

김치로부터 Exopolysaccharide 생성 유산균의 분리 및 특성 규명

김효주 · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과

Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria from Kimchi.
Kim, Hyo Ju and Hae Choon Chang*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea – Three slime-forming lactic acid bacteria were isolated from Kimchi and shown to produce viscous exopolysaccharides (EPS) in sucrose media. The isolated strains, GJ2, C3 and C11, were identified as *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum* and *Leuconostoc mesenteroides*, respectively, by examining their metabolic characteristics and determining their 16S rDNA sequences. *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 exhibited high viability (maintained initial viable cell count of 10^8 CFU/ml) in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 3.0) for 2 h, in artificial gastric juice for 2 h and in 0.3% oxgall for 24 h. When tested, *Leu. kimchii* GJ2, in particular, displayed antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 produced 21.49 g/l, 16.46 g/l and 22.98 g/l EPS, respectively, in sucrose (5%) medium. The amount of purified EPS extracted from *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 was 14.61 g/l, 7.73 g/l and 4.77 g/l, respectively. Although the EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11 differed in viscosity, TLC and HPLC analysis revealed that each contained only one type of monosaccharide, glucose. The average molecular mass of EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2 was 306,606 Da.

Key words : Lactic acid bacteria, *Leuconostoc* sp., EPS, kimchi, probiotics

서 론

Exopolysaccharide(EPS)는 미생물 세포벽의 일부로서 세포벽주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 점질형태로서 발효중에 축적되는 미생물 다당류로, 1차 또는 2차 대사산물이다[14]. EPS는 에너지원으로 이용되는 것은 아니나 건조, 식균작용, 원생동물의 습식, 항생제, 독성화합물, 삼투압 스트레스 등과 같은 외부환경으로부터 자신을 보호하는 작용을 하며, 물에 녹거나 분산되는 긴 사슬의 고분자 중합체로서 가공식품에서 농후제나 젤링화에 중요한 역할을 한다[12]. EPS는 실제적 측면에서 미생물이 가장 다량으로 생성하는 다당류이며, 배양액으로부터 회수가 쉽고, 정제비용이 적게 들므로 상업적인 잠재력이 가장 높은 다당류이다[28]. 특히 유산균이 생성하는 EPS는 유산균 발효유제품에서 큰 문제점이었던 유청 분리 현상을 완화시키고 점성을 증가시키며 조직을 부드럽게 하여 섭취 시 구강 내 포만감과 조직감을 부여해준다[1, 2]. 따라서 서유럽 특히 프랑스, 덴마크, 네델란드 등에서는 발효유에 대한 안정제 대체원으로서 발효유제품의 평균으로 EPS생성 유산균들이 매우 오래전부터

사용되어왔다[7, 23, 29].

유산균이 생성하는 EPS는 크게 homopolysaccharides와 heteropolysaccharides로 나뉘어 진다. Homopolysaccharides는 주로 fructose와 glucose와 같은 한 가지 형태의 당으로만 구성되어 있는 것을 말하며, *Streptococcus salivarius*와 *Streptococcus mutans*에 의한 fructans type의 levan과 inulin이 있으며, glucans type으로 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*와 *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*에 의한 dextran과 *Leu. mesenteroides*에 의한 alternan 및 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*에 의한 mutan이 있다[5, 23]. Dextran은 석유회수 증진제, 유화제, 점착제, 물성 조절제, 혈장증량제 등에 오래전부터 사용되어 왔으며, 시럽과 캔디의 보습성 증진 및 설탕 결정 방지, 껌과 젤리의 젤화, 아이스크림의 빙결방지, 유체식품의 물성조절 등 식품공업에서도 활발히 이용되고 있다[21]. Heteropolysaccharides는 두 가지 이상의 단당, 주로 glucose, galactose, fructose 및 rhamnos가 서로 다른 비율로 구성되어 있으며, 경우에 따라 N-acetyl-aminosugar, phosphate, acetyl, glycerol과 같은 당이 아닌 물질들이 존재하기도 한다. 주로 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sake* 등의 중온성 유산균들과 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgalicus*, *Streptococcus thermophilus* 등의 고온성 유산균들에서 생산

*Corresponding author

Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

되는데, 일반적으로 homopolysaccharides에 비해 낮은 생산성을 보이며, EPS생산이 일시적인 특성을 보인다. 이는 이들 균주에서의 EPS생산 encoding 유전자의 불안정으로 인한 손실이나 재배열에 따른 영향으로 이러한 EPS 생산의 유전적 불안정성은 산업적 이용성에 심각한 문제로 작용한다 [7, 23].

최근에 와서는 EPS가 과거의 단순 물성기능소재로써가 아니고 생리기능소재로서 주목받고 있다. 유산균 중 *Bifidobacteria*의 EPS와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgalicus*, *Lactobacillus helveticus* var. *jugurti*로부터 유래한 EPS들이 항암효과가 있다고 보고 하였다[17]. *Streptococci*로부터 생산된 EPS의 경우 면역학적 효과가 있다고 하였고, 항체양 효과와 cholesterol 저하 활성에 대한 보고도 있다[4]. 지금까지 유산균으로부터 생성된 EPS에 관한 많은 연구가 이루어졌으나, 대부분의 연구가 요구르트와 치즈 등과 같은 발효유제품의 물성기능소재로서의 중간이용에 관한 것이거나, EPS생산 균주의 탐색이나 특성에 관한 연구도 대부분 발효 유제품에서 분리한 유산균에 국한되고 채소발효식품, 특히 김치에서 분리한 경우는 엄 등[9]과 김 등[13]의 보고 정도이다.

김치는 배추나 무를 주원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 일정기간 발효시킨 우리나라 고유의 발효식품이며, 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다 [16, 19]. 이러한 채소발효식품과 관련된 미생물 중 유산균들은 그 영양학적 및 생리학적 장점이 부각되고 있으며, 김치의 기능성과 효능에 관한 연구결과들이 활발하게 진행되면서 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다. 최근에는 유산균 특징 중에 probiotics라는 기능적인 측면에 관심이 모아지고 있다. Probiotics는 살아있는 균주를 섭취한다는 점에서 항생제의 잔류 및 내성문제를 해결하는 항 박테리아제로서 장내 미생물군의 균총 유지와 대장균의 감소를 통한 정장작용을 기대할 수 있다[5, 16].

본 연구에서는 EPS가 극한 생존환경에서 자기 방어 물질로서 작용하는 것에 착안하여 EPS생성 유산균이 낮은 pH의 위산에서와 소장에 분리된 담즙에서 생존하여 probiotics로 기능할 수 있을 것을 기대하여, 김치로부터 분리된 유산균 중 3종의 EPS생성 유산균주를 선별하고 내산성, 인공위액 및 인공담즙 저항성 시험을 통하여 분리균주의 장내 생존 가능성을 조사하였다. 나아가 기능성 소재로 개발이 가능한 EPS를 분리균주로부터 분리, 정제하여 그 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

EPS 생성 균주의 분리 및 동정

김치로부터 분리되어 유산균으로 확인된 김치유산균주를

sucrose 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% dipotassium phosphate, 0.5% diammonium citrate, 5% sucrose, pH 7.0)에 도말하여 30°C에서 48시간 평판배양 하였다. Mucoïd colony를 나타내는 점질균을 선정하고, 다시 sucrose 액체배지에서 점성물질을 분비하는 것을 확인하여 EPS 생성균주로 선정하였다.

분리된 EPS 생성 균주는 그람염색(BD Co., U.S.A.)을 비롯한 형태학적 특성, 50CHL API kit(Biomérieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다.

내산성 및 인공위액 저항성

분리균주의 산 저항성은 단순 산성 pH에 대한 내성과 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액 내성시험을 실시하여 확인하였다. 산성 pH에 대한 내성은 pH 3.0으로 조정된 0.05 M sodium phosphate 용액을 사용하여 측정하였다[22]. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등 [18]의 방법을 변형한 것으로 1 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정된 MRS 액체배지에 pepsin(Sigma Co., U.S.A.) 1,000 unit/ml를 첨가하여 사용하였다. EPS 생성을 위해 분리균주를 sucrose 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양액은 원심분리(9,950×g, 5 min)하여 균체를 회수한 다음 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액을 각각 상징액과 동량으로 첨가하여 30°C에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 생균수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 비교하였다. 대조균은 분리균주가 EPS를 생성하지 않은 상태로서 MRS 배지에서 배양한 후(30°C, 24 h) 실험구와 동일하게 처리하였다.

인공담즙 저항성

인공담즙의 조제는 MRS 액체배지에 0.45 µm filter(Milipore Co., U.S.A.)로 여과된 oxgall(Sigma Co., U.S.A.) 용액을 0.3%로 첨가하여 사용하였다[25]. 담즙에 대한 저항성은 sucrose 액체배지에서 30°C, 48시간 배양된 균주를 인공위액에서 2시간 처리한 후 인공담즙에 대한 저항성을 시험하였다. 인공위액 처리를 거친 유산균 배양액은 원심분리(9,950×g, 5 min)하여 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 조제된 인공담즙액을 제거한 상징액과 동량 첨가하여 이를 현탁시킨 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 생균수(colony forming unit(CFU)/ml)를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 비교하였다. 대조균은 분리균주가 EPS를 생성하지 않은 상태로서 MRS 배지에서 배양한 후(30°C, 24 h) 실험구와 동일하게 처리하였다.

항균활성 및 항균물질에 대한 각종 효소의 영향

유해균주에 대한 항균 활성의 확인은 균체를 직접 가하는 direct method[15]로 실시하였다. 항균물질의 각종 효소에 대

한 영향은 trypsin(Sigma Co., U.S.A.), lipase(Sigma Co., U.S.A.), protease(Sigma Co., U.S.A.)를 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), pepsin(Sigma Co.)은 50 mM citrate 완충액(pH 2.0), proteinase K(Sigma Co., U.S.A.)는 10 mM Tris-HCl-50 mM NaCl-5 mM EDTA(pH 7.5), α -amylase(Sigma Co., U.S.A.)는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 20 mg/ml가 되도록 준비하여, 항균물질에 준비된 각종 효소를 최종 4 mg/ml 농도로 37°C에서 12시간 반응시켜 활성의 변화를 측정하였다. 대조구로는 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리한 것으로 사용하였다.

EPS 분리, 정제 및 정량

분리균주로부터 생성된 EPS는 균체 배양액을 4°C에서 원심분리(9,950×g, 25 min)하여 균체를 제거하고, 회수한 상정액에 2배량의 냉각된 95% 에탄올을 서서히 가하여 4°C에서 15시간 침전시켜 분리하였다. 침전물은 원심분리(9,950×g, 25 min, 4°C)하여 회수하고, 남은 에탄올을 건조시킨 후 동결건조(Samwon Co., Korea)하여 이를 crude EPS로 하였다[27].

생성 EPS의 정제를 위해 배양액에 trichloroacetic acid(Sigma Co., U.S.A.)를 최종농도가 4%(w/v)가 되도록 첨가하고 4°C에서 2시간 처리한 후 원심분리(9,950×g, 25 min, 4°C)하여 균체와 침전된 단백질을 제거하였다. 상정액은 회수한 후 0.2 μ m filter(Milipore Co., U.S.A.)로 여과하여 남은 단백질을 제거하고, 2배량의 냉각된 95% 에탄올을 서서히 가하여 4°C에서 15시간 침전시켰다. 침전물은 원심분리(9,950×g, 25 min, 4°C)하여 회수하고, 남은 에탄올을 건조시킨 후 3차 증류수에 용해하여 dialysis-sack(MW cut off 10,000, Spectrum Laboratories Inc., U.S.A.)에 넣고 4°C, 24시간 동안 투석한 다음 동결건조 하였다[30]. 배양액에 대한 EPS의 생성량은 g/l로 나타내었다.

총 당, 총 단백질 및 점도

총 당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 Dubois 등[8]의 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다. 총 단백질량은 bovine albumin(Sigma Co., U.S.A.)을 표준물질로 하여 Schacterle 및 Pollack방법[24]을 이용하여 측정하였다. 생성 EPS의 점도는 viscometer(Brookfield Co., U.S.A.)에 small sample adapter를 부착하여 spindle No.18을 사용하여 측정하였다.

구성 당 확인

EPS의 구성 당은 EPS 가수분해물을 제조 후 TLC 및 HPLC로 분석하였다[21]. EPS의 가수분해는 2 N 황산으로 100°C에서 3-6시간 동안 실시하였다. 가수분해물은 1 N NaOH로 중화하고 0.45 μ m filter(Milipore Co.)로 여과하여 시료로 사용하였다. TLC는 준비된 시료를 TLC plate

(Whatman Co., England)에 1 μ l 점적한 후 전개용매 acetone : butanol : water(4 : 5 : 2)로 2번 전개시켰다. Spot의 확인을 위해 0.5%(w/v) α -naphthol과 5%(v/v) 황산을 포함한 에탄올 용액에 담그고 건조시킨 후 120°C 오븐에서 10분간 발색시켰다[9]. HPLC는 분석 column으로 carbohydrate analysis column(3.9 mm × 300 mm, Waters Co., U.S.A.)을 사용하였다. 이동상 용매로는 80%(v/v) acetonitrile을 사용하여 1.5 ml/min 유속으로 35°C에서 분석하였다. 시료는 autosampler(Spark Co., Netherlands)를 이용하여 20 μ l 주입하고 RI(Refractive Index, Younglin instrument Co., Korea)검출기로 검출하였다.

분자량 측정

분자량은 EPS의 농도를 10 mg/ml로 하여 GPC(gel permeation chromatography)를 이용하여 측정하였다. Zorbax bioseries GFC 250(MW range 500-400,000)를 분석 column으로 하여 GPC system(Agilent Co., U.S.A.)을 사용하였다. 이동상은 물을 사용하여 1 ml/min 유속으로 35°C에서 수행하였다. 시료는 100 μ l 주입하여 RI검출기로 검출하였다. 분자량은 슬라이스를 70개로 나누어 그 중량평균으로 계산하였다.

결과 및 고찰

EPS 생성 균주의 분리 및 동정

김치로부터 분리한 유산균 중 sucrose 고체배지에서 점질성 집락을 나타내는 9종의 균을 분리하여 그 중 sucrose 고체배지 상에서 형태가 다른 3종의 균을 선발하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 GJ2로부터 생성된 EPS는 투명하면서 물엿정도의 퍼짐을 나타냈다. C3에서의 EPS는 불투명하고 끈적임이 크며 배지 상에 블록하게 솟아올랐으며, C11에서의 EPS는 불투명하고 묽게 퍼졌다. 선발된 3종의 균주는 모두 그람양성의 구균으로 현미경하에서의 형태학적 관찰과 생화학적 특성을 조사하였다. 16S rDNA염기서열 분석결과 분리된 3종의 균주는 *Leuconostoc kimchii* AF179386,

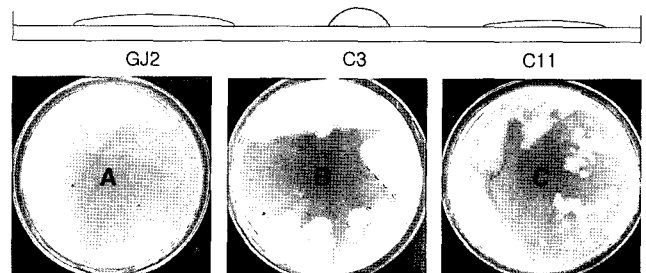


Fig. 1. Isolation of EPS producing lactic acid bacteria from Kimchi. Isolate strains were grown on sucrose medium. A. *Leu. kimchii* GJ2; B. *Leu. citreum* C3; C. *Leu. mesenteroides* C11.

Leuconostoc citreum AF111949, *Leuconostoc mesenteroides* AB023246과 99%, 99%, 99% 상동성을 각각 나타내어 *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었다. 분리된 3종의 균주는 각각 *Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc citreum* C3, *Leuconostoc mesenteroides* C11로 명명하였다.

장내 생존성

유산균이 정상작용의 효능을 발휘하기 위해서는 일단 소화관 내에서 생존하여야 한다. 따라서 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액과 십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다. 3종의 분리 균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 산 저항성을 검토한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 sucrose 배지에서 30°C, 48 시간 동안 배양되어 EPS를 생성한 3종의 분리균주는 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액이나 인공위액에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 초기균수(10^8 CFU/ml)를 유지하며 높은 내산성을 나타내었다. 이는 위에서 생존하여 장으로 이동할 수 있다는 가능성을 제시한 결과라 할 수 있겠다. 순수한 위액의 pH는 1.4-2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 되지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인하여 위의 pH가 높아진다는 것을[26] 고려한다면 생존율은 더욱 높아질 것으로 생각된다. 인공담즙에 대한 내성은 실제로 probiotics 생균으로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/l)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다[20]. 섭취된 유산균은 실제로 위를 통과하여 장으로 이동되는 것임을 고려하여, 분리균주를 인공위액에서 2시간 처리한 후

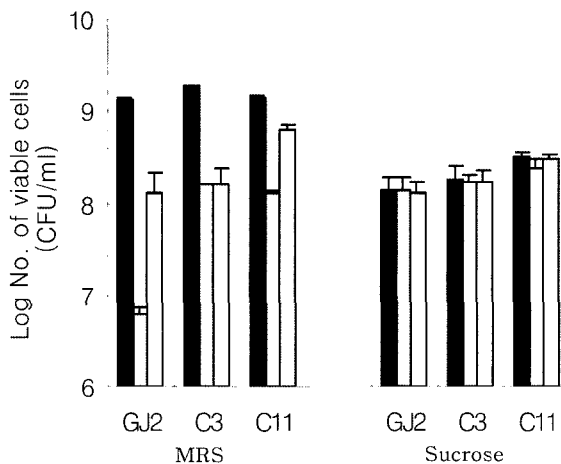


Fig. 2. Acid tolerance of EPS producing isolates in 0.05 M sodium phosphate and artificial gastric juice of pH 3.0. All values were means \pm SD (n=3). Cells were precultured in MRS medium at 30°C for 24 h (■) or in sucrose medium at 30°C for 48 h (■) \rightarrow treated in 0.05 M sodium phosphate (pH 3.0)(□) or in artificial gastric juice (pH 3.0) (□) for 2 h.

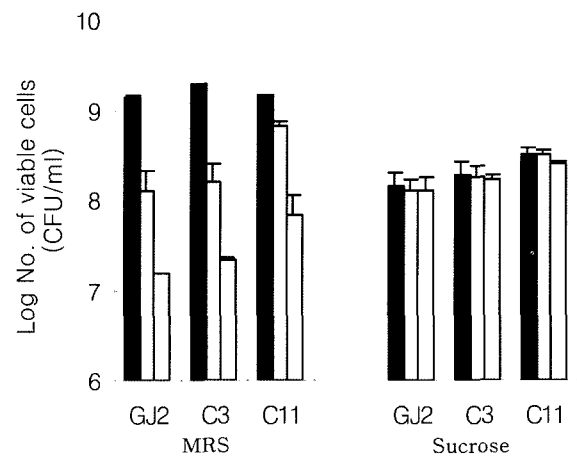


Fig. 3. Bile resistance of EPS producing isolates against 0.3% oxgall after treatment for 2 h in artificial gastric juice of pH 3.0. All values were means \pm SD (n=3). Cells were precultured in MRS medium at 30°C for 24 h (■) or in sucrose medium at 30°C for 48 h (■) \rightarrow treated in artificial gastric juice for 2 h (□) \rightarrow and then in 0.3% oxgall for 24 h (□).

0.3% oxgall 함유 인공담즙을 처리하였을 때 3균주 모두 24 시간 동안 초기균수(10^8 CFU/ml)를 유지하며 높은 담즙액 저항성을 나타내었다(Fig. 3). 정 등[6]이 보고한 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3이 인공위액에서의 저항성이 높은 반면 인공담즙에서의 생존율이 6%로 나타난 점에 비하면 본 연구에서의 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11은 높은 내산성의 기능을 지니면서 동시에 담즙에 대한 높은 저항성을 나타내어 probiotics로서의 기능을 갖추었다고 할 수 있다. 대조균으로서 MRS 배지에서 30°C, 24시간 동안 배양되어 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우 산 저항성 실험에서와 인공담즙 실험 모두에서 생균수가 10^{1-2} CFU/ml 감소현상을 보여, 위내에서의 생존 가능성과 인공담즙에서의 높은 저항성은 분리균주의 EPS 생성으로 인한 균체 보호막 작용에 의한 결과라고 판단되었다. 뿐만 아니라 *Leu. kimchii* GJ2의 경우 분변오염의 지표가 되는 *E. coli*, 패혈증을 일으키는 *Pseudomonas*, 식중독의 원인균인 *Listeria*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*속 등에서 항균활성을 지니는 것으로 나타나(Table 1) 장에 머물면서 유해균주를 억제하여 바람직한 장내 환경을 조성함으로써 효과적인 생균활성 기능을 기대할 수 있다. 또한 생산된 항균물질은 trypsin, protease, proteinase K와 같은 단백분해효소에 의하여 실활됨으로 단백질성 물질임을 알 수 있었다(Table 2). 이와 같은 특성은 *Leu. kimchii* GJ2를 생균활성제로 활용하기에 매우 적합함을 나타내는 결과로 판단된다.

EPS의 분리 및 정제

3종의 분리균주는 유일한 탄소원으로 sucrose를 이용하여 EPS를 생성하였다. *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3,

Table 1. Antimicrobial activity of *Leu. kimchii* GJ2 against pathogenic microorganism.

Sensitive indicator	GJ2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	+
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	+

To assay of antibacterial activity, *Leu. kimchii* GJ2 was directly applied onto sensitive indicator. +: detectable activity.

Table 2. Effect of various enzyme on the antibacterial activity of bacteriocin from the *Leu. kimchii* GJ2.

Enzyme	GJ2
Control (non-enzyme treated sample)	+
Trypsin	-
Protease	-
Lipase	+
α -Amylase	+
Proteinase K	-
α -Chymotrypsin	+

Lb. plantarum KFRI 464 was used as a sensitive indicator.

+: detectable activity; -: no clear zone.

Leu. mesenteroides C11을 sucrose 액체배지에 30°C, 48시간 배양된 배양액에 2배량의 에탄올을 가하여 침전시킴으로써 각각 21.49 g/l, 16.46 g/l, 22.98 g/l의 crude EPS를 회수하였다. 회수된 crude EPS를 다시 정제하였을 때에 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11은 각각 14.61 g/l, 7.73 g/l, 4.77 g/l의 정제된 EPS 수득량을 나타내어 단순 에탄올 침전으로 회수한 crude EPS보다 약 1.5-5배 정도 감소량을 보였다(Table 3). 이러한 결과는 *S. thermophilus*의 경우 50-350 mg/l의 정제된 EPS를 생성하였다는 Cerning 등의 보고[4]와 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*가 164-263 mg/l의 EPS를 생성한 Zhennai Yang의 보고[30] 및 *Lactobacillus* ssp. SCU-M이 1,680 mg/l의 EPS를 생성하였다는 보고[2]보다 높은 EPS 생성량을 보였고, T. Smitinont 등[27]이 보고한 *Pediococcus pentosaceus*

AP-1과 AP-3에서 6.0과 2.5 g/l의 EPS를 생성한 것에 비해서도 높은 생산량이라 할 수 있다. 그러나 김치에서 분리한 유산균에서의 EPS 생성에 관한 보고는 엄 등[9]에 의한 동치미에서 분리된 *Leu. mesenteroides*의 dextransucrase의 활성에 관한 보고정도이며 김 등[13]에 의한 김치로부터 dextran 생성 *Leu. lactis* 분리에 관한 보고가 있으나 생성 dextran에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

구성 당 및 분자량

분리균주에 의해 생성된 EPS의 구성 당을 확인하기 위하여 산 가수분해한 EPS를 TLC와 HPLC를 사용하여 분석하였다. TLC분석 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 분리균주에서 생성된 EPS의 경우 3종 모두 표준 당으로 사용한 glucose와 같은 전개율로 1개의 spot을 나타내어 1차적으로 glucose로만 이루어진 homo형의 EPS로 추정할 수 있었다. 보다 정확한 분석을 위해 산 가수분해물을 HPLC로 분석하였다(Fig. 5). TLC분석 결과와 마찬가지로 가수분해된 3종의 EPS 모두 표준 당으로 사용한 glucose와 같은 retention time(5.92 min)의 단일 peak만을 나타내어 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, 그리고 *Leu. mesenteroides* C11로부터 생성된 EPS는 오직 glucose로만 구성되어 중합

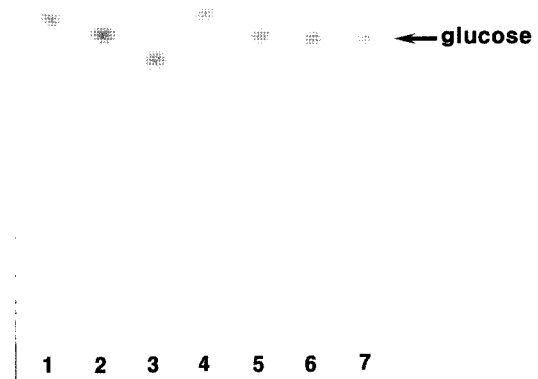


Fig. 4. Thin layer chromatogram after acid hydrolysis of EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11. Lane 1, 2, 3 and 4(standard): fructose, glucose, galactose, and mannose, respectively; lane 5, 6 and 7: acid hydrolyzed product of EPS from *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11, respectively.

Table 3. EPS production by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11.

Culture	Crude EPS (g/l)	Purified EPS (g/l)	Purified EPS	
			Total sugar (g%)	Total protein (g%)
<i>Leu. kimchii</i> GJ2	21.49±0.46	14.61±0.09	96.48±0.49	0.80±0.26
<i>Leu. citreum</i> C3	16.46±0.79	7.73±0.09	89.38±0.33	0.90±1.04
<i>Leu. mesenteroides</i> C11	22.98±0.72	4.77±0.08	91.05±0.28	0.95±0.45

Values are means ± SD(n=3).

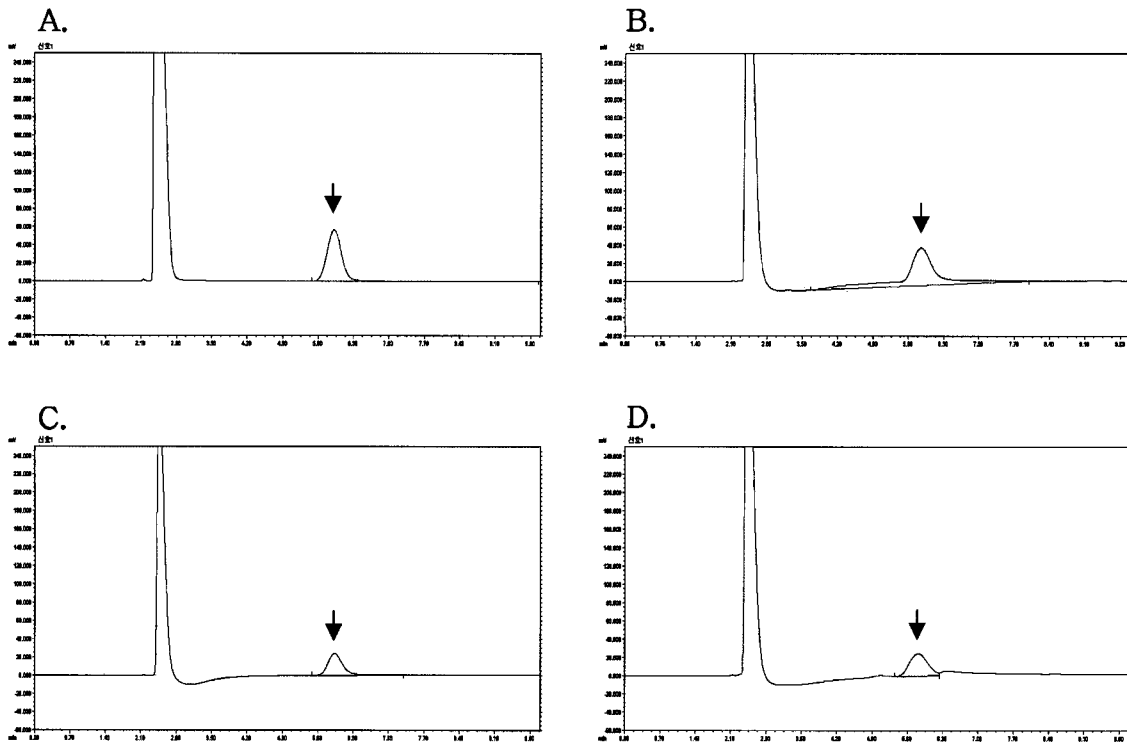


Fig. 5. HPLC chromatogram after acid hydrolysis of EPS produced by *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11. A. glucose(standard); B, C, and D. acid hydrolyzed product of EPS from *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3 and *Leu. mesenteroides* C11, respectively. Arrow indicates glucose.

체를 형성하는 homo형의 polysaccharides인 것으로 결정되었다. 3종의 분리균주 중 EPS생성량이 가장 높은 *Leu. kimchii* GJ2에 대해서 GPC를 이용한 분자량 측정결과 polysaccharide calibration curves에 의해 산출된 평균 분자량은 360,606 Da으로 확인되었다.

점도

분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS가 모두 같은 종류의 당(glucose)으로 구성되었음에도 불구하고 Fig. 1에서와 같이 서로 다른 성상의 EPS를 생성하였다. 따라서 분리균주의 sucrose 배양 상징액과 에탄올 침전하여 회수한 crude EPS, 정제 EPS에 대해 점도를 측정하였다. 점도측정 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11의 배양 상징액은 각각

13.03 cp, 7.31 cp, 2.21 cp의 점도를 나타내었으며, 이로부터 추출된 crude EPS에서는 각각 482.15 cp, 139.25 cp, 5.39 cp, 정제 EPS에서는 각각 4,662 cp, 3,633 cp, 3.67 cp의 점도를 나타내었다. sucrose 고체배지에서 *Leu. citreum* C3로부터 생성된 EPS가 가장 끈적였음에도 불구하고 *Leu. kimchii* GJ2로부터의 EPS가 가장 높은 점도를 나타냈으며, 다음으로 *Leu. citreum* C3로부터의 EPS, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS순으로 나타났다. 그러나 이와 같은 결과는 각 분리 균주로부터의 EPS 생성량에 따른 차이가 점도에 영향을 미쳤을 수 있으므로 각각의 분리균주로부터의 crude EPS와 정제 EPS를 4%(w/v)의 동일농도로 조정한 후 점도를 측정하였다(Table 4). 그 결과 *Leu. citreum* C3에서의 crude EPS와 정제 EPS가 각각 136.3 cp, 3,719 cp로 가장 높은 점도를 나타냈다. *Leu. kimchii* GJ2는 각각 119.4 cp, 266.3 cp였으며, *Leu. mesenteroides* C11은 각각 3.57

Table 4. Viscosities of the EPS solutions produced by the three isolates.

(unit: centipoise)

Culture	Culture supernatant	Crude EPS /20 ml DW	Purified EPS /10 ml DW	Crude EPS (4%)	Purified EPS (4%)
<i>Leu. kimchii</i> GJ2	13.03±0.38	482.15±10.25	4,662±15.72	119.4±0.06	266.3±0.71
<i>Leu. citreum</i> C3	7.31±0.08	139.25± 0.35	3,633±26.87	136.3±0.03	3,719±4.24
<i>Leu. mesenteroides</i> C11	2.21±0.26	5.39± 0.08	3.67± 0.08	3.57±0	6.07±0.04

Values are means ± SD(n=3).

cp, 6.07 cp로 비교적 큰 차이를 보이며 가장 낮은 점도를 나타냈다. 이와 비슷한 결과로 Elisabeth J.의 보고[10]에 의하면 *Streptococcus thermophilus* Rs와 Sts에서 생성된 EPS의 경우 galactose와 rhamnose가 5 : 2로 구성되어 같은 구조를 형성하지만 *Streptococcus thermophilus* Rs는 non-ropy한 EPS를 *Streptococcus thermophilus* Sts는 ropy한 EPS를 생성하는데, 이는 두 균주로부터 생성된 EPS의 분자량(Rs: 2.6×10^3 kDa, Sts: 3.7×10^3 kDa)의 차이에 의한 결과라고 보고하였다. 한편, 점도차이의 다른 요인으로서 생성 EPS들간의 결합구조의 차이를 생각할 수 있다. Jeanes 등의 보고[11]에 의하면 *Leu. mesenteroides* NRRL B-1355는 형태가 다른 두가지 polysaccharide를 생성한다. 하나는 약간의 수용성을 띠는 polysaccharide(fraction L)이고 다른 하나는 수용성 polysaccharide(fraction S)로 fraction L은 *Leu. mesenteroides* NRRL B-512F로부터 생성된 dextran과 유사한 95% α -1,6 glucosidic 결합에 5% α -1,3 가지로 구성된 polysaccharide였으며, fraction S는 alternan으로 이루어졌다고 보고한바 있다. 따라서 3종의 분리균주 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터 생성된 EPS의 점도차이는 이들의 결합구조와 분자량의 차이에 의한 것으로 생각된다.

요 약

김치로부터 3종의 EPS 생성 유산균을 분리하였다. 분리균주는 *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었으며, 각각 *Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc citreum* C3, *Leuconostoc mesenteroides* C11로 명명하였다. EPS생성 김치유산균의 장내 정착성 여부 확인 결과 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate buffer와 인공위액에서 2시간 처리한 후에도 3균주 모두 초기균수(10^8 CFU/ml)를 유지하였으며 인공담즙에서 24시간 처리한 후에도 3균주 모두 초기균수(10^8 CFU/ml)를 유지하며 3종의 EPS생성 김치유산균 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11이 장내 정착하면서 probiotics로서 작용할 수 있을 것임을 확인하였다. 반면, 대조군으로서 분리균주가 EPS를 생성하지 않았을 때의 경우에는 내산성, 인공위액, 인공담즙에서 처리 후 생균수가 10^{1-2} CFU/ml 감소현상을 보여 균체의 EPS생성 여부가 probiotics로서 기능할 수 있는데 결정적 요인임을 보여주었다. 특히 *Leu. kimchii* GJ2의 경우 *E. coli*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*속 등의 유해 균주에서 항균활성을 나타내었으며, 생산 항균물질은 단백질성 물질로 확인되었다. 김치유산균 *Leu. kimchii* GJ2, *Leu. citreum* C3, *Leu. mesenteroides* C11로부터의 EPS 생성량은 sucrose(5%) 배지에서 각각 21.49 g/l, 16.46 g/l, 22.98 g/l 였으며, 정제 시에도 각각 14.61 g/l, 7.73 g/l,

4.77 g/l로 기존의 EPS 생성 유산균에서의 생산량에 비해 10 배 이상의 높은 생산량을 나타내었다. TLC 및 HPLC를 이용한 EPS 구성 당 확인 결과 3균주 모두 glucose로만 구성된 homopolysaccharides로 확인되었다. EPS 생성량이 가장 좋은 *Leu. kimchii* GJ2의 평균 분자량은 360,606 Da이었으며, 나머지 두 균주에 대해서는 생성 EPS 형태와 점도의 차이로 미루어보아 생성 EPS의 분자구조와 분자량이 서로 다른 것으로 판단하였다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 조선대학교 연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Alan, D. W. and I. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnol.* **21**: 269-274.
2. Bae, I. H. and J. W. Huh. 2002. Isolation of *Lactobacillus* ssp. producing exopolysaccharide and optimization of its production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 169-175.
3. Baek, Y. J. 1993. Lactic acid bacteria and human health. *Kor. J. Food Nutr.* **6**: 53-65.
4. Cerning, J., C. Bouilanne, M. J. Desmazeaud, and M. Landon. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* **10**: 255-260.
5. Chou, L. S. and B. Weimer. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**: 23-31.
6. Chung, W. B., W. S. Soe, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from korean dongchimi. *Kor. J. Food Preserv.* **10**: 406-410.
7. Duboc, P. and B. Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**: 759-768.
8. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
9. Eom, H. J., D. M. Seo, H. S. Yoon, H. B. Lee, and N. S. Han. 2002. Strain selection of psychrotrophic *Leuconostoc mesenteroides* producing a highly active dextransucrase from kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 1085-1090.
10. Faber, E. J., P. Zoon, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegthart. 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydr. Res.* **310**: 269-276.
11. Jeanes, A., W. C. Haynes, C. A. Williams, J. C. Rankin, E. H. Melvin, M. J. Austin, J. E. Cluskey, B. E. Fisher, H. M. Tsuchiya, and C. E. Rist. 1954. Characterization and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria.

- J. Am. Chem. Soc.* **76**: 5041-5052
12. Kang, H. J., S. C. Baick, and J. H. Yu. 2005. Studies on the properties of the stirred yogurt manufactured by exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**: 84-91.
 13. Kim, B. J., B. H. Min, J. H. Kim, and H. U. Han. 2001. Isolation of dextran-producing *Leuconostoc lactis* from kimchi. *J. Microbiol.* **39**: 11-16.
 14. Kim, D. J. and S. Y. Lee. 2001. Isolation of exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 370-375.
 15. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
 16. Kim, S. J. 2005. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Food Culture* **20**: 337-340.
 17. Kimmel, S. A., R. F. Roberts, and G. R. Ziegler. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 659-664.
 18. Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-698.
 19. 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.
 20. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 73-78.
 21. Park, C. S. and C. H. Lee. 1992. Effect of reaction time on the rheological properties of dextran formed solution produced by crude dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *sikhae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 316-323.
 22. Park, J. G., S. Y. Yun, S. Oh, J. G. Shin, and Y. J. Baek. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from korean breast-fed infant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
 23. Patricia, R. M., J. Hugenholtz, and P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**: 163-171.
 24. Schacterle, G. R. and R. L. Pollack. 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* **51**: 654-655.
 25. Shin, M. S., J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh, and Y. J. Baek. 1998. Characteristics of *Bifidobacterium* spp. isolated from korean feces for probiotics. *Kor. J. Dairy Sci.* **20**: 273-282.
 26. Sim, J. H., S. J. Oh, S. K. Kim, and Y. J. Baek. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 101-104.
 27. Smitinont, T., C. Tansakul, S. Tanasupawat, S. Keeratipibul, L. Navarini, M. Bosco, and P. Cescutti. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* **51**: 105-111.
 28. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnol.* **16**: 41-46.
 29. Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings, and L. D. Vuyst. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 900-912.
 30. Yang, Zhennai., E. Huttunen, M. Staaf, G. Widmalm, and H. Tenhu. 1999. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *Int. Dairy J.* **9**: 631-638.

(Received July 6, 2006/Accepted Sep. 2, 2006)