

## 고염에서 성장하는 젓갈 유래 Bacteria의 분리 및 고염에서의 생육 특성

안두현 · 이종훈\*  
경기대학교 식품생물공학과

Received : July 18, 2011 / Revised : August 11, 2011 / Accepted : August 12, 2011

**Isolation of Bacteria from Jeotgal Using High-salt-content Media and Their Growths in High-salt Condition. An, Doohyun and Jong-Hoon Lee\***. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – Proteolytic bacteria were isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal* using high-salt-content media and their growths in the media containing 25% NaCl were monitored to draw the role of bacteria in the ripening of *jeotgal*. The most populous genus in *Myeolchi-jeotgal* detected on agar media with 15% NaCl was *Bacillus* and its relatives, while the most populous in *Saeu-jeotgal* was *Staphylococcus*. Among the isolates, *Virgibacillus halodenitrificans* from *Myeolchi-jeotgal* and *Halobacillus trueperi* from *Saeu-jeotgal* showed proteinase activities. The species from *Myeolchi-jeotgal* showed proteinase activity on the agar media with 8% NaCl were similar to those isolated from the media with 15% NaCl. The dominant of *Myeolchi-jeotgal* isolated at the 15% NaCl concentration may be involved in the proteolysis. The proteolytic species from *Saeu-jeotgal* on the agar media with 8% NaCl were the genera *Bacillus*, *Salinicoccus*, and *Salimicrobium* those were not the dominants at 15% NaCl condition. The dominant isolates from *Saeu-jeotgal* on agar media with 15% NaCl may not be involved in the proteolysis of *Saeu-jeotgal*. *Vb. halodenitrificans* and *Staphylococcus equorum*, the dominant species from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal*, showed growths at the nutrient broth containing 25% NaCl. They may play a significant role in the ripening of *jeotgal* and have a high possibility to be used as the starter.

**Key words:** *Jeotgal*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Staphylococcus*

### 서 론

젓갈은 어패류의 근육, 내장 또는 생식소 등에 10~30%의 식염을 첨가하여 부패 변질을 억제하면서 일정기간 숙성 발효시킨 전통 수산가공식품으로, 장류, 침채류와 더불어 우리나라 3대 발효식품 중 하나이다. 유리아미노산 및 정미성분이 풍부하여 단백질 공급원으로써 뿐만 아니라 김치의 부원료나 조미료로써 한국인의 식생활에서 빼놓을 수 없는 주요한 자리를 차지하고 있다. 현재 국내에서 조사된 젓갈류는 침장원 및 원료의 종류, 제조방법 등에 따라 160종의 젓갈과 식해가 알려져 있지만, 산업화가 이루어진 것은 30여 종이며 대부분은 지역특산물로 가내수공업 수준에서 제조되고 있고, 원료의 수급 사정으로 명맥만 유지하는 것도 있다.

1980년대부터는 젓갈의 대중화 및 산업화가 진행되고 있지만 영세한 제조업체가 다수를 차지하고 있어, 제조 및 유통은 다른 발효식품에 비해 취약한 상태에 있다[18]. 그 이유는 1) 고염 식품이라는 점에서 과거에 비해 기호도 및 선

호도가 떨어지고 있으며, 2) 발효숙성기간이 길며, 3) 품질의 규격화가 어렵다. 또한 4) 상품수명이 짧고, 5) 위생적 품질관리가 어려우며, 6) 수송 및 취급이 용이하지 못하기 때문이다. 이러한 문제점의 해결을 위해서는 1) 소비자가 선호하는 새로운 제품의 출시, 2) 숙성발효기술 개발, 3) 젓갈 품질의 표준화 및 품질 평가 방법의 확립, 4) 유통기한 연장 기술의 개발, 5) 젓갈 위해요소의 규명 및 제거 등을 목표로 한 젓갈 제조기술의 과학화 및 현대화가 이루어져야 하며, 이를 위한 기초연구가 진행되어야 한다.

젓갈의 숙성은 원료로부터 유래된 자가소화효소 및 미생물의 효소작용에 의해 단백질이 분해되어 특유의 풍미와 조직감이 형성되는 것으로 알려져 있지만, 그 기작은 정확히 알려져 있지 않다[28]. 또한 젓갈발효 관련 미생물에 대한 연구는 상당히 오래 전부터 진행되어 왔지만, 아직 젓갈의 숙성과 관련된 미생물의 역할에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 초기의 젓갈 미생물 연구에서는 *Acromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Serratia* 속(genus)의 bacteria가 분리되었고, *Saccharomyces* 및 *Torulopsis*와 같은 효모의 존재

\*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9656, Fax: +82-31-253-1165

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

가 보고되었다[2, 9, 15, 16, 24]. 이들 속 중에서 *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas* 속이 빈번히 검출되었고, 호염성 archaea *Halobacterium* 속[1]과 호염성 bacteria *Halomonas* 속[11]이 분리되었으며, 유산균의 존재도 보고되었다[10, 12, 13, 19].

그러나 초기의 미생물 연구에서는 제한된 종류의 배지와 배양조건에서 미생물이 분리되었고, 다양한 종류의 젓갈이 미생물 분리에 사용되어 특정 젓갈에 대한 미생물학적 지식을 얻기에 충분한 연구가 진행되지 못했고, 미생물의 동정이 형태 및 생리학적 특성에 근거한 고전적 동정법에 의해 진행되었다. 최근 들어 계통발생학적 동정법이 미생물의 동정에서 차지하는 비중이 높아짐에 따라 계속적으로 bacteria의 분류학적 위치가 변화하고 있기 때문에 새롭게 젓갈발효 관련 미생물에 대한 연구가 진행되어야 할 필요성이 높아지고 있다.

본 연구그룹은 최근에 6종류의 배지를 이용하여 멸치젓과 새우젓으로부터 분리한 총 610 colony의 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA) 분석에 의한 계통발생학적 동정을 통해 두 젓갈에 존재하는 bacteria의 다양성을 평가하였다[8]. 총 42속, 104종(species) bacteria의 존재가 밝혀졌고, 멸치젓에서는 *Bacillus* 근연 속이, 새우젓에서는 *Staphylococcus* 속이 우점하는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 젓갈의 숙성에 미치는 bacteria의 역할 규명을 목표로 고염에서 성장하며 단백질 분해활성을 나타내는 bacteria를 분리하여 젓갈 숙성에 가장 큰 영향을 미칠 것으로 추정되는 우점균의 고염환경에서의 생장을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 젓갈 시료 및 고염에서 성장하는 bacteria 선발

호염성 또는 내염성 bacteria 분리를 위한 멸치젓과 새우젓은 수원시 소재 재래시장에서 각각 4종씩 구입하였고, 멸균한 거즈로 걸러 분리한 젓갈시료의 여액을 bacteria 선발에 사용하였다. 여액은 멸균한 생리식염수를 이용하여 bacteria의 분리가 가능한 농도로 희석한 다음, 고체배지에 도달하여 20°C에서 48시간 이상 배양하며 관찰하였다. Bacteria 분리에 사용한 배지는 1.5%(w/v) 한천을 첨가한 nutrient medium(Difco, USA)과 marine medium(MBcell, Korea)을 사용하였고, 각 배지의 NaCl 최종농도는 8%(w/v) 또는 15%(w/v)가 되도록 첨가하였으며, 단백질 분해활성 보유 균주 선발을 위해 2%(w/v)의 skim milk(Difco)를 각 배지에 추가로 첨가하였다. 가능한 다양한 colony의 선발을 위하여 각 배지에서 성장한 colony들 중, 외관상 크기, 색, 모양 그리고 skim milk 분해에 의한 투명환(clear zone) 생성 여부 등의 형태학적 특성에 따라 각 시료 당 5개 정도의 colony를 선발하였고, colony 선발과정과 동일한 배지를 사용하여 순수분리하였다. 여액의 NaCl 농도는 식품공전에 따

라 측정하였고, pH는 pH meter를 사용하여 측정하였다.

### 선발 균주의 동정

선발된 bacteria는 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 계통 발생학적으로 동정하였다. 분리된 bacteria의 16S rDNA 증폭은 DNeasy tissue kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출된 DNA를 PCR 하거나 colony PCR을 이용하여 수행하였다. PCR 증폭에 사용된 primer는 다양한 미생물의 증폭에 사용되는 eubacterial universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다[14]. PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였고, 50 µL PCR 반응계에는 template DNA 또는 소량의 colony, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase(Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C에서 1분간 변성, 57°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit(SolGent, Korea)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EzTaxon server 2.1[3]에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주(type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

### 고염배지에서의 생육 측정

고염 조건에서의 분리 균주들의 생육은 25%(w/v)의 NaCl을 첨가한 nutrient medium을 이용하여 측정하였다. 3% NaCl이 첨가된 nutrient medium에서 전배양한 균주들을 15% NaCl이 첨가된 nutrient medium에 접종하여 적응시킨 다음, NaCl이 25% 첨가된 본배양 배지에 1%(v/v) 접종한 후, 30°C에서 정배양과 교반배양을 통하여 50일간 배양하면서 생균수의 변화를 측정하였다. 시료의 채취는 20일까지는 5일 간격으로 수행하였고, 그 후에는 10일 간격으로 수행하였다. 채취한 배양액은 적당한 농도로 희석하여 NaCl을 3% 첨가한 nutrient agar에 도말하고, 30°C 미호기적 조건에서 48시간 배양하여 배지에 형성된 colony를 계수하여 생육 곡선을 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### NaCl 농도 15%에서 성장하는 bacteria

멸치젓과 새우젓 시료 각 4종을 여과하여 얻어진 여액의 pH와 염도는 시료에 따라 약간의 차이는 있었지만, 평균 pH는 5.6과 7.4로 나타났고, 평균 염도는 27.4%(w/v)와 22.3%

(w/v)로 측정되었다(Table 1). 멸치젓의 염도가 새우젓에 비해 높은 것으로 나타났고, 새우젓의 pH는 중성으로 기존에 보고된 다른 종류의 젓갈에 비해 다소 높은 것으로 나타났다[28]. 새우젓의 pH가 중성을 나타내는 원인 중의 하나로 새우껍질에 포함된 calcium ion의 유리를 들 수 있다[4].

본 연구자들의 선행연구에서 젓갈에서 분리한 우점 균주를 대상으로 다양한 농도의 NaCl이 첨가된 nutrient agar에서의 단백질 분해활성을 검토한 결과, 15% 이상의 농도에서는 단백질 분해활성을 확인할 수 없었다[8]. 따라서 본 연구에서는 15% 이상의 NaCl 농도에서 단백질 분해활성을 나타내는 균주의 선별을 시도하였다. NaCl 15%와 skim milk 2%가 첨가된 nutrient agar와 marine agar에서 성장한 colony들 중, 멸치젓으로부터 총 30균주가 순수분리되었고, 그 중 3균주가 투명환을 형성하였다. 새우젓으로부터는 37균주가 분리되어, 1균주가 투명환을 형성하였다. 총 67균주의 동정 결과 12속, 18종의 bacteria가 분리된 것으로 나타났다(Table 2). 배지에 따라 분리되는 bacteria의 종류에는 크

게 차이가 나지 않았지만, NaCl 농도 15%에서 멸치젓과 새우젓으로부터 분리되는 bacteria의 종류는 차이가 있는 것으로 나타났다. 멸치젓으로부터는 *Bacillus* 속과 *Lentibacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus* 속의 *Bacillus* 근연 속이 주로 분리되었다. 새우젓으로부터는 *Staphylococcus* 속이 주로 분리되었지만, *Salinicoccus*와 *Salimicrobium* 속도 다수 분리되었다. 계통발생학적으로 유산균으로 분류되는 *Tetragenococcus* 속 균주들은 멸치젓과 새우젓 모두로부터 분리되었다. 젓갈 유래 bacteria의 다양성을 평가한 본 연구자들의 선행연구에서는 *Tetragenococcus* 속이 멸치젓에서만 분리되었고, NaCl이 15% 첨가된 배지에서만 분리되었다[8]. 저염배지에서는 분리되지 않는 것으로 보아 *Tetragenococcus* 속 균주들은 내염성(halotolerant)이라기 보다는 호염성(halophilic) bacteria로 추정되고, 분리원에 관계 없이 고염상태에서 널리 분포하는 것으로 추정된다.

멸치젓으로부터 *Virgibacillus halodenitrificans*는 총 6균주가 분리되었지만, 3균주만이 NaCl이 15% 첨가된 배지에서

**Table 1. The pHs and salt concentrations of samples.**

Sample <sup>a</sup>	<i>Myeolchi-jeotgal</i>				<i>Saeu-jeotgal</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
pH	5.7	5.6	5.4	5.6	7.5	7.6	7.5	7.1
Salt concentration (%)	28.6	24.4	30.2	26.3	20.8	24.4	21.6	22.4

<sup>a</sup>Sample number was arbitrarily mentioned.

**Table 2. Numbers of the bacteria isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal* using media containing 15% NaCl.**

Genus	Species	<i>Myeolchi-jeotgal</i>		<i>Saeu-jeotgal</i>	
		Marine agar + 13% NaCl	Nutrient agar + 15% NaCl	Marine agar + 13% NaCl	Nutrient agar + 15% NaCl
<i>Bacillus</i>	<i>B. hwajinpoensis</i>	2	1		
<i>Halobacillus</i>	<i>Hb. trueperi</i>				1 (1)
<i>Kocuria</i>	<i>K. palustris</i>				1
<i>Lentibacillus</i>	<i>Lb. salicampi</i>	1	4		
<i>Nesterenkonia</i>	<i>N. halobia</i>				1
<i>Oceanobacillus</i>	<i>Ob. picturae</i>		3		
<i>Pontibacillus</i>	<i>Pb. chungwhensis</i>				1
<i>Salimicrobium</i>	<i>Sm. flavidum</i>			4	
<i>Salinicoccus</i>	<i>Sc. roseus</i>				4
	<i>Sc. salsiraiiae</i>			3	2
	<i>Sc. siamensis</i>			1	
<i>Staphylococcus</i>	<i>St. caprae</i>				1
	<i>St. equorum</i>			7	8
	<i>St. saprophyticus</i>				1
<i>Tetragenococcus</i>	<i>T. halophilus</i>	1		1	1
	<i>T. muriaticus</i>	5	2		
<i>Virgibacillus</i>	<i>Vb. halodenitrificans</i>	1	6 (3)		
	<i>Vb. necropolis</i>		4		
Total		10	20 (3)	16	21 (1)

NaCl was added to each medium to become 15% (w/v) final concentration. Each medium was supplemented with 2% skim milk for protease activity confirmation. The numbers of proteolytic bacteria among the identified isolates are indicated in parenthesis.

단백질 분해활성을 나타내었다. 선행연구에서 동일한 방법을 이용하여 단백질 분해활성을 검토한 *Vb. halodenitrificans* 균주 KM2100의 경우, 12% NaCl이 첨가된 배지에서는 활성이 나타났지만, 15% 농도에서는 활성이 나타나지 않았다 [8]. 이러한 결과로 보아 단백질 분해활성을 나타내지 않은 3균주는 단백질 분해활성이 없는 균주 또는 아종(subspecies) 이라기 보다는 15% 이하의 NaCl 농도에서 활성을 갖는 protease를 생성하거나 분비하는 균주로 추정된다. 따라서 *Vb. halodenitrificans*의 NaCl 농도에 따른 단백질 분해활성은 균주 특이적인 현상으로 해석된다. 단백질 분해활성을 나타낸 새우젓 유래 1균주는 *Halobacillus trueperi*로 동정되었다. *Hb. trueperi*의 검출빈도가 높지 않고, 선행연구[8]에서도 분리되지 않았지만, *Virgibacillus*와 함께 같은 과(family) *Bacillaceae*에 속한다는 점을 고려하면 젓갈발효와 관련성이 높은 종으로 추정된다.

각 배지로부터 분리되어 동정된 개체수가 고염에서의 우점종에 대한 결론을 내리기에 충분하지 않지만, 멸치젓에서는 *Virgibacillus* 속이 새우젓에서는 *Staphylococcus* 속이 우점하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 연구자들이 6종의 배지를 이용하여 bacteria를 분리한 선행연구[8]와 일치하는 결과로, 고염에서 성장 가능한 bacteria가 젓갈발효의 우점종으로 추정된다.

#### NaCl 농도 8%에서 단백질 분해활성을 보유한 bacteria

생선을 비롯한 해산물에서 유래하는 단백질 분해효소와 미생물이 분비하는 효소의 작용이 젓갈의 풍미 생성과 깊은 관련이 있는 것으로 알려지고 있지만, 미생물의 단백질 분해효소가 젓갈의 숙성에 미치는 역할은 아직 규명되지 못했다 [7, 17, 28]. NaCl이 15% 첨가된 배지에서 단백질 분해활

성을 나타낸 bacteria는 2종에 불과하지만, 본 연구자들의 선행연구에서 단백질 분해활성이 염농도에 따라 다르게 나타남을 확인한 바 있다 [8]. 따라서 보다 다양한 단백질 분해활성 보유 bacteria의 분리를 위하여 NaCl의 함량을 8%로 낮추고 skim milk를 2% 첨가한 nutrient agar와 marine agar를 이용하여 투명환을 생성하는 균주들을 선발하였다 (Table 3).

멸치젓에서 분리된 단백질 분해활성 보유 bacteria는 *Vb. halodenitrificans*를 중심으로 한 *Bacillus* 근연 속이 분리되어 NaCl 농도 15%에서 성장하는 bacteria의 군집과 크게 다르지 않은 것으로 나타났다. 그러나 새우젓으로부터 분리된 단백질 분해활성 보유 bacteria는 NaCl 농도 15%에서 분리된 bacteria의 군집과 달리 *Bacillus* 속과 *Planococcus*, *Salinivibrio* 속이 분리되었고, *Kytococcus sedentarius*가 1종의 시료로부터 8균주 분리되었다. 새우젓에서 우점하는 *Staphylococcus*, *Salinicoccus*, *Salimicrobium* 속이 8% NaCl이 존재하는 환경에서 단백질 분해활성을 나타내지 않는 점으로 미루어 멸치젓의 우점종과 달리 새우젓의 우점종은 단백질 분해가 아닌 다른 역할을 하고 있는 것으로 추정된다. 젓갈과 재료 및 제조방법이 비슷한 fish sauce의 경우 *Staphylococcus* 속 bacteria가 풍미 형성과 관련이 있는 것으로 보고되었고 [6, 7], 새우젓의 경우, *Staphylococcus equorum*이 고염에서 우점으로 검출되었기 때문에 *Staphylococcus* 속은 젓갈의 풍미와 깊은 관련이 있는 미생물로 추정된다.

NaCl이 8% 첨가된 배지에서 단백질 분해활성을 나타낸 bacteria는 총 7개 속, 12종이 분리되었고, 선행연구[8]에서 분리되지 않았던 *Halobacillus*와 *Kytococcus* 속이 새롭게 분리되었다. *Halobacillus* 속의 *Hb. trueperi*는 15% NaCl 배지에서는 새우젓으로부터 분리되었지만, 8% NaCl이 함유된

**Table 3. Numbers of the proteolytic bacteria isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal* using media containing 8% NaCl.**

Genus	Species	<i>Myeolchi-jeotgal</i>		<i>Saeu-jeotgal</i>	
		Marine agar + 6% NaCl	Nutrient agar + 8% NaCl	Marine agar + 6% NaCl	Nutrient agar + 8% NaCl
<i>Bacillus</i>	<i>B. hwajinpoensis</i>			1	
	<i>B. vietnamensis</i>	1	1		4
<i>Halobacillus</i>	<i>Hb. trueperi</i>	1			
<i>Kytococcus</i>	<i>Kc. sedentarius</i>			3	5
<i>Oceanobacillus</i>	<i>Ob. picturae</i>	2		1	
	<i>Pc. maritimus</i>			1	1
<i>Planococcus</i>	<i>Pc. rifietoensis</i>				2
	<i>Sv. costicola</i>				1
<i>Virgibacillus</i>	<i>Sv. siamensis</i>			1	
	<i>Vb. carmonensis</i>	1			
	<i>Vb. halodenitrificans</i>	2	8		
	<i>Vb. necropolis</i>	4			
Total		11	9	7	13

NaCl was added to each medium to become 8% (w/v) final concentration. Each medium was supplemented with 2% skim milk for protease activity confirmation.

배지를 이용한 경우 멸치젓으로부터 분리된 점으로 보아 두 젓갈 모두에서 성장 가능한 종으로 추정된다. NaCl이 8% 함유된 배지를 사용한 경우, 멸치젓으로부터는 *Vb. halodenitrificans*가 가장 많이 분리되었지만, 새우젓으로부터는 *Kc. sedentarius*가 가장 많이 분리되었다. *Vb. halodenitrificans*는 4종의 시료로부터 분리되었지만, *Kc. sedentarius*는 1종의 시료로부터만 분리되어 우점종은 아닌 것으로 추정된다. 한편, *Kc. sedentarius*는 식품으로부터 검출된 바 없는 bacteria로 아직 병원성에 대해 정확히 알려지진 않았지만, 폐렴이나 손톱질환, 복막염 등과 관련이 있는 것으로 보고되었다[21, 22, 26]. *Kc. sedentarius*는 keratin을 분해하는 단백질 분해활성이 있는 것으로 보고되었고, 본 연구에서도 단백질 분해활성이 확인되었으며, 젓갈의 숙성이 단백질 분해와 깊은 관련이 있기 때문에 젓갈발효 관련성을 완전히 배제할 수 없다. 현 단계에서는 제조과정 중의 오염으로 예상하고 있지만, 병원성균이 고염식품인 젓갈에서 생존할 수 있다는 가능성이 제시되었기 때문에 젓갈의 위생적 제조의 필요성이 제시된 한 예라 할 수 있다.

**호염성 및 내염성 균주의 고염배지에서의 성장**

선발된 균주들의 젓갈 숙성과정에서의 변화 예측 및 종균으로써의 적용가능성을 검토하기 위하여 높은 빈도로 선발된 균주들을 대상으로 25% NaCl이 함유된 액체배지에서의 생육을 50일간 모니터링하였다. 멸치젓의 경우 단백질을 분해활성을 보유한 *Vb. halodenitrificans*와 본 실험에서의 검출 빈도를 고려하여 *Tetragenococcus muriaticus*, *Lentibacillus salicampi*, *Oceanobacillus picturae*를 대상으로 하였고(Fig. 1), 새우젓으로부터는 단백질을 분해활성을 보유한 *Hb. trueperi*와 검출빈도가 높은 *St. equorum*, *Salinicoccus salsiraiiae*, *Salimicrobium flavidum*을 대상으로 하였다(Fig. 2).

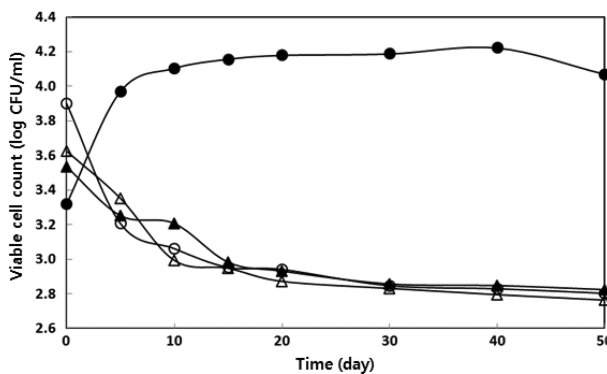
멸치젓 유래의 4균주 중, *Vb. halodenitrificans*는 접종 후, 약 10배가 증가하여 배양 10일 이후로 일정한 수준을 유지

하였지만, 나머지 3균주는 배양 20일까지 서서히 감소하다가 일정 수준을 유지하였다. 배양 30일 이후의 *Vb. halodenitrificans*와 3균주와의 개체수는 약 100배 정도의 차이가 있는 것으로 나타났다.

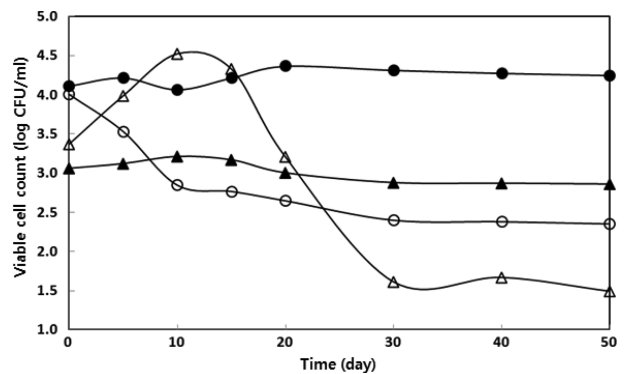
새우젓 유래의 균주들 중, *St. equorum*과 *Sm. flavidum*은 NaCl이 25% 첨가된 배지에서 활발히 증식하지는 않지만 초기의 균수를 유지하는 것으로 나타났고, *Sc. salsiraiiae*는 배양 10일까지 감소하다가 개체수를 유지하는 것으로 나타났다. 한편 NaCl 농도 15%에서 단백질 분해활성을 나타내는 *Hb. trueperi*는 초기에 증식하다가 급격히 감소하여 일정 수준을 유지하는 것으로 나타났다.

NaCl 농도 15% 고체배지에서 분리된 이들 8종 bacteria를 NaCl이 15% 첨가된 액체배지에서 5일간 전배양하여 NaCl이 25% 함유된 액체배지에 1%(v/v) 접종한 후, 측정된 0일차의 생균수는 10<sup>3</sup>에서 10<sup>4</sup> CFU/mL 정도로 계수되어 15% NaCl 농도에서의 증식이 활발하지 않은 것으로 나타났고, 25% NaCl 농도에서는 완전히 사멸하지는 않지만, 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 단백질을 분해활성을 보유한 *Vb. halodenitrificans*와 *Hb. trueperi*는 생육이 가능한 것으로 나타났고, 증식이 정지하거나 감소하는 시점이 배양 10일 경이라는 점을 고려하면 이들 균주들의 고염에서의 생장은 단백질 분해활성과 관련이 있는 것으로 추정된다.

8종 bacteria의 생장이 교반배양과 정지배양 간의 차이가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 8종 bacteria의 표준균주를 대상으로 산소 요구를 조사해 본 결과, 4종(*Hb. trueperi*, *Lb. salicampi*, *Sm. flavidum*, *St. equorum*)은 호기성균[23, 27, 29, 31]으로 나머지 4종(*Ob. picturae*, *Sc. salsiraiiae*, *T. muriaticus*, *Vb. halodenitrificans*)은 편성혐기성균[5, 20, 25, 30]으로 보고되어 산소 공급에 따른 생장의 차이가 예상되지만, 배양법에 따른 생육의 차이가 없는 것으로 보아 고염환경에서의 이들 bacteria의 생장은 산소에 의한 영향이 크지 않은 것으로는 추정된다.



**Fig. 1.** Growth of the bacteria isolated from *Myeolchi-jeotgal* in high-salt (25% NaCl) environment. Isolates: *Virgibacillus halodenitrificans* (●), *Tetragenococcus muriaticus* (○), *Oceanobacillus picturae* (▲), *Lentibacillus salicampi* (△).



**Fig. 2.** Growth of the bacteria isolated from *Saeu-jeotgal* in high-salt (25% NaCl) environment. Isolates: *Staphylococcus equorum* (●), *Salinicoccus salsiraiiae* (○), *Salimicrobium flavidum* (▲), *Halobacillus trueperi* (△).

고염배지에서 다수가 검출된 *Vb. halodenitrificans*와 *St. equorum*의 젓갈 숙성 중의 역할은 규명되지 않았지만, 고염에서 생장이 가능하고 가장 높은 내염성을 나타내었기 때문에 멸치젓과 새우젓의 우점종으로 자리잡은 것으로 추정된다. 한편 *Hb. trueperi*의 경우, 고염에서 단백질 분해활성을 나타내지만 내염성이 높지 않아 우점종으로 발전하지 못하는 것으로 추정된다. *Vb. halodenitrificans*와 *St. equorum*는 25% NaCl 농도에서 사멸하지 않는 내염성을 가지고 있는 것으로 규명되었기 때문에 젓갈발효의 기준으로 적용될 높은 가능성을 가지고 있으며, 향후 이들의 젓갈 숙성과정 중의 역할 규명이 요구된다.

## 요 약

젓갈의 숙성에 미치는 bacteria의 역할 규명을 목표로 고염에서 생장하며 단백질 분해활성을 나타내는 bacteria를 멸치젓과 새우젓으로부터 분리하여 이들의 고염에서의 생장을 검토하였다. NaCl이 15% 첨가된 고체배지를 이용하여 bacteria를 분리한 경우, 멸치젓으로부터는 *Bacillus* 및 근연속이, 새우젓으로부터는 *Staphylococcus* 속이 우점으로 분리되었고, 멸치젓으로부터 분리된 *Virgibacillus halodenitrificans*와 새우젓으로부터 분리된 *Halobacillus trueperi*가 단백질 분해활성을 나타내었다. NaCl이 8% 첨가된 고체배지에서 단백질 분해활성을 나타낸 멸치젓 유래 bacteria는 *Vb. halodenitrificans*를 중심으로 한 *Bacillus* 근연속으로 NaCl 농도 15%에서 생장하는 bacteria의 군집과 크게 다르지 않았다. 그러나 NaCl이 8% 첨가된 고체배지에서 단백질 분해활성을 나타낸 새우젓 유래 bacteria는 NaCl 농도 15%에서 분리된 우점균 *Staphylococcus*, *Salinicoccus*, *Salimicrobium* 속이 아닌 *Bacillus* 속과 *Planococcus*, *Salinivibrio* 속으로 확인되어 새우젓의 우점종은 단백질 분해와 큰 관련이 없는 것으로 추정된다. 멸치젓의 우점종 *Vb. halodenitrificans*와 새우젓의 우점종 *Staphylococcus equorum*은 NaCl이 25% 첨가된 배지에서도 생장을 나타내어 젓갈 숙성과 높은 관련성을 가지고 있으며, 기준으로 이용될 높은 가능성을 가지고 있다.

## Acknowledgement

This work was supported by the 2011 grant from the Ministry for Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (#311041-3).

## REFERENCES

1. Ahn, Y.-S., C.-J. Kim, and S.-H. Choi. 1990. Production of protease by the extreme halophile, *Halobacterium* sp. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **33**: 247-251.

2. Cha, Y.-J., S.-Y. Cho, K.-S. Oh, and E.-H. Lee. 1983. Studies on the processing of low salt fermented sea foods (2. The taste compounds of low salt fermented sardine). *Bull. Korean Fish. Soc.* **16**: 140-146.
3. Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, and Y.-W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259-2261.
4. Evers, D. J. and D. J. Carroll. 1998. Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **71**: 241-249.
5. Franca, L., F. A. Rainey, M. F. Nobre, and M. S. da Costa. 2006. *Salinicoccus salsiraiiae* sp. nov.: a new moderately halophilic gram-positive bacterium isolated from salted skate. *Extremophiles* **10**: 531-536.
6. Fukami, K., M. Satomi, Y. Funatsu, K.-I. Kawasaki, and S. Watabe. 2004. Characterization and distribution of *Staphylococcus* sp. implicated for improvement of fish sauce odor. *Fisheries Sci.* **70**: 916-923.
7. Fukami, K., Y. Funatsu, K. Kawasaki, and S. Watabe. 2004. Improvement of fish-sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (Moromi) made from frigate mackerel. *J. Food Sci.* **69**: FMS45-49.
8. Guan, L., K. H. Cho, and J.-H. Lee. 2011. Analysis of the cultivable bacterial community in *jeotgal*, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.* **28**: 101-113.
9. Hur, S. H. 1996. Critical review on the microbiological standardization of salt-fermented fish product. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**: 885-891.
10. Jeun, J.-H., H.-D. Kim, H.-S. Lee, and B.-H. Ryu. 2004. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced gamma-aminobutyric acid (GABA) from traditional salt fermented anchovy. *Korean J. Food Nutr.* **17**: 72-79.
11. Jung, Y. J. and D. H. Park. 2004. Physiology and growth properties of halophilic bacteria isolated from jeotgal (salted seafood). *Korean J. Microbiol.* **40**: 263-268.
12. Kim, H.-J., N.-K. Lee, S.-M. Cho, K.-T. Kim, and H.-D. Paik. 1999. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria by lactacin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 from fermented fish food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 1035-1043.
13. Kim, S.-J., S.-J. Ma, and H.-L. Kim. 2005. Probiotic properties of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Korean traditional food, *Jeot-gal*. *Korean J. Food Preserv.* **12**: 184-189.
14. Lane, D. J. 1991. 16S-23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
15. Lee, K. H. 1969. Microbiological and enzymological studies on the flavor components of sea food pickles. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **11**: 1-6.
16. Lee, J.-G. and W.-K. Choe. 1974. Studies on the variation of microflora during the fermentation of anchovy, *Engraulis*

- japonica*. *Bull. Korean Fish. Soc.* **7**: 105-114.
17. Lee, C.-H. 1989. Fish fermentation technology. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 645-654.
  18. Lee, W. D. 2001. Recent development of jeotgal (traditional Korean fermented seafood) and its future. *Food Ind. Nutr.* **6**: 23-27.
  19. Lee, N.-K., H.-W. Kim, S.-Y. Choi, and H.-D. Paik. 2003. Some probiotic properties of some lactic acid bacteria and yeasts isolated from Jeotgal. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 297-300.
  20. Lee, J.-S., J.-M. Lim, K. C. Lee, J.-C. Lee, Y.-H. Park, and C.-J. Kim. 2006. *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 251-257.
  21. Levens, H., P. Donnelly, N. Blijlevens, P. Verweij, H. Shirango, and B. de Pauw. 2004. Fatal hemorrhagic pneumonia caused by infection due to *Kytococcus sedentarius*-a pathogen of passenger? *Ann. Hematol.* **83**: 447-449.
  22. Longshaw, C. M., J. D. Wright, A. M. Farrell, and K. T. Holland. 2002. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 810-816.
  23. Place, R. B., D. Hiestand, H. R. Gallmann, and M. Teuber. 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 30-37.
  24. Sands, A. and E. V. Crisan. 1974. Microflora of fermented Korean seafoods. *J. Food Sci.* **39**: 1002-1005.
  25. Satomi, M., B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, and T. Fujii. 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 832-836.
  26. Sims, D., T. Brettin, J. C. Detter, C. Han, A. Lapidus, A. Copeland, T. G. D. Rio, M. Nolan, F. Chen, S. Lucas, H. Tice, J.-F. Cheng, D. Bruce, L. Goodwin, S. Pitluck, G. Ovchinnikova, A. Pati, N. Ivanova, K. Mavromatis, A. Chen, K. Palaniappan, P. D'haeseleer, P. Chain, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, S. Schneider, M. Göker, R. Pukall, N. C. Kyrpides, and H.-P. Klenk. 2009. Complete genome sequence of *Kytococcus sedentarius* type strain (541<sup>T</sup>). *Stand. Genomic Sci.* **1**: 12-20.
  27. Spring, S., W. Ludwig, M. C. Marquez, A. Ventosa, and K.-H. Schleifer. 1996. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 492-496.
  28. Um, M.-A. and C.-H. Lee. 1996. Isolation and identification of *Staphylococcus* sp. from Korean fermented fish products. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 340-346.
  29. Yoon, J.-H., K. H. Kang, and Y.-H. Park. 2002. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 2043-2048.
  30. Yoon, J.-H., T.-K. Oh, and Y.-H. Park. 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariet al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2163-2167.
  31. Yoon, J.-H., S.-J. Kang, K.-H. Oh, and T.-K. Oh. 2009. *Salimicrobium flavidum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2839-2842.