

## 젓갈 프로바이오틱 생균의 내산성 및 내담즙 특성

이나경 · 김현욱 · 최신양<sup>1</sup> · 백현동<sup>2\*</sup>

경남대학교 생명과학부, <sup>1</sup>한국식품개발연구원, <sup>2</sup>건국대학교 동물생명과학부

**Some Probiotic Properties of Some Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from Jeot-gal.** Lee, Na-Kyoung, Hyeon-Wook Kim, Shin-Yang Choi<sup>1</sup>, and Hyun-Dong Paik<sup>2\*</sup>. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, <sup>1</sup>Korea Food Research Institute, Seongnam, Kyonggido 463-420, Korea, <sup>2</sup>Division of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – In order to select probiotics with a high survival rate in gut and the growth inhibition of virulent pathogens to human beings or animals, we have screened lactic acid bacteria and yeasts from Jeot-gal to assess resistance against the artificial gastric acid and bile juice. Lactic acid bacteria and yeasts isolated were incubated for 24 h in artificial bile juice after incubation for 2 h in artificial gastric acid. Especially, strain HW161 and strain NK181 showed the higher survival for 2 h incubation in artificial gastric acid. All of 3 strains of lactic acid bacteria and 2 strains of yeast were showed higher growth rate than the control in artificial bile. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria and yeasts was also investigated to prove efficacy as probiotic organisms. Lactic acid bacteria were shown the inhibition of Gram positive and negative bacteria, but yeasts narrow inhibition.

**Key words:** Probiotics, lactic acid bacteria, yeast, gastric acid, bile juice, antimicrobial activity

한국인의 식생활에 중요한 위치를 차지하고 있는 젓갈류는 어패류를 원료로 하는 여러 종류의 미생물과 효소작용에 의한 전통발효식품이다. 이는 특유의 맛과 유리 아미노산 및 정미 성분이 풍부하여 단백질 공급원으로서 뿐만 아니라 김치의 부원료나 조미료로써 우리의 식생활과 밀접한 식품이다. 젓갈에서는, 대부분이 내염성으로 호기성과 혐기성균이 공존하고, 발효속성에는 주로 *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus* 및 *Sarcina litoralis* 등이 관련하는 것으로 알려져 있다[9].

프로바이오틱 생균제는 살아있는 균주를 섭취하게 한다는 점에서 항생제의 첨가로 야기될 수 있는 잔류 및 내성문제를 해결하는 항박테리아제로 장내 미생물군의 균형 유지와 대장균의 감소를 통한 성장 촉진 등의 효과를 나타내는 신생 성장촉진제라 할 수 있다[4, 10, 12]. 생균제로서의 조건은 안전성, 기능성 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 촉진능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능 등), 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조과정 중의 생존성 등), 그리고 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내에서 생존력이 커야 한다는 것 등이다[1, 2, 11, 14].

본 연구의 목적은 젓갈로부터 GRAS 미생물로 알려져 있

는 유산균 및 효모를 분리하여, 프로바이오틱 생균의 주요 특성인 인공위액 및 인공담즙에 대한 내성 및 항균성을 검토하여 우수한 프로바이오틱 생균의 선별을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

균 분리원인 젓갈은 마산지역의 대형 마트와 가정에서 수집하였으며, 젓갈의 종류는 오징어젓, 갈치속젓, 꼴뚜기젓, 멸치젓 등으로 20여 종류였다. 분리방법은 일반적인 도말법을 이용하여 분리하였다. 사용된 배지는 *Lactobacillus* 균주를 분리하기 위해 LBS 배지(BBL)를, 정미성을 얻기 위한 효모를 분리하기 위해 PDA 배지(Difco, pH 3.5로 조정)를 이용하였고, 배양온도는 32°C이었다. 젓갈로부터 유산균 16 균주, 효모 14 균주를 분리하였다.

프로바이오틱 생균으로서 가져야 할 특성이 여러 가지가 있는데, 이 중에서 가장 중요한 특성 중 하나가 생존력이 높아야 한다는 점이다. 구강을 통하여 섭취되는 균은 위와 십이지장을 통해 생존하여 최종 목적 부위인 장에 도달하게 된다. 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 된다[3,6]. 하지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸율이 어느 정도 감소하게 된다.

인공위액은 Kobayashi의 방법에 따라 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 1% pepsin을 첨가하여 사용하였다[8]. 인공위액에 대한 내성을 실험하기 위해 각 균주의 배양액을 eppendorf tube에 1 ml를 넣은 후, 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 배양 상등액을 버리고 균체

\*Corresponding author

Tel: 82-2-2049-6011, Fax: 82-2-455-1044

E-mail: hdpaik@konkuk.ac.kr

만을 회수하였다. 회수된 균체는 다시 인공위액을 상등액과 동량 인공위액에 첨가하여 37°C, 2시간 동안 배양하여 총균수를 측정하였다. Control은 pH를 조절하지 않고, pepsin을 첨가하지 않은 각각의 broth를 사용하여 실험하였다. 인공위액에서의 실험결과, 유산균 중에서는 NK32, NK34, NK171, NK181 균주의 생존율이 눈에 띄게 높았다. 효모에서는 HW11, HW81, HW161 균주가 높은 생존율을 보였다. 이외의 다른 유산균과 효모들도 기존의 프로바이오틱 생균에 비해 비교적 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 조[2] 등에 의해 내산성을 실험한 위액에 의한 미생물의 사멸작용의 주요인이 HCl에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀졌고, 내산성의 실험으로 생존율이 높은 *L. fermentum* YL-3을 분리한 바 있다. 이 유산균인 경우, pH는 2.0까지 실험되었었고, 2시간이 지난 후 10% 정도의 비교적 높은 생존율을 보였다. 김 등[7]은 프로바이오틱 생균의 pH에 대한 영향으로, pH 4에서 *Lactobacillus* 균주는 대략 1% 정도의 생존율을 보인다고 보고하였다. 본 실험에서 첫걸에서 분리된 NK161 균주와 HW181 균주는 50% 정도의 높은 생존율을 얻을 수 있었으며, 이는 기존의 보고된 논문과 비교할 때 매우 우수한 내산성을 가지고 있다고 판단되었다.

섭취된 프로바이오틱 생균이 장에 도달하기 위해서 위를

거쳐 체장과 십이지장을 통과하게 된다. 이 부위에서 분비되는 담즙액에 대한 내성 또한 프로바이오틱 생균이 가져야 할 중요한 특성이다[3, 5]. 인공담즙액은 멸균된 각각의 broth에 멸균한 0.1% oxgall 용액을 첨가하여 사용하였다. 인공담즙산 내성을 실험하기 위해서 인공위액을 거친 배양액을 인공담즙액이 있는 test tube에 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 총균수를 측정하였다. Control은 oxgall이 첨가되지 않은 각각의 broth에 위와 같은 방법으로 실험하였다. 인공담즙에 대한 내성은, 인공위액(pH 2.5)을 통과한 인공담즙(0.1% oxgall 첨가)에서 배양한 결과, 유산균과 효모의 생존율은 6%에서 부터 100% 이상까지의 생존율을 보였다(Table 2). 이들 중 NK161 균주와 HW181 균주는 0.3% oxgall을 첨가하였을 때, 각각 56.8%, 125%의 높은 생존율을 확인할 수 있었다. 100%이상의 생존율은 oxgall에 의해 저해받기 보다는 생육의 촉진을 의미한다. 한편, 신 등[13]도 *Lactobacillus* 균주의 경우, 0.3% bile salt를 첨가하였을 때, 1~100% 정도의 생존율을 나타내었다.

프로바이오틱 생균의 항균활성을 측정하기 위해 deferred method를 사용하였다. 즉, 프로바이오틱 생균을 배양한 후, 건조된 agar plate 표면에 3 µl를 spot하고 각 배양온도에서 24시간 배양하였다. 분리균주를 대상으로 실험한 결과, 유산

**Table 1. Survival of probiotic lactic acid bacteria and yeasts isolated from Jeot-gal in artificial gastric acid.**

Strains	Control (CFU/ml)	Pepsin (pH 2.5) (CFU/ml)	Survival (%)	Strains	Control (CFU/ml)	Pepsin (pH 2.5) (CFU/ml)	Survival (%)
<b>Lactic acid bacteria</b>				NK161	3.1×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	4.39
NK21	1.2×10 <sup>9</sup>	4.1×10 <sup>5</sup>	0.03	NK162	1.7×10 <sup>9</sup>	3.3×10 <sup>7</sup>	1.94
NK32	2.5×10 <sup>8</sup>	3.5×10 <sup>7</sup>	14.0	NK171	3.7×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	33.5
NK33	6.0×10 <sup>8</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	0.10	NK172	4.1×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	0.29
NK34	1.6×10 <sup>8</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	10.4	NK181	6.4×10 <sup>8</sup>	3.4×10 <sup>8</sup>	52.6
NK41	8.9×10 <sup>8</sup>	<10	0.00	NK182	4.6×10 <sup>8</sup>	3.9×10 <sup>6</sup>	0.85
NK51	1.3×10 <sup>9</sup>	<10	0.00	<b>Yeasts</b>			
NK54	3.4×10 <sup>8</sup>	<10	0.00	HW11	9.6×10 <sup>6</sup>	9.2×10 <sup>5</sup>	9.58
NK71	4.4×10 <sup>8</sup>	5.0×10 <sup>6</sup>	1.14	HW12	1.7×10 <sup>6</sup>	3.3×10 <sup>5</sup>	0.19
NK81	2.4×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>3</sup>	0.00	HW81	6.9×10 <sup>6</sup>	6.8×10 <sup>5</sup>	9.86
NK111	3.5×10 <sup>9</sup>	5.0×10 <sup>6</sup>	0.14	HW92	2.6×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>5</sup>	6.77
NK151	2.2×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	6.18	HW161	2.6×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	68.4

**Table 2. Survival of probiotic lactic acid bacteria and yeasts isolated from Jeot-gal in artificial bile juice after treated with artificial gastric acid for 2 h at 37°C.**

Strains	Control (CFU/ml)	Oxgall (CFU/ml)	Survival (%)	Strains	Control (CFU/ml)	Oxgall (CFU/ml)	Survival (%)
<b>Lactic acid bacteria</b>				<b>Yeasts</b>			
NK32	2.0×10 <sup>9</sup>	1.1×10 <sup>9</sup>	56.6	HW11	5.2×10 <sup>6</sup>	2.9×10 <sup>6</sup>	56.1
NK151	1.3×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>	173	HW81	1.4×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	107
NK161	2.5×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	6.0	HW92	2.3×10 <sup>6</sup>	9.8×10 <sup>3</sup>	0.4
NK171	1.5×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>	200	HW161	2.5×10 <sup>6</sup>	2.8×10 <sup>6</sup>	111
NK181	1.0×10 <sup>8</sup>	1.1×10 <sup>8</sup>	110				

균은 비교적 넓은 항균효과를 나타내었다. 젖산을 비롯한 여러 유기산 그리고 기타 항균물질의 생산에 의한 결과로 보여진다(Table 3). 그람양성균인 *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 4797, *Pediococcus acidilactici* KCTC 1626, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Micrococcus flavus*, 그람음성균인

*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas cepacia* SBA 9611, *Pseudomonas cepacia* SBB 9613, *Pseudomonas fluorescense* SBB 9631, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis* BNJ 9664, *Xanthomonas maltophila* SBC 9611에 대해 항균력을 나타내었으나, 효모의 경우, HW92 균주만, 7균주

**Table 3. Antimicrobial spectrum of activity of selected Jeot-gal probiotic lactic acid bacteria.**

Organisms	Inhibition zone diameter (mm)			
	NK111	NK151	NK171	NK181
<b>Gram positive bacteria</b>				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	10	7	0	15
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 1626	10	7	7	15
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> KCCM 40104	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	34	32	18	>40
<i>Bacillus pumilis</i>	>40	>40	>40	>40
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12113	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0	0	0	0
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	>40	>40	>40	>40
<b>Gram negative bacteria</b>				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	>40	>40	>40	>40
<i>Chryseomonas luteola</i> SBA 9634	15	0	0	>40
<i>Escherichia coli</i> JM 109	0	0	0	0
<i>Pseudomonas cepacia</i> SBA 9611	>40	>40	>40	>40
<i>Pseudomonas cepacia</i> SBB 9613	>40	>40	>40	>40
<i>Pseudomonas fluorescense</i> SBB 9631	>40	>40	>40	>40
<i>Pseudomonas putida</i>	24	28	15	18
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> BNJ 9664	>40	>40	>40	>40
<i>Xanthomonas maltophila</i> SBC 9611	>40	>40	>40	>40

**Table 4. Antimicrobial spectrum of activity of selected Jeot-gal probiotic yeasts.**

Organisms	Inhibition zone diameter (mm)			
	HW11	HW81	HW92	HW161
<b>Gram positive bacteria</b>				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	0	0	0	0
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC 1626	0	0	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> KCCM 40104	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	30	0
<i>Bacillus pumilis</i>	0	0	10	0
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12113	0	0	9	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0	0	0	0
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	0	0	0	0
<b>Gram negative bacteria</b>				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0
<i>Chryseomonas luteola</i> SBA 9634	0	0	10	0
<i>Escherichia coli</i> JM 109	0	0	0	0
<i>Pseudomonas cepacia</i> SBA 9611	10	11	10	10
<i>Pseudomonas cepacia</i> SBB 9613	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescense</i> SBB 9631	0	0	10	0
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> BNJ 9664	0	0	0	0
<i>Xanthomonas maltophila</i> SBC 9611	0	0	20	0

(*Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis* IFO 12113, *Chryseomonas luteola* SBA 9634, *Pseudomonas fluorescens* SBB 9631, *Pseudomonas cepacia* SBA 9611, *Xanthomonas maltophilia* SBC 9611)에 대해 항균효과가 입증되어 비교적 넓은 항균효과를 보였다(Table 4). 이 효모들은 추후 기능성 젓갈을 제조할 때 항균성이 우수한 프로바이오틱 기능보다는 정미성 기능의 효모로 사용 될 수 있다.

이들 결과를 종합해 볼 때, 전통발효식품인 젓갈로부터 분리된 유산균과 효모 중 일부 분리균에 대해 유용 프로바이오틱 생균으로서의 가능성을 일부 확인할 수 있었다. 이들 분리균주 중 HW161 균주와 NK181 균주의 경우, 위 뿐만 아니라 담즙에서도 높은 생존율을 보였으며 항균활성을 확인할 수 있었다. 향후 이러한 특성 이외에도 분리균주의 미생물학적 동정, 장내 정착성, 항돌연변이성 등의 연구가 수행되어야 한다.

### 감사의 글

본 연구는 바이오그린 21사업의 연구비 지원(과제명: 전통발효식품의 기능성 물질 구명)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Ahn, Y.-T., Y.-H. Kim, E.-J. Jung, H.-T. Lim, H.-J. Kang, and H.-U. Kim. 1999. Resistance of lactobacilli and bifidobacteria isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Kor. J. Anim. Sci.* **41**: 335-342.
- Cho, M.-K., K. Kim, C.-H. Kim, T.-K. Lee, and K.-Y. Kim. 2000. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 279-284.
- Chung, S.-H., H.-J. Suh, and H. Lee. 1997. Utilization of soybean curd whey as a medium for *Lactobacillus acidophilus* and acid- and bile-tolerance of cultured strains. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 872-877.
- Fernández, M.F., S. Boris, and C. Barbés. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 449-445.
- Gilliand, S.E., T.E. Staley, and L.J. Bish. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045-3051.
- Hong, S.-I., Y.-J. Kim, and Y.-R. Pyun. 1999. Acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. *Lebensm.-Wiss. U-Technol.* **32**: 142-148.
- Kim, G.-B., J.-H. Lee, K.-S. Lim, C.-S. Huh, H.-S. Bae, Y.-J. Baek, and H.-U. Kim. 1999. Bile salt deconjugation activity of *Lactobacillus* strains isolated from yogurt products. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 385-390.
- Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Tolerance of multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-697.
- Lee, C.-H. 1993. Fish fermentation technology, pp. 187-279. In C.-H. Lee, K.H. Steinkraus, and P.J.A. Reilly (eds.), *Fish Fermentation Technology in Korea*, United Nations University Press, Tokyo, Japan.
- Lee, K.-H., K.-D. Jun, W.-S. Kim, and H.-D. Paik. 2001. Partial characterization of polyfermentin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 1-6.
- Lee, S.H. and M.-J. No. 1997. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 617-622.
- OSullivan G. C. 2001. Probiotics. *Brit. J. Surg.* **88**: 161-162.
- Shin, Y.-S., S.-H. Kim, and K.-S. Lee. 1995. Survivals of lactic acid bacteria and its characteristics under the acidic and anaerobic condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 373-377.
- Xanthopoulos, V., E. Litopoulou-Tzanetaki, and N. Tzane-takis. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant feces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* **17**: 205-215.

(Received May 8, 2003/Accepted July 19, 2003)