

장류유래 Exopolysaccharide 생성 유산균의 잠재적 Probiotic 특성

안유진 · 최혜선[†]

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Potential Probiotic Properties of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Soybean Product

Yu-Jin Ahn and Hye-Sun Choi[†]

Dept. of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Gyeonggi 441-853, Korea

ABSTRACT Exopolysaccharides (EPSs) have been widely used in the food industry as viscofying, stabilizing, and emulsifying agents as well as in the pharmaceutical industry for their immunomodulatory, anti-tumor, and anti-inflammatory effects. A total of 458 lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from several kinds of soybean pastes were screened for the production of homo-EPS (HoPS). LAB isolates were primarily screened using thin layer chromatography (TLC) and further screened polymerase chain reaction (PCR) targeting genes involved in HoPS production. Six LAB isolates producing high amounts of HoPS were identified by TLC. Among these isolates, glucansucrase gene was amplified in two strains (JSA57, JSB22), whereas the fructansucrase gene was detected in three strains (JSA57, JSB22, JSB66). After isolating the strains, their morphological characteristics and 16S rDNA sequences were determined. Six species were identified as *L. alimentarius* HSB15, *L. plantarum* JSA22, *L. pentosus* JSA57, *L. brevis* JSB22, *L. alimentarius* JSB66, and *L. parabrevis* JSB89. To evaluate the potential probiotic properties of these LAB, their survival rates against a simulated intestinal environment were determined. After 2 hr of incubation in artificial gastric juice, survival rates of JSA57, JSB90, JSB22, and JSB66 were all greater than 50%. After 2 hr of incubation in bile juice, viable cell count of JSB22 was similar with initial vial cell counts. Growth of the six LAB was screened in arabinoligosaccharide (AOS)-containing MRS broth. Results showed that growth of the isolates selectively increased after culture in AOS-containing media. Strain JSB22 (6 hr), JSB66 (6 hr), HSB15 (20 hr), and JSA22 (29 hr) showed maximum growth rate. Especially, JSB22 showed the highest growth rate. These results suggest that EPS-producing LAB isolated from Deonjang could be applied as synbiotics.

Key words: lactic acid bacteria, exopolysaccharide, probiotics, prebiotics, synbiotics

서 론

Probiotics는 GRAS(generally recognized as safe)로 안전한 미생물이고 내산성 및 내담즙성을 가짐으로써 위장관에서 정착하여 숙주에게 건강적 효능을 주는 것으로 보고되고 있으며, 유산균이 대표적이다(1). 유산균은 자연계에 널리 분포하고 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 채소 등 다양한 발효식품 가공에 종균으로 사용하고 있으며, 식품의 보존성 향상뿐만 아니라 관능적 특성 및 영양적 가치 향상에 기여하고 있다. 또한 일부 유산균 속은 다당류를 생합성하여 제품의 조직과 점성 향상에 기여하고 있다(2). Exopolysaccharides (EPS)는 미생물 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 점질 형태로써 발효 중에 축적되

는 미생물 다당류로 1차 또는 2차 대사산물이다(3). 최근에는 EPS가 물성 증진 효과와 함께 항암(4), cholesterol 저하, 항레앙(5) 등 면역학적 효과가 있다고 보고되면서 생리기능성 소재로 주목받고 있다. 또한 EPS가 prebiotics로서의 기능을 갖고 있다고 보고되고 있다(6). Prebiotics는 장내 유해 균종의 증식을 억제하고 유용 미생물의 증식을 촉진시켜 장내 환경을 개선시키는데 장관 내 미생물들의 탄소원으로 사용되는 복합 당류로서 oligosaccharides, lactulose, lactosucrose, palatinose, raffinose, stachyose 및 inulin 등이 있다(7). 식품원료로 사용 가능한 prebiotics는 그 종류가 다양하지 못한 실정이며, 최근 arabinoligosaccharide (AOS)에 대한 연구가 진행될 바 있다(8). 최근 probiotics와 prebiotics의 합성어로 synbiotics가 많이 알려져 있으며, 지금까지 이들에 대한 연구는 발효 유제품 및 육제품, 사람의 분변에서 분리된 장내 유산균들을 대상으로 한 것들이 대부분이고(9) 식물성 유산균에 대한 연구는 미진한 실정이다. 식물성 유산균은 채소, 과일, 곡물이나 식물발효식품 등 식

Received 31 March 2014; Accepted 25 April 2014

[†]Corresponding author.

E-mail: choihs9587@korea.kr, Phone: +82-31-299-0572

물소재에서 유래된 유산균을 말하며, 곡물이나 채식을 주식으로 하는 동양인의 위장에 동물성 유산균보다 더 적합한 것으로 보고되어 있다(10).

전통 장류는 예로부터 전승된 우리나라의 대표적인 대두 발효식품으로 곡류 단백질에서 부족하기 쉬운 필수 아미노산, 지방산, 유기산, 미네랄 및 비타민류 등의 영양소를 보충해줌으로써 영양학적으로 중요한 기능을 가진다(11). 발효과정 중 미생물이 생산하는 2차 대사산물의 혈전 용해능, 항산화능, 항암 활성, 면역 증강, 혈압 강하 및 항균 효과 등 다양한 생리활성이 보고됨에 따라 기능성 식품으로서 전통 장류에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다(12). 이와 같이 전통 장류에서 분리된 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다.

본 연구에서는 전통 장류에서 분리한 식물성 유산균 중 EPS 생산 유산균을 선발하여 항균 활성, 인공위액 및 인공담즙 저항성 시험을 통하여 선발 유산균의 probiotics로써 특성 분석과 synbiotics 관점의 prebiotics로써 arabinooligosaccharides(AOS)의 이용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 사용 균주

본 실험에서 사용한 장류는 전국 각지에서 12종을 수집하였다. 균주 *Listeria monocytogenes* LMG 13305, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Bacillus cereus* ATCC 27348, *Escherichia coli* DSM 30083, *Salmonella enterica* IFO 3313을 사용하였다. 분석에 사용한 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

균주 배양 및 선발

수집한 장류 시료 20 g을 80 mL의 0.85%(w/v) 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 영양 배지로 MRS agar(Difco,

Sparks, MD, USA), BL agar(Difco), 저영양 배지로 20% MRS agar, 20% BL agar 배지에 도말하여 37°C에서 정지 배양하였다. 영양 배지는 48시간, 저영양 배지는 96시간 동안 배양한 후 유산균 성상을 나타내는 콜로니를 picking 하였다. 선택된 콜로니는 동일한 배지에 순수 분리하여 3대 계대배양한 후 단일 콜로니를 취하여 MRS 액체 배지에 배양하여 75% glycerol 용액에 현탁하고 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

Homo-EPS(homo-exopolysaccharide) TLC 스크리닝

장류유래 유산균주의 세포 외 다당 및 올리고당 생산을 스크리닝 하기 위하여 균주 배양액을 thin layer chromatography(TLC) 분석으로 확인하였다. Homo-EPS 생성 확인을 위하여 MRS 배지를 5 kDa cutoff ultrafiltration(Pall, Port Washington, NY, USA)하여 배지 내 단백당당을 제거한 후, 2% sucrose와 maltose를 첨가하였다. 분리 균주는 37°C에서 24시간, 30°C에서 7시간 배양 후, 8,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(6200, Kubota, Tokyo, Japan) 하여 상등액을 TLC 스크리닝 시료로 사용하였다. 배양액 1 µL 4회 점적하고 전개용매(ACN : water=85:15)로 4회 전개하였으며, 발색용매(0.5% naphthal, 5% H₂SO₄ in ethanol)로 발색시킨 후, 105°C 오븐에 3분 굽고 spot을 확인하였다. 다당 생성 농도를 정량적 스크리닝 하기 위해 배양액의 spot 농도는 multi gauge(Fuji film, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 균을 배양하지 않은 배지 spot(control)의 농도와 균배양액의 spot의 농도를 비교하여 180% 이상 차이를 보인 균주를 EPS 우수생성 균주로 선발하였다(Fig. 1).

EPS 생합성 유전자 PCR 스크리닝

선발 균주의 EPS 생성 관련 유전자 확인을 위해 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 전 배양된 균체를 원심분리(8,000 rpm, 10분) 한 후, 멸균증류수로 잔여 배지성분을 씻어내었다. Total genomic DNA는 QIAamp

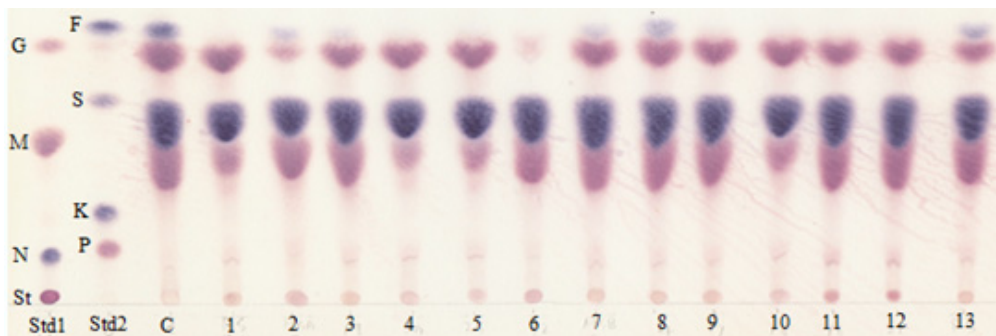


Fig. 1. Thin layer chromatogram of homo-polysaccharides formation in culture with LAB, sucrose and maltose. Lane std1 and std2 (standards), glucose, maltose, nystose, starch, fructose, sucrose, 1-kestose, D-panose (0.5%); Lane C, control; Lane 1~13, RS20, HSA03, 19, 24, 25, 32, MSB03, 04, 07, 13, 16, 20, RS24. The carbohydrate of compositions of the reaction products were analyzed by TLC, TLC silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) with two ascents of 85:15 (v/v/v) acetonitrile/water. The carbohydrate were visualized by dipping the plates into 5% H₂SO₄ in ethanol containing 0.5% naphthal, followed by drying and heating for 3 min at 105°C.

DNA mini kit(Qiagen, Hilden, Germany) 권장 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출된 genomic DNA, EPS 생합성 관련 유전자 primer 및 Amfioco PCR premix(GenDEPOT, Barker, Houston, TX, USA)로 Bio-Rad C1000 thermal cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel 로 전기영동 하여 유전자 발현 여부를 확인하였다.

EPS 생산 균주의 동정

선발 균주는 16S rDNA 서열분석을 통하여 동정하였다. DNA 유전자 염기서열 분석은 (주)제노텍(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였으며, 사용된 primer는 518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3')와 800R(5'-TACC-AGGGTATCTAATCC-3')을 사용하였다. 16S rDNA 유전자의 염기서열 분석 후, NCBI의 database를 통하여 유사균주들과 비교하였다. 또한 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 정렬한 후, neighbor-joining method(13)에 의거하여 분리 균주의 계통분류학적 위치를 조사하였다.

항균 활성

분리 균주의 항균 활성은 agar-well diffusion assay를 사용하여 분석하였다(14). 대상세균으로는 식중독 감염의 원인균으로 보고된 그람양성 세균인 *Listeria monocytogenes* LMG 13305, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Bacillus cereus* ATCC 27348, 그람음성 세균인 *Escherichia coli* DSM 30083, *Salmonella enterica* IFO 3313을 사용하였다. 유해 균주 배양액을 optical density(660 nm)를 0.5가 되도록 일정농도의 균수로 조절하여

0.7% NA soft agar(Difco)에 0.3%의 농도로 접종하여 혼합한 뒤 NA 평판배지에 5 mL 분주하여 굳힌 후, 1 mm의 구멍을 내고 전 배양된 분리 균주를 5 µL씩 접종하여 배양하여 저해환(clear zone)을 확인하였다.

인공위액 저항성

분리 균주의 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액 내성실험을 실시하여 확인하였다. 인공위액 내성 실험은 Kobayashi의 방법(15)을 변형하여 1 N HCl로 pH 2.5로 조정한 MRS 액체배지(Difco)에 0.22 µm membrane filtration(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)한 1% pepsin(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 인공위액을 제조하였다. MRS 액체배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 200 rpm의 조건에서 배양(VS-8480SF, Vision, Bucheon, Korea)한 후, 배양액 1 mL를 50 mL의 인공위액을 가하여 배양(37°C, 2 hr, 200 rpm)하고 생균수를 계수하여 생존율(%) [(실험구의 Log 지수값/대조구의 Log 지수값)×100]로 나타내었다. 대조구는 pepsin을 첨가하지 않고 pH 조절하지 않은 MRS 액체배지를 사용하였다.

인공 담즙액 저항성

인공 담즙에 대한 저항성은 Paik의 방법(16)을 변형하여 멸균된 10% oxgall을 1% 첨가하여 인공담즙을 제조하였다. MRS 액체배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 인공위액에 넣고, 진탕배양(37°C, 2 hr) 후 생균수를 측정하여 생존율(%)로 나타내었다. 대조군은 10% oxgall을 첨가하지 않은 MRS 액체배지를 사용하였다.

Table 1. Primer pairs used to screen for homopolysaccharides (HoPS) genes

Primer	Direction ¹⁾	Sequence ²⁾ (5'-3')	Target gene	Fragment size (bp)	PCR conditions	Positive control strain ³⁾	Reference
<i>Dsr1</i>	F	GAY GCN GTN GAC YAA YGT NRA YG	Glucan-sucrase	1580	35 cycles of 94°C (30 sec), 55°C (45 sec), 72°C (80 sec)	<i>Leu. mesenteroides</i> KCTC 3719	This study
	R	TAH AWT TGR TCN GGN ACM MAR TC					
<i>Gif</i>	F	GAY AAY WSI AAY CCI RYI GTI C	Dextran-sucrase	660	35 cycles of 95°C (30 sec), 42°C (45 sec), 72°C (1 min)	<i>Leu.mesenteroides</i> <i>subsp. dextranicum</i> LMG 7939	12
	R	ADR TCI CCR TAR TAI AVI YKI G					
<i>FTF2</i>	F	GAY RTY TGG GAY WSN TGG C	Fructan-sucrase	220	30 cycles of 94°C (45 sec), 55°C (30 sec), 72°C (30 sec)	<i>Leu. mesenteroides</i> KCTC 3719	13
	R	GCW GAN CCN GAC CAT TST TG					
<i>Lev</i>	F	GAY GTI TGG GAY WSI TGG C	Levan-sucrase	800	30 cycles of 94°C (45 sec), 50°C (30 sec), 72°C (30 sec)	<i>Lab.</i> <i>Sanfranciscensis</i> 30	14
	R	TCI TYY TCR TCI SWI RMC AT					

¹⁾F: forward, R: reverse.

²⁾Y=C or T; R=A or G; W=A or T; K=G or T; S=C or G; M=A or C; V=A, C or G; N=A, C, G or T; I=inosine.

³⁾The presence and sequence analysis of the corresponding genes were confirmed by DNA sequencing.

AOS의 synbiotics 효과

분리 균주의 synbiotics 능력 평가를 위한 prebiotics로 arabino-oligosaccharide(AOS) 이용 평가를 실시하였다. Glucose 무첨가 MRS에 3% AOS를 첨가한 배지를 제조하여 균주 배양액을 접종한 후 배양(37°C, 48 hr) 중 일정 시간격으로 흡광도(Abs. at 660 nm)를 측정하였다. 또한 TLC 분석을 통해 배양액의 AOS 소비패턴을 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 수행하였으며, SPSS 12.0(Statistical Package for the Social Science, IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 Duncan's multiple range test에 의하여 시행하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

HoPS 생성하는 분리 균주 선발

유산균이 생성하는 EPS는 homopolysaccharides와 hetero-polysaccharides로 구분된다. 그중 homopolysaccharides(HoPS)는 glucose 또는 fructose 등의 단당류로 구성되어 있으며, glucans type으로 dextran(α -(1-3)-glucan), reuteran(α -(1-4)-glucan)이 있으며, fructans type의 levan(β -(2-1)-fructan)과 inulin(β -(2-6)-fructan)이 있다(2).

장류로부터 유산균 성상을 보이는 458개의 균주 중, TLC 분석으로 HoPS를 생성하는 6개의 분리 균주의 다당 생성 유전자(*Dsr1*, *Gtf*, *FTF2*, *Lev*)를 확인한 결과는 Table 2와 같다. JSA57과 JSB22에서 *Dsr1*과 *FTF2* 유전자가 존재하는 것을 확인하였다. 생성된 다당은 세포 외로 분비되거나 세포벽(cell wall)에 부착된 상태로 host 장내상피세포의 adhesion 및 invasion에 관여하는 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

EPS 생산 균주의 동정

TLC와 PCR 분석을 통해 선발된 HoPS 생산 6균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, HSB15, JSA22, JSA57, JSB22, JSB66, JSB89는 *Lb. alimentarius*, *Lb.*

Table 3. Identification of exopolysaccharide (EPS) producing isolates in fermented soybean paste and its ingredients by partial 16S rRNA sequencing

Strain	Accession No. ¹⁾	Identification	Identity (%)
HSB15	AB919110	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	98
JSA22	AB919111	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
JSA57	AB919112	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99
JSB22	AB919113	<i>Lactobacillus brevis</i>	100
JSB66	AB919114	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	100
JSB89	AB919115	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	100

¹⁾ Isolates assigned accession number by DNA Data Bank of Japan.

plantarum, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis*, *Lb. alimentarius*, *Lb. Parabrevis*와 98~100%의 상동성을 보였다(Table 3). 16S rDNA 유전자의 구조에 근거하여 기존 젖산균과의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 phylogenetic tree를 작성한 결과, 각 분리 균주들은 위에서 언급한 유산균을 포함하는 계통학적 그룹에 포함됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

항균 활성

분리 균주의 항균 활성을 측정하기 위하여 분변오염의 지표가 되는 *E. coli*, 식중독 원인균인 *Listeria*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *B. cereus*에서 항균 활성을 측정한 결과, JSA22가 4개의 병원성 균에 대해 가장 우수한 항균력을 나타내었고, JSB22가 3개의 병원성 균에 대한 항균력을 나타내었다. 그리고 HSB15, JSA57과 JSB66은 각각 1개의 병원성 균에 대한 항균력을 나타내었다(Table 4). 유산균은 lactic acid를 생성하여 산도를 낮춤으로써 병원성 세균의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있으며, bacteriocin 등의 항균성 펩티드를 생성하여 항균작용을 나타낸다(17). 따라서 항균 활성이 우수한 분리 균주 JSA22와 JSB22는 장에 머물면서 유해 균주 증식을 억제하여 장내균총을 개선시키는 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

In vitro 내산성 및 내담즙산성

식품과 함께 섭취된 유산균이 효과를 나타내기 위해서는 소화액 수준의 산성 환경에서 생존할 수 있는 내산성이 요구되며, 장내 담즙 농도(0.3%)보다 고농도의 oxgall이 함유된 배지에서 생육할 수 있어야 한다(16). HoPS를 생성하는 분리 균주의 인공위액과 인공담즙에 대한 내성을 조사한 결과, HSB15, JSA22와 JSA57은 70% 이상의 높은 인공위액에 대한 내성을 나타내었고, JSB22는 63.31%, JSB66과 JSB89는 각각 36.49%, 44.26%의 인공위액내성을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 균주는 주재료인 콩과 함께 채소류를 부재료로 하여 발효시킨 별미장에서 유래하였으며, 채소발효에 의해 김치와 유사한 젖산발효가 일어난 pH가 낮은 조건에서 생육하였기 때문에 내산성을 가지는 것으로 사료된다. 담즙산에 대한 내성 또한 probiotics 균주 선발에 있어 중요한

Table 2. Screening of genes involved in HoPS (*Dsr1*, *Gtf*, *FTF2*, *Lev*) production¹⁾

Strain	<i>Dsr1</i>	<i>Gtf</i>	<i>FTF2</i>	<i>Lev</i>
HSB15	-	-	-	-
JSA22	-	-	-	-
JSA57	+	-	+	-
JSB22	+	-	+	-
JSB66	-	-	+	-
JSB89	-	-	-	-

¹⁾ +, presence of the corresponding gene; -, no detection of the corresponding gene.

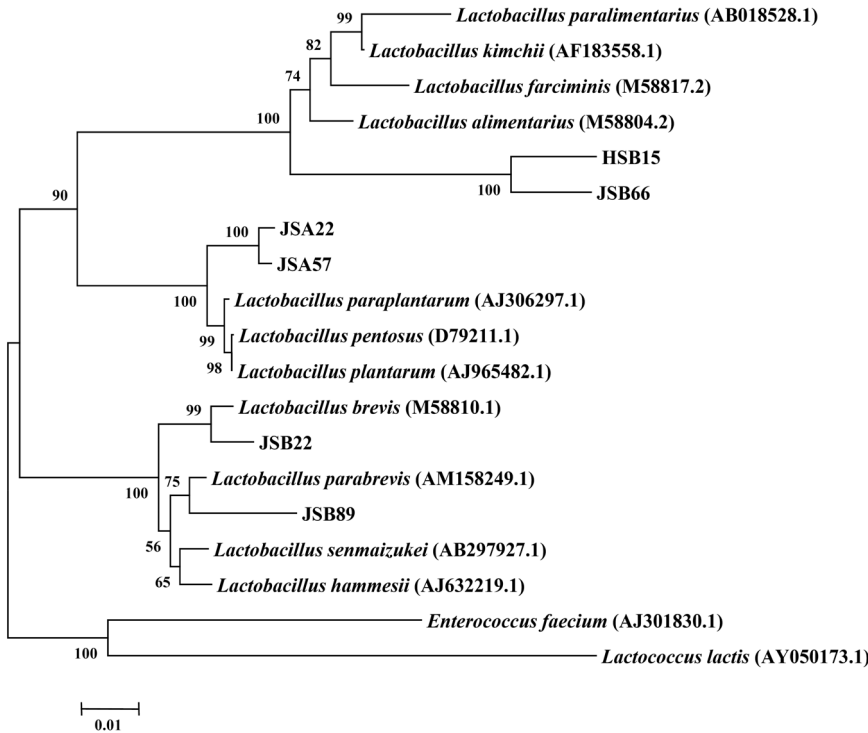


Fig. 2. Neighbour joining phylogenetic tree of the composition of the LAB from fermented soybean paste. The scale bar indicates 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides. Numbers in parentheses indicate accession numbers of 16S rRNA genes from type strains. Bootstrap values over 50% (based on 1,000 replications) are shown at the nodes.

Table 4. Antibacterial activity of exopolysaccharide (EPS) producing isolates in fermented soybean paste

Strain	Inhibition ¹⁾				
	<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305	<i>Escherichia coli</i> DSM 30083	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 346	<i>Salmonella enterica</i> IFO 3313	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348
HSB15	-	-	-	+	-
JSA22	+	+	-	+	+
JSA57	-	+	-	-	-
JSB22	+	+	-	+	-
JSB66	-	-	-	+	-
JSB89	-	-	-	-	-

¹⁾+, presence of an inhibition zone surrounding the *Lactobacillus* colony; -, no inhibition.

특성이다. HSB15(66.36%)를 제외한 분리 균주 모두 80% 이상의 높은 내담즙성을 가지고 있었다. Probiotics로 알려져 있는 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)와 비교했을

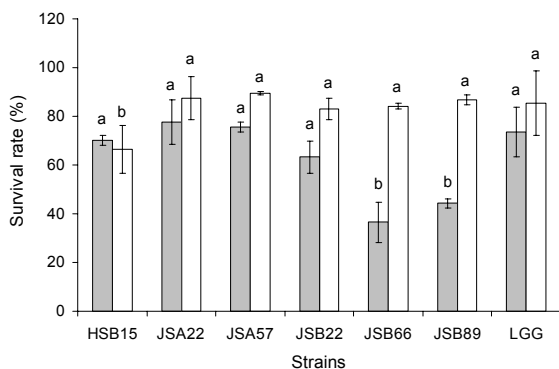


Fig. 3. Survival of the LAB tested after incubation in simulated gastric (■) and bile juices (□). Error bars represent standard deviations (n=3). Means with different letters (a,b) above the same bar are significantly different ($P<0.05$).

때 인공위액과 담즙액에서 내성이 떨어지지 않는 것을 관찰하였다. 한편 산양유로부터 분리된 *Streptococcus salivarius*와 *Lactobacillus lactis*는 pH 3.0에서 대부분 사멸하였으며 0.3% bile에서 22~29%의 담즙내성을 나타내었다고 보고된 바 있고(18), 동치미에서 분리된 *Lactobacillus* sp. FF-3은 인공위액에서 내성이 높은 반면 담즙에서 생존율은 6%로 나타났다(19). 또한 Kim 등의 연구에서 위액과 담즙에서의 높은 저항성은 분리 균주의 EPS 생성으로 인한 균체 보호막 작용에 의한 결과라고 보고하였다(20). 따라서 EPS를 생성하는 분리 균주들을 우수한 위액내성과 담즙내성을 나타내어 장내 환경에서도 생존 가능한 probiotics로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

AOS 이용 synbiotic 효과

Prebiotics는 장내 유익한 박테리아의 성장을 돕는 성분으로 probiotics의 영양원이 되어 장내 환경을 개선하는 데 도움을 주며, 올리고당과 같은 난소화성 탄수화물로 이루어

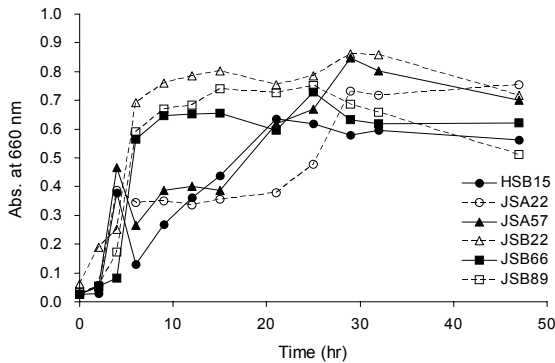


Fig. 4. The growth curve of LAB in MRS containing 3% prebiotics (AOS) as shown by the optical density (turbidity) measured at 660 nm.

저 있는 경우가 많고 대부분이 식이섬유의 형태로 존재한다. 현재 식물의 세포벽 및 식물 세포벽 다당류 분해 효소로부터 다당류에 대한 기술의 진보는 새로운 prebiotics의 개발에 영향을 미쳤으며, 식품원료로 사용 가능한 prebiotics 종류가 매우 제한적(isomaltooligosaccharide 및 fructooligosaccharide 등)이고 다양한 종류가 필요한 실정이다. 최근 새로운 prebiotics로써 sugar beet arabinan에 효소적 기법을 이용하여 제조된 arabino-oligosaccharide(AOS)에 대한 연구가 진행되고 있다(8).

Probiotic 특성을 지닌 분리 균주의 prebiotics로써 AOS를 이용한 시간에 따른 성장율을 관찰한 결과, AOS를 탄소원으로 균체 증식에 소모되는 것과 균주별 소비 패턴이 다르다는 것을 확인하였다. 특히 JSB22가 AOS를 이용한 성장율이 가장 우수하였으며, JSB66와 JSB89도 높은 성장율을 보였다(Fig. 4). 6균주 모두 AOS를 첨가하지 않은 MRS 액체배지에서보다 AOS를 첨가한 MRS 액체배지에서 선택적으로 높은 성장율을 나타내었다(data not shown). 따라서 probiotic 특성을 나타내는 분리 균주가 prebiotics로써 AOS를 선택적으로 이용함으로써 AOS의 새로운 prebiotics로써의 가능성을 확인하였다.

요 약

전통 장류에서 유산균 성장을 보이는 균주를 분리하여, TLC와 PCR을 통하여 HoPS를 우수하게 생성하는 균주 HSB15, JSA22, JSA57, JSB22, JSB66 및 JSB89를 선발하였다. 선발된 6균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 HSB15는 *L. alimentarius*, JSA22는 *L. plantarum*, JSA57은 *L. pentosus*, JSB22는 *L. brevis*, JSB66는 *L. alimentarius*, JSB89는 *L. parabrevis*로 동정되었다. 항균 활성은 6균주 중에서 JSA22가 4개의 병원성균에 대한 항균을 나타내어 항균 활성이 가장 우수하게 나타났고, 인공위액 저항성은 HSB15, JSA22와 JSA57 균주가 70% 이상의 높은 인공위액 저항성으로 가장 우수했으며, 인공담즙 저항성은 HSB15를 제외한 5균주에서 80% 이상의 생존율을 나타내며 담즙

액 저항성이 우수하게 나타났다. 또한 probiotic 특성을 지닌 분리 균주의 prebiotics로써 AOS를 이용한 성장율을 관찰한 결과, 모든 분리 균주가 AOS를 선택적으로 이용하며 성장하는 것을 관찰하였고 특히 JSB22가 AOS 이용 성장율이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 본 연구를 통해 장류유래 probiotics를 선발하였고 AOS의 새로운 prebiotics로 활용을 검토한 바, synbiotics로 이용할 수 있는 가치가 있다고 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구개발사업(PJ008626 및 PJ907153) 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Otero MC, Ocaña VS, Elena Nader-Macias M. 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Methods Mol Biol* 268: 435-440.
- Ruas-Madiedo P, Hugenholts J, Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 12: 163-171.
- Kim DJ, Lee SY. 2001. Isolation of the exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 370-375.
- Kimmel SA, Roberts RF, Ziegler GR. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl Environ Microbiol* 64: 659-664.
- Cerning J, Bouilanne C, Desmazeaud MJ, Landon M. 1998. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett* 10: 255-260.
- Welman AD, Maddox IS. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 21: 269-274.
- Modler H, Mckellar R, Yaguchi M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can Inst Food Sci Tech J* 23: 29-41.
- Westphal Y, Kühnel S, de Waard P, Hinz SW, Schols HA, Voragen AG, Gruppen H. 2010. Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydr Res* 345: 1180-1189.
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84: 197-251.
- Cho YH, Park SN, Jeong SW. 2009. A study on the physiological activity and industrial prospects of plant-origin lactic acid bacteria. *Korean J Dairy Sci Technol* 27: 53-57.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37: 123-131.
- Ahn YS, Kim YS, Shin DH. 2006. Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* 38: 82-87.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining methods: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

14. Hechard Y, Dherbomez M, Cenatiempo Y, Lettlier F. 1990. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the sandwich method. *Lett Appl Microbiol* 11: 185-188.
15. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. 1974. Biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of a multiple antibiotic resistant strain, *Lactobacillus casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Nihon Saikingaku Zasshi* 29: 691-697.
16. Paik HD, Jung MY, Jung HY, Kim WS, Kim KT. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J Food Sci Technol* 34: 73-78.
17. Messens W, De VL. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. *Int J Food Microbiol* 72: 31-43.
18. Lim YS, Kim SY, Lee SK. 2008. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk. *Korean J Food Sci Ani Resour* 28: 82-90.
19. Chung WB, Seo WS, Cha JY, Cho YS. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from Korean *dongchimi*. *Korean J Food Preserv* 10: 406-410.
20. Kim HJ, Chang HC. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34: 196-203.