

Probiotic Characterization of *Fructobacillus fructosus* F2 Isolated from Honeybee Larvae

Woo Young Bang*

National Institute of Biological Resources, Environmental Research Complex, Incheon 22689, Korea

Received August 21, 2024 / Revised September 2, 2024 / Accepted September 5, 2024

Fructobacillus spp. strains (Fs) were isolated from honeybee larvae to evaluate their functionality and potential use as probiotics. Anti-microbial activity was generally observed in F strains against Gram-negative, Gram-positive, and yeast strains, with F2 and F3 being superior, particularly F2. Kerosene emulsification was similarly observed in strains other, except for F4. Emulsification analysis based on carbon sources showed that F2 had high emulsification in the presence of fructose but lower than the standard strain and 16S rDNA sequence analysis revealed that the F2 was identified as *Fructobacillus fructosus*. The growth curve of F2 showed maximum growth at 18 hr, followed by a slight increase. Furthermore, antimicrobial activity and pH showed maximum and minimum values at 18 hr, respectively, and remained constant thereafter. Lactic acid content showed a slight decrease after reaching its maximum value at 24 hr of culture. Acid resistance was observed up to pH 2.5, but completely lost at pH 2.0. Bile acid resistance was generally strong. F2's adhesion to mucin was higher compared to *S. Typhimurium*, which increased until 18 hr of culture and then decreased. Enzyme activity according to anaerobic culture time was high for carboxymethylcellulase (CMCase), avicelase, and mannanase, regardless of the presence of fructose. Auto- and co-aggregation were higher compared to the standard strain, and surface hydrophobicity was high for chloroform, which indicates electron donor properties. Therefore, the *Fructobacillus fructosus* F2 can be considered a potential probiotic due to its excellent anti-microbial, emulsification, acid resistance, bile resistance, CMCase, mannanase, and auto- and co-aggregation properties.

Key words : Anti-microbial activity, *Fructobacillus*, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, Probiotics

서 론

유산균(Lactic acid bacteria; LAB)은 유제품, 발효식품, 식물 표면, 토양, 사람 및 동물의 위장관, 여성생식기관, 구강 등 다양한 환경에서 서식하고 있다. 이러한 유산균은 다양한 환경에 적응하기 위해 특이적인 생리적 및 생화학적 특성을 진화해 왔다[10]. 특이성을 보이는 예로써 식물의 phytoalexin에 대한 저항성, 위장관 담즙산에 저항성 등이 해당된다[13, 29]. 이와 같은 특성은 발효식품에 적합한 starter 배양 유산균 및 프로바이오틱스 등으로 활용이 가능하다[4, 7, 30].

Fructophilic LAB (FLAB)는 최근래에 발표된 LAB의 특이 그룹으로써 특이적인 생화학적 특성에 기인하여 *Fruc-*

tobacillus 속으로 재분류되었다[9, 10]. *Fructobacillus*는 fructophilic bacterium으로 과당이 풍부한 식물의 꽃잎, 과실 및 발효식품 등에서 주로 발견된다[9, 28, 31]. 본 균주들은 포도당보다 과당을 우선적으로 이용하는 균주로써 1-40% 과당 농도에서 성장이 가능하며, 최적 과당 농도는 5% 내외이다[11, 24]. 과당을 우선적으로 이용하는 것은 alcohol/acetalddehyde (adhE) 유전자의 상실에 기인된다[18]. FLAB는 obligate (절대의존)와 facultative (통성) fructophilic group으로 분류된다[12].

최근래 상업적으로 과당시럽, 벌꿀, 과실음료수, 젤리, 아이스크림 등 과당이 많이 포함된 식품의 유통이 증가됨으로써 비만과 연관성이 입증되고 있다[3, 12]. 이와 같은 과다 과당 섭취에 따른 문제를 해결하기 위해 프로바이오틱스인 *Lactobacillus curvatus* HY7601 및 *Lactobacillus plantarum* KY1032 등으로 비만을 포함하는 고과당 섭취에 따른 물질대사 증후군의 발생을 방지하는 방법이 제시되고 있다[21]. 따라서 기존에 사용되는 *Lactobacillus*보다 과당의 처리에 있어 보다 적합한 *Fructobacillus* 균주를 활용하는 연구들이 최근래 수행되어 오고 있다[24].

본 연구에서는 꿀벌 유충에서 분리된 *Fructobacillus* spp.

*Corresponding author

Tel : +82-32-590-7084, Fax : +82-32-590-7230

E-mail : wyoungbang@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

F 균주들에 대해 배양 특성, 항균 기능성 및 프로바이오틱 스토서의 가능성을 분석하기 위해 연구하였다.

실험재료 및 방법

시료 제조

꿀벌 유충으로부터 이전 연구를 통해 분리된 균주는 de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 1 mL씩 분취 하여 13,500 RPM에서 원심분리 한다. 원심분리 후 상등액은 채취하여 0.2 µm syringe filler로 여과한 후 -20°C에 보관하여 추출물을 확보하였다. 표준균주로 사용된 *Fructobacillus fructosus* KCTC3544는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 이용하였다. 본 연구에서 사용된 *Fructobacillus* spp. F들은 꿀벌 유충으로부터 분리된 균주들이다.

병원성 세균 표준균주 이용한 항균 활성 평가

분리된 *Fructobacillus* 균주들의 1차 스크리닝을 위하여 그람 음성균인 *Salmonella* Typhimurium (ST, KCTC12401), *E. coli* (EC; ATCC10536)와 그람 양성균인 *Bacillus cereus* (BC, ATCC11778), *Staphylococcus aureus* (SA, ATCC6538) 그리고 효모인 *Candida albicans* (CA, KCTC7122)를 이용하여 DISC 또는 microtiter plate 방법으로 1차 스크리닝을 수행하였다. 항균 분석을 위해 overnight (O/N)으로 전 배양된 균주는 10⁶ colony-forming unit (CFU)/ml로 맞추어 연구에 사용되었다. 반응액을 microtiter plate에 첨가하거나 disc에 점적 한 후 37°C에서 O/N 배양하면서 반응 성상을 관찰하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 평가하였다.

선발된 균주의 minimal inhibitory concentration (MIC) 분석

선발된 균주들의 MIC 측정을 위하여 1차 스크리닝과 같은 그람 음성균인 EC와 그람 양성균인 SA를 이용하여 DISC 또는 microtiter plate 방법으로 minimal inhibitory concentration (MIC) 분석을 수행하였다. 항균 분석을 위해 O/N으로 전 배양된 균주는 10⁶ CFU/ml로 맞추어 연구에 사용되었다. 반응액을 microtiter plate에 첨가하거나 disc에 점적 한 후 37°C에서 O/N 배양하면서 반응성상을 관찰하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 평가하였다.

유화력 분석

유화력 평가를 위해 *Fructobacillus* spp. 배양액은 다음과 같이 전처리가 수행되었다. MRS에 포함되어 있는 계면활성제에 의해 에러가 발생하는 것을 방지하도록 배양 후 2,000× g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거하였

다. 유산균은 phosphate-buffered saline (PBS) 완충액(pH 7.4)으로 2회 세척한 후, 배양액에 대해 1/5 양의 PBS 완충액(pH 7.4)으로 현탁하였다. 처리된 유산균은 25°C에서 24시간 저속 RPM으로 바이오 계면활성제를 추출하였다. 처리된 반응액은 2,000× g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 수거한 후, 0.2 µm 필터로 완전히 제거하여 유화력 시험에 사용하였다.

Kerosene 유화력은 6 ml kerosene과 4 ml *Fructobacillus* spp. 무세포추출액을 혼합하여 2분 동안 vortexing을 통해 강하게 혼합하였다. 그런 후에 실온에서 24시간 방치 후 다음과 같은 방법에 의해 유화력을 평가하였다[6].

$$\text{유화력(\%)} = \text{유화층높이(cm)} \times 100 / \text{전체높이(cm)}$$

생장 곡선 조사

최적 생장 온도 조사를 위해 *Fructobacillus* spp. F 균주들을 25, 30, 37°C에서 5 ml로 24시간 배양 후 샘플을 수거하여 600 nm 흡광도 조사를 수행하여 각 온도에서 성장력을 비교하였다.

Fructobacillus spp. F2 성장곡선을 분석하기 위해 본 균주를 100 ml 배지에 1/100로 접종하였다. 접종된 균주는 30°C에서 배양하면서 6시간 간격으로 샘플링을 수행하였다. 샘플링된 용액은 600 nm에서 흡광도를 측정하는 것에 의해 유산균의 성장도를 평가하였다. 항균력은 위에서 서술된 MIC 측정 방법에 의해 수행되었다. 유기산 함량은 HPLC에 의해 수행하였으며, 전개용매는 acetonitrile : water (0:100-100:0 v/v)를 사용하였고, 254 nm에서 감지하였다. HPLC의 표준품으로 lactic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 구입하여 사용하였다.

탄소원에 따른 바이오 계면활성 능력 평가

탄소원에 따른 바이오 계면활성제 생성 능력을 평가하기 위해 유산균용 최소배지(minimal medium)에 배양하였다. 유산균용 최소배지는 1당 1.6 g K₂HPO₄, 0.4 g KH₂PO₄, 0.1 g NaCl, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.02 g CaCl₂, 1 ml trace element, 8.0 g peptone, 5.0 g yeast extract, 90 g sugar cane molasses or glycerol을 포함한다. Trace element는 100 ml 당 0.5 mg CuSO₄·5H₂O, 1.0 mg H₃BO₃, 1.0 MnSO₄·5H₂O, 0.7 mg ZnSO₄, 1.0 mg MoO₃ 등으로 제조하였다. 탄소원은 glucose, dextrin, inositol, sucrose, maltose, starch, lactose, mannitol, fructose 등을 2.0% 첨가하여 평가하였다. 제조된 최소배지에 1.0% 전배양액을 첨가하여 적절한 온도에서 24시간 배양한 후 4,000× g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 cell에는 PBS 완충액(pH 7.4)으로 2회 세척한 후, 원배양액의 1/5 양의 PBS 완충액(pH 7.4)에 재현탁하였다. 처리된 배양액을 실온에서 roller mixer에서 gentle stirring으로 24시간 반응 후 4,000× g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 처

리된 상등액 3 ml은 0.5 ml toluene과 혼합하여 2분 동안 vortexing 후 30°C에서 1시간 반응하여 상분리를 실시하였다. 수용액 상은 주의 깊게 분리하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다[17].

1 U 유효력(emulsification activity; EU/ml) = 400 nm 0.010 U × 회석 배수(1.16667) = 0.116667

샘플 유효력(Sample emulsification activity; EU/ml) = 400 nm OD 값/0.11667 × blank: PBS 완충액(pH 7.4)

각종 효소 활성 분석

효소 활성을 분석하기 위해 30°C에서 전배양된 F2 균주를 1/100로 접종한 후, 30°C에서 72시간 동안 정지배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 CMCase, avicelase, cellobiase, xylanase, mannanase 등의 활성 분석을 위해 사용하였다.

CMCase, avicelase 및 cellobiase는 반응액에 각각 1.0% carboxymethyl cellulose (CMC), 1.0% avicel 및 15 mM cellobiose를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응하여 포도당의 농도로 활성을 측정하였다[5, 27]. Xylanase 및 mannanase는 각각 1.0% xylan 및 0.5% locust bean gum를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응하여 각각 xylose 및 mannose의 농도로 활성을 측정하였다[16, 19].

내산성 및 내담즙성 분석

내산성 및 내담즙성은 이전에 수행된 연구 방법을 약간 수정하여 분석을 수행하였다[14, 20]. 간략히 서술하면, 9 ml fresh MRS medium의 pH를 HCl에 의해 pH 2.5와 3.5로 조정 후, 1 ml overnight cultural cell 첨가를 첨가하였다. 처리된 용액은 37°C에서 4시간 배양하면서, 각 시간별 생존 개체수 조사를 수행하였다.

내담즙성 분석은 위의 내산성 분석과 유사하게 수행하였으며, 0.3%와 0.6% oxgall (Oxoid, Bstingstoke, UK)를 사용하여 실시하였다.

Mucin 부착 능력 평가

돼지 위 type III mucin (Sigma-Aldrich)는 10 mg/ml로 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 용해시켰다. 제조된 mucin 용액은 이전 수행된 연구 방법을 약간 수정하여 수행하였다[25]. 간략히 서술하면, 1 mg/ml mucin을 microtiter plate에 처리하여 37°C에서 30분 처리 후, 4°C에서 16시간 방치하여 부착하였다. PBS 완충액으로 3회 세척 후 10^7 CFU/ml 대상 미생물을 첨가하여 실온에서 3시간 또는 37°C에서 24시간 반응하였다. 부착되지 않은 균주는 PBS 완충액으로 3회 세척하여 제거한 후, 100 ml 0.1% crystal violet를 첨가하여 실온에서 30분 반응한 후, PBS 완충액으로 3회 세척하였다. 100 ml 30% 초산을 첨가하여 미생물에 부착된 crystal violet를 용출하여 570 nm에서 흡

광도를 측정하여 mucin 결합력을 평가하였다. 뮤이신 부착력 분석에 참고로 사용된 균주들은 ST 및 바위게에서 분리된 *Bacillus licheniformis* NIBR-H-9이 사용되었다.

자가응집력 및 공응집력 분석

유산균은 MRS 배지에서 30 또는 37°C에서 24시간 배양한 후 $4,000 \times g$, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 수거된 세포는 PBS 완충액 2회 세척 후, 1/5 양의 PBS bfr에 재현탁하여 600 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 조정하였다. 자가응집력은 10초간 vortexing하여 5-24시간 동안 방치하면서 상등액 일부를 분취한 후 흡광도를 측정하여 자가응집력 분석을 실시하였다[8].

자가응집력(%) = $(A0-A1) \times 100/A0$

A0: 시작 직후 600 nm 흡광도

A1: 각 해당 시간에 600 nm 흡광도

공응집력을 관찰하기 위해 사용된 병원성 미생물은 ST (KCTC 12401) 및 SA (ATCC 6538)를 사용하여 실시하였다. 해당 균주들은 자가응집력과 유사하게 배양한 후, 전처리되었다. 수거된 균주 현탁액은 병원성균주와 유산균을 각각 동량으로 혼합하여 600 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 조정하였다. 공응집력은 10초간 vortexing하여 5-24시간 동안 방치하면서 상등액 일부를 분취한 후 흡광도를 측정하여 공응집력 분석을 실시하였다.

공응집력(%) = $(A0-A1) \times 100/A0$

A0: 시작 직후 600 nm 흡광도

A1: 각 해당 시간에 600 nm 흡광도

세포표면 소수성 평가

유산균은 MRS 배지에서 30 또는 37°C에서 24시간 배양한 후 $4,000 \times g$, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 수거된 세포는 PBS bfr 2회 세척 후, 1/5 양의 PBS bfr에 재현탁하여 600 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 조정하였다. 세포면소수성은 미생물 현탁액과 xylene, chloroform, ethyl acetate 등과 동량으로 혼합하여 1분간 vortexing하여 30분간 실온에 방치하면서 상등액 일부를 분취한 후 흡광도를 측정하여 세포표면 소수성 분석을 실시하였다[15].

세포표면 소수성(%) = $(A0-A1) \times 100/A0$

A0: 시작 직후 수용층 600 nm 흡광도

A1: 30분 후에 수용층 600 nm 흡광도

통계분석

반복 실험을 통하여 얻은 결과는 SAS program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 분산분석 하였으며, 시료에 대한 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 시료의 분석결과에 대한 유의성 검증은 분산분석을

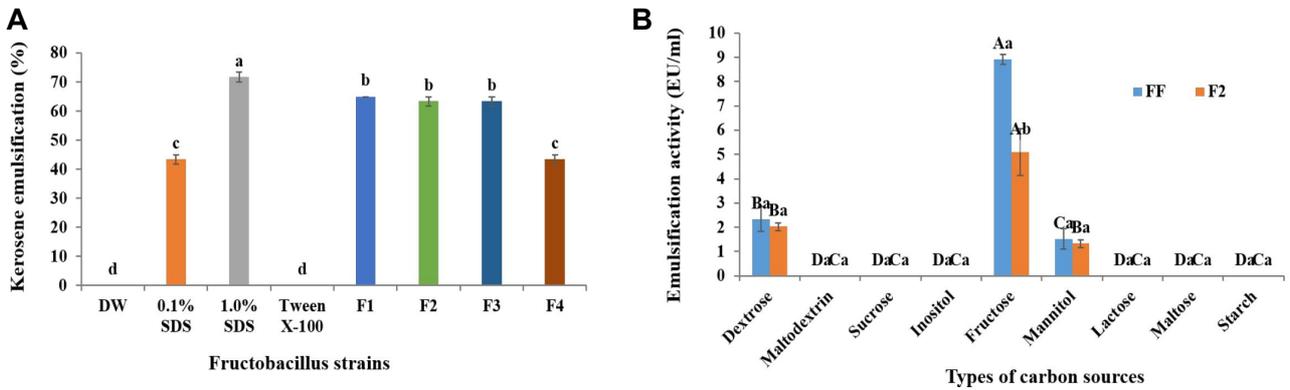


Fig. 2. Evaluations of emulsification. (A) Kerosene emulsification and (B) emulsification of *Fructobacillus fructosus* F2 grown according to carbon sources. For kerosene emulsification, the cell-free supernatant originated from *Fructobacillus* strains were strongly mixed with kerosene, and then left for 24 hr at room temperature. The evaluation of emulsification was indicated by emulsified percent. For emulsification of the extracts from *Fructobacillus* strains grown according to carbon sources, the cultural cells were re-suspended with PBS buffer, and then extracted for 24 hr at room temperature. After the supernatants were recovered from the treated cells, the supernatants were strongly mixed with toluene, and then separated for 1 hr at 30°C. The water phases were separated from organic solvent, and measured at 400 nm in wavelength. FF, *F. fructosus* KCTC3544; F2, *Fructobacillus fructosus* F2. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Different capital letters (A-D) among the groups and small letters (a-d) within the group indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

났다(Fig. 2). 그러나 *Fructobacillus fructosus* F2는 표준균주보다 과당의 존재에서 매우 낮은 유화력을 보였으며, 추가적으로 dextrose, mannitol 등에서 유화력을 보였다.

유산균이 생산하는 바이오 계면활성제는 다른 특성으로 항균활성 및 바이오필름을 파괴하는 능력을 보유하는 것으로 나타나고 있다[1, 23, 32]. 전술한 바와 같이 본 연구의 항균활성 평가에서 항균활성이 전반적으로 높았던 *Fructobacillus* spp. F는 F2와 3이었다. 그러나 유화력 분석에서 나타난 바와 같이 바이오 계면활성제의 생산이 높게 나타난 균주는 F4를 제외한 모든 균주에서 관찰되었기 때문에 유화력이 높은 균주와 항균활성과의 상관관계는 직접적으로 관찰하는 것은 어려운 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 바이오 계면활성제의 항균 활성이 유산 및 AMPs에 비교하면, 상대적으로 낮은 관계에 기인되는 것이 원인일 것으로 추정된다[1, 23, 32].

성장곡선에 따른 특성 분석

본 연구는 프로바이오틱스로써 *Fructobacillus* spp.의 성장에 관한 것이 우선적으로 고려 대상이 되어서 항균활성이 상대적으로 높고, 계면활성 능력이 유지되는 *Fructobacillus fructosus* F2에 대해 세부 연구를 수행했다. F2는 30°C에서 가장 높은 성장률을 보였으며, 20°C와 25°C의 비교적 낮은 온도에서는 성장력이 양호했지만, 30°C 이상의 온도에서는 성장력이 30°C에 비교하여 감소되는 경향성을 보였다(data not shown). F2의 성장력은 37에서는 20°C와 유사한 값을 보였지만, 42°C에서는 급격히 감소되어

30°C에 비교하여 23.3%만의 성장력을 보였다.

본 연구에 사용된 *Fructobacillus* spp. F들은 일반적인 MRS 배지에서 성장이 우수한 것으로 나타났다. MRS 배지에서는 포도당이 추가되어 있지만, 별도로 과당이 공급되어 있지는 않다. 따라서 본 배지에서 모두 성장이 양호한 것은 본 연구에 사용된 *Fructobacillus* spp. F들이 모두 facultative fructophilic strain으로 분류될 가능성이 매우 높은 것으로 평가된다[12].

Fructobacillus fructosus F2의 성장곡선 분석에서 30°C에 배양 시 18시간 부근에서 정지기에 도달되는 것으로 나타났으며, 이후에는 소폭 증가되는 양상을 보였다(Fig. 3). pH 변화는 성장곡선과 연계되었으며, 배양 18시간에 pH 4.021로써 최소 pH에 도달한 이후에 지속적으로 유지되는 것으로 나타났다. MIC90의 농도 역시 성장곡선과 연계되는 것으로 나타났으며, 배양 18시간에 EC와 SA는 MIC90이 각각 29.4와 46.7 µl으로써 최저점 부근인 것으로 관찰되었다. SA는 EC에 비교하여 전반적으로 약간 낮은 항균활성이 관찰되었다. 유산함량은 배양 24시간에서 최대인 것으로 나타났고, 성장곡선에 비교하여 약간 지연되는 결과였다. 배양배지 내 탄수화물 변화는 초기 2.3% 내외에서 시작하여 배양 18시간째에 0.4%까지 감소된 이후에 그 함량 부위에서 지속적으로 유지되는 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 성장곡선의 변화는 탄수화물 함량, pH 및 유산 함량 변화와 연관성 상에서 나타나는 것으로 제외할 수 있다.

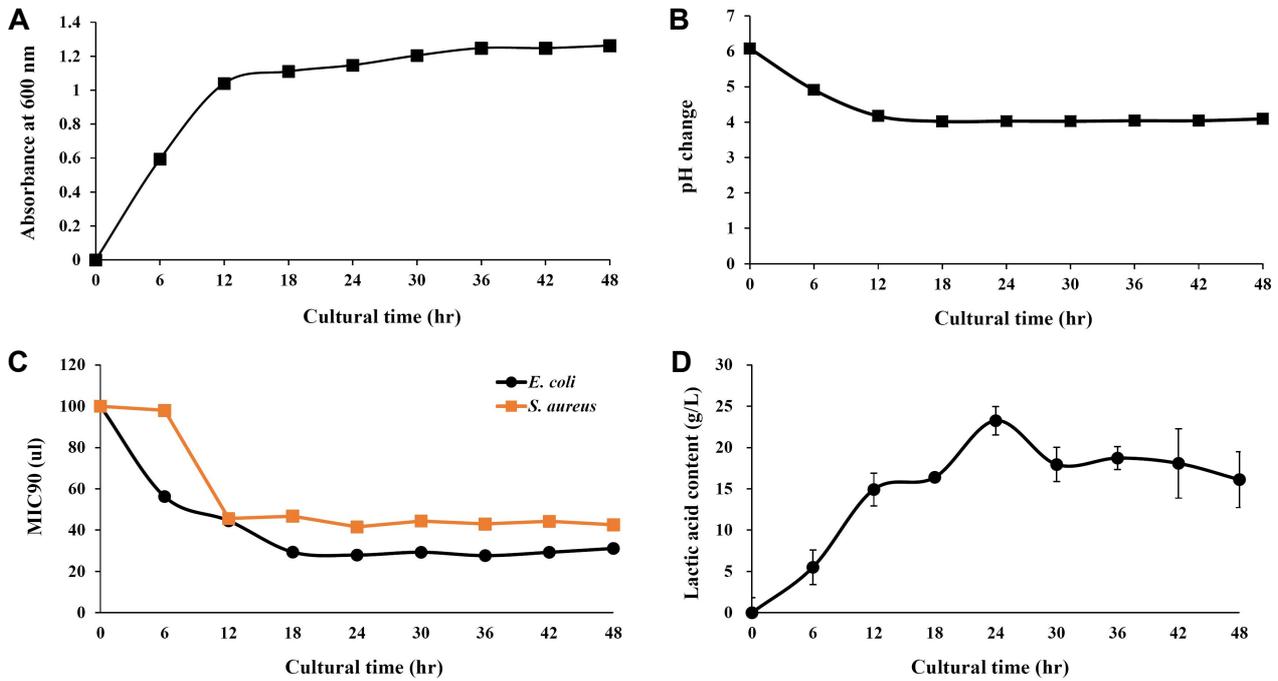


Fig. 3. Assays of phycochemical factors depending on growth times. (A) growth curve, (B) pH changes, (C) anti-microbial activities, and (D) Lactic acid content. *Fructobacillus fructosus* F2 was grown for 48 hr at 30°C. The cultural broth and supernatant were applied for measurements of pH, bacterial growth inhibition, and lactic acid content. Data are presented as mean ± standard deviation (SD).

프로바이오틱스 특성 분석 결과

프로바이오틱스로써 특성을 분석하기 위해 내산성, 내담즙성, 뮤신 부착성 등을 분석하였다. 내산성 분석에서 *Fructobacillus fructosus* F2는 pH 3.5 이상에서는 비교적 높은 생존율을 보였지만, pH 3.0부터 점차적으로 생존율

이 감소되는 경향성을 보였다(Fig. 4). pH 2.5에서는 무처리구에 비교하여 2 log 값 이하의 생존율을 보였고, pH 2.0에서는 생존 개체수가 전혀 관찰되지 않았다. 본 유산균의 생존율은 *Leuconostoc mesenteroides*에 비교 시 생존율이 비슷한 양상을 보이는 것으로 나타났다[2, 14]. 따라서

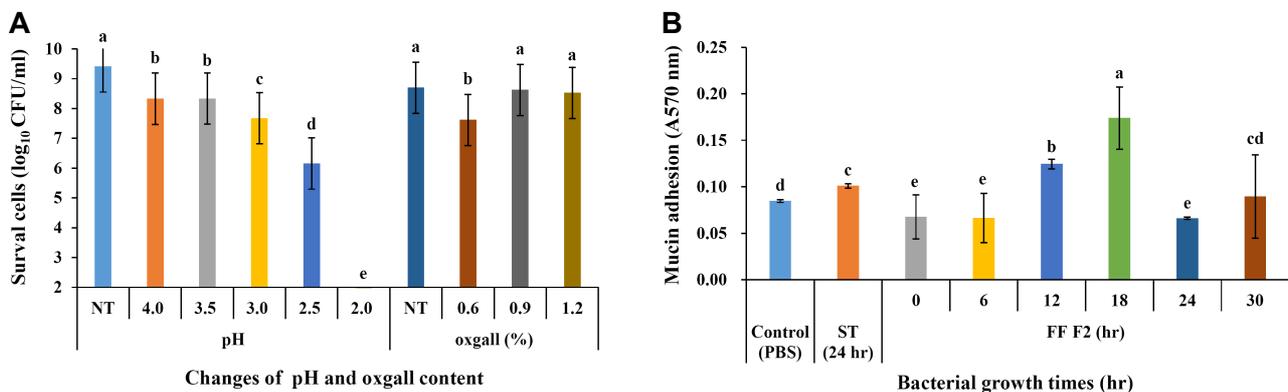


Fig. 4. Acid and bile acid tolerances (A), and mucin adhesion (B). For acid tolerance assay, the adjustment of pH was done from 4.0 to 2.0 by hydrogen chloride solution, and then the cells were re-suspended with the pH adjusted solutions. The treated solutions were reacted for 4 hr at 30°C, and then examined for survival cells. The bile acid tolerance assay was done by procedure similar with acid tolerance assay. For mucin adhesion assay, mucin was treated in a microtiter plate, and then the attached mucin was reacted with bacterial strains. The reacted plate was stained with crystal violet, and then measured at 570 nm in wavelength. ST, pathogenic *S. Typhimurium* c3339; FF F2, *F. fructosus* F2. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Different small letters (a-d) within the group indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

본 분리균주 *Fructobacillus* spp. F2는 강산에 대해 내성이 약간 낮은 경향성은 있지만, 프로바이오틱스로서 활용 가능성은 충분히 존재하는 것으로 추정된다.

Fructobacillus spp. F2의 내담즙성 분석에서 0.6% oxgall에서 일부 감소가 나타났지만, 1.2%까지 높은 생존율이 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 전반적으로 담즙산에 대해서는 매우 안정성이 높은 것으로 평가될 수 있다.

장 점막 성분인 뮤이신에 대한 부착력 분석 결과, *Fructobacillus* spp. F2는 24시간 배양된 ST에 비교하여 약간 높은 뮤이신 부착력을 보였다. F2 배양시간 경과에 따

라 18시간까지는 뮤이신에 대한 부착력이 증가하였지만, 그 이후에는 감소되는 경향성을 보였다(Fig. 4).

세포의 효소 활성 분석결과, *Fructobacillus*는 CMCase, cellobioase, mannase, xylanase 등이 *Lactobacillus plantarum* SSDan-7 및 K9과 비교할 때 과당이 존재할 경우에 2-16배 이상의 활성의 차이가 있는 것으로 관찰되었다(data not shown). 그러나 *Fructobacillus* strain들 간에는 활성의 차이가 유사한 것으로 나타났다. *Fructobacillus fructosus* F2를 정치배양 하면서 표준균주와 효소 활성을 비교 분석해 본 결과, Fig. 5에서 보여지는 바와 같이 과당 존재하에서

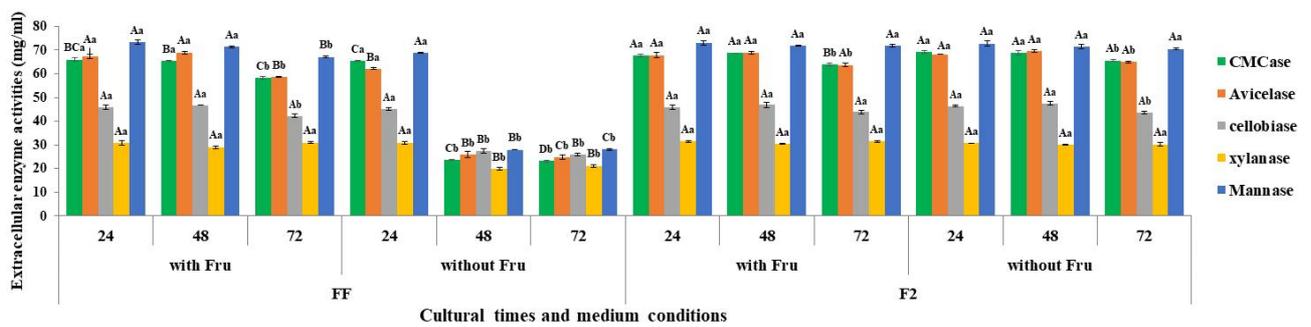


Fig. 5. Assays of extracellular enzymes. *F. fructosus* F2 was cultured for the indicated times at 30°C by standing culture with or without fructose in medium. The cultural supernatants were applied for measurements of each extracellular enzyme activity. FF, *F. fructosus* KCTC3544; F2, *Fructobacillus fructosus* F2. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Different capital letters (A-C) among the groups and small letters (a and b) within the group indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

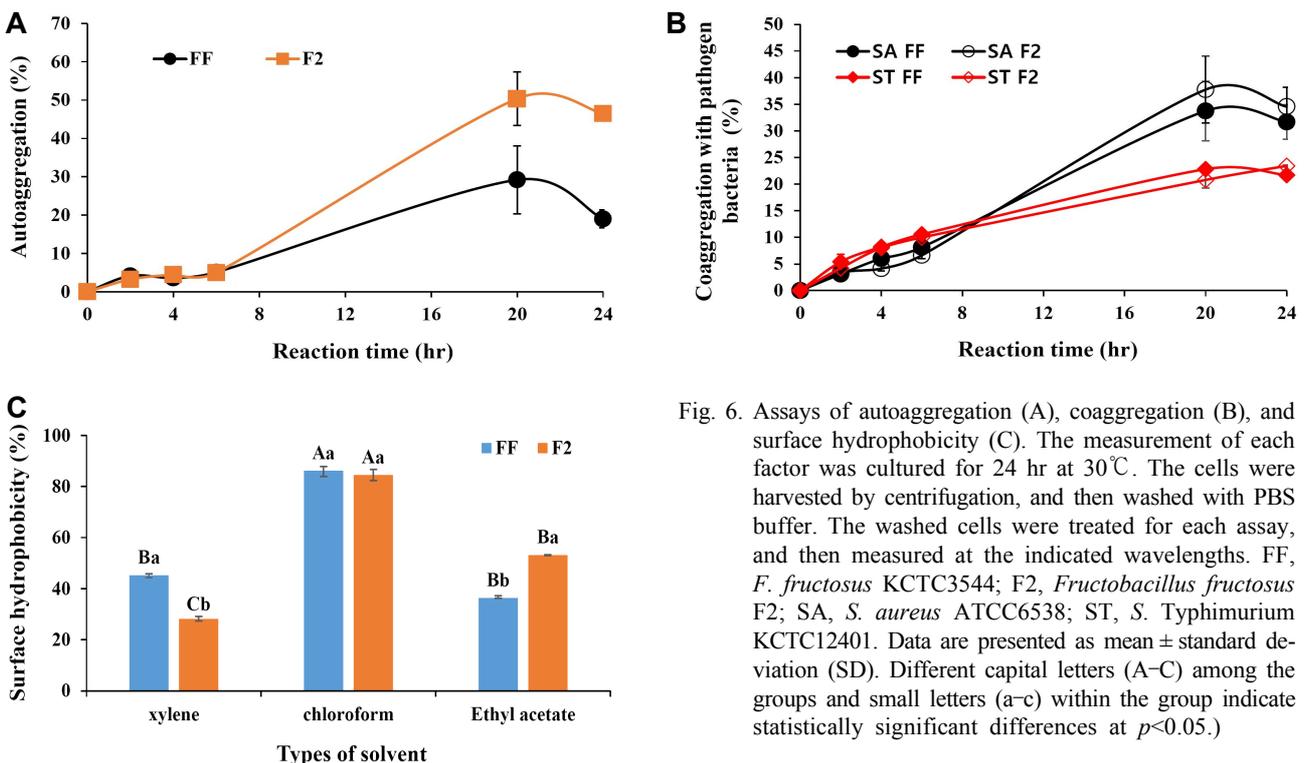


Fig. 6. Assays of autoaggregation (A), coaggregation (B), and surface hydrophobicity (C). The measurement of each factor was cultured for 24 hr at 30°C. The cells were harvested by centrifugation, and then washed with PBS buffer. The washed cells were treated for each assay, and then measured at the indicated wavelengths. FF, *F. fructosus* KCTC3544; F2, *Fructobacillus fructosus* F2; SA, *S. aureus* ATCC6538; ST, *S. Typhimurium* KCTC12401. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Different capital letters (A-C) among the groups and small letters (a-c) within the group indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

는 표준균주와 유사한 양상을 보였지만, 과당을 추가하지 않은 배지 상태에서는 24시간 경과 이후에 표준균주에서 효소 활성이 매우 감소되는 경향성을 보였다. 특히, CMCase, avicelase, mannanase 등의 감소 폭이 높은 것으로 나타났다. 그러나 F2에서는 72시간까지 과당의 존재 유무에 상관없이 변화가 유발되지 않는 특성을 보였다. 이와 같은 현상은 *F. fructosus* KCTC3544가 보다 과당에 민감하게 반응되는 것으로 추정된다.

자가응집력은 점막 등에 부착을 위한 가능성을 평가해 볼 수 있는 수단이 된다. Fig. 6에서 보여지는 바와 같이 표준균주에 비교할 때 F2는 보다 높은 자가응집력을 보였다. 다른 한편으로, 병원미생물과 공용집력은 표준균주와 유사한 응집력을 보였다. 그러나 *L. plantarum*에 비교할 때, F2는 자가 및 공용집력이 낮게 평가되어 장내 부착성이나 병원성 미생물 응집력에서 낮게 형성될 것으로 추정된다. 프로바이오틱스 균주의 응집능력 역시 장부착능과 상관관계가 있으며, 병원성균과의 낮은 응집 정도는 병원체의 생물막형성과, 장점막세포에 부착하는 것을 저해하는 중요한 역할을 한다[26]. 따라서, 본 연구에 사용된 *Fructobacillus fructosus* F2는 병원성 균주의 바이오필름형성과 장점막 부착 방위에 *L. plantarum*에 비교하여 보다 우수할 것으로 추정되었다.

세포표면 소수성은 세포막이나 비생물체 표면의 부착에 있어 중요한 기능을 수행한다[8, 22]. 세포표면 소수성 분석 결과, 분석된 모든 유산균들이 chloroform에 대해 높은 이형 결과가 나타났다(Fig. 6). Xylene에 대해서는 표준균주에 비교하여 F2는 낮게 형성되는 것으로 나타났다. 그러나 ethyl acetate에 의해서는 반대 현상을 보였다. *Fructobacillus fructosus* F2는 xylene에서 표준균주보다 낮았기 때문에 표면 소수성이 상대적으로 낮을 것으로 추정된다. 다른 한편으로, ethyl acetate에서 표준균주보다 높게 형성되었기 때문에 전자수용체로서는 표준균주보다 더 높게 형성될 가능성이 있다. 전자 공여체의 특성을 나타내는 chloroform에 대해서는 유사한 특성을 나타내었기 때문에 두 균주는 유사할 것으로 추정되었다.

이상의 결과를 종합해 보면, *Fructobacillus fructosus* F2는 광범위 항균력, 유화력 및 프로바이오틱스로써 우수한 특성을 유지하기 때문에 프로바이오틱스로써 활용 가능성이 높은 것으로 제외되며, 특히, cellulase, xylanase, mannanase 등의 특성이 우수하여 소화 개선제로써 활용성이 높은 것으로 제외된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 국립생물자원관 연구사업(NIBR202019103)에 의해 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Ashraf, S. A., Hassan, M. I., Snoussi, M., Badraoui, R., Jamal, A., Bardakci, F., Awadelkareem, A. M., Sachidanandan, M. and Patel, M. 2021. Functional and structural characterization of *Pediococcus pentosaceus*-derived biosurfactant and its biomedical potential against bacterial adhesion, quorum sensing, and biofilm formation. *Antibiotics (Basel)* **10**, 1371.
- Benmechemene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P. and Barros-Velázquez, J. 2013. Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 418132.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J. and Popkin, B. M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 537-544.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S. and Leroy, F. 2017. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **100**, 49-160.
- Dar, M. A., Pawar, K. D., Jadhav, J. P. and Pandit, R. S. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **98**, 73-80.
- Das, K. and Mukherjee, A. K. 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Proc. Biochem.* **42**, 1191-1199.
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Jarvinen, H. M., Kant, R., Pietila, T. E., Randazzo, C., Paulin, L., Laine, P. K., Caggia, C., von Ossowski, I., Reunanen, J., Satokari, R., Salminen, S., Palva, A. and de Vos, W. M. 2013. Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1923-1933.
- Doyle, R. J. and Rosenberg, M. 1995. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrates. *Methods Enzymol.* **253**, 532-550.
- Endo, A. and Okada, S. 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2195-2205.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y. and Dicks, L. M. 2009. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bac-

- teria from fructose-rich niches. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 593-600.
11. Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Sonomoto, K., Itoh, K., Okada, S. and Dicks, L. 2011. *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 898-902.
 12. Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L. and Salminen, S. 2018. Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e01290-18.
 13. Hammes, W. and Hertel, C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, pp. 320-403. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. (eds.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag: New York, NY, USA.
 14. Ji, K., Jang, N. Y. and Kim, Y. T. 2015. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1568-1577.
 15. Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosic, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981-987.
 16. Liu, Z., Ning, C., Yuan, M., Yang, S., Wei, X., Xiao, M., Fu, X., Zhu, C. and Mou, H. 2020. High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresour. Technol.* **295**, 122257.
 17. Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang H., Kokare, C. R., Zhou, X., Wang, J., Dai, H., Song, F., Liu, M., Wang, J., Wang, S. and Zhang, L. 2010. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1881-1893.
 18. Maeno, S., Kajikawa, A., Dicks, L. and Endo, A. 2018. Introduction of bi-functional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Fructobacillus fructosus* settled its fructophilic characteristics. *Res. Microbiol.* **170**, 35-42.
 19. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 20. Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H. and Rahman, N. A. 2020. Sustainable microbial cell nanofactory for zinc oxide nanoparticles production by zinc-tolerant probiotic *Lactobacillus plantarum* strain TA4. *Microb. Cell Fact.* **19**, 10.
 21. Park, D., Ahn, Y., Huh, C., Mcgregor, R. A. and Choi, M. 2013. Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* **19**, 274-283.
 22. Patel, A. K., Ahir, J. J., Pawar, S. P., Chaudhari, B. L. and Chincholkar, S. B. 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *J. Foodres.* **42**, 505-510.
 23. Patel, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Ashraf, S. A., Alreshidi, M., Snoussi, M., Rizvi, S. M. D., Bardakci, F., Jamal, A., Sachidanandan, M. and Adnan, M. 2021. Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties. *Antibiotics (Basel)* **10**, 1546.
 24. Patil, M., Jadhav, A. and Patil, U. 2020. Functional characterization and *in vitro* screening of *Fructobacillus fructosus* MCC 3996 isolated from *Butea monosperma* flower for probiotic potential. *Lett. App. Microbiol.* **70**, 331-339.
 25. Radziwill-Bienkowska, J. M., Le, D. T., Szczesny, P., Duviau, M. P., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Loubière, P., Mercier-Bonin, M., Bardowski, J. K. and Kowalczyk, M. 2016. Adhesion of the genome-sequenced *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB477 strain is mediated by specific molecular determinants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9605-9617.
 26. Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Bouwer, E., Lyklema, J. J. and Zehnder, A. J. B. 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1723-1728.
 27. Robson, L. M. and Chambliss, G. H. 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1039-1046.
 28. Sakandar, H. A., Kubow, S. and Sadiq, F. A. 2019. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT-Food Sci. Technol.* **104**, 70-75.
 29. Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G. F., Beresford, T. and Ross, R. P. 2010. Invited review: *Lactobacillus helveticus*—a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J. Dairy Sci.* **93**, 4435-4454.
 30. van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J. M., Walunas, T., Gibrat, J. F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich S. D. and Maguin, E. 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 9274-9279.
 31. Veron, H. E., Di Risio, H. D., Isla, M. I. and Torres, S. 2017. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT-Food Sci. Technol.* **104**, 70-75.
 32. Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H. and Ge, J. 2019. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microb. Pathog.* **127**, 12-20.

초록 : 꿀벌 유충에서 분리된 *Frutobacillus fructosus* F2의 프로바이오틱스 특성 분석

방우영*

(국립생물자원관)

본 연구는 꿀벌 유충으로부터 분리된 *Frutobacillus* spp. F 균주들의 기능성과 프로바이오틱스로써 사용 가능성을 평가하기 위해 수행되었다. 항균활성은 그람음성, 그람양성, 효모 균주들에 대해 사용된 F들이 전반적으로 활성을 보였지만, F2와 -3가 보다 우수한 것으로 평가되었고, 특히 F2가 우수하였다. Kerosene 유화력은 F4를 제외한 다른 균주들은 유사하게 관찰되었다. 탄소원에 따른 유화력 분석결과로써 F2는 과당이 존재할 경우에 높게 나타났지만, 표준균주보다 낮은 것으로 관찰되었고, 16S rDNA 서열 분석 결과 F2는 *Fructobacillus fructosus*로 확인되었다. 또한 F2는 성장곡선에서 18시간에서 최대 성장력으로 보였고, 이후 소량 증가되는 양상을 보였다. 항균력 및 pH는 역시 18시간에 각각 최대 및 최소 값을 보였으며, 이후에 지속적으로 유지되는 경향성을 보였다. 유산 함량은 배양 후 24시간에서 최대 값을 보인 이후에 약간 감소되는 양상을 보였다. 내산성은 pH 2.5까지는 저항성을 보였지만, pH 2.0에서는 완전히 소실되는 것으로 나타났다. 담즙산에 대한 내성은 전반적으로 강력한 것으로 평가되었다. F2의 뮤이신에 대한 부착력은 *S. Typhimurium*에 비교하여 높게 나타났고, 배양 18시간까지 상승된 후에, 감소되는 경향성을 보였다. 혐기적 배양시간에 따른 효소 활성은 과당의 존재에 상관없이 CMCase, avicelase, mannase 등이 높은 것으로 나타났다. 자가 및 공용집력은 표준균주에 비교하여 모두 높게 형성되었으며, 표면 소수성은 전자공여체의 양상을 나타내는 클로로포름에 대해 높게 형성되었다. 따라서 *Frutobacillus fructosus* F2는 항균활성이 우수하였고, 유화력, 내산성, 내담즙성, CMCase, mannase, 자가 및 공용집력 등이 비교적 우수하기 때문에 프로바이오틱스로써 활용 가능성이 있는 것으로 평가된다.