

백합(*Meretrix meretrix*)식해에서 분리한 *Pediococcus pentosaceus* SH-10의 생균제적 특성

송현정 · 김강진 · 김희대¹ · 유정희² · 구재근 · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과, ¹충북도립대학 바이오생명의약과

²군산대학교 식품영양학과

Probiotic Properties of *Pediococcus pentosaceus* SH-10 Isolated from the Hard Clam *Meretrix meretrix Shikhae*

Hyun-Jung Song, Kang-Jin Kim, Hee-Dai Kim¹, Jung-Hee Yoo²,
Jae-Geun Koo and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

¹Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Okcheon 373-807, Korea

²Department of Food and Nutrition, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

This study examined the suitability of characteristics of potential strains of probiotic bacteria. Among 25 lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food, the Hard Clam *Meretrix meretrix Shikhae*, the SH-10 strain, which exhibited superior resistance to low pH and bile salts, was selected as a potential probiotic bacteria. By examining carbohydrate utilization, morphological properties, and the 16S rRNA gene sequence, the SH-10 strain was identified as *Pediococcus pentosaceus* (hereafter, *P. pentosaceus* SH-10). *P. pentosaceus* SH-10 was resistant to amikacin, cefotetan, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, streptomycin, and vancomycin. Tests of antimicrobial activities against pathogens such as *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, and *Staphylococcus aureus*, indicated that *P. pentosaceus* SH-10 inhibited the growth of pathogenic bacteria. These results suggest that *P. pentosaceus* SH-10 can be developed as a probiotic bacteria.

Key words: Probiotics, Acid and bile tolerances, Hard Clam *Shikhae*, *Pediococcus pentosaceus* SH-10

서 론

생균제란 숙주의 장내 균총의 능력을 개선하여 숙주의 건강에 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물이라고 정의되고 있으며 여기에는 *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., Yeast 등이 포함된다(Guarner and Schaafsma, 1998). 일반적으로 생균제로 이용되고 있는 미생물은 젖산균으로 위산과 담즙산에 비교적 잘 견딜 뿐만 아니라 병원성 세균에 대한 길항작용을 가지는 경우가 많기 때문이다(Fuller, 1989). 숙주에 대한 젖산균의 영향은 장내세균군의 안정화(Lidbeck and Nord, 1987), 위장관내 병원균의 증식억제(Fernandes et al., 1992), 혈중 콜레스테롤의 저하(Suzuki and Kaizu, 1991), 특이 및 비특이 면역반응의 유도 및 영양소 이용성의 향상(Fernandes et al., 1992), 암 퇴화 및 장내효소 활성감소에 의한 결장암의 예방효과(Goldin and Gorbach, 1984), 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성 등 각종 효과가 알려져 있다. 생균제가 효과적으로 기능을 나타내기 위해서는 섭취한 균이

위와 십이지장 등의 소화기관을 통과하여 살아서 소장까지 도달한 다음 장에서 증식하여야 한다. 또한 장내 부착능이 좋아야 하는데 젖산균이 대장에 상재할 때는 장관 상피세포와의 결합보다는 젖산균 표면에 존재하는 렉틴상 단백질(surface lectin-like protein)과 점막층을 구성하는 단백당체인 mucin의 당쇄 구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되어 있다(Matsumura et al., 1999; Mukai et al., 2004). 현재 국내에서는 *Bifidobacterium* spp. 및 *Lactobacilli*가 상업적으로 발효유제품, 의약품 및 동물약품 등에 사용되고 있는 실정이다.

식해는 수산물에 식염과 곡류, 엽기름, 고춧가루, 마늘 등의 부재료를 넣어 발효 숙성시킨 식품으로 일반 젓갈에 비해 염도가 낮고 유기산 및 유리당 함량이 높아 저식염 젓갈제품을 선호하는 현대인의 기호에 보다 적합하다(Lee et al., 1983; Koo et al., 2009). 식해에 관한 연구는 가자미식해(Lee et al., 1983), 오징어식해(Lee et al., 1996), 명태식해(Cha et al., 2002), 백합식해(Koo et al., 2009) 등의 미생물학적 및 이화학적 특성변화에 관한 연구가 주로 이루어져 왔기 때문에 식해 유래 젖산균의 생균제적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 백합식해에서 분리한 젖산균 *Pediococcus*

*Corresponding author: parkks@kunsan.ac.kr

pentosaceus SH-10을 대상으로 내산성, 담즙내성, 항생제 내성 및 병원성 세균의 억제능력 등의 생균제의 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 배지

실험에 사용한 젖산균은 백합식해의 발효과정에서 분리한 25개 균주를 사용하였으며, *Bacillus cereus* KCCM40138, *Listeria monocytogenes* KCCM40307, *Salmonella choleraesuis* KCCM11806 및 *Staphylococcus aureus* KCCM12214은 젖산균에 의한 억제능을 확인하기 위하여 사용하였다. 젖산균의 배양배지로는 Lactobacilli MRS (Difco, USA) 평판배지 또는 액체배지를 사용하였으며, 병원성균의 배양에는 Brain heart infusion (Difco, USA), Brilliance Bacillus cereus agar (Oxoid, UK), LPM agar (Fluka, Switzerland), XLD agar (Difco, USA) 및 Staphylococcus 110 agar (Difco, USA)를 사용하였다. 각 균주는 35°C에서 정치 또는 진탕 배양하였다.

균주의 동정

분리균주는 형태학적, 생화학적 특성 및 16S rRNA 서열 등을 분석하여 동정하였다. 균주의 형태는 주사전자현미경(S-4800+EDS, Hitachi, Japan)으로 관찰하였으며, 생화학적 특성은 API 50CHL kit (BioMerieux, France)를 사용하여 시험하였다. 16S rRNA 서열 분석을 위한 genomic DNA 추출은 Genomic DNA extraction kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였으며, 16S rRNA 증폭용 primer는 27F primer (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')와 1492R primer (5'-TACCTTGT

TACGACTT-3')를 사용하였다(Dunbar et al., 2000). 모든 PCR 반응에는 Takara kit (Japan)를 사용하였다. PCR 반응액은 0.5 µL(2.5 U) *Taq* polymerase, 5.0 µL *Taq* polymerase buffer (x10), 4.0 µL 2.5 mM dNTP, 35.5 µL dH₂O에 20 pmol의 각 primer 2.0 µL와 1.0 µL의 주형 DNA를 첨가하였다. DNA 증폭은 95°C 30초, 55°C 30초 및 72°C에서 2분을 30회 반복하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel (Sigma, USA)을 사용한 전기영동으로 확인하였으며 목적 DNA는 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)으로 정제하여 pT7Blue T Vector (Novagen, USA)에 TA cloning한 다음 염기서열을 결정하였다. DNA sequence는 ABI310 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 결정하였으며, 염기서열의 상동성 검색은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

내산성 조사

음식물이 위에서 위산에 의해 소화될 때의 조건을 고려하여 배지를 1 N HCl를 사용하여 pH를 2.5 및 3.0으로 조절한 MRS broth 5 mL에 하룻밤 전 배양한 시험균 1/50을 접종하고 35°C에서 3시간 배양한 후에 생균수를 측정하여 내산성 정도를 확인

하였다.

담즙내성 조사

Bile salt를 각각 0.1, 0.3 및 0.5% 첨가한 MRS broth 5 mL에 하룻밤 전 배양한 시험균 1/50을 접종하고 35°C에서 6시간 배양한 후에 생균수를 측정하여 담즙내성 정도를 확인하였다.

Biofilm 생성량 측정

Biofilm 생성량 측정은 이전의 방법을 약간 변형하여 실시하였다(Park et al., 2005). MRS broth에 균을 접종하여 35°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 멸균된 생리식염수로 2회 수세하고 현탁 후 spectrophotometer (Beckman coulter, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 1.0으로 조정하였다. 조정된 균액은 배지에 1/100을 첨가한 후 멸균된 culture tube (Borex, 12×75 mm)에 0.8 mL씩 분주하여 35°C에서 정치 배양하면서 12시간 간격으로 배양 48시간까지 4회 biofilm 량을 측정하였다. 균체는 증류수로 3회 수세하여 제거하고 여기에 0.2% crystal violet (Junsei Chemical Co., Japan) 1.0 mL를 가하여 실온에서 15분간 염색하였다. 증류수로 3회 수세하여 biofilm과 결합하지 않은 염색액은 완전히 제거한 후 dimethyl sulfoxide 1.0 mL를 가하고 vortex하여 완전히 용출한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3개의 시험관을 사용하였으며 3회 반복 실험하여 얻은 평균값으로 계산하였다.

항생제 감수성 검사

항생제 감수성 시험은 Acar and Goldstein의 디스크 확산법으로 검사하였다(Acar and Goldstein, 1991). 디스크는 Oxoid (UK)사의 antimicrobial susceptibility testing disk를 사용하였다: amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), bacitracin (10 units), cefepime (30 µg), cefotetan (30 µg), cefoxitin (30 µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 units), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), sulphamethoxazole/trimethoprim 19:1 (25 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim (5 µg) 및 vancomycin (30 µg). 시험균주는 MRS broth에 접종하여 35°C에서 하룻밤 배양한 후 생리식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland 0.5로 조정하여 MRS agar (Difco, USA)에 도말하였다. 여기에 검사 항생제 디스크를 고착하여 35°C에서 18시간 배양한 후 증식 억제한 생성유무 및 크기로 항생제 감수성을 판독하였다.

병원성균 억제능 측정

젖산균에 의한 병원성균의 억제능 실험은 MRS broth에 병원성 균주와 젖산균주의 혼합배양 후 생균수의 변화를 측정하여 검토하였다. 젖산균과 4종의 병원성균을 각각의 적절한 배지에서 하룻밤 배양한 후 젖산균과 병원성균의 농도를 대략 10⁶-10⁷ CFU/mL가 되도록 조정된 후 MRS broth에 혼합 접종하였다.

Table 1. Survival of lactic acid bacteria isolated from the Hard Clam *M. meretrix Shikhae* in artificial gastric acid after 3 h at 35 °C

Strain	CFU/mL		
	Control	pH 2.5 (survival %)	pH 3.0 (survival %)
3	1.5×10 ⁸	1.1×10 ⁷ (7.3)	6.7×10 ⁷ (44.7)
5	1.6×10 ⁸	1.2×10 ⁷ (7.5)	1.5×10 ⁸ (78.9)
7	1.6×10 ⁸	1.1×10 ⁷ (6.9)	6.1×10 ⁷ (38.1)
8	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁷ (8.3)	3.1×10 ⁷ (25.8)
9	1.4×10 ⁸	2.6×10 ⁷ (18.6)	1.3×10 ⁸ (92.8)
10	2.2×10 ⁸	9.1×10 ⁷ (41.4)	2.7×10 ⁸ (122.7)
11	2.5×10 ⁸	3.1×10 ⁷ (12.4)	2.3×10 ⁸ (92.0)
15	1.9×10 ⁸	2.7×10 ⁷ (14.2)	1.3×10 ⁸ (68.4)
19	1.5×10 ⁸	3.0×10 ⁷ (20.0)	8.2×10 ⁷ (54.7)
22	1.4×10 ⁸	2.8×10 ⁷ (20.0)	9.3×10 ⁷ (66.4)

대조구는 병원성 균만을 MRS broth에 접종 배양하였다. 35 °C에서 24시간 배양한 후 각각의 선택배지에서 생균수를 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

백합식해의 숙성과정 중 젖산균의 변화는 *Lactobacillus* MRS agar를 사용하여 측정하였다. 백합식해 제조 직후의 젖산균 수는 3.6×10⁴ CFU/g 이었으나 저장 기간에 따라 증가하여 저장 9일째 최고치인 5.0×10⁸ CFU/g에 도달한 후 저장 45일까지 거의 변화하지 않았다(Koo et al., 2009). 젖산균의 생균제적 특성을 검토하기 위하여 MRS 고체배지에서 집락의 형태 및 크기 등이 다른 젖산균을 저장 7, 15 및 25일 3회에 걸쳐 총 25개 균주를 순수 분리하여 -80 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

분리균주의 내산성

배지의 pH를 2.5 및 3.0으로 조절한 MRS broth에 실험균주를 접종하여 3시간 후의 생균수 변화, 즉 초기균수에 대한 3시간 후의 생균수 변화 차이로 분리균주에 대한 내산성 정도를 검토하였으며 그 결과는 Table 1에 제시하였다. 실험에 사용한 25개 균주 중 pH 2.5 배지에서 생존율이 5% 이상을 나타내는 10개 균주의 결과만을 나타내었다. 균주번호 10은 pH 2.5 배지에서는 초기균수의 41%, pH 3.0 배지에서는 초기균수보다 약간 상회하는 123%의 생균수를 나타내어 실험에 사용된 25개 균주 중 내산성이 가장 강한 균주로 판명되었다. 균주번호 10번을 제외한 나머지 균주는 pH 2.5 배지에서 20% 이하의 생존율을 나타내고 있으나, pH 3.0 배지에서 대부분의 균주는 50% 이상의 생존율을 보였다. 특히 pH 3.0 배지에서의 균주번호 9번과 11번은 초기균수와 거의 유사한 정도의 생존율을 보이고 있다. 젖산균은 배지의 pH에 의해 생존율은 달라지는데 일반적으로 pH 2.0에서는 급속하게 사멸되며, pH 2.5에서는 생존율은 낮은 편이나

Table 2. Survival of lactic acid bacteria isolated from the Hard Clam *M. meretrix Shikhae* in bile salt of concentration 0.1, 0.3, and 0.5% after 6 h at 35 °C

Strain	CFU/mL			
	Control	Bile 0.1% (survival %)	Bile 0.3% (survival %)	Bile 0.5% (survival %)
3	1.5×10 ⁸	1.6×10 ⁸ (106.7)	1.3×10 ⁸ (86.7)	5.0×10 ⁷ (33.3)
5	1.6×10 ⁸	1.7×10 ⁸ (106.3)	1.3×10 ⁸ (81.3)	4.0×10 ⁷ (25.0)
7	1.6×10 ⁸	2.1×10 ⁸ (131.3)	1.6×10 ⁸ (100.0)	8.0×10 ⁷ (50.0)
8	1.2×10 ⁸	1.8×10 ⁸ (150.0)	1.3×10 ⁸ (108.3)	8.0×10 ⁷ (66.7)
9	1.4×10 ⁸	2.0×10 ⁸ (142.9)	1.5×10 ⁸ (107.1)	9.0×10 ⁷ (64.3)
10	2.2×10 ⁸	3.8×10 ⁸ (172.7)	3.1×10 ⁸ (140.9)	2.1×10 ⁸ (95.5)
11	2.5×10 ⁸	3.3×10 ⁸ (132.0)	2.4×10 ⁸ (96.0)	1.9×10 ⁸ (76.0)
15	1.9×10 ⁸	2.7×10 ⁸ (142.1)	2.1×10 ⁸ (110.5)	1.7×10 ⁸ (89.5)
19	1.5×10 ⁸	2.3×10 ⁸ (153.3)	1.8×10 ⁸ (120.0)	1.4×10 ⁸ (93.3)
22	1.4×10 ⁸	1.9×10 ⁸ (135.7)	1.5×10 ⁸ (107.1)	1.0×10 ⁸ (71.4)

pH 3.0 이상에서는 대체로 생존율이 양호한 것으로 보고되고 있다(Mutai, 1983; Park et al., 1998; Ahn et al., 2002; Kim et al., 2005; Lim et al., 2007). 음식물의 종류 및 섭취량에 따라 차이는 있지만 음식물이 위를 통과하는데 소요되는 시간이 평균 3시간 정도이므로 음식물 섭취에 의해 위산의 pH가 2-3으로 희석된다는 점을 고려해 보면 내산성을 가진 10번 균주의 경우, 음식물과 함께 위를 통과한다면 생존율은 실험값보다도 더 높을 가능성을 배제할 수 없다.

분리균주의 담즙내성

생균제로서 갖춰야 할 조건중의 하나가 담즙산에 대한 내성이다. 담즙은 소장의 상부에서 분비되어 지질식품의 소화 및 흡수를 촉진하며 미생물에 대해서는 세제와 유사한 작용을 함으로써 미생물의 세포막에 영향을 주어 살균작용을 하는 것으로 알려져 있다. 담즙산염(bile salt)의 농도를 0.1, 0.3 및 0.5% 첨가한 MRS broth에 시험균주를 접종하여 35 °C에서 6시간 배양 후 균수변화를 측정하여 담즙내성을 측정하였다. 담즙내성 측정에 사용된 균주는 내산성 실험에서 선별된 10개 균주를 사용하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 0.1% 담즙산염을 첨가한 배지에서의 균수는 다소 차이는 있지만 시험균주 모두 초기균수보다 증가하는 결과를 나타내었고, 0.3% 담즙산염을 첨가한 배지에서의 균수는 초기균수보다 조금 줄거나 증가하는 경향을 나타내었다. 담즙산염이 0.5% 첨가된 배지에서의 균수변화는 모든 시험균주에서 초기균수보다는 감소하는 경향을 나타내었다. 담즙내성이 제일 강한 균주는 내산성이 제일 강했던 균주번호 10번으로 확인되었다. 장내의 oxgall의 농도는 다양하지만 소화관 내에서 저항성 있는 생균제 선별에 이용되는 담즙의 농도는 0.3% 정도라고 알려져 있다(Erkki and Petaja, 2000). 실험에 사용한 10종의 시험균주는 0.3% 담즙산염이 첨가된 배지에서 균수 변화가 초기균수와 거의 차이가 없었기 때문에 이 균주들은 실제 소장을 통과할 때 담즙산의 영향은 크게 받지 않고 소장을 통과

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of isolated strain SH-10 using API 50CHL kit

Characteristics	Result	Characteristics	Result	Characteristics	Result
Gram stain	+	Dulcitol	-	Inulin	-
Catalase	-	Inositol	-	Melezitose	-
Glycerol	-	Mannitol	-	Raffinose	-
Erythritol	-	Sorbitol	-	Starch	-
D-arabinose	-	a-Methyl-D-mannoside	-	Glycogen	-
L-arabinose	+	a-Methyl-D-glucoside	-	Xylitol	-
Ribose D-ribose	+	N-acetyl-glucosamine	+	Gentiobiose	+
D-xylose	-	Amygdalin	+	D-turanose	-
L-xylose	-	Arbutin	+	D-lyxose	-
D-adonitol	-	Esculin	+	D-tagatose	+
Methyl-BD-xylopyranoside	-	Salicin	+	D-fucose	-
D-galactose	+	Cellobiose	+	L-fucose	-
D-glucose	+	Maltose	+	D-arabitol	-
D-fructose	+	Lactose	+	L-arabitol	-
D-mannose	+	Melibiose	-	Gluconate	-
L-sorbose	-	Sucrose	-	2-keto-gluconate	+
Rhamnose	+	Trehalose	+	5-keto-gluconate	-

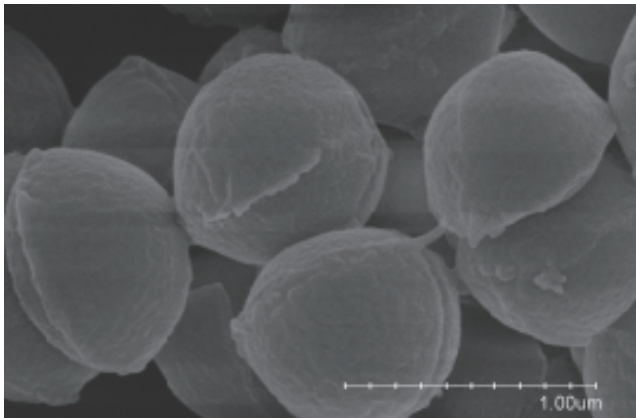


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Pediococcus pentosaceus* SH-10 strain (bar = 1 μm).

하여 대부분의 균은 대장에 도착할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Table 2의 결과는 젖산균의 담즙내성 정도는 균주에 따라 다르나 배지중의 담즙산염의 농도가 증가함에 따라 생존율은 떨어진다. 이는 기존의 보고와 일치하였다(Park et al., 1998; Ahn et al., 2002; Kim et al., 2005; Lim et al., 2007; Yuksekdag and Aslim, 2010).

균주의 동정

내산성 및 담즙내성이 가장 강한 균주번호 10번 균주를 대상으로 형태학적, 생화학적 및 16S rRNA 염기서열 결정 등을 통하여 동정하였다. 주사전자현미경으로 관찰한 결과 이 균주는 구균 형태로 관찰되었다(Fig. 1). Gram 양성, catalase 음성, 비운동성, 무포자 형성 등의 특징을 나타내었다. API 50CHL kit

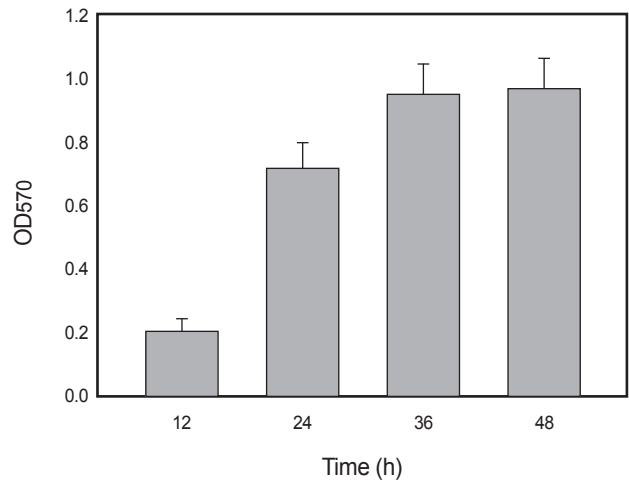


Fig. 2. Biofilm formation of *Pediococcus pentosaceus* SH-10 strain. Biofilms were formed in MRS broth at 35°C for 48 h. Bacteria attached to borosilicate glass tubes were removed by washing three times with distilled water and then stained with crystal violet. The optical density at 570 nm was measured to quantify the amount of dimethyl sulfoxide-solubilized dye. Data shown are the averages of three independent experiments. Error bars represent standard deviations.

를 사용하여 생화학적 특성을 조사하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. L-arabinose와 D-ribose의 5탄당, galactose, glucose, fructose, mannose 및 rhamnose의 6탄당, cellobiose, maltose 및 lactose의 이당류 등을 선택적으로 이용하는 특징을 나타내었으며 API 50CHL kit에 의한 생화학적 결과는 *Pediococcus pentosaceus*와 99%의 상동성을 나타내었다. 또한 16S

Table 4. 16S rRNA sequence (1,535 bp) of *Pediococcus pentosaceus* SH-10 The homology search of sequence data was performed with the web-based program BLAST available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

1	AGAGTTTGAT	CATGGCTCAG	GATGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAAC
61	GAAC TTCGT	TAATTGATTA	TGACG TACTT	G TACTGATTG	AGATTTTAA C	ACGAAGTGAG
121	TGGCGAACGG	GTGAGTAACA	CGTGGGTAAC	CTGCCCAGAA	G TAGGGGATA	ACACCTGGAA
181	ACAGATGCTA	ACACCGTATA	ACAGAGAAAA	CCGCATGGTT	T TCTTTTAA A	AGATGGCTCT
241	GCTATCACTT	CTGGATGGAC	CCGCGGCGTA	T TAGCTAGTT	G GTGAGGTAA	AGGCTCACCA
301	AGGCAGTGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	C ATTGGGACT	GAGACACGGC
361	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA	A TGGACGCAA	GTCTGATGGA
421	GCAACGCCGC	GTGAGTGAAG	AAGGGTTTCG	GCTCGTAAAG	C TCTGTTGTT	AAAGAAGAAC
481	GTGGGTAAAG	GTA ACTGTTT	ACCCAGTGAC	G GTATTTAAC	C AGAAAGCCA	CGGCTAACTA
541	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTA	T CCGGATTTA	TTGGGCGTAA
601	AGCGAGCGCA	GCGGCTCTTT	TAAGTCTAAT	GTGAAAGCCT	T CGGCTCAAC	C GAAGAAGTG
661	CATTGGAAAC	TGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG	G AACTCCATG	T GTAGCGGTG
721	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT	G GCGAAGGCG	G CTGTCTGGT	C TGCAACTGA
781	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG	GGTAGCGAAC	A GGATTAGAT	A CCCTGGTAG	T CCATGCCGT
841	AAACGATGAT	TACTAAGTGT	TGGAGGGTTT	C CGCCCTTCA	G TGCTGCAGC	T AACGCATTA
901	AGTAATCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCCGAAG	G TTGAAACTC	A AAAGAATTG	A CGGGGGCCC
961	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	G GTTTAAATC	G AAGCTACGC	G AAGAACCTT	A CCAGGTCTT
1021	GACATCTTCT	GACAGTCTAA	GAGATTAGAG	G TTCCCTTCG	G GGACAGAAT	G ACAGGTGGT
1081	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	T GTTGGGTTA	A GTCCCAGCAA	C GAGCGCAAC
1141	CCTTATTACT	AGTTGCCAGC	ATTAAGTTGG	G CACTCTAGT	G GAGACTGCCG	G TGACAAACC
1201	GGAGGAAGGT	GGGGACGACG	TCAAATCATC	A TGCCCCTTA	T GACCTGGGC	T ACACACGTG
1261	CTACAATGGA	TGGTACAACG	AGTCGCGAGA	C CGCAGAGTT	A AGCTAATCT	C TTTAAAACCA
1321	TTCTCAGTTC	GGACTGTAGG	CTGCAACTCG	C CTACACGAA	G TCGGAATCG	C TAGTAATCG
1381	CGGATCAGCA	TGCCGCGGTG	AATACGTTCC	C GGGCCTTGT	A ACACACGCC	C GTCACACCA
1441	TGAGAGTTTG	TAACACCCAA	AGCCGGTGGG	G TAACCTTTT	A GGAGCTAGC	C GTCTAAGGT
1501	GGGACAGATG	ATTAGGGTGA	AGTCGTAACA	AGGTA		

Reference(accession no.)	Identity(%)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> NRIC 0123(AB362605)	99.9
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC25745(CP000422)	99.9
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CTSP1(EU855222)	99.8
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LM2632(AY675245)	99.7

Table 5. Inhibition of pathogenic bacteria by co-incubation with *Pediococcus pentosaceus* SH-10

Pathogenic bacteria	(CFU/mL)	
	Control ¹⁾	Viable cells ²⁾
<i>Bacillus cereus</i> KCCM40138	2.9×10 ⁷	<10 ²
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM40307	1.5×10 ⁸	<10 ²
<i>Salmonella choleraesuis</i> KCCM11806	3.5×10 ⁸	<10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM12214	1.1×10 ⁸	<10 ²

¹⁾Only pathogenic bacteria was grown in MRS broth.

²⁾Each strain was grown with pathogenic bacteria in MRS broth.

rRNA 유전자의 염기서열 결과를 blast를 통하여 상동성을 검색한 결과 *Pediococcus pentosaceus*의 16S rRNA 유전자와 99.7 - 99.9%의 상동성을 나타내었다(Table 4). 형태학적, 생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과를 종합해 보면 백합식해에서 분리한 내산성 및 담즙내성이 강한 10번 균주는

*Pediococcus pentosaceus*로 동정되었기에 *Pediococcus pentosaceus* SH-10로 명명하였다. *P. pentosaceus*는 김치 또는 젓갈 발효에 이용되는 호염성의 4련쇄상 구균으로 항균성 peptide인 pediocin을 생산하는 것으로 알려져 있다(Facklam and Elliott, 1995; Osmanagaoglu et al., 2000; Park et al., 2010).

P. pentosaceus SH-10의 biofilm 생성능

장내 점막에 대한 젖산균의 결합은 점막의 특정성분과 젖산균 표면에 존재하는 렉틴상 단백질이 관여한다고 보고되어 있다(Matsumura et al., 1999; Mukai et al., 2004). *P. pentosaceus* SH-10이 사람 또는 동물의 장관세포에의 부착능 여부는 비교 대상의 적절한 대조구가 없었기 때문에 세포 대신 biofilm (생물막) 생성능으로 검토하였다. Biofilm은 미생물이 스스로 분비한 다량체 기질 속에 형성된 3차원적 구조물로서 고체표면 위에 막 형태로 형성되기 때문에 생물막 속의 미생물은 부유생활에 비해 가혹한 외부환경, 항생제, 면역세포의 공격 등에 훨씬 강한 저항력을 갖게 된다(Kolter and Greenberg, 2006). *P. pentosaceus*

SH-10을 MRS broth에 접종 후 시간경과에 따른 biofilm 생성량을 확인한 결과, 배양 12시간 후의 biofilm 생성량은 적었으나 점차 증가하여 36시간 후의 biofilm 양은 거의 정점에 도달하였다(Fig. 2). 시간경과에 따라 biofilm 생성량이 증가하는 결과로 미루어 *P. pentosaceus* SH-10은 사람 또는 동물의 장관 상피세포에 충분히 흡착할 것으로 판단된다.

항생제 내성

다양한 종류의 항생제는 사람과 동물의 치료, 질병예방 및 성장촉진 등 다양한 목적을 위해 사용되고 있으며 지속적으로 다양한 항생제 사용은 각종 항생제 내성균의 증가를 가중시키는 결과로 나타날 가능성이 높다. 생균제로 사용하기 위해서는 일정농도의 다양한 항생제에 견딜 수 있는 젖산균이 생균제로 사용가치가 높다고 할 수 있다. 이를 위해 23종의 항생제 디스크를 사용하여 *P. pentosaceus* SH-10의 항생제 내성을 검토하였다. 그 결과 amikacin, cefotetan, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, oxacillin, streptomycin, sulphamethoxazole/trimethoprim, trimethoprim 및 vancomycin 등 11종의 항생제에 대해서는 내성을 나타낸 반면 나머지 ampicillin, bacitracin, cefepime, cefoxitin, cephalothin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, imipenem, penicillin G, rifampicin 및 tetracycline 등 12종의 항생제에 대해서는 정도의 차이는 있지만 감수성이었다(data not shown). 특히, cephalothin, clindamycin, imipenem 및 penicillin G에는 감수성이 컸다. 보고된 다른 연구자들의 결과와 비교해 보면 결과가 다른 항생제도 있지만 *Pediococcus pentosaceus*는 gentamicin과 vancomycin에는 내성을 갖는다는 결과는 동일하였다(Yuksekdag and Aslim, 2010).

병원성균 억제능 측정

젖산균에 의한 병원성균의 억제 기작으로는 대사산물(유기산, H₂O₂ 등)의 생성, 박테리오킨과 같은 항균물질의 생산, 장내 상피세포의 부착장소 경쟁 등이 알려져 있다(Reid and Burton, 2002). *P. pentosaceus* SH-10에 의한 병원성균 *Bacillus cereus* KCCM40138, *Listeria monocytogenes* KCCM40307, *Salmonella choleraesuis* KCCM11806 및 *Staphylococcus aureus* KCCM12214의 성장억제 능력은 *P. pentosaceus* SH-10와 각각의 병원성균과의 혼합배양에 의해 측정하였다. Table 5에 나타낸 바와 같이 각각의 병원성 균주를 MRS broth에서 24시간 단독 배양하였을 경우, 균수는 2.9×10^7 CFU/mL에서 3.5×10^8 CFU/mL의 범위로 측정되었다. 그러나 *P. pentosaceus* SH-10와의 혼합배양의 경우 4종의 병원성 균의 균수는 1×10^2 CFU/mL 이하로 성장이 심각하게 억제되었다(Table 5). 다양한 종류의 병원성 세균을 사용하지 않았기 때문에 쉽게 결론을 내릴 수는 없지만 *P. pentosaceus* SH-10는 실험에 사용된 병원성 균주에 대한 억제능은 매우 탁월하였다. 또한 본 실험에서는 억제기작에 관해서는 검토하지 않았기 때문에 향후 *P. pentosaceus* SH-10의

병원성균 증식억제에 대한 기작연구가 필요하다고 판단된다.

우리나라 수산발효식품인 백합식해에서 분리한 *P. pentosaceus* SH-10는 내산성, 담즙내성, 다양한 항생제 내성, biofilm 형성능 및 병원성 세균의 발육 억제능 등이 뛰어나 생균제로서 개발 가치의 가능성이 시사되었다.

참고문헌

- Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian V, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 17-52.
- Ahn YT, Lim KL, Ryu JC, Kang DK, Ham JS, Jang YH and Kim HU. 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. Asian-Aust J Anim Sci 15, 1790-1797.
- Cha YJ, Lee CE, Jeong EK, Kim H and Lee JS. 2002. Physiological functionalities of traditional Alaska pollack sikhae. J Korean Soc Food Sci Nutr 31, 559-565.
- Dunbar J, Ticknor LO and Kuske CR. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Appl Environ Microbiol 66, 2943-2950.
- Erkki S and Petaja E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci 55, 297-300.
- Facklam R and Elliott JA. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*. Clin Microbiol rev 8, 479-495.
- Fernandes CF, Chandan RC and Shahani KM. 1992. Fermented dairy products and health In: *the Lactic acid Bacteria*, Volume 1, Wood, BJB (ed), London, New York: ELSEVIA Applied Science, 297-342.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. J Appl Bacteriol 66, 365-378.
- Goldin BR and Gorbach SL. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Am J Clin Nutr 39, 756-761.
- Guarner F and Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. Int J Food Microbiol 39, 237-238.
- Kim SJ, Ma SJ and Kim HL. 2005. Probiotic properties of lactic acid and yeasts isolated from Korean traditional food, *Jeot-gal*. Korean J Food Preserv 12, 184-189.
- Kolter R and Greenberg EP. 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. Nature 441, 300-302.
- Koo JG, Yoo JH, Park KS and Kim SY. 2009. Biochemical and microbiological changes of hard clam *Shikhae* during fermentation. Kor J Fish Aquat Sci 42, 569-573.
- Lee CH, Cho TS, Lim MH, Kang JW and Yang HC. 1983.

- Studies on the sik-hae fermentation made by flat-fish. Kor J Appl Microbiol Bioeng 11, 53-58.
- Lee NH, Oh SW and Kim YM. 1996. Biochemical changes in muscle protein of squid sikhae during fermentation -Effects of temperature and moisture content-. Korean J Food Sci Technol 28, 291-297.
- Lidbeck GJ and Nord CE. 1987. Impact of *Lactobacillus acidophilus* on the normal intestinal flora after administration of two antibiotic agents. Infection 16, 329-335.
- Lim SJ, Jang SS and Kang DK. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 isolated from chicken feces. Kor J Microbiol Biotechnol 35, 98-103.
- Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y and Itoh T. 1999. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. J Dairy Sci 82, 2525-2329.
- Mukai T, Kaneko S, Matsumoto M and Ohori H. 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. Int J Food Microbiol 90, 357-362.
- Mutai M. 1983. Utilization and effect of lactic acid bacteria. Kor J Appl Microbiol Bioeng 11, 339-345.
- Osmanagaoglu O, Beyatli Y, Gunduz U and Sacilik SC. 2000. Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. J Basic Microbiol 40, 233-241.
- Park HS, Lee SJ and Uhm TB. 1998. Selection of microorganism for probiotics and their characterization. J Kor Soc Food Sci Nutr 27, 4433-4440.
- Park KS, Arita M, Iida T and Honda T. 2005. *vpaH*, a gene encoding a novel histone-like nucleoid structure-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* TH3996. Infect Immun 73, 5754-5761.
- Park YL, Lee NK, Park KK, Park YH, Kim JM, Nam HM, Jung SC and Paik HD. 2010. Medium optimization for pediocin SA131 production by *Pediococcus pentosaceus* SA131 against bovine mastitis using response surface methodology. Korean J Food Sci Ani Resour 30, 66-72.
- Reid G and Burton J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect 4, 3119-3124.
- Suzuki Y and Kaizu H. 1991. Effect of cultured milk on serum cholesterol concentration in rats which were fed high cholesterol diets. Anim Sci Technol 62, 565-576.
- Wood BJB. 1992. The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers. UK. Vii-X.
- Yuksekdag Z and Aslim B. 2010. Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (Sucuk). J Microbiol Biotechnol 20, 161-168.

2011년 10월 21일 접수
 2011년 11월 9일 수정
 2011년 11월 23일 수리