

제주지역 전통발효식품에서 분리한 유산균의 기능적 특성

강민균¹ · 조두민¹ · 오도경¹ · 송예준¹ · 김영목^{1,2} · 박슬기^{2,3*}

¹부경대학교 식품공학과, ²부경대학교 식품연구소, ³서스캐처원 대학 화학 및 생물 공학과

Functional Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated From Jeju Island Traditional Fermented Food

Min-Gyun Kang¹, Du-Min Jo¹, Do Kyung Oh¹, Ye-Jun Song¹, Young-Mog Kim^{1,2} and Seul-Ki Park^{2,3*}

¹Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Department of Chemical and Biological Engineering, College of Engineering, University of Saskatchewan, 57 Campus Dr., Saskatoon, SK S7N 5A9, Canada

Jeju island is the largest island of South Korea, and has a relatively warm climate due to its geographical characteristics. These features have fostered development of various fermented foods distinct to Jeju island. Therefore, the functional activity of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from the Jeju region's traditional fermented foods, including *Kimchi* and *Jeotgal* was characterized in this study. Fifteen strains were isolated from 6 types of fermented food. These strains include *Enterococcus* spp., *Lactoplantibacillus* spp., and *Weissella* spp. Several experiments were carried out to assess functional characteristics including acid resistance, bile resistance, hemolysis, DPPH and ABTS radical scavenging activity, and cholesterol-lowering activity. Three isolated strains (J-4, J-6 and J-10) exhibited high acid resistance, while the other 3 isolates (J-1, J-4 and J-6) showed high bile salt resistance. The strains displayed varied DPPH and ABTS radical scavenging activity: 71.14-86.42% among the first 3 strains, and 50.11-75.11% among the remaining 3 strains. Cholesterol-lowering activities were in the range 15.74-82.90% for all isolated strains. In conclusion, these studies suggest that isolated LAB strains from Jeju island traditional fermented foods possess the potential for broader application in the food industry.

Keywords: Anti-cholesterol activity, Antioxidant activity, Fermentation, Lactic acid bacteria

서론

제주도는 한반도 최남단에 위치한 국내에서 가장 큰 섬으로 지리적으로 아열대 지방에 위치해서 비교적 기후가 온화하다 (Kim and Park, 2014). 사면이 바다로 둘러싸여 있어 육지와 원재료 교류가 어려운 지리적 특성으로 장기간 보관이 가능한 젓갈이 발달하였고 갈치젓과 자리젓 등이 제주지역의 대표적인 젓갈이다(Park et al., 2012; Hazra and Byun, 2021). 이러한 제주지역 특유의 젓갈을 이용하여 내륙지방과는 차별화된 김치 문화가 발달하였다(Cha et al., 2003; Park et al., 2012). 김치 및 젓갈 등의 발효식품은 원재료의 종류와 온도 등과 같은 다양한 조건에 따라 발효에 관여하는 미생물의 종류가 달라

지고 그 결과 발효식품의 독특한 풍미 등이 결정된다고 보고되어 있다(Cha and Seo, 2017). 우리나라의 대표적인 발효식품인 김치와 젓갈에는 일반적으로 *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp. 등 다양한 유산균이 존재한다고 보고되어 있으며, 이러한 발효식품들에서 분리한 유산균이 나타내는 생리활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Choi et al., 2013; Ko et al., 2013). 발효식품에서 분리된 유산균들의 항균, 항고혈압 및 콜레스테롤 저하 등의 기능성이 알려지면서 식품뿐만 아니라 의약과 화장품 등 다양한 분야에서 유산균을 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다(Jeun et al., 2004; Oh et al., 2010; Kim et al., 2016). Park (2017)은 광주지역 및 전라남도 지역의 김치에서 *Leuconostoc mesenteroides*

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: skpark87@pukyong.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0733>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 733-741, October 2021

Received 4 August 2021; Revised 7 September 2021; Accepted 17 September 2021

저자 직위: 강민균(대학원생), 조두민(대학원생), 오도경(대학원생), 송예준(대학원생), 김영목(교수), 박슬기(연구원)

및 *Lactobacillus sakei* 8종을 분리하였으며 그 중 우수한 항균 물질 생성능을 가지는 유산균을 보고하였다. 또한, Kook et al. (2011)은 전라북도, 강원도, 경기도 및 서울 지역의 김치 및 충청북도 및 경기도 젓갈류 150여종을 시료로 하여 *Lactobacillus* spp.을 비롯한 다양한 유산균주를 분리 및 동정하였으며, 그 중 protease 활성이 뛰어난 유산균주에 대해 보고하였다. 이처럼 다양한 발효식품과 다양한 지역에서 유용 유산균을 분리하고 그 기능성에 대해 규명하려는 연구가 지속되고 있다. 하지만, 내륙과는 다른 지리적 환경과 기후조건을 가지고 있으며 다소 독특한 식문화를 가지고 있는 제주지역의 전통 발효식품에서 유용 유산균을 분리하고 기능성을 규명하려는 연구는 미비하다(Ryu and Heo, 2021). 따라서 본 연구에서는 제주지역의 전통 발효식품에서 유산균을 분리하고 그 기능적 특성에 대한 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

제주도 발효식품에서의 유산균 분리 및 동정

제주도 발효식품에서의 유산균 분리 및 동정을 위해 제주특별자치도 소재 전통 시장에서 젓갈 4종(갈치속젓, 멧게젓, 보말젓 및 넙치식해) 및 김치 2종(배추김치 및 묵은지)을 구매하였다. 각 젓갈 및 김치 25 g을 0.1 M phosphate buffer saline (PBS; pH 7.2)으로 10배 희석하여 균질화 시킨 후 이를 시료로 사용하였다. 균질화된 시료는 bromocresol purple (BCP; Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Korea)를 0.002% (w/v) 첨가한 deMan Rogosa Sharpe medium (MRS; Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간부터 48시간까지 배양하였으며, 배양 후 유산균이 생성하는 유기산 등에 의해 집락 주위가 노란색으로 변한 단일 집락을 선별하여 분리하였다.

분리된 유산균을 동정하기 위해 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 이를 이용하여 16S rRNA 증폭을 위해 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 및 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')을 이용하여 PCR (polymerase chain reaction) 수행 후 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 염기서열 분석은 바이오닉스(Bionics, Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 자료와 비교하여 동정하였다.

내산성, 내담즙성 및 용혈성 분석

내산성 및 내담즙성 분석은 Ryu et al. (2020)의 방법을 변형하여 진행하였다. 내산성 분석을 위해, 1 N HCl을 이용하여 pH 2.0 및 pH 6.5로 조정된 10 mL의 0.1 M PBS에 분리된 유산균주를 약 10^8 - 10^9 CFU (colony forming unit)/mL 수준으로 접종

하여 37°C에서 2시간 배양하였다. 이를 PBS로 단계별 희석하여 MRS agar에서 37°C, 24시간 배양 후 생존한 집락을 계수하여 내산성을 확인하였다. 내담즙성 분석은 MRS broth 10 mL에 0.3% (w/v) oxgall (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 제조한 인공담즙에 각각의 분리 균주를 약 10^8 - 10^9 CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 7시간 배양한 것을 MRS agar에서 균수를 확인하여 진행하였으며, 대조군으로 oxgall이 첨가되지 않은 MRS broth를 사용하였다. 분리된 유산균의 안전성을 확인하기 위해 용혈성 분석을 진행하였으며, 분리균주의 배양액을 5% sheep blood (v/v; KisanBio, Seoul, Korea)를 첨가한 tryptic soy agar (Difco)에 희석도말 후 37°C에서 24시간 배양하여 균주 주위에 형성된 환의 형태를 통해 용혈성을 판단하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

분리균의 DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) superoxide radical 소거 활성은 Farvin et al. (2010)의 방법을 변형하여 측정하였다. 분리된 유산균을 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양 후 상등액을 사용하기 위해 원심분리(10,000 g, 15 min, 4°C)를 진행하였다. 얻어진 상등액을 0.2 µm membrane filter (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK)로 여과하여 이를 시료로 사용하였다. 여과액 시료 0.5 mL에 0.15 mM의 DPPH (Sigma-Aldrich) 용액 1 mL을 첨가하여 30분간 상온의 암실에서 반응 후 상등액을 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구로는 동량의 증류수를 사용하였으며, 양성 대조구로는 0.2 mM의 l-ascorbic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. DPPH radical 소거 활성은 다음의 식으로 계산하였다.

Radical scavenging activity (%) =

$$\frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성은 Aloglu and Öner (2011)의 방법을 수정하여 분석하였다. 분리된 유산균 배양액의 상등액을 0.2 µm membrane filter (Whatman Int. Ltd.)로 여과하여 사용하였다. ABTS radical solution은 2.4 mM potassium persulfate를 포함한 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich)로 제조하여 암실에서 16시간 안정화 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.005 가 되도록 희석하여 사용하였다. 시료 500 µL와 ABTS 용액 500 µL를 혼합하여 6분간 상온의 암실에서 반응 후 상등액을 microplate reader (BioTek)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구로 동량의 증류수, 양성 대조구로 5 mM 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

(Trolox; Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, ABTS radical 소거 활성은 다음의 식으로 계산하였다.

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

콜레스테롤 감소 활성 측정

콜레스테롤 감소 활성을 확인하기 위해 Hwang and Lee (2002)의 방법을 일부 변형하여 ortho-phthalaldehyde 정색반응을 이용하였다. 표준 곡선은 0.3% oxgall (Sigma-Aldrich)을 첨가한 MRS broth에 water-soluble cholesterol (Sigma-Aldrich)을 혼합하여 작성하였다. 콜레스테롤 감소 활성을 측정하기 위해 0.3% oxgall (w/v) 및 water soluble cholesterol (0.1 g/L)을 함유한 MRS broth에 분리균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였으며 원심분리(10,000 g, 4°C) 및 여과한 상등액을 시료로 사용하였다. 시료 1 mL에 50% KOH (w/v) 2 mL 및 95% ethanol (v/v) 3 mL를 첨가하여 60°C에서 10 분간 방치 후 시료를 냉각시켜 5 mL의 n-hexane을 혼합하고 1 mL의 증류수를 첨가하여 10분간 방치 후 상층(hexane 층) 3 mL을 60°C의 항온수조에서 질소가스로 농축하였다. 농축된 시료에 ortho-phthalaldehyde 반응액(0.5 mg ortho-phthalaldehyde/glacial acetate in 1 mL; Sigma-Aldrich) 4 mL을 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 10분간 방치 후 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하여 섞어주고, 10분 후 상등액을 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

본 연구에서 수행한 모든 실험은 3회 반복하였으며, 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 수행한 후, P<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS (v.25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 수행하였다.

결론 및 고찰

제주지역 전통발효식품에서 유산균의 분리 및 동정

본 연구에서 제주도에서 구매한 것갈 및 김치로부터 총 15종의 유산균을 분리하였고 이를 동정한 결과와 시료의 종류는 Table 1에 나타내었으며 분리균주의 염기서열을 기반으로 한 phylogenetic tree를 Fig. 1에 나타내었다(Felsenstein, 1985; Saitou and Nei,1987; Nei and Kumar, 2000; Kumar et al., 2018). 15종의 분리균주의 16S rRNA gene의 염기서열을 분석한 결과, *Weissella cibaria* 4종, *Weissella confusa* 3종, *Enterococcus faecalis* 3종, *Enterococcus hirae* 1종, *Weissella halotolerans* 1종, *Weissella paramesenteroides* 1종 및 *Lactiplantibacillus plantarum* 1종 및 *Lactiplantibacillus pingfangensis* 1종으로 다양하게 나타났으며 이는 LAB J-1 및 J-15로 명명하였다. 서울, 여수 및 부산 등의 지역에서 판매하는 갈치것갈 및 멸치것갈을 이용해 유산균을 분리한 Lee et al. (2018)에서는 *Pediococcus* spp. 및 *Enterococcus* spp.이 주요 유산균으로 보고되어 있다. 또한 일반적으로 김치에서 우점종인 유산균들의

Table 1. Identification of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented food based on 16S rRNA analysis

Strains.	Source	Subject	Identities (%)	Hemolysis
LAB J-1		<i>Enterococcus faecalis</i> strain 2675 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-2		<i>Weissella confusa</i> strain S2-16 16S ribosomal RNA gene	99.88	
LAB J-3	<i>Galchisok-jeot</i>	<i>Weissella cibaria</i> strain 10251 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
LAB J-4		<i>Enterococcus faecalis</i> strain WS19 16S ribosomal RNA gene	99.88	
LAB J-5		<i>Weissella confusa</i> strain SB100 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-6	<i>Meongge-jeot</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> strain P5 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
LAB J-7		<i>Weissella cibaria</i> strain 12098 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-8	<i>Bomal-jeot</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i> strain S2-7 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
LAB J-9	<i>Paralichthys</i>	<i>Weissella halotolerans</i> JCM 1114 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-10	<i>olivaceus Sikhae</i>	<i>Enterococcus hirae</i> strain ML106 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
LAB J-11		<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain AMI1103 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-12	<i>Kimchi</i>	<i>Lactiplantibacillus pingfangensis</i> strain CP446 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
LAB J-13		<i>Weissella cibariai</i> strain 3128 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-14		<i>Weissella confusa</i> strain 3273 16S ribosomal RNA gene	100.00	
LAB J-15	<i>Mukeunji</i>	<i>Weissella cibaria</i> strain 3052 16S ribosomal RNA gene	100.00	γ
GG	Type strain	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033		

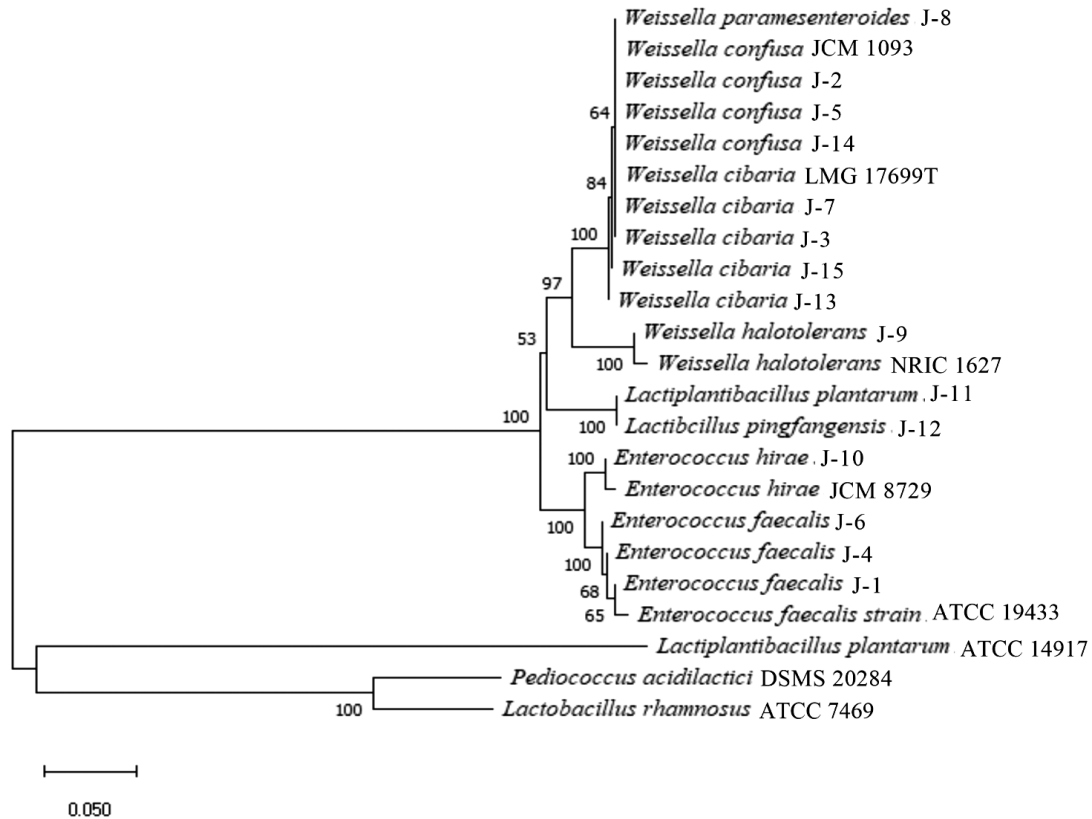


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, which showing the relationship between isolated strains with each type strain.

종은 *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. 및 *Weissella* spp.로 알려져 있다(Cho et al., 2006; Park et al., 2010). 국내의 발효식품에서 분리된 유산균들 중 막걸리 또는 김치와 같은 전통발효식품에서 분리되는 유산균은 주로 *Lactobacillus* spp. 및 *Pediococcus* spp., 등이 주로 분리되며(Cho et al., 2006; Park et al., 2010; Jung and Kim, 2015; Lee et al., 2018), Park et al. (2013)은 젓갈과 같은 다양한 국내 전통발효식품에서 분리된 유산균주들은 *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. 및 *Pediococcus* spp. 등 다양한 종이 분리되는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 제주지역의 전통 발효 식품 중 젓갈류에서는 주로 *Weissella* spp. 및 *Enterococcus* spp., 김치류에서는 *Lactobacillus* spp.가 분리되어 선행연구들과 유사한 결과를 나타내었다. 분리 균주의 염기서열을 기반으로 한 phylogenetic tree는 Fig. 1에 나타나있으며 각 분리 균주들의 표준 균주 16S rRNA sequence와 함께 비교 분석하였으며, 모든 분리 균주들은 같은 속의 표준균주들과 같은 group으로 분류되었으며 이는 분리균주들의 16S rRNA sequence 동정 결과가 유효함을 의미한다.

분리된 유산균의 내산성

본 연구에서 분리된 유산균의 pH 2.0 및 6.5로 조정된 PBS

에서의 내산성 분석을 진행하였다(Fig. 2). 대조균으로 사용한 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033 (GG)은 pH 6.5에서 7.49 log CFU/mL, pH 2.0에서 7.01 log CFU/mL가 생존하였으며 두가지 pH 조건에서 생존한 균수의 차이가 0.48 log CFU/mL로 매우 낮았으며 따라서 우수한 내산성이 확인되었다. 분리균주의 경우 대부분 pH 6.5와 비교했을 때 pH 2.0에서 1.5 log CFU/mL 이상 감소하였으며 J-4, J-6, 및 J-10의 경우 비교적 높은 내산성을 가지는 것으로 나타났다. 그 중 J-10의 경우, pH 6.5에서 8.85 log CFU/mL, pH 2.0에서 8.29 log CFU/mL로 pH 6.5의 균수와 pH 2.0 조건에서의 균수의 차이가 약 0.56 log CFU/mL로 대조균과 유사한 우수한 내산성을 나타내었으며 분리 균주 중 가장 우수한 내산성을 가지는 것으로 확인되었다. 멸치 젓갈에서 분리된 4종의 유산균에 대한 내산성을 분석한 Lim et al. (2016)에서는 pH 2.0에서 *Enterococcus faecium* 가 약 7 log CFU/mL 생존하여 분리된 다른 유산균에 비해 높은 내산성을 가지는 것으로 보고했다. 또한 Ayyash et al. (2018)에 보고된 바에 따르면 Camel milk에서 분리한 probiotics 후보 균주들 중 *E. faecium*이 내산성과 장 점착률이 높아 인체내에서 probiotics로써 활용될 가능성이 매우 높다고 보고하였으며, 본 연구결과에서도 내산성이 높은 3균주는 동정결과 Ayyash et

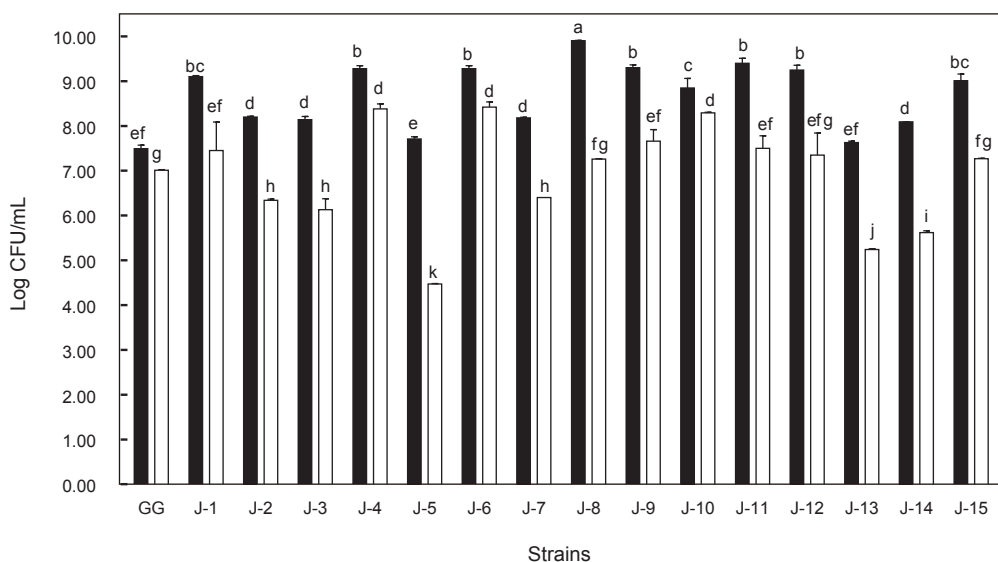


Fig. 2. Acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented foods in 0.1 M phosphate buffer saline adjusted to pH 6.5 (■) and 2.0 (□). GG, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at P<0.05.

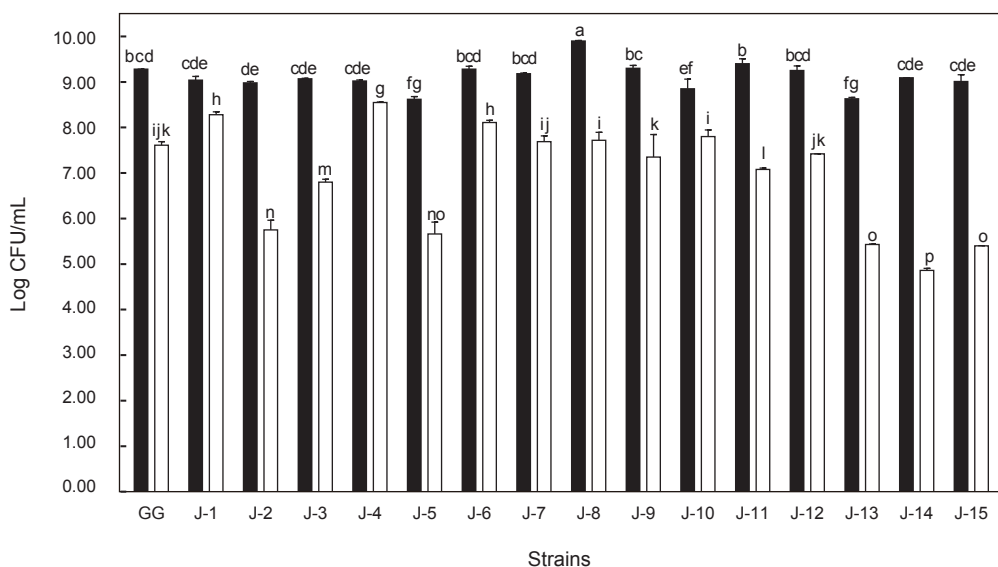


Fig. 3. Bile tolerance of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented foods in the presence of 0% (■) or 0.3% oxgall (□). GG, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at P<0.05.

al. (2018)의 연구와 동일한 속의 균주인 *E. faecalis* 및 *E. hirae* 로 확인되었다.

분리된 유산균의 내담즙성

분리균주를 0.3% oxgall을 첨가한 MRS broth에 접종하여 배양한 내담즙성 결과는 Fig. 2와 같다. Oxgall을 첨가하지 않은 대조구인 GG 균주 및 15종의 분리 균주 모두 8-9 log CFU/mL

가 유지되었으나 0.3% oxgall을 첨가한 경우 전반적으로 생존 균수가 감소하였다. 대조구인 GG 균주는 7.61 log CFU/mL 생존하였으며 분리 균주의 경우 4.60-8.28 log CFU/mL 생존하는 것으로 확인되었다. 분리 균주 중 J-1, J-4 및 J-6은 0.3% oxgall을 첨가하여도 약 8 log CFU/mL가 생존하였으며 감소된 균수가 대조군보다 낮게 나타나 우수한 내담즙성을 나타내었다. 본 연구에서 분리된 내담즙성이 우수한 3균주 모두 *E. faecalis*

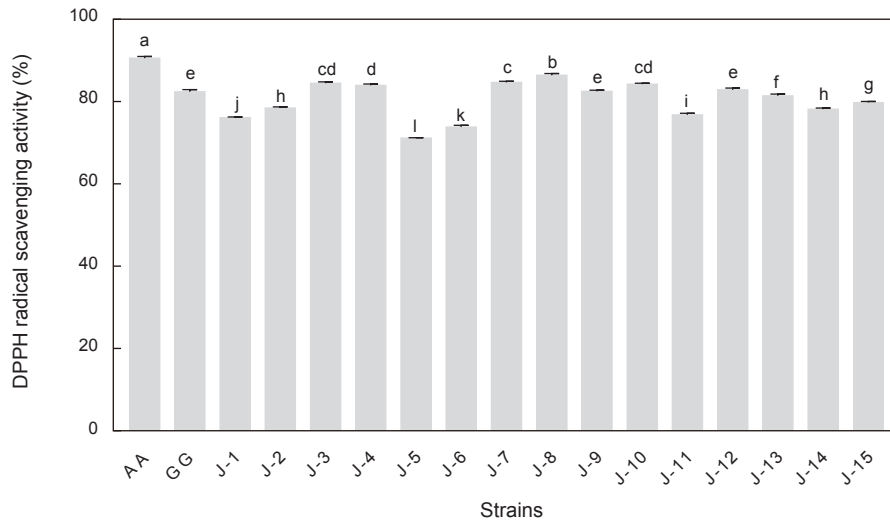


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented foods. AA, 0.2 mM L-ascorbic acid; GG, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at $P < 0.05$.

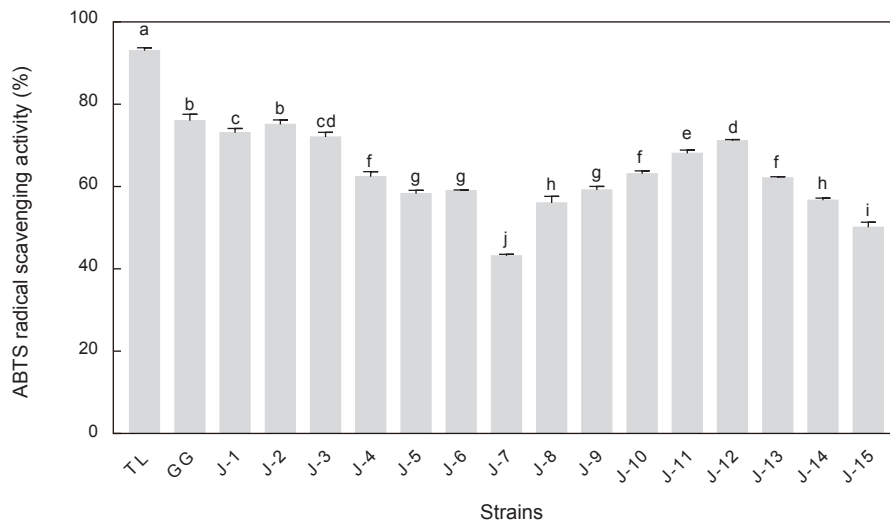


Fig. 5. ABTS radical scavenging activity of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented foods. TL, 5 mM Trolox; GG, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at $P < 0.05$.

로 동정되었으며 Khalkhali and Mojgani (2017)에 보고된 바에 의하면 human milk에서 분리된 *E. faecium*과 *E. faecalis*는 모두 높은 bile salt 농도에서도 생존했으며, 이 두 가지 균주는 probiotics로서의 활용도가 높다고 보고하였다. 또한, Cho et al. (2007)에 따르면, 김치로부터 분리한 *L. plantarum*은 oxgall 0.1%에서 약 8 log CFU/mL, 0.5 및 1.0%에서 5 log CFU/mL 이상 생존하는 것으로 보고되어 있다. 일반적으로 사람이 섭취한 미생물들은 담즙산에 의해 세포막에 영향을 받아 미생물 생장이 억제되는 것으로 알려져 있으나 특정 유산균의 경우 담

즙산염 가수분해효소를 이용하여 담즙산을 가수분해 및 억제하여 내담즙성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Sahadeva et al., 2011). 내산성과 내담즙성이 높은 유산균주는 probiotics로 활용 시 위액 및 담즙산에 의해서도 생존률이 높아 장관에서 유익한 환경을 조성하는데 유리하다고 알려져 있다(Seo and Lee, 2007).

분리된 유산균의 용혈성

용혈성은 적혈구가 파괴되거나 적혈구의 미생물이 생성하는

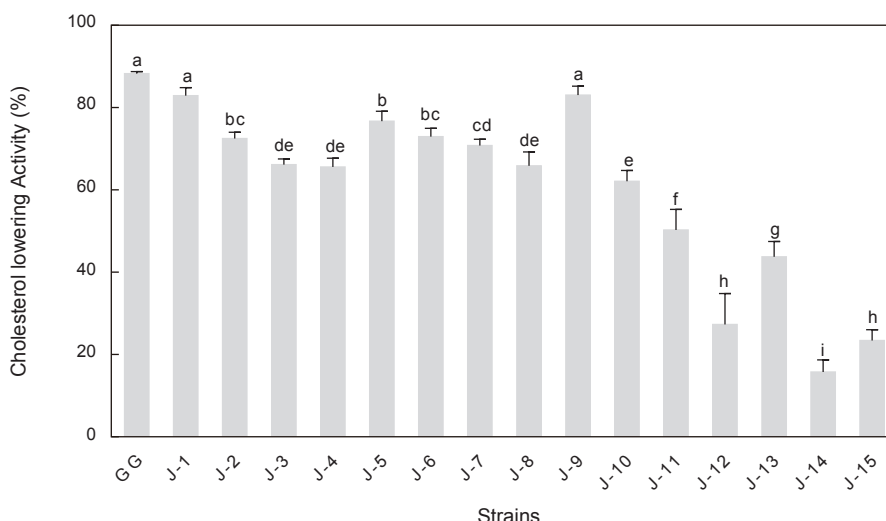


Fig. 6. Cholesterol lowering activity of lactic acid bacteria isolated from Jeju traditional fermented foods in MRS broth containing 0.1% cholesterol and 0.3% oxgall. GG, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033. Means followed by the same lowercase letter are not significantly different at $P < 0.05$.

독성물에 의해 적혈구에 결함을 주어 비정상적인 작용을 하는 것을 의미하며(Kim, 1995) 분리균주의 안전성 여부를 판단하기 위해 용혈성 여부를 확인하였다(Table 1). 분리한 유산균 15종 모두에서 용혈 현상이 없는 γ 형으로 확인되었다. 미생물의 용혈성은 균주 주위에 녹색환 생성시 알파용혈(α -haemolysis), 황색 투명한 생성시 베타용혈(β -haemolysis), 환 생성이 없을 시 감마용혈(γ -haemolysis)로 나타내며 이 중 감마용혈의 경우에는 용혈 현상을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다(Argyri et al., 2013). 김치에서 분리된 *Lactobacillus* spp. 및 *Leuconostoc* spp. 등도 용혈성을 갖지 않는 것으로 보고되었으며 멸치젓갈에서 분리된 *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus sakei* 등도 γ 형으로 나타나 프로바이오틱스로서 적합하다고 보고된 바 있다(Ryu and Chang, 2013; Lim et al., 2016).

분리된 유산균의 DPPH radical 소거 활성

젓갈 및 김치에서 분리한 유산균 배양액의 DPPH radical 소거 활성 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 분리한 유산균 배양액의 DPPH radical 소거 활성은 71.14-86.42%로 나타났으며 대조구로 사용된 GG 균주는 82.38%, 양성 대조구인 0.2 mM ascorbic acid는 90.56%로 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타냈다. 대조구인 GG 균주보다 높은 활성을 보인 분리균주는 J-3, J-4, J-8 및 J-10으로 각각 84.45, 83.96, 86.42 및 84.23%로 확인되었으며 젓갈에서 분리된 네 균주가 비교적 높은 활성을 나타냈다. 그 외에도 J-9 (82.49%) 및 J-12 (82.87%)은 GG 균주와 유사한 수준의 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Kim et al. (2020)은 김치로부터 분리한 유산균의 DPPH radi-

cal 소거 활성이 40.00-60.00% 수준인 것으로 보고하였으며, Le and Yang (2018)에서는 오징어 젓갈에서 분리한 *Weissella* spp.의 DPPH radical 소거 활성이 48.20-52.10% 수준인 것으로 보고되었다. 본 연구에서 분리한 15종의 유산균은 비교적 우수한 DPPH radical 소거능을 나타낸 것으로 사료된다.

분리된 유산균의 ABTS radical 소거 활성

젓갈 및 김치에서 분리한 유산균 배양액의 ABTS radical 소거 활성 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 양성 대조구인 5 mM Trolox는 93.02%, 분리된 유산균 배양액의 ABTS radical 소거 활성은 50.11-75.11%의 범위로 확인 되었다. 대조구로 사용된 GG 균주의 ABTS radical 소거활성은 76.01%로 분리 균주 보다 높은 활성을 가진 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 유산균 중 가장 높은 활성을 나타낸 J-2 (75.11%)는 통계적으로 GG 균주와 같은 수준의 활성을 나타내었다. 김치에서 분리한 유산균의 ABTS radical 소거 활성은 약 25.00-37.00%로 보고되어 있다(Kim et al., 2020). 또한, Yu et al. (2019)에서는, *W. cibaria* KACC 91811P의 ABTS radical 소거 활성 60.85%로 보고되어 있으며, 본 연구에서 분리한 15종의 유산균은 분리 균주 중 비교적 ABTS radical 소거활성이 우수한 것으로 판단된다.

분리된 유산균의 콜레스테롤 감소 활성

젓갈 및 김치에서 분리한 유산균의 콜레스테롤 감소 활성 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 분리균주의 콜레스테롤 감소 활성은 15.74-82.90%의 범위로 다양하게 나타났으며, 대조구로 사용된 GG 균주의 콜레스테롤 감소 활성은 88.24%로 확인되었다. 분리균주 중 갈치속젓에서 분리된 J-1의 콜레스테롤 감소 활

성은 82.90%, 식해에서 분리된 J-9의 콜레스테롤 감소 활성은 83.04%로 분리균주들 중 가장 높은 콜레스테롤 감소 활성을 나타내었다. Ryu et al. (2020)는 다시마 김치에서 분리된 유산균의 콜레스테롤 감소 활성에 대해 보고하고 있으며 *L. plantarum*은 94.77%, *L. brevis*는 91.91%, *L. paraplantarum*은 91.65%의 콜레스테롤 감소 능력을 갖고 있는 것으로 보고하였다. Park et al. (2017)은 콜레스테롤 감소능을 가지는 김치에서 분리한 유산균에 대해 보고하였으며 *L. rhamnosus*의 경우 88.1% 감소율이 확인되었고, 분리균주의 경우 35.0-90.7%까지 다양하게 나타나 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 유산균이 콜레스테롤 감소 활성을 나타내는 것은 유산균의 세포막 부분에 콜레스테롤이 결합을 하여 흡착을 하거나 유산균이 bile salt hydrolase 촉매 작용하여 콜레스테롤을 포함한 담즙 염을 분해하는 것에 의한 활성이라고 보고되어 있다(Lye et al., 2010; Patel et al., 2010; Chen et al., 2011).

본 연구를 통해 제주 지역의 전통발효 식품인 젓갈 및 김치에서 분리한 유산균의 기능적 특성을 규명하였으며, 이와 같이 전통발효식품에서 우수한 생리 활성을 가진 유산균 분리하여 식품을 비롯한 여러 산업에서 다양하게 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임[유산균이 살아있는 고농도 발효 GABA소금의 개발 및 상용화 계획 (20200073)].

References

- Aloğlu HŞ and Öner Z. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J Dairy Sci* 94, 5305-5314. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4285>.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ and Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol* 33, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>.
- Ayyash M, Abushelaibi A, Al-Mahadin S, Enan M, El-Tarabily K and Shah N. 2018. *In-vitro* investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk. *LWT-Food Sci Technol* 87, 478-487. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.019>.
- Cha IT and Seo MJ. 2017. Analysis techniques for fermented foods microbiome. *Food Sci Ind* 50, 2-10.
- Cha YJ, Lee YM, Jung YJ, Jeong EJ, Kim SJ, Park SY, Yoon SS and Kim EJ. 2003. A nationwide survey on the preference characteristics of minor ingredients for winter Kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32, 555-561. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2003.32.4.555>.
- Chen ZY, Ma KY, Liang Y, Peng C and Zuo Y. 2011. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *J Funct Foods* 3, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.003>.
- Cho J, Lee D, Yang C, Jeon J, Kim J and Han H. 2006. Microbial population dynamics of Kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol Lett* 257, 262-267. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00186.x>.
- Cho JK, Li GH, Cho SJ, Yoon YC, Hwang SG, Heo KC and Choe IS. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from Kimchi. *Food Sci Anim Resour* 27, 363-370. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2007.27.3.363>.
- Choi HN, Oh HH, Yang HS, Huh CK, Bae IH, Lee JS, Jeong YS, Jeong EJ and Jung HK. 2013. Antifungal activity against cheese fungi by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Korean J Food Preser* 20, 727-734. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2013.20.5.727>.
- Farvin KS, Baron CP, Nielsen NS, Otte J and Jacobsen C. 2010. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2-characterisation of peptide fractions. *Food Chem* 123, 1090-1097. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.029>.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Hazra D and Byun YC. 2021. Generating synthetic fermentation data of Shindari, a traditional Jeju beverage, using multiple imputation ensemble and generative adversarial networks. *Appl Sci* 11, 2787. <https://doi.org/10.3390/app11062787>.
- Hwang CC and Lee WC. 2002. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting. *J Chromatogr A* 962, 69-78. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00559-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00559-9).
- Jeun JH, Kim HD, Lee HS and Ryu BH. 2004. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced γ -aminobutyric acid (GABA) form traditional slat fermented anchovy. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 17, 72-79.
- Jung SE and Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli. *Korean J Food Sci Technol* 47, 44-50. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2015.47.1.44>.
- Khalkhali S and Mojangani N. 2017. Bacteriocinogenic potential and virulence traits of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from human milk. *Iran J Microbiol* 9, 224-233.
- Kim DA, Kim HS, Yoo JS, Cho YA and Kim CH. 2020. Antioxidant activity of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional food Kimchi. *J Dairy Sci Biotechnol* 38, 89-97. <https://doi.org/10.22424/jdsb.2020.38.2.89>.
- Kim JH. 1995. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin (s) from lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Appl Biol Chem* 38, 302-307.

- Kim JH, Park LY and Lee SH. 2016. Seaweed fermentation and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45, 1481-1487. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.10.1481>.
- Kim MS and Park EJ. 2014. Bacterial communities of traditional salted and fermented seafoods from Jeju Island of Korea using 16S rRNA gene clone library analysis. *J Food Sci* 79, M927-M934. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12431>.
- Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J and Kim IC. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different Kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42, 89-95. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.1.089>.
- Kook MC, Cho SC, Park H, Kim SS, Pyun YR, Choi WY and Lee HY. 2011. Protease activity of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food. *Food Eng Prog* 2, 182-187.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Le B and Yang SH. 2018. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicol Rep* 5, 314-317. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.007>.
- Lee Y, Cho Y, Kim E, Kim HJ and Kim HY. 2018. Identification of lactic acid bacteria in Galchi-and Myeolchi-Jeotgal by 16S rRNA gene sequencing, MALDI-TOF mass spectrometry and PCR-DGGE. *J Microbiol Biotechnol* 28, 1112-1121. <https://doi.org/10.4014/jmb.1803.03034>.
- Lim ES, Kim YM and Lee EW. 2016. Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy. *Korean J Food Sci Technol* 48, 306-316. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2016.48.4.306>.
- Lye HS, Rusul G and Liong MT. 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci* 93, 1383-1392. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2574>.
- Nei M and Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, NY, U.S.A.
- Oh YS, Park JE, Oh HJ, Kim JH, Oh MC, Oh CK, Oh YJ and Lim SB. 2010. Isolation and characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste (*Doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39, 47-53. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.1.047>.
- Park HY, Park SK, Kim BG, Ryu DG, Lim E and Kim YM. 2017. Isolation and characterization of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from Kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 49, 377-382. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2017.49.4.377>.
- Park JH, Moon HJ, Oh JH, Lee JH, Choi KM, Cha JD, Lee TB, Lee JM and Jung HK. 2013. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods and development of a starter for fermented milk. *Korean J Food Preserv* 20, 712-719. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2013.20.5.712>.
- Park JM, Shin JH, Lee DW, Song JC, Suh HJ, Chang UJ and Kim JM. 2010. Identification of the lactic acid bacteria in Kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci Biotechnol* 19, 541-546. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0075-1>.
- Park SY, Lim HK, Park SG and Cho MJ. 2012. Quality and preference changes red sea cucumber *Stichopus japonicus* Kimchi during storage period. *J Appl Biol Chem* 55, 135-140. <https://doi.org/10.3839/jabc.2011.071>.
- Park YJ. 2017. Isolation and characterization of Kimchi lactic acid showing antibacterial activity. *Korean J Human Ecol* 26, 547-558. <https://doi.org/10.5934/kjhe.2017.26.6.547>.
- Patel AK, Singhanian RR, Pandey A and Chincholkar SB. 2010. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 166-180. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8738-1>.
- Ryu DG, Park SK, Kang MG, Jeong MC, Jeong HJ, Kang DM, Lee JH, Kim YM and Lee MS. 2020. Antioxidant and cholesterol-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from Kelp *Saccharina japonica* Kimchi. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 351-360. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0351>.
- Ryu EH and Chang HC. 2013. *In vitro* study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from Kimchi. *Ann Microbiol* 6, 1387-1395. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0599-8>.
- Ryu YS and Heo MS. 2021. Phylogenetic diversity and antibacterial activity of bacteria from *shindari* of Jeju traditional fermented food. *J Life Sci* 31, 73-82. <https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.1.73>.
- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, Wong SYW and Chan HK. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res* 18, 1515-1522.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Seo JH and Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 39, 681-687.
- Yu HS, Jang HJ, Lee NK and Paik HD. 2019. Evaluation of the probiotic characteristics and prophylactic potential of *Weissella cibaria* strains isolated from Kimchi. *LWT-Food Sci Technol* 112, 108229. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.127>.