



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](#)

A THESIS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

유산균과 병원균에 대한 팽생이모자반 유래  
효소 추출물의 프로바이오틱스 활성 평가

Prebiotics effect of enzyme-assisted extract from *Sargassum horneri*  
on the lactic acid bacteria and pathogen bacteria

PO GONG

Department of Marine Life Sciences

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

2021. August

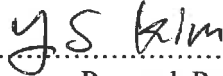
# 유산균과 병원균에 대한 갱생이모자반 유래 효소 추출물의 프리바이오틱스 활성 평가

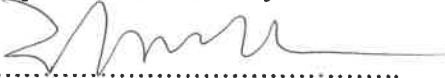
Po Gong


(Supervised by Professor You-Jin Jeon)

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

This thesis has been examined and approved by,

  
.....  
Thesis director, Young-Sang Kim (PhD), Research Professor of Marine Life Science,  
Jeju National University

  
.....  
BoMi Ryu (PhD), Research Professor of Marine Life Science, Jeju National University

  
.....  
You-Jin Jeon (PhD), Professor of Marine Life Science, Jeju National University

2021. 08

Department of Marine Life Sciences

GRADUATESCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

<b>Abstract</b> .....	iv
<b>그림 목차</b> .....	vi
<b>표 목차</b> .....	ix
<b>약어 목차</b> .....	x
<b>국문 초록</b> .....	1
<b>1. 서론</b> .....	4
<b>2. 재료 및 방법</b> .....	8
2.1. 갱생이모자반 추출물 제조.....	8
2.2. 유산균과 병원성 세균 배양.....	9
2.3. 갱생이모자반 효소 추출물 5 종의 유산균 증식 활성 평가 (Colony count assay).....	10
2.4. 갱생이모자반 효소 추출물의 유산균 증식 활성 평가.....	10

2.5. 팽생이모자반 효소 추출물 5 종의 병원성 세균 증식 억제 평가.....	11
2.6. 팽생이모자반 효소 추출물의 유산균 이차대사산물 생성량 측정.....	11
2.7. 유산균 이차대사산물의 병원균 세균 증식 억제 평가.....	12
2.8. 팽생이모자반 추출물 급이를 통한 제브라피쉬 증체율 변화와 <i>S.parauberis</i> 인위 감염을 통한 항균 활성 분석 .....	12
2.9. 염증 매개 인자 단백질 발현 측정 .....	13
2.10. 통계처리 .....	13
<b>3. 결과</b> .....	18
3.1. 팽생이모자반 효소 추출물의 유산균 증식 활성 평가.....	18
3.2. 팽생이모자반 추출 방법에 따른 추출물의 유산균 증식 비교.....	18
3.3. 팽생이모자반 효소 추출물의 유산균 3 종 증식 평가 .....	24
3.4. 팽생이모자반 효소 추출물의 병원성 세균 증식 억제 결과 .....	28
3.5. 팽생이모자반 효소 추출물 첨가로 인한 유산균 이차대사산물 생성량 측정 .....	32

3.6. 유산균 이차대사산물의 병원성 세균에 대한 증식 억제 효과 평가 .....	34
3.7. 팽생이모자반 효소 추출물의 유산균의 사료 첨가에 따른 제브라피쉬 체중 변화 결과 .....	38
3.8. 팽생이모자반 효소 추출물과 유산균의 사료 첨가에 따른 제브라피쉬의 병원성 세균 <i>S. parauberis</i> 인위감염 결과 .....	40
<b>4. 고찰</b> .....	<b>44</b>
<b>참고문헌</b> .....	<b>49</b>

## Abstract

Seaweeds are plants that inhabitant in the sea and produce unique natural compounds according to the sea environment where they live. Their compounds have potential biological activity on human. For example, *Ecklonia cava* extract has activity such as inhibition of adipocyte synthesis, pain relief, anti-inflammation, excretion of heavy metals and protection from radioactive substances. Lactobacillus species grows in the intestine, an acid environment while enhancing immunity and biological circulation, and has effect of suppressing various disease such as inflammation bowel disease. The extract of *Sargassum horneri* shows various physiological activities such as antioxidant, anti-inflammation, anti-coagulant, anti-cancer and skin whitening and wrinkle improvement. Probiotics is bacteria that have various advantages on human health and prebiotics are ingredients which help the growth of these probiotics and are indigestible substances that affect the improvement of the intestinal environment. In this study, we investigated that assessment prebiotic effect of *Sargassum horneri* enzyme-assisted extract on Lactic acids bacteria and pathogen bacteria. On the growth of Lactic acid bacteria, *S. horneri* celluclast extract has stimulation effect concentration at 10 mg/ml on *L. plantarum* and *L. pentosus*. *S. horneri* termamyl extract has best effect on the growth of *L. brevis*. In the evaluation of Lactic acid bacteria secondary metabolite production, we measure weight of secondary metabolite at presence or absence of SHC. Secondary metabolite was obtained from *L. plantarum* 868.7g, *L. pentosus* 736.07g, *L. brevis* 572.0 g. Compared with MRS only media, SHC could enhance secondary metabolite production 1.8 ~ 2.1 fold. These

secondary metabolite was used to evaluation of inhibition effect on the growth of pathogen bacteria. Celluclast extract of *S. horneri* producing secondary metabolite has more effective in inhibiting the growth of pathogen bacteria compared with MRS only media producing secondary metabolite. First, secondary metabolite from *L. plantarum* has inhibition effect on the growth of *S. parauberis* 10%, *S. iniae* 9%, *E. tarda* 5%, respectively. For secondary metabolite from *L. pentosus*, it shows inhibition effect on the growth of *S. parauberis* 8%, *S. iniae* 13%, *E. tarda* 9%, respectively. In further in vivo experiment, mixed feed with SHC 5% and LAB 1% improved the growth and mortality of *S. parauberis*-infected zebrafish as regulating the expression of inflammatory mediator, iNOS and COX2. According to the results, celluclast extract from *S. horneri* has prebiotic effect on LAB and improved mortality caused by pathogenic bacteria that occurred frequently in the aquaculture industry and also, our conclusion from this evidence is that SHC can be used and applied as a useful prebiotic or feed additives for aquaculture.



## 그림 목차

<b>Figure. 1</b> Experimental scheme of effect of secondary metabolites of <i>L. plantarum</i> and <i>L. pentosus</i> on pathogen bacterial growth.....	16
<b>Figure. 2</b> Experimental scheme of challenge experiment of <i>Sargassum horneri</i> celluclast-assisted extract (1, 3, 5)and Lactic acid bacteria (1%) supplemented diets. ....	17
<b>Figure. 3</b> The stimulation effect of <i>S. horneri</i> enzymatic extracts on the growth of <i>L. plantarum</i> .....	20
<b>Figure 4.</b> The stimulation effect of <i>S. horneri</i> enzymatic extracts on the growth of <i>L. pentosus</i> .....	21
<b>Figure 5.</b> The stimulation effect of <i>S. horneri</i> enzymatic extracts on the growth of <i>L. brevis</i> .....	22
<b>Figure 6.</b> The stimulation effect of <i>S. horneri</i> enzymatic extracts on the growth of lactic acid bacteria (ECC: <i>Ecklonia cava</i> celluclast extract, SHE: <i>S. horneri</i> ethanol extract, SHC: <i>S. horneri</i> celluclast extract, SHD: <i>S. horneri</i> distilled water extract) .....	23

<b>Figure 7.</b> The stimulation effect of SHC on the growth of <i>L. plantarum</i> . (SHC: <i>S. horneri</i> celluclast extract) .....	25
<b>Figure 8.</b> The stimulation effect of SHC on the growth of <i>L. pentosus</i> (SHC: <i>S. horneri</i> celluclast extract) .....	26
<b>Figure 9.</b> The stimulation effect of SHC on the growth of <i>L. brevis</i> (SHC: <i>S. horneri</i> celluclast extract) .....	27
<b>Figure 10.</b> The inhibition effect of <i>S.horneri</i> enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, <i>E. tarda</i> .....	29
<b>Figure 11.</b> The inhibition effect of <i>S.horneri</i> enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, <i>S. iniae</i> .....	30
<b>Figure 12.</b> The inhibition effect of <i>S.horneri</i> enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, <i>S. parauberis</i> .....	31
<b>Figure 13.</b> Production of secondary metabolites of lactic acid bacteria by adding SHC .....	33

<b>Figure 14.</b> Effects of secondary metabolites produced by <i>L. plantarum</i> (A) and <i>L. pentosus</i> (B) on <i>S. parauberis</i> growth .....	35
<b>Figure 15.</b> Effects of secondary metabolites produced by <i>L. plantarum</i> (A) and <i>L. pentosus</i> (B) on <i>S. iniae</i> growth.....	36
<b>Figure 16.</b> Effects of secondary metabolites produced by <i>L. plantarum</i> (A) and <i>L. pentosus</i> (B) on <i>E. tarda</i> growth .....	37
<b>Figure 17.</b> Results of zebrafish weight change according to feed addition of <i>Sargassum horneri</i> extracts and $\pm$ LAB .....	39
<b>Figure 18.</b> Changes in mortality rate of zebrafish infected with <i>S. parauberis</i> by addition of <i>Sargassum horneri</i> extract single feed .....	41
<b>Figure 19.</b> Changes in mortality rate of zebrafish infected with <i>S. parauberis</i> by addition of <i>Sargassum Horneri</i> extract mixed feed.....	42
<b>Figure 20.</b> The effect of <i>Sargassum honeri</i> extracts on the expression of iNOS and COX-2 in <i>S. parauberis</i> infected zebrafish. (A) The mixed-feeding with SHC and LAB (A), and SHC only feeding group(B) .....	43

## 표 목차

<b>Table 1.</b> List of Lactic acid bacteria and pathogen bacteria species .....	15
--	----

## 약어 목차

LAB	Lactic acid bacteria
SHC	<i>Sargassum horneri</i> celluclast-assisted extract
SHE	<i>Sargassum horneri</i> ethanol extract
SHD	<i>Sargassum horneri</i> distilled water extract
ECC	<i>Ecklonia cava</i> celluclast extract
IP	Intraperitoneal
PBS	Phosphate buffered saline

## 국문 초록

해조류는 바다에 서식하는 식물체로서 서식하는 바다 환경에 맞춰 특이한 천연 화합물을 생성한다. 여기서 나온 화합물들은 생리활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 예를 들어 감태의 지방세포 합성 저해, 진통 완화, 염증 개선과 지충이의 중금속 및 방사능 물질 체외 배출, 비만 및 변비 방지 등의 효과가 있으며, 큰열매모자반의 관절염, 간 보호, 혈청지질개선 등의 효과가 있다. 유산균은 산성 환경인 장에 생육 하면서 면역 및 생체 순환 기능을 증가 시키며, 염증성장질환 등 다양한 질병을 억제하는 효과가 있다. 갱생이모자반 추출물은 항산화, 항염증, 항혈액응고, 항암, 미백, 주름개선 등 다양한 생리활성을 보인다. Probiotics 는 다양한 장점을 갖고 인체에 도움을 주는 세균을 말하며, prebiotics 는 이러한 probiotics 의 성장을 돕는 영양분이며 장 내 환경 개선에 영향을 주는 난소화성 물질이다. 갱생이모자반 효소 추출물의 prebiotics 효과와 병원성 세균의 성장 저해 효과가 있는지 알아보기 위해 실험을 하였다. 갱생이모자반 효소 추출물을 이용한 유산균 활성 평가는 celluclast 추출물 10 mg/ml 이 *L. pentosus*, *L. plantarum* 의 증식에 가장 좋은 효과가 있었으며, termamyl 10 mg/ml 은 *L. brevis* 의 성장에 가장 좋은 효과가 있었다. celluclast 효소

추출물의 농도 별 유산균 활성 평가에서는 10 mg/ml이 3 종 유산균 모두에서 성장에 가장 좋은 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 유산균 이차대사물질 생성 평가에서는 celluclast 추출물을 첨가한 실험구에서 *L. pentosus* 868.70g, *L. plantarum* 736.07g, *L. brevis* 572.0g 의 이차대사산물이 생성되어 MRS 배지만 사용한 실험구 (*L. pentosus* 402.03g, *L. plantarum* 351.83g, *L. brevis* 303.45g)보다 1.8 ~ 2.1 배 많은 이차대사산물 생성량을 확인 할 수 있었다. 이렇게 생성된 이차대사산물의 병원성 세균 증식 억제 평가에서는 celluclast 추출물을 첨가한 MRS 배지에서 생성된 유산균의 이차대사산물이 celluclast 추출물을 첨가하지 않고 오직 MRS 배지에서만 생산된 이차대사산물 보다 병원성 세균 증식 억제에 좋은 효과를 보였다. 먼저 *L. plantarum* 이차대사산물에서는 *S. parauberis* 10%, *S. iniae* 9%, *E. tarda* 5%의 증식 억제 효과 차이가 있었고, *L. pentosus* 이차대사산물에서는 *S. parauberis* 8%, *S. iniae* 13 %, *E. tarda* 9 %의 증식 억제 효과 차이를 보였다. 제브라피쉬를 이용한 추출물 급이 실험에서는 유산균 1%와 다당체 추출물 1%를 혼합하여 급이 한 실험구에서 124.52%의 증체율로 가장 좋은 결과를 얻었고, *S. parauberis* 로 인위 감염을 시킨 병원성 세균 접종실험에서는 celluclast 추출물 5% 급이 한 실험구와 celluclast 추출물 3%와 유산균 1%를 혼합급이 한 실험구에서 5% 미만의 폐사율로 가장 좋은 병원성 세균

억제 효과를 확인할 수 있었다. 이번 평가를 통해 제주도에 대량으로 유입되어 대부분 폐기처분 되는 광생이모자반이 효소 추출을 통해 유산균의 활성을 돕는 prebiotics 뿐만 아니라 양식산업에서 빈번하게 발생하는 병원성 세균에 의한 폐사 억제 효능을 확인하면서 사료 첨가제로서의 활용 가능성이 있음을 확인하였다.



## 1. 서론

유산균 (Lactic acid bacteria)은 Gram양성의 통성혐기성세균으로 포도당에 대하여 약 50% 이상의 lactic acid를 대사산물로 생성하지만 사람과 동물에게 해로운 indole, skatole, phenol, amine, ammonia 등은 생성하지 않은 세균이다 (박용하, 장영호 et al. 1999). 유산균은 300~400여 종류로 알려져 있고 그중 20~30여 종류가 산업에 이용되고 있으며 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*으로 크게 6그룹으로 구분할 수 있다 (Baek 2008). 유산균은 대부분의 인간과 동물 장내에 존재하며, 유당 불내증 완화, 소화성 궤양 억제, 면역계 자극, 항 알레르기 효과, 식품 보존, 결장 예방 등 다양한 유익한 효과를 지닌다 (Masood, Qadir et al. 2011). 또한 김치, 젓갈, 막걸리, 발효유, 치즈, 사우어크라우트 등의 발효식품은 오래전부터 인류가 유산균을 활용한 좋은 예다 (Kang 2013).

Probiotic이라는 용어는 1965년 Lilly와 Stillwell이 처음으로 사용하였으며, 다른 유기체의 성장을 자극하는 한 유기체에서 분비되는 물질을 뜻한다 (Gupta and Garg 2009). 이러한 물질을 생성하며, 장내 다양한 유익한 미생물의 구성과 균형을 개선하기 위한, 살아있는 비병원성 미생물이 probiotics이다 (Isolauri, Salminen et al. 2004). 대표적으로 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium* 등의 젖산균과 *Sacharomyces boulardii* 효모가 있다 (Williams 2010). Prebiotics는 유익한 장내 세균에 선택적으로 대사되는 물질이다. 대사를 통해 생성된 acetate, butyrate 및

propionate 등과 같은 단쇄지방산(short chain fatty acids; SCFA)에 의해 장내 pH 감소 (Campbell, Fahey Jr et al. 1997), 염증인자 생성 억제(Delzenne 2003, Tedelind, Westberg et al. 2007) 등의 효과가 있다. 그리고 prebiotics에 의해 장내 미생물이 영양 공급을 받고, Lactobacillus 와 Bifidobacterium 등의 유산균 증식과 활성을 자극하여 장내 미생물의 구성을 변화 시키고 질병을 유발하는 병원성 박테리아에 대한 내성을 강화하여 대장염 감소 (Gibson 1999) 그리고 장벽 상피세포 기능개선 및 장벽 강화를 통해 장내 염증을 감소 시키며 (Madsen 2001, Lindsay, Whelan et al. 2006), 혈액 암모니아를 낮추며 면역 반응의 자극을 증가시키고 암 위험을 줄일 수 있다 (Manning, Gibson et al. 2004). Prebiotic 올리고당의 말단 당은 병원성 박테리아의 수용체를 방해하여 장 상피에 감염되는 것을 억제하여 장내 발생하는 염증을 억제한다 (Zopf and Roth 1996, Forchielli and Walker 2005).

전세계적으로 어류 양식 산업이 발달하면서 병원체, 숙주 및 환경의 상호 작용으로 어류 세균성 질병의 출현과 발달이 시작 되었다 (Toranzo, Magariños et al. 2005). 어류에 감염되어 질병을 일으키는 대부분의 세균은 기회감염체로 어류가 저 산소, 급격한 pH 변화, 고밀도 양식 등의 비정상적인 환경 스트레스에 노출되거나, 면역 기능이 저하되면 발생한다 (Derome, Gauthier et al. 2016). 세균성 질병 중 *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* 는 양식 어류에 발생하여 폐사를 유발하는 주요 세균이다 (Heo, Jung et al. 2002, Cho, Kim et al. 2007).

해양에 서식하는 식물성 조류에는 단세포성 미세 조류인 식물성플랑크톤과 녹조류, 홍조

류, 갈조류로 불리는 다세포성 거대 조류를 통상 해조류라 총칭한다. 국내에서 생육하는 해조류는 750여종 이상이며 약 70%인 520종이 제주 연안에 생육하고 있다 (이용필 2004). 인간이 주로 이용하는 해조류는 약 500여종인데 산업적으로 중요한 해조류는 김, 미역, 우뚝가사리, 다시마, 개우무, 꼬시래기 등이 있고 (Hwang, PARK et al. 1996), 국내 대량 양식되는 해조류에는 김, 미역, 톳, 다시마, 파래 등이 있다 (Baek 2007). 해조류의 주요 기능적 특성으로는 바다 생태계의 부영양화 감소 및 산소의 공급 기능, 이산화탄소 흡수원, 수산자원의 산란 및 성육장, 그리고 해조류 자원은 지속적으로 이용 할 수 있다는 점이다.

모자반과 모자반속에 속하는 갯생이모자반 (*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh 1820)은 암초의 바다 밑에서 자라는 여러해살이 갈조류이다. 길이는 3 ~ 5 m이며, 헛뿌리는 쟁반 모양이고 중심에서 원기둥 모양의 줄기가 나오고 곁가지를 친다. 부착기는 수지상의 반상, 줄기는 다소 편압된 원주상이다. 잎은 장피침형 또는 선형이고, 길이 5 ~ 10 cm, 곁각이 중륵부까지 깊게 파인다. 기낭은 구형 또는 방추형이고, 길이 4 ~ 6 mm, 직경 2 ~ 3 mm이며, 잎 모양과 같은 관엽을 갖는다. 전국 연안의 조간대 및 조하대 상부에 서식한다. 연중 생육하며, 4 ~ 8 월에 성숙한다. 한국, 중국, 대만, 홍콩, 일본, 베트남에 주로 분포한다. 2015 년부터 우리나라 신안과 제주도에 갯생이모자반이 대량으로 유입되기 시작했다 (Hwang et al. 2016). 갯생이모자반 대량 유입으로 지역 어업인의 어선 및 양식 등 어업 활동에 막대한 피해를 주었다. 또한 가두리양식장 등 해상 시설물 고장 및 파손 등을 유발하였고, 연안으로 떠밀려온 갯생

이모자반은 자연경관을 훼손시키고 부패하여 악취를 풍기는 등의 문제도 발생하고 있다. 이런 갯생이모자반 유입을 예측, 방지 및 유입된 갯생이모자반 제거에는 많은 어려움이 있다 (김지희, 김광석 et al. 2019). 현재는 어업 전반에 피해를 주고 있는 갯생이모자반을 활용하기 위한 다양한 연구가 이뤄지고 있으며, 항균, 면역, 항산화, 미백, 주름개선 등의 다양한 효과를 확인하였다 (Chang, Kim et al. 1997, Kim, Sung et al. 2019, Park, Thomas et al. 2020, 감다혜, 홍지우 et al. 2020). 또한 갯생이모자반 바이오 폴리머를 이용하여 보강용 콘크리트 재료에도 사용할 수 있음을 확인하였다 (Lee, Lee et al. 2019, 현정환, 이선목 et al. 2019).

본 연구에서는 현재 산업적 이용 가치는 떨어지며, 쉽게 시료를 획득할 수 있는 갯생이모자반을 효소를 이용하여 추출하여, 추출물이 유산균의 활성을 돕는 prebiotics로서 기능 여부를 평가하고 병원성 세균을 억제하여 사료 첨가제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2.재료 및 방법

### 2.1. 갱생이모자반 추출물 제조

추출물 제조에 사용된 갱생이모자반은 제주 연안을 따라 수집하였으며, 표면의 염분, 모래, 기타오염물질 등의 이물질을 담수로 제거하고 45~55<sup>o</sup>C로 건조한 다음 곱게 갈아 분말로 제조하여 사용하였다. 갱생이모자반 효소 추출 제조를 위해 갱생이모자반 건조 분말 10 g을 증류수 (pH 4.5, pH 8.0) 500 mL에 넣고 혼합하여 1  $\mu$ l 또는 1  $\mu$ g의 당분해효소 (AMG, Celluclast, Ultraflo, Termamyl, Viscozyme, Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark)를 가하여 50<sup>o</sup>C 에서 100 rpm으로 설정한 진탕배양기에서 24시간 진탕 배양 후 pH를 7로 조절하여 100<sup>o</sup>C에서 10분간 중탕하여 효소를 비활성화 시켰다. 효소 비활성화 시킨 샘플을 6000 rpm으로 10분간 원심분리하고 100 mm 필터 (whatman No. 4)를 이용하여 여과하고 -80<sup>o</sup>C에서 72시간 냉동 후 동결 건조하여 각각의 효소추출물로 사용하였다.

건조 분말 상태의 갱생이모자반 10g에 10배의 70% 에탄올 또는 물을 가한 후 실온에서 24시간 동안 교반기를 이용하여 추출하였다. 이를 6000 rpm으로 10분간 원심분리하고 100 mm 필터(whatman No. 4)를 이용하여 여과하고 -80<sup>o</sup>C에서 72시간 냉동 후 동결 건조하여 70% 에

탄을 추출물과 물 추출물로 사용하였다. 각기 다른 방법으로 추출한 추출물은 실험에 사용하기 전 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter로 미세 여과한 후 실험에 사용하였다.

## 2.2. 유산균과 병원성 세균 배양

프로바이오틱 세균 3종 *L. brevis* (*Lactobacillus brevis*), *L. plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *L. pentosus* (*Lactobacillus pentosus*)과 병원성 세균인 *E. tarda* (*Edwersiella tarda*), *S. iniae* (*Streptococcus iniae*), *S. parauberis* (*Streptococcus parauberis*)는 각각 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms) 및 KCTC (Korean Collection for type culture, Daejeon, Korea)에서 구입하였다 (Table 1). 유산균 3종은 MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) 액체 배지와 와 MRS agar 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 30°C로 설정된 배양기에서 배양 하였으며, 병원성 세균 3종은 BHI (Brain Heart Infusion) 액체 배지와 BHI agar 배지 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 30°C로 설정된 배양기에서 배양 하였다.

### 2.3. 갱생이모자반 효소 추출물 5종의 유산균 증식 활성 평가(Colony count assay)

활성 평가를 위해 3종의 유산균 *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus* 를 MRS 액체 배지 10 mL 에 접종 후 갱생이모자반 효소 추출물 AMG, Celluclast, Ultra (Ultraflozyme), Visco (Viscozyme), Term (Termamyl)을 0.1, 1, 10 mg/mL 농도로 각각 첨가하여 30°C에 24 시간 배양 후 배양중인 MRS 액체 배지에서 100  $\mu$ L를 취하고 멸균 PBS (phosphate buffered saline) 900  $\mu$ L와 혼합 후 단계 희석하여 배지에 도말 후 30°C에 24 시간 배양하여 세균 집락수를 측정 하였다.

### 2.4. 갱생이모자반 효소 추출물의 유산균 증식 활성 평가

갱생이모자반 효소 추출물 SHC (*Sargassum horneri* Celluclast-assisted extract)의 유산균 증식 활성 평가를 위해 3종의 유산균 *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus*를 MRS 액체 배지 10mL에 접종 후 SHC와 SHC.Ps를 0.01, 0.1, 1, 10 mg/mL 농도로 각각 첨가하여 30°C에 24시간 배양 후 배양중인 MRS 액체 배지에서 100 $\mu$ L를 취하고 멸균 PBS 900 $\mu$ L와 혼합 후 단계 희석하여 배지에 도말 후 30°C에 24시간 배양하여 세균 집락수를 측정 하였다.

## 2.5. 갱생이모자반 효소 추출물 5종의 병원성 세균 증식 억제 평가

갱생이모자반 효소 추출물 5종의 병원성 세균 증식 억제 평가를 위해 3종의 병원성 세균 *E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis* 를 BHI 액체 배지 10 mL 에 접종 후 갱생이모자반 효소 추출물 AMG, Celluclast, Ultra (Ultraflozyme), Visco (Viscozyme), Term (Termamyl)을 0.1, 1, 10 mg/mL 농도로 각각 첨가하여 30°C에 24 시간 배양 후 배양중인 BHI 액체 배지에서 100  $\mu$ L를 취하고 멸균 PBS 900  $\mu$ L와 혼합 후 단계 희석하여 배지에 도말 후 30°C에 24 시간 배양하여 세균 집락수를 측정 하였다.

## 2.6. 갱생이모자반 효소 추출물의 유산균 이차대사산물 생성량 측정

SHC와 SHC.Ps의 유산균 이차대사산물 생성 평가를 위해 MRS 액체배지 10 mL에 유산균 3종 *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus*을 각각 접종하고, 10 mg/mL 농도의 SHC와 SHC.Ps를 각각 100  $\mu$ L를 유산균이 접종된 MRS 액체 배지에 가하여 30°C에 24시간 배양하였다. 배양 후 10,000rpm으로 30분간 원심분리 하여 0.45  $\mu$ m 필터 (Woongki science, china)를 사용하여 상층액을 여과 후 동결건조 하여 이차대사산물 생성량을 측정 하였다..



## 2.7. 유산균 이차대사산물의 병원균 세균 증식 억제 평가

먼저 BHI 액체배지 10 mL에 병원성 세균 3종 *E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis*을 각각 접종하였다. 그리고 SHC를 첨가한 MRS 배지와 첨가하지 않은 MRS 배지에 각각 유산균 2종 (*L. plantarum*, *L. pentosus*)을 접종하여 생성한 이차대사산물을 각각 10 mg/mL의 농도로 병원성 세균 3종이 접종된 BHI 액체배지에 가하였다. 30°C에 24시간 배양하여 100 $\mu$ L를 취하고 멸균 PBS 900 $\mu$ L 혼합 후 단계 희석하여 배지에 도말 후 30°C에 24시간 배양하여 세균 집락수를 측정 하였다 (Figure. 1).

## 2.8. 팽생이모자반 추출물 급이를 통한 제브라피쉬 증체율 변화와 *S. parauberis* 인위 감염을 통한 항균 활성 분석

실험에 사용한 제브라피쉬 (*Danio rerio*, wild type)는 제주 월드피쉬수족관 (Jeju, Korea)에서 구입 하였고, 30마리를 한 그룹으로 총 11그룹으로 나눠 2주간 순치 사육을 거친 후 SHC, *L. plantarum*을 5주간 단독과 혼합 급이 하였다. 매주마다 중량 측정을 하였으며, 급이 3주차에 추출물의 항균 활성을 확인하기 위해  $1 \times 10^7$  CFU 농도의 *S. parauberis*를 제브라피쉬의 복강내 주사 (Intraperitoneal, ip)를 통해 인위 감염 시킨 후 각 실험구별 폐사율을 확인 하였다 (Figure. 2).

## 2.9. 염증 매개 인자 단백질 발현 측정

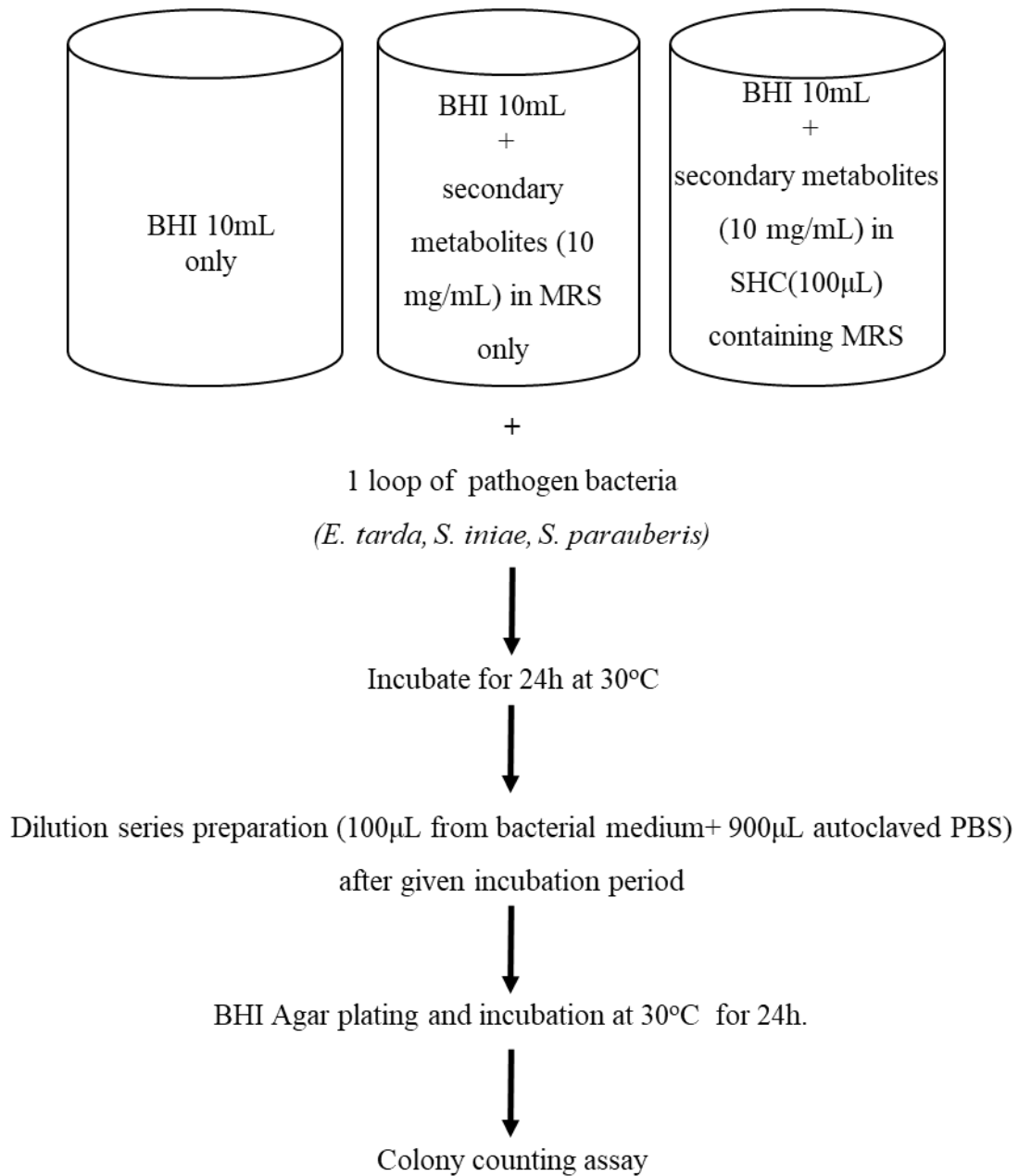
단백질 발현 측정을 위한 방법으로 Wang 등의 실험방법을 참고하여 진행하였다 (Mahmood and Yang 2012, Wang 2019). 3 주간 급이 한 제브라피쉬에  $1 \times 10^7$  cfu 의 *S. parauberis* 를 복강내 접종을 통해 인위 감염 시킨 후 48 시간 뒤 근육조직을 추출하였다. 조직의 단백질을 얻기 위하여 homogenizer 를 이용하여 조직을 분쇄하고 lysis buffer[ (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 15 μg/mL aprotinin, 0 mM NaF, and 25 μg/mL leupeptin) ]로 세포 내 단백질을 용해한 후 BCA protein assay kit (ThermoFisherScientific, MA, USA)를 통해 단백질 정량 하였다. 동일한 단백질 양을 SDS-PAGE 에 loading 하여 크기에 따라 분리한 뒤 nitrocellulose membrane 으로 transfer 하여 membrane 에 염증 매개 인자인 iNOS (Santa Cruz Biotechnology USA)와 COX-2 (Santa Cruz Biotechnology USA)의 1 차 항체를 반응시킨 후 2 차 항체를 결합시켜 western blotting detection kit (ThermoFisher Scientific, MA, USA)를 사용한 chemiluminescence 방법을 통하여 단백질의 발현량을 가시화 하였고, usionCapt Advance FX7 program (Vilber Lourmat, Australia)을 통하여 단백질의 발현량을 수치화 시켜 분석하였다.

## 2.10 통계처리

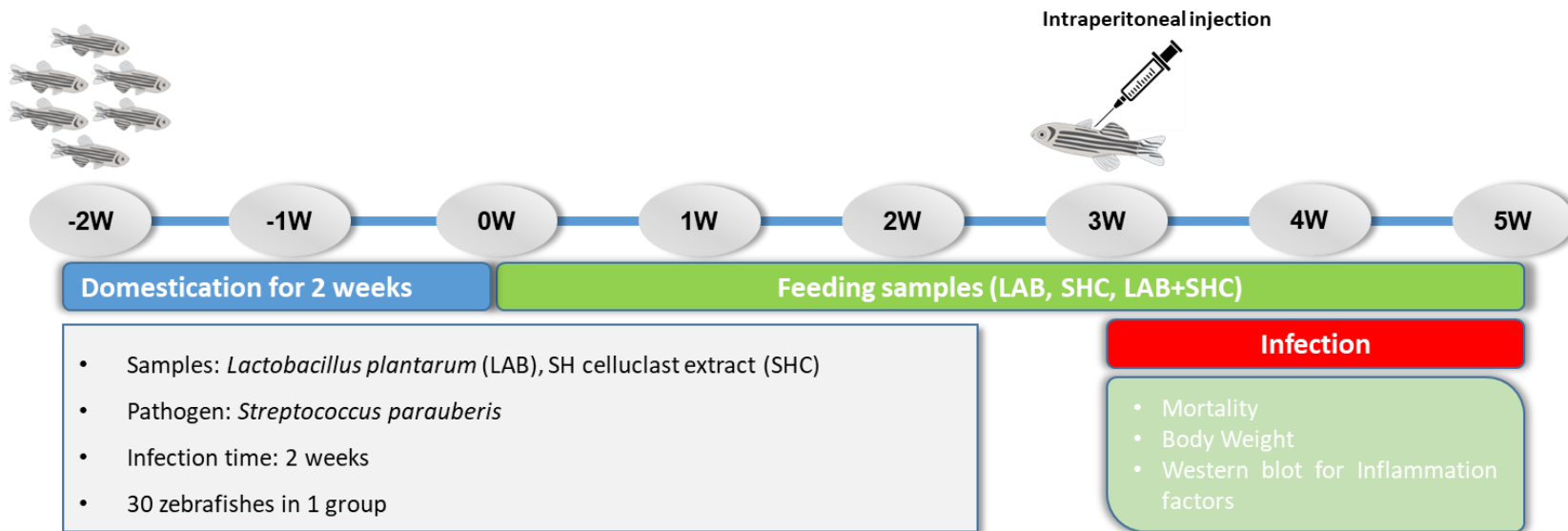
통계분석은 GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA)을 이용하여 two-way ANOVA, Dunnett's multiple range tests에 의해  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  범위에서 유의성을 검정하였다.

**Table 1. List of Lactic acid bacteria and pathogen bacteria species**

<b>Bacteria</b>	<b>Species</b>	<b>Number</b>
	<i>L. brevis</i>	KCCM 40399
<b>LAB</b>	<i>L. pentosus</i>	KCCM 40997
	<i>L. plantarum</i>	KCCM 12116
	<i>E. tarda</i>	KCTC 12267
<b>Pathogen</b>	<i>S. iniae</i>	KCTC 3657
	<i>S. parauberis</i>	KCTC 3651



**Figure. 1** Experimental scheme of effect of secondary metabolites of *L. plantarum* and *L. pentosus* on pathogen bacterial growth



**Figure. 2** Experimental scheme of challenge experiment of *Sargassum horneri* celluclast-assisted extract (1, 3, 5%) and Lactic acid bacteria (1%) supplemented diets.

### 3. 결과

#### 3.1. 갱생이모자반 효소 추출물의 유산균 증식 활성 평가

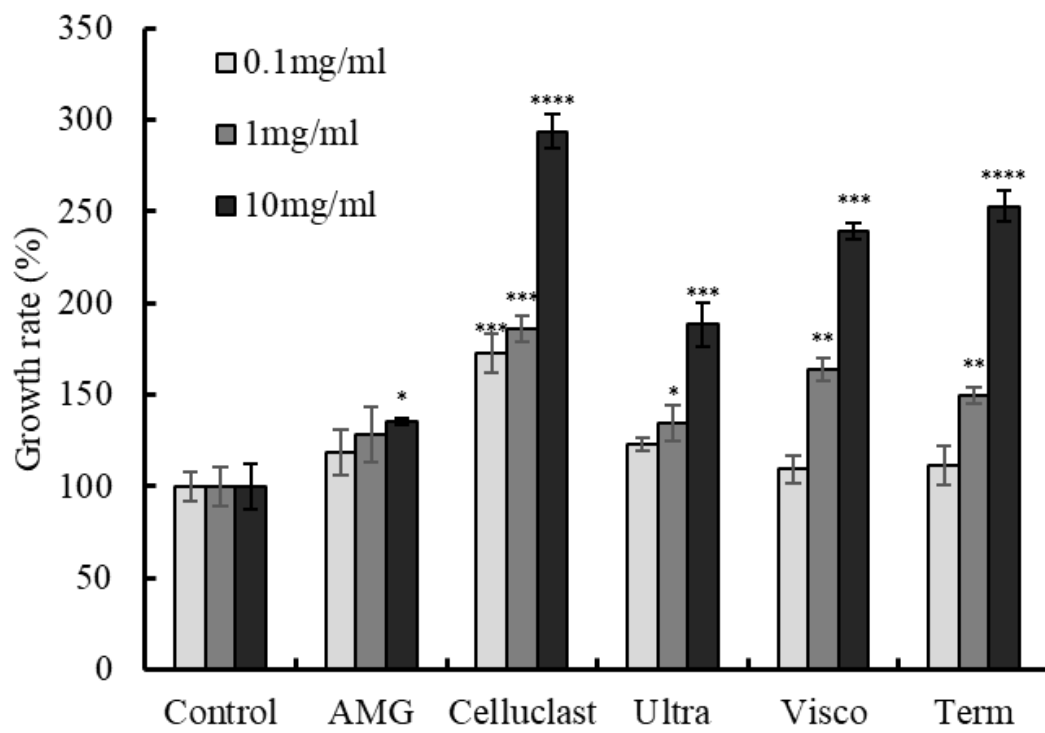
갱생이모자반을 5 종의 당 분해 효소 추출물 (AMG, Celluclast, Ultraflo, Viscozyme, Termamyl)을 이용하여 유산균 3 종 *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus* 의 증식 활성 평가를 하였다. 5 종의 효소 추출물 모두가 대조구에 비해 유산균 3 종의 증식 활성을 높여주는 효과가 있었다. Celluclast 추출물 10 mg/ml을 첨가한 실험구에서 *L. plantarum* 와 *L. pentosus* 는 293.81%, 493.53%의 증식률로 5 종의 효소 추출물 가운데 가장 좋은 증식 촉진 활성을 보였고, *L. brevis* 는 termamyl 10 mg/ml의 실험구에서 298.74%의 증식률로 5 종의 효소 추출물 가운데 가장 좋은 증식 촉진 활성 결과를 확인 하였다 (Figure. 3 - 5).

#### 3.2. 갱생이모자반 추출 방법에 따른 추출물의 유산균 증식 비교

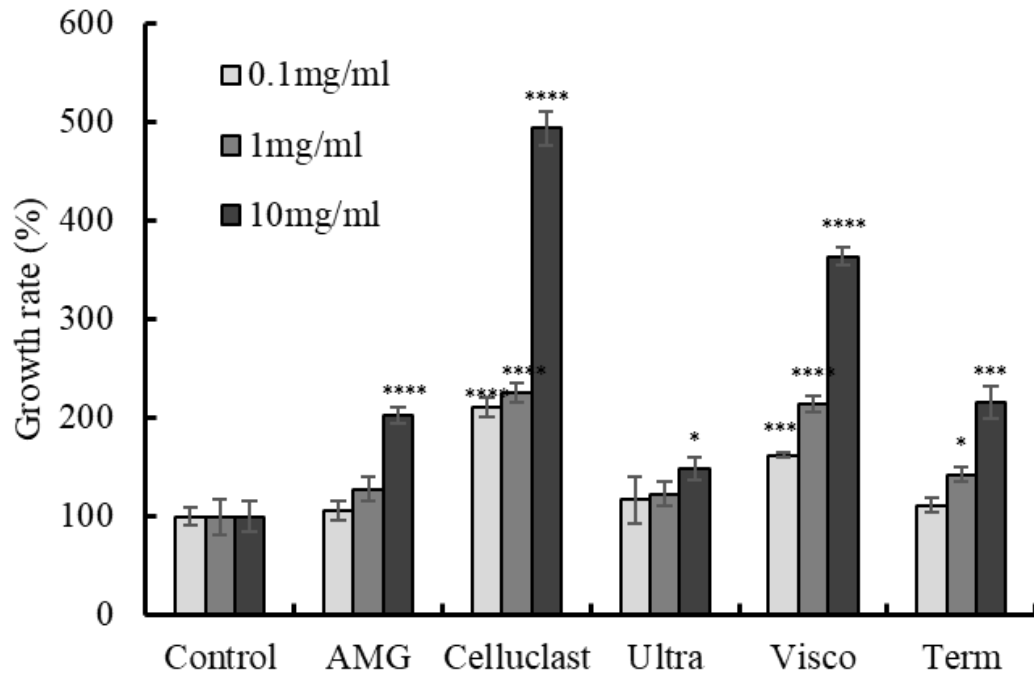
갱생이모자반 5 종의 효소 추출물 가운데 효과가 좋았던 celluclast 효소 추출물의 유산균 증식 활성 효과를 다른 추출 방법의 추출물과 비교 평가 하였다. 에탄올을 이용하여

괭생이모자반을 추출한 SHE, 물을 이용하여 괭생이모자반을 추출한 SHD 와 비교 평가하였고, 다른 해조류 추출물과 비교를 위해 선행연구 결과인 감태 celluclast 추출물 (*Ecklonia cava* celluclast-assisted extract, ECC)과 비교 분석 하였다 (LEE 2013). 괭생이모자반 추출물을 첨가한 실험구 가운데 SHC 실험구가 유산균 3 종 증식 촉진 활성에 가장 좋은 결과를 보였으며, 다른 해조류를 이용한 추출물과의 비교 결과 ECC 와 유사한 증식 촉진 활성을 나타냄을 확인하였다 (Figure. 6).

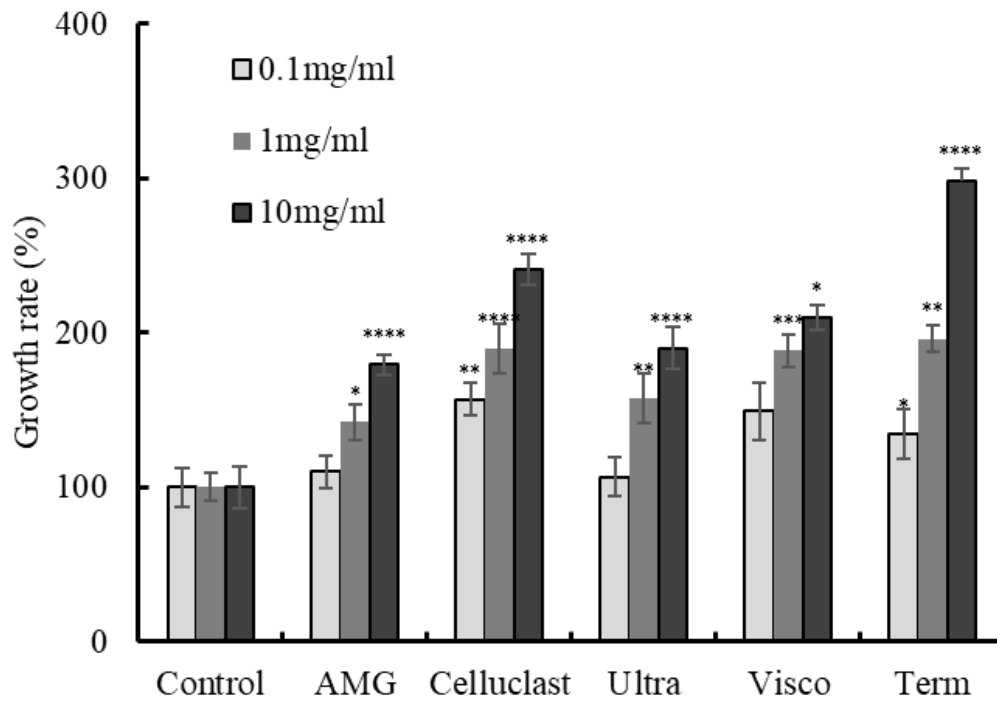




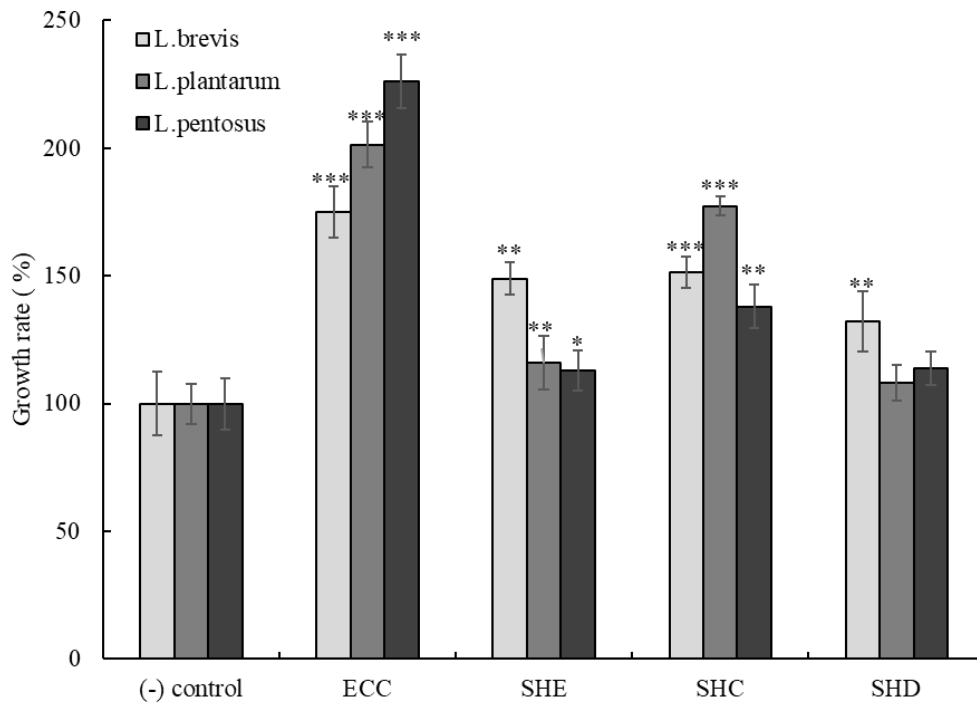
**Figure. 3** The stimulation effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of *L. plantarum*.



**Figure 4.** The stimulation effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of *L. pentosus*.



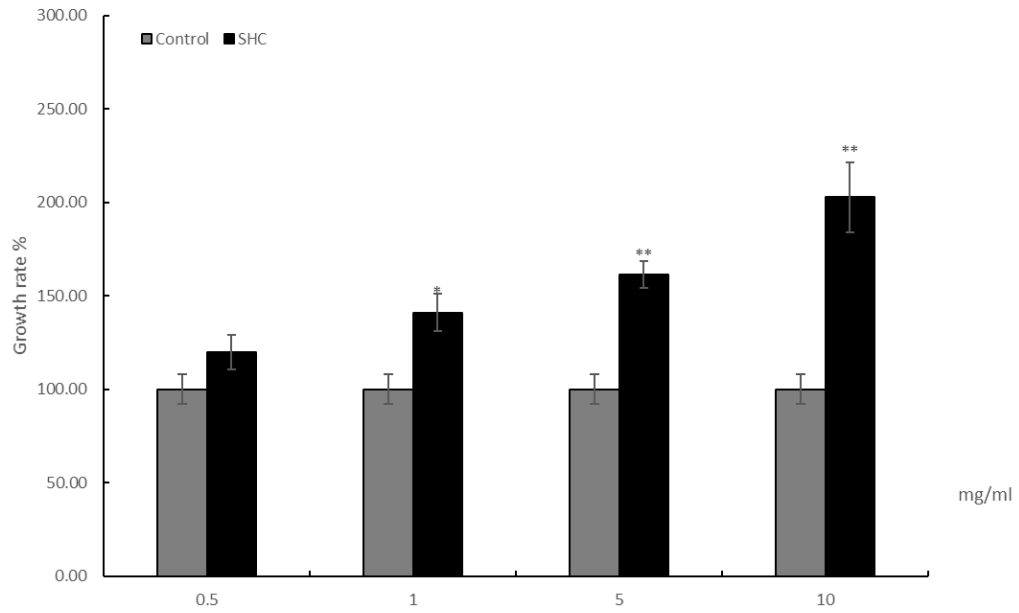
**Figure 5.** The stimulation effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of *L. brevis*.



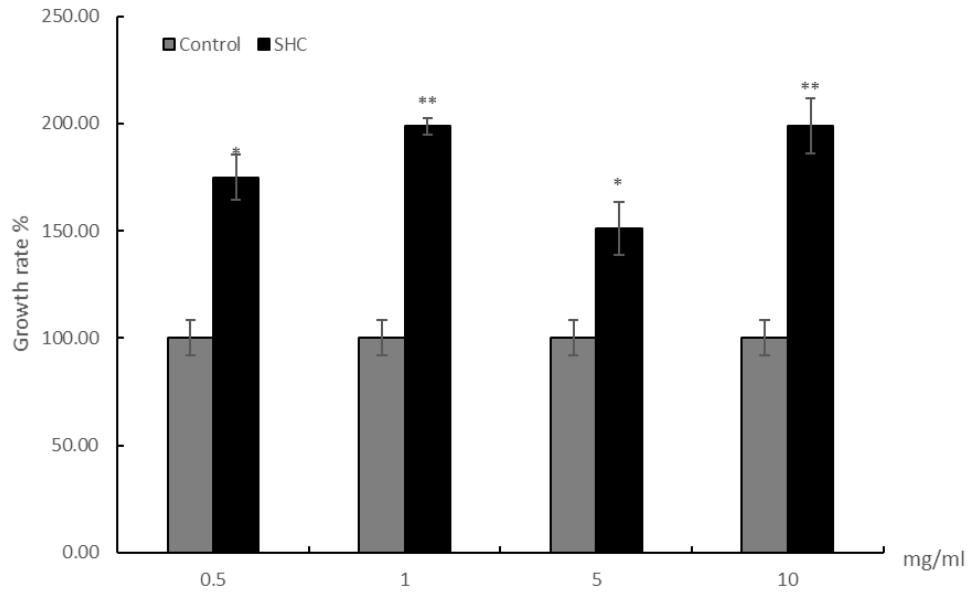
**Figure 6. The stimulation effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of lactic acid bacteria. (ECC: *Ecklonia cava* celluclast extract, SHE: *S. horneri* ethanol extract, SHC: *S. horneri* celluclast extract, SHD: *S. horneri* distilled water extract)**

### 3.3. 갯생이모자반 celluclast 효소 추출물의 유산균 3 종 증식 평가

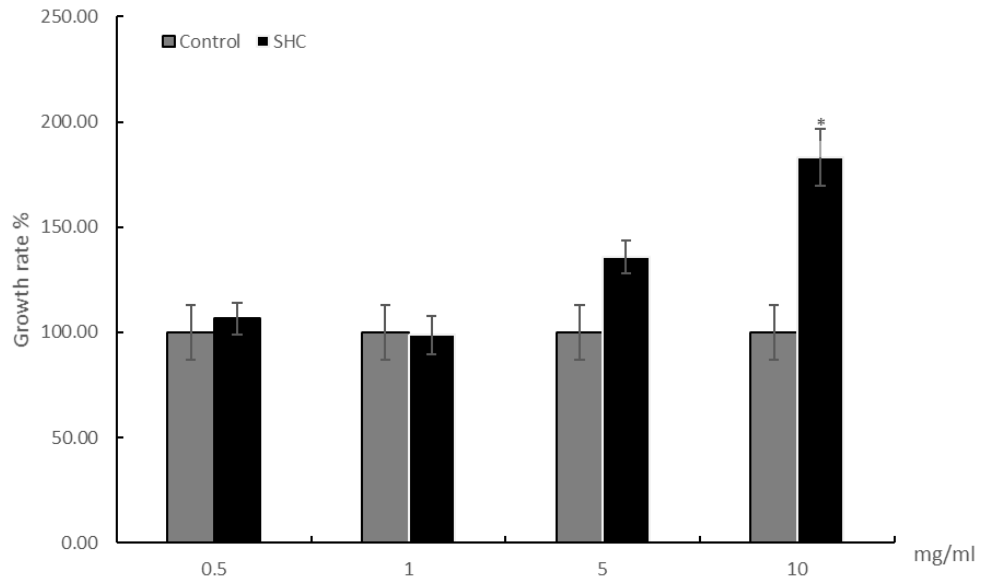
SHC 와 SHC.Ps 의 농도별 유산균 3 종 *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* 의 증식 평가를 하였고, 그 결과는 Figure. 7 - 9 에 나타냈다. 유산균 3 종 모두 SHC 10 mg/ml의 실험구에서 가장 좋은 증식 결과를 얻었다. *L. plantarum* 는 SHC 10 mg/ml의 실험구에서 대조구에 비해 202.74% 더 높은 증식율을 보였으며, *L. pentosus* 와 *L. brevis* 의 결과 역시 SCH 10 mg/ml 실험구에서 198.8%, 183.22% 으로 가장 좋은 증식 결과를 확인 하였다.



**Figure 7. The stimulation effect of SHC on the growth of *L. plantarum*. (SHC: *S. horneri* celluclast extract)**



**Figure 8.** The stimulation effect of SHC on the growth of *L. pentosus*. (SHC: *S. horneri* celluclast extract)

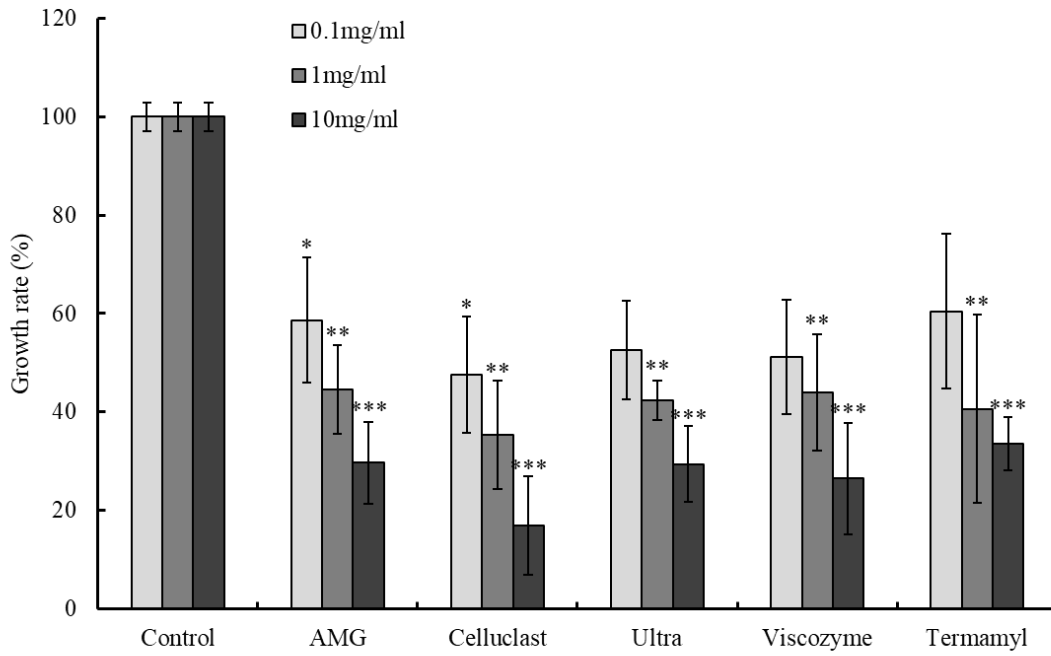


**Figure 9.** The stimulate growth effect of SHC on *L. brevis*. (SHC: *S. horneri* celluclast extract)

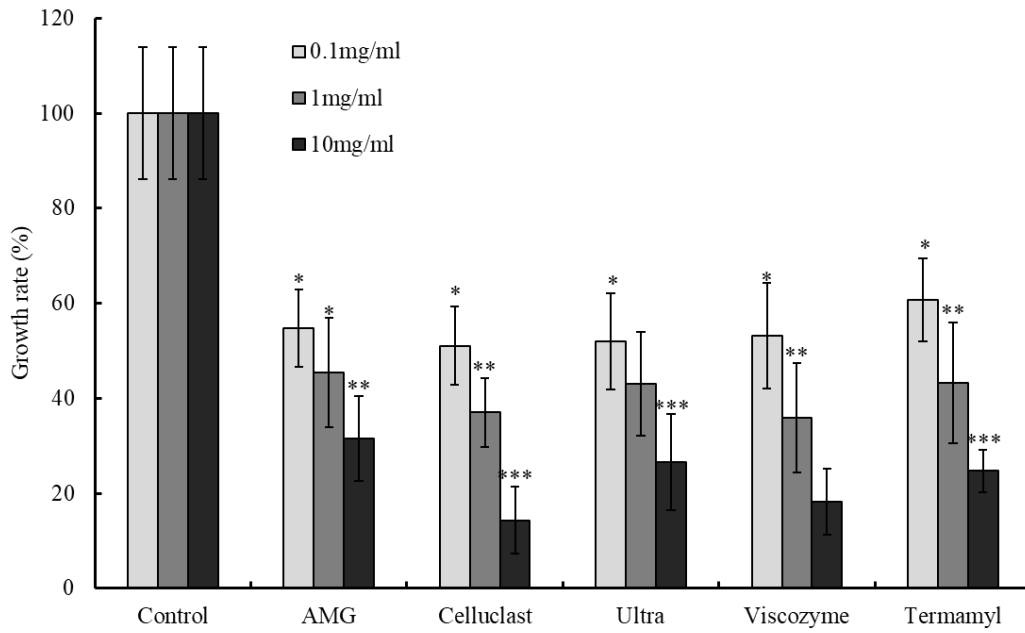


### 3.4. 갱생이모자반 효소 추출물의 병원성 세균 증식 억제 결과

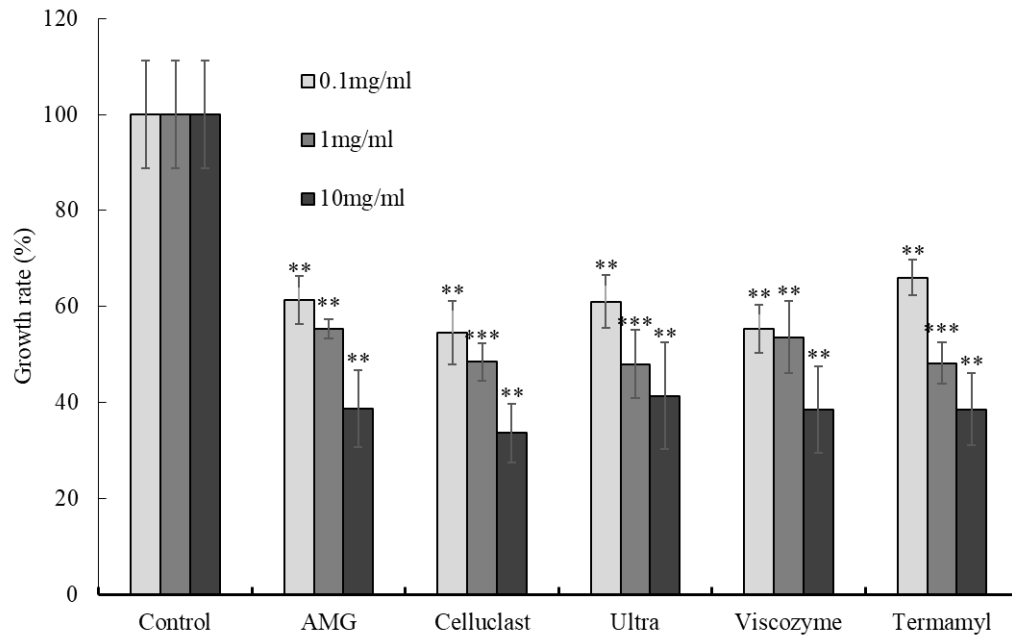
갱생이모자반 5 종류의 효소 추출물을 이용하여 병원성 세균 3 종 *E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis* 에 대한 증식 억제 평가를 하였고, 그 결과는 Figure. 10-12 에 나타냈다. 5 종의 효소 추출물 첨가를 통해 모두 대조구에 비해 모두 병원성 세균 증식 억제 효과가 있었다. 병원성 세균 3 종 모두 celluclast 효소 추출물 10 mg/ml의 실험구에서 가장 좋은 결과를 얻었는데, *E. tarda* 는 celluclast 효소 추출물 10 mg/ml 첨가로 17.01%의 증식율을, *S. iniae* 는 celluclast 효소 추출물 10 mg/ml 첨가로 14.34%의 증식율을, *S. parauberis* 는 celluclast 효소 추출물 10 mg/ml 첨가로 control 대비 33.64%의 증식율을 보였다. 갱생이모자반 celluclast 효소 추출물 첨가로 인하여 병원성 세균 3 종에 각각 82.09%, 85.66%, 66.36%의 증식 억제 효과를 확인하였다 (Figure. 10 - 12).



**Figure 10. The inhibition effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, *E. tarda*.**



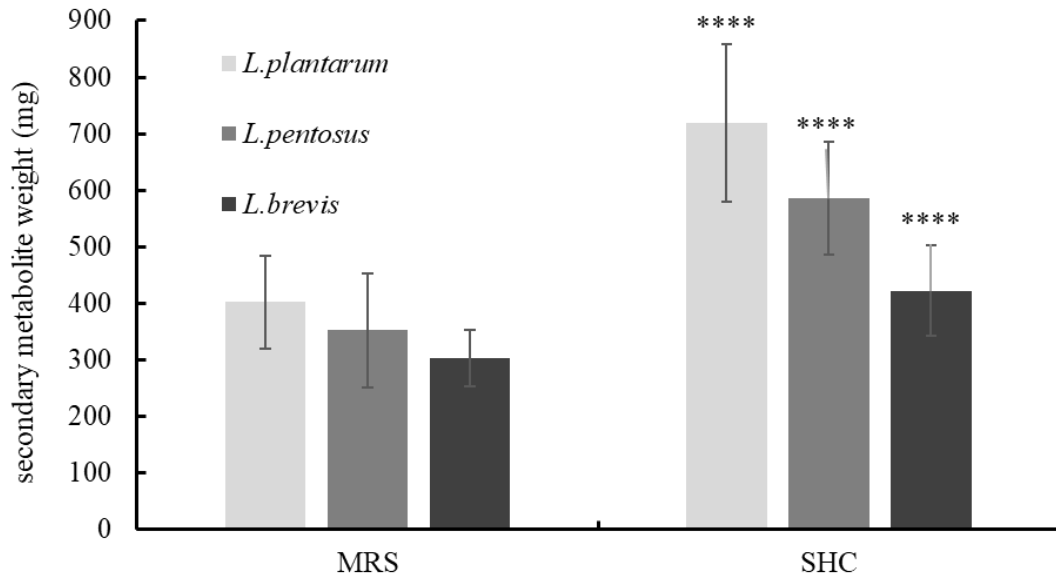
**Figure 11. The inhibition effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, *S. iniae*.**



**Figure 12.** The inhibition effect of *S. horneri* enzymatic extracts on the growth of pathogen bacteria, *S. parvauberis*.

### 3.5. 팽생이모자반 효소 추출물과 다당체 추출물 첨가로 인한 유산균 이차대사산물 생성량 측정

SHC 를 MRS 배지에 첨가하여 유산균 3 종에 의해 생성된 이차대사산물을 획득하였고 그 결과는 Figure. 13 에 나타냈다. *L. plantarum* 의 이차대사산물 생성량은 대조구에서 402.0 mg, SHC 첨가 실험구에서는 868.70 mg 결과로 SHC 첨가 실험구에서 가장 좋은 결과를 얻었고, *L. pentosus* 의 이차대사산물 생성량 또한 대조구에서 351.8 mg, SHC 첨가 실험구에서는 736.07 mg의 결과로 SHC 첨가 실험구에서 가장 좋은 결과를 얻었다. *L. brevis* 의 이차대사산물 생성량은 대조구에서 303.5 mg, SHC 첨가 실험구에서는 572.05 mg의 결과를 얻었다. 위의 결과로 미루어 보아 SHC 는 유산균의 이차대사산물 생성에 영향이 있음을 확인 하였다.

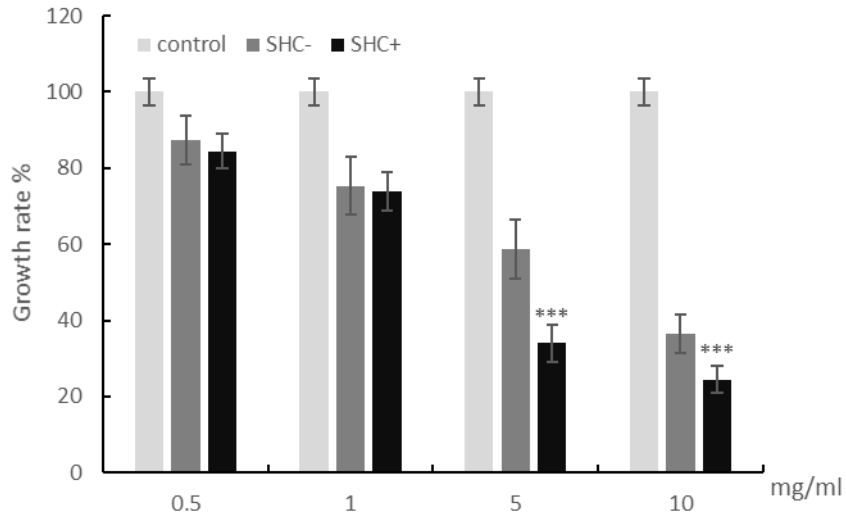


**Figure 13. Production of secondary metabolites of lactic acid bacteria by adding SHC**

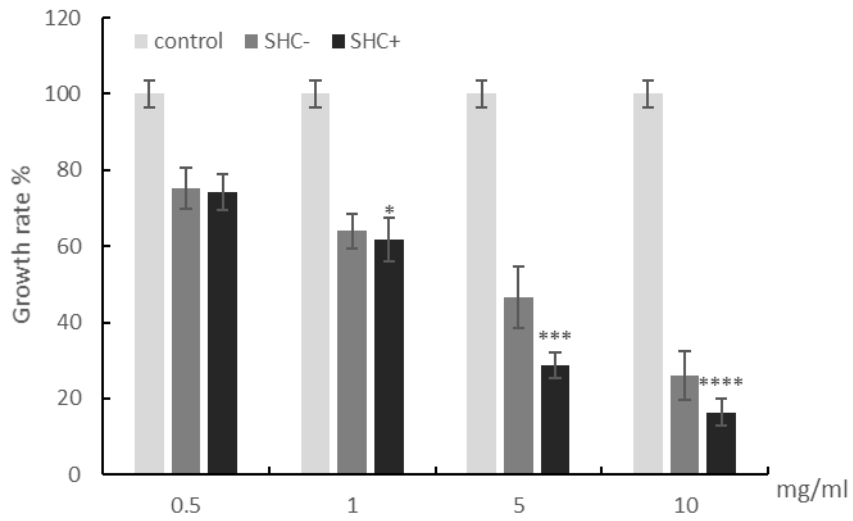
### 3.6. 유산균 이차대사산물의 병원성 세균에 대한 증식 억제 효과 평가

유산균 *L. plantarum* 과 *L. pentosus* 의 이차대사산물을 이용한 병원성 세균 3 종 *E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis* 의 증식 억제 결과는 Figure. 14-19 에 나타냈다. SHC 첨가 MRS 배지에서 생성된 유산균의 이차대사산물 SHC+ 0.5, 1, 5, 10 mg/ml와 SHC 가 첨가되지 않은 MRS 배지에서 생성된 유산균의 이차대사산물 SHC- 0.5, 1, 5, 10 mg/ml를 사용하였다. *L. plantarum* 의 이차대사산물은 *E. tarda* 에서 SHC- 10 mg/ml 29%, SHC+ 10 mg/ml 20%의 결과를, *S. iniae* 에서 SHC- 10 mg/ml 56%, SHC+ 10 mg/ml 27%의 결과를, *S. parauberis* 에서 SHC- 10 mg/ml 36 %, SHC+ 10 mg/ml 24 %의 결과를 확인하였다. *L. pentosus* 의 이차대사산물은 *E. tarda* 에서 SHC- 10 mg/ml 25 %, SHC+ 10 mg/ml 17 %의 결과를, *S. iniae* 에서 SHC- 10 mg/ml 49 %, SHC+ 10 mg/ml 27 %의 결과를, *S. parauberis* 에서 SHC- 10 mg/ml 26 %, SHC+ 10 mg/ml 16 %의 결과를 확인하였다. 유산균 이차대사산물의 병원성 세균 증식 억제 효과를 확인하였고, celluclast 효소 추출물의 첨가로 병원성 세균 증식 효과에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

(A)



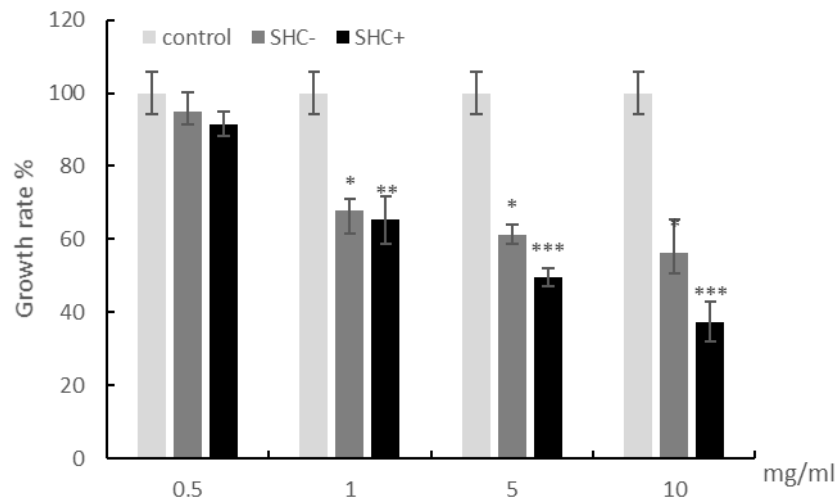
(B)



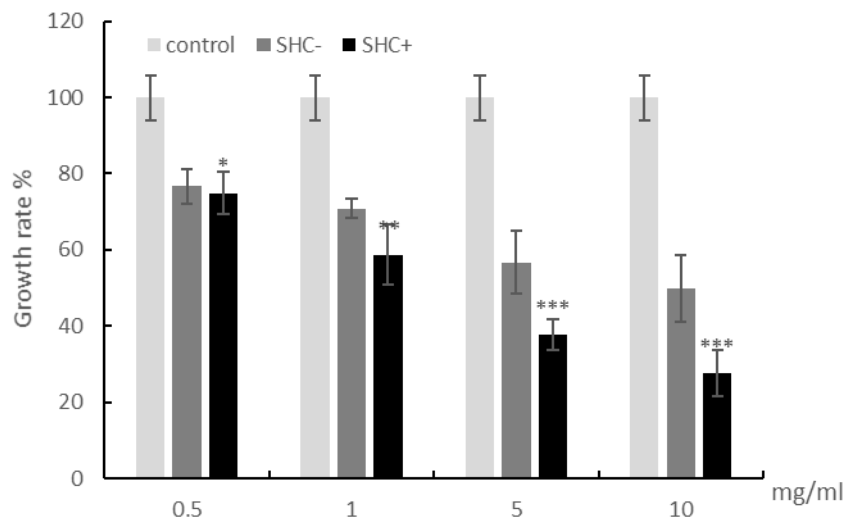
**Figure 14. Effects of secondary metabolites produced by *L. plantarum* and *L. pentosus* on *S. parauberis* growth**



(A)

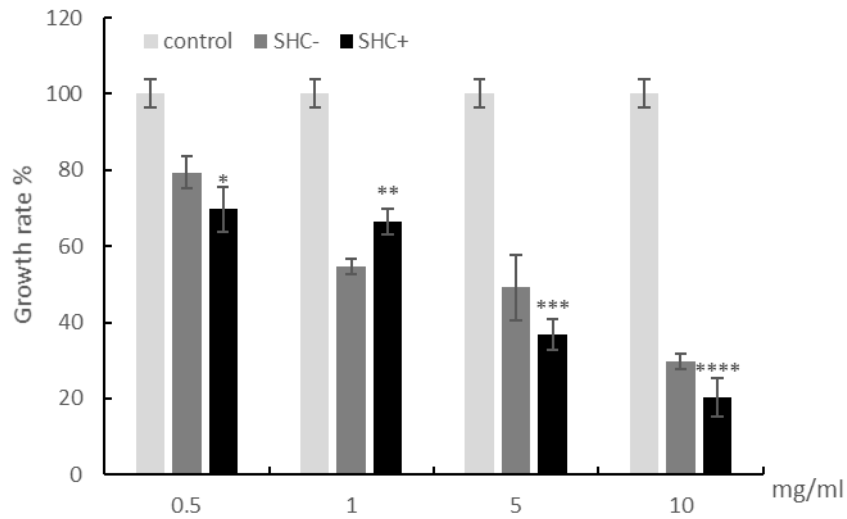


(B)

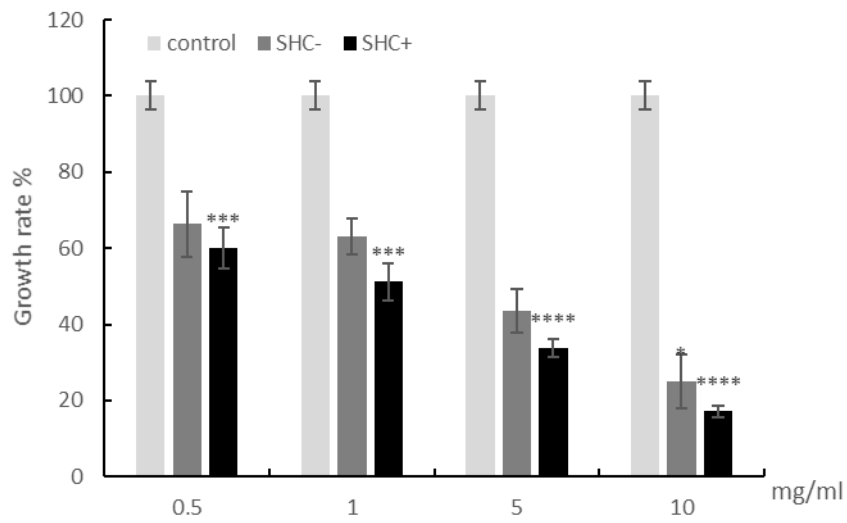


**Figure 15. Effects of secondary metabolites produced by *L. plantarum*(A) and *L. pentosus*(B) on *S. iniae* growth**

(A)



(B)

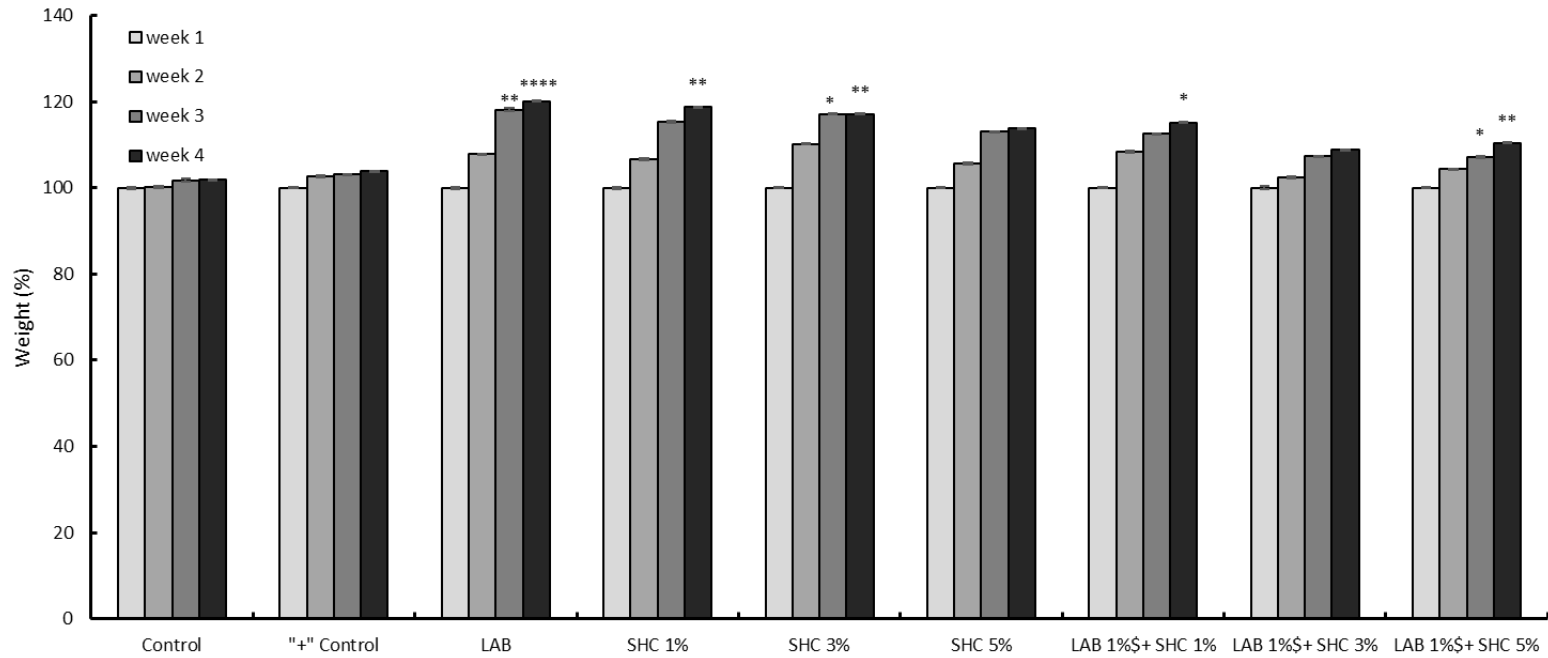


**Figure 16. Effects of secondary metabolites produced by *L. plantarum*(A) and *L. pentosus*(B) on *E. tarda* growth**

### 3.7. 팽생이모자반 효소 추출물, 다당체 추출물 과 유산균의 사료 첨가에 따른 제브라피쉬

#### 체중 변화 결과

제브라피쉬 사료에 SHC, LAB 를 단독 또는 혼합 첨가하여 0 주부터 감염 직전인 3 주차까지의 3 주간 급이 후 체중 변화의 차이를 평가 하였다. 단독 급이 한 실험구에서는 LAB 1%를 첨가하여 급이 한 실험구에서 120.13%의 증체율을 보여 가장 좋은 결과를 확인 하였다. SHC 1%를 첨가한 실험구가 118.80%로 유산균 1%를 첨가한 실험구와 유사한 증체량 결과를 얻었다. 혼합 첨가하여 급이 한 실험구에서는 LAB 1%와 SHC 1%를 혼합 첨가하여 급이 한 실험구에서 115.16%의 증체율로 가장 높은 결과를 얻었다. 단독, 혼합 급이 모든 실험구에서 가장 좋은 결과 였다. 유산균 1% 와 SHC 3%를 혼합 급이 한 실험구에서는 108.82% 증체율을 보여 가장 낮은 결과를 얻었다 (Figure. 17).



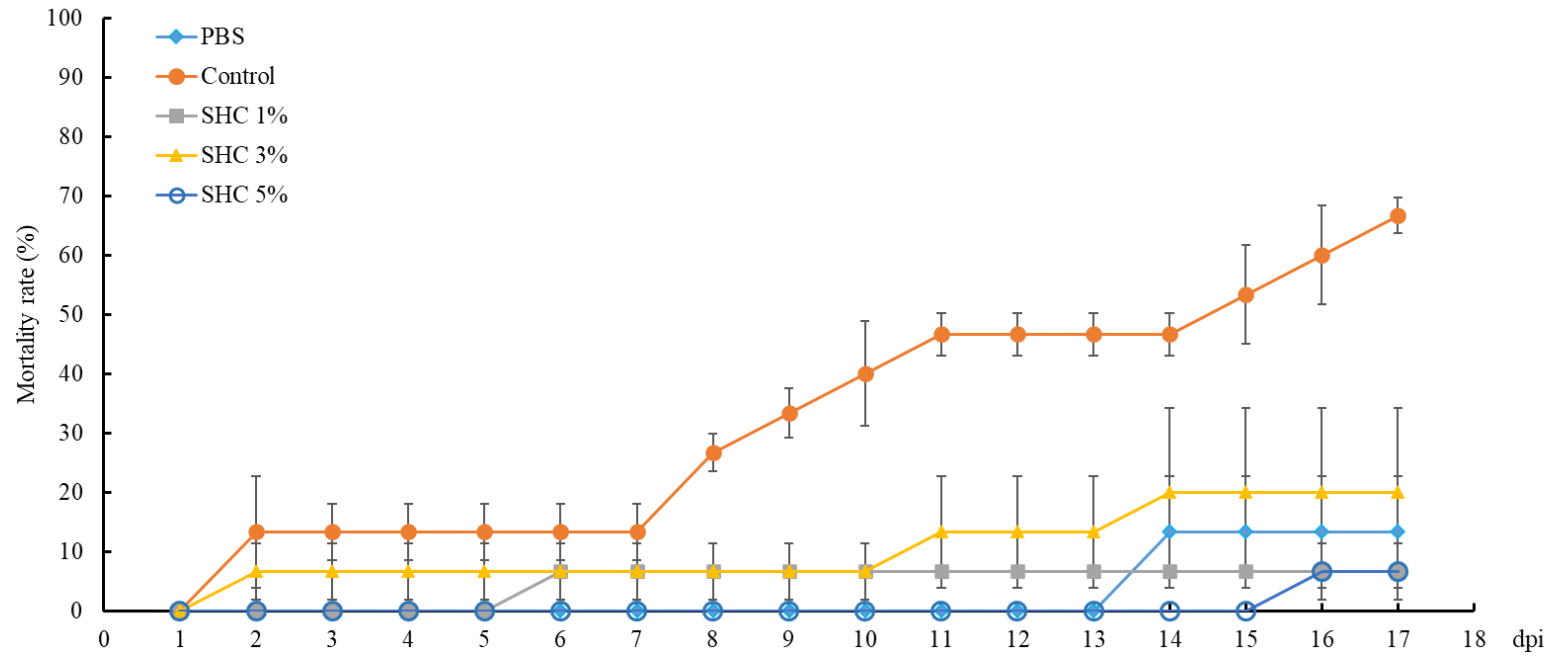
**Figure 17. Results of zebrafish weight change according to feed addition of *Sargassum horneri* extracts and  $\pm$ LAB**

### 3.8. 팽생이모자반 효소 추출물 과 유산균의 사료 첨가에 따른 제브라피쉬의 병원성 세균 *S.*

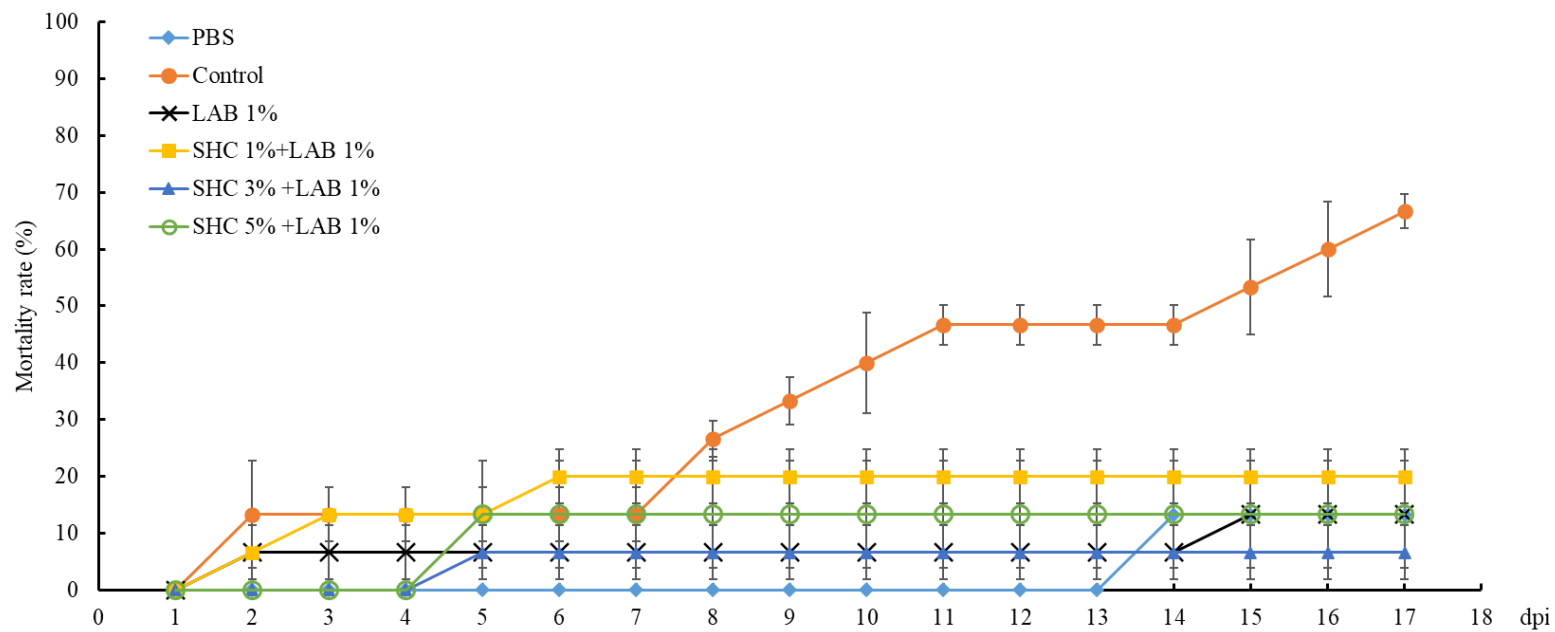
#### *parauberis* 인위감염 결과

SHC, LAB 를 단독 또는 병행 첨가하여 5 주간 급이 하면서 급이를 시작한지 3 주차때 병원성 세균 *S. parauberis* 를 복강내 접종을 통해 인위감염 시키 후 폐사율을 확인하였다. 음성 대조구는 PBS 를 같은 방법으로 복강내 접종 후 13 일까지는 폐사가 발생하지 않았다. 추출물 첨가 없이 사료만 급이 한 실험구에서는 *S. parauberis* 접종 후 2 일부터 폐사가 발생하여 최종적으로 약 70%의 폐사율을 확인하였다. 단독 처리군 중에서는 SHC 5%를 첨가한 실험구에서 가장 낮은 폐사율을 보였으며 (Figure. 18), 병행하여 첨가한 실험구에서는 SHC 3%와 LAB 1%를 병행 첨가한 실험구가 가장 낮은 폐사율을 보였다 (Figure. 19).

병원성 세균 *S. parauberis* 를 제브라피쉬 복강내 접종을 통해 인위감염 시킨 후 매개인자 COX-2 와 iNOS 발현량을 평가한 결과는 Figure. 20 과 같다. 매개인자 COX-2 발현량은 단독 처리군 중에서는 SHC 5%를 첨가한 실험구에서 가장 낮은 발현량을 보였으며, 병행 첨가하여 급이한 실험구에서 더욱 감소하는 결과를 확인하였다. iNOS 발현량 결과는 단독 처리군 중에서는 LAB 1%를 첨가한 실험구에서 가장 낮은 발현량을 보였으며, COX-2 발현량 결과와 유사하게 병행 첨가하여 급이 한 실험구에서 더욱 감소하는 결과를 확인하였다



**Figure 18. Changes in mortality rate of zebrafish infected with *S. parauberis* by addition of *Sargassum Horneri* extract single feed**



**Figure 19. Changes in mortality rate of zebrafish infected with *S. parauberis* by addition of *Sargassum Horneri* extract mixed feed**

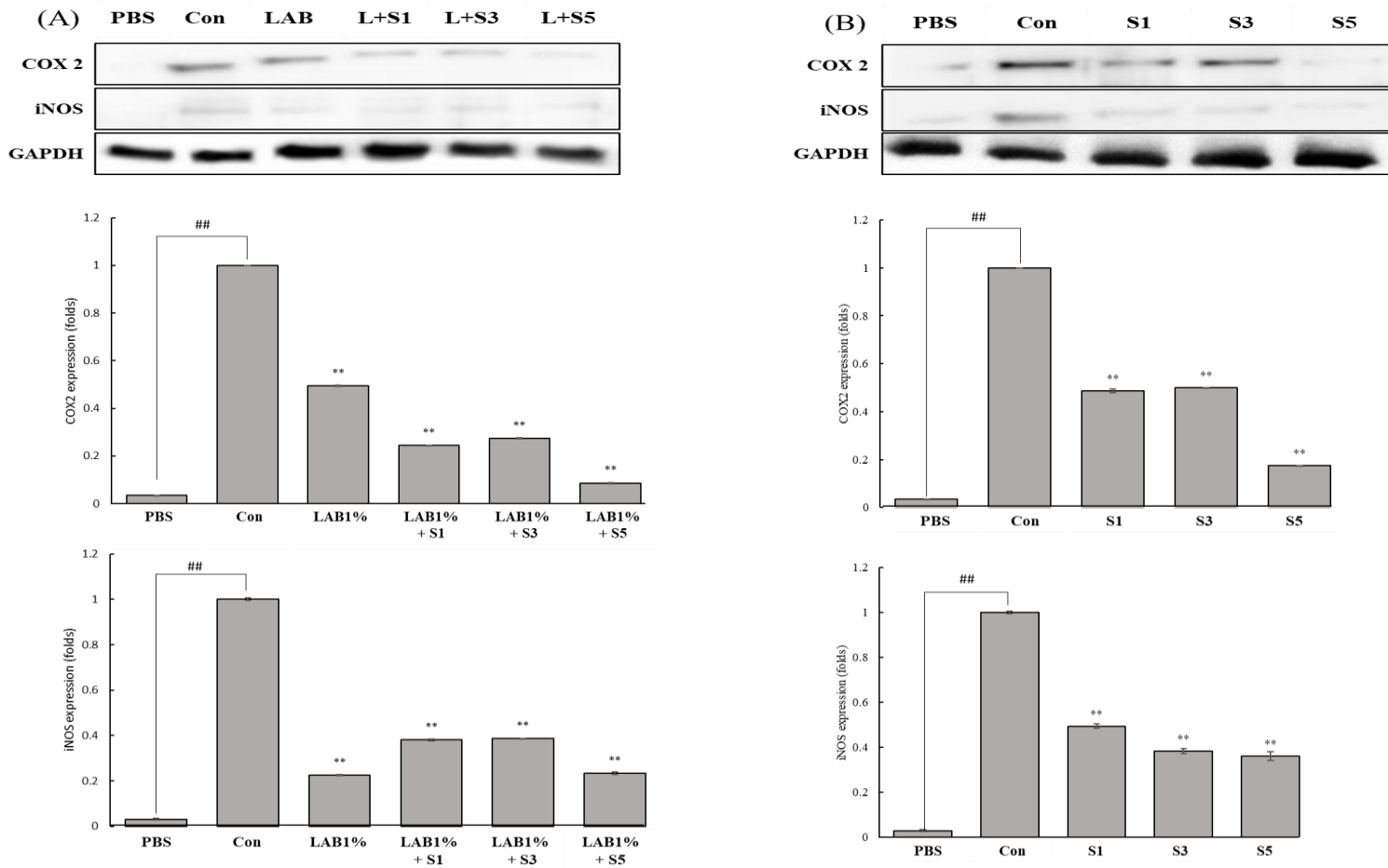


Figure 20. The effect of *Sargassum horneri* extracts on the expression of iNOS and COX-2 in *S. parauberis* infected zebrafish. (A) The mixed-feeding with SHC and LAB (A), and SHC only feeding group(B)



## 고찰

유산균은 대부분의 인간과 동물의 장에 존재하며 병원성 세균의 감염 억제 등 다양한 유익한 기능을 가진 미생물 이다. Prebiotics 는 이런 유산균에 영양원으로 작용하여 유산균 증식 활성화에 도움을 주는 물질이며, 해조류의 prebiotics 에 대한 연구 (O’Sullivan, Murphy et al. 2010, Zaporozhets, Besednova et al. 2014, Okolie, CK Rajendran et al. 2017, Cherry, Yadav et al. 2019)가 활발하게 이뤄지고 있고, 실제로 감태, 다시마 등, 해조류 추출물이 probiotics 의 성장에 영향을 주는 prebiotics 로서의 기능을 수행 할 수 있다 (LEE 2013, Yang and Lee 2016). 본 연구에서 사용한 갯생이모자반 효소 추출물 모두 유산균 증식에 도움을 주는 prebiotics 효능이 있음을 확인하였다. 그 중 celluclast 효소 추출물인 SHC 가 실험에 사용한 다른 효소들 추출물에 비해 우수한 유산균 증식 효과를 보였다. 추출 방법에 따른 prebiotics 효능 비교 실험에서는 SHC 가 각각 다른 방법을 사용한 추출물 가운데 가장 좋은 유산균 증식 활성을 보였다. SHC 의 농도별 첨가에 따른 유산균 증식 효과 결과 SHC 10 mg/ml 실험구에서 유산균 3 종 *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* 모두 180 ~ 200% 이상의 증식율로 가장 좋은 결과를 확인 하였다. 천연 상태의 해조류 섬유는 장을 빨리 통과하여 박테리아 이용을 허용하지 않는 고분자량의 중합체로 알려져 있다 (Warrand 2006, Deville, Gharbi et al. 2007, Ramnani, Chitarrari et al. 2012). 하지만 해조류의 저분자량 또는 가수분해된 다당류는 장에 머무는

시간이 증가하여 장내 미생물에 의해 대사되며, 이러한 이유로 해조류의 다양한 당 화합물이 prebiotics로서 가능성이 있다고 알려져 있다 (Gibson and Roberfroid 1995, Gibson 1998, Teitelbaum and Walker 2002, Ventura, O'flaherty et al. 2009, Grimoud, Durand et al. 2010, Ramnani, Chitarrari et al. 2012).

국내 해조류 추출물은 해조류의 종류, 추출용매, 추출방법 등에 따라 어류에 질병을 유발하는 세균, 충치균, 진균, 여드름균, 항생제 내성균 등 다양한 세균에 대해 항균활성의 차이를 보인다 (Lee, SUH et al. 2000, Kim, Lee et al. 2002, Kang, Oh et al. 2005, Kim, Kwon et al. 2012). CHO 등의 연구 결과에 따르면 팽생이모자반 추출물 또한 항균활성을 가진다고 보고하였다 (Cho, You et al. 1994, Chang, Kim et al. 1997). 제주도 양식넙치(Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)에 빈번하게 발생하는 병원성 세균인 *E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis* (Cho, Kim et al. 2008)는 넙치에 감염되어 출혈성 패혈증, 복수, 탈장, 안구돌출, 체색흑화 등의 증상을 유발한다 (Han, Kim et al. 2006, Nho, Shin et al. 2009, Park, Nho et al. 2009). 팽생이모자반 추출물을 이용하여, 제주도 넙치 양식에서 발생하여 폐사를 유발하는 3 종의 병원성 세균 (*E. tarda*, *S. iniae*, *S. parauberis*) 의 증식 억제를 확인한 결과 모든 효소 추출물에서 증식 억제효과를 확인하였고, 10 mg/ml 농도의 SHC 실험구가 66 ~ 85%의 증식 억제효과를 보여 가장 좋은 항균활성을 보였다.

갈조류인 감태의 효소 추출물은 prebiotics 기능으로 유산균 증식 활성화에 도움을 줄 뿐만 아니라 유산균의 이차대사산물 생성을 증가시키고, 생성된 이차대사산물은 항균력을 갖고 있어 세균 증식억제 효과가 있다 (LEE 2013). 또한 *Streptomyces* 등의 이차대사산물 또한 항균력이 있음을 알 수 있다 (Tan, Chan et al. 2016, Feliatra, Muchlisin et al. 2018). 본 연구에서는 갈조류인 팽생이모자반 효소 추출물인 SHC 첨가를 통해 유산균의 이차대사산물의 생성량 차이와 이차대사산물을 이용한 병원성 세균 증식억제 효과 평가를 하였다. 유산균 3 종 모두 SHC 첨가를 통해 대조구에 비해 1.5 ~ 2 배 가량 많은 이차대사산물을 생성하여 SHC 가 유산균의 이차대사산물 생성에 영향이 있음을 확인하다. 또한 *L. plantarum* 과 *L. pentosus* 의 이차대사산물을 이용한 병원성 세균 증식 억제 결과는 SHC 가 첨가된 MRS 배지에서 생성된 이차대사산물이 SHC 가 첨가되지 MRS 배지에서 생성된 이차대사산물에 비해 5 ~ 13 % 정도의 증식 억제 효과를 나타냈다.

현재 제주 넙치양식 시설은 약 360 개소, 수면적 1,259,808 m<sup>2</sup>으로 전국의 56.6%를 차지하고 있지만, 병원성 세균이나 바이러스 등 질병에 의한 폐사율이 20.19%에 달한다 (Jee, Shin et al. 2014). 이러한 어류 양식의 질병 저항성을 높이기 위하여 사료첨가제 등 해조류 추출물 급이를 통한 어류의 증체량, 면역력 증가 및 병원성 세균에 대한 저항력 증가 등의 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 먼저 참돔의 경우 팽생이모자반 추출물 급이를 통해 암모니아 및 저산소 스트레스에 대한 보호 효과가 밝혀졌고 (Shi, Wen et al. 2019, Shi, Yu et al.

2020), 모자반 추출물 급이를 한 농어는 *S. iniae* 에 대한 저항력과 내성을 향상 시켰다 (Yangthong, Hutadilok-Towatana et al. 2016). 또한 톳, 감태 추출물 첨가로 인해 돌돔 치어에 비특이적 면역활성이 증가 되었으며(Song, Jang et al. 2011), 모자반 추출물을 먹인 고등어에서는 근육내 히스타민을 억제 하였다(Jung, Kim et al. 2013). 본 연구에서도 SHC, LAB 을 단독 또는 병행하여 5 주간 급이 한 제브라피쉬의 증체량과 추출물 급이를 통해 *S. parauberis* 인위감염에 대한 저항성 과 염증 매개인자 발현에 대해 평가를 하였다. 추출물 급이 결과 LAB 1%를 단독 첨가하여 급이 한 실험구에서 120.13%의 증체율을 보였고, 병행처리 하여 급이 한 실험구에서는 LAB 1%와 SHC 1%를 병행 처리하여 급이 한 실험구에서 115.16%의 가장 높은 증체율을 보였다. An 등에 연구에 따르면 유산균과 해조류 다당체 추출물 등의 첨가로 인해 어류의 체중이 증가하고 비례적으로 비특이 면역, 병원성 세균에 대한 저항력 등이 증가함을 알 수 있다 (An, Kim et al. 2012, Cha, Yang et al. 2012, Noh, Kim et al. 2020). 제브라피쉬에 추출물 급이 3 주차에 병원성 세균 *S. parauberis* 를 복강내 주사를 통해 인위감염 시켰고, 일반 사료만 급이한 제브라피쉬의 폐사율은 70%에 달했으며, SHC 5%를 단독 급이 한 실험구와 SHC 3%와 LAB 1%를 병행처리 하여 급이 한 실험구에서 가장 낮은 폐사율을 보였다. 염증 매개인자 COX-2 와 iNOS 발현량을 평가한 결과 단독 급이 실험구에서 각각 SHC 5%와, LAB 1%를 첨가한 실험구에서 가장 낮은 발현량을

보였으며, 병행 첨가하여 급이 한 실험구에서는 단독 급이 한 실험구보다 더욱 감소하는 결과를 확인하였다.

이 연구를 통하여 갯생이모자반 celluclast 효소 추출물의 prebiotics 로서 효과를 확인하였고, 유산균 *L. plantarum* 을 혼합하여 제브라피쉬에 급이시 체중 증가, 병원성 세균인 *S. parauberis* 에 대한 저항성 증가 및 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 제주도로 유입된 갯생이모자반을 활용하여 양식 어류에 첨가제로 사용하고 양식 생산성 향상에 도움을 주기 위해서는 산업적 가치 분석 및 경제성 평가가 필요하며, 양식현장에서의 실증 시험과 더불어 추출물 처리 공정의 효율화 등의 추가 연구가 필요하다.

## 참고문헌

An, C.-M., et al. (2012). "Effect of supplementing the diet of Olive flounder *Paralichthys olivaceus* with sea mustard *Undaria pinnatifida* glycoprotein on growth and the immune system." *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45(5): 423-429.

Baek, J.-M. (2007). 해조류 양식 산업의 현황과 전망. Proceedings of the EASDL Conference, The East Asian Society of Dietary Life.

Baek, Y.-J. (2008). "유산균 (乳酸菌) 과 건강 (健康)." *The Microorganisms and Industry* 34(1): 4-6.

Campbell, J. M., et al. (1997). "Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats." *The Journal of nutrition* 127(1): 130-136.

Cha, J.-H., et al. (2012). "Effects of dietary supplementation with *Bacillus* sp. on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance against *Streptococcus iniae* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*." *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45(1): 35-42.

Chang, K., et al. (1997). "Antibacterial effects of *Sargassum horneri* extract to the *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains." *J. Korean Acad. Dent. Health* 21: 379-388.

Cherry, P., et al. (2019). "Prebiotics from seaweeds: An ocean of opportunity?" *Marine drugs* 17(6): 327.

Cho, M.-Y., et al. (2008). "A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea." *Journal of fish pathology* 21(3): 271-278.

Cho, M.-Y., et al. (2007). "Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea." *Journal of fish pathology* 20(1): 61-70.

Cho, S.-Y., et al. (1994). "Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method." Korean Journal of Food Science and Technology 26(3): 261-265.

Delzenne, N. M. (2003). "Oligosaccharides: state of the art." Proceedings of the nutrition Society 62(1): 177-182.

Derome, N., et al. (2016). Bacterial opportunistic pathogens of fish. The Rasputin effect: When commensals and symbionts become parasitic, Springer: 81-108.

Deville, C., et al. (2007). "Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics." Journal of the Science of Food and Agriculture 87(9): 1717-1725.

Feliatra, F., et al. (2018). "Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish." F1000Research 7.

Forchielli, M. L. and W. A. Walker (2005). "The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence." British Journal of Nutrition 93(S1): S41-S48.

Gibson, G. R. (1998). "Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics." British Journal of Nutrition 80(S2): S209-S212.

Gibson, G. R. (1999). "Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin." The Journal of nutrition 129(7): 1438S-1441S.

Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." The Journal of nutrition 125(6): 1401-1412.

Grimoud, J., et al. (2010). "In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics." Anaerobe 16(5): 493-500.

Gupta, V. and R. J. I. j. o. m. m. Garg (2009). "Probiotics." 27(3): 202.

Han, H. J., et al. (2006). "Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel)." Journal of Fish Diseases 29(10): 601-609.

Heo, J.-H., et al. (2002). "The Epidemiological study on fish diseases in the southern area of Kyeognam." JOURNAL OF VETERINARY CLINICS-SEOUL- 19(1): 14-18.

Hwang, E. K., et al. (1996). "Analysis of functional form groups in macroalgal community of Yonggwang vicinity, western coast of Korea." Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 29(1): 97-106.

Isolauri, E., et al. (2004). "Probiotics." 18(2): 299-313.

Jee, B. Y., et al. (2014). "Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea." Journal of fish pathology 27(1): 77-83.

Jung, S.-A., et al. (2013). "Inhibitory effects of histamine production in mackerel muscle by medicinal herbs and seaweed extracts." Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 42(8): 1263-1269.

Kang, K. H. (2013). "Health benefits of lactic acid bacteria." Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics 1(1): 1-8.

Kang, S.-Y., et al. (2005). "Antimicrobial activities of Korean marine algae against fish pathogenic bacteria." Journal of fish pathology 18(2): 147-156.

Kim, D.-S., et al. (2019). "Splenocyte-mediated immune enhancing activity of *Sargassum horneri* extracts." Journal of Nutrition and Health 52(6): 515-528.

Kim, J. H., et al. (2002). "Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*." Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 35(2): 191-195.

Kim, M.-S., et al. (2012). "Evaluation of the Antimicrobial Activities of 35 Seaweed



Extracts against Pathogenic Bacteria and Candida sp." Microbiology and Biotechnology Letters 40(2): 144-151.

Lee, B.-J., et al. (2019). "Durability Performances of Concrete Produced with Recycled Bio-Polymer Based on Sargassum Honeri." Journal of the Korean Recycled Construction Resources Institute 7(4): 445-451.

Lee, H.-S., et al. (2000). "Preparation of antibacterial agent from seaweed extract and its antibacterial effect." Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 33(1): 32-37.

LEE, W. (2013). "Effects of Ecklonia cava on the growth of lactic acid bacteria and the improvement of innate immune response of olive flounder (Paralichthys olivaceus)."

Lindsay, J. O., et al. (2006). "Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease." Gut 55(3): 348-355.

Madsen, K. L. (2001). "Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse." Clinical and investigative medicine 24(5): 250-257.

Mahmood, T. and P.-C. Yang (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." North American journal of medical sciences 4(9): 429.

Manning, T. S., et al. (2004). "Prebiotics." 18(2): 287-298.

Masood, M. I., et al. (2011). "Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings." 37(1): 91-98.

Nho, S.-W., et al. (2009). "Phenotypic characteristics of Streptococcus iniae and Streptococcus parauberis isolated from olive flounder (Paralichthys olivaceus)." FEMS microbiology letters 293(1): 20-27.

Noh, Y.-H., et al. (2020). "Effect of Dietary Supplementation of Diatom Melosira nummuloides and Lactic Acid Bacteria Lactobacillus plantarum on the Growth and Immune Stimulation Responses of Olive Flounder Paralichthys olivaceus." Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53(4): 597-605.

O'Sullivan, L., et al. (2010). "Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications." Marine drugs 8(7): 2038-2064.

Okolie, C. L., et al. (2017). "Prospects of brown seaweed polysaccharides (BSP) as prebiotics and potential immunomodulators." Journal of Food Biochemistry 41(5): e12392.

Park, S., et al. (2020). "Inhibitory effects of Sargassum horneri extract against endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells." J Nutr 53(6): 583-595.

Park, Y.-K., et al. (2009). "Antibiotic susceptibility and resistance of Streptococcus iniae and Streptococcus parauberis isolated from olive flounder (Paralichthys olivaceus)." Veterinary microbiology 136(1-2): 76-81.

Ramnani, P., et al. (2012). "In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds." Anaerobe 18(1): 1-6.

Shi, Q., et al. (2019). "Protective effects of Sargassum horneri against ammonia stress in juvenile black sea bream, Acanthopagrus schlegelii." Journal of Applied Phycology 31(2): 1445-1453.

Shi, Q., et al. (2020). "Effects of dietary Sargassum horneri on resisting hypoxia stress, which changes blood biochemistry, antioxidant status, and hepatic HSP mRNA expressions of juvenile black sea bream Acanthopagrus schlegelii." Journal of Applied Phycology 32: 3457-3466.

Song, J.-W., et al. (2011). "Effect of dietary supplementation with alga (Hizikia fusiformis and Ecklonia cava) on the non-specific immune responses of parrot fish Oplegnathus fasciatus." Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44(4): 332-338.

Tan, L. T.-H., et al. (2016). "Streptomyces bacteria as potential probiotics in aquaculture." Frontiers in microbiology 7: 79.

Tedelind, S., et al. (2007). "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease."

**World journal of gastroenterology: WJG 13(20): 2826.**

**Teitelbaum, J. E. and W. A. Walker (2002). "Nutritional impact of pre-and probiotics as protective gastrointestinal organisms." Annual review of nutrition 22(1): 107-138.**

**Toranzo, A. E., et al. (2005). "A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems." 246(1-4): 37-61.**

**Ventura, M., et al. (2009). "Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics." Nature Reviews Microbiology 7(1): 61-71.**

**Wang, L. (2019). Cosmeceutical effect of fucoidan isolated from brown seaweed, Hizikia fusiforme collected from Jeju Island, 제주대학교 대학원.**

**Warrand, J. (2006). "Healthy Polysaccharides." Food Technology & Biotechnology 44(3).**

**Williams, N. T. J. A. J. o. H.-S. P. (2010). "Probiotics." 67(6): 449-458.**

**Yang, H. and Y. Lee (2016). "Seaweed Derived Oligosaccharides and its Health Beneficial Effects on Gut Health." The Journal of the Korea Contents Association 16(7): 465-475.**

**Yangthong, M., et al. (2016). "An aqueous extract from Sargassum sp. enhances the immune response and resistance against Streptococcus iniae in the Asian sea bass (Lates calcarifer Bloch)." Journal of Applied Phycology 28(6): 3587-3598.**

**Zaporozhets, T., et al. (2014). "The prebiotic potential of polysaccharides and extracts of seaweeds." Russian journal of marine biology 40(1): 1-9.**

**Zopf, D. and S. Roth (1996). "Oligosaccharide anti-infective agents." The Lancet 347(9007): 1017-1021.**

**감다혜, et al. (2020). "꺽생이모자반으로부터 미백과 주름개선 생리활성물질 생산을 위한 초음파 추출공정 개발." KSBB Journal 35(4): 294-302.**

김지희, et al. (2019). GOCI 를 활용한 갯생이모자반 한반도 유입 특성 분석. 2019 한국지구물리물리탐사학회 봄 학술대회, 2019 한국지구물리물리탐사학회 봄 학술대회.

박용하, et al. (1999). "특집/유산균 (4) 유산균의 연구와 최근 분류학적 고찰." 생물산업 12(2): 35-77.

이용필 (2004). "제주도 해조류의 정성적 특성."

현정환, et al. (2019). "갯생이모자반으로 만든 바이오 폴리머를 혼입하여 제조한 교면포장 보수용 콘크리트의 재료 특성." 콘크리트학회 논문집 31(2): 191-197.

## 감사말씀

설레는 마음으로 2017년 후기 대학원 석사 과정인 해양생명공학과에 입학 하였습니다. 대학 졸업과 동시에 석사과정을 진행하지 못한 부분에 후회가 많았는데 한참 지난 후 직장을 다니면서 대학원을 다닐 수 있게 되어 너무 즐거웠습니다. 해조류 등의 분석방법을 배워보고 싶어서 전유진 교수님 연락처를 찾아서 바로 전화 드렸습니다. 일면식도 없는 제 전화를 받으시고 흔쾌히 실험실 생활을 허락해 주신 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님 덕분에 연구를 계획하고, 실험을 진행하는 저의 태도와 자세에 대해 다시금 생각 할 수 있게 되었고, 꼭 연구 뿐만이 아니라 앞으로 살아가면서 체계적이고 계획적인 제 삶을 위해 교수님 말씀 생각하며 살아가도록 하겠습니다. 직장과 실험실을 동시에 다닌다는 게 당연히 힘들 거라고 생각했고, 각오도 했지만 생각 이상으로 힘들었습니다. 전날 직장 밤샘 근무를 마치고 바로 실험하러 가는 날엔 새로운 실험을 배우는 것이 즐겁고 재미있었지만 또한 힘들기도 했습니다. 하지만 이 모든 힘든 시간을 견딜 수 있도록 도와 주신 하나님께 제일 먼저 감사 드립니다. 실험을 배우고 논문을 쓰는 동안 너무 많은 도움과 격려를 받았습니다. 김영상박사님, 류보미박사님, 양혜원박사님, 효근씨, 지민씨, 준건씨, 진이씨, MADU 생소한 실험과 잦은 실수에도 누구 하나 화내거나 짜증내지 않고 너그럽게 이해해 주신 모든 실험실분들께 감사드립니다. 졸업이 끝이 아니라 새로운 시작이기에 실험실 분들과 오랜 인연 이어갔으면 좋겠습니다. 마지막으로 퇴근 후 실험한다고 늦게까지 학교 다니면서 힘들고 피곤 할 때 항상 곁에서

힘이 되어준 사랑하는 아내 혜민아 항상 고맙고 사랑해, 그리고 멀리 떨어져 지내고 있지만  
항상 응원과 힘내라며, 격려해주신 소중한 가족들 너무 감사드리고 사랑합니다.