead (Bio-Rad Lab., Hercules, CA)를 이용한 boiling 방법을 사용하여 추출하였다. 16s rRNA를 증폭시키기 위하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-GGTTACCTGT CGACTT-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였으며 PCR은 10 pmole 각 primer, 2 mM $MgCl_2$, 200 mM deoxynucleoside-triphosphate, 1 U의 Solg™ Taq polymerase가 들어 있는 DNA PCR premix (Solgent, Dajeon, Korea)를 이용하여 genomic DNA 10 μL과 멸균 증류수 40 μL를 넣은 혼합물을 만들어 실시하였다. 94℃에서 5분간 Pre-denaturation 한

Table 1. Lactic acid bacteria isolated from *Sik-hae* purchase from traditional market

Strain No.	Traditional market	Source	Strains
1	Jukdo Market, Pohang-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae*	LAB S-01
2	Yeongdeok Market, Yeongdeok-gun	*Todarodes pacificus Sik-hae*	LAB S-02
3	Central Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (A)	LAB S-03
4	Central Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (A)	LAB S-04
5	Central Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (B)	LAB S-05
6	Central Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (B)	LAB S-06
7	Jumunjin Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (A)	LAB S-07
8	Jumunjin Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (B)	LAB S-08
9	Jumunjin Market, Gangneung-city	*Glyptocephalus stelleri Sik-hae* (B)	LAB S-09
LR	-	Korean Collection for Type Culture	*Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033

뒤 94℃에서 denaturation 20 초, 58℃에서 annealing 20초, 72℃에서 elongation 30초 35회 반복하였으며 72℃에서 최종 elongation을 10분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에 주입하여 전기영동을 실시한 후 Ethidium bromide로 염색하여 추출 여부를 확인하였다. 이후, ㈜바이오닉스 (Bionics, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 database 자료와 비교하였다.

2.1.3. 분리균의 생화학적 특성 분석

분리된 유산균의 생화학적 특성은 API 50CHL kit (BioMérieux, Lyon, France)를 사용하여 확인하였다. 선별된 유산균은 MRS broth에서 배양(30℃, 24 h)하여 API 50CHL medium (BioMérieux, Lyon, France)으로 탁도를 3-4 Mcfarland로 현탁한 다음 strip에 접종 후 mineral oil을 첨가하였다. 30℃에서 24시간 및 48시간 배양하여 색깔의 변화로 양성(+)과 음성(-)을 육안을 통하여 판단하였다.

2.2. 분리균주의 probiotics 특성 분석

2.2.1. 내산성 분석

내산성 실험은 Hyronimus et al. (2000)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 멸균된 증류수를 37% hydrochloric acid (HCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 사

용하여 pH 2.0 용액을 제조하였다. 제조된 pH 용액 10 mL에 MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h)된 유산균 배양을 각각 1 mL 섞은 후 37℃에서 0분, 30분, 2시간 지점에서 1 mL 용액을 취한 뒤, PBS로 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 평판도말(spreading) 하여 30℃에서 24-48 시간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 계수하여 내산성을 확인하였다.

2.2.2. 내담즙성 분석

내담즙성 실험은 Gilliland et al. (1984)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h)된 유산균 배양액을 0.3%의 oxgall (Sigma-Aldrich)을 첨가한 MRS broth 배지와 첨가하지 않은 배지에 각각 1% 접종하였다. 37℃에서 7시간 배양 후 PBS로 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 평판도말하여 30℃에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 계수하여 내담즙성을 확인하였다.

2.2.3. 내염성 분석

내염성 실험은 분리된 유산균을 MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h)한 후 sodium chloride (Samchun Chemicals. Seoul, Korea)를 3%, 5%, 7%, 10% (w/v) 첨가한 MRS broth 배지 및 첨가하지 않은 MRS broth 배지에 1% 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 PBS로 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 평판도말하여 30℃에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 계수하여 내염성을 확인하였다.

2.3. 항산화 활성 분석

2.3.1. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거 활성 실험은 Brand-Williams et al. (1995)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 실험에 사용할 시료는 분리된 유산균을 MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h)한 뒤 원심분리 (1,398 × g, 5 min, 4℃)하여 얻어진 상등액을 0.2 μm cellulose acetate hydrophilic filters (Advantec, Tokyo, Japan)을 이용하여 여과한 무균 용액을 사용하였다. 준비된 시료 0.5 mL에 0.15 mM의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich)용액 1 mL를 혼합하여 암실에서 30분간 반응을 실시한 후 상등액 200 μL를 취해 96 well plate에 주입하여 microplate readers (Synergy™ HTX and Synergy™ 2 Multi-Mode Readers; BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로는 시료와 동일한 양의 증류수를 사용하였으며, 양성 대조구로는 0.2 mM의 L-ascorbic acid (Vitamin C, Sigma-Aldrich)를 사용하였다. DPPH radical 소거 활성 실험의 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorban of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

2.3.2. ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS radical 소거 활성 실험은 Re et al. (1999)의 방법을 일부 변형하여 실

시하였다. 분석 시료인 유산균 상등액은 DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 것과 동일한 방법으로 준비되었다. 실험을 위하여 2.4 mM potassium persulfate를 함유하는 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS, Sigma-Aldrich)를 제조하여 16시간 암실에 보관한 후 734 nm의 흡광도에서 0.700±0.005가 되도록 희석하였다. 제조된 ABTS 용액 1 mL와 시료 10 μL를 혼합하여 6분동안 암실에서 반응을 실시한 후 상등액 200 μL를 취해 96 well plate에 주입하여 BioTek microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로는 시료와 동일한 양의 증류수를 사용하였으며, 양성 대조구로는 5 mM의 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma-Aldrich)를 사용하였다. ABTS radical 소거 활성 실험의 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

2.3.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성 측정

FRAP 실험은 Benzie and Strain (1999)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (3.1 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ and 16 mL $C_2H_4O_2$, pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ; Sigma-Aldrich) 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich)을 각각 25 mL, 2.5 mL, 2.5mL 혼합하여 조제하였다. 분석 시료인 유산균 상등액은 DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 것과 동일한 방법으로 준비되었다. 96 well plate에 시료 10 μL와 FRAP 용액 190 μL

를 넣어 30분간 반응 후 BioTek microplate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 표준 물질로 하여 ascorbic acid equivalents (mM AE/mg)로 나타내었다.

2.3.4. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 활성 측정

ORAC 측정은 Zulueta et al. (2009)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 분석 시료인 유산균 상등액은 DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 것과 동일한 방법으로 준비한 것을 10배 희석하여 실험에 사용하였다. 실험을 위하여 96 black well plate에 시료 50 μL와 78 nM fluorescein 용액 50 μL를 혼합하여 30℃에서 15분간 반응 후 221 mM 2, 2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihychloride (Sigma-Aldrich) 25 μL와 반응시켰다. BioTek microplate reader를 이용하여 형광물질의 감소 정도를 30℃에서 60분(5분간 1회, 총 13회) 동안 485 nm에서 전자가 여기되고, 528 nm에서 전자가 방출되도록 하여 측정하였다. 표준곡선은Trolox (Sigma-Aldrich)를 통해 작성하여 Trolox equivalents (mM AE/mg)로 나타내었다.

2.4. 안전성 분석

2.4.1. 용혈성 분석

용혈성 실험은 Oh and Jung (2015)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 분리된 유산균을 MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h) 후 sheep blood를 5% 함유하는 tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) 평판배지에 획선도말법(streaking)으로 도말 후 30℃에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 육안을 통하여 알파 용혈 (α-haemolysis, colony 주변 녹색환 생성), 베타용혈 (β-haemolysis, colony 주변 투명환 생성) 또는 감마용혈 (γ-haemolysis, colony 주변 환 생성 없음)을 판단하였다.

2.4.2. 항생제 내성 분석

항생제 내성 실험은 Oh and Jung (2015)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 분리된 유산균을 MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 h) 후 동일한 배지에 1×10^6 CFU/mL 수준으로 현탁하였다. 각각의 유산균 배양액을 96 well plate에서 희석한 항생제(erythromycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, penicillin G, and ampicillin; Sigma- Aldrich)와 혼합하여 최종 항생제 농도가 0.25-512 μg/mL 되도록 하였다. 이후 30℃에서 24시간 배양하여 결과를 판단하였다.

2.4.3. Biogenic amine 생성능 분석

Biogenic amine 생성능 실험은 Bover-Cid and Holzapfel (1999)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 유산균주에서 관련 효소의 생성의 촉진을 위하여 카르복실기 제거배지(decarboxylating medium (DCM); Difco, St. Louis, MO)에 histamine 확인을 위한 L-histidine monohydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich), tyramine 확인을 위한 L-tyrosine disodium salt (Sigma-Aldrich), cadaverine 확인을 위한 L-lysine monohydrochloride (Sigma-Aldrich), putrescine 확인 위한 L-ornithine monohydrochloride (SigmaAldrich) 전구체 아미노산을 각각 0.1% 첨가 및 pyridoxal-5-phosphate (Sigma-Aldrich) 0.001%를 첨가하여 제조하였다. 제조된 배지에 분리된 유산균을 7회 계대배양 (30℃, 24 h)하여 효소활성을 유도하였다. 그 후 Bover-Cid and Holzapfel (1999)이 제시한 평판 배지에 접종하여 30℃에서 96시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양한 후 자색으로 변한 경우 biogenic amine 생성능 양성으로 판정하였다. 대조군으로는 아미노산이 첨가되지 않은 배지를 대조군으로 사용하였다.

2.5 단백 분해능 분석

분석 시료인 유산균 상등액은 DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 것과 동일한 방법으로 준비되었다. 실험을 위해 사용된 배지는 Pailin et al. (2001)의 방법을 일부 변형하여 5% Skim milk (BD, Franklin Lakes, NJ) 및 1.5% Bacto Agar (BD)를 혼합하여 배지를 제조하였으며, 실험은 well diffusion

method (Tagg and McGiven, 1971)의 방법을 이용하여 분석하였다. 준비된 평판배지 위에 well (직경 5mm)을 뚫어 시료 50 μL를 well 내에 주입한 후 30℃에서 24시간 배양한 다음 well 주위에 생긴 투명환의 생성여부를 통하여 단백질 분해능을 확인하였다.

2.6. Cholesterol 감소능 측정

분리된 유산균의 cholesterol 감소능 실험은 Rudel and Morris (1973)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 표준곡선은 *O*-phthaladehyde 정색반응을 통하여 작성하였다. 0.3% oxgall을 첨가한 MRS broth에 water-soluble cholesterol (Sigma-Aldrich)를 각각 0.0, 0.125, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 해당하는 농도로 준비하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

이후 실험을 위하여 MRS broth 배지에 0.3% oxgall (w/v)과 water-soluble cholesterol (0.1 g/L)을 첨가하여 분리된 유산균을 배양(30℃, 24 h)하였다. 배양된 배양액을 원심분리 (1,398 × g, 5 min, 4℃)하여 얻어진 상등액을 0.2 μm cellulose acetate hydrophilic filters (Advantec)을 이용하여 여과한 무균 용액 1 mL에 2mL의 50% KOH (w/v)와 3 mL의 94% ethanol (v/v)를 첨가한 후 1분간 혼합하고 10분간 60℃의 항온수조에 방치하였다. 이후 흐르는 물로 냉각하고 5 mL의 *n*-hexane을 첨가하여 혼합하였다. 그리고 1 mL의 증류수를 혼합 후 10분간 상온에서 방치하였다. 분리된 상층 hexane 층 3 mL를 유리 시험관에 옮긴 후 60℃의 항온수조 상에서 질소가스를 이용하여 농축하였다.

농축된 시료에 4 mL *O*-phthaladehyde 반응액 (0.5 mg *O*-phthaladehyde/glacial acetate in 1 mL, Sigma-Aldrich)을 첨가 후 10분간 상온에서 방치한 다음 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하였다. 10분 후 상등액 200 μL를 96 well plate에 넣어 BioTek microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. 통계 분석

본 연구에서 실시한 실험은 모두 3회 반복하였으며, SPSS 프로그램 (Ver.23.0, Chicago, IL, USA)의 onw-way ANOVA로 유의적인 차이($P<0.5$)를 확인하였으며, Ducan의 다중범위 검증 (Ducan's multiple range test)를 통해 사후 검증하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

III. 결과 및 고찰

1. 식해에서의 유산균 분리 및 동정

본 연구를 위하여 국내 전통시장 5곳에서 구매한 식해로부터 분리한 유산균은 9종으로 Table 2에 나타내었다. 9종의 유산균주는 16S rRNA 염기서열에 바탕을 둔 분석 결과 *Weissella halotolerans* 1종, *Luconostoc citreum* 1종, *Weissella viridescens* 1종, *Luconostoc mesenteroides* 5종 및 *Lactobacillus sakei* 1종으로 확인되었다. 식해는 김치와 유사한 생리 및 기능적 특성을 가진다고 보고되어 있으며(Han et al., 2013b), Lee et al. (2014)은 김치 내 주요 발효 유산균으로 *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. 및 *Weissella* sp. 등을 보고하였다. 본 연구에서도 식해에서 분리한 유산균은 김치 유산균과 유사한 종으로 분리되었다. 지역별 식해에서 분리된 9종의 유산균 중 *L. citreum*, *L. mesenteroides* 및 *L. sakei* 등 7종은 국내에서 식품에 사용할 수 있는 미생물 원료로 등록되어 있는 유산균이다(Korea Food Standards Codex, 2020).

Table 2. Identification of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae* based on 16S rRNA analysis

Isolated LAB strains	Reference strains	Length	Identity (%)	GenBank Accession No.
S-01	*Weissella halotolerans* NRIC 1627	1480	100.0	NR 040812.1
S-02	*Leuconostoc citreum* ATCC 49370	1505	100.0	NR 041727.1
S-03	*Weissella viridescens* NRIC 1536	1479	100.0	NR 040813.1
S-04	*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293	1549	100.0	NR 074957.1
S-05	*Lactobacillus sakei* NBRC 15893	1499	100.0	NR 113821.1
S-06	*L. mesenteroides* ATCC 8293	1549	100.0	NR 074957.1
S-07	*L. mesenteroides* ATCC 8293	1549	100.0	NR 074957.1
S-08	*L. mesenteroides* ATCC 8293	1549	100.0	NR 074957.1
S-09	*L. mesenteroides* subsp. jonggajibkimchii DRC1506	1551	100.0	NR 157602.1

2. 식해에서 분리된 유산균의 생화학적 특성

식해에서 분리된 9종의 유산균(*W. halotolerans* S-01, *L. citreum* S-02, *W. viridescens* S-03, *L. mesenteroides* S-04, *L. sakei* S-05, *L. mesenteroides* S-06, *L. mesenteroides* S-07, *L. mesenteroides* S-08, *L. mesenteroides* S-09)에 대하여 당 이용성은 API 50CHL kit를 이용하여 분석하였다(Table 3). *W. halotolerans* S-01의 경우 D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitiol, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetyl glucosamine, D-maltose, D-trehalose, gluconate 등과 같은 10개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. 다음으로 *L. citreum* S-02의 경우 D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitiol, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-maltose, D-melibiose, D-saccharose, D-Trehalose, D-turanose, gluconate, 2-ketogluconate 등과 같은 17 가지의 당 이용성에 대하여 양성을 나타내었다. *W. viridescens* S-03의 경우 D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetylglucosamine, esculin ferric citrate, D-maltose, D-Trehalose, gluconate 등과 같은 8개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. mesenteroides* S-04의 경우 D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetyl glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-rafinose, gentiobiose, D-turanose, gluconate 등과 같은 22개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. sakei* S-05의 경우 D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetyl glucosamine,

Table 3. Carbohydrate utilization of lactic acid bacteria isolated from *Sik-hae* using API 50 CHL kit

Characteristics	Isolated LAB strains								
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08	S-09
Control	-[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+[b]	-	+
D-Ribose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	+	+	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl β-D-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	+	-	+	+	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitiol	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl D-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl D-Glucopyranoside	+	+	-	+	+	-	+	-	+
N-AcetylGlucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Arbutin	-	+	-	+	+	+	+	-	+

[a], Negative reaction. [b], Positive reaction

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Table 3. Continued

Characteristics	Isolated LAB strains								
	S-01	S-02	S-03	S-04	S-05	S-06	S-07	S-08	S-09
Esculin ferric citrate	- [a]	+ [b]	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	-	-	-	+	+	+	-	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Lactose	-	-	-	+	-	+	-	+	+
D-Melibiose	-	+	-	+	+	+	+	-	+
D-Saccharose (sucrose)	-	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinose	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	-	-	+	+	+	-	-	+
D-Turanose	-	+	-	+	+	+	+	-	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconate	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2-ketogluconate	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a], Negative reaction. [b], Positive reaction

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose. D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-rafinose, gentiobiose, D-turanose, gluconate 등과 같은 21개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. mesenteroides* S-06의 경우 D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetyl glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose. D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-rafinose, gentiobiose, D-turanose, gluconate 21개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. mesenteroides* S-07의 경우 L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetyl glucosamine, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-maltose, D-melibiose, D-saccharose , D-trehalose, D-rafinose, D-turanose, gluconate 등과 같은 19개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. mesenteroides* S-08의 경우 D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, N-acetyl glucosamine, amygdalin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-lactose, D-saccharose, D-trehalose, inulin, Amidon, D-lyxose 등과 같은 18개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. *L. mesenteroides* S-09의 경우 L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, α-methyl D-glucopyranoside, N-acetyl glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose. D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-rafinose, gentiobiose, D-turanose, gluconate 등과 같은 23개의 당에 대하여 양성을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 보면 식해에서 분리된 유산균 중 *L. mesenteroides* S-09 가 가장 많은 종류의 당(23종) 이용성을 가지고 있는 것으로 분석되었으며 가장 적은 당 이용성을 가지고 있는 분리 유산균은 *W. viridescens* S-03 (8종) 이었다.

3. 식해에서 분리된 유산균의 probiotics 특성

3.1. 식해에서 분리된 유산균의 내산성 특성

유산균 또는 probiotics의 경구 섭취를 통한 건강 기능성을 기대하기 위해서는 위에서 생존할 수 있는 내산성과 소화관내에서 생존할 수 있어야 한다(Speck, 1976; Soomro et al., 2002; Liong et al., 2005). 이에 본 연구에서는 식해에서 분리된 유산균에 대한 내산성 실험을 진행하였다. pH 2.0으로 조정한 용액에서의 시간의 경과에 따른 생존균수 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 대조구로 상용적으로 많이 사용되고 있는 GG균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 생존균수는 0분에서 9.81 log CFU/mL, 30분에서 9.75 log CFU/mL 그리고 2시간 처리에서는 9.69 log CFU/mL로 강한 내산성을 가지는 것으로 확인되었다. 식해에서 분리된 유산균들은 생존균수는 30분에서 8.10-9.27 log CFU/mL, 2시간 처리에서는 6.25-8.75 log CFU/mL 수준으로 확인되었다. 분리된 유산균들을 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033과 비교하면 다소 낮은 내산성을 가지는 것으로 나타났다. Liong et al. (2005)의 내산성 실험 결과에서도 *Lactobacillus acidophilus* 4종 및 *Lactobacillus casei* 7종의 분리 유산균들도 pH 조건별 시간의 경과에 따라 생존율이 감소하는 결과를 나타내었으며 본 연구의 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 이러한 연구 결과와 비교하였을 때 식해에서 분리된 유산균 중 *L. mesenteroides* S-04 와 *L. mesenteroides* S-09는 pH 2.0에서 2시간 후에도 생존균수는 8.70-8.75 log CFU/mL 수준으로 확

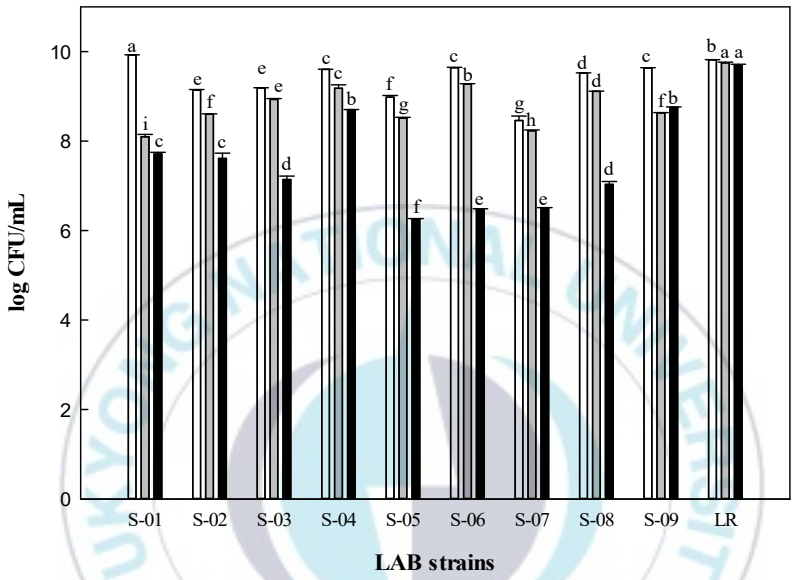

Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae* in 0.1 M phosphate buffer saline adjusted to pH 2.0 for 0 m (□), 30 m (▨), 120 m (■). LAB strains were exposured for the indicated time. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

인되었으며 상대적으로 우수한 내산성을 가지는 것으로 판단된다.

3.2. 식해에서 분리된 유산균의 내담즙성 특성

유산균 또는 probiotics의 소화관에서의 생존섭취를 통한 건강 기능성을 기대하기 위해서는 위산에 대한 내산성 뿐만 아니라 담즙산에 대한 내성을 가져야 장에서 생존할 수 있어야한다(Speck. 1976; Gilliland, 1979). Probiotics 균주 선별에 있어 요구되어지는 담즙산의 농도는 0.3% 정도라고 알려져 있으며 이 조건하에서 지역별 식해에서 분리된 유산균의 내담즙성 실험을 진행하였다(Erkkila and Petaja, 2000). 0.3%의 oxgall을 첨가한 MRS broth 배지와 음성 대조구로 oxgall을 첨가하지 않은 MRS broth 배지에서의 생존균수 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 대조구로 상용적으로 많이 사용되고 있는 GG 균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033는 0.3% oxgall의 첨가 유무에 큰 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 식해에서 분리된 유산균의 균수는 oxgall을 첨가하지 않은 배지에서 7.32-10.63 log CFU/mL 수준으로 확인되었으며 0.3% oxgall을 첨가한 배지에서는 5.68-8.77 log CFU/mL 수준으로 확인되었다. 식해에서 분리된 유산균주 중 *W. halotolerans* S-01의 감소균수는 2.76 log CFU/mL로 인공 담즙에 대하여 가장 많은 영향을 많이 받는 것으로 나타났다. 그 외의 나머지 분리균주는 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033 과 비교하여 낮은 생존율을 보였으나 상대적으로 높은 내담즙성을 가지는 것으

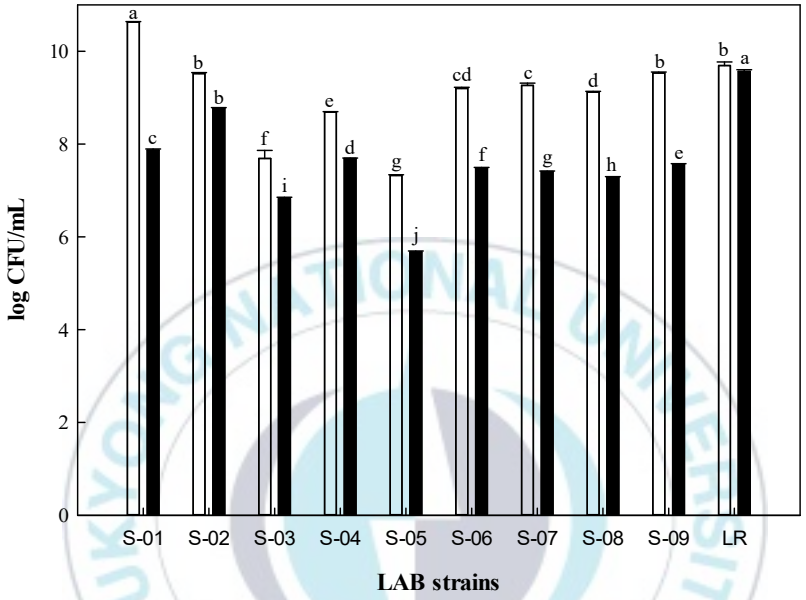

Fig. 2. Bile tolerance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae* in the presence of 0% (□) and 0.3% (■) oxgall. LAB strains were exposured for 7 h. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

로 판단된다. Sim et al. (1995)은 내산성이 강한 균주들이 상대적으로 담즙산 내성이 우수하다고 보고 하였으며, 본 연구 결과와 유사한 결과 양상을 가지는 것으로 판단된다.

3.3. 식해에서 분리된 유산균의 내염성 특성

식해는 어육 등의 주 원료에 10% 보다 낮은 소금을 가하여 익힌 곡류와 같은 부재료를 혼합하여 숙성을 통하여 풍미와 조직감이 생성되는 전통 수산발효식품이다(Cha et al., 2004; Han et al., 2013b; Jeong et al., 2015). 유산균을 식해 제조의 종균제로 사용하기 위해서는 발효에 있어 잘 적응하기 위한 내염성이 있어야 하며 이에 본 연구에서 식해에서 분리된 유산균에 대한 내염성 실험을 진행하였다. Sodium chloride를 첨가하여 3%, 5%, 7% 및 10%로 조정된 MRS broth 배지 및 sodium chloride를 첨가하지 않은 MRS broth 배지에서의 생존균수 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대조구로 상용적으로 많이 사용되고 있는 GG균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 생존균수는 0%에서 9.42 log CFU/mL, 3%에서 9.14 log CFU/mL, 5%에서 9.20 log CFU/mL, 7%에서 7.66 log CFU/mL, 10%에서 4.82 log CFU/mL로 3%, 5%의 sodium chloride 첨가는 생육에 있어 큰 영향을 주지 않았으나 7%, 10%의 sodium chloride 첨가는 생육에 저해를 주는 것으로 나타났다. 식해에서 분리된 유산균수는 0%에서 8.96-9.66 log CFU/mL, 3%에서 8.46-9.69 log CFU/mL, 5%에서 5.84-9.44 log CFU/mL, 7%에서 6.01-9.43 log CFU/mL, 10%에서 4.69-9.52 log CFU/mL 수준으

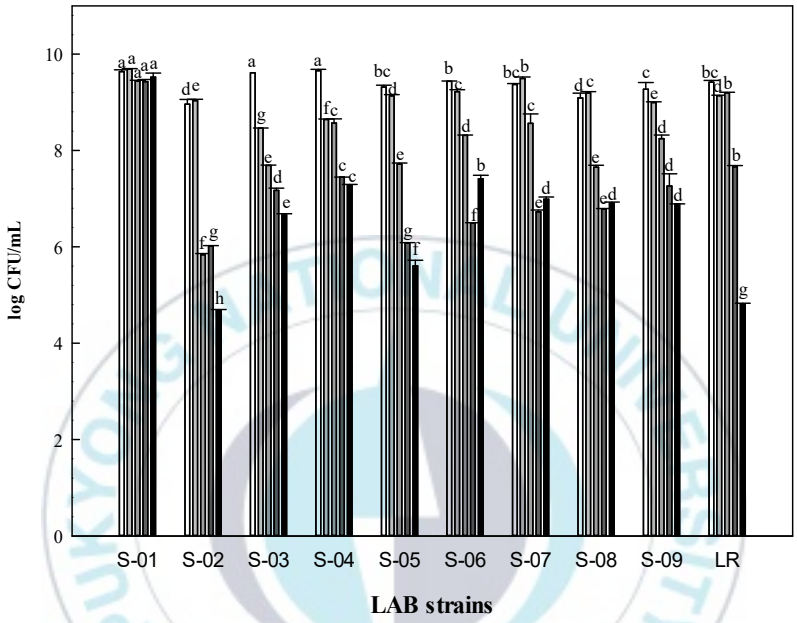

Fig. 3. Salt tolerance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae* in MRS broth containing 0% (□), 3% (□), 5% (■), 7% (■) and 10% (■) concentrations of NaCl. LAB strains were exposured for 24 h. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

로 확인되었다. 이를 종합해 보면 식해에서 분리된 유산균은 3%의 sodium chloride 첨가는 생육에 있어 큰 영향을 받지 않았으나 5%, 7%, 10%의 sodium chloride 첨가는 대부분의 분리균주 생육에 저해를 주는 것으로 판단된다. Choi et al. (2014)은 3% NaCl은 김치에서 분리한 *Lactococcus lactis*은 3% sodium chloride에서 108.5%, *Lactobacillus brevis*은 3%의 NaCl에서 103.1%의 생존율을 보고하였다. 또한, Park et al. (2017)의 보고에서 김치에서 분리한 유산균주 23종은 9%의 sodium chloride 조건 하에서 15종의 균주만 생존하였다고 보고하였다. 이러한 연구 결과를 고려하였을 때, 유산균은 sodium chloride의 첨가 수준에 따라 생육에 있어 영향을 받는 것으로 판단되며 본 연구 결과와 유사한 결과 양상을 가지는 것으로 나타났다.

4. 식해에서 분리된 유산균의 항산화 활성 및 특성

4.1. 식해에서 분리된 유산균의 DPPH radical 소거 활성

활성산소(oxygen free radical)는 강한 산화력을 지녀 생체조직 및 세포에 파괴한다고 알려져 있으며 일부 유산균은 활성산소로부터 자신을 보호할 수 있는 항산화 활성을 보이는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2012). DPPH radical 소거 활성 측정은 항산화 활성을 검증하기 위한 방법으로 중의 하나로 DPPH radical이 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방

향족 아민류 등의 항산화능을 지닌 물질에 의해 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 정도를 측정하는 것이다(Blois, 1958). 식해에서 분리된 유산균의 DPPH radical 소거 활성 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 양성대조구인 0.2 mM ascorbic acid의 DPPH radical 소거 활성은 96.11%로 나타났으며 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 소거 활성은 88.29%, 식해에서 분리된 유산균의 소거 활성은 73.57-89.51%의 범위로 나타났다. 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033와 비교하여 *W. viridescens* S-03, *L. sakei* S-05, *L. mesenteroides* S-06 및 *L. mesenteroides* S-09는 유사한 소거 활성을 가지는 것으로 확인되었다. Oh and Jung. (2015)은 한국의 전통 알코올 음료에서 분리한 7종의 유산균은 30.41-39.64%의 범위의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈다고 보고하였으며 Jung and Kim (2015)은 시판 막걸리에서 분리한 6종의 유산균은 10.30-32.44%의 범위의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈다고 보고하였다. 또한, Seo et al. (2020)은 전통발효식품인 메주에서 분리한 6종의 유산균은 21.23-28.4%의 범위의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 연구 결과와 비교하였을 때 식해에서 분리된 유산균은 상대적으로 우수한 DPPH radical 소거 활성을 가지는 것으로 판단된다.

4.2. 식해에서 분리된 유산균의 ABTS radical 소거 활성

일부 유산균은 활성산소로부터 자신을 보호하기 위해 항산화 활성을 나타내며 ABTS radical 소거 활성은 항산화 활성을 검증하기 위한 방법으로

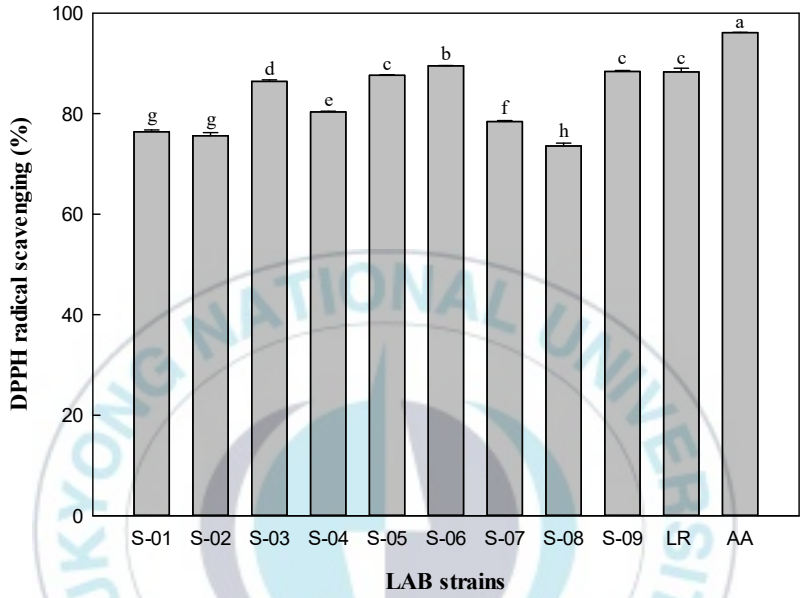

Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033; AA, 0.2 mM L-ascorbic acid. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

.

중의 하나로 ABTS 와 potassium persulfate의 반응을 통하여 생성된 청녹색 $ABTS^{\bullet+}$의 탈색 정도를 통하여 식품 추출물 등에 적용 가능한 항산화능 측정법이다(Re et al., 1999; Li et al., 2012). 식해에서 분리된 유산균의 ABTS radical 소거 활성 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 양성대조구인 5 mM trolox의 ABTS radical 소거 활성은 93.45%로 나타났으며 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 소거 활성은 74.94%, 식해에서 분리된 유산균의 소거 활성은 62.18-81.07%의 범위로 나타났다. 분리균주 중 *W. halotolerans* S-01 가 81.07%로 가장 높은 소거 활성을 나타냈으며 *L. mesenteroides* S-04, *L. sakei* S-05, *L. mesenteroides* S-06, *L. mesenteroides* S-07, *L. mesenteroides* S-08, *L. mesenteroides* S-09는 대조구와 유사한 소거 활성을 가지는 것으로 나타났다. Ji et al. (2015)은 김치 및 유아의 대변에서 분리한 11종의 유산균주는 50.00% 보다 높은 ABTS 소거 활성을 나타냈다고 보고하였으며, Cho and Oh (2010)은 김치, 분변, 유제품 등에서 분리한 23종의 유산균주는 평균적으로 74%의 라디칼 감소능 가지는 것으로 보고하였다. 이러한 연구 결과와 비교하였을 때 식해에서 분리된 유산균은 상대적으로 우수한 ABTS radical 소거 활성을 가는 것으로 판단된다.

4.3. 식해에서 분리된 유산균의 FRAP 활성

산소를 이용하는 모든 생명체는 에너지 대사 과정에서 산소부산물로써 활성산소종이 생성된다. 체내에서 활성산소종이 지나치게 많아지면 세포의

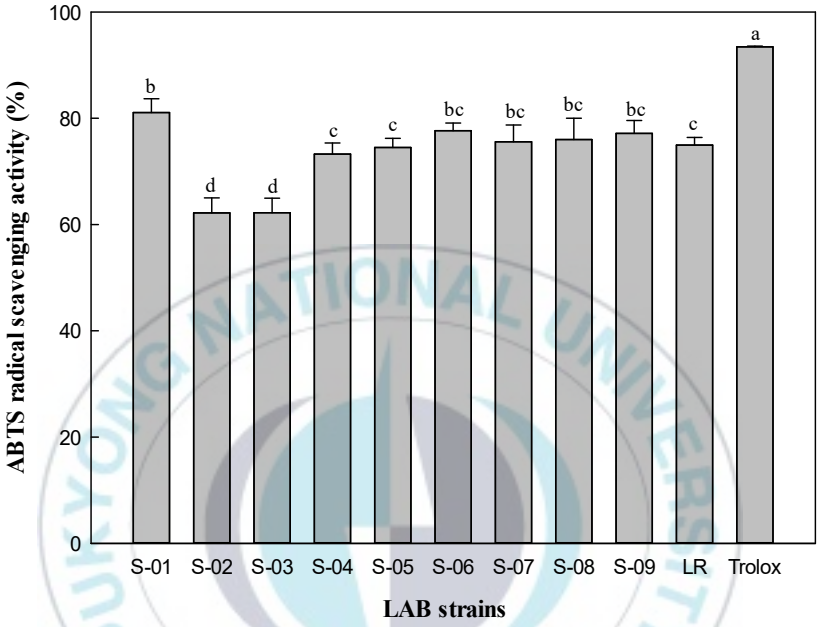

Fig. 5. ABTS radical scavenging activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033; Trolox, 5 mM Trolox. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

주요한 기능을 파괴하여 제 기능을 하지 못하게 하며, 노화의 원인이 되기도 한다(Balaban et al., 2005). FRAP 활성은 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPIZ) 복합체가 항산화제에 의하여 ferric tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPIZ) 형태로 환원되고 593 nm에서 최대 흡수율을 가지는 진한 청색을 발생시킨다(Lim and Lim. 2013). 식해에서 분리된 유산균의 FRAP 활성 결과는 Fig. 6에 나타내었다. FRAP 활성 결과 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 0.85 mM AA/mg, 식해에서 분리된 유산균은 0.55-1.11 mM AA/mg의 범위로 나타났다. 식해에서 분리된 유산균 중 *L. citreum* S-02, *W. viridescens* S-03, *L. mesenteroides* S-09의 FRAP 활성 결과는 1.02-1.11 mM AA/mg의 범위로 나타났으며, 대조구 보다 우수한 FRAP 활성을 가진 것으로 확인되었다. Oh et al. (2018)은 유아의 대변에서 분리한 8건의 *Lactobacillus* sp. 중 2개의 유산균주에서 1,734.3 μM의 FRAP 활성을 나타내었다고 보고하였으며, Thaipong et al. (2006)의 보고에서 구아바 추출물에 대한 FRAP 실험은 높은 재현성을 가지며 간단하고 빠르게 수행되었다고 보고했다. 분석 방법의 차이로 본 연구와 비교 분석은 어렵지만 환원력을 이용한 항산화 활성 측정하는 원리를 고려하였을 때 식해에서 분리된 유산균은 생체 내에서 높은 항산화 활성을 가질 것으로 판단된다.

4.4. 식해에서 분리된 유산균의 ORAC 활성

호흡과정에서 체내로 공급된 산소 중 일부분은 정상세포 대사의 부산물

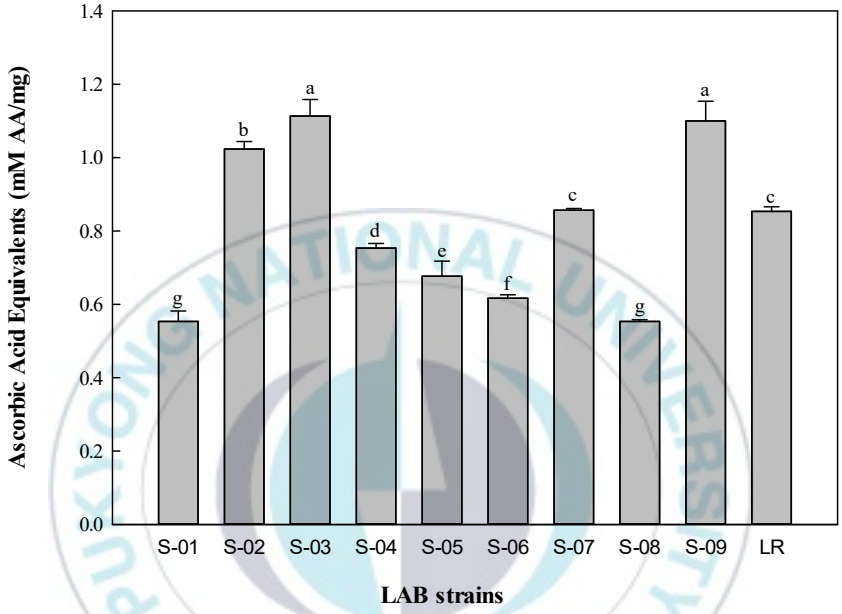

Fig. 6. Ferric reducing antioxidant power of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

로 활성 산소종이 생성되어 산화적 스트레스를 유발하여 지질, 단백질, 탄수화물 및 DNA 등의 생물학적 분자에 손상을 일으킨다(Kim and Park, 2011). Peroxyl radical은 활성산소종의 일종이며, ORAC assay에서 peroxyl radical은 fluorescent probe와 반응하여 비형광의 생성물을 형성하는데, 항산화 활성은 시간에 따른 비형광 생성물의 양과 감소율을 평가하여 측정하는 방법이다 (Prior et al., 2005). 식해에서 분리된 유산균의 ORAC 활성 결과는 Fig. 7에 나타내었다. ORAC 활성 결과 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 143.66 mM TE/mL, 식해에서 분리된 유산균은 140.25-156.57 mM TE/mL의 범위로 나타났다. 식해에서 분리된 유산균 모두 대조구와 유사하거나 높은 ORAC 활성을 가진 것으로 확인되었다. 그 중, *W. halotolerans* S-01, *L. mesenteroides* S-08, *L. mesenteroides* S-09의 ORAC 활성 결과는 152.47-156.57 mM TE/mg의 범위로 나타났으며 상대적으로 우수한 활성을 가지는 것으로 확인되었다. Oh et al. (2018)은 유아의 대변에서 분리한 8건의 *Lactobacillus* sp. 중 3개의 유산균주에서 우수한 ORAC 활성이 나타났으며 가장 우수한 유산균주의 ORAC 활성은 2.4 mM로 분석되었다고 보고하였다. 실험 방법의 차이로 본 연구결과와의 비교분석은 어려우나 peroxyl radical 제거 활성을 통하여 항산화 활성을 측정하는 ORAC 실험을 고려하였을 때 식해에서 분리된 유산균은 생체 내에서 높은 항산화 활성을 가질 것으로 판단된다.

본 연구의 항산화 활성 결과를 종합하였을 때 식해에서 분리된 9종의 유산균주 중 *L. mesenteroides* S-09 가 가장 우수한 항산화능을 가지는 것으로 판단된다.

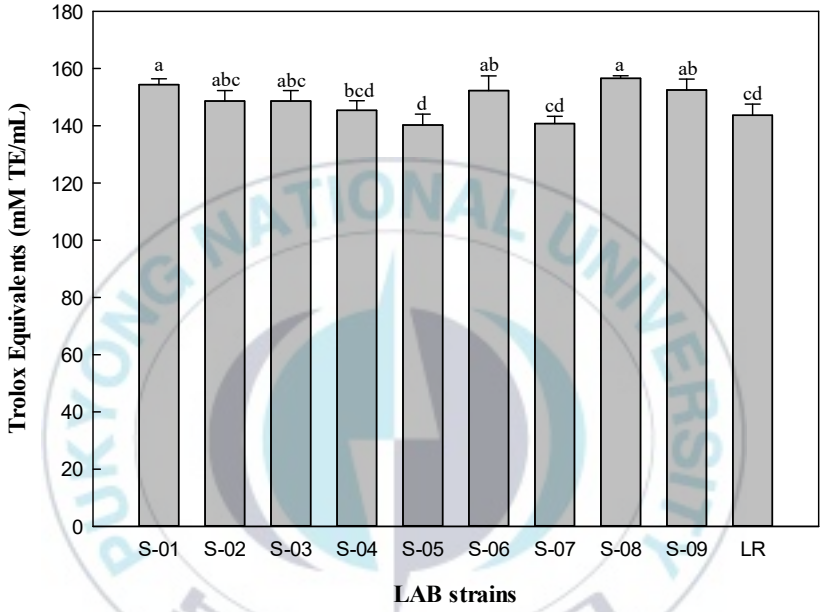

Fig. 7. Oxygen radical antioxidant capacity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

5. 식해에서 분리된 유산균의 안전성 확인

5.1. 식해에서 분리된 유산균의 용혈 독성 분석

Probiotics는 체내 환경 하에서 생존하여 장관 내 유용한 생리활성을 나타내야 하며 돌연변이 유발이나 용혈능이 없어야 한다고 알려져 있다(Salminen et al., 1998). 알파 용혈(α-hemolysis)은 부분 용혈이라고 지칭되기도 하며 세균 집락 주위로 녹색 또는 갈색으로 변색이 일어난다. 베타 용혈(β-hemolysis)은 완전 용혈이라고 지칭되기도 하며 세균 집락 주위로 갈색 또는 녹색의 변색을 포함하지 않는 투명환을 형성한다. 감마 용혈(γ-hemoylsis)은 용혈이 없음을 나타내며 세균 집락 주위에 반응이 없어야 한다(Buxton, 2005). 식해에서 분리된 유산균의 용혈 독성 결과는 Table 4에 나타내었다. 실험에 사용된 9종의 식해에서 분리된 유산균과 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 모두 용혈능이 없는 감마 용혈 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Ji et al. (2015)의 보고에서는 김치 및 유아의 대변에서 분리한 11종의 유산균에서 모두 감마 용혈을 나타났다고 보고하였으며 Thirabunyanon and Hongwittayakorn (2013)의 보고에서는 유아의 대변에서 분리한 15종의 유산균에서 모두 감마 용혈을 나타났다고 보고하였다. 하지만, Lim et al. (2016)의 보고에서 멸치 젓갈로부터 분리된 유산균주 중 *Enterococcus faecium* 과 *Pediococcus pentosaceus*에서 알파 용혈 활성을 나타내었다고 보고하였다. 이러한 보고를 통하여 식품유래 유산균 일부는 용혈

Table 4. Hemolysis activity of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*

LAB strains	Hemolysis		
	α[a]	β[b]	γ[c]
Weissella halotolerans S-01	-	-	+
Leuconostoc citreum S-02	-	-	+
Weissella viridescens S-03	-	-	+
Leuconostoc mesenteroides S-04	-	-	+
Lactobacillus sakei S-05	-	-	+
L. mesenteroides S-06	-	-	+
L. mesenteroides S-07	-	-	+
L. mesenteroides S-08	-	-	+
L. mesenteroides S-09	-	-	+
Lactobacillus rhamnosus KCTC 5033	-	-	+

[a], Incomplete hemolysis. [b], Complete hemolysis. [c], Non-hemolysis

활성을 나타내는 것을 알 수 있으며 본 연구에서는 분리된 유산균들은 모두 감마 용혈을 나타내어 생체 세포내에서 용혈 독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다.

5.2. 식해에서 분리된 유산균의 항생제 내성 분석

유산균은 많은 항생제에 대한 본질적인 내성을 가지고 있다고 보고되어 있으며 식품의 starter로 사용되는 유산균주 및 probiotics에 대한 안정성 확립을 위하여 항생제 내성에 대한 연구는 지속적으로 증가하고 있다 (Salminen et al., 1998; Mathur and Singh, 2005). 이에 본 연구에서 분리된 유산균주를 대상으로 항생제 내성 분석을 실시하였다. 식해에서 분리된 유산균의 항생제 내성 결과는 Table 5에 나타내었다. 식해에서 분리된 유산균에 대한 항생제 내성 결과는 다음과 같다. *W. halotolerans* S-01은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 256 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 4 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. citreum* S-02은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 256 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 16 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *W. viridescens* S-03은 kanamycin, streptomycin, tetracycline 항생제에 대하여 MIC 값이 64 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 2

Table 5. Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*

LAB strains	Antibiotic resistance (MIC, μg/ml)					
	Erythromycin	Kanamycin	Streptomycin	Tetracycline	Penicillin G	Ampicillin
Weissella halotolerans S-01	0.5	> 512	256	4	≤ 0.25	≤ 0.25
Leuconostoc citreum S-02	≤ 0.25	> 512	256	16	≤ 0.25	0.5
Weissella viridescens S-03	2	> 512	> 512	64	1	≤ 0.25
Leuconostoc mesenteroides S-04	≤ 0.25	> 512	> 512	8	0.5	2
Lactobacillus sakei S-05	≤ 0.25	32	32	2	≤0.25	≤ 0.25
L. mesenteroides S-06	0.5	> 512	> 512	16	1	2
L. mesenteroides S-07	2	> 512	> 512	16	2	4
L. mesenteroides S-08	≤ 0.25	> 512	> 512	16	0.5	1
L. mesenteroides S-09	≤ 0.25	64	32	2	≤ 0.25	0.5
Lactobacillus rhamnosus KCTC 5033	0.5	> 512	512	4	≤ 0.25	2

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* S-04은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 512 μg/mL 보다 높아 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 8 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. sakei* S-05은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 32 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 2 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* S-06은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 512 μg/mL 보다 높아 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 16 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* S-07은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 512 μg/mL 보다 높아 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 16 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* S-08은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 512 μg/mL 보다 높아 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 16 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* S-09은 kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 32 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 2 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. 대조구로 상용적으로 많이 사용되고 있는 GG균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 항생제 내성 결과는

kanamycin, streptomycin 항생제에 대하여 MIC 값이 512 μg/mL 이상으로 항생제에 대한 내성이 비교적 높았으나 erythromycin, tetracycline, penicillin G, ampicillin 항생제에 대한 MIC 값이 4 μg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. Lim et al. (2016)은 멸치 젓갈 10종에서 분리한 유산균주 중 *L. mesenteroides*은 kanamycin에 대한 저항성이 높았으나 ampicillin에 대해서는 감수성이 높다고 보고하였으며 본 연구 결과와 유사한 결과 양상을 가지는 것으로 판단된다. 또한, 다양한 식품원에서 분리된 유산균들이 kanamycin, streptomycin에 상대적으로 높은 항생제 내성을 나타낸다는 다른 연구자들의 연구결과와도 유사하였다(Mathur and Singh, 2005; Kang et al., 2017).

5.3. 식해에서 분리된 유산균의 biogenic amine 생성능 분석

Probiotics는 비병원성이어야 하며 biogenic amines 등과 같은 유해물질 생성에 따른 독성 발생 가능성에 대하여 반드시 안전성이 확보되어야 한다고 알려져 있다(Lim et al., 2016). 미생물의 활동을 통하여 생성된 생체아민은 개인 민감도에 따라 인체에 두통, 구토 및 설사 등의 영향을 줄 수 있다(Barbieri et al., 2019). 식해에서 분리된 유산균의 biogenic amines 생성능 결과는 Table 6에 나타내었다. 실험에 사용된 9종의 식해에서 분리된 유산균과 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 모두 histidine, lysine, ornithine 및 tyrosine을 분해할 수 없어 이들 물질을 전구체로하는 biogenic amine을 생성

Table 6. Production of biogenic amines of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*

LAB strains	His	Cad	Put	Tyr
Weissella halotolerans S-01	-[a]	-	-	-
Leuconostoc citreum S-02	-	-	-	-
Weissella viridescens S-03	-	-	-	-
Leuconostoc mesenteroides S-04	-	-	-	-
Lactobacillus sakei S-05	-	-	-	-
L. mesenteroides S-06	-	-	-	-
L. mesenteroides S-07	-	-	-	-
L. mesenteroides S-08	-	-	-	-
L. mesenteroides S-09	-	-	-	-
Lactobacillus rhamnosus KCTC 5033	-	-	-	-

[a], Negative. His, Histamine; Cad, cadaverine; Put, putrescine; Tyr, Tyramine.

하지 않는 것으로 분석되었다. Pircher et al. (2007)의 보고에서 발효 소시지 및 치즈에서 분리된 유산균에서 cadaverine 과 putrescine을 생성할 수 있다고 보고하였으며, Moreno-Arribas et al. (2003)의 보고에서는 와인에서 분리된 유산균이 tyramine을 생성할 수 있다고 보고하였다. 한편, Jung et al. (2013)의 보고에서 김치에서 분리된 유산균주 6종은 아미노산 카르복실제거 유전자가 확인되어 지지 않았다고 보고하였다. Lim et al. (2016)은 합성배지 상에서 생체 아민의 생산능이 특정 균주에 따라 상이하며 젓갈에서 분리된 유산균주 중 일부는 tyramine, cadaverine, putrescine을 생성하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 유산균의 분리원 및 균주에 따라 유산균별로 biogenic amines 생성능이 다른 것으로 판단된다.

6. 식해에서 분리된 유산균의 단백 분해 활성

프로테아제는 식품 개발 및 유통기한 연장에 있어서 중요한 역할을 하고 있다(Park et al., 2017). 또한, 식품에 존재하는 유산균은 단백질의 소화성을 향상시키며 장관에 거주하여 건강에 도움되는 것으로 알려져 있다(Garcia-Cano et al., 2019). 식해에서 분리된 유산균의 단백 분해 활성 결과는 Table 7에 나타내었다. 실험에 사용된 9종의 식해에서 분리된 유산균 중 8종의 유산균과 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033 모두 skim milk 분해활성을 나타내는 clean zone이 확인되어 단백질 분해능을 가지는 것으로 확인되었다. 하지만, 식해에서 분리된 유산균 중 *L. citreum* S-02은 5% skim milk를 함

Table 7. Protease activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae*

LAB strains	Clean zone
Weissella halotolerans S-01	+ [a]
Leuconostoc citreum S-02	- [b]
Weissella viridescens S-03	+
Leuconostoc mesenteroides S-04	+
Lactobacillus sakei S-05	+
L. mesenteroides S-06	+
L. mesenteroides S-07	+
L. mesenteroides S-08	+
L. mesenteroides S-09	+
Lactobacillus rhamnosus KCTC 5033	+

[a], Positive. [b], Negative

유하는 배지에서 clean zone이 형성되지 않아 단백질 분해능이 없는 것으로 확인되었다. Park et al. (2017)의 보고에서 가자미밥 식해, 오징어 젓갈, 지누아리 무침에서 분리한 233개의 유산균은 72시간 배양 후, 총 72개의 유산균에서 단백 분해 활성을 나타내었다고 보고하였으며 Lim et al. (2019)의 보고에서도 발효식품에서 분리된 17개의 유산균이 모두 단백 분해 활성을 가지는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 분리된 유산균의 대부분은 단백 분해 활성을 가지는 것으로 나타났다.

7. 식해에서 분리된 유산균의 cholesterol 감소 활성

식해에서 분리된 유산균의 cholesterol 감소 황성 결과는 Fig. 8에 나타내었다. Cholesterol 감소능 결과는 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 84.02%, 식해에서 분리된 유산균은 45.30-81.61%의 범위로 나타났다. 식해에서 분리된 유산균 중 *L. mesenteroides* S-09이 81.61%로 가장 우수한 cholesterol 감소 활성을 보였으며 대조구와 유사한 값을 나타냈다. 다음으로는 *W. viridescens* S-03 (75.11%), *L. sakei* S-05 (71.11%), *L. mesenteroides* S-04 (70.62%) 순으로 나타났다. Park et al. (2017)의 보고에서 대조구로 사용한 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 cholesterol 감소능은 88.10% 로 나타났으며 본 연구 결과와 유사하게 분석되었다. Jung and Kim (2015)의 보고에서 시판 생막걸리에서 분리한 probiotics로의 기능성을 가진 6개의 균주의 cholesterol 저하능은 9.44-68.82%로 나타났다고 보고하였으며 Choi and Chang (2015)의 보고에서는 김치에서

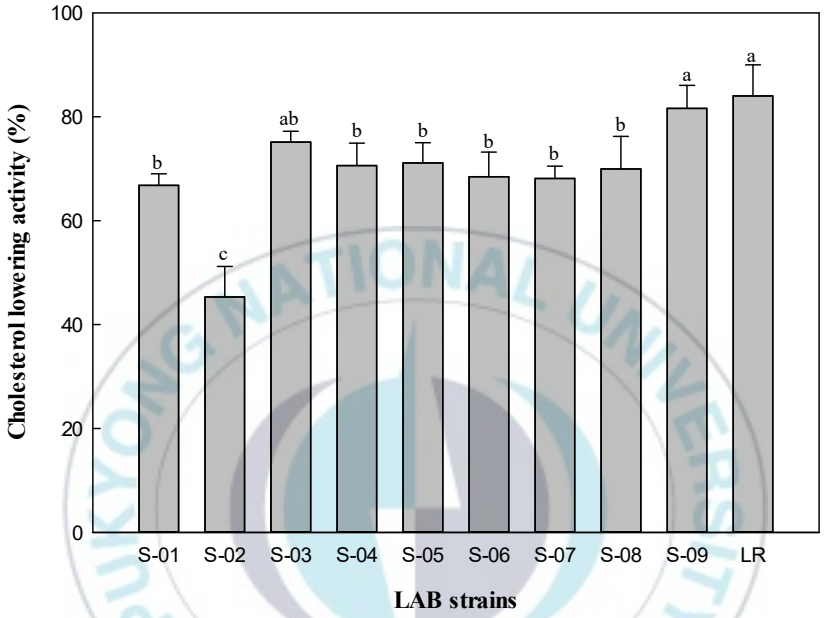

Fig. 8. Cholesterol removal efficacy of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Sik-hae* in MRS broth containing 0.1% cholesterol and 0.3% oxgall. LR, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. The significant difference of means was estimated by Duncan's multiple rang test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($p<0.05$).

분리한 50종의 유산균의 cholesterol 감소능은 3.51-80.86%로 나타났다고 보고하였다. 이러한 연구 결과와 비교하였을 때 식해에서 분리된 유산균 대부분이 우수한 cholesterol 감소 활성을 가지는 것으로 판단된다.

이상의 연구를 종합해 보면 본 연구에서는 식해로부터 내산성, 내담즙성 그리고 내염성이 우수한 probiotic 후보균주를 선발하였으며 이들 중에서 항산화와 콜레스테롤 저감 활성이 우수한 probiotic 유산균을 분리하였다. 분리된 probiotics 모두 용혈활성과 biogenic amine 생성능 그리고 항생제 내성 분석 결과 모두 인체 적용에 문제가 없는 것으로 분석되어 향후 전통 수산 발효 식품의 개발에 있어 높은 활용성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 요 약

식해는 우리나라 고유의 수산발효식품 중의 하나로 원재료인 어패류 및 부재료 (곡류, 고춧가루, 무채, 생강 등)로부터 유래되는 각종 미생물 및 자가효소에 의해 발효된다. 이에 본 연구에서는 식해의 상품성 향상을 위해 지역별 식해에서 분리된 9종의 유산균(*W. halotolerans* 1종, *L. citreum* 1종, *W. viridescens* 1종, *L. mesenteroides* 5종 및 *L. sakei* 1종)과 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033에 대하여 probiotics 특성 확인, 항산화 활성, 안전성 평가, biogenic amine 생성능, 단백 분해 활성 및 cholesterol 감소 활성 등의 실험을 실시하였다.

내산성 실험 결과 분리된 유산균은 pH 조건별 시간의 경과에 따라 생존율이 감소하였으나 상대적으로 높은 내산성을 가지는 것으로 판단된다. 또한, 내담즙성 실험 결과 0.3% oxgall 첨가 유무에 따라 분리된 유산균은 생존균수에 영향을 받았으나 상대적으로 우수한 내담즙성을 가지는 것으로 판단된다. 내염성 실험 결과 분리된 유산균의 생존균수는 3%의 sodium chloride 첨가 수준에 있어 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

식해에서 분리한 유산균의 배양액을 이용하여 실시한 DPPH radical 소거 활성 결과는 73.57-89.51%, ABTS radical 소거 활성 결과는 62.18-81.07%, FRAP 활성 결과는 0.55-1.11 mM AA/mg 그리고 ORAC 활성 결과는 140.25-156.57 mM TE/mg로 모든 항상화 활성 실험에서 대부분의 균주가 대조구인 *L. rhamnosus* KCTC 5033과 비교하여 높거나 유사한 결과가 나타났다.

식해에서 분리한 유산균의 안전성 확인을 위하여 실시한 용혈 독성 실험 결과 모든 균주에서 용혈능이 없는 감마 용혈 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 유산균주 모두 histidine, lysine, ornithine 및 tyrosine을 분해할 수 없는것으로 분석되어 biogenic amine을 생성하지 않는 것으로 나타났다.

프로테아제는 식품의 개발에 있어 중요한 역할을 하며 식해에서 분리된 유산균 중 *L. citreum* S-02을 제외한 모든 분리된 유산균에서 단백질 분해능을 가지는 것으로 나타났다.

분리된 유산균의 cholesterol 감소 활성 결과는 45.30-81.61%의 범위로 분석되었다. 유산균주 중 *L. mesenteroides* S-09의 cholesterol 감소 활성 결과 (81.61%)는 상용적으로 많이 사용되고 있는 GG균주 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 cholesterol 감소 결과 (88.10%)와 유사한 cholesterol 감소 활성을 가지는 것으로 나타났으며 우수한 cholesterol 감소 활성을 가지는 것으로 판단된다.

종합적으로 probiotics 후보균주로 사용 가능성이 높다고 판단된 *L. mesenteroides* S-09은 우수한 내산성, 내담즙성, 내염성, 항산화 활성 및 cholesterol 감소능을 가지는 것으로 나타났다. 우수한 기능성을 가진 *L. mesenteroides* S-09은 전통 수산 발효 식품인 식해 제조에 있어 높은 잠재력을 가질 것이라고 기대되며 본 연구의 결과는 한국의 전통 수산식품에서의 유산균 분리 및 특성 연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

AFRC RF. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-378. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x

Agrawal R. 2005. Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnology, 19, 227-246. https://doi.org/10.1080/08905430500316474

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell, 120, 483-495. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001

Barbieri F, Montanari C, Gardini F, Tabanelli G. 2019. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. Foods, 8, 1-27. https://doi.org/10.3390/foods8010017

Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, 299, 15-27. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5

Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200.

Bover-Cid S, Holzapfel WH. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 53, 33-41. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00152-X

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to

evaluate antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology, 28, 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Cha YJ, Kim SJ, Kim EJ, Kim H, Yoo MY. 2004. Studies on taste compounds in alaska pollack sikhae during fermentation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 33, 1515-1521.

Cho YH, Oh SJ. 2010. Comparative study of lactic acid bacteria for antioxidative activities. Journal of Milk Science and Biotechnology, 28, 31-39.

Choe SN, Kim JB, Yun SS. 2006. Research and development on the traditional fishery fermented foods-chemical composition of helice tridens tientsinensis preserved in brine. Journal of Fisheries and Marine Sciences Education, 18, 209-217.

Choi EA, Chang HC. 2015. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. LWT-Food Science and Technology, 62, 210-217. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.019

Choi HJ, Kim YJ, Lee NR, Park HW, Jang JY, Park SH, Kim TW. 2014. Selection of lactic acid bacteria with antibacterial activity for extension of kimchi shelf-life. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 43, 328-332. https://doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.2.328

Erkkila S, Petaja E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55, 297-300. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00156-4

Garcia-Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E, Jimenez-Flores R. 2019. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. Applied

Microbiology and Biotechnology, 103, 5243-5257. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6

Gilliland SE. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts[1,2]. Journal of Food Protection, 42, 164-167. https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.2.164

Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. Journal of Dairy Science, 67, 3045-3051. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7

Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology, 119, 917-935. https://doi.org/10.1111/jam.12886

Han DW, Han HJ, Kim DG, Im MJ, Cho SY. 2013a. Optimal fermentation conditions (temperature and salt concentration) for preparing flounder verasper moseri jordan et gilberu sikhae. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 46, 689-695. https://doi.org/10.5657/kfas.2013.0689

Han DW, Han HJ, Kim DG, Im MJ, Cho SY. 2013b. Quality characterization of commercial flounder verasper moseri jordan et gilberu sikhae. *Korean Journal of* Fisheries and Aquatic Sciences, 46, 696-701. https://doi.org/10.5657/kfas.2013.0696

Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj Sassi A, Deschamps A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61, 193-197. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00366-4

Jeong EJ, Kim H, Cha YJ. 2015. Quality of alaska pollack theragra chalcogramma sikhae after fermentation for different times. Korean Journal of Fisheries and

Aquatic Sciences, 48, 293-300. https://doi.org/10.5657/kfas.2015.0293

Ji KH, Jang NY, Kim YT. 2015. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 1568-1577. https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01077

Jung JY, Lee SH, Jin HM, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. International Journal of Food Microbiology, 163, 171-179. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022

Jung SE, Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli. Korean Journal of Food Science and Technology, 47, 44-50. https://doi.org/10.9721/KJFST.2015.47.1.44

Kang CH, Kim YG, Han SH, Jeong YA, Paek NS. 2017. Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestine origin. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal, 32, 199-205. http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.2.153

Kim MJ, Park EJ. 2011. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 40, 1053-1062. https://doi.org/10.3746/jkfn.201 1.40.7.1053

Kim YS, Oh SH, Kim SD. 2008. Effect of preparation method and fermentation conditions on microbiological characteristics of sikhae. Korean Journal of Food Preservation, 15, 909-914.

Korea Food Standards Codex. 2020. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.

kr/portal/safefoodlife/foodMeterial/foodMeterialDB.do?menu_grp=MENU_NEW04&menu_no=2968 on May 6, 2020.

Lee HSY, Kim DY, Lee MA, Jang JY, Choue R. 2014. Immunomodulatory effects of kimchi in chinese healthy college students: A randomized controlled trial. Clinical Nutrition Research, 3, 98. https://doi.org/10.7762/cnr.2014.3.2.98

Lee YK, Park BD, Kim SD. 2005. Quality characteristics of squid sikhae by preparation method and fermentation conditions. Journal of the East Asian Society of Dietary Life, 15, 405-412.

Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Wang Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional chinese fermented foods. Food Chemistry, 135, 1914-1919. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048

Lim CSH, Lim SL. 2013. Ferric reducing capacity versus ferric reducing antioxidant power for measuring total antioxidant capacity. Laboratory Medicine, 44, 51-55. https://doi.org/10.1309/lm93w7ktfnpzixrr

Lim ES, Kim YM, Lee EW. 2016. Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy. Korean Journal of Food Science and Technology, 48, 306-316.

Lim KS, Jeong JW, Oh SJ, Moon YI, Koh JH. 2015. Current market trends and perspectives of probiotics. Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics, 3, 46-53. https://doi.org/10.35732/ctlabp.2015.3.2.46

Lim YH, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Abdullah N. 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their

potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. Journal of Animal Science and Biotechnology, 10, 15. https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z

Liong MT, Shah NP. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. Journal of Dairy Science, 88, 55-66. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72662-X

Mathur S, Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. International Journal of Food Microbiology, 105, 281-295. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008

Moreno-Arribas MV, Polo MC, Jorganes F, Munoz R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. International Journal of Food Microbiology, 84, 117-123. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00391-4

Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y. 2018. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. Plos One, 13, 1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192021

Oh YJ, Jung DS. 2015. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. LWT-Food Science and Technology, 63, 437-444. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.005

Pailin T, Kang DH, Schmidt K, Fung DYC. 2001. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. Letters in Applied Microbiology, 33, 45-49. https://doi.org/10.1046/j.1472-

765X.2001.00954.x

Park HY, Park SK, Kim BG, Ryu DG, Lim ES, Kim YM. 2017. Isolation and characterization of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from kimchi. Korean Journal of Food Science and Technology, 49, 377-382.

Park WJ, Lee SH, Lee HJ. 2017. Antibacterial and Proteolytic Activities of Bacterial Isolates from Ethnic Fermented Seafoods in the East Coast of Korea. Korean Society for Food Engineering, 21, 88-92. https://doi.org/10.13050/foodengprog.2017.21.1.88

Pircher A, Bauer F, Paulsen P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. European Food Research and Technology, 226, 225-231. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0530-7

Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290-4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

Buxton R. 2005. Blood agar plates and hemolysis protocols. American Society For Microbiology. http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2885

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rudel LL, Morris MD. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. Journal of Lipid Research, 14, 364-366.

Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84, 197-215. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8

Salminen S, Von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics-A review. International Journal of Food Microbiology, 44, 93-106. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7

Sanders ME. 2008. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. Clinical Infectious Diseases, 46, S58-S61. https://doi.org/10.1086/523341

Seo JW, Yang HJ, Jeong SJ, Ryu MS, Jeong DY. 2020. Potential probiotic activity of *Lactobacillus brevis* SCML 504 isolated from traditional Korean fermented food and the preparation of‘Sikhye’with brown rice. The Korean Society of Food Preservation, 27, 46-57. https://doi.org/10.11002/kjfp.2020.27.1.46

Seo YE, Yoon YH, Kim SJ. 2019. Functionality and safety of probiotics. Journal of Milk Science and Biotechnology, 37, 94-101. https://doi.org/10.22424/jmsb.2019.37.2.94

Seong YJ, Park MS. 2019. Trends in probiotics product. Korean Society of Food Science and Technology, 52, 229-240.

Sim JH, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic fermented products. Korean Journal of Food Science and Technology, 27, 101-104.

Soomro AH, Masud T, Anwaar K. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – A review. Pakistan Journal of Nutrition, 1, 20-24. https://doi.org/10.3923/pjn.2002.20.24

Speck ML. 1976. Interactions among *Lactobacilli* and man. Journal of Dairy Science, 59, 338-343. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84207-5

Tagg JR, McGiven AR. 1971. Assay system for bacteriocins. Applied Microbiology, 21, 943.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 669-675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

Thirabunyanon M, Hongwittayakorn P. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. Applied Biochemistry and Biotechnology, 169, 511-525. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9995-y

Zhao W, Liu Y, Latta M, Ma W, Wu Z, Chen P. 2019. Probiotics database: a potential source of fermented foods. International Journal of Food Properties, 22, 198-217. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1579737

Zulueta A, Esteve MJ, Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry, 114, 310-316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033