

복합 프로바이오틱스 급이가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 성장, 면역 반응 및 질병저항성에 미치는 영향

이민경 · 정현경 · 김동균¹ · 박인숙 · 허유리 · 강정하 · 김영삼*

국립수산과학원 생명공학과, ¹국립수산과학원 연구기획과

Effects of Multi-Strain Probiotics on Growth, Immunity and Disease Resistance in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Min-Kyeong Lee, Hyun-Kyoung Jung, Dong-Gyun Kim¹, In-Suk Park, Yu Li Heo, Jungha Kang and Young-Sam Kim*

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

¹Research Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

This study evaluated the effects of dietary multi-strain probiotics on growth performance, plasma biochemical and immune parameters, immune-related gene expression, and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), assessed by cumulative mortality after an *Edwardsiella tarda* challenge. Fish were fed diets containing *Bacillus subtilis* (B), *Enterococcus faecium* (E), and *Pediococcus pentosaceus* (P) for 5 weeks. Compared with the control group, fish fed the B+E, E+P, and B+E+P diets had significantly higher final body weight, weight gain, and specific growth rate and lower feed conversion ratios ($P<0.05$). Plasma lysozyme activity was significantly higher in the B+E+P group ($P<0.05$), whereas plasma biochemistry, phagocytic activity, anti-protease activity, and immune-related gene expression did not differ among treatments. After the *E. tarda* challenge, probiotic-fed groups showed lower cumulative mortality than the control group, although the differences were not significant. Thus, dietary multi-strain probiotics improved growth performance, feed utilization, and plasma lysozyme activity in olive flounder; however, their effects and underlying mechanisms require further investigation.

Keywords: Olive flounder, Multi-strain probiotics, Growth performance, Immune response, *Edwardsiella tarda*

서론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 국내 해산어류 양식 산업에서 높은 생산 비중을 차지하는 대표적인 경제성 양식 어종이다(NIFS, 2024). 그러나 집약적 양식 환경과 고밀도 사육 조건은 어류의 생리적 스트레스와 세균성 질병 발생 위험을 증가시켜 성장 저하 및 대량 폐사와 같은 경제적 손실을 유발한다(Lee et al., 2023; NIFS, 2024). 이에 따라 항생제를 대체하면서 양식 어류의 성장 및 면역 능력을 동시에 향상시킬 수 있는 친환경 기능성 사료첨가제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

프로바이오틱스(probiotics)는 적정량 투여 시 숙주의 건강에 유익한 효과를 제공하는 살아있는 미생물로, 장내 미생물 균

형 유지, 영양소 이용 효율 개선, 면역 반응 활성화 및 질병 저항성 향상에 기여하는 것으로 보고되어 항생제 대체제로 주목받고 있다(Kim and Heo, 2019; Kim et al., 2022; Lee et al., 2024). 특히 *Bacillus*, *Enterococcus* 및 *Pediococcus* 속 미생물은 protease, amylase 및 lipase와 같은 소화효소를 분비하여 영양소의 분해 및 흡수 효율 향상에 기여하는 것으로 알려져 있다(Martínez Cruz et al., 2012; Yuan et al., 2024; Lee et al., 2025; Mohammed et al., 2025). 또한 이들은 라이소자임 활성(lysozyme activity), 식세포 활성(phagocytic activity) 및 항단백질 분해효소 활성(anti-protease activity) 등 비특이적 면역반응을 조절하여 병원체에 대한 초기 방어 능력을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Loh, 2017; Ferraboschi et al., 2021).

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2461 Fax: +82. 51. 720. 2456

E-mail address: kim032@korea.kr



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2026.0275>

Korean J Fish Aquat Sci 59(4), 275-284, August 2026

Received 29 May 2026; Revised 25 June 2026; Accepted 9 July 2026

저자 직위: 이민경(연구사), 정현경(연구원), 김동균(연구관), 박인숙(연구원), 허유리(연구원), 강정하(연구관), 김영삼(연구사)

구체적으로 *Bacillus subtilis*는 우수한 효소 생산능과 환경 안정성을 바탕으로 납치를 포함한 다양한 양식 어종에서 성장 및 면역 증진 효과가 보고된 바 있다(Cha et al., 2012). 또한 *Enterococcus faecium*은 장내 환경 개선 및 면역 조절 기능이 우수한 프로바이오틱스로 알려져 있으며(Lee et al., 2025; Zhang et al., 2025), *Pediococcus pentosaceus* 역시 항균 활성 및 숙주 면역 증진 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Dawood et al., 2016). 이와 같이 단일 균주를 활용한 프로바이오틱스 연구는 활발히 수행되어 왔으나, 복합 균주 조합에 따른 생리·면역학적 반응과 질병저항성 개선 효과에 대한 연구는 여전히 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *B. subtilis*, *E. faecium* 및 *P. pentosaceus*를 조합한 프로바이오틱스 복합 균주를 납치에 급여한 후 성장 지표, 혈액생화학적 지표, 비특이적 면역반응, 면역 관련 유전자 발현 및 질병저항성 평가를 수행하여 복합 프로바이오틱스의 급여 효과를 종합적으로 분석하였다.

재료 및 방법

프로바이오틱스 균주의 분리 및 동정

본 실험에 사용된 균주는 납치의 장 내용물로부터 분리하였다. 장 내용물을 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)을 이용하여 연속 희석한 후, tryptic soy agar (TSA), yeast peptone dextrose agar (YPD) 및 de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) 배지에 각각 도말하였다. 이후 배지는 20°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 형성된 콜로니를 반복 계대배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주는 각각 E-TSA-3, YPD-N2 및 MRS-A4-1로 명명하였다.

균주 동정을 위하여 genomic DNA를 추출한 후 universal primer인 27F (5'-AGR GTT YGA TYM TGG CTC AG-3')와 1426R (5'-RGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 산물의 염기서열은 EzBioCloud database (CJ Bioscience, Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였으며, E-TSA-3은 *B. subtilis*, YPD-N2는 *E. faecium*, MRS-A4-1은 *P. pentosaceus*로 각각 동정되었다. 종 동정의 정확성을 높이기 위해 확보된 전장유전체 서열로부터 16S rRNA, *gyrB* 및 *rpoB* 서열을 추출하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI BLASTn을 이용하여, *gyrB* 및 *rpoB* 예측 아미노산 서열은 NCBI BLASTp를 이용하여 참조 균주와의 서열 유사도를 비교하였다. 이들 균주는 이전 연구(Lee et al., 2025)에서 내산성 및 내담즙성, 항균 활성 및 소화효소 생산능을 평가하여 프로바이오틱스 후보 균주로 선발되었으며, 전장유전체 분석 결과 독성 또는 병원성과 관련된 biosynthetic gene cluster는 검출되지 않았다. 동정된 균주는 glycerol stock 형태로 제조하여 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험사료

본 실험에서는 납치용 시판 배합사료(Daebong LF Co., Ltd., Jeju, Korea)를 기본 사료로 사용하였다. 프로바이오틱스 처리구는 *B. subtilis* (B), *E. faecium* (E) 및 *P. pentosaceus* (P)의 액체 배양액을 실험구 설계에 따라 혼합하여 제조하였다. 처리구는 균주 조합에 따라 두 균주 혼합 처리구(B+E, B+P, E+P)와 세 균주 혼합 처리구(B+E+P)로, 총 4종으로 구성하였다. 각 균주 배양액은 동일 비율로 혼합한 후 기본 사료에 분무하여 균일하게 코팅하였으며, 최종 균수는 사료 1 g당 약 6.5×10^7 CFU가 되도록 조정하였다. 코팅된 실험사료는 제조 직후 즉시 급이에 사용하였으며 대조구는 프로바이오틱스를 첨가하지 않은 기본 사료를 사용하였다.

실험어 및 사육관리

본 실험에 사용된 납치는 국립수산물과학원 육종연구센터로부터 분양받아 시판 배합사료를 공급하며 2주간 순치시킨 후 사용하였다. 사육 실험에는 평균 체중 16.98 ± 2.26 g의 실험어를 사용하였으며, 원형 아크릴 수조(바닥 면적 0.2 m²)에 수조당 35마리씩 각 실험구에 3반복으로 무작위 배치하였다. 실험 기간 동안 에어레이션을 실시하여 충분한 용존산소 농도를 유지하였고, 평균 수온은 21.4 ± 0.4 °C였다. 실험사료는 1일 2회(09:00 및 17:00), 어체중의 3%로 5주간 정량 급이하였다. 공급된 사료는 모두 섭취되어 잔량이 발생하지 않았으며, 성장시험 기간 동안 실험 처리와 관련된 폐사는 발생하지 않았다. 본 실험은 국립수산물과학원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다(2024-NIFS-IACUC-46).

성장지표 분석

2주간의 순치 사육 후 실험어의 초기 체중(initial body weight, IBW)을 측정하였으며, 5주간의 사육 실험 종료 후 최종 체중(final body weight, FBW)을 측정하였다. 사료섭취량(feed intake, FI)은 실험 기간 동안 각 수조에 공급된 총 사료량을 기준으로 산정하였으며, 공급된 사료는 모두 섭취되어 실제 FI는 공급된 총 사료량과 동일하였다. 측정 결과를 바탕으로 증체량(body weight gain, BWG), 증체율(weight gain rate, WGR), 일간성장률(specific growth rate, SGR) 및 사료요구율(feed conversion ratio, FCR)을 다음 식을 이용하여 산출하였다.

$$BWG(g) = FBW - IBW$$

$$WGR(\%) = [(FBW - IBW) / IBW] \times 100$$

$$SGR(\%/day) = [\ln(FBW) - \ln(IBW)] / \text{days} \times 100$$

$$FCR = FI / BWG$$

시료 채취 및 전처리

5주간의 사육 실험 종료 후, 각 수조에서 무작위로 5마리씩(실험구당 총 15마리)을 선별하여 시료를 채취하였다. 모든 실험어

는 2-phenoxyethanol 100 ppm (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)으로 마취하였으며, 헤파린 처리된 1 mL 주사기를 이용하여 미부정맥에서 채혈한 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액은 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며, 분석 전까지 -80°C에 보관하였다. 적출된 간 조직은 액체질소를 이용하여 즉시 급속동결한 후 RNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

혈액생화학적 분석

혈장 내 glucose (GLU), alkaline phosphatase (ALP), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 및 total protein (TP) 수준은 자동생화학 분석기(FUJI DRI-CHEM NX500; FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

비특이적 면역반응

식세포 활성은 Müller et al. (1981)의 방법에 따라 분석하였다. 전혈 50 µL와 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액 50 µL를 혼합하여 실온 암조건에서 30분 동안 반응시킨 후 N,N-dimethyl-formamide 100 µL를 첨가하여 반응을 종료하였다. 이후 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 20 µL에 PBS 180 µL를 혼합하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라이소자임 활성은 Hikima et al. (2001)의 방법을 약간 변형하여 분석하였다. 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus*를 1 × PBS에 현탁하여 최종 농도가 0.02%가 되도록 준비하였다. 0.02% *M. lysodeikticus* 현탁액 190 µL와 혈장 10 µL를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 530 nm에서 1분 간격으로 20분간 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 분당 흡광도 0.001 감소를 1 unit으로 계산하였다.

항프로테아제 활성은 Coêlho et al. (2016)의 방법을 약간 변형하여 분석하였다. 혈장 10 µL와 5 mg/mL trypsin 용액 10 µL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, PBS 100 µL와 2% azocasein 100 µL를 혼합한 용액 200 µL를 첨가하여 실온에서

1시간 동안 반응시켰다. 이후 10% trichloroacetic acid 500 µL를 첨가하여 반응을 종료하고 6,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액 100 µL에 1 N NaOH 100 µL를 혼합하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

면역 관련 유전자 발현

실험어의 간 조직에서 RiboEx reagent (GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)로 cDNA를 합성하였다. 면역 관련 유전자인 *c-type lysozyme*, *CD4* 및 *CD8*의 발현은 quantitative real-time PCR (QuantStudio 3; Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, USA)을 이용하여 분석하였으며, 이들 유전자는 프로바이오틱스 급이에 따른 선천면역 및 세포성 면역 반응을 평가하기 위한 지표로 선정하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 초기 변성한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분의 과정을 총 40 cycles 반복하였다. 각 유전자의 상대적 발현량은 β -actin을 내부 대조군으로 사용하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법(Livak and Schmittgen, 2001)으로 산출하였으며, 분석에 사용한 primer 정보는 Table 1에 제시하였다.

공격실험

5주간의 사육 실험 종료 후, 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받은 *Edwardsiella tarda* KCTC 12267^T를 공격균주로 사용하였다. *E. tarda*는 넙치 양식에서 주요 세균성 질병인 에드워드병의 원인균으로 알려져 있어 질병저항성 평가를 위한 공격균주로 선정하였다. 실험어는 각 실험구당 총 90마리(수조당 30마리씩 3반복)를 배치하였다. *E. tarda*는 멸균 식염수를 이용하여 최종 농도가 2.0×10^6 CFU/mL이 되도록 조정된 후, 실험어 개체당 100 µL씩 복강 내 주사하여 인위 감염하였으며, 이후 21일 동안 누적 폐사율을 조사하였다. 모든 수조는 $21.4 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 에어레이션을 실시하여 충분한 용존산소 농도를 유지하고 매일 사육수의 50%를 환수하

Table 1. Primer sequences used for quantitative real-time PCR analysis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Gene	Primer (5'-3')	Accession number
<i>c-type lysozyme</i>	F: CTG TGG GCA GGA AAG ACT TC	AB050589.1
	R: GGAAGT GTT GGT GGA GAG G	
<i>CD4</i>	F: AGG TGC CAG TGA GGT GGT TTA T	XM_069537653.1
	R: GCC GTC CTG TTT ACC AAA ACT C	
<i>CD8</i>	F: CGC TGC GCT GCAATG AT	AB082958.1
	R: CAC GCC CCA CCT GTA ACC	
β -actin	F: CAT CAG GGA GTG ATG GTG GGT A	AF216646.1
	R: ATA CCG TGC TCG ATG GGG TAC T	

F, forward primer; R, reverse primer; PCR, polymerase chain reaction.

였다. 감염어의 이상 행동 및 섭이 활동은 매일 2회 이상 관찰 하였으며, 빈사 상태의 개체와 폐사어는 발견 즉시 제거하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 3반복구의 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 실험구 간 차이를 분석하기 위해 GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 유의한 차이가 확인된 경우 Tukey's multiple comparison test를 수행하였다. P<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

16S rRNA 유전자 분석 결과, E-TSA-3, YPD-N2 및 MRS-A4-1은 각각 *B. subtilis*, *E. faecium* 및 *P. pentosaceus*로 동정되었다. 추가적으로 전장유전체에서 확보한 16S rRNA, *gyrB* 및 *rpoB* 서열을 분석하여 PCR 기반 16S rRNA 유전자 분석에 따른 종 동정 결과를 검증하였으며, 각 유전자의 서열 유사도는 Table 2에 제시하였다. 군주 동정에 사용한 16S rRNA 유전자 염기서열과 *gyrB* 및 *rpoB*의 예측 아미노산 서열은 Supplementary Data S1에 제시하였다.

5주간 프로바이오틱스를 급이한 넙치의 성장지표 및 사료 이용 효율 분석 결과는 Table 3과 같다. IBW는 모든 실험구에서 16.97–16.99 g 범위로 나타났으며, 실험구 간 유의한 차이는 확인되지 않았다. 사육 종료 후 FBW, BWG, WGR 및 SGR은 실험

구 간 유의한 차이를 나타냈으며(P<0.05), B+E구, E+P구 및 B+E+P구에서 대조구보다 유의하게 높은 값을 보였다. 반면, B+P구에서는 다른 처리구와 유의한 차이가 확인되지 않았다. FCR 또한 실험구 간 유의한 차이를 나타냈으며(P<0.05), B+E구, E+P구 및 B+E+P구에서 대조구보다 유의하게 낮은 값을 보였다. 반면, B+P구에서는 다른 처리구와 유의한 차이가 확인되지 않았다. 이전 연구에서는 *B. subtilis* 및 *E. faecium*이 protease, amylase 및 lipase 활성을 나타내는 것으로 보고되었으며(Lee et al., 2025), 이러한 소화효소 활성은 영양소의 소화 및 흡수 효율 향상에 기여할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 일부 복합 프로바이오틱스 처리구의 성장지표와 사료 이용 효율이 개선된 결과는 프로바이오틱스 급이에 따른 영양소 이용성 변화와 관련되었을 가능성을 시사한다. 이러한 결과는 *Bacillus* spp.를 급이한 기존 연구에서 성장지표와 사료 이용 효율이 향상되었다는 보고와도 유사하였다(Cha et al., 2013; Lee et al., 2020). 다만, 본 연구에서는 단일 군주 처리구를 포함하지 않았으므로 복합 군주의 효과를 개별 군주의 효과와 직접 비교하거나 군주 간 상호작용을 평가하기에는 한계가 있다. 따라서 이에 대한 검증은 단일 군주 처리구를 포함한 후속 연구를 통해 이루어질 필요가 있다.

넙치 혈장의 생화학적 지표 분석 결과는 Table 4와 같다. GLU, ALP, GOT, GPT 및 TP는 모든 실험구에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 복합 프로바이오틱스 급이가 넙치의 생리적 안정성을 유지하면서 간 기능이나 단백질 대사에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 시사한다. 이는 *Bacillus* spp. 급이 후 넙치의 혈액생화학적 지표에

Table 2. Molecular identification and species confirmation of probiotic strains based on 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoB* sequence analyses

Strain	Closest reference strain (16S rRNA)	Identity (%)	Closest reference strain (<i>gyrB</i>)	Identity (%)	Closest reference strain (<i>rpoB</i>)	Identity (%)
<i>B. subtilis</i> NIFS	<i>B. subtilis</i>	100.00	<i>B. inaquosorum</i>	98.61	<i>B. safensis</i>	95.58
<i>E. faecium</i> NIFS	<i>E. faecium</i>	100.00	<i>E. faecium</i>	100.00	<i>E. faecium</i>	100.00
<i>P. pentosaceus</i> NIFS	<i>P. pentosaceus</i>	100.00	<i>P. acidilactici</i>	94.60	<i>P. acidilactici</i>	95.42

B., *Bacillus*; E., *Enterococcus*; P., *Pediococcus*; NIFS, National Institute of Fisheries Science.

Table 3. Growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diets supplemented with different combinations of probiotics for 5 weeks

	IBW (g)	FBW (g)	BWG (g)	WGR (%)	SGR (%/day)	FCR
Control	16.99±3.01	46.57±9.84 ^a	29.59±9.84 ^a	174.26±57.93 ^a	2.88±0.65 ^a	1.55±0.77 ^a
B+E	16.98±1.93	50.67±9.34 ^b	33.69±9.34 ^b	198.39±54.98 ^b	3.12±0.54 ^b	1.28±0.44 ^b
B+P	16.97±2.54	49.87±9.07 ^{ab}	32.89±9.07 ^{ab}	193.72±53.44 ^{ab}	3.08±0.55 ^{ab}	1.34±0.67 ^{ab}
E+P	16.98±1.68	50.78±9.78 ^b	33.80±9.78 ^b	199.08±57.61 ^b	3.13±0.58 ^b	1.29±0.46 ^b
B+E+P	16.97±2.01	50.60±8.11 ^b	33.62±8.11 ^b	197.97±47.77 ^b	3.12±0.48 ^b	1.25±0.38 ^b

Values are presented as mean±SD (n=3 replicate tanks per group; 35 fish per tank). Different superscript letters within a column indicate significant differences among groups as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (P<0.05). IBW, initial body weight; FBW, final body weight; BWG, body weight gain; WGR, weight gain rate; SGR, specific growth rate; FCR, feed conversion ratio; SD, standard deviation; ANOVA, analysis of variance; B, *Bacillus subtilis*; E, *Enterococcus faecium*; P, *Pediococcus pentosaceus*.

Table 4. Blood biochemical parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diets supplemented with different combinations of probiotics for 5 weeks

	GLU (mg/dL)	ALP (U/L)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	TP (g/dL)
Control	74.5±32.9	255.0±101.7	27.3±9.4	13.3±1.9	3.4±0.3
B+E	62.8±32.7	259.3±108.8	26.0±11.3	12.6±3.1	3.4±0.3
B+P	59.5±29.4	219.2±44.9	31.2±10.8	14.1±3.4	3.5±0.2
E+P	47.7±34.5	206.0±40.9	24.6±9.8	11.7±1.6	3.4±0.4
B+E+P	60.7±20.5	211.9±20.9	23.1±7.6	12.9±4.6	3.3±0.3

Values are presented as mean±SD ($n=15$ fish per group; 5 fish per tank). No significant differences were detected among groups by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($P>0.05$). GLU, glucose; ALP, alkaline phosphatase; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; TP, total protein; SD, standard deviation; ANOVA, analysis of variance; B, *Bacillus subtilis*; E, *Enterococcus faecium*; P, *Pediococcus pentosaceus*.

서 뚜렷한 이상 변화가 나타나지 않았다는 기존 연구 결과와 유사하였다(Kim et al., 2022).

넙치의 비특이적 면역반응 분석 결과는 Table 5와 같다. 혈장 lysozyme 활성은 실험구 간 유의한 차이를 나타냈으며 ($P<0.05$), B+E+P구에서 가장 높은 활성을 보였다. 반면, 식세포 활성과 anti-protease 활성은 실험구 간 유의한 차이를 나타내지 않았다. Lysozyme은 어류의 선천면역계에서 세균의 세포벽을 분해하여 병원체 제거에 관여하는 대표적인 비특이적 면역 인자로 알려져 있으며(Magnadóttir, 2006), 프로바이오틱스 급이에 따른 lysozyme 활성 증가는 다양한 어종에서 보고된 바 있다(Jang et al., 2013; Kim et al., 2022). 본 연구에서 B+E+P구의 lysozyme 활성이 유의하게 증가한 결과는 세 군주의 복합 급이가 혈장 lysozyme 활성 향상에 기여하였을 가능성을 시사한다. 그러나 식세포 활성과 anti-protease 활성에서는 실험구 간 유의한 차이가 확인되지 않았으므로, 복합 프로바이오틱스의 비특이적 면역 조절 효과를 보다 명확히 평가하기 위해서는

추가 연구가 필요하다.

넙치의 간 조직 내 면역 관련 유전자(*c-type lysozyme*, *CD4*, *CD8*)의 상대적 발현량 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 분석한 모든 면역 관련 유전자의 발현량은 실험구 간 유의한 차이를 나타내지 않았다. 일부 처리구에서 상대적인 발현 변화가 관찰되었으나, 통계적 유의성이 확인되지 않았으므로 이를 복합 프로바이오틱스에 의한 면역 조절 효과로 해석하기에는 한계가 있다. 혈장 lysozyme 활성과 간 조직의 *c-type lysozyme* 유전자 발현 양상이 일치하지 않은 것은 유전자 발현과 단백질 활성 사이의 조절 단계 차이에 기인한 것으로 판단된다. 일반적으로 mRNA 발현량과 단백질 활성은 전사 후 및 번역 후 조절(post-transcriptional and post-translational regulation), 단백질 안정성 및 분해 속도 등의 영향을 받으므로 반드시 일치하지 않을 수 있다. 또한 혈장 lysozyme 활성은 간 이외의 면역 관련 조직과 세포에서 생성·분비되는 lysozyme의 영향을 함께 반영할 수 있다.

E. tarda 공격 후 누적 폐사율 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 모든 실험구에서 감염 후 시간이 경과함에 따라 누적 폐사율이 증가하였다. 폐사는 감염 후 5일째부터 관찰되기 시작하였으며, 프로바이오틱스 급이구에서는 대조구보다 낮은 누적 폐사율이 관찰되었다. 그러나 감염 후 21일째의 최종 누적 폐사율을 ANOVA와 Tukey의 다중비교검정으로 분석한 결과, 실험구 간 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 본 연구에서는 Kaplan-Meier 생존분석과 log-rank 검정을 수행하지 않았으며, 폐사 개체에서 공격균주의 재분리도 실시하지 않았다. 따라서 본 결과는 프로바이오틱스에 의한 질병저항성 향상을 입증하는 결과라기보다는 공격 후 누적 폐사율의 변화 양상을 보여주는 결과로 해석할 필요가 있다. 아울러 급이한 프로바이오틱스 군주의 장내 정착 여부를 확인하지 않았으므로, 관찰된 폐사율 변화 양상을 군주의 직접적인 효과로 단정하기에는 한계가 있다.

종합적으로, 일부 복합 프로바이오틱스 처리구에서는 넙치의 성장지표와 사료 이용 효율이 유의하게 개선되었으며, B+E+P구에서는 혈장 lysozyme 활성이 유의하게 증가하였다. 또한 *E. tarda* 공격시험에서 프로바이오틱스 급이구의 누적 폐사율이 대조구보다 낮은 경향을 보였으나, 실험구 간 통계적으로 유의

Table 5. Non-specific immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diets supplemented with different combinations of probiotics for 5 weeks

	Phagocytic activity (OD 550 nm)	Lysozyme activity (U/mL)	Anti-protease activity (OD 450 nm)
Control	0.054±0.01	4.55±9.53 ^a	0.371±0.15
B+E	0.064±0.02	15.39±9.05 ^{ab}	0.417±0.17
B+P	0.063±0.01	14.84±13.61 ^{ab}	0.375±0.18
E+P	0.065±0.01	12.13±12.22 ^a	0.453±0.14
B+E+P	0.058±0.01	26.18±9.80 ^b	0.437±0.14

Values are presented as mean±SD ($n=15$ fish per group; 5 fish per tank). Different superscript letters within a column indicate significant differences among groups as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($P<0.05$); no significant differences were detected in phagocytic activity or anti-protease activity ($P>0.05$). OD, optical density; SD, standard deviation; ANOVA, analysis of variance; B, *Bacillus subtilis*; E, *Enterococcus faecium*; P, *Pediococcus pentosaceus*.

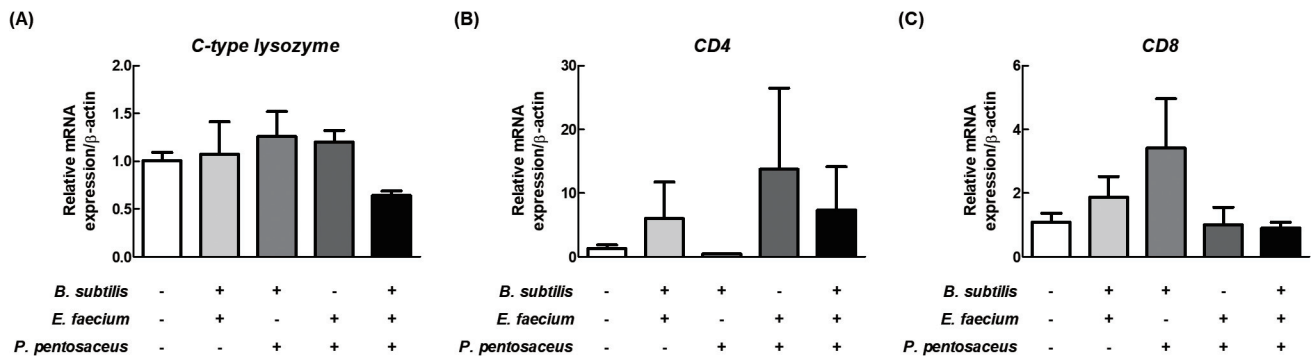


Fig. 1. Relative expression levels of *c-type lysozyme*, *CD4*, and *CD8* genes in olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diets supplemented with different combinations of probiotics for 5 weeks. Values are presented as mean±SD ($n=3$ replicate tanks per group). Gene expression levels were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, and no significant differences were detected among the experimental groups ($P>0.05$). SD, standard deviation; ANOVA, analysis of variance; B, *Bacillus subtilis*; E, *Enterococcus faecium*; P, *Pediococcus pentosaceus*. (A), *c-type lysozyme*; (B), *CD4*; (C), *CD8*.

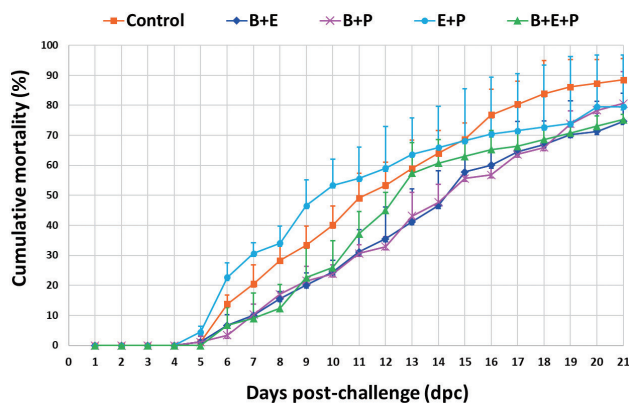


Fig. 2. Cumulative mortality of olive flounder *Paralichthys olivaceus* challenged with *Edwardsiella tarda* following a 35-day feeding trial with diets supplemented with different combinations of probiotics. Mortality was monitored daily for 21 days after challenge. Data are presented as mean±SD of cumulative mortality (%) from three replicate tanks ($n=3$; 30 fish per tank). Final cumulative mortality was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, and no significant differences were detected among the experimental groups ($P>0.05$). SD, standard deviation; ANOVA, analysis of variance; B, *Bacillus subtilis*; E, *Enterococcus faecium*; P, *Pediococcus pentosaceus*.

한 차이는 확인되지 않았다. 혈액생화학적 지표, 비특이적 면역 지표 및 면역 관련 유전자 발현에서도 실험구 간 유의한 차이는 나타나지 않았다. 본 연구에서는 단일 균주 처리구를 포함하지 않았으며, Kaplan-Meier 생존분석, 공격균주의 재분리 및 프로바이오틱스 균주의 장내 정착성 평가를 수행하지 못한 한계가 있다. 또한 *E. faecium* 균주에 대해서는 전장유전체 분석을 수행하였으나, 용혈성, 항생제 감수성 및 병원성 관련 특성에 대한 추가적인 안전성 평가는 수행하지 못하였다. 따라서 본 연구 결

과를 프로바이오틱스의 안전성으로 일반화하기에는 한계가 있으며, 향후에는 단일 균주 처리구를 포함한 비교시험, 장내 미생물 및 균주 정착성 분석, 적절한 생존분석, 폐사 개체에서의 공격균주 재분리와 함께 균주 수준의 안전성 평가를 수행하여 복합 프로바이오틱스의 성장, 면역 및 질병저항성에 대한 효과와 균주의 안전성을 보다 명확하게 검증할 필요가 있다.

사 사

이 논문은 2026년도 국립수산물과학원 수산시험연구사업 (R2026037) 연구개발비 지원으로 수행되었습니다.

References

- Cha JH, Rahimnejad S, Yang SY, Kim KW and Lee KJ. 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture* 402-403, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.030>.
- Cha JH, Yang SY, Woo SH, Song JW, Oh DH and Lee KJ. 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 J Fish Aquat Sci* 45, 35-42. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2012.0035>.
- Coelho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E and Tambourgi EB. 2016. Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: Reexamining a traditional method using bromelain samples. *Biomed Res Int* 2016, 8409183. <https://doi.org/10.1155/2016/8409183>.
- Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M and Yokoyama S. 2016. Effects of dietary inactivated *Pediococcus pentosaceus* on

- growth performance, feed utilization and blood characteristics of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. Aquac Nutr 22, 923-932. <https://doi.org/10.1111/anu.12314>.
- Ferraboschi P, Ciceri S and Grisenti P. 2021. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic. Antibiotics 10, 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>.
- Hikima JI, Minagawa S, Hirono I and Aoki T. 2001. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. Biochim Biophys Acta 1520, 35-44. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00248-2).
- Jang IS, Kim DH and Heo MS. 2013. Dietary administration of probiotics, *Bacillus* sp. IS-2, enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. Korean J Microbiol 49, 172-178. <https://doi.org/10.7845/kjm.2013.3033>.
- Kim DH and Heo MS. 2019. Dietary effect of *Bacillus subtilis* MD-02 on innate immune response and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Microbiol Biotechnol Lett 47, 132-138. <https://doi.org/10.4014/mb.1807.07003>.
- Kim MG, Gunathilaka BE, Lee S, Kim Y and Lee KJ. 2022. Effects of *Bacillus* SW1-1 coated diets on innate immunity and disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Edwardsiella tarda* infection. Fish Aquat Sci 25, 243-249. <https://doi.org/10.47853/FAS.2022.e22>.
- Lee C, Cha JH, Kim MG, Shin J, Woo SH, Kim SH, Kim JW, Ji SC and Lee KJ. 2020. The effects of dietary *Bacillus subtilis* on immune response, hematological parameters, growth performance, and resistance of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae*. J World Aquac Soc 51, 551-562. <https://doi.org/10.1111/jwas.12680>.
- Lee MK, Jung HK, Kim DG, Park IS, Heo YL, Kang J and Kim YS. 2025. Strain-specific effects of *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, immunity, and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fishes 10, 465. <https://doi.org/10.3390/fishes10090465>.
- Lee S, Park JW, Jeong M, Jung HS, Kim J, Kim WJ, Lee JH and Lee D. 2023. Effects of rearing density stress on malformation and stress and immune related gene expression of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 56, 380-387. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0380>.
- Lee SJ, Noh DI, Lee YS, Hasan MT, Hur SW, Lee S, Jeong SM, Lee JM, Lee EW, Kim KW and Jang WJ. 2024. Effects of host-associated low-temperature probiotics in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture. Sci Rep 14, 2134. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52491-9>.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. Methods 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loh JY. 2017. The role of probiotics and their mechanisms of action: An aquaculture perspective. World Aquac 48, 19-23.
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol 20, 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- Martínez Cruz P, Ibáñez AL, Monroy Hermosillo OA and Ramírez Saad HC. 2012. Use of probiotics in aquaculture. ISRN Microbiol 2012, 916845. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>.
- Mohammed EAH, Ahmed AEM, Teye-Gaga C and Pál K. 2025. The potential use of *Pediococcus* spp. probiotic in aquaculture: A review. Acta Agraria Debreceniensis 1, 99-106. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/15372>.
- Müller J, Alföldy P and Lemmel EM. 1981. Nitroblue-tetrazolium test for the functional evaluation of phagocytic cells: A critical analysis of the methodology. Agents Actions 11, 384-390. <https://doi.org/10.1007/BF01982475>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2024. Technical Manual for Olive Flounder Aquaculture. NIFS, Busan, Korea, 179. Retrieved from <https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20250805162435388QZI.pdf&rs=/distantwater/preview/Board0027/> on August 7, 2026.
- Yuan M, Li Z, Zhou Q, Zheng X, Sun C, Liu B, Wang A and Zhu A. 2024. Enhancement of digestive enzyme activity in *Enterococcus faecalis* using ARTP mutagenesis. Microorganisms 12, 2425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122425>.
- Zhang Y, Lu Y, Zhang Y and Niu C. 2025. Effects of dietary supplement of probiotic *Enterococcus faecium* on intestinal microbiota and barrier structure, immune function, and antioxidant capacity of soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. Aquac Nutr 2025, 8066906. <https://doi.org/10.1155/anu/8066906>.

부 록

Supplementary data legend

Supplementary Data S1. Nucleotide sequences of 16S rRNA genes and amino acid sequences of *gyrB* and *rpoB* obtained from the whole-genome sequences of *Bacillus subtilis* NIFS, *Enterococcus faecium* NIFS and *Pediococcus pentosaceus* NIFS.

Bacillus subtilis NIFS 16S rDNA nucleotide sequence

TCGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTT-
GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC-
GGGGCTAATACCGGATGTTGTTTGAACCGCATGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCC-
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA-
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG-
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGC-
GGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT-
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT-
CATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG-
GAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAG-
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT-
TAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCAT-
GTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC-
GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG-
CAACCTTGATCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT-
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGGACGCGAAACCGCGAG-
GTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC-
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCC-
GAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG-
TATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

Bacillus subtilis NIFS *gyrB* amino acid sequence

MAMEQQQNSYDENQIQVLEGLEAVRKRPGRMYIGSTNSKGLHHLVWEIVDNSIDEALAGYCTDINIQIEKDNSITVVDNGRGIPVGI-
HEKMGRPAVEVIMTVLHAGGKFDGSGYKVSGLHGVASVNALSTELDVTVHRDGIHQTYKRGVPVTDLEIIGETDHT-
GTTTHFVPDPEIFSETTEYDYDLLANRVRELAFTLKGVNITIEDKREGQERKNEYHYEGGIKSYVEYLNRSKEVVHEEPIYIEGK-
DGITVEVALQYNDYSYTSNIYSFTNNINTYEGGTHEAGFKTGLTRVINDYARKKGLIKENDPNLSGDDVREGLTAISIKHPD-
PQFEGQTKTKLGNSEARTITDTLFTAMETFMLENPDAAKKIVDKGLMAARARMAAKKARELTRRKSALISNLPGKLADCSSK-
DPSISELYIVEGDSAGGSAKQGRDRHFQAILPLRGKILNVEKARLKDILSNNEVRSMTALGTGIGEDFNLEKARYHKVVMITDAD-
VDGAHIRTLLLTFFRYMRQIIENGYVYIAQPPPLYKVQQGKRVEYAYNDKELEELLKTLPTKPKPLQRYKGLGEMNATQLWETTM-
DPSSRTLLQVTLEDAMDADETFEMLMGDKVEPRRNFIENARYVKNLDI

Bacillus subtilis NIFS *rpoB* amino acid sequence

MTGQLVQYGRHRQRRSYARISEVLELPLNIEIQTSSYQWFLDEGLREMFQDISPIEDFTGNLSLEFIDYSLGEPKYPVEESKERDV-
TYSAPLRVKVRLINKETGEVKDQDVFMDGFPIMTDTGTIINGAERVIVSQLVRSPSVYFSGKVDKNGKKGFTATVIPNRGAWLEYET-
DAKDVVYVRIDRTRKLPVTVLLRALGFGSDQEILDLIGENEYLRNTLDKNTENSDDKALLEIYERLRPGEPPTVENAKSLLDSRFFD-
PKRYDLANVGRYKINKKLHIKNRFLNQRLAETLVDPETGEILAEKGQILDRRTLDKVLPYLENGIGFRKLYPNGGVVEDEVTLQSIKI-
FAPTDQEGEQVINVIGNAYIEEIKNITPADISSISYFFNLLHGVGDTDDIDLGNRRRLRSVGELLQNFRIGLSRMERVVRRER-
SIQDNTITPQQLINIRPVIASIKEFFGSSQLSQFMDQTNPLAELTHKRRLSALGPGGLTRERAGMEVRDVHYSHYGRMCPIET-
PEGPNIGLINSLSYAKVNRFGFIETPYRRVDPETGKVTGRIDYLTADEEDNYVVAQANARLDDEGAFFIDDSIVARFRGENTVVSRRN-
RVDYMDVSPKQVVSAAATACIPFLENDDSNRRLMGANMQRQAVPLMQPEAPFVGTGMEYVSGKDSGAIVICKHPGIVERVEAK-
NVWVRRYEEVDGQKVGNLDKYSLLKFVRSNQGTCYNQRPIVSVGDEVVKGELADGPSMELGELALGRNVMGFMTWDG-
YNYEDAIIIMSERLVKDDVYTSIHIEEYSEARDTKLGPEEITRDIPNVGEDALRNLDGRGIIRIGAEVKDGDLLVGKVTGKVTTEL-
TAERLLHAIFGEKAREVRDTSLRVPHGGGGIHDVKVFNREDGDELPPGVNQLRVYIVQKRKISEGDKMAGRHNKNGVISKIL-
PEEDMPYLPDGPIDIMLNPLGVPSRMNIGQVLELHMGMAARYLGIHASPFDGAREEDVWETLEEAGMSRDAKTVLYDGRGTGE-
PFDNRVSVGIMYMIKLAHMMVDDKLHARSTGPYSLVTQQPLGGKAQFGGQRFGEVWALEAYGAAYTLQEILTVKSDDVVGRVK-
TYEIVKGDNVPEPGVPESFKVLIKELQSLGMDVKILSGDEEIEIMRDLDEEDAKQADGLALSGDEEPEETASADVERDVVTKE

Enterococcus faecium NIFS 16S rDNA nucleotide sequence

TATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCG-
 GAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAA-
 CACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATG-
 GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC-
 GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCT-
 GACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACT-
 GTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT-
 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT-
 CATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAG-
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAG-
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT-
 TAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCAT-
 GTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCCTTC-
 GGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCG-
 CAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC-
 GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTA-
 AGCTAATCTCTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCG-
 GATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCCGAAGTC-
 GGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG-
 GAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

Enterococcus faecium NIFS *gyrB* amino acid sequence

MTEERSLVERAKEYDASQIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSTSSEGLHHLVWEIVDNSIDEVLAFATKIHVIIKDNSITVID-
 DGRGIPVDIAKTGRPAVETVFTVLHAGGKFGGGYKVSGLHGVSSVNALSTQLDVKVYKEGNVYQYERRGAVVDDLKII-
 EQDRHGTTVHFTPDPEIFTETTEFDFSKLATRIELAFNRGMRISIEDKREEPVINEYHYDGGIKSYVEYLNANKTVIFPEP-
 VYLEGEQQDIAVEVSMQYTDGYHSNIMSFANNIHTYEGGTHESGFKTALTRVINDYARKQKLMKENDDNLTGEDVREGLTAVISIKH-
 PDPQFEGQTKTKLGNSEVRTVTDRLFSEHFMFLENPSVGRQIVEKLLASRARLAAKRAREVTRRKGALEISNLPGLADC-
 SSNDPEKCELFIVEGDSAGGSAKQGRNREFQAILPIRGKILNVEKASMDKILANEEIRSLFTAMGTGFGEDFDVSKARYHKLVMIT-
 DADVDAHIHRTLLTLFYRYMRPIVEAGYVYIAQPPLYGVKQGNITYVQPKNAEEELKQVVASLPASPKPSVQRYKGLGEMD-
 DHQLWETMDPSNRMMARVSVDDAIAADQIFEMLMGDRVEPRRAFIENAHYVKNLDI

Enterococcus faecium NIFS *rpoB* amino acid sequence

MAGHVVKYKGKRRERSFARISEVLELPNLIEIQTDSYQWFLDEGLREMFEDILPIDDFNGNLSLEFVDYELKEPKYTVAEAR-
 AHDANYSAPLHVTLRLTNRETGEIKAQEVFFGDFPLMTEQGTIINGAERVIVSQLVRSPGVYFHGKVDKNGKEFGGST-
 VIPNRGAWLEMETDAKDISYVRIDRTRKIPLTVLVRALGFGSDDTIFEIFGDSETLRNTVEKDLHKNASDSRTEEGLKDVIYERLRP-
 GEPKTADSSRNLLNARFFDPKRYDLANVGRYKVNKKLDLKRLLNLTAETLVDPETGEIIVEKGTVLTHQVMETLAPFIDNGLNS-
 VTYYPSEDGVVTDPMTVQVIKVFSPRDPEREVNVIGNGYPEAAVKTVRPADIIASMSYFLNLMEGIGNVDDIDHLGNRRIRSVGEL-
 LQNQFRIGLARMERVVRERMSIQDTETLTLPQQLINIRPVVASIKEFFGSSQLSQFMDQTNPLGELTHKRRLSALGPGGLTRDRA-
 GYEVDRDVHYSHYGRMCPIETPEGPNIGLINSLSYAKVNKFGFIETPYRRVDRETGRVTDQIDYLTADIEDHYIVAQANSPLNEDGT-
 FAQDVVMARAQSENLEVSIDKVDYMDVSPKQVVAVATACIPFLENDDSNRMLMGANMQRAVPLINPQAPWVGTMGEYKSAHDS-
 GAALLCKHDGVVEYVDASEIRVRDNGALDKYDVTKFRRSNSGTSYNQRPVHLGEKVEKGDTLADGPSMEQGEMALGQNVLVG-
 FMTWEGYNYEDAIIMSRRLVKDDVYTSIHIEEYSEARDTKLGPEEITREIPNVGEDALKDLDGMGIIRIGAIEVQDGDLLVGKVT-
 PKGVTLSAEERLLHAIFGEKAREVRDTSRVPHGCGGIVHDVKIFTREAGDELSPGVNMLVRVYVQKRKIHEGDKMAGRHNKGV-
 VSRIMPEEDMPFLPDGTPIDIMLNPLGVPSRMNIGQVLEHLGMAARQLGIHVATPVFDGASDEDVWETVREAGMASDAKTVLY-
 DGRTGEPFDGRVSVGVMYMIKLAHMVDDKLHARSIGPYSLVTQQPLGGKAQFGGQRFGEVWALEAYGAAYTLQEILTYKSDDV-
 VGRVKTYEAIKGEPIPKGPVPEFRVLVKELQSLGLDMRVLDIETEIELRDMDEDDDLITVDALTKFAEQQTAKLEKKAEEQVE-
 DERDDVIQNFETAEDLD

Pediococcus pentosaceus NIFS 16S rDNA nucleotide sequence

ATGAGAGTTTGTCTTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGAT-
 TATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAG-
 TAGGGGATAACACCTGGAACACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAGATGGCTCTGCTAT-
 CACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGA-
 GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC-
 GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGG-
 TAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG-
 GTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAAC-
 CGAAGAAGTGCATTGGAAGCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG-
 ATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG-
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAAC-
 GCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAG-
 CATGTGGTTTAAATCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTC-
 GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG-
 CAACCCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC-
 GACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGT-
 TAAGCTAATCTCTTAAACCATTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCG-
 GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGC-
 CGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAG-
 GAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT

Pediococcus pentosaceus NIFS *gyrB* amino acid sequence

MADEKETKAELAREYDASQIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSTSSQGLHHLVWEIIDNGIDEALAGFADKIDVIVEKDNSITVTDN-
 GRGIPVDIQKKTGKPALETFTVTLHAGGKFGGGGYKVSGGLHGVGASVVNALSTELDARVMKDGKIYYIDFALGKVKTTPMKTIG-
 DTEHPDDHGTIVHFVDPDPIDFQETTTYDINILKTRIARELAFLNKGRLITLDMRPEKPTEDDFLYEGGIRHYVEYLNKEGKEVIFPEPI-
 YVEGVTKGITVEVAMQYIEGYQSKLLFTNNIHTYEGGTHEEGFKRALTRVINDYAKNNNILEKENDDKLSGDDVREGLTAVVSVKH-
 PDPQFEGQTKTLGNSDARTAVNEVFAETFNKFLLENPKVARQIVDKGILAAKARVAAKRAREVTRKKSGLLENNLPGLADNTSK-
 DPSISELFIVEGDSAGGSAKSGRSRLTQAILPIRGKILNVEKATLDRVLANEEIRSLFTALGTGFGEFDFVSKANYHKLIMTDAD-
 VDGAIHRTLLTLFYRYMRPMDAGFYVIAQPPLYQVRQGMQIYIDSEDELETVLGQLSPSPKPIQRYKGLGEMDAEQLWETTMN-
 PENRRLLRVSAEDADAASGDFEMLMGDKVEPRRKFIENAVFVKNLDI

Pediococcus pentosaceus NIFS *rpoB* amino acid sequence

MAGHLVKYGKHRTRRSYARIKEVLDPNLIEIQSDSYQWFLDEGLREMFNDIMPIEDFAGKLSLEFVDYQLLEPKYTVDEAREHEA-
 NYSAPLHVTLRLTNHETGEIKSQDVFFGDFPLMTEQGTIINGAERVIVSQLVRSPGVYNNLDTDKNNRKIWGTTPVNRGAWLEYET-
 DAKEISYVRIDRTRKIPMTLVRALGFGSDEEIIDIFGGSDSLDFTLDKDVHKNPESRVAESLKDIYERLRPGEPKTDASSRSL-
 TARFFDPKRYDMAPVGRYKVNKKLSLKTRLLGQTLAETLADPDTGEVIAQKGEVMNVDVMKKLAVFLDRPDFKMVTYQPSEE-
 AVVTEPMTIQVIKVDQPNPDLPTLNMIIGNGNIDAKLKHITPADIISMNYFFLLQDGI GSTDDIDHLGNRRIRSVGELLQNFRIGL-
 SRMERVVRRMSIQDAETVTPQQLINIRPVVAATKEFFGSSQLSQFMDQTNPLGELSHKRRLSALGPGLTRDRAGYEVDR-
 VHYYHYGRMCPIETPEGPNIGLINNLASYGKINRYGFIETPYRRVSWEDHKVTDRIIDYLTADEEDQFVIAQANSPLNDDGSFADDV-
 VMAHESDNIETSIENVDMVSPKQVVAVATACIPFLENDSDNRALMGANMQRQAVPLVDPHSPLIGTGIEYKAAHDSGVALL-
 CQHAGVVEYVDAREVRVRRDDGALDITYKLMKFRRSNGGKNYNQRPVVRVNDKVDADDEVLDGSPMEQGEALGQNPLIAFMT-
 WQGYNFEDAIAINERLVRDDVYTSIHIEEYSEARDTKLGPEEMTREIPNIGEDALRNLDQDGIVRVGAEVEDGDILVGKVTPKG-
 VELSAEERLLHAIFGEKAREVRDTSRVPHGCGGIVQDVKIFTRENGDELSPGVNMMVRVYIAQKRKLQVGDKMAGRHNKGT-
 VSVVIPQEDMPYMPDGTPIIDMLSPMGVPSRMNIGQVLEHLGLMAARNLGIHMTTPVFDGAQDKDIWEAVAEAGMDSDAKSPLY-
 DGRTGEPFEQVRVAVGMHYMKLAHMVDDKIHARSIGPYSLVTQQPLGGKAQFGGQRFGEVWVALEAYGAAYTLQEILTYKSDDV-
 VGRVKTYEAIKGEPIPRGPVPEFRVLVKELQALGLDMKVLGGDDQVELRDMDEEDDDVVNVDALSKYAEKQNEKTNASAE-
 AKAPSTESAPVETKNNQN