한국생물공학회지 제17권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 2, 169-175(2002)

Exopolysaccharide생산 유산균주의 분리 및 배양조건

배 인 휴 · †[1]허 정 원
순천대학교 농과대학 동물자원학과, [1]경기도 보건환경연구원
(접수 : 2002. 2. 18., 게재승인 : 2002. 4. 3.)

Isolation of *Lactobacillus* ssp. Producing Exopolysaccharide and Optimization of its Production

Inhyu Bae and Jeong-Weon Huh[1]†
Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture, Sunchon National University, 315 Maegok-Dong, Sunchon 540-742, Korea
[1]Kyonggi-Do Institute of Health & Environment Suwon 440-290, Korea
(Received : 2002. 2. 18., Accepted : 2002. 4. 3.)

A lactic acid bacterial isolate *Lactobacillus* ssp. SCU-M which produces exopolysaccharide was identified and its cultural condition was investigated. The optimum culture conditions for exopolysaccharide(EPS) production of *Lactobacillus* ssp. SCU-M were 37°C, pH 6.5, using medium composed of 1.5% galactose, 1.0% yeast extract, 0.25% peptone, 0.15% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15% K_2HPO_4 and 0.1% tween 80 in distilled water. The EPS concentration after 48 hours at the initial pH 6.5, 37°C in a flask culture was 1,680 mg/ℓ.

Key Words : exopolysaccharide(EPS) production, *Lactobacillus*, galactose

서 론

유산균 발효유제품의 제조에는 전통적으로 제품의 큰 결점인 유청분리현상을 완화시키고 점성을 증가시키며 조직을 부드럽게 하여 섭취시 구강내 포만감과 조직감을 부여해주기 위하여 안정제를 사용하고 있다. 이러한 안정제로는 전분, carrageennan, guar gum, pectin, gelatin, sodium caseinate 등이 사용되어 왔다(1). 그러나 안정제에 대한 소비자들의 거부감 때문에 서유럽, 특히 프랑스, 덴마크, 네덜란드 등에서는 1960년대 말부터 발효유에 대한 안정제 첨가를 법적으로 규제해 오고 있어 그 대체효과를 위한 제품내 다당류 공급원으로서 미생물다당류에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다(2,3). 이러한 연구결과 그 동안 발효유제조에 사용되어 왔던 starter 유산균들 중에 상당수가 미생물 다당류를 생산하고 있다는 사실이 밝혀 진 바 있고 특히 북부유럽제국들에서는 점질물 생산 유산균들이 매우 오래 전부터 사용되어왔다(4). 이들 점질물 생성균주들은 Nordic ropy 발효유제품들과 코카서스지방의 kefir 및 북유럽 국가들의 villii, piima, langfil, taette 등의 전통적인 점성 발효유제품에 사용되었고(5) 이들 제품 중의 점성물질은 생성균주들의 협막, 균체외 다당류 생성에 의해 유래 된 것으로 그 균종에 따라 구성당의 종류와 비율이 서로 다르다는 것이 밝혀진 바 있다(6-12). 또한 이들 점질물질들이 발효유제품에서의 최종제품에 여러 특성을 증진시키는 효과가 있다고 알려져 오래 전부터 이용되어 오고 있으며 이들 유산균 중 Bifidobacteria의 다당류(13)와 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. helverticus var. jugurti*로부터 유래한 다당류(14)들이 항암효과가 있다고 보고하였다. *Streptococci*로부터 생산된 점질 물질의 경우 면역학적 효과가 있다고 하였고(15), 이들 다당류가 갖고 있는 biofunctional properties 와 항암성이 발견된 이래 새로운 치료약물개발 자원으로서의 잠재성을 보이고 있다(16). 또한 이들 다당류는 유산균과 유단백질을 결합시켜 발효유제품의 결점인 유청분리 현상을 완화시키고 점성의 증가로 점착성을 증대시켜 최종제품의 적절한 조직성이나 견고성을 제공하여 안정제로 작용하며 제조공정 중의 기계적 충격(pumping, blending, filling, machines), 온도 및 물리적 충격에 대한 물성을 안정하게 유지시켜주는 것으로 보고되었다(17-20).

따라서 본 보에서는 우리 나라의 원유로부터 다당류 고생산성 유산균을 선별, 동정함으로써 발효유 산업에서 요구되는 점질성 스타터로서의 가능성을 시험하고 이 균주의 다당류생산을 위한 배양최적조건을 검토하여 이들의 응용가능성을 조사하여 보고한다.

†Corresponding Author : Kyongi-Do Institute of Health & Environment, Suwon 440-290, Korea
Tel : +82-31-250-2531-4, Fax : +82-31-250-2620
E-mail : jwhuh333@netian.com

재료 및 방법

배지조성 및 배양조건

EPS 생산 유산균의 분리용 선택배지로는 1.0%(w/v) glucose, 1.0%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) peptone, 0.2%(w/v) Na-acetate · $3H_2O$, 0.5 mL salt solution($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg, NaCl 2 mg/mL), 1.0 mL tween 80 solution(2.5 mg/mL), 0.5%(w/v) $CaCO_3$, 1.5%(w/v) agar, pH 6.5로 구성된 GYP 배지(Glucose-yeast-peptone agar)를 사용하였다.

시료 현탁액을 도말하여 30℃에서 48시간 배양하였다.

다당류 생성 균주의 분리

원유로부터 채취한 시료를 생리 식염수로 희석한 시료현탁액을 GYP배지에 도말 배양하였다. 30℃ 항온기에서 48시간 배양한 후, 생성된 집락이 투명환을 형성하고 점성이 있는 균을 다당류생성 균주로 선발하였다. 이때 집락의 점성은 Macura 와 Townsley의 방법(5)에 따라 확인하였다. 즉, 멸균된 백금선으로 colony에 접촉하여 점성여부를 확인하였고 배양물의 점성은 12% 환원탈지유에 배양한 후 응고한 배양물을 멸균 피펫으로 흡입하여 점성을 확인, 2차 선발하였으며 viscometer로 점도를 측정하여 가장 점성이 우수한 균주를 최종 선발하였다.

분류 균주의 동정

최종 선발된 점성균주의 동정은 얻어진 결과들을 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(21)와 비교하고 內村와 岡田의 방법(22)에 따라 동정하였다. 분리균의 형태는 전자현미경 (SEM, DSM940, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

다당류의 분리

분리 균주로부터 생성된 다당류의 분리는 배양액을 5분간 열탕하여 효소를 불활성화 한 후 원심분리(11,000×g, 30분, 4℃)하였다. 다시 상등액에 3배량의 cold ethanol을 가하여 다당류를 침전시킨 후 동일 알코올로 2번 세척하고 증류수에 용해하여 배양액으로부터 유리 당을 제거하기 위하여 투석(M. W. cut off 10,000)한 다음 동결 건조한 것을 crude EPS로 사용하였다.

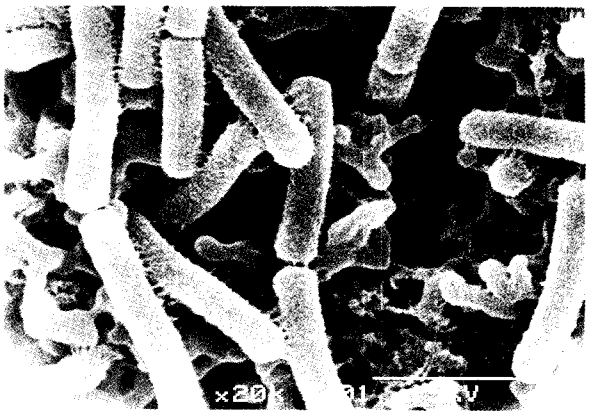
점도, 당량 및 적정산도의 측정

생성된 다당류의 점도는 Brookfield viscometer(LVT, U.S.A.)의 spindle No. 1을 사용하여 측정하였으며 필요에 따라 UL-adapter를 부착하여 측정하였다. 전당량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol sulfuric acid방법(23)을 사용하여 측정하였다. 적정산도는 Bianco 등(24)의 방법에 따라 측정하였다.

배양조건

분리 균주의 최적배양조건은 분리용 배지를 기본배지로 하여 질소원, 탄소원 및 미량원소를 각 농도 별로 첨가하여 48시간 정치 배양한 배양액으로부터 조다당 함량을 측정하여 최적조건을 확립하였다.

그리고 선발균주의 치즈제조시 부산물로 생성되는 유청(whey)의 이용성을 검토하기 위하여 deproteinized whey와 lactic acidified whey를 제조하여 사용하였다. 즉, deproteinized whey는 탈지유를 1N HCl로 pH4.6으로 조정한 후 100℃에서 30분간 가열, 여과하고 다시 1N NaOH로 pH 7.0으로 하여 가열, 여과하여 lactic acid로 pH를 조정하였고, lactic acidified whey는 pH 5.5로 조정, 가열, 여과하여 탄소원으로 사용하였다.



* Bar represents 2 μm

Figure 1. Scanning electron micrographs of the *Lactobacillus* ssp. SCU-M.

Table 1. Fermentation of various carbohydrates by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Carbohydrates	Fermentation	Titratable acidity(%)
Glucose	+++	1.00
Galactose	+++	0.88
Fructose	+++	0.85
Lactose	+++	0.83
Raffinose	+	0.15
Melicitose	±	0.14
Mannose	+++	0.90
Maltose	±	0.12
Sorbitol	-	-
Arabinose	±	0.13
Xylose	±	0.10
Rhamnose	+++	0.46
Melibiose	±	0.11
Ribose	+++	0.76
Inulin	++	0.31
Salicin	++	0.52
Xylan	-	-
Dextrin	±	0.13

결과 및 고찰

분리균주의 동정

선발된 균주의 생리생화학적 특성실험 결과 gram양성, 간균으로 비포자성이며 운동성이 없는 통성혐기성균이고, 그 크기는 0.5×0.7 ~1.0 μm였다(Figure 1).

또한 arginine, casein, gelatin 가수분해, catalase반응, 질산환원반응에서는 음성을 보였으며, indol과 H_2S를 생성하지 않았다. 그리고 esculin을 가수분해하였고, litmus milk시험에서 응고성, 산성화 그리고 비액화성을 나타내었다. 또한 45℃까지 성장하였으나 15℃ 이하에서는 성장하지 않았으며 Table 1에서 보는 바와 같이 선발균주는 glucose, galactose, fructose,

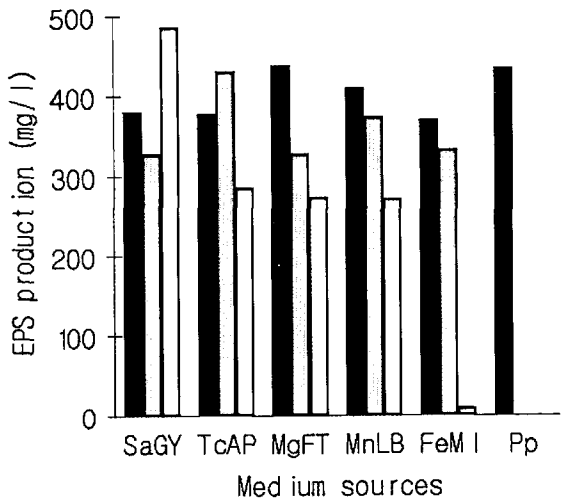


Figure 2. Effect of cabon, nitrogen and salt sources on the EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M. Sa; sodium acetate, Tc; triammonium citrate, Mg; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Mn; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, Fe; $FeSO_4 \cdot H_2O$, Pp: K_2HPO_4, G; glucose, A; galactose, F; fructose, M; mannose, Y; *yeast extract*, P; *peptone*, T; *tryptone*, B; *beef extract*, I; inorganic nitrogen sources

lactose, mannose 및 rhamnose에 대하여 발효하였고, xylan, dextrin과 몇 가지의 당류에 대하여 발효능이 없었던 점으로 미루어 보아 *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*와 일치하지만 4% NaCl에서의 생육 불가, melizitose, sorbitol에서의 발효 능은 일치하지 않았다. 따라서 이러한 특성을 고려하여 *Lactobacillus* ssp. SCU-M으로 동정, 명명하였다.

다당류생산을 위한 최적배양조건

(1) 탄소원의 영향

미생물세포의 EPS 생성능은 배지조성에 크게 영향을 받는데 높은 비율의 탄소원/질소원에서 EPS의 생산이 촉진된다(25). 특히 배지의 탄소원은 다당류의 생산과 그 구조 및 특히 yogurt 제조시 최종제품에서 syneresis와 graininess가 생기지 않도록 방지하는 등 그 물성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있어(18) glucose, galactose, fructose, lactose, raffinose, arabinose, manose, melizitose, maltose, melibiose, ribose, inulin, salcin, sorbitol, xylose, xylan, starch, sucrose, dextrin등 20여종 탄소원의 이용능을 검토한 결과 (Table 1) 다당류 생산성과 균생육능이 양호한 glucose, fructose, galactose, lactose, mannose에 대하여 재차 시험한 결과는 Figure 2로서 galactose에서 각각 431 mg/L로 가장 높은 생산성을 보였으며, lactose, mannose 순으로 생성되었으나 fructose와 glucose에서 가장 낮은 생성 율을 보였고, 당이용율에 있어서도 galactose가 가장 좋았다.

따라서 galactose를 0~4.0%의 농도범위로 첨가하여 균의 생육능과 다당류 생산성을 검토한 결과는 Table 2와 같으며 galactose 1.5%를 첨가하였을 때 균의 생육이 1.39×10^8 cfu/mL로 가장 왕성하였고 당 생성량도 553 mg/L로 가장 높았다. 그러나 galactose (1.5%)와 lactose의 동량 첨가효과는 없었다 (data 생략). 이는 Mozzi 등(26)의 보고에 의하면 *L. casei*의 경우 다당류 생산성에 탄소원이 미치는 영향에서 galactose 첨가시 56 mg/L로 가장 좋았고 lactose가 가장 낮았다는 보고와 유사하였다. 그러나 Cerning 등(27)의 *L. casei* CG11 균주에서 2% glucose 첨가시 160 mg/L로 가장 좋았다는 결과와 Kang 등(28)의 *Lb. acidophilus* CH-2와 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB12의 EPS 생산에서 glucose가 최고의 탄소원 이었다는 보고, 그리고 Toba 등(29)의 *Lactobacillus* sp.에서의 EPS 합성에 대한 galactose의 첨가 효과가 없었다는 결과 및 Gancel 과 Novel(30)이 상업용 균주인 *Str. salivarius* ssp. *thermophilus*의 반합성배지내 배양에서 lactose가 EPS 생성을 주도하였다는 결과와는 상이하였다.

또한 치즈 생산 부산물인 whey의 이용성면에서 다당류생산성을 검토하기 위하여 deproteinized whey와 lactic acidified whey를 사용하여 skim milk와의 생산성을 비교한 결과 Table 3에서와 같이 다당류 생성이 각각 639, 550, 510 mg/L로 deproteinized whey가 다른 탄소원들 보다 높은 결과를 보였다. 이는 Mozzi 등(26)이 *L. acidophilus, L. delbrueckii* ssp.

Table 2. Effect of galactose on growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Galactose (%)	Final pH	Titratable acidity (%)	Viability (10^7cfu/mL)	EPS production (mg/L)
0	4.60	0.27	1.31	72.8
0.5	3.93	0.44	9.02	215
1.0	3.84	0.42	9.86	459
1.5	3.91	0.51	13.93	553
2.0	3.88	0.44	10.37	508
3.0	3.93	0.43	11.32	415
4.0	3.88	0.37	10.48	348

* Initial pH : 6.5

Table 3. Influence of the whey and skim milk on the growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Culture media	Titratable acidity	Viability (10^8cfu/mL)	EPS production (mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu) $\times 10^{-11}$
GYPd*	1.07	7.10	639	90.0
GYPla*	1.16	8.95	550	61.5
Skim milk	0.64	8.65	510	59.0

* d: deproteinized whey, la: lactic acidified whey

Table 4. Effect of yeast extract on the growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Concentration(%)	Final pH	Titratable acidity(%)	Viability(10^7cfu/mL)	EPS production(mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu)$\times10^{-11}$
0	4.19	0.02	0.004	n. d.	0
0.5	3.42	0.27	2.9	291	1003.4
1.0	3.51	0.47	9.4	485	516.0
1.5	3.58	1.40	16.4	681	41.3
2.0	3.60	1.41	10.3	319	309.7

* n. d. : not detected, Initial pH : 6.5

Table 5. Effect of yeast extract and peptone on the growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Peptone(%)	Final pH	Titratable acidity(%)	Viability(10^8fu/mL)	EPS production(mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu)$\times10^{-11}$
0	3.51	0.47	0.94	485	516.0
0.25	3.58	0.51	1.13	602	532.7
0.5	3.62	0.57	1.25	934	747.2
0.75	3.61	0.55	1.36	891	655.1

*Yeast extract : 1.5%, Initial pH : 6.5

Table 6. Effect of $MgSO_4$ on growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

$MgSO_4$(%)	Final pH	Titratable acidity(%)	Viability(10^7cfu/mL)	EPS production(mg/L)
0	3.88	0.46	8.30	870
0.01	3.86	0.46	9.00	811
0.02	3.84	0.48	8.72	814
0.04	3.84	0.48	11.33	821
0.08	3.83	0.49	10.02	872
0.1	3.77	0.48	14.53	901
0.15	3.86	0.46	19.48	971
0.2	3.82	0.48	18.19	959

bulgaricus, S. salivarius ssp. *thermophilus*를 10% non-fat skim milk에서 배양시 EPS생성량이 각각 65, 120, 95 mg/L라고 한 것에 비하여 5~10배로 이 균주의 whey를 이용한 다당류의 생산 가능성을 나타내었다.

(2) 질소원의 영향

질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$ 등의 무기질소원과 peptone, tryptone, beef extract, yeast extract 등의 유기질소원을 이용하여 다당류의 생산량을 조사한 결과 이 균주는 무기질소원인 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3와 NH_4Cl를 첨가한 경우 거의 EPS를 생성하지 않았으나 유기질소원의 경우 상대적으로 매우 높아 이들의 배양조건을 검토한 결과 Figure 2에서와 같이 yeast extract를 첨가 한 경우 486 mg/L, peptone의 경우 286 mg/L 순으로 높았다. 따라서 yeast extract를 0~2.0% 농도로 첨가한 경우 Table 4에서와 같이 1.5% 첨가시 681 mg/L로 가장 양호한 당 생산성을 보였으며 Table 5에 나타낸 바와 같이 위 농도를 고정한 배지에 peptone을 0~0.75% 첨가하였을 때 0.5% 첨가시 934 mg/L로 약 50%의 생산성 향상을 보였다.

이는 Auer와 Seviour(31)와 Aslop (32) 및 Sutherland(33)가 질소원의 제한이 미생물의 다당류생성을 촉진하였다는 보고와 유사하였고 Kimmel 등(14)이 보고한 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*에서 bacto-casiton 첨가가 우수하였고, 생성량도 217~374 mg/L로 가장 양호하였다는 보고와는 상이하였으나 생성량에 있어서는 본 균주가 더 좋은 결과를 나타내었다.

(3) 미량원소의 영향

염류 및 금속이온의 미량성분은 미생물생장과 다당류 생성의 임계요소로 알려져 있어 이들의 다당류 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 미량성분으로 sodium acetate, triammonium citrate, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, K_2HPO_4를 사용하여 시험한 결과 Figure 2에 나타낸 바와 같이 $MgSO_4$를 0.2% 첨가하였을 때 EPS생산성이 435 mg/L로 가장 높았으며 K_2HPO_4, $MnSO_4$ 순으로 나타났다. 따라서 $MgSO_4$를 0~0.2% 농도 범위로 첨가한 시험에서 Table 6에 나타낸 바와 같이 0.15%를 첨가한 경우 EPS생산성과 균의 생육이 971 mg/L과 1.95×10^8cfu/mL로 가장 우수하였다. 반면 Table 7에서 나타난 바와 같이 $MgSO_4$와 비슷한 생산성을 보인 K_2HPO_4를 0~0.2% 농도 범위로 $MgSO_4$와 동시 첨가하였을 때 0.15%가 1,076 mg/L로 EPS 생산성을 증진시켰으며 $MgSO_4$ 단독 첨가 시에 비하여 약 20% 증가하였으나 균 생육은 1.61×10^7cfu/mL로 오히려 억제되어 나타났다.

이러한 결과는 K^+이 EPS생성을 촉진하지는 않았지만 인산과 함께 미생물 증식시 RNA합성, 세포벽의 구조 및 역할에 영향을 주어 균생육을 향상시켰다고 한 보고(34)와는 상이하고 $MnSO_4$의 첨가가 점성과 EPS생성에 효과적 영향을 미쳤다는 보고(34)와도 차이가 있었다. 또한 Sutherland(35)는 인산 혹은 sulfur원의 제한이 EPS생성을 증진시키지만 일부 인산이나 미량성분이 EPS생합성에는 필수적이라는 보고와 일치하였다.

Table 7. Effect of $MgSO_4$ and K_2HPO_4 on growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

K_2HPO_4(%)	Final pH	Titratable acidity(%)	Viability(10^7cfu/mL)	EPS production(mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu)$\times 10^{-11}$
0	3.84	0.49	1.21	971	471.9
0.05	3.53	0.59	1.24	793	316.9
0.1	3.89	0.59	3.79	829	113.2
0.15	3.46	0.63	1.52	1076	444.7
0.2	3.85	0.60	1.61	743	213.0

* $MgSO_4$: 0.15%, Initial pH : 6.5

Table 8. Effect of temperature on the growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Temperature(℃)	Final pH	Titratable acidity(%)	Viability(10^7cfu/mL)	EPS production(mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu)$\times 10^{-11}$
25	3.79	0.56	17.5	1336	763.4
30	3.78	0.63	18.5	1332	720.0
37	3.50	0.83	18.1	1444	797.8
40	3.50	0.80	5.32	1248	2345.9

* Initial pH : 6.5

Table 9. Effect of pH on the growth characteristics and EPS production by *Lactobacillus* ssp. SCU-M

pH	Final pH	Titratable acidity	Viability(10^8cfu/mL)	EPS production(mg/L)	$Y_{p/x}$(mg/cfu)$\times 10^{-11}$
5.5	3.29	1.01	2.19	992	453.0
6.0	3.37	0.95	2.44	1144	468.9
6.5	3.42	0.91	2.17	1680	774.2
7.0	3.55	0.85	2.19	856	390.9
7.5	3.60	0.89	2.37	832	351.1

* Incubation temperature ; 37℃

(4) 온도의 영향

분리균주의 배양온도에 대한 EPS 생산능력을 검토한 결과 Table 8에서와 같이 25~37℃의 온도범위에서 균 생육능력은 커다란 차이를 보이지 않고 비슷한 결과를 보였으나 이 중 37℃에서 1,444 mg/L로 EPS 생산능력이 가장 우수하였다. Mozzi 등(34)의 *L. acidopilus*의 경우 30℃와 37℃에서 가장 좋은 EPS생산성을 나타냈으며, *L. delbrueckii* ssp. bulgaricus의 경우 37℃에서 121 mg/L의 EPS를 생성하였다고 하였고 (35) *Str. salivarius* ssp. *thermophilus*는 30℃에서 가장 좋은 EPS생성을 나타내었다는 보고와 유사한 경향을 보였으며 본 균주는 이에 비해 9배의 높은 생산성을 나타내었다(36). 한편, Ko 등(37)이 *H. chejuensis*가 25℃에서, Rasic과 Kurmann (4) 이 점질성 유산균이 최적생육온도보다 낮은 온도에서 점성물질의 생성이 증가된다는 보고와는 다소 상이하였다.

(5) 초기 pH의 영향

이상의 당 생성 발효최적조건을 확립하여 pH를 5.5~7.5 범위로 조정한 완전배지를 이용하여 EPS 생산능력을 검토한 결과는 Table 9와 같으며 pH6.5에서 1,680 mg/L로 가장 좋았으며 세포 당 EPS 생산능력인 $Y_{p/x}$도 774로 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 Mozzi 등(38)의 *L. casei* CRL87의 경우 pH 5.0에서 가장 좋은 EPS 생성량을 나타낸 것과는 상이하였다.

이상의 결과로부터 galactose 1.5%, yeast extract 1.0%, peptone 0.25%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, K_2HPO_4 0.15%, Tween80 0.1%, 배양온도 37℃, pH 6.5로 EPS생성의 최적 배지를 결정하였으며(Table 10) 1,680 mg/L의 EPS를 생성할 수 있었다. 이러한 결과는 *S. thermophilus*의 경우 50~350 mg/L의 EPS 생산능력을 나타냈다는 Cerning 등(15)의 결과와 *L. bulgaricus*가 60~150 mg/L 정도의 EPS생산성을 나타냈다는 Garcia-Garibay와 Marshall의 결과(39) 및 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*의 EPS의 생산성이 80~600 mg/L였다고 보고된 결과(9)보다 높은 EPS생성량을 보였고, Dick 등(40)이 보고한 *L. sake*에서 1,400 mg/L의 EPS를 생성한 것에 비해서도 높았다.

Table 10. Composition of the propriety medium for production of EPS of *Lactobacillus* ssp. SCU-M

Components	Concentration(%)
Galactose	1.50
Yeast extract	1.00
Peptone	0.25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15
K_2HPO_4	0.15
Tween 80	0.10

* Initial pH : 6.5, Temperature : 37℃

요 약

원유로부터 다당류를 생산하는 유산균을 분리, 선발하여 균의 배양조건을 조사하고 *Lactobacillus* ssp. SCU-M으로 동정, 명명된 최적배지의 탄소원은 galactose 1.5% 첨가시 553 mg/L의 EPS를 생성하였으며 whey의 이용성 검토를 위한 deproteinized

whey와 lactic acidified whey를 탄소원으로 사용하였을 때 각각 639, 550 mg/L를 생성하였다. 질소원으로 yeast extract 1.5%, peptone 0.5%를 첨가한 경우 934 mg/L, 미량성분으로 $MgSO_4$, 0.15%, K_2HPO_4 0.15% 첨가시 1,076 mg/L의 다당 생산성을 나타내었다.

따라서 이들 결과를 종합하여 galactose 1.50%, yeast extract 1.00%, peptone 0.25%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, K_2HPO_4 0.15%, tween 80, 0.10%를 적정 배지로 하여 pH 6.5, 배양온도 37℃에서 배양시 1,680 mg/L의 EPS를 생성하였다.

감 사

본 연구는 산학협동재단의 1997-1998년도 학술연구비지원 사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부로 연구비지원에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Hur, C. S., J. H. Lee, Y. J. Baek, and H. U. Kim(1995), Characteristics of Polysaccharide produced by Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria, *J. Kor. Dairy Technol. & Sci.* **13(1)**, 27-39.
2. Zourari, A., J. P. Acocolas, and M. J. Desmazeaud(1992), Metabolism and Biochemical Characteristic of Yoghurt bacteria. a review, *Lait.* **72**, 1-34.
3. Schellhaass, S. M. and H. A. Morris(1985), Rheological and Scanning Electron Microscopic Examination of Skim Milk gels obtaines by Fermenting with ropy and non-ropy strains of Lactic acid Bacteria, *Food Microstructure.* **4**, 279-287.
4. Rasic, J. L. and J. L. Kurmann(1978), Yoghurt-Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations. p61, 99-137, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark.
5. Macura, D. and P. M. Townsley(1984), Scandinavian Ropy Milk : Identification and characterization of endogenerous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion, *J. Dairy Sci.* **67**, 735-745.
6. Sundman, V.(1953), On the Protein Character of a Slime produced by *Streptococcus cremoris* in Finnish ropy sour milk, *Acta Chem. Scand.* **7**, 558.
7. Sharpe, M. E., I. E. Gravie, and R. H. Tilbury(1972), Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus, Appl. Microbiol.* **23**, 389-397.
8. La Riviere, J. W. M., P. Koomin, and K. Smidt(1967), Kefiran, a Novel Polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis, Arch. Mikrobiol.* **59**, 269-278
9. Cerning, J., C. Bouillanne, M. Landon, and M. Desmazeaud (1992), Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from slim-forming mesophilic lactic acid bacteria, *J. Dairy Sci.* **75**, 692-699.
10. Nakajima, H. and T. Hirota(1992), Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495, *Cabohydr. Res.* **224**, 245-253.
11. Gruter, M., B. R. Leeflang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegenthart(1992), Structure of the Exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk, *Carbohr. Res.* **231**, 273-291
12. Gruter, M., B. R. Leeflang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegenthart(1993), Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrückii* subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk, *Carbohr. Res.* **239**, 209-226.
13. Ohyama, Y.(1982), Extracellular Polysaccharide produced by *Bifidobacterium, Jpn. J. Dairy Food Sci.* **31**, A258-259.
14. Kimmel, S. A., R. F. Roberts, and G. R. Ziegler(1998), Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 659-664.
15. Cerning, J., C. Bouillanne, M. Desmazeaud, and M. Landon(1988), Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus, Biotechnol. Lett.* **10**, 255-260.
16. Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, K. Kambe, and F. Tsuchiya(1983), Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp., *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1623-1625.
17. Cerning, J.(1990), Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 113-130.
18. Nakajima H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa, and S. Adachi(1990), A Novel phosphopolysaccharide from slim-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495, *J. Dairy Sci.* **73**, 1472-1477.
19. Perry, D. B., D. J. McMahon, and C. J. Oberg(1998), Manufacture of low fat Mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures, *J. Dairy Sci.* **81**, 563-566.
20. Schellhaass, S. M.(1983), Characterization of exocellular slim produced by bacterial starter cultures used in the Manufacturer of fermented dairy products, Ph. D. Dissertation, University of Minnesota, St. Paul.
21. Sneath, P. H. A., N. S. Nair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt(1986), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. p1208-1234, Williams and Wilkins, Baltimore.
22. Uchimura, T. and S. Okada(1992), Laboratory Manual on Lactic Acid Bacteria - From Isolation to Identification, p28-73, Asakura Shoten, Tokyo.
23. Dubois, M. K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith(1956), Colorimetric method for determinaton of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
24. Bianco, L. J., G. H. Richardson, J. W. Sherbon, J. A. Biuke, D. Lehman, W. Roth, R. Ginn and D. T. Liden (1978), In Standard methods of the Examination of Dairy Products(Ed. E. M. Marth), p329-336, Amer. Publ. Health

Assoc., Washington.

25. Choi, J. H., S. Y. Kim, U. T. Lee, D. K. Oh, and J. H. Kim(1998), Optimization of Culture Condition for Production a High Viscosity Polysaccharide, Methylan, by *Methylobacterium organophilum* from Methanol, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26(3)**, 244-249.
26. Mozzi, F., G. S. D. Giori, G. Oliver, and G. F. D. Valdez(1995), Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei.* Ⅱ. Influence of the carbon source, *Milchwissenschaft.* **50**, 80-82
27. Cerning, J., C. M. G. C. Renard, J. F. Thibault, C. Bouillanne, M. Landon, M. Desmazeaud, and L. Topisirovic (1994), Carbon source requirements for Exopolysaccharide by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3914-3916.
28. Kang, H. M., I. S. Son, Y. S. Um, and C. I. Chung (1999), Comparison of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Foods I. A Study on the Availability of Carbon Sources for Exopolysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* spp., *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **19(2)**, 121-126.
29. Toba, T., Y. Tomita, T. Ioth, and S. Adachi(1981), β-galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose, *J. Dairy Sci.* **64**, 185-189.
30. Gancel, F. and G. Novel(1994), Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Cultures. 1 Conditions of Production, *J. Dairy Sci.* **77**, 685-688.
31. Auer, D. P. F. and R. J. Seviour(1990), Influence of varying nitrogen Sources on polysaccharide Production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32.** 637-644.
32. Aslop, R. M.(1983), Industrial Production of Dextrans . In: *Progress in Industrial Microbiology Vol.*18 (Bushel, M. E., ed.). p1-44, Elsevier, London.
33. Sutherland, I. W.(1982), Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides, *Adv. Microbial. Physiol.* **23**, 79-150.
34. Mozzi, F., G. S. D. Giori, G. Oliver, and G. F. D. Valdez(1995), Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei.* Ⅰ. Influence of salts, *Milchwissenschaft.* **50**, 307-309.
35. Sutherland, I. W.(1972), Bacterial exopolysaccharides, *Adv. Microb. Physiol.* **8**, 143-212
36. Mozzi, F., G. Oliver, G. S. D. Giori, and G. F. D. Valdez(1995), Influence of Temperature on the production of exopolysaccharide by thermophilic lactic acid bacteria, *Milchwissenschaft.* **50(2)**, 80-82.
37. Ko, S. H., H. S. Lee, S. H. Park, and H. K. Lee(2000), Optimal Conditions for the Production of Exopolysaccharide by Marine Microorganism *Hahella chejuensis, Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 181-185
38. Mozzi, F., G. S. D. Giori, G. Oliver, and G. F. D. Valdez(1994), Effect of culture pH on the growth characteristics and exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei, Milchwissenschaft.* **50**, 667-670.
39. Garcia-Garibay, M., and V. M. E. Marshall(1991), Polymer production by *Lactobacillus delbtueckii* ssp. *bulgaricus, J. Appl. Bacteriol.* **70**, 325-328.
40. Dick, J. C. van den Berg, G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, A. M. Ledeboer, and T. Verrips(1995), Production of novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* O-1 and characterization of the polysaccharide, *Appl. Environ. Microbiol.* **61,** 2840-2845.