

멸치 젓갈로부터 분리된 젓산세균의 프로바이오틱 특성 및 안전성 평가

임은서* · 김영목¹ · 이은우²

동명대학교 식품영양학과, ¹부경대학교 식품공학과, ²동의대학교 생명응용학과

Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy

Eun-Seo Lim*, Young-Mog Kim¹, and Eun-Woo Lee²

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University

¹Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University

²Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University

Abstract This study was conducted to evaluate the functional characteristics and safety properties of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy, a putative probiotic candidate. The following isolates were identified by biochemical profiles, carbohydrate fermentation patterns, and 16S rRNA sequencing: *Enterococcus faecium* AJ06, *Leuconostoc mesenteroides* AJ13, *Pediococcus halophilus* AJ22, *Lactobacillus sakei* AJ29, and *Pediococcus pentosaceus* AJ35. The strains AJ06, AJ22, AJ29 exhibited high tolerance to simulated gastric and intestinal juices and were able to produce bile salt hydrolase on MRS agar plates supplemented with taurocholic acid and/or taurodeoxycholic acid. The strains AJ22 and AJ29, which demonstrated high adherence to Caco-2 cells and resistance to various antibiotics, effectively inhibited the growth of food-borne pathogens by the production of antimicrobial substances. These strains did not show α - or β -haemolysis on blood agar. Furthermore, biogenic amines in MRS broth containing the precursor amino acids were not mutagenic in *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotic properties, safety assessment, salt-fermented anchovy

서 론

젓산세균은 사람이나 동물의 소화관 내에 상재하며 자연계에 널리 분포하는 균으로서 수세기 동안 여러 나라의 전통 발효식품 제조에 주로 이용되고 있다. 많은 사람들이 오랫동안 섭취하여도 독성 유발 가능성이 낮은 안전한 유익균으로 판단되어 이들이 생산한 대사산물은 미국 FDA에서 “generally recognized as safe (GRAS)” 물질로 인정되고 있다(1). 젓산세균은 우유제품이나 침채류 등의 발효식품 스타터로서 발효과정 동안 당을 분해하여 유기산과 박테리옌 등의 항균물질을 생산함으로써 식품의 풍미를 향상시키고 부패균의 증식을 억제하여 저장성을 연장시킬 뿐만 아니라 장내 pH의 산성화를 통한 유해 세균의 증식을 저해시켜 장내 균총을 정상화 시킨다. 게다가 젓산세균은 젓당 분해효소를 분비하여 젓당불내증을 완화시키고, 장 점막 면역 시스템의 기능을 강화시켜 궤양성 대장염이나 과민성 대장증후군을 예방하는 등의 효과가 보고되고 있으며, 장 기능 개선 효능이 탁월한 락토바실리(*Lactobacilli*)와 비피도박테리아(*Bifidobacteria*) 등의 젓산세균은 프로바이오틱스 균주로 알려져 있다(2).

2001년 세계보건기구(WHO)와 국제식량기구(FAO)의 합동전문가위원회(3)에 따르면 프로바이오틱스란 적당히 섭취했을 때 사람이나 동물의 건강에 유익한 기능을 발휘하는 살아있는 미생물로서 장 점막의 IgA 반응을 자극하고 식세포 작용의 활성을 높여 점막을 안정화시키며, 항균물질을 분비하거나 영양분이나 부착부위를 두고 서로 경쟁하여 유해균의 부착과 증식을 억제시킨다(4). 또한 발암물질을 분해하거나 결합시켜 제거하고, 항돌연변이 물질을 생산하며, 발암성 유발효소를 불활성화시켜 종양발생 억제를 유도한다. 뿐만 아니라 활성산소를 제거함으로써 산화방지 작용을 나타내며, 혈관 내 나쁜 콜레스테롤 수치를 낮춰 심혈관계 질환 유발 가능성을 감소시키는 등 건강을 향상시키는데 도움을 주는 유용한 균주들이다(2).

다만 프로바이오틱스 균주로 선발되기 위해선 생리활성 검색에 앞서 몇 가지 전제 조건을 충족하여야 한다. 우선 체내에 유입된 미생물들은 식도와 위장을 통과하는 동안 강산인 위액 하에서 생존해야하고, 쓸개즙분해효소를 생산하여 쓸개즙산을 분해함으로써 소장 내에서도 저항해야 하며, 대장 상피세포에 대해 높은 부착능을 발휘하고, 유해세균을 제어할 수 있는 항균물질 생산능을 갖춰야 한다(5). 이와 같이 체내 환경 하에서 생존하여 생리활성을 발휘해야 하는 필수적인 기본 요건 충족과 함께 프로바이오틱스 균주는 돌연변이 유발이나 용혈능이 없어야 하며, 바이오제닉 아민 등과 같은 유해물질 생성에 따른 독성 발생 가능성이 낮아야 하는 등 반드시 안전성이 확보되어야 한다(6).

본 연구에서는 시판하는 멸치 젓갈로부터 분리된 젓산세균을 대상으로 프로바이오틱스 균주의 선발 기준에 대한 적합성 유무

*Corresponding author: Eun-Seo Lim, Department of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 48520, Korea
Tel: 82-51-629-1714
Fax: 82-51-629-1709
E-mail: limsm020@tu.ac.kr
Received May 4, 2016; revised June 7, 2016;
accepted June 8, 2016

를 확인하기 위해 *in vitro* 상에서 인공 위액과 쓸개즙액에 대한 저항성, 다양한 항생제에 대한 내성, Caco-2 세포에 대한 부착능 및 항균물질 생산에 따른 장내 유해균에 대한 항균 활성을 확인하였다. 또한 선발 균주의 안전성 평가를 위해 돌연변이 및 용혈 현상 유발 가능성과 유해 아민 생성능을 조사하여 안전한 프로바이오틱스로서의 이용 가능성을 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

젯산세균 분리 배양

시판하는 멸치 젓갈 10종을 수집하여 적당하게 희석한 후 Lactobacilli MRS agar (BD Difco Co., Sparks, MD, USA) 평판 배지 상에서 순수 분리 배양하고 1% (w/v) CaCO₃을 첨가한 MRS 한천평판배지에 배양했을 때 투명환을 생성하는 콜로니를 젯산세균으로 간주하였다. 분리된 균주(10⁹ CFU/mL) 배양액(1%, v/v)은 pH 3.0으로 조정된 MRS 액상배지(broth) (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하고 난 후 10⁶ CFU/mL 이상 생균수를 유지하는 내산성 젯산세균만을 선발하였다. MRS 액상배지에 접종하여 호기적인 조건 하에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 선발된 균주의 배양액은 20% (v/v) glycerol과 혼합하여 -20°C하에서 보관하면서 실험하였다.

선발 균주 동정

분리 균주들의 세포 형태, 그람염색성, 운동성, 포도당으로부터 산과 가스 생성능, 10°C와 45°C 온도에서의 증식능, 산소요구성과 카탈레이스(catalase) 생성능 등 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, API 50 CHL system (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당 이용능을 확인하였다. 한편, MRS 액상배지 배양액으로부터 균주의 DNA를 DNA 추출키트(extraction kit) (Qiagen, Hilden, Germany)로 추출 정제하고, 27F (5'-AGAGTTG ATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTACCTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction) thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, CA, USA)로 초기 변성(94°C, 5분), 변성(94°C, 30초), 풀림(56°C, 1분), 신장(72°C, 1분) 및 연장(72°C, 5분) 조건 하에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 산물은 전기영동(1.5% (w/v) agarose gel) 하고 PCR 정제키트(purification kit) (Qiagen)로 정제하였다. DNA sequencer (ABI Prism[®] 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 분석한 다음 생명공학정보센터(NCBI; The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST (Basic Local Align Search Tool) 프로그램(version 2.0.8.)을 이용하여 염기서열의 상동성(homology)을 확인하였다.

인공 위액과 쓸개즙액에 대한 저항성

실험 균주는 MRS 액상배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 얻은 배양액을 원심분리 (7,000×g, 10분, 4°C)한 다음 인산완충식염수(phosphate buffer saline) (pH 7.0) 내에 2회 세척한 후 세포수를 1.0×10⁸ CFU/mL로 조정하였다. 인공 위액은 pH 2.0과 3.0으로 맞춘 인산완충식염수에 NaCl (125 mM), KCl (7 mM), NaHCO₃ (45 mM) 및 펩신(pepsin) (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 제조하고 젯산세균 세포를 접종한 후 37°C에서 2시간 배양한 다음 MRS 한천평판배지 상에서 표준 한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 조사하였다. 한편, 인공 쓸개즙액은 인산완충식염수(pH 8.0)에 쓸개즙염(bile salts) (Sigma-Aldrich)를 농도별[0.3, 0.5 및 1.0% (w/v)]로 첨가한 다음 젯산세

균 세포 현탁액(1.0×10⁸ CFU/mL)을 접종하고 37°C에서 3시간 배양한 후 MRS 한천 평판배지 상에서 평판배양하여 생균수를 측정하였다. 분리 균주의 쓸개즙분해효소(bile salt hydrolase, BSH) 활성을 확인하기 위해 MRS 액상배지에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액을 백금으로 채취한 다음 0.5% (w/v) 소듐염[taurocholic acid (TC), taurodeoxycholic acid (TDC) glycocholic acid (GC)과 glycodeoxycholic acid (GDC), Sigma-Aldrich]가 함유된 MRS 한천 평판배지에 희석 접종하였다. 37°C에서 72시간 동안 혐기적 조건 하에서 배양한 후 쓸개즙산염이 가수분해되어 쓸개즙산이 침전됨으로써 콜로니 주변이 불투명해지면 쓸개즙분해효소 활성이 있는 것으로 간주하였다(7).

장내 상피세포에 대한 부착능

Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받은 Caco-2 세포에 대한 분리 균주의 부착능을 측정하기 위해 세포는 56°C에서 30분간 가열 처리한 10% (v/v) fetal bovine serum (FSB, Gibco, Rockville, MD, USA), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin과 0.1 mg/mL streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich)에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. Monolayer를 형성한 Caco-2의 세포수를 1.0×10⁵ cells/mL로 조정하여 FBS와 항생제를 첨가하지 않은 DMEM 배지가 분주된 6-well culture plate (Falcon, Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA) 내에 접종하고 난 다음 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 2시간 동안 전 배양하였다. 한편, MRS 액상배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 젯산세균 배양액은 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)를 통해 세포만을 모아 인산완충식염수(pH 7.0)로 세척한 다음 DMEM 배지 내에 젯산세균 수를 1.0×10⁸ CFU/mL로 조정하였다. Caco-2 세포를 전 배양한 plate의 well에 젯산세균 현탁액을 접종하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하고 난 다음 부착된 세포는 trypsin-EDTA 용액으로 탈착시켜 인산완충식염수(pH 7.0)로 세척하고 MRS 한천평판배지로 평판배양하여 젯산세균수를 측정하였다(8). 한편, 세균 세포 표면의 소수성 측정에는 Crow 등(9)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉, MRS 액상배지 내에서 정지기 단계까지 배양한 후 배양액은 원심분리(10,000×g, 5분, 4°C)하여 세포를 모아 인산완충식염수(pH 7.0)로 세척하고 난 다음 세포수를 1.0×10⁸ CFU/mL로 조정하였다. 세포 현탁액(1 mL)에 *n*-hexadecane (6 mL)를 처리하고 유화시키기 위해 약 2분간 강하게 혼합시켰다. 상온에서 약 30분간 방치하여 층을 분리하고 난 다음 수상(water phase)을 제거한 후에 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 표면 소수성 [H%=(노말헥사데케인 처리 전 흡광도-노말헥사데케인 처리 후 흡광도/노말헥사데케인 처리 전 흡광도×100)]을 계산하였다. 자가응집력(autoaggregation) 측정을 위해 MRS 액상배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000×g, 10분)하여 세포를 얻어 인산완충식염수(pH 7.0)로 2회 세척하고 세포수를 1.0×10⁸ CFU/mL로 조정하였다. 세포 현탁액(2 mL)은 약 10초간 격렬하게 vortex 시킨 후 37°C에서 2시간 배양하였다. 상층액 1 mL를 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 자가응집력(%)은 계산식[1-(2시간 배양 후 흡광도/배양 전 흡광도)×100]에 대입하여 측정하였다(10).

항균물질 생성능과 항균력 측정

항균물질 생산을 위해 젯산세균은 MRS 액상배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 배양 상층액을 준비하였다. 한편, 배양 상층액은 6 N 수산화소듐

(NaOH)을 이용하여 pH 6.5로 조정하고 1 mg/mL 카탈레이스 (Sigma-Aldrich)를 처리한 다음 50% (w/v) (NH₄)₂SO₄을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 교반하여 단백질을 침전시켰다. 그런 다음 원심분리(12,000×g, 30분, 4°C)하여 침전물을 모아 20 mM 인산완충식염수(pH 6.5)에 현탁시키고 4°C에서 24시간 동안 동일한 buffer 내에서 투석막(molecular weight cut-off=1,000 Da, Spectrum, Laguna Hills, CA, USA)으로 투석시킨 후 조박테리오신 용액을 조제하였다. 실험 균주의 항균력 측정을 위해 American Type Culture Collection (ATCC)과 Korean Collection for Type Culture (KCTC)로부터 분양 받은 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 및 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 3471 등의 식중독균을 지시 균주로 사용하였다. *L. monocytogenes* KCTC 3569, *S. aureus* ATCC 6538 및 *S. enteritidis* ATCC 13076은 BHI 액상배지, *V. parahaemolyticus* KCTC 3471는 Marine 액상배지(Difco)에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 세포를 모으고 인산완충식염수(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 십진 희석하여 세포수를 1.0×10⁵ CFU/mL로 조정하였다. BHI 액상배지와 Marine 액상배지에 지시 균주의 세포 현탁액 1% (v/v)와 젯산세균의 배양 상층액 5% (v/v)를 각각 접종하고 37°C에서 24시간 배양하고 난 후 배양액을 채취하여 BHI 한천과 Marine 한천배지에서 평판배양법으로 잔존하는 세포수를 측정하였다. 또한 박테리오신 용액의 항균활성은 microtiter plate method(11)로 측정하기 위해 plate well에 BHI 액상배지와 Marine 액상배지를 각각 분주하고 농도를 맞춘 박테리오신 용액을 첨가한 다음 십진희석법으로 10,000배 희석하여 지시 균주의 균수를 1.0×10⁵ CFU/mL로 조정된 세포 현탁액(1%)을 접종하였다. 호기적인 조건 하에서 37°C, 24시간 배양한 후 microplate reader (BioTek, Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 흡광도(600 nm)를 측정하고 박테리오신 용액 대신 인산완충식염수(pH 7.0)를 처리한 대조구와 비교하여 배양액의 혼탁도가 50% 저해된 최대 희석배수의 역수를 박테리오신 활성(arbitrary units, AU)으로 나타내었다.

항생제에 대한 감수성

실험 균주의 항생제에 대한 내성은 Bauer 등(12)의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration) (MIC)에 따라 측정하였다. 즉, 젯산세균은 MRS 액상배지 내에서 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하여 세포만을 회수하고 인산완충식염수(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 세포수를 1.0×10⁶ CFU/mL로 조정하였다. 세포 현탁액(1%, v/v)은 50°C 정도로 식힌 MRS 한천(한천 1.0%, v/v)에 접종하고 난 후 MRS 한천 평판배지 위에 증충하여 응고시켰다. 항생제(ampicillin, erythromycin, kanamycin, penicillin, streptomycin, tetracycline과 vancomycin, Sigma-Aldrich)의 stock solution으로부터 2진 희석법으로 농도를 맞춘 다음 paper disk (φ 8 mm)에 50 μL loading하여 MRS 한천 평판배지 위에 올리고 37°C에서 24시간 배양한 후 paper disk 주변에 저해환을 생성하는 최소농도를 측정하였다.

용혈능

실험 균주는 MRS 한천 사면배지에서 3회 계대 배양하여 활성을 높인 후 5% (w/v) 혈액이 함유된 Columbia 한천(Difco) 평판배지에 희석 접종 후 37°C에서 48시간 배양한 후 알파용혈(α-haemolysis) (콜로니 주변 녹색환 생성), 베타용혈(β-haemolysis) (콜로니 주변 황색 투명한 생성)과 감마용혈(γ-haemolysis) (콜로니 주변 환 생성 없음)을 조사하였다(13).

생체아민 생성능

실험 균주의 생체 아민 생성능은 Bover-Cid와 Holzapfel(14)의 방법을 일부 변형하여 아미노산을 첨가한 카복실기제거 배지(decarboxylating medium) 상에서 측정하였다. 즉, 실험균은 효소 유도를 촉진시키기 위해 전구체 아미노산(L-histidine monohydrochloride monohydrate, L-tyrosine disodium salt, L-lysine monohydrochloride 및 L-ornithine monohydrochloride, Sigma-Aldrich) 각각 1 g/L와 pyridoxal 5-phosphate 1 mg/L를 첨가한 카복실기제거 액체배지(decarboxylating broth)에서 37°C에서 24시간 동안 5회 전 배양하였다. 그런 다음 아미노산(2%, w/v)이 첨가된 탈카복실화 액체배지를 microtiter plate의 각 well에 100 μL 분주하고 활성화시킨 전 배양액 50 μL을 접종한 후 37°C에서 72시간 동안 혐기적인 조건 하에서 배양한 후 자색으로 변한 경우 생체 아민 생성능 양성으로 판정하였다. *Pseudomonas aeruginosa* BK19음성 대조균으로 하고, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 균주를 양성 대조균으로 하였다.

복귀 돌연변이 시험

분리 균주의 복귀 돌연변이능을 확인하기 위해 틀이동 돌연변이체(frame shift mutant)인 *Salmonella* Typhimurium TA98 (*his*D3052, *rfa*, Δ *uvrB*)과 점 돌연변이체(point mutant)인 *S. Typhimurium* TA100 (*his*G46, *rfa*, Δ *uvrB*)에 대한 유전적 돌연변이 유발 가능성을 대사활성제인 S9-mix 존재 유무에 따라 pre-incubation법(15)으로 측정하였다. 양성 대조물질로 사용한 2-aminoanthracene, 2-AA과 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)는 Wako Chemicals Inc. (Osaka, Japan)로 부터 구입한 후 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide) (DMSO, 1 mg/mL)에 용해시켜 -20°C에 보관하였고, 음성 대조물질로는 증류수를 사용하였다. Aroclor 1254에 의해 유도된 쥐 간의 마이크로솜 분획물은 Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA)로 부터 구입하여 간접 돌연변이원의 활성화를 위해 사용하였다. S9 fraction 10%, MgCl₂-KCl salt 2%, 1 M glucose-6-phosphate 0.5%, 1 M nicotin adenine dinucleotide 4% 및 0.2 M 인산완충식염수(pH 7.4)를 혼합한 뒤 여과 제거하여 S9-mix를 조제하였다. 분리된 젯산세균은 MRS 액상배지에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000×g, 10분, 4°C)하고 나서 회수한 균체에 동결/냉동건조 보호제로서 탈지분유(skim milk) 10% (w/w)와 sucrose 5% (w/w)를 첨가하여 균질화한 후 -40°C에서 냉동 건조시킨 다음 건조된 균체는 분쇄하여 분말화한 것을 시험물질로 사용하였다. *S. Typhimurium* TA98과 *S. Typhimurium* TA100 균 배양액 0.8 mL에 다이메틸설폭사이드 0.07 mL를 첨가하여 -80°C에 보관하였고, 히스티딘(histidine) 요구성 여부, *uvrB*와 *rfa* 돌연변이 유지 여부와 자발적 복귀 돌연변이 등 균주의 형질을 확인하였다. 농도결정 시험 결과를 토대로 시험물질의 최종 농도는 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 μg/plate로 맞추고 S9-mix 첨가 및 무첨가 하에서 시험하였고, 양성 대조물질인 2-AA는 0.5-1.0 μg/plate, AF2는 0.01-0.1 μg/plate의 농도에 맞춰 사용하였다. 젯산세균 분말(1.0×10⁹ CFU/g)을 인산완충식염수(pH 7.0)에 용해시켜 제조한 시험물질(100 μL), *S. Typhimurium* TA98 혹은 TA100 배양액(1.0×10⁹ CFU/mL, 100 μL) 및 S9-mix (500 μL) 혹은 인산완충식염수(pH 7.4, 0.5 mL)을 멸균된 시험관에 넣고 혼합하였다. 37°C에서 20분간 배양한 후 배양액에 0.05 mM L-히스티딘(히오틴)과 0.09 M 염화소듐으로 구성된 molten top 한천(0.5%, w/v, 45°C) 2 mL를 첨가하여 vortexing한 다음 minimal glucose agar (증류수 1 L 중 magnesium sulfate 0.2 g, citric acid monohydrate 2 g, potassium phosphate dibasic 10 g, sodium ammo-

nium phosphate 3.5 g, glucose 20 g, histidine 0.05 g, biotin 0.00074 g, ampicillin 0.025 g 및 agar 15 g 함유) 평판배지에 증충하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 *his+* revertants 콜로니 수를 계수하였다(16).

통계처리

실험 항목별로 총 3회 측정된 후 얻어진 값은 평균±표준편차로 나타내었고, SPSS 프로그램(Ver. 12.0, Chicago, IL, USA)의 one-way ANOVA로 유의적인 차이($p<0.05$)를 확인하였으며, 던칸 시험(Duncan's multiple range test) 으로 사후 검증하였다.

결과 및 고찰

멸치 젯갈에서부터 분리된 내산성 젯산세균의 동정

시판하는 숙성된 멸치 젯갈 10종으로부터 순수 분리된 젯산세균 중에서 내산성이 강한 5종의 젯산세균을 분리 선발하여 형태학적 및 배양학적 특성과 API 50 CHL system에 의한 당 발효능과 염기서열 분석을 통해 동정한 결과는 Table 1과 같다. 분리된 5종의 젯산세균은 모두 그람양성균이었고, AJ06, AJ13, AJ22 및 AJ35의 세포 형태는 모두 구균인 반면, AJ29는 간균이었다. 선발된 균주 모두 L형의 젯산세균을 생산하는 조건무산소세균이며, 45°C의 온도에서 증식이 가능하였다. AJ13, AJ22 및 AJ35는 포도당으로부터 가스를 생산하였고, AJ06, AJ22 및 AJ29는 10°C에서도 증식하였다. AJ06, AJ29 및 AJ35는 카탈레이스를 생산한 반면, AJ13과 AJ22는 카탈레이스를 생산하지 못했다. API 50 CHL kit를 이용하여 당 분해능을 확인한 결과, AJ06은 상동성이 98.4%인 *E. faecalis*로 동정되었고, AJ13, AJ22, AJ29 및 AJ35 균주는 99% 이상의 상동성을 보여 각각 *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus sakei* 및 *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다. 16S rRNA 순서결정(sequencing)에 의한 염기순서분석 결과, AJ13, AJ22, AJ29 및 AJ35 균주는 API kit에서 나타난 결과와 동일하게 동정되었으나, AJ06은 상동성 99.2%의 *Enterococcus faecium*으로 확인되었다.

해산어류의 장관 내로부터 유래한 *Lactobacillus plantarum*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *L. mesenteroides*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Streptococcus* spp. 및 *Weissella* spp. 등의 젯산세균이 주로 분리된 것으로 보고된 바 있다(17). Mauguin과 Novel(18)은 각종 해산어류로부터 분리된 젯산세균의 DNA 상동성을 확인한 결과, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc* spp. 및 *Carnobacteria* spp. 등으로 밝혀졌다. 멸치 젯갈은 생 멸치에 20%의 소금을 첨가하여 일정 시간 숙성 과정을 거치는 동안 다양한 미생물이 증식하여 원료 내 아미노산을 분해한다. 또한 *Staphylococcus* spp., *Acromobacter* spp., *Bacillus* spp., *Brevibacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Halobacterium* spp. 및 *Micrococcus* spp. 등의 호염성균이나 내염성균과 포자형성균들은 멸치 젯갈 숙성 과정 중 단백질질을 분해시키고 독특한 풍미와 조직감을 부여한다고 알려져 있다(19,20). Cho 등(21)에 의하면 시판하는 젯갈로부터 *L. mesenteroides*와 *Streptococcus salivarius* 등이 분리되었다고 보고하였다. 또한 멸치 젯갈에서 분리된 젯산세균 중 0.1% 글리코덱스콜산 소듐염(glycodexcholic acid sodium salt)이 함유된 MRS 한천 평판배지 상에서 강한 쓸개즙분해효소 활성을 나타낸 A24 균주는 ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, rhamnose, amygdalin, lactose와 melibiose 등의 당을 분해하였고, 16S rRNA 유전자를 증폭하여 염기순서를 분석한 결과 *P. pentosaceus*로 동정되어(22), 본 연구에서 분리된 균주는 이미 보고된 연구(17-22)에서 밝힌 균종들과 일부 유사한 *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 및 *Lactobacillus* 등의 젯산세균으로 동정되었다.

분리 젯산세균의 인공 소화액에 대한 내성

인공 소화액 하에서 배양시킨 후 분리 동정된 젯산세균의 생존 균수를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 멸치 젯갈에서 분리된 총 5종의 균주 중 *E. faecium* AJ06, *P. halophilus* AJ22 및 *L. sakei* AJ29는 펩신이 첨가된 pH 3.0 하에서 10⁷ CFU/mL 이상의 균수를 유지하였고, 이보다는 다소 낮지만 *L. mesenteroides* AJ13과 *P. pentosaceus* AJ35도 10⁶ CFU/mL 이상 생존 가능하였다.

Table 1. Biochemical and physiological profiles and representative results of API 50 CHL system and 16S rRNA sequence analysis of the tested strains

Contents	Strains				
	AJ06	AJ13	AJ22	AJ29	AJ35
Cell shape	Cocci	Cocci	Cocci	Rods	Cocci
Gram staining	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	+	+	-	+
Lactic acid	l	l	l	l	l
Growth in aerobic condition	+	+	+	+	+
Growth in anaerobic condition	+	+	+	+	+
Growth at 10°C	+	-	+	+	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+
Catalase	+	-	-	+	+
Species affiliation by API 50 CHL system (Confidence, %)	<i>Enterococcus faecalis</i> (98.4)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99.2)	<i>Pediococcus halophilus</i> (99.9)	<i>Lactobacillus sakei</i> (99.5)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (99.0)
Related strain according to 16S rRNA sequencing (Similarity, %)	<i>Enterococcus faecium</i> KU366367 (99.2)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> EF579729 (99.1)	<i>Pediococcus halophilus</i> KJ699142 (99.9)	<i>Lactobacillus sakei</i> KM267630 (99.8)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KC142151 (99.7)
Identification	<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35

Table 2. Resistance to low pH and bile salts and BSH activity of the tested strains

Strains	Viable cell counts (CFU/mL)					Activity of BSH			
	pH of gastric juice		Concentration of bile salts (%)			TC	TDC	GC	GDC
	2.0	3.0	0.3	0.5	1.0				
<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	2.5±2.4×10 ⁷	8.6±0.7×10 ⁷	4.0±1.6×10 ⁷	3.9±1.1×10 ⁶	2.8±0.2×10 ⁶	+	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	3.7±0.6×10 ⁴	5.4±1.9×10 ⁶	6.3±0.3×10 ⁸	7.2±0.5×10 ⁷	4.4±0.7×10 ⁶	-	-	+	-
<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	1.9±1.7×10 ⁵	2.7±0.4×10 ⁷	7.0±1.7×10 ⁸	8.1±0.6×10 ⁷	3.0±2.8×10 ⁷	+	+	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	3.0±2.6×10 ⁶	5.1±2.2×10 ⁷	2.8±0.7×10 ⁸	5.5±1.9×10 ⁸	1.5±1.9×10 ⁶	-	+	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35	9.7±3.5×10 ⁴	4.3±0.9×10 ⁶	1.6±0.4×10 ⁸	3.4±2.5×10 ⁷	9.2±6.0×10 ⁷	-	-	+	+

TC: taurocholic acid, TDC: taurodeoxycholic acid, GC: glycocholic acid, GDC: glycodeoxycholic acid.
Data are means±SD from triplicate determinations.

한편, pH 2.0 하에서 AJ13과 AJ35 균주는 10⁴ CFU/mL 정도 생존하였던 반면, AJ06과 AJ29 균주는 10⁶ CFU/mL 이상 균수가 유지되어 강산 하에서도 저항성이 매우 높은 것으로 확인되었다. 인공 쓸개즙액에 대한 저항성을 확인하기 위해 쓸개즙염의 농도 별 생존 균수를 확인한 결과, 0.3% 첨가된 배지 내에서는 AJ13, AJ22, AJ29 및 AJ35는 10⁸ CFU/mL 이상 생균이 검출되어 쓸개즙염에 전혀 아무런 영향을 받지 않았던 반면, AJ06 균주는 이들보다 다소 낮은 균수(10⁷ CFU/mL)를 유지하였다. 0.5% 농도 하에서 AJ29 균주는 초기 균수를 거의 유지하였으나, AJ06, AJ13, AJ22 및 AJ35의 초기 균수는 약 1-2 log cycle 정도 감소되었다. 게다가 1.0% 농도 하에서도 실험 균주 모두 10⁶ CFU/mL 이상을 유지하였으므로 인공 쓸개즙액에 대한 저항성이 상당히 높은 것으로 나타났다. 게다가 실험 균주들의 다양한 쓸개즙염에 대한 쓸개즙분해효소 활성을 측정된 결과, AJ06은 TC만을 분해할 수 있었고, AJ13은 GC를 분해하였고, AJ22는 TC와 TDC에 대해 쓸개즙분해효소 활성을 나타내었다. 또한 AJ29는 TDC를 분해할 수 있었고, AJ35 균주는 GC와 GDC 분해능을 나타내었다.

젓갈에서 분리된 *Lactococcus lactis* NK34는 pH 2.5 하에서 2 시간 동안 1 log cycle 감소하였으나, 쓸개즙산이 함유된 배지 내에서는 24시간 동안 100% 생존하여 인공 소화액에 대한 저항성이 높은 것으로 확인되었다(23). *L. sakei* AJ29는 이와 유사한 정도의 위액과 쓸개즙액에 대한 저항성을 나타낸 반면 *L. mesenteroides* AJ13과 *P. pentosaceus* AJ35의 저항성은 이보다 낮게 나타났다. 가물치 내장에서 분리한 *L. mesenteroides* sp. *mesenteroides*는 pH 3.0-8.0와 0.3% 쓸개즙염 하에서 높은 증식률을 나타내었으나, pH 2.0에서 2시간 동안 배양한 결과 생균은 거의 나타나지 않았으므로 동일한 조건에서 10⁴ CFU/ml 이상을 유지한 *L. mesenteroides* AJ13 균주의 저항성은 이보다는 큰 것으로 확인되었다(24). 젓갈로부터 분리한 *L. mesenteroides* HK4, HK5 및 HK11 균주들도 인공 위액과 쓸개즙액에 대해 강한 저항성을 나타내었다(21). 젓갈에서 분리된 젓산세균들을 pH 3.0에서 2시간 배양한 결과, *P. pentosaceus* F66은 32.6% 생존하였고, *P. pentosaceus* D56은 17.2%, *P. pentosaceus* A24는 7.5% 잔존하였다. 또한 0.3% 쓸개즙염에 2시간 노출된 후에도 *P. pentosaceus* F66 (26.6%)은 *P. pentosaceus* A24 (13.7%)와 *P. pentosaceus* D56 (5.8%) 보다 저항성이 강하여(22) 이들과 동일한 속(genus)에 속하는 *P. halophilus* AJ22와 *P. pentosaceus* AJ35는 이보다 높은 저항성(50% 이상)을 나타내었다. Cho와 Do(25)에 따르면, 젓갈에서 분리한 78종의 젓산세균(*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp. 및 *Streptococcus* spp.)들은 0.5% 쓸개즙염 하에서 저항성이 강했고, 이 중에서 *Leuconostoc paramesenteroides* DHK4와 *L. plantarum*

DHK10 등은 pH 2.0 하에서도 상당히 높은 생존을 보여 *L. mesenteroides* AJ13 균주와 유사한 정도의 저항성을 나타내었다. 젓산세균의 산에 대한 내성은 당분해 과정 흐름(glycolytic flux)의 변화, 세포 내 pH 조절 능력과 세포막의 ATPase와 관계 있으며, 우유와 같은 식품의 성분에 의해 저항성은 유의하게 증가된다고 알려져 있다(26).

한편 많은 젓산세균들은 쓸개즙에 대한 높은 저항성 덕분에 장내 환경에서 강한 생존율을 나타낸다고 알려져 있으며, 쓸개즙에 대한 내성은 쓸개즙분해효소에 기인하는 것으로 보고되고 있다(27). *L. paramesenteroides* DHK4, *Leuconostoc citreum* DHK6, *L. plantarum* DHK21 및 *L. citreum* DHK33 등은 TDC에 대해 강한 쓸개즙분해효소 활성을 나타내어 체내 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있을 것이라고 하였는데 *P. halophilus* AJ22와 *L. sakei* AJ29 균주들도 TDC에 대한 분해능이 있었으나, AJ06, AJ13 및 AJ35는 이에 대한 쓸개즙분해효소 활성을 나타내지 않았다. 쓸개즙분해효소는 글리신과 타우린(taurine)-포함형 쓸개즙산염을 아미노산 잔기와 유리 쓸개즙 및 쓸개즙산염으로 가수분해를 촉매하는 효소로서 *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. 및 *Enterococcus* spp. 등의 프로바이오틱 젓산세균들로부터 활성이 확인된 바 있다(28). 한편, *Pediococcus* spp.의 쓸개즙분해효소 활성은 쓸개즙산염의 존재 하에서 더 높게 나타났는데, 글리신-포함형 쓸개즙산염(glycine-conjugated bile salt) 하에서 자란 세포는 타우린-포함형 쓸개즙산염(taurine-conjugated bile salt) 내에서 보다 더 높은 활성을 나타내었는데(22), *P. pentosaceus* AJ35도 GC와 GDC에 대한 분해능이 있었던 반면, *P. halophilus* AJ22는 TC 및 TDC에 대한 분해능을 나타내었다. 포함형 쓸개즙산염은 식이성 지방, 지용성 비타민과 그 밖의 지방 용해성 화합물의 흡수를 위해 소장으로 분비되나, 흡수되지 않은 쓸개즙산염의 작은 입자들은 포함형의 쓸개즙산염 보다 용해성이 낮아 소장 내강 내에 흡수되기 어려워 주로 분변으로 배출된다. 탈포합된 쓸개즙산염은 상피세포를 통과하여 혈류 내로 들어가 새로운 쓸개즙산을 형성하기 위해 전구체인 콜레스테롤을 이용함으로써 혈중 내 이들의 농도를 감소시킨다(29). 또한 탈포합형은 식이성 지방의 유흥과 미셀형성을 효과적으로 억제시키고, 쓸개즙분해효소 효소는 지방 분해 산물인 지방산과 모노글리세라이드의 흡수를 방해하는 효과도 있다(28).

장내 상피세포 Caco-2에 대한 부착능, 표면 소수성과 자기응집력

Caco-2 세포에 대한 분리 균주의 부착능과 이에 영향을 줄 수 있는 세균 세포 표면의 소수성과 자기응집력을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 실험 균주 중 *L. sakei* AJ29가 Caco-2 세포에 대해 가장 높은 22.5±1.8%의 부착능을 보였고, 그 다음으로 *P.*

Table 3. Adhesion ability to Caco-2 cells, hydrophobicity, and auto-aggregation of the tested strains

Strains	Adhesion (%)	Hydrophobicity (%)	Auto-aggregation (%)
<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	7.7±2.0 ^b	12.2±1.3 ^a	31.5±1.7 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	3.5±1.4 ^a	16.9±0.5 ^b	29.1±1.1 ^a
<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	18.6±0.9 ^c	20.5±0.9 ^c	32.7±0.9 ^a
<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	22.5±1.8 ^d	51.8±2.0 ^e	40.3±2.5 ^b
<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35	15.1±0.4 ^c	27.1±1.6 ^d	39.2±3.1 ^b

Data are means±SD from triplicate determinations and 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 ($p < 0.05$).

halophilus AJ22는 18.6±0.9%, *P. pentosaceus* AJ35는 15.1±0.4%로 나타났으며, *E. faecium* AJ06과 *L. mesenteroides* AJ13는 10.0% 이하로 유의하게 낮은 부착능을 보였다. 세균 세포 표면의 소수성은 가장 높은 부착능을 나타낸 AJ29 균주가 51.8±2.0%으로 가장 높았으며, AJ22와 AJ35는 20% 이상으로 나타난 반면, AJ06과 AJ13은 이들 보다 낮은 소수성을 보여 주었다. 자가응집력의 경우는 AJ29와 AJ35 균주가 약 40% 정도로 다른 균주에 비해 높게 나타나 AJ06, AJ13 및 AJ22 보다 유의하게($p < 0.05$) 높은 자가응집력을 나타내었다.

젯갈에서 분리된 *Pediococcus* spp.는 Caco-2 cells에 대한 부착능은 10.9-13.9 CFU/cell로 나타났으며, 이는 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 부착능(12.8±0.5 CFU/cell)과 비슷한 수준이었다. 특히 *P. pentosaceus* F66의 부착능(13.9±0.4 CFU/cell)이 가장 높았고, 그 다음으로 *P. pentosaceus* D56은 13.2±0.3 CFU/cell이었고, *P. pentosaceus* A24는 10.9±0.5 CFU/cell로 나타났다. *Pediococci*는 락토바실리보다 더 높은 부착능을 나타낸다고 하였으며, 높은 부착능을 가지는 균주는 장관 상피세포 내에 부착하여 콜로니 형성 가능성이 높은 것으로 보고하였다(22). 게다가 세포 표면의 소수성은 세균의 자가응집력과 부착능에 영향을 미치는 중요한 인자이며, 소수성이 가장 강한 균주는 *P. pentosaceus* D56 (xylene: 33.71±3.14%, *n*-hexadecane: 3.67±0.12%)이었고, 그 외의 균주들의 소수성은 이보다 비교적 낮게 나타났지만, *Pediococcus* spp.의 소수성은 *L. lactis* MG1363 보다는 높았다고 하였다. 비극성 용매인 xylene에 대해 부착된 세포수가 많다는 것은 세포 표면의 소수성 본질에 기인하는 것이며, 대개 표면 소수성은 세균의 부착능과 상관관계가 있고, 비특이적 부착을 위한 주요 인자로 보고되고 있다(22).

한편, 자가응집력은 동일한 세균 세포간의 군집능을 의미하고, 프로바이오틱 균주의 자가응집력은 장내 상피세포에 대한 균주의 부착능과 상관관계가 있다. 이로 인해 장관 내에서 세균이 쉽게 콜로니를 형성할 수 있게 되고 체내 환경 하에서도 저항할 수 있다고 알려져 있다. 24시간 배양 후 *Pediococcus* spp.의 자가응집력은 최소 65.2% 이상이었으며, D56 균주는 69.1±3.2%의 매우 높은 자가응집력을 나타내었다. 일반적으로 프로바이오틱 균주는 병원균에 비해 더 높은 자가응집력을 나타내는데 탄화수소에 대해 높은 부착능을 가지는 균주는 자가응집력도 높은 것으로 알려져 있다(22). 상피세포에 대한 세균의 부착 메커니즘은 세포막 표면의 특이적 수용체와의 결합과 전하와 소수성 상호결합에 의해 나타나는데, 일반적으로 젯산세균이 xylene에 대해 부착율이 높게 나타나는 것은 세포 표면의 소수성에 기인하는 것으로 알려져 있다. 또한 일부 젯산세균은 동일한 균주나 서로 다른 균종들과 응집하는 능력이 있는데 이로 인해 상피세포 점막에 대한 부착능을 높여준다. 젯산세균은 상피세포, 점막층이나 점막 구성성분인 collagen, fibronectin과 vitronectin과 같은 세포 외 기질

분자와 결합할 수 있는 능력을 발휘한다. *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* 및 *L. crispatus* 등은 증식하는 동안 세포 표면을 덮고 있는 표면층(S-layer)을 형성하고 상피세포에 대한 부착을 조절하며 세포 표면 소수성을 전달할 수 있는 물질을 생산한다(27). 장관 상피세포의 표면에 대한 젯산세균의 부착과 증식은 프로바이오틱 균주로서 충족해야 할 중요한 필요 조건이다. 부착력이 강한 균주는 대사성 효과와 면역조절 능력이 탁월하며, 효과적으로 면역활성을 유도하고 장 점막 장벽을 안정화할 뿐만 아니라 상피세포에 대한 병원성균의 부착을 억제시킨다고 알려져 있다(4).

항균물질 생산능과 식중독균에 대한 항균활성

실험 균주의 배양 상층액으로부터 얻은 유기산과 박테리오신 등의 항균 물질이 식중독균의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과는 Table 4와 같다. 배양상층액의 항균 활성은 주로 유기산으로부터 기인하는 것으로 추정되며, *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성은 *P. pentosaceus* AJ35의 배양상층액(pH 3.71±0.11, 결과 미제시) 5%에 의해 30.1±3.8%로 다른 균주들보다 유의하게 높게 나타났으며, *L. sakei* AJ29의 배양 상층액(pH 3.93±0.18)에 의해서도 약 23.4±4.1% 정도 저해되었던 반면, *L. mesenteroides* AJ13의 배양 상층액(pH 4.52±0.16) 처리에 의해 가장 낮은 7.8±0.8% 사멸되었다. *S. aureus*는 AJ06 (pH 4.19±0.09), AJ29 및 AJ35의 배양상층액에 의해서 약 14-20% 정도 저해된 반면, AJ13과 AJ22 (pH 4.05±0.23)의 배양상층액에 의해서 10% 미만으로 저해되었다. *S. enteritidis*는 AJ35로부터 얻어진 배양상층액에 의해 20% 이상 저해되었으나, AJ06의 배양상층액은 9.2±0.9% 정도로 가장 낮은 사멸 효과를 나타내었다. *V. parahaemolyticus*는 AJ29의 배양상층액으로부터 약 20% 정도 저해되어 다른 균주들 보다 유의하게 높았고, AJ06과 AJ35의 배양상층액은 10-14% 정도 저해 효과를 나타내었다. 특히, AJ06, AJ29 및 AJ35 균주들은 카탈레이스를 생성하므로 이들 배양상층액의 항균력은 유기산뿐만 아니라 과산화수소에 기인하는 것으로 추정된다. 한편, AJ06 균주는 *L. monocytogenes* (256 AU/mL)와 *S. aureus* (32 AU/mL)와 같은 그람양성균에 대한 항균 활성을 나타내는 박테리오신을 생산한 반면, AJ13 균주의 박테리오신은 *S. enteritidis* (16 AU/mL)와 *V. parahaemolyticus* (64 AU/mL)와 같은 그람음성균에 대한 항균 활성을 나타내었다. AJ29 균주는 *V. parahaemolyticus*를 제외한 식중독균을 저해할 수 있는 박테리오신을 생산할 수 있었던 반면, AJ22와 AJ35는 이들 지시 균주에 대한 항균 효과를 나타내는 박테리오신을 생산하지 않았다.

젯산세균은 배양 과정 중에 유기산(젯산이나 아세트산), 과산화수소, 저분자 대사산물(reuterin, diacetyl, fatty acids)과 박테리오신 등과 같은 항균물질을 생산함으로써 다양한 병원성균의 증식을 저해하는 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있으며, 항균 활성

Table 4. Antagonistic activity of antibacterial substances obtained from the tested strains against food-borne pathogens

Strains	Antibacterial substances							
	Inhibition by CFCS (%)				Bacteriocin activity (AU/mL)			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	12.5±2.0 ^a	14.4±1.1 ^b	9.5±1.4 ^a	10.6±2.1 ^{ab}	256	32	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	7.8±0.8 ^{ab}	9.9±2.5 ^a	11.0±0.7 ^{ab}	6.0±1.5 ^a	ND	ND	16	64
<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	15.7±3.1 ^b	8.3±1.7 ^a	18.9±3.6 ^{cd}	14.5±2.9 ^{bc}	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	23.4±4.1 ^c	16.8±2.0 ^{bc}	16.0±4.1 ^{bc}	19.1±3.3 ^c	128	64	8	ND
<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35	30.1±3.8 ^d	19.9±1.6 ^c	22.7±3.5 ^d	13.7±2.6 ^b	ND	ND	ND	ND

Data are means±SD from triplicate determinations and 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 ($p < 0.05$).

은 균종과 균주에 따라 다양하다. 유기산의 항균력은 비해리 분자가 세포막 내로 확산되어 세포에 필수적인 대사 기능을 방해하며, 세포질 내 pH와 세포막 전위의 소실을 유발하게 된다. 박테리옌은 세균의 리보솜에서 합성되는 단백질 성분으로 부패균이나 식중독균의 효소 활성 조절, 포자 증식 억제 및 세포막에 구멍을 뚫어 세포 내 유효 성분을 유출시켜 결국 세포를 사멸시킨다(30). 젖산세균에 의해 생산된 박테리옌은 그람음성균 보다는 그람양성균을 좀 더 효과적으로 저해한다고 알려져 있는데 이는 그람음성균의 세포막 구조상 박테리옌이 세포막 내로 투과하기 어렵기 때문이다(31).

어류 및 어육 가공품에서 유래된 *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., 및 *Weissella* spp. 등의 젖산세균은 *Listonella anguillarum* CECT4344, *L. anguillarum* CECT7199, *Aeromonas hydrophila* CECT5734, *Lactococcus garvieae* JIP29-99, *Streptococcus iniae* LMG14521 및 *Streptococcus agalactiae* CF01173 등의 균주에 대한 항균활성을 나타내었으나, *Photobacterium damsela* CFCE626 및 *Vibrio alginolyticus* CECT521의 증식에는 큰 영향을 미치지 않았다(32). *L. mesenteroides* sp. *mesenteroides* 는 어류에 대한 병원균인 *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* 및 *Shewanella putrefaciens* 등에 대한 저해 활성을 나타내었다. 해산물에서 분리된 222종의 젖산세균 중 52종의 균주는 *V. parahaemolyticus* SH1, *Escherichia coli* DMST4212, *L. monocytogenes* DMST11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST20076, *S. typhimurium* DMST0562와 같은 식중독균 중 적어도 한 균주 이상에 대해 항균 활성을 나타내었다(33). Buntin 등(34)에 따르면, *P. pentosaceus* APa4, *P. pentosaceus* AIa1 및 *E. faecium* Ara1 등의 젖산세균은 *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* 및 *L. monocytogenes*를 효과적으로 저해하였다고 보고하였다. 해산물에서 분리된 *E. faecium* 12 균주는 항리스테리아 활성을 나타내었고 특히 PE 2-2 균주는 *S. aureus*도 저해할 수 있었다고(35) 보고된 바 있어 본 연구의 실험 균주는 이미 보고된 일부의 균주들과 유사하게 식중독균에 대한 항균 스펙트럼이 나타났다.

항생제에 대한 저항성

실험 균주에 대한 항생제의 MIC를 측정한 결과는 Table 5와 같다. *E. faecium* AJ06에 대한 카나마이신, 페니실린, 스트렙토마이신과 반코마이신 등의 MIC는 64 µg/mL 이상으로 이들 항생제에 대한 저항성이 비교적 높았던 반면, 암피실린, 에리트로마이신과 테트라사이클린 등의 MIC는 4 µg/mL 이하로 감수성이 높게 나타났다. *L. mesenteroides* AJ13에 대한 카나마이신의 MIC는

512 µg/mL로 이에 대한 저항성이 가장 높았으나, 암피실린에 대해선 감수성이 높은 것으로 나타났다. *P. halophilus* AJ22도 카나마이신, 테트라사이클린 및 반코마이신 의해선 저항성이 높았으나, 에리트로마이신이나 스트렙토마이신에 의한 MIC는 낮은 농도로 측정되었다. *L. sakei* AJ29는 카나마이신, 페니실린과 반코마이신에 의한 MIC는 높았던 반면, 암피실린과 에리트로마이신에 의해 감수성이 매우 높게 나타났다. *P. pentosaceus* AJ35에 대한 카나마이신의 MIC는 256 µg/mL, 스트렙토마이신과 반코마이신의 MIC는 64 µg/mL로 높게 나타났으나, 페니실린(8 ig/mL)과 테트라사이클린(4 µg/mL)에 의해선 낮은 농도에 의해 저해되었다.

락토바실리는 본질적으로 광범위한 항생제에 대한 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있는데 특히 *L. rhamnosus*와 *Lactobacillus casei*는 반코마이신에 대해 저항하며, 대부분의 비피도박테리아는 본질적으로 날리딕스산(nalidixic acid), 네오마이신(neomycin), 폴리믹신(polymyxin) B, 카나마이신, 겐타마이신(gentamycin), 스트렙토마이신과 메트로니다졸(metronidazole) 등에 저항하는 것으로 알려져 있다(4). 특히 *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus leichmannii*, *L. acidophilus* 등은 D-alanine ligase-related enzymes을 가지고 있으므로 약제에 대한 저항성이 큰 것으로 보고되고 있다(36). Enterococci는 아미노글리코사이드(aminoglycosides)와 베타-락탐(beta-lactams) 등의 항균제에 높은 생존율을 나타낸다고 알려져 있고, 특히, *E. faecium*은 고농도의 페니실린에 본질적으로 저항하는 것으로 밝혀졌다(37). 어류 및 어육 가공품에서 분리된 *L. curvatus*와 *P. pentosaceus* 균주들 중 97.5%는 암피실린에 민감할 뿐만 아니라, 겐카마이신(100%), 에리트로마이신(95%), 클린클린담(87.5%), 테트라사이클린(95%) 및 크로람페니콜(chloramphenicol, 100%) 등에 대한 감수성도 높은 반면, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. 및 *Leuconostoc* spp. 등은 본질적으로 반코마이신에 저항한다고 보고하였다. 하지만 대부분의 *E. faecium* 균주는 암피실린, 반코마이신, 겐타마이신, 카나마이신, 스트렙토마이신, 테트라사이클린, 크로람페니콜 및 에리트로마이신에 대한 저항성이 낮은 것으로 나타났다(32). 가물치 내장에서 분리된 *L. mesenteroides* sp. *mesenteroides*는 streptomycin에 대한 저항성이 높은 반면, 겐타마이신, 테트라사이클린, 크로람페니콜 및 암피실린 등에 대해 감수성이 높았다고 하였으며, 프로바이오틱 균주는 항생제에 대한 내성이 강할수록 생존 가능성이 높아 장관 내에서 증식하여 유용한 기능을 발휘하게 된다고 밝힌 바 있다(24). 한편, 젖갈로부터 분리된 *Pediococcus* spp.의 항생제에 대한 내성을 조사한 결과, 암피실린, 크로람페니콜, 에리트로마이신, 카나마이신, 스트렙토마이신 및 테트라사이클린 등에 대해 감수성이 높았고, 카나마이신의 MIC는 다른 항생제

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of antibiotics against 5 strains isolated from salted seafood

Strains	MIC (ig/mL)						
	Ampicillin	Erythromycin	Kanamycin	Penicillin	Streptomycin	Tetracycline	Vancomycin
<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	4	<2	256	64	128	<2	64
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	<2	8	512	64	32	16	32
<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	8	4	512	32	4	64	128
<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	<2	<2	128	128	8	32	512
<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35	16	16	256	8	64	4	64

Table 6. Safety assessments including haemolytic activity and production of biogenic amines of the tested strains

Contents	Strains				
	<i>Enterococcus faecium</i> AJ06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AJ13	<i>Pediococcus halophilus</i> AJ22	<i>Lactobacillus sakei</i> AJ29	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AJ35
Haemolysis	α	+	-	-	+
	β	-	-	-	-
	γ	-	+	+	-
Biogenic amine production	Histamine	-	-	-	-
	Tyramine	-	-	-	+
	Cadaverine	+	+	-	+
	Putrescine	+	-	-	-

보다 높았으며, 반코마이신(2,048 µg)에 대한 저항성은 매우 높게 나타났다. 또한 반코마이신에 대한 저항성은 많은 젯산세균들의 본질적인 특성이며, 크로람페니콜, 에리트로마이신 및 테트라사이클린 에 대한 저항성은 균주에 따라 다양하다고 보고하였다(22).

용혈능과 생체 아민생산물

실험 균주들의 안전성 평가를 위해 용혈능과 아미노산 카복실기 제거 반응에 의한 생체 아민 생산능을 측정 한 결과는 Table 6 과 같다. 실험 균주들은 모두 베타용혈독을 생산하지는 않았으나, *E. faecium* AJ06과 *P. pentosaceus* AJ35는 알파용혈독을 생산하였고, *L. mesenteroides* AJ13과 *P. halophilus* AJ22 및 *L. sakei* AJ29는 감마용혈독을 생산하는 것으로 확인되었다. 한편, 5종의 젯산세균들은 히스티딘을 분해할 수 없었으나, AJ06은 라이신(lysine)과 오르니틴(ornithine)을 분해할 수 있었고, AJ13은 라이신을 분해하였고, AJ35는 티로신(tyrosine)과 라이신을 분해하였다.

민물고기의 내장으로부터 분리된 *E. faecium*과 *L. mesenteroides* 는 pH 3.0의 강산 하에서와 썩게증염, 판크레아틴(pancreatin) 및 펩신 존재 하에서도 생존하였고 항균물질을 생산하여 식중독균에 대한 강한 저해 활성을 나타내었으며, 용혈 활성은 전혀 나타내지 않아 프로바이오틱로서 적합하다고 보고된 바 있으며(38), 본 연구의 결과는 이와 유사하다는 것을 확인하였다. 육류, 우유 제품과 채소류 등에서 분리된 enterococci들로부터 용혈독 등 독성인자가 검출되지 않았다고 보고된 바 있고(39), 김치로부터 분리된 *L. plantarum* NO1과 *P. pentosaceus* MP1 등 10여 종의 젯산세균들은 용혈능이 관찰되지 않았다고 밝힌 바 있다(40). Vest-erlund 등(41)은 프로바이오틱 젯산세균으로부터 병원성의 알파 및 베타용혈 활성이 확인되지 않았다고 하였고, Osmanagaoglu 등(42) 모유로부터 분리된 *P. pentosaceus* OZF에 의해 비병원성인 베타용혈능만 확인되었다고 보고한 바 있다.

Pereira 등(43)에 따르면, 해산물에서 분리된 총 52종의 젯산세균 중 3종(1IS11, 4IS16, 4IS17)은 아미노산의 카복실기 제거 효소를 생성하지 않은 것으로 확인되어 이들은 발효된 어육 가공품

내에 생체 아민을 축적하지 않은 것으로 추정하였고, 생체 아민 축적에 영향을 주는 인자는 아미노산을 카복실기 제거 시키는 미생물의 존재 유무, 유리 아미노산의 이용능과 카복실기 제거 효소를 생산하는 미생물의 증식에 적합한 배양 조건 등이라고 보고한 바 있다. 해산물에서 분리된 *E. faecium* FR1-2는 카복실기 제거 효소에 의해 전구체 라이신, 오르니틴, 히스티딘 및 티로신들로부터 생체 아민을 생성하였으나, FB 1-3-B, FB 3-1 및 FTA 1-2 균주는 라이신, 오르니틴 및 티로신을 카복실기를 제거하였다(35). 히스티딘 decarboxylase 활성이 다양한 세균으로부터 확인될 지라도 몇몇 *Lactobacillus* spp.는 히스타민(histamine) 생성을 억제하는 효과가 있으나, 티로신 decarboxylase 활성은 락토바실리에서 주로 확인되며, 푸트레신(putrescine)과 카다베린(cadaverine)을 생성하는 균주도 간혹 보고되고 있다(44). Bover-Cid와 Holzapfel(14)의 보고에 따르면, 177종의 젯산세균을 대상으로 조사한 결과 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *L. curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *Carnobacterium* spp. 및 *Enterococcus* spp. 는 tyrosine decarboxylase 의 활성을 나타내었고, 락토바실리 몇몇 균주는 푸트레신과 티라민(tyramine) 및 카다베린을 생산하였다고 하였다. 게다가 일부 락토바실리 균주와 *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp., 및 *Pediococci* 균주들은 decarboxylase 활성을 나타내지 않았다고 하였다. 합성배지 상에서 생체 아민의 생산능이 특정 균종에서 보다는 균주에 따라 상이한 것으로 보고되고 있다. Matamoros 등(45)는 식품 내에 생체 아민 생산은 젯산세균을 포함한 일부 세균과 관련 있으며, 특히 해산물 내에서 많은 양의 생체 아민이 존재한다고 밝혔고, 해산물로부터 유래한 총 7종의 젯산세균에 의해 약 5 µg/mL 이하 소량의 히스타민과 티라민을 생성하였으나, 이는 인체에 유해성이 심각한 정도는 양은 아니라고 하였다.

돌연변이 유발능

실험 균주의 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에 대한 유전적 돌연변이 유발 가능성을 조사한 결과는 Table 7과 같다. 대사활

Table 7. Number of revertant colonies induced by the tested strains

Tester strain	Concentration (µg/plate)	No. of revertant colonies/plate													
		Treated substances													
		2-AA		AF-2		AJ06		AJ13		AJ22		AJ29		AJ35	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
TA98	0.1	432±25													
	0.5	416±24													
	D.W.					21±2	29±3	22±2	30±3	19±2	29±3	19±2	28±3	22±2	30±3
	312.5					20±2	27±4	19±4	27±1	20±3	30±2	22±4	28±1	20±2	28±3
	625					22±4	30±4	20±1	27±4	22±2	27±2	21±1	27±1	18±4	30±2
	1,250					20±3	28±2	20±2	30±3	20±4	29±4	22±4	29±3	19±1	30±1
	2,500					18±1	29±2	21±4	29±2	18±2	28±4	21±2	30±2	20±1	29±1
	5,000					22±2	28±4	18±2	28±1	20±1	29±3	21±3	29±2	19±2	27±3
TA100	0.01	512±19													
	1.0	724±33													
	D.W.					109±10	129±15	107±11	131±11	104±14	123±5	103±13	131±14	109±13	120±10
	312.5					111±7	124±8	105±7	129±9	105±11	119±7	105±9	124±11	105±9	126±16
	625					106±5	127±10	110±13	121±12	110±13	130±12	109±5	122±12	111±4	128±10
	1,250					102±13	131±12	106±10	126±14	111±9	124±9	111±7	123±7	102±10	129±13
	2,500					110±11	120±11	103±10	120±10	104±15	129±8	108±12	128±8	104±7	127±9
	5,000					103±8	129±9	107±6	122±13	108±10	126±14	106±15	130±10	110±9	133±11

성적인 S9-mix를 첨가하지 않은 상태에서 양성 대조물질인 AF-2 (0.01-0.1 µg/plate)에 의해 TA98과 TA100 균주는 돌연변이가 유발되어 plate 당 각각 432±25 및 512±19 colony/plate의 콜로니가 생성되었다. 게다가 S9-mix를 첨가한 상태에서 2-AA (0.5-1.0 µg/plate)는 TA98 (416±24 colony/plate)과 TA100 (724±33 colony/plate) 균주에도 상당히 강한 복귀 돌연변이를 유발하였다. S9-mix가 존재하지 않은 상태에서 음성 대조물질인 증류수를 처리한 경우 TA98 균주의 자연 복귀 돌연변이에 의해 생성된 콜로니수는 19-22 colony/plate이고 S9-mix가 존재하는 경우에는 28-30 colony/plate 정도로 나타났는데 이들 음성 대조물질에 비해 유의하게 돌연변이 콜로니수를 증가시킨 실험 균주(312.5-5,000 µg/plate)는 없었던 것으로 나타났다. 또한 S9-mix를 처리하지 않은 경우 음성 대조물질에 의해 유발된 TA100 균주의 자연 복귀 돌연변이 콜로니수는 103-109 colony/plate이고, S9-mix를 처리한 경우에는 120-131 colony/plate로 확인되었는데, 실험 균주(312.5-5,000 µg/plate)에 의해 돌연변이 콜로니수가 유의하게 증가된 경우는 확인되지 않았다.

Hirose 등(16)에 따르면, 가열 처리한 *L. plantarum* L-137을 냉동 건조한 다음 dextrin과 혼합하여 제조한 LP20은 312.5-5,000 µg/plate의 농도로 처리했을 때 S9-mix 존재 유무에 관계없이 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에 대하여 돌연변이를 유발하지 않았다 하였다. 게다가 양성과 음성 대조구에 의해 유발된 복귀 돌연변이 콜로니수는 기존의 데이터에서 얻어진 콜로니의 범위 내에서 나타난 반면, *L. brevis* KB290 균주에 의해서 S9-mix 존재에 관계없이 세균의 복귀 돌연변이 콜로니가 관찰되지 않았다(46). 음성 대조구에 의해 생성된 복귀 돌연변이 콜로니수는 기존의 데이터에서 얻어진 콜로니 수의 평균±3(표준편차)이었고, 양성 대조구에 의한 콜로니 수는 음성 대조구 값의 2배 이상으로 나타났다. *L. pentosus* b240의 투여량에 대해서도 침전 현상이나 돌연변이 유발 세균의 증식 저해는 전혀 나타나지 않았고 복귀 돌연변이 콜로니 수가 농도의존적으로 증가되지 않았으므로 돌연

변이를 유발능을 관찰되지 않았다(47).

젖산세균은 오랜 세월 동안 우리가 이용해 오고 있는 동안에도 독성 발생 가능성이 낮아 안전성이 확보된 균종으로 알려져 있으나, 돌연변이 유발능 및 용혈능 등 안전성 평가는 프로바이오틱 균주의 선발 과정 중 필수요건이며 특히, 생물학적 보존제로 이용하기 위해선 안전성 평가는 반드시 실시되어야 한다. 멸균 젖갈에서 분리된 내산성의 젖산세균 5종으로부터 돌연변이 유발 가능성이 전혀 나타나지 않았으며, 특히 *P. halophilus* AJ22와 *L. sakei* AJ29는 생체 아민과 병원성 알파 및 베타용혈독을 생성하지 않음을 확인하였다. 게다가 항생제에 대한 내성이 강하고 항균물질 생산에 따른 식중독균 제어 효과도 탁월하였으며, 장내 상피세포에 대한 부착능도 높게 나타났다. 또한 인공 소화액에 대한 저항성이 높아 소장에 도달한 후 콜로니를 형성하여 장내 환경을 개선시킬 수 있을 것으로 간주되어 이들 균주는 생물학적 보존제로 이용 가능성이 높은 안전한 프로바이오틱스임을 확인하였다.

요 약

멸균 젖갈로부터 분리한 젖산세균을 대상으로 프로바이오틱 균주로서의 기능적 특성과 안전성을 평가하였다. 분리된 균주는 생화학적 특성과 당 발효능 및 염기순서 분석을 통해 *Enterococcus faecium* AJ06, *Leuconostoc mesenteroides* AJ13, *Pediococcus halophilus* AJ22, *Lactobacillus sakei* AJ29 및 *Pediococcus pentosaceus* AJ35로 동정되었다. AJ06, AJ22 및 AJ29 균주들은 펩신이 첨가된 인공 위액 및 쓸개즙액에서 강한 저항성을 나타내었고, taurocholic acid 혹은 taurodeoxycholic acid가 첨가된 MRS 한천 평판 배지 상에서 쓸개즙분해효소를 생산하였다. 특히, Caco-2 세포에 대한 높은 부착능과 다양한 항생제에 대한 저항성을 나타낸 AJ22와 AJ29 균주는 항균물질 생산으로 인해 식중독균의 증식을 효과적으로 저해하였다. 이들 균주는 혈액 한천 평판배지

상에서 알파 및 베타용혈독을 나타내지 않았고, 아미노산 전구체가 함유된 MRS 액상배지 내에서 생체 아민을 생산하지 않았으며, *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100 균주에 대한 돌연변이도 유발하지 않았다.

References

- Wessels S, Axelsson L, Hansen EB, de Vuyst L, Laulund S, Lahteenmake L, Lindgren S, Mollet B, Salminen S, von Wright A. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 498-505 (2004)
- Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Design* 8: 99-110 (2002)
- Joint FAO/WHO Working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada (2002)
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215 (2000)
- Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digest. Liver Dis.* 38: S242-S247 (2006)
- Salminen S, Von-Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, De Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birke-land SE, Mattila-Sandholm T. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93-106 (1998)
- Taranto MP, de Ruiz Holgado AP, de Valdez GF. Bile salt hydrolase activity in *Enterococcus faecium* strains. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 13: 375-379 (1995)
- Tuomola EM, Ouwehand AC. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 45-51 (1998)
- Crow V, Gopal P, Wicken A. Cell surface differences of lactococcal strains. *Int. Dairy J.* 5: 45-68 (1995)
- Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94: 981-987 (2003)
- Hole H, Nilssen O, Nes IF. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879-3887 (1991)
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496 (1966)
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KG, Tsakalidou E, Nychas GE, Panagou EZ, Tassou CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33: 282-291 (2013)
- Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41 (1999)
- Maron DM, Ames BN. Revised method for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215 (1983)
- Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Muroyama K, Miwa Y, Fujishima A, Lynch B. Safety studies of LP20 powder produced from heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137. *Regul. Toxicol. Pharm.* 54: 214-220 (2009)
- Francoise L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27: 698-709 (2010)
- Mauguin S, Novel G. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *J. Appl. Bacteriol. Environ. Microbiol.* 76: 616-625 (1994)
- Mah JH, Chang YH, Hwang HJ. *Panenibacillus tyraminigenes* sp. nov. isolated from myeolchi-jeotgal, a traditional Korean salted and fermented anchovy. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 209-214 (2008)
- Guan L, Cho KH, Lee JH. Analysis of the cultivable bacterial community in *jeotgal*, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.* 28: 101-113 (2011)
- Cho GS, Do CH, Bae CY, Cho GS, Whang CW, Sin HK. Candidate of probiotic bacteria isolated from several *jeotgals*: Korean traditional fermented seafoods. *J. Food Sci. Nutr.* 11: 140-145 (2006)
- Lee KW, Park JY, Sa HD, Jeong JH, Jin DE, Heo HJ, Kim JH. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from *Jeotgals*, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe* 28: 199-206 (2014)
- Lee NK, Noh JE, Choi GH, Park EJ, Chang HI, Yun CW, Kim SW, Kang CW, Yoon YC, Paik HD. Potential probiotic properties of *Lactococcus lactis* NK34 isolated from *jeotgal*. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 843-847 (2007)
- Allameh SK, Daud H, Yusoff FM, Saad CR, Ideris A. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *Afr. J. Biotechnol.* 11: 3810-3816 (2012)
- Cho GS, Do HK. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from a traditional *Jeotgal* product in Korea. *Ocean Sci. J.* 41: 113-119 (2006)
- Sanchez B, Reyes-Gavilan CG, Margolles A. The F₁F₀-ATPas of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environ. Microbiol.* 8: 1825-1833 (2006)
- Ljungh A, Wadstrom T. Lactoc acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 7: 73-90 (2006)
- Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1729-1738 (2006)
- Liong MT, Shah NP. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.* 15: 391-398 (2005)
- Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 82-100 (2003)
- Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615 (1991)
- Munoz-Atienza E, Gomez-Sala B, Araujo C, Campanero C, De Campo R, Hernandez PE, Herranz C, Cintas LM. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 13: 1-22 (2013)
- Nanasombat S, Phunpruch S, Jaichalad T. Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafood products for their potential use as starter cultures. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 34: 255-262 (2012)
- Buntin N, Chanthachum S, Hongpattarakere T. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 30: 141-148 (2008)
- Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Canamero MM, Galvez A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* 27: 955-961 (2010)
- Bernardeau M, Vernouxx JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganism: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 278-285 (2008)
- Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 291-301 (2008)
- Rim EJ, Monia EB, Pilar CM, Karola B, Inmaculada CFN, Jorge BV, Balkiss BZ. *In vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Can. J. Microbiol.* 62: 60-71 (2015)
- Omar NB, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NMK, Franz CMAP, Holzapfel WH, Perez-Pulido R, Martinez-Canamero M, Galvez A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *System. Appl. Microbiol.* 27: 118-130 (2004)
- Ryu EH, Chang HC. *In vitro* study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Ann. Microbiol.* 63: 1387-1395 (2013)

41. Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotics isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 325-331 (2007)
42. Osmanagaoglu O, Kiran F, Ataoglu H. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probio. Antimicro. Prot.* 2: 162-174 (2010)
43. Pereira CI, Barreto CMT, San Romao MV. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 211-216 (2001)
44. O'Brien J, Crittenden R, Ouwehand AC, Salminen S. Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 418-424 (1999)
45. Matamoros S, Pilet MF, Gigout F, Prevost H, Leroi F. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 26: 638-644 (2009)
46. Yakabe T, Moore EL, Yokota S, Sui H, Nobuta Y, Fukao M, Palmer H, Yajima N. Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2450-2453 (2009)
47. Szabe NJ, Dolan LC, Burdock GA, Shibano T, Sato SI, Suzuki H, Uesugi T, Yamahira S, Toba M, Ueno H. Safety evaluation of *Lactobacillus pentosus* strain b240. *Food Chem. Toxicol.* 49: 251-258 (2011)