



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

*Pedicoccus* sp. PSK와 감초  
열수추출물의 혼합물을 이용한  
어류질병세균에 대한 항균활성 및  
사료 내 첨가에 따른 *paralichthys*  
*olivaceus*의 비특이적 면역 반응



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科


文景洙

2015年 2月

*Pedicoccus* sp. PSK와 감초  
열수추출물의 혼합물을 이용한  
어류질병세균에 대한 항균활성 및 사료  
내 첨가에 따른 *paralichthys olivaceus*의  
비특이적 면역 반응

指導教授 許文洙

文景洙

 제주대학교 중앙도서관  
이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2015 年 2 月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_진 창 남\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_김 만 철\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_허 문 수\_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2015 年 2 月

Effect of dietary supplementation of *Pedicoccus*  
sp. PSK and *Glycyrrhiza uralensis fischer*  
water extract mixture, on non-specific immune  
responses in *paralchthys olivaceus* and against  
its bacterial pathogens.

Kyung-Mi Moon

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)



A thesis submitted in partial fulfillment  
of the requirement for the degree of  
Master of Science

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2015

# 목 차

|   |     |
|---|-----|
| 목 차 .....                                     | i   |
| List of Tables .....                          | iv  |
| List of Figures .....                         | v   |
| Abstract .....                                | vii |
| I. 서 론 .....                                  | 1   |
| II. 재료 및 방법 .....                             | 3   |
| 2.1. Probiotic 균주 분리 및 선정 .....               | 3   |
| 2.1.1. 균주 분리 .....                            | 3   |
| 2.1.2. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성 .....  | 4   |
| 2.2. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK의 동정 .....      | 5   |
| 2.2.1. 형태학적 특성 .....                          | 5   |
| 2.2.2. 생리학적 특성 .....                          | 5   |
| 2.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석 .....                 | 6   |
| 2.2.4. Probiotic 균주 선정 .....                  | 7   |
| 2.3. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK의 생육조건 검토 ..... | 8   |
| 2.3.1. 탄소원의 배지조성 .....                        | 8   |
| 2.3.2. 질소원의 배지조성 .....                        | 8   |
| 2.3.3. 무기염의 배지조성 .....                        | 8   |
| 2.3.4. 최적 pH 및 온도별 성장 확인 .....                | 9   |
| 2.4. 시료 구입 및 추출 .....                         | 10  |
| 2.4.1. 사용 시료 .....                            | 10  |
| 2.4.2. 시료 추출방법 .....                          | 11  |

|   |    |
|---|----|
| 2.5. 온도별 감초 열수추출물과 <i>Pedicoccus</i> sp. PSK의 혼합물에 대한 pH 및 생육 조건, 항균활성 확인 ..... | 12 |
| 2.5.1. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK pH 및 생육조건 .....                                | 12 |
| 2.5.2. 온도별 감초 열수추출물 첨가에 따른 pH 및 생육조건 .....                                      | 12 |
| 2.5.3. 항균실험 .....   | 13 |
| 2.6. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK과 감초 열수 추출물의 혼합물 첨가에 따른 넙치의 비특이적 면역반응 .....       | 15 |
| 2.6.1. 실험어의 사육 관리 .....   | 15 |
| 2.6.2. 실험사료 제작 및 투여 방법 .....  | 15 |
| 2.6.3. 어류 식세포의 활성산소 측정 .....  | 16 |
| 2.6.4. 혈청의 Lysozyme 활성 측정 .....   | 16 |
| III. 결과 및 고찰 .....  | 17 |
| 3.1. Probiotic 균주 분리 및 선정 .....   | 17 |
| 3.1.1. 균주 분리 및 선정 .....   | 17 |
| 3.1.2. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성 .....                                    | 18 |
| 3.2. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK의 동정 .....  | 19 |
| 3.2.1. 배양학적, 형태학적 특성 .....  | 19 |
| 3.2.2. 생리학적 특성 .....  | 21 |
| 3.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석 .....   | 24 |
| 3.3. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK의 생육조건 검토 .....                                   | 26 |
| 3.3.1. 탄소원의 영향 .....  | 26 |
| 3.3.2. 질소원의 영향 .....  | 27 |
| 3.3.3. 무기염의 영향 .....  | 28 |
| 3.3.4. 최적 pH 및 온도별 성장 확인 .....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK 및 감초 열수추출물의 혼합물 첨가에 따른 pH, 생육 조건 및 항균활성 확인 ..... | 31 |
| 3.4.1. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK pH 및 생육조건 .....                                | 31 |
| 3.4.2. 온도별 감초 열수추출물 첨가에 따른 pH 및 생육조건 .....                                      | 33 |
| 3.4.3. 항균 활성 .....  | 35 |
| 3.5. <i>Pedicoccus</i> sp. PSK와 감초 열수 추출물의 혼합물 첨가에 따른 녀치의 비특이적 면역반응 .....       | 36 |
| 3.5.1. 어류 식세포의 활성산소 측정 .....  | 36 |
| 3.5.2. 혈청의 Lysozyme 활성 측정 .....   | 38 |
| IV. 요약 .....  | 40 |
| V. 참고 문헌 .....  | 42 |
| VI. 감사의 글 .....   | 47 |



## List of tables

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Composition of isolation media .....   | 3  |
| Table 2. List of strains used of antibacterial experiment .....   | 13 |
| Table 3. Composition of bacterial media .....   | 14 |
| Table 4. Isolation of probiotic strain .....  | 17 |
| Table 5. Biochemical properties of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 18 |
| Table 6. Physiological characteristic of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 22 |
| Table 7. Enzymes detected by the API ZYM test of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 23 |
| Table 8. Effect of <i>Glycyrrhiza uralensis fischer</i> water extract and <i>Pedicoccus</i> sp. PSK mixture in bacterial growth ..... | 35 |



## List of figures

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1. <i>Glycyrrhiza uralensis fischer</i> .....   | 10 |
| Fig. 2. Cultural characterization of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....   | 20 |
| Fig. 3. Scanning electron micrograph of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 20 |
| Fig. 4. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK within the radiation of the genus <i>Pedicoccus</i> . ..... | 25 |
| Fig 5. Effect of different carbon sources on cell growth of isolated <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....   | 26 |
| Fig 6. Effect of different nitrogen sources on cell growth of isolated <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....   | 27 |
| Fig. 7. Effect of different mineral sources on cell growth of isolated <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....   | 28 |
| Fig. 8. Effect of temperature on cell growth of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 30 |
| Fig. 9. Effect of pH on cell growth of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....   | 30 |
| Fig. 10. Growth curve of viable cell absorbance and pH in MRSB of <i>Pedicoccus</i> sp. PSK .....  | 32 |

Fig. 11. Result of pH and viable cell absorbance of *Pedicoccus* sp. PSK in MRSB water extract of *Glycyrrhiza uralensis fischer* ..... 34

Fig. 12. NBT (Nitroblue Tetrazolium) activity of Olive flounder fish fed with *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and mixture *Pedicoccus* sp. PSK and *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and control diet for 4 weeks ..... 37

Fig. 13. Lysozyme activity in serum of Olive flounder fish fed with *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and *Pedicoccus* sp. PSK mixed diet for 4 weeks ..... 39



## Abstract

Probiotic are beneficial microorganism helps in maintaining proper balance of the intestinal microflora in humans which were proved to improve health and enhance immunity. Lactic acid bacteria along with medicinal plant and herbal extracts have reported to promote growth.

In the present study, the main component was used as the licorice with a perennial plant Glycyrrhizin containing about 6 to 14%. Glycyrrhizin is generally known for its anti-inflammatory and anti-cancer effects in allergic, chronic infections, viral diseases and to reduce cholesterol. In general, medicine herbs effectively use the component of licorice extract through hot water decoction of medicinal plants. In this study, *Pedococcus* sp. PSK was isolated from traditional fermented soybean foods. PSK was subjected to physiological characterization, such as salt tolerance, immunity against artificial gastric juice and bile acid, heat resistance, hemolytic action, and its morphological features to ensure that its could be used as a probiotic bacteria. Water extract of *Glycyrrhiza uralensis fischer* mixed with PSK and the optimum pH change, the growth temperature were investigated. Results shows an increased growth with water extract. Halibut is a non-specific immune response of *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract (75°C). Addition of 1% *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract in the culture medium (75 °C), have increased the activity of macrophages, which in turn increased lysozyme activity. Hence, the *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract along with PSK could be used to increase the fish farming production by improving the immune system function of fish against bacterial fish diseases.

## I. 서론

어류양식은 일본 방사능의 피해 및 적조 현상 등으로 인한 감소가 보이긴 했으나, 출하 가능한 성어들의 물량은 증가하고 있다 (통계청., 2013). 가장 높은 비중을 차지하는 넙치는 단백질 함량이 높고 저칼로리로 많은 사람들에게 인기가 많은 어종이다. 하지만 생산량 증가를 위한 고밀도의 사육은 수질 악화 및 어류의 스트레스로 인해, 어류 질병의 발생 빈도가 증가 되고 있다 (Heo *et al.*, 2003). 그리고 세균 및 바이러스, 기생충 등의 단독 감염이 아닌 혼합 감염의 발생이 증가 되고 있다 (Hwang., 2007).

이를 치료하기 위한 가장 일반적인 방법인 화학적 요법은 항생제 투여 방법이 있다 (Eldar *et al.*, 1954). 그러나 무분별한 항생제의 오남용으로 인해 내성 균주 증가 및 생태학적으로 많은 문제를 일으킨다 (Weston., 1993; Newman., 1993; Esiobu, *et al.*, 2002; EI-Rhman, *et al.*, 2009). 이러한 문제를 해결하기 위해 수많은 천연 항생 물질 및 합성항산화제를 사용하고 있으나 고농도로 투여할 때 발암성을 나타낸다는 연구 결과가 있다 (문 등., 2007; Ooi and Liong., 2010; Koo and Chung., 1994).

따라서 안전 요법으로 알려진 프로바이오틱스에 대한 관심이 늘어났으며, 현재 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다 (Trafalska and Grzbowska., 2004; Jang., 2012; Salminen *et al.*, 1999).

프로바이오틱스는 인체에 유익한 미생물로 장내 미생물의 균형을 알맞게 유지시키며 (Isolauri *et al.*, 2001; Willis *et al.*, 2007), 장내 균총을 강화해 면역과 건강 향상에 많은 도움을 준다고 알려져 있다 (Fuller., 1989). 대표적인 프로바이오틱스에는 유산균 (*Lactic acid bacteria*, LAB)이 있다 (Ringo *et al.*, 1998; Conway., 1996). 그 중 *Lactobacillus* sp.(Ashenafi., 1991; Chateau *et al.*, 1993; Gildberg *et al.*, 1997)와 *Bifidobacterium* sp.는 사람들에게 많이 사용되며, *Bacillus* sp.(Sugita *et al.*, 1998), *Enterococcus* sp.와 *Saccharomyces* sp.는 동물에게 많이 사용 된다 (Jadamus *et al.*, 2001).

본 실험에서 사용한 *Pedicoccus* sp.는 운동성을 지닌 그람 양성균이며, 비 포자 형태로 장내 미생물의 강화 및 병원균의 침입을 억제해주는 것으로 알려져 있다 (Ooi and Liong., 2010). 또한 젖산균으로 발효 대사 산물을 생산 한다 (Holck et al., 1992).

유산균에 식물이나 채소, 한약재 추출물을 첨가하면 생육을 증가시킨다는 연구 결과가 있다 (오 2002; 우 2004; Metcalf et al., Koo and Chung., 1994; Zalka et al., 1978). 증식을 촉진시켜 주는 물질은 비타민(Shorb., 1948)과 아미노산(Heimbuch et al., 1956) 또는  $Mn^{2+}$ (Stamer et al., 1964; Zalka and Kissinger., 1984)라고 알려져 있다. 인공배지에서는 유산균의 생합성 능력이 제한되어 있지만, 위의 물질에 따라 그 제한 된 것들을 채워줄 수 있다고 보고되어 있다 (Thornhill and Cogan., 1976).

여러 한약재 중 본 실험에서는 감초(*Glycyrrhiza uralensis fischer*)를 사용 했다. 감초는 다년초 식물이며, 주성분인 Glycyrrhizin을 약 6~14%을 함유하고 있다 (Yun., 1980). Glycyrrhizin은 일반적으로 항염증 및 항암 효과와 알레르기 (Kumagai et al., 1967), 만성감염(Kiso et al., 1984), 바이러스질환(Pompei et al., 1979), 콜레스테롤 감소에 효과가 알려져 있다(Hsiang et al., 2002; Shibata., 2000; Mun et al., 2002). 일반적으로 한약은 달여서 먹는 약용식물로 감초의 유용 성분을 효과적으로 추출해보고자, 증류수를 이용한 열수 추출로 수행하였다.

본 논문에서는 전통발효식품인 된장에서 분리 되어진 *Pedicoccus* sp. PSK의 생리학적 특성, 형태학적 특성, 염기서열 분석으로 동정하고, 생육 조건 검토 및 단일 생육과 pH 변화를 관찰하였다. 감초는 다양한 온도별 구배를 두어 열수 추출하였다. 그리고 추출되어진 온도별 감초는 PSK와 혼합하여 생육 및 pH 변화를 관찰하였다. 다음 온도별 첨가 혼합물들은 어류질병세균에 대한 항균 활성을 측정하고, 넙치 내 비특이적 면역 반응을 확인하여 사료 첨가 내 응용성을 확인 하였다.

본 연구의 목적은 이런 바탕을 기반으로 어류질병 세균의 예방 및 면역 기능을 향상시킴으로서 어류 양식 산업 생산의 증가를 돕고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. Probiotic 균주 분리 및 선정

#### 2.1.1. 균주 분리

본 실험에 사용된 균주는 전통발효식품인 된장에서 분리하였다. 된장을 0.85% 생리식염수에 1g을 넣어 단계별로 희석하여, Mann, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, Difco., USA)에 100  $\mu$ l 넣어 도말하였다. 그리고 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 균은 단일 콜로니를 분리하여 Man Rogosa and Shape Broth (MRSB, Difco., USA)에 (Table.1) 접종하여 30°C에서 48시간 배양시켰다. 분리된 균주는 25%(v/v) glycerol에 현탁 시켜 -70°C에서 보관하였다.

Table. 1. Composition of isolation media.

| Media                 | Comporiton (Per liter) | Amounts | Remarks    |
|-----------------------|------------------------|---------|------------|
| MRS Broth             | Proteose Peptone No. 3 | 10 g    | Difco, USA |
|                       | Beef Extract           | 10 g    |            |
|                       | Yeast Extract          | 5 g     |            |
|                       | Dextrose               | 20 g    |            |
|                       | Polysorbate 80         | 1 g     |            |
|                       | Ammonium Citrate       | 2 g     |            |
|                       | Sodium Acetate         | 5 g     |            |
|                       | Magensium Sulfate      | 0.1 g   |            |
|                       | Manganese Sulfate      | 0.05 g  |            |
| Dipotassium Phosphate | 2 g                    |         |            |

### 2.1.2. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

분리된 균주의 인공 위액에 대한 내성 조사를 위해 0.005M sodium phosphate buffer를 HCl로 보정하여 만든 pH 2.0~7.0의 MRSB 배지에 균주 ( $10^8$  cfu/ml)를 10배 희석하여 접종한 후, 30°C에서 30분간 방치 후 MRSA에 도달하여 10배 이상의 균수가 낮아지지 않는 것을 확인하여 양성으로 판정하였다.

인공 담즙산 내성 조사는 1~3% bile salt가 포함 된 MRSB 배지에 균주 ( $10^8$  cfu/ml)를 10배 희석하여 접종했으며, 30°C에서 30분간 방치 후 MRSA에 도달하여 10배 이상의 균수가 낮아지지 않는 것을 확인하여 양성으로 판정하였다.

내염성 조사는 0~50 ppt (part per thousand)의 NaCl를 포함한 MRSB 배지에 균주 ( $10^8$  cfu/ml)를 10배 희석하여 접종했으며, 30°C에서 30분간 방치 후 MRSA에 도달하여 10배 이상의 균수가 낮아지지 않는 것을 확인하여 양성으로 판정하였다.

내열성 조사는 균주 ( $10^8$  cfu/ml)를 10배 희석하고 60°C 항온수조에 30분간 방치 후, MRSA에 도달하여 1/10배 이하로 균수가 낮아지지 않는 것을 확인하여 양성으로 판정하였다.

용혈소(Hemolysin) 조사는 면양 적혈구가 5% 첨가되어진 plate (Hanil Komed, Korea) 위에 균을 도말하고 30°C에서 48시간 배양시켜 용혈환이 나타나는지의 유무를 확인하여 판정하였다.

## 2.2. Probiotic 균주 동정

### 2.2.1. 형태학적 특성

미생물의 형태학적 특성은 장방출주사현미경 (Scanning Electron Microphotography, SEM, JSM-6700JEOL Ltd., England)을 통해 관찰하였다. MRSA 위에 균을 도말하고, 균이 성장하기 전에 전처리를 수행하였다. 먼저 배지를 0.5 x 0.5cm 되도록 절제하고, 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) 용액에 1시간 동안 담가 고정시켰다. 1 M phosphate buffer로 5분 간격으로 2회 세척하고 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 ethylalcohol (Sigma-Aldrich, USA)로 각각 1시간씩 탈수 시켰다. 그리고 isoamyl acetate (Sigma-Aldrich, USA)와 100% ethylalcohol에 1:1로 섞어 1시간 뒤, 100% isoamyl acetate에 1시간 방치시켰다. 마지막으로 CO<sub>2</sub> gas를 이용하여 건조시키고 백금 처리하여 SEM으로 관찰하였다.



### 2.2.2. 생리학적 특성

생리학적 특성은 그람염색법과 포자유무 및 운동성을 관찰 하였으며, 생화학적 성상은 API 50CHB (Biomerieux, France), API ZYM kit (Biomerieux, France)를 이용하여 지시방법에 따라 수행하였다.



### 2.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석

염기서열 분석은 genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. Chromosomal DNA를 분리시켜, Bacterial 16S rDNA universal primer로 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성 되어진 oligonucleotides는 Forward primer (27F) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer (1492R) : 5'GGTTACCTTGTACGACTT-3'로 구성되었다. PCR 수행을 위해, 0.5  $\mu$ M primer, 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, 3  $\mu$ M Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea)를 각각 첨가하였다. PCR 반응조건은 30 cycle로 94°C에서 45초 denaturation, 50°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초 extension의 단계를 거친 후, 72°C에서 5분간 extension을 하였다. 증폭되어진 PCR 산물은 ethidium bromide (Sigma-Aldrich., USA)를 첨가하여 1% agarose (AgaroseLE, promegaCO., USA) gel에서 확인하였다. 다음 Accuprep™ PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 primers, nucleotides, polymerase, salts의 남아 있는 PCR 산물들을 제거하여 정제시키고, 30  $\mu$ l elutionbuffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution 하였다. 그리고 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR 산물들의 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열의 분석은 BLAST online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였으며, ClustralW software로 염기서열을 배열시키고 MEGA3 program (Ver 6.0)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

#### 2.2.4. Probiotic 균주 선정

된장에서 분리한 Probiotic 균주를 이용하여 인공 위액과 인공 담즙산에 대한 내성 및 내염성, 내열성, 용혈성, 생리학적 특성, 형태학적 특성을 확인하였다.

본 실험에서는 생균제로서 갖추어야 할 특성과 안전성이 확보된 *Pedicoccus* sp. PSK를 선정하였다.



### 2.3. *Pedicoccus* sp. PSK의 생육조건 검토

생육 검토를 위해 0.5% glucose, 0.1% yeast extract, 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 함유된 GY 배지를 사용하였다.

#### 2.3.1. 탄소원의 배지조성

탄소원은 GY배지에 dextrine, saccharose, sorbitol을 각각 1%씩 첨가하여 30°C, 24시간 배양시킨 뒤, 배양액의 탁도를 흡광광도계 660 nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지를 사용하였다.

#### 2.3.2. 질소원의 배지조성

질소원은 GY배지에 malt extract, peptone, yeast extract을 각각 1%씩 첨가하여 30°C, 24시간 배양시킨 뒤, 배양액의 탁도를 흡광광도계 660 nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지를 사용하였다.

#### 2.3.3. 무기염의 배지조성

무기염은 GY배지에  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 을 각각 1%씩 첨가하여 30°C, 24시간 배양시킨 뒤, 배양액의 탁도를 흡광광도계 660 nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지를 사용하였다.

#### 2.3.4. 최적 pH 및 온도별 성장 확인

최적 배양 배양조건은 250 ml 삼각플라스크 안에 MRSB를 150 ml를 넣고 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH 용액으로 pH 4~9의 범위를 조정하여 121℃에서 15분 멸균하여 사용하였다. 제조된 MRSB에 *Pedococcus* sp. PSK의 배양액을 1%씩 접종하여, 30℃에서 24시간 배양시켜 배양액의 탁도를 흡광광도계 660 nm에서 측정하였다. 최적 배양온도는 10~40℃의 범위로 확인하였으며, 최적 pH 확인과 동일하게 확인하였다.



## 2.4. 시료 구입 및 추출 방법

### 2.4.1. 사용 시료

본 실험에서 사용 된 감초(*Glycyrrhiza uralensis fischer*)는 제주도 전통시장에서 건조되어진 상태로 구입하였다 (Fig.1). 시료는 상온에서 보관하여 필요할 때마다 꺼내어 사용하였다.



Fig 1. *Glycyrrhiza uralensis fischer*

#### 2.4.2. 시료 추출방법

시료추출은 증류수 500 ml 당 10 g의 감초를 혼합시켜 각각 95℃, 85℃, 75℃, 65℃, 55℃에 약 3시간 증탕시킨 후 Whatman No.2 여과지를 사용하여 1차 여과과정을 거친 뒤, pore size 0.45  $\mu\text{m}$  syringe용 멸균 filter로 열수 추출액을 조제하였다. 그리고 *Pedicoccus* sp. PSK의 생육 및 항균 항산화 측정을 위해 사용되었고, 추출액은 -4℃에서 보관하여 사용하였다.



## 2.5. 온도별 감초 열수추출물과 *Pedicoccus* sp. PSK의 혼합물에 대한 pH 및 생육 조건, 항균활성 확인

### 2.5.1. *Pedicoccus* sp. PSK pH 및 생육조건

MRSB에 *Pedicoccus* sp. PSK를  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml 농도로 접종하여 30℃에서 48시간 배양하였으며, 생육 조건을 확인하기 위해 12시간 마다 흡광도 및 pH를 측정하였다. 생균수는 12시간 마다 흡광광도계를 사용하여 600 nm에서 측정하였으며, pH는 pH meter (SeveMulti., Swiss)를 사용하여 측정하였다.

### 2.5.2. 온도별 감초 열수추출물 첨가에 따른 pH 및 생육조건

MRSB에 *Pedicoccus* sp. PSK를 5%씩 접종하고 온도별 감초 열수추출물(5℃, 65℃, 75℃, 85℃, 95℃)을 배양액에 각각 0%, 5%, 10%, 15%, 20%씩 혼합 첨가하여 30℃에서 48시간 배양시켰다. pH 및 생육 측정을 위해 12시간마다 배양액을 흡광광도계와 pH meter를 이용하여 측정하였다.

### 2.5.3. 항균실험

본 실험에서 사용한 어류질병세균은 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받았다 (Table.2). 균주들은 stock (25% glycerol)화하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였으며, 어류질병세균들은 Marine Broth (MB, Difco., USA), Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Difco., USA)에서 배양하였다 (Table.3).

어류 질병 세균에 대한 항균 활성 측정은 *Pedicoccus* sp. PSK (5%)를 접종하고 온도별 감초 열수추출액을 각각 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%씩 MRSB에 혼합 첨가하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 14240 xg로 원심 분리하여 상층액을 항균 활성에 사용하였다. 공시 균주는 Muller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 24시간 배양하여 MacFarland turbidity No. 04가 되도록 조절 시킨 뒤, 멸균되어진 면봉을 사용하여 MHA 배지 전면에 균액을 도말하였다. 항균 활성 측정용 시료액은 paper disc (8 mm, ADVANTEC., Japan)에  $50\ \mu\text{l}$ 를 흡수시키고  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 건조시켰다. 그리고 공시균주는  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양시켜 형성되어진 억제환을 측정하였다.

**Table 2.** List of strains used of antibacterial experiment.

| Bacteria name                   | Strain. No. |
|---------------------------------|-------------|
| <i>Streptococcus iniae</i>      | KCTC 3657   |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | KCTC 3651   |
| <i>Edwardsiella tarda</i>       | KCTC 12267  |
| <i>Micrococcus luteus</i>       | KCTC 3063   |
| <i>Listonella anguillarum</i>   | KCTC 2711   |



**Table 3.** Composition of bacterial media

| Media                      | Comporiton (Per liter)          | Amounts | Remarks    |
|----------------------------|---------------------------------|---------|------------|
| Marine Broth               | Peptone                         | 5 g     | Difco, USA |
|                            | Yeast Extract                   | 1 g     |            |
|                            | Ferric Citrate                  | 0.1 g   |            |
|                            | Sodium Chloride                 | 19.45 g |            |
|                            | Magnsium Chloride               | 5.9 g   |            |
|                            | Magensium Sulfate               | 3.24 g  |            |
|                            | Calcium Chloride                | 1.8 g   |            |
|                            | Potassium Chloride              | 0.55 g  |            |
|                            | Sodium Bicarbonate              | 0.16 g  |            |
|                            | Potassium Bromide               | 0.08 g  |            |
|                            | Strontium Chloride              | 34 mg   |            |
|                            | Boric Acid                      | 22 mg   |            |
|                            | Sodium Silicate                 | 4 mg    |            |
|                            | Sodium Fluoride                 | 2.4 mg  |            |
| Brain Heart Infusion Broth | Ammonium Nitrate                | 1.6 mg  | Difco, USA |
|                            | Disodium Phosphate              | 8 mg    |            |
|                            | Calf Brains, Infusion from 200g | 7.7 g   |            |
|                            | Beef Heart, Infusion from 250g  | 9.8 g   |            |
|                            | Proteose Peptone                | 10.0 g  |            |
|                            | Dextrose                        | 2.0 g   |            |
|                            | Sodium Chloride                 | 5.0 g   |            |
| Disodium Phosphate         | 2.0 g                           |         |            |

## 2.6. *Pedicoccus* sp. PSK와 감초 열수 추출물의 혼합물 첨가에 따른 넙치의 비특이적 면역 반응

### 2.6.1. 실험어의 사육 관리

실험어는 제주도 제주시 조천읍에 위치해 있는 양식장에서 분양받았으며, 제주대학교 해양과학대학에서 수행하였다. 넙치는 약 1주일 동안 절식으로 순치시켰으며, 평균 무게는  $48.91 \pm 0.01\text{g}$  이었다. 사육 수조는 120L 사각수조를 사용하였으며, 각 수조당 15마리씩 수용하였다. 실험기간 중 수온은 18.06-19.81℃, 염분 32.78-34.60‰, pH 8.14-8.32, DO는 7.1-8.2 ppm 이었다. 실험사료는 어체 중의 2%씩 1일 2회(오전 9시, 오후 6시), 총 4주간을 공급하였다.

### 2.6.2. 실험사료 제작 및 투여 방법

실험사료는 시중에 판매되고 있는 넙치용 배합사료(조단백질 52.0%, 조지방 8.0%, 조섬유 3.0%, 조점유 3.0% 조회분 14.0%, 칼슘 1.5%, 인 2.7%, 보그락, Suhyup Co, Korea)를 사용하였다. *Pedicoccus* sp. PSK (5%)에 감초 열수추출물 (75℃)을 1% 혼합 시킨 MRSB를 사료 내 10% 첨가하고 발효용기에 담아 밀봉하여 30℃에서 24시간 보관하였다. 단일 감초 열수추출물 (75℃)은 사료 내 10% 첨가하여 사용하였으며, 대조구는 일반 사료를 사용하였다. 각 사료들은 -4℃에서 보관하여 사용하였다.

### 2.6.3. 어류 식세포의 활성산소 측정

Respiratory burst activity는 Anderson과 Siwicki (1996) 실험법에 따라 수행하였다. 넙치의 미부에서 채취한 혈청을 0.2% NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma, USA)와 1:1로 섞은 후, 30분간 상온에 반응시켰다. dimethyl foramide (Sigma, USA) 1 ml을 넣고 반응 시킨 후, 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취해 흡광광도계에서 540nm로 값을 측정하였다. Blank는 dimethyl foramide, Control은 NBT 시약으로 수행하였다.

### 2.6.4. 혈청의 Lysozyme 활성 측정

Lysozyme 활성 측정 방법은 Kumari와 Sahoo (2005) 방법에 따라 분석하였다. 우선, 0.02 M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 0.2 mg/ml이 되도록 *M. lysodeikticus* solution을 만들었다. 96 well plate에 *M. lysodeikticus* solution 1 ml을 분주한 후 혈청 50  $\mu$ l와 혼합시켰다. 그리고 상온에서 micro plate reader (Synergy HYX multi-mode reader, BioTek, USA) 530nm에서 30초와 4분 30초의 흡광도를 측정하였다. 효소의 양은 분당 0.001의 감소를 나타내는 단위로 정의하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 3.1. Probiotic 균주 분리 및 선정

##### 3.1.1. 균주 분리 및 선정

된장에서 분리 한 Probiotic 균주는 30℃에서 가장 잘 증식하였다 (Table.4). 뚜렷한 단일 집락을 형성하였으며, 생육 속도가 빠른 것을 확인 하였다.

**Table 4.** Isolation of probiotic strain.

| Strain Name | Isolaton source | Isolate temperature | Isolate medium    |
|-------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| PSK         | Soybean paste   | 30℃                 | MRS (0%(v/v)NaCl) |

### 3.1.3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

*Peidicoccus* sp. PSK는 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 그람염색, 내염성, 내열성, 용혈성을 조사하였다 (Table. 5).

PSK는 무포자 상태로 그람 양성균으로 확인되었다. 내열성은 60℃에서 음성 반응으로 확인되었고, 1% 인공위액과 3% 담즙산에 조사에서는 내성을 갖는 것을 확인하였다. 용혈성 테스트 결과 PSK는 용혈소를 생산하지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

**Table 5.** Biochemical properties of *Pedicoccus* sp. PSK

| Characteristics                         | PSK           |
|---|---------------|
| Source                                  | Soybean paste |
| Gram staining                           | +             |
| Hemolysin activity                      | -             |
| Heat stability (60℃)                    | -             |
| Bile tolerance (3%)                     | +             |
| Artificial gastric juice tolerance (1%) | +             |

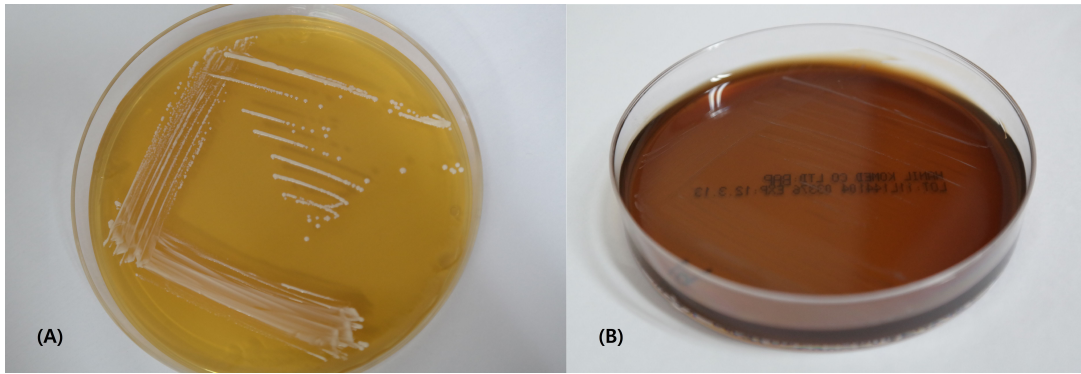
## 3.2. *Pedicoccus* sp. PSK의 동정

### 3.2.1. 배양학적, 형태학적 특성

*Pedicoccus* sp. PSK는 고체배지 위에서 점성(viscosity)을 보이지 않았고 둥근 형태의 집락 형태를 보였다 (Fig. 2A).

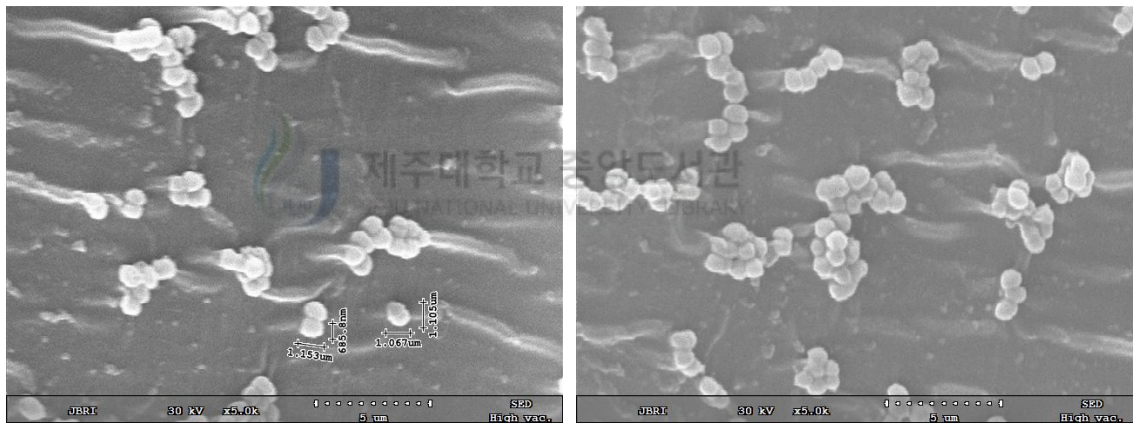
형태학적 특성은 MRS 배지에서 배양한 뒤, SEM을 통하여 관찰하였다. 균주는 집단을 이룬 구형 형태의 모습을 보였다. 평균적인 길이는 1.11  $\mu\text{m}$ , 폭은 1.09  $\mu\text{m}$ 로 나타났다.





**Fig. 2.** Cultural characterization of *Pedicoccus* sp. PSK. Cells were grown at 30°C for 48 hours.

(A) ; MRS agar, (B) ; Blood plate agar.



**Fig. 3.** Scanning electron micrograph of *Pedicoccus* sp. PSK. Cells were grown at 30°C for 24 hours.

### 3.2.2. 생리학적 특성

생리학적 특성은 API 50 CHB Kit를 사용 한 결과, Ribose, D-Xylose, Glucose, Fructose, Manose, N Acetyl glucosamine, Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Gentiobiose에서 양성 반응을 나타내었고 나머지는 음성 반응을 나타냈다 (Table. 4). 효소 활성 측정 결과는 Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Acid phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucosidase에서 양성 반응을 나타내었고 나머지는 음성 반응을 나타냈다 (Table. 5).





**Table 6.** Physiological characteristic of *Pedicoccus* sp. PSK.

| No. | Test | Composants actifs           | Result (+/-) |
|-----|------|-----------------------------|--------------|
| 0   |      | Control                     | -            |
| 1   | GLY  | Glycerol                    | -            |
| 2   | ERY  | Erythritol                  | -            |
| 3   | DARA | D-Arabinose                 | -            |
| 4   | LARA | L-Arabinose                 | -            |
| 5   | RIB  | Ribose                      | +            |
| 6   | DXYL | D-Xylose                    | +            |
| 7   | LXYL | L-Xylose                    | -            |
| 8   | ADO  | Adonitol                    | -            |
| 9   | MDX  | $\beta$ Methyl-D-xyloside   | -            |
| 10  | GAL  | Galactose                   | -            |
| 11  | GLU  | Glucose                     | +            |
| 12  | FRU  | Fructose                    | +            |
| 13  | MNE  | Manose                      | +            |
| 14  | SBE  | Sorbose                     | -            |
| 15  | RHA  | Rhamnose                    | -            |
| 16  | DUL  | Dulcitol                    | -            |
| 17  | INO  | Inositol                    | -            |
| 18  | MAN  | Mannitol                    | -            |
| 19  | SOR  | Sorbitol                    | -            |
| 20  | MDM  | $\alpha$ Methyl-D-mannoside | -            |
| 21  | MDG  | $\alpha$ Methyl-D-glucoside | -            |
| 22  | NAG  | N Acetyl glucosamine        | +            |
| 23  | AMY  | Amygdlin                    | -            |
| 24  | ARB  | ArbutiN                     | -            |
| 25  | ESC  | Esculin                     | +            |
| 26  | SAL  | Salicin                     | +            |
| 27  | CEL  | Cellobiose                  | +            |
| 28  | MAL  | Maltose                     | +            |
| 29  | LAC  | Lactose                     | -            |
| 30  | MEL  | Melibiose                   | -            |
| 31  | SAC  | Sucrose                     | -            |
| 32  | TRE  | Trehalose                   | -            |
| 33  | INU  | Inulin                      | -            |
| 34  | MLZ  | Melezitose                  | -            |
| 35  | RAF  | Raffinose                   | -            |
| 36  | AMD  | Starch                      | -            |
| 37  | GLYG | Glycogen                    | -            |
| 38  | XLT  | Xylitol                     | -            |
| 39  | GEN  | Gentiobiose                 | +            |
| 40  | TUR  | D-Turanose                  | -            |
| 41  | LXY  | D-Lyxose                    | -            |
| 42  | TAG  | D-Tagatose                  | -            |
| 43  | DFUC | D-Fucose                    | -            |
| 44  | LFUC | L-Fucose                    | -            |
| 45  | DARL | D-Arabitol                  | -            |

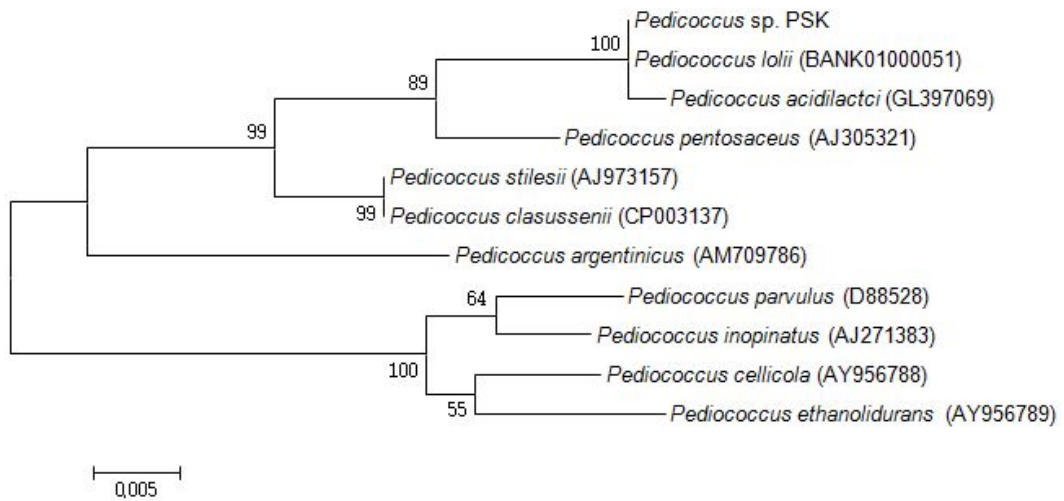
**Table 7.** Enzymes detected by the API ZYM test of *Pedicoccus* sp. PSK.

| No. | Enzyme Assayed for                 | Substrate                                      | Result (+/-) |
|-----|------------------------------------|--|--------------|
| 1   | Control                            |  | -            |
| 2   | Alkaline phosphatase               | 2-naphthyl phosphate                           | -            |
| 3   | Esterase(C4)                       | -naphthyl butyrate                             | -            |
| 4   | Esterase Lipase(C8)                | 2-naphthyl caprylate                           | -            |
| 5   | Lipase(C14)                        | 2-naphthyl myristate                           | -            |
| 6   | Leucine arylamidase                | L-leucyl-2-naphthylamide                       | +            |
| 7   | Valine arylamidase                 | L-valyl-2-naphthylamide                        | +            |
| 8   | Crystine arylamidase               | L-cystyl-2-naphthylamide                       | -            |
| 9   | Trypsin                            | N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide          | -            |
| 10  | $\alpha$ -chymotrypsin             | N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide       | -            |
| 11  | Acid phosphatase                   | 2-naphthyl phosphate                           | +            |
| 12  | Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase     | Naphtol-AS-BI-phosphate                        | +            |
| 13  | $\alpha$ -galactosidase            | 6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside | -            |
| 14  | $\beta$ -glucuronidase             | 2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranoside        | -            |
| 15  | $\beta$ -glucosidase               | Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide           | -            |
| 16  | $\alpha$ -glucosidase              | 2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside         | -            |
| 17  | $\beta$ -glucosidase               | 6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyranoside     | +            |
| 18  | N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase | 1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucosaminide   | -            |
| 19  | $\alpha$ -mannosidase              | 6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside    | -            |
| 20  | $\alpha$ -fucosidase               | 2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside          | -            |

### 3.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석

16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 얻은 전체 염기서열은 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 BLAST search program을 이용하여 분석한 결과 *Pedicoccus pentosaceus*와 100%의 상동성을 보였다. PSK는 근연종 type strain (*Pedicoccus lolii*, *Pedicoccus acidilactci*, *Pedicoccus pentosaceus*, *Pedicoccus stilesii*, *Pedicoccus clasussenii*, *Pedicoccus argentinicus*, *Pedicoccus parvulus*, *Pedicoccus inopinatus*, *Pedicoccus cellicola*, *Pedicoccus ethanolidurans*) 염기서열로 계통수를 작성하였다 (Fig.4).



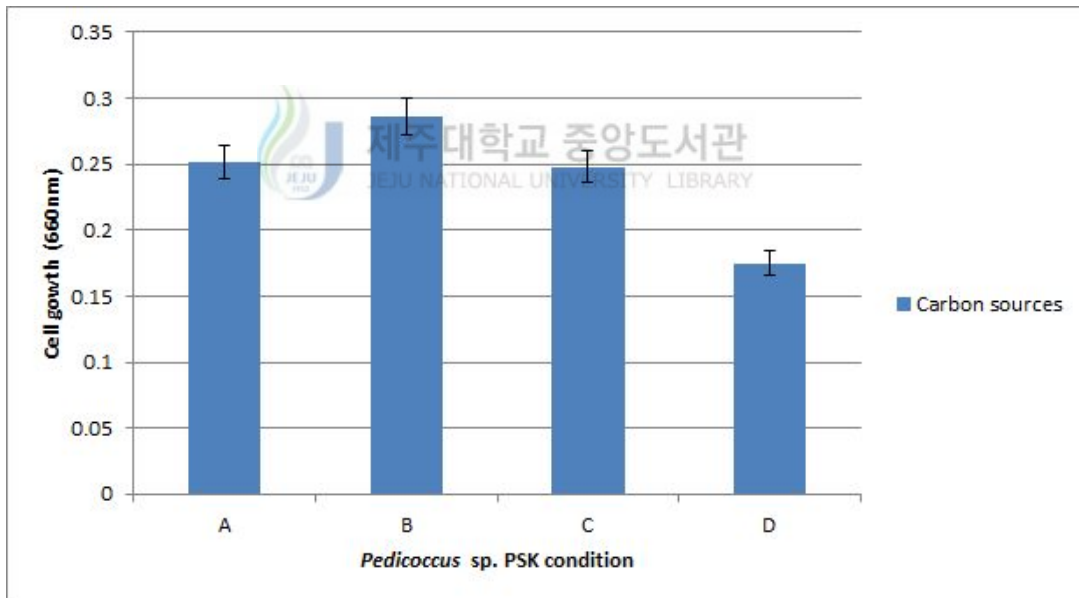


**Fig. 4.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of *Pedicoccus* sp. PSK within the radiation of the genus *Pedicoccus*. Bootstrap percentage (from 1000 replications) are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3.3. *Pedicoccus* sp. PSK의 생육조건 검토

#### 3.3.1. 탄소원의 영향

탄소원은 유산균의 성장을 도와주며, lactic acid를 형성시키는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Saarella *et al.*, 2003). *Pedicoccus* sp. PSK의 탄소원 영향은 Saccharose와 Control이 비슷한 결과를 보였으며, Sorbitol의 첨가는 성장을 저해하는 것을 확인하였다. 하지만 Dextrine이 대체적으로 높은 생육에 영향을 끼치는 것을 보인 결과, 본 연구에서는 최적 무기염을 Dextrine으로 결정하였다 (Fig. 5).

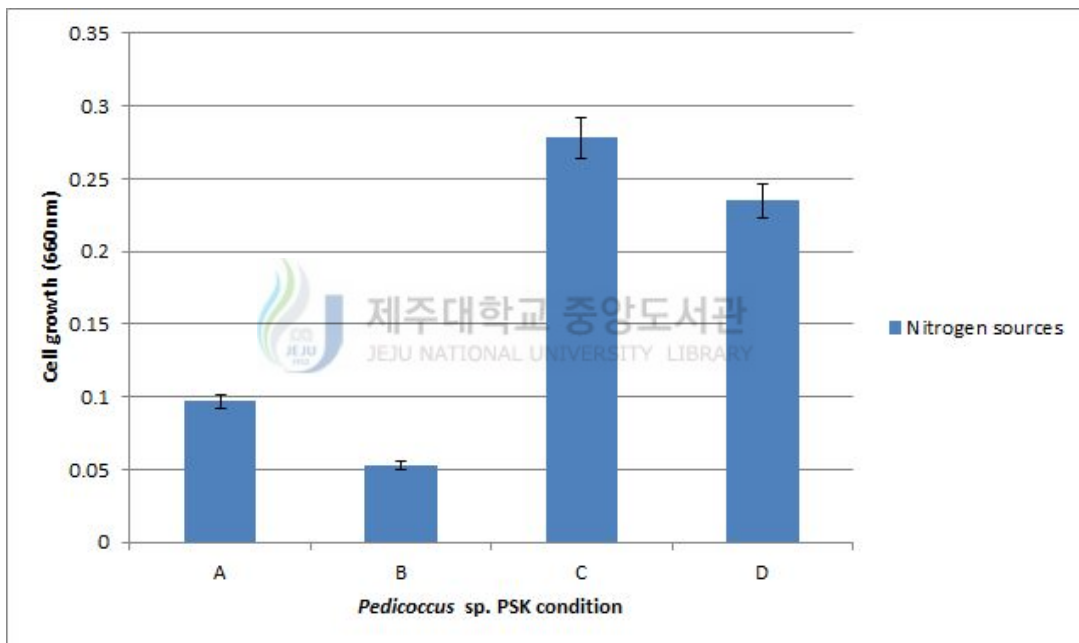


**Fig. 5.** Effect of different carbon sources on cell growth of isolated *Pedicoccus* sp. PSK.

A : Control, B : Dextrine, C : Saccharose, D : Sorbitol.

### 3.3.2. 질소원의 영향

질소원은 대조구에 1% soluble starch를 GY배지에 첨가하고 질소원을 제외한 배지를 사용하였다. 균주의 생육은 Peptone, Yeast extract 첨가에서 성장이 높은 것을 확인하였다. 하지만, Malt extract의 첨가는 생육을 저해하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 최적 질소원으로 Peptone을 결정하였다 (Fig. 6).

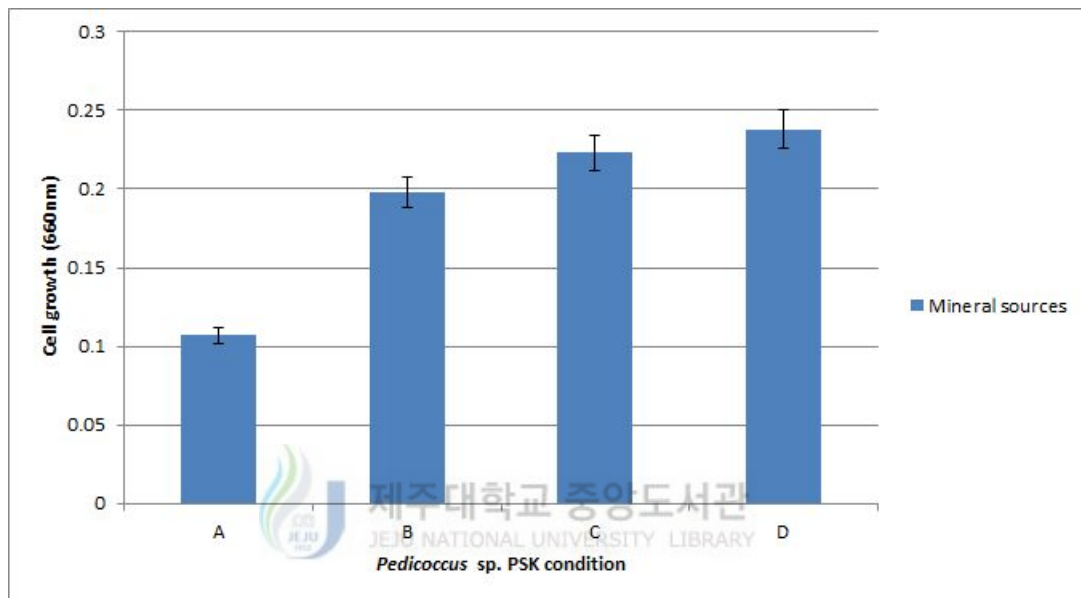


**Fig. 6.** Effect of different Nitrogen sources on cell growth of isolated *Pedicoccus* sp. PSK.

A : Control, B : Malt extract, C : Peptone, D: Yeast extract.

### 3.3.3. 무기염의 영향

*Pedicoccus* sp. PSK의 무기염의 영향은  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 첨가한 순서대로 높은 생육 영향을 나타냈고, 본 연구에서는 최적 탄소원으로  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 결정하였다 (Fig. 7).



**Fig. 7.** Effect of different mineral source on cell growth of isolated *Pedicoccus* sp. PSK.

A : Control, B :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , C :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , D :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.3.4. 최적 pH 및 온도별 성장 확인

*Pedicoccus* sp. PSK의 온도별에 따른 성장을 확인한 결과, 30~35℃ 의 성장률이 가장 높았다. 하지만 40℃ 이상을 넘어가게 되면 균의 성장이 이뤄지지 않는 것을 확인하였다 (Fig.8). 또한 pH는 pH 5 이하로 내려가게 되면 급격한 생육 저하를 나타냈으며, pH 6~7 사이에서 가장 안정적으로 성장하는 것을 확인하였다 (Fig. 9).





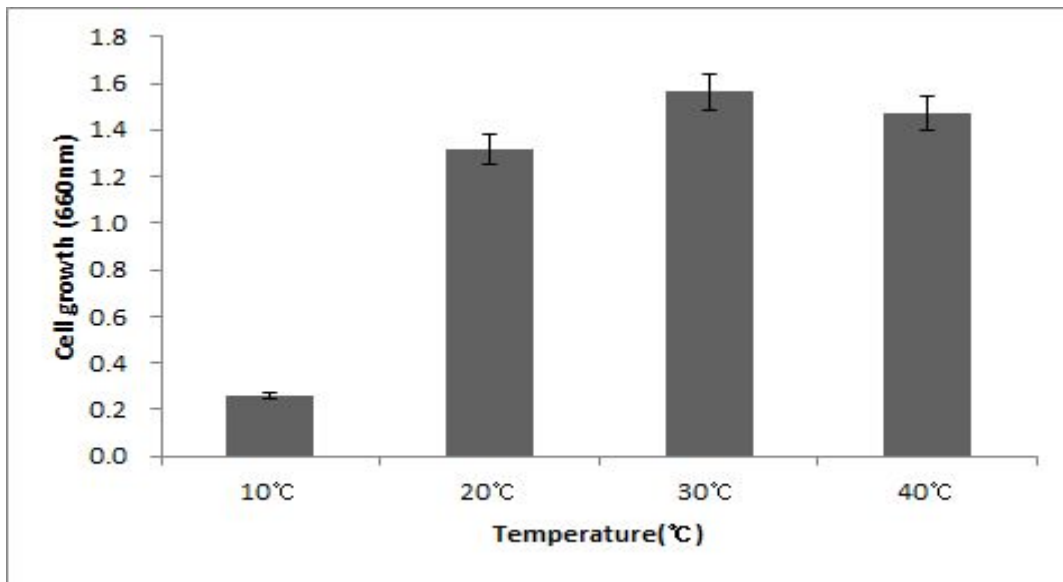


Fig. 8. Effect of temperature on cell growth of *Pedicoccus* sp. PSK.

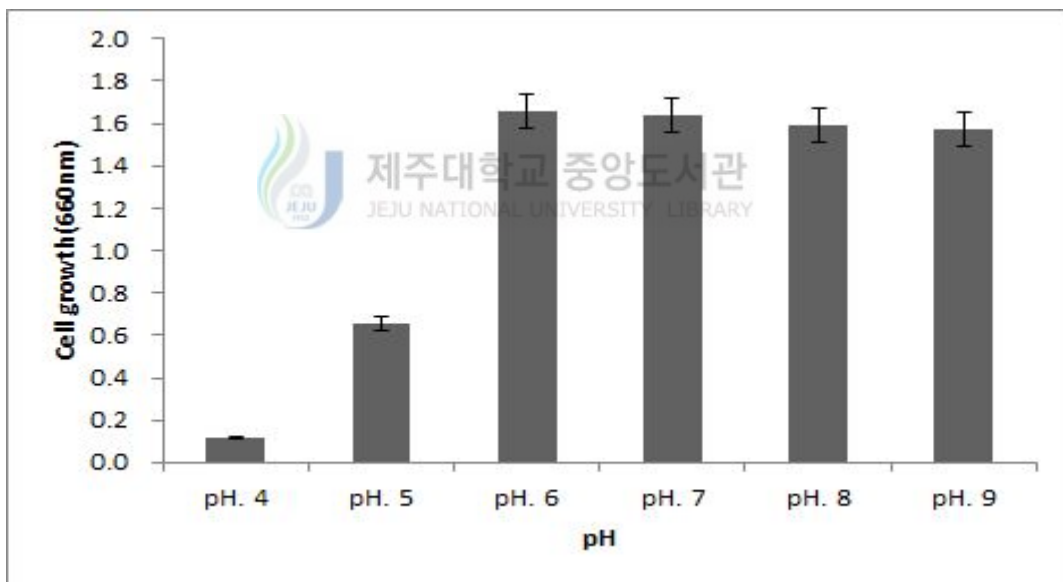


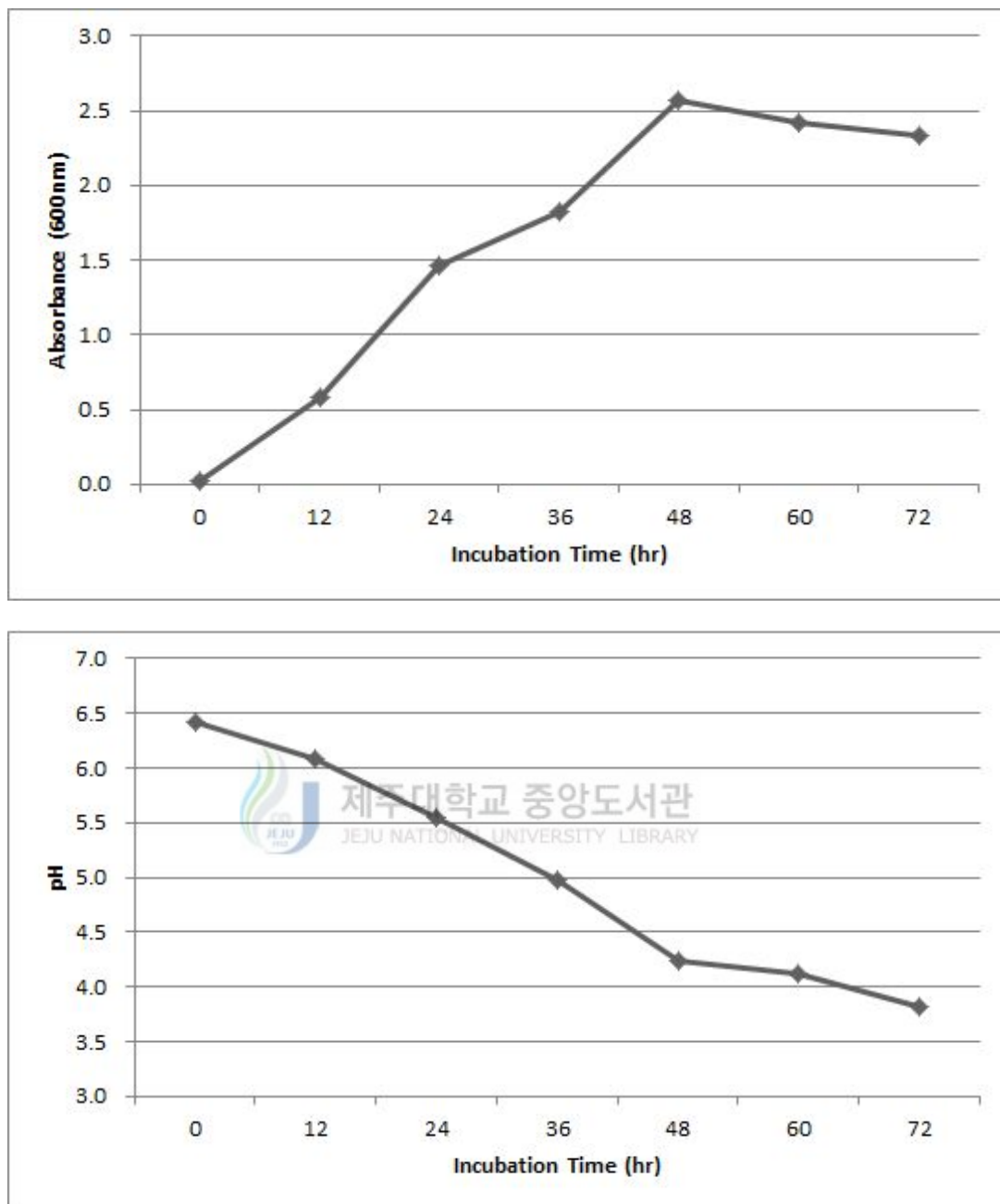
Fig. 9. Effect of pH on cell growth of *Pedicoccus* sp. PSK.

### 3.4. *Pedicoccus* sp. PSK 및 감초 열수추출물의 혼합물 첨가에 따른 pH, 생육조건 및 항균활성 확인

#### 3.4.1. *Pedicoccus* sp. PSK pH 및 생육조건

MRSB에 배양 된 *Pedicoccus* sp. PSK의 생육 조건을 확인하기 위해, 72시간 동안 균수의 변화와 pH를 측정하였다 (Fig.10). 그 결과, 48시간에서 가장 높은 생육을 보이다 점차 감소하는 것을 확인하였다. 균수를 측정하기 위해 48시간의 배양액을 Plate Count Agar (PCA, Difco., USA)에 100  $\mu$ l씩 도말한 결과  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml로 나타났다. pH 감소량을 확인한 결과 pH 6.3에서 pH 2.8로 변화된 것을 확인하였다 (Fig.10).





**Fig. 10.** Growth curve of viable cell absorbance and pH in MRSB of *Pedicoccus* sp. PSK.

### 3.4.2. 온도별 감초 열수추출물 첨가에 따른 pH 및 생육조건

*Pedicoccus* sp. PSK, 5%와 온도별 감초 (55℃, 65℃, 75℃, 85℃, 95℃) 열수추출물을 MRSB에 0%, 5%, 10%, 15%, 20%씩 각각 혼합 첨가하여 생육 변화 및 pH에 미치는 영향을 확인하였다 (Fig. 11).

확인한 결과, 55℃에서 감초 열수추출물을 1~2% 첨가 시, 높은 생육을 보인 것을 확인하였다. 그 외 감초 열수추출물도 생육에 도움을 주긴 했으나, 75℃의 0.5% 및 95℃의 1.5% 첨가물은 오히려 생육을 저해하는 것을 확인하였다.

pH는 4.2~4.4 사이로 변화된 것을 볼 수 있었으며, 생육이 저해 될수록 pH의 값도 증가되는 것을 확인하였다.

위의 결과를 토대로, *Pedicoccus* sp. PSK만을 배양했을 때보다 감초 열수추출물(55℃)을 1~2%첨가하면 생육이 높아지는 것을 확인하였다.



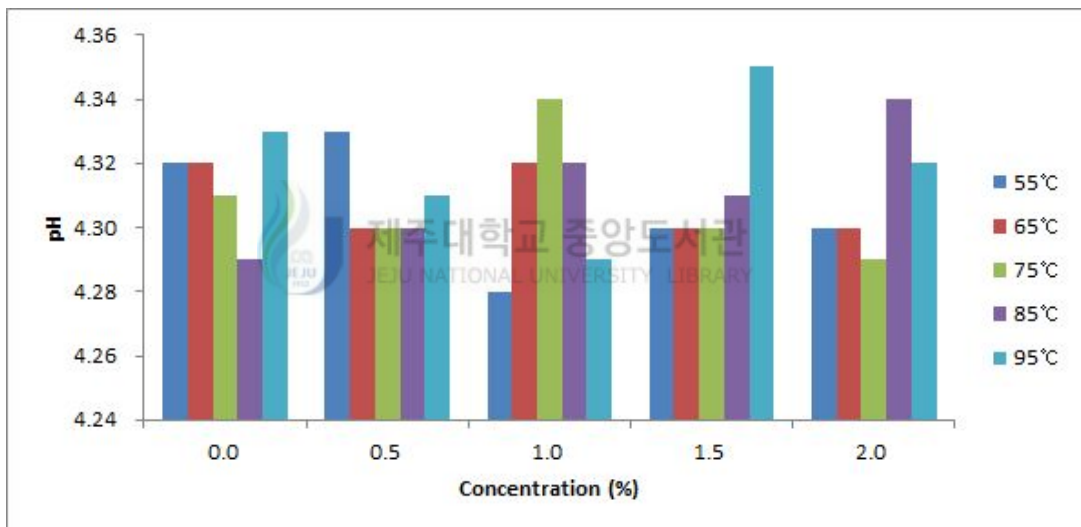
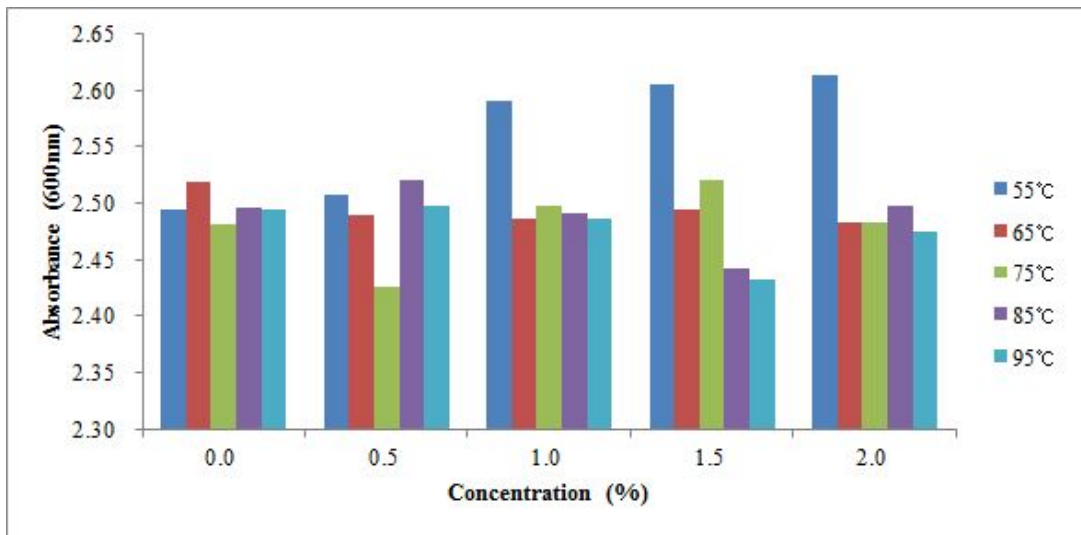


Fig. 11. Result of pH and viable cell absorbance of *Pedicoccus* sp. PSK in MRSB water extract of *Glycyrrhiza uralensis fischer*.

### 3.4.3. 항균 활성

*Pedicoccus* sp. PSK의 항균 활성은 *Listonella anguillarum*를 제외한 나머지 어류 질병 세균에서는 나타나지 않았다. 하지만 온도별 감초 추출물의 첨가로 인해 항균 활성을 측정하였다. 그 중 75°C의 1% 감초 열수추출물을 첨가한 *Pedicoccus* sp. PSK는 세 개의 균주에서 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다 (Table. 8). 전체적으로 높은 항균활성을 나타내진 못했으나, 감초 열수추출물과 *Pedicoccus* sp. PSK의 혼합물이 항균활성을 증가시켜준 것으로 사료된다.

**Table. 8.** Effect of *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and *Pedicoccus* sp. PSK mixture in bacterial growth.

| Temperature<br>(°C) | <i>Glycyrrhiza uralensis fischer</i> concentration (clear zone(mm)) |   |   |      |      |   |      |      |    |      |   |   |      |    |    |
|---------------------|---|---|---|------|------|---|------|------|----|------|---|---|------|----|----|
|                     | 0%  |   |   | 0.5% |      |   | 1.0% |      |    | 1.5% |   |   | 2.0% |    |    |
|                     | A   | B | C | A    | B    | C | A    | B    | C  | A    | B | C | A    | B  | C  |
| 55°C                | 8.1   | - | - | 8.2  | -    | - | 8.3  | -    | -  | 8.3  | - | - | 8.4  | -  | -  |
| 65°C                | 10.2  | - | - | 10.2 | -    | - | 12   | 10.8 | -  | 11.8 | - | - | 10   | -  | -  |
| 75°C                | 8.2   | - | - | 11.1 | 10.1 | - | 11.1 | 9    | 13 | 10.2 | - | - | 9.9  | -  | -  |
| 85°C                | 10  | - | - | 12   | 11   | - | 9.2  | -    | -  | 9    | - | - | 11.3 | -  | -  |
| 95°C                | -   | - | - | -    | 10.3 | - | -    | 11.1 | -  | -    | - | - | -    | 11 | 11 |

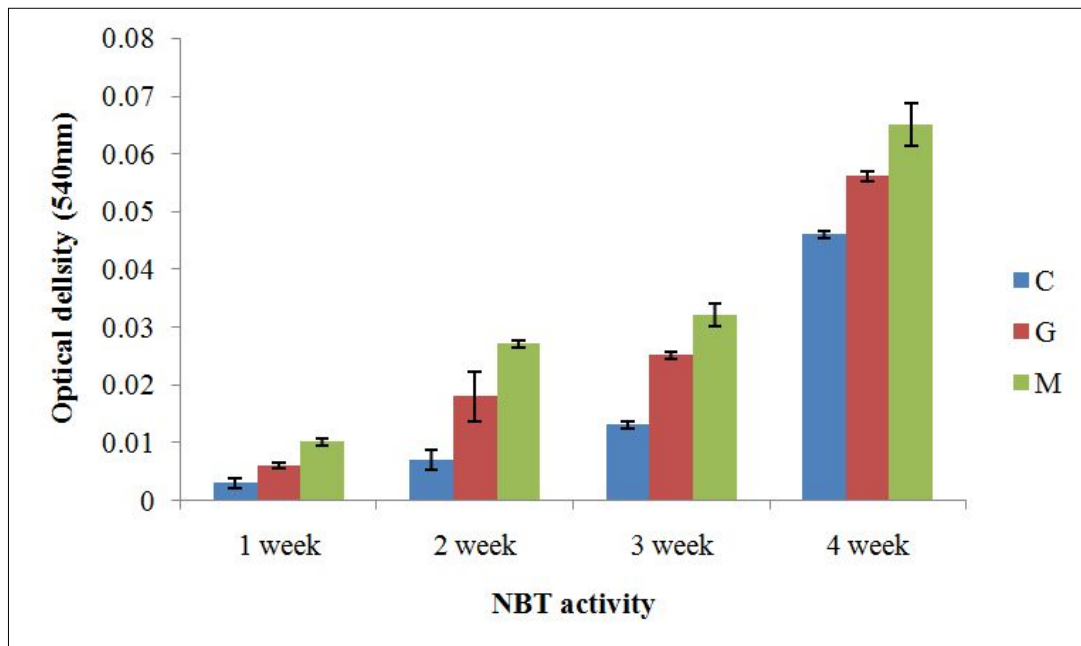
A; *Listonella anguillarum* KCTC 2711 (+), B; *Streptococcus parauberis* KCTC 3651 (-), C; *Micrococcus luteus* KCTC 3063 (-).

### 3.5. *Pedicoccus* sp. PSK와 감초 열수 추출물의 혼합물 첨가에 따른 넙치의 비특이적 면역반응

#### 3.5.1. 어류 식세포의 활성산소 측정

어류 체내 식세포의 활성산소는 NBT법 (Ayyaru and Venkatesan, 2006; Andreas and Dieter, 2003, Siwicki et al, 1994)으로 측정하였다. 1~3주 동안 3 그룹에서는 유의적 차이가 없었지만, 4주차 때 혼합물의 결과 값이 높아지는 것을 확인하였다 (Fig. 12). 이러한 결과는 Probiocs 균주와 herbal를 혼합하여 첨가시킨 후 4주차부터 NBT 활성이 급격히 증가한다는 보고와 일치하였다 (Harikrishnan *et al.*, 2011).





**Fig. 12.** NBT (Nitroblue Tetrazolium) activity of Olive flounder fish fed with *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and mixture *Pedicoccus* sp. PSK and *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and control diet for 4 weeks.

C ; Control, G ; *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract, M ; Mixture of *Pedicoccus* sp. PSK and *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract (75°C, 1%).

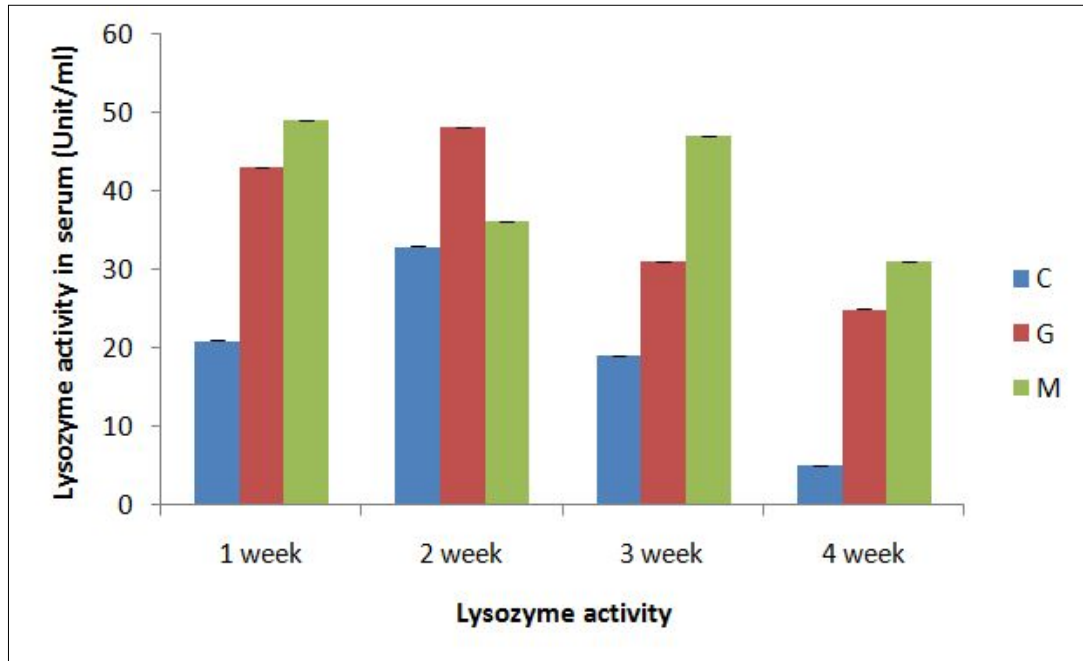


### 3.5.2. 혈청의 Lysozyme 활성 측정

라이소자임 활성은 그람 양성균의 세포벽에 직접 작용하고, 그람 음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후 펩티도글리칸층을 분해해주는 역할을 한다 (Jang., 2012). 본 실험 결과에서는 전체적으로 대조구보다 높은 라이소자임 활성을 보였다. 1~2주에는 감초만 첨가한 그룹의 결과 값이 높았으나, 3주차엔 혼합물을 첨가한 그룹의 라이소자임 활성이 증가하는 것을 확인 하였다. 4주차에서는 3주차에 비해 전체적으로 감소를 보이긴 했으나, 세 그룹을 보았을 시 혼합물의 그룹이 증가된 것을 확인하였다 (Fig. 13).

라이소자임 활성 측정 결과, 감초만 첨가한 수조에서는 시간이 지남에 따라 점차적으로 활성이 감소하였고, 혼합물의 경우 감초만 첨가한 그룹에 비해 활성이 증가되는 것을 확인하였다.





**Fig. 13.** Lysozyme activity of Olive flounder fish fed with *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract and *Pedicoccus* sp. PSK mixed diet for 4 weeks.

C ; Control, G ; *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract, M ; Mixture of *Pedicoccus* sp. PSK and *Glycyrrhiza uralensis fischer* water extract (75°C, 1%).

## IV. 요약

Probiotics 균주는 된장에서 분리하여 인공 담즙 및 인공위액에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성 등의 기초적인 생균제의 특성, 형태학적, 생리학적 및 16s rRNA 염기서열 분석을 통하여 분석하였다. 이 결과를 토대로 본 연구에서는 분리한 Probiotic은 *Pedicoccus pentosaceus*와 100% 상동성을 보여 최종적으로 *Pedicoccus* sp. PSK로 명명하였다.

*Pedicoccus* sp. PSK의 최적 배양조건은 탄소원  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 질소원 Peptone, 무기염 Dextrine을 확인하였으며, 최적배양온도 30°C, 최적pH는 6~7으로 확인하였다.

감초는 온도별(55°C, 65°C, 75°C, 85°C, 95°C)로 열수추출을 하였다. 추출되어진 온도별 열수추출액은 각각 0%, 5%, 10%, 15%, 20%를 각각 MRSB에 접종하고, *Pedicoccus* sp. PSK를 5% 혼합 첨가하여 30°C에서 48시간 배양시키고 생육 및 pH를 조사한 결과, 전체적으로 생육을 증대시키는 것으로 나타났다. 하지만 75°C의 0.5%와 95°C의 1.5%의 첨가물은 오히려 생육을 저해하였다. pH의 변화는 4.2~4.4로 확인 되었으며, 생육이 낮을수록 pH의 값도 증가되는 것을 확인하였다.

*Pedicoccus* sp. PSK는 *Listonella anguillarum*를 제외한 나머지 어류 질병 세균에서 항균 활성을 나타내지 않았다. 그러나 온도별 감초 추출물의 혼합 첨가로 그람 양성 1종, 그람 음성 2종에서 항균 활성이 나타났다. 이는 온도별 감초 열수추출물이 *Pedicoccus* sp. PSK에 관여하여 항균 활성을 증가시켜준 것으로 사료된다.

넙치의 비특이적 면역 반응은 감초 열수추출물 (75°C) 1%와 *Pedicoccus* sp. PSK 5%를 혼합 시킨 사료와 일반 감초 열수추출물(75°C), 대조구로 총 3그룹으로 나뉘어 식세포 활성과 Lysozyme 활성을 측정하였다. 식세포 활성 결과 대체적으로 시간이 지날수록 혼합물의 결과 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 라이소자임 활성에서는 초기 감초 열수추출물의 결과 값이 높았지만 4주차에서는 혼합물의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 결과적으로 감초는

*Pedicoccus* sp. PSK의 생육을 증진 및 항균 활성을 증가시켰고, 납치의 비특이적 면역 반응의 향상을 확인하였다.

본 연구에서는 전통발효식품인 된장에서 Probiotics 균주를 선별하여 한약재인 감초와 혼합시켰다. 유산균들은 식물 및 한약재 추출물을 첨가하면 생육을 촉진시킨다는 연구 결과가 보고되었다. 따라서, 이런 바탕을 기반으로 어류 질병 세균의 예방 및 면역 기능을 향상시킴으로서 어류 양식산업에 생산을 증대시키고자 하였다.



## V. 참고 문헌

- Aelsson, L. 1998. Lactic acid bacterial: classification and physiology. pp. 1-17. In, S. alminen and A. Von Wright (eds). Lactic Acid Bacterial: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Ashenafi, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. Food Microbiol. 8: 303-310.
- Chateau, N., Castllanos, I., Deschamps, A.M. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of commercial probiotic consortium. J. Appl. Bacteriol. 74: 36-40.
- Conway, P.L., 1996. Developmnt of intestinal microbiota. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. Eds. Gastrointestinal Microbiology. Vol. 2.
- EI-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. E., Shalaby, A. M. E. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 27:175-180.
- Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. Vaccine. 13: 867-870.
- Esiobu N, Armenta L, Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. Int J Environ Health Res. 12:133-144.
- Fuller afrc, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Microbiol. 66(5): 356-378.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringo, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. Hydrobiologia. 352: 279-285.

- Gopalakannan, A., Venkatesan, A. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*. 255(1-4): 179-187.
- Harikrishnan, R., Kim, M.C., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011. Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. *Fish hellfish Immunol*. 31: 310-317.
- Heimbuch, A.H., Aurand, L.W., Speck, M.S. 1956. Some characteristics of a growth stimulant in corn steep liquor for *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol*. 72(4): 543-547.
- Heo, W. S., Kim Y. R., Kim, E. Y., Sungchul C, and S. I. 2003. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paalichthys olvaceus*). *Aquaculture*. 376-379:20-24.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland., Aukrust, T., Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol*. 138: 2715-2720.
- Hsiang, C.Y., Lai, I.L., Chao, D.C., Ho, T.Y. 2002. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci*. 70(14): 1643-56.
- Hwang, S.D. 2007. M.D. thesis. Pukyong National University, South Korea.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr*. 73: 444s-450s.
- Jadamus, A., Simon, O., Vahjen, W. 2001. Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. *J. Anim. Feed Sci*. 10: 51-67.

- Jang, I.S. 2012. M.D. thesis. Jeju National University, South Korea.
- Kiso, Y., Tohin, M., Ino, H., Hattori, M., Seamoto, T., Narnba, T. 1984. Mechanism of Antihepatotoxin Activity of Glycyrrhizin I: Effect on Free Radical Generation and Lipid Peroxidation. *Planta Med.* 50(4): 298-302.
- Koo, H.H., Chung, S.H. 1994. Effects of paans ginseng and ganoderma lucidum extract n the growth of lactic acid bacteria. *Korea J. Food Nutr.* 7(1): 45-50.
- Kumagai, A., Nanaboshi, M., Asanuma, Y., Yogur, T., Nishino, K. 1967. Effect of glycyrrhizin on thymolytic and immuno-suppres-sive action of cortisone. *Endocrinol. Jpn.* 14(1): 39-42.
- Metcalf, D., Hucker, G.J., Carpenter, D.C. 1946. A Growth Factor in Certain Vegetable Juices. *J. Bacteriol.* 51(3): 381-384.
- Mun, Y.J., Kim, J., Lim, N.Y., Lee, S.Y., Seop, G., Hwang, C.Y., Woo, W.H. 2002. Inhibitory Effect on Melanogenesis of Radix Glycyrrhizae Water Extract. *J. Oriental Physiology & Pathology.* 16(6): 1230-1235.
- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3:145-185.
- Ooi, L.G., Liong, M.T. 2010. Cholesterol-Lowering Effects Probiotics and Prebiotics: A Review of *in Vivo* and *in Vitro* Findings. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2499-2522.
- Pompi, R., Rlore, O., Marcialis, MA., Pani, A., Loddo, B. 1979. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature.* 281: 689-690.
- Reidab, G., Friendshipac, R. 2002. Alternatives to antibiotic: probiotics for the gut. *Anim. Biotechnol.* 13(1): 97-112.

- Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160: 177-203.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., Mättö. 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Int. Dairy J.* 13(4): 291-302.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C., Benno, Y., Lee, K. 1999. probiotics: How should they be defined *Trends. Food Sci. Technol.* 10: 107-110.
- Shibata S. 2000. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi.* 120(10): 849-862.
- Shorb, M.S. 1948. Activity of vitamin B<sub>12</sub> the growth of *Lactobacillus lactis*. *Science.* 107: 397-398.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41(1-2). 125-139.
- Skouras, A., Steinhagen, D. 2003. Measuring some flounder (*Platichthys flesus* L.) innate immune responses to be incorporated in effect biomonitoring concepts. *Helgol Mar Res.* 57(3-4): 199-205.
- Stamer, J.R., Albury, M.A., Pederson, C.S. 1964. Substitution of manganese for tomato juice in the cultivation of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.* 12(2): 165-168.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsue, N., Degudri, Y. 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture.* 165: 29-280.
- Thornhill, B.P., Cogan, T.M., 1976. Effect of fruit on growth of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Res.* 44: 155-158.



Trafalska, E., Grzybowska, K. 2004. Probiotics--an alternative for antibiotics. *Wiad. Lek.* 57(9-10): 497-498.

Weston DP. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: Baird D, Beveridge MVM, Kelly LA, Muir JF, editor. *Aquaculture and water Resource mangement*. Oxford: Blackwell; 1993.

Willis, W.L., Isikhuemhen, O.S., Ibrahim, S.A. 2007. Performance Assessment of Broiler Chickens Given Mushroom Extract Alone or in Combination with Probiotics. *Poult. Sci.* 86(9): 1856-1860.

Woo, J.Y. 2004. M.D. thesis. Hankyong National University, South Korea.

Yun, D.H. 1980. M.D. thesis. Korea University, South Korea.

Zalka, L.L., Kissinger, J.C. 1984. Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *J. Food Sci.* 49(1): 5-9.

Zalka, L.L., Zell, T.E., Palumbo, S.A., Smith, J.L. 1978. Effect of spices and salt on fermentation of lebanon bologna-type sausage. *J. Food Sci.* 43(1): 186-189.

문영건, 여인규, 허문수: 꿀풀 추출물의 유산균에 대한 생육과 향산화 활성 및 어류 병원성 미생물에 대한 항균활성. *J. Life Sci.* 17(11): 1547-1554, 2007.

오문정: 당귀, 숙지황, 쑥, 황기가 유산균의 생육에 미치는 영향. *동국대학교*. 2002.

통계청. 한국. 어류양식동향조사. 2013.

## VI 감사의 글

우선 대학 시절 처음, 실험실에 들어와 대학원까지 진학하기에 있어 아낌없이 지도해주시고 많은 도움을 주신 허문수 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 학부생부터 많은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 박상울 교수님께도 감사의 말씀을 올리고 싶습니다. 또한, 대학원 석사학위를 졸업하기에 앞서, 논문 작업에 많은 신경을 써주시고 도움을 주신 진창남 소장님과 수산자원공리단에 계신 실험실의 큰 오빠였던 김만철오빠에게도 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

실험실에 처음 들어와 많은 것을 가르쳐주고 일깨워 준, 이제 다들 사회 생활에 계셔서 항상 뵙지 못하는 영원한 실험실 오빠들인 김만철 오빠, 김주상 오빠, 장익수 오빠, 한용재 오빠, 송창영 오빠, 유영민 오빠, 홍승현 오빠들에게도 감사의 말씀을 건내고 싶습니다. 그리고 실험실을 이끄느라 고생하고 항상 고마운 김동휘 오빠, 먼저 걱정해주고 챙겨주시는 박소현 언니와 졸업 동기겸 실험실 동기인 고등학교부터 지금까지 쭉 같이 지내온 하나뿐인 나의 절친 김민선, 서울에서 내려와 이제 제주도 사람 다 됐나 싶었더니 떠나는 정지운과 실험실에 들어와 고생하는 학부생 박진국, 최하리, 인도 먼 곳에서 온 배려심 넘치는 Dr. Dharaneedharan에게도 진심으로 감사의 말을 건넵니다.

그리고 대학 진학까지에 있어 도움 주신 양병규 선배님, 장영환 선배님, 문영건 선배님 그리고 졸업에 앞뒤 몇 안되는 동기인 현수오빠, 은성오빠, 원보오빠, 민선, 지운, 혜나에게도 수고의 말 건넵니다.

끝으로 지금까지 모자름 없이 대학원 진학에 있어 많은 도움을 주고 항상 아낌없이 사랑해주고 보살펴주신 고마운 우리 가족 아버지 (文昌友), 어머니 (盧玉順), 미우나 고우나 하나밖에 없는 나의 동생 경남이에게도 감사의 말을 전합니다. 그리고 아마 지금까지도 살아계셨더라면 가장 기뻐해주셨을 우리 할아버지 (文東源)께 이 논문을 바칩니다.