

전통 침채류 유래 다당 생산균의 분리 및 특성

권태연 · 심상민 · 허민영 · 안두현 · 신광순 · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Isolation and Characterization of Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Korean Fermented Vegetables. Kwon, Taeyeon, Sangmin Shim, Minyoung Heo, Doohyun An, Kwang-Soon Shin, and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – Four bacteria producing viscous exopolysaccharides (EPSs) were isolated from Korean fermented vegetables (Cucumber *kimchi*, Young radish *kimchi*, Green onion *kimchi*) using a selection medium intended for isolating bacteria with tannin-degrading activity. They were identified phylogenetically by 16S rDNA sequence analysis and found to be very close to *Enterobacter cowanii*, *Escherichia senegalensis*, *Enterobacter asburiae*, and *Enterobacter ludwigii*. Strain CK31, the most efficient EPS-producer, produced a heteropolysaccharide with an approximate molecular weight of 420 kDa. The neutral sugar fraction of the EPS was composed of rhamnose, fucose, arabinose, mannose, galactose, and glucose.

Key words: Exopolysaccharide, fermented vegetable, *Enterobacter*

서 론

우리나라 고유의 전통식품인 김치는 주원료 배추, 무 등에 고춧가루, 마늘, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 발효시킨 채소발효식품으로, 이들 원료와 미생물의 적당한 발효가 어우러져 고유한 풍미를 만들어 낸다.

다양한 측면에서 김치 관련 연구가 꾸준히 진행되고 있고, 1939년 처음으로 김치발효 관련 미생물에 대한 연구[12]가 보고된 후, 현재까지 *Leuconostoc*속, *Lactobacillus*속 등의 주발효 유산균뿐만 아니라 *Bacillus*속, *Aeromonas*속 및 효모에 이르기까지 다양한 미생물의 존재가 보고되었다[17]. 유산균을 비롯한 다양한 미생물이 검출됨에 따라 김치는 국내 연구자들에게 새로운 기능성을 보유한 안전한 미생물의 탐색원이 되어왔다. 김치에서 분리한 유산균을 probiotics로 개발하려는 연구를 비롯하여, dextransucrase의 생산을 위한 *Leuconostoc mesenteroides*의 분리[4], 저분자 기능성물질 CLA (conjugated linoleic acid)와 GABA (gamma-aminobutyric acid) 생산균주의 분리 등이 진행되었고[3, 14], 특히 식중독균의 저해 및 bacteriocin 생산과 관련된 유산균의 선발에 대해서는 많은 연구가 진행되었다[10, 11].

그러나 지금까지 김치에 관한 연구의 대부분은 배추김치에만 편중되어 있어, 다른 주원료를 사용하는 발효 침채류가 우리나라에 다수 있음에도 불구하고, 이들에 대한 체계적인 미생물 연구는 부진한 실정이다.

본 연구에서는 탄닌을 분해하는 유산균을 분리하여 올리 고머형 탄닌의 생산 및 탄닌과 단백질의 결합에 의한 영양소 흡수 저하의 문제점 해결을 목적으로 전통 침채류 9종으로부터 탄닌을 분해하는 유산균을 검출하던 중, 일부 침채류 시료를 접종한 선발배지에서 다당류로 추정되는 점질물질을 생산하는 균주를 선발하였다.

박테리아가 생산하는 세포외 다당류(exopolysaccharides, EPSs)는 구성당 및 연결구조의 다양성으로 인해 다양한 물성을 가지고 있고, 자연계에서 쉽게 분해될 뿐만 아니라, 배양액으로부터 쉽게 회수되기 때문에 적은 비용으로 정제가 가능하다. 이러한 장점들로 인해 식품산업에서의 유향제, 안정제, 응집제 등의 용도뿐만 아니라 의료용으로도 주목을 받고 있다[9, 13].

본 연구에서는 발효 침채류 유래 박테리아가 생산하는 다당류의 산업적 이용 가능성을 검토하기 위해서 수행한 실험의 결과를 보고한다.

재료 및 방법

미생물 분리원

미생물 분리에 사용된 발효 침채류(배추김치, 총각김치, 물김치, 파김치, 고들빼기, 깻잎김치, 오이소박이, 고춧잎김치, 부추김치)는 서울과 수도권 지역의 대형마트와 재래시장에서 구입하였고, 이들 시료는 멸균된 거즈로 여과한 후 생리식염수로 적당히 희석하여 선발배지에 도말하여 미생물 분리에 사용되었다.

*Corresponding author

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

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

배지 및 배양

탄닌 분해균의 분리를 위한 선발배지는 2%(w/v) tannic acid 용액(Sigma, USA)이 처리된 brain heart infusion agar (T-TBHIA)가 사용되었고[15], 37°C에서 3일간 배양하였을 때 점성을 나타내는 집락(colony)을 선발하여 순수분리한 후, 점질물의 생성을 확인하였다(Fig. 1). 선발된 점질물 생성균의 배양은 배 등[1]이 다당 생성의 최적 배지로 결정된 조성에 따라 1.5%(w/v) galactose, 1.0%(w/v) yeast extract, 0.25%(w/v) peptone, 0.15%(w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.15%(w/v) K₂HPO₄, 0.1%(w/v) Tween 80을 혼합하여 pH 6.5로 제조한 GYP (galactose-yeast-peptone) 액체배지 또는 1.5%(w/v) agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다.

미생물 동정

분리균의 동정은 16S ribosomal DNA의 염기서열에 의해서 결정되었다.

선발된 균주들의 16S rDNA의 PCR 증폭을 위한 universal primer (16F: 5'-GAA CGC TGG CGG CGN GCY T-3'; 16R: 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3')는 GenBank database에 수록된 *Lactobacillus plantarum* (AL935260), *Lactobacillus pentosus* (D79211), *Lactobacillus paraplantarum* (AJ306297), *Bacillus cereus* (AE017194), *Listeria monocytogenes* (AL591981), *Bacillus subtilis* (Z99107), *Lactobacillus acidophilus* (CP000033), *Streptococcus thermophilus* (CP000023), *Streptococcus pyogenes* (AE004092), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (AE006456),

Clostridium perfringens (CP000246), *Desulfotalea psychrophila* (CR522870), *Nitrobacter hamburgensis* (CP000319), *Shewanella denitrificans* (CP000302), *Vibrio fischeri* (CP000020), *Bifidobacterium longum* (AE014295), *Treponema denticola* (AE017226), *Ehrlichia canis* str. *Jake* (CP000107), *Chlamydia trachomatis* (DQ019307)의 16S rDNA 염기서열을 ClustalX multiple alignment program (Higgins Laboratory, Ireland)을 이용하여 정렬한 후, 보존영역을 선정하였고, 다인바이오(Korea)에서 제작하였다.

선발균주의 total DNA는 GYP 액체배지에서 37°C, 24시간 배양한 균체로부터 DNeasy[®] tissue kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 추출하였다.

PCR 반응에는 UNOII thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하였으며, 100 µL 반응계에는 20 ng DNA, 0.25 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany) 및 각 20 pmol의 primer를 첨가하였다. 온도조건은 95°C에서 5분 예비 가열 후, 95°C 1분간 변성, 72°C 1분 annealing, 72°C 1분 합성의 과정을 30회 반복하여 수행하였다.

PCR에 의하여 증폭된 단편은 전기영동한 다음, 0.8% agarose gel로부터 QIAquick gel extraction kit (Qiagen)을 사용하여 회수한 다음, pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 cloning하였다. 재조합 plasmid에 삽입된 단편의 염기서열은 수탁업체(SolGent, Korea)에 의뢰하여 결정하였다.

결정된 염기서열은 nucleotide blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 이용하여 상동성이 높은 균주의 16S rDNA 정보를 얻은 다음, ClustalX program을 이용하여 염기서열을 정렬하고, TreeView program [16]을 이용하여 계통유전학적(phylogenetic) tree를 완성하였다.

다당 분석

GYP 고체배지에서 배양한 균주가 세포 외로 생성하는 점질물질을 멸균된 면봉으로 회수하여 분석시료로 사용하였다. 점질물 1 g을 증류수 20 ml에 녹인 후, 80 ml 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치하고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 소량의 증류수에 다시 녹이고, 증류수로 투석하여 저분자의 당류와 불순물을 제거한 후, 원심분리로 침전물을 제거하고 얻어진 상등액을 냉동건조하여 7.45 mg의 수용성 조다당을 얻을 수 있었다.

조다당의 분자량 및 정제도 분석은 Asahipak GS-520, GS-320, GS-220 column (각 0.76×50 cm, Asahi Chemical Industry Co., Japan)을 직렬로 장착한 HPLC로 수행하였다. 0.2 M NaCl 용액을 전개용매로 0.5 ml/min로 상온에서 용출하였고, 검출에는 RI detector를 사용하였다. 다당의 분자량은 standard pullulan P-400, 200, 100, 50, 20, 5 (Showa Denko Co., Japan)들을 전개하여 얻어진 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

구성당은 조다당 시료 1 mg을 2 M trifluoroacetic acid로

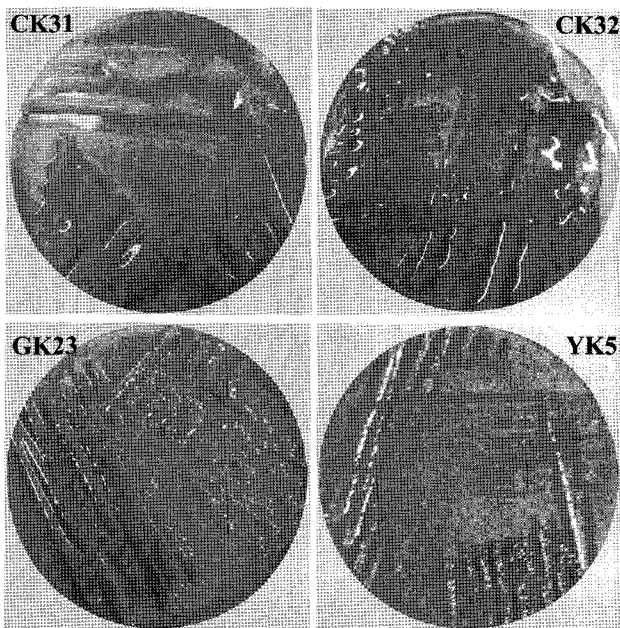


Fig. 1. Growth of exopolysaccharide-producing strains on GYP agar plates after 2 days of incubation at 37°C.

121°C에서 90분간 가수분해한 다음, alditol acetate 유도체로 전환시켜 GC-FID로 분석하였다[6]. GC 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 μ m film, 0.25 mm \times 30 m, Supelco)이 장착된 Hewlett-Packard model 5890 series II을 이용하였으며, 온도조건은 60°C에서 1분간 유지 후 220°C까지 30°C/min의 비율로 상승시켜 12분간 유지하고 250°C까지 8°C/min의 비율로 상승시킨 후 15분간 유지하여 분석하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비와 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

결과 및 고찰

다당 생성균의 선별

수원시 소재 재래시장에서 구입하여 적당히 희석한 발효 침채류 시료를 T-TBHA에 도달하여 배양한 결과, 오이소박이(Cucumber kimchi), 총각김치(Young radish kimchi), 파김치(Green onion kimchi)로부터 다당류로 추정되는 점질물질을 생성하는 4종의 집락을 순수분리하였다. 오이소박이에서 분리한 균은 각각 CK31, CK32로, 총각김치에서 분리한 균은 YK5, 파김치에서 분리한 균은 GK23으로 명명하였다. 이들 균주를 GYP 고체배지에서 배양한 결과, 오이소박이에서 분리된 CK31과 CK32 균주가 YK5나 GK23에 비해 많은 양의 EPSs로 추정되는 점질물질을 생성하는 것이 육안

으로 확인되었다(Fig. 1).

분리균주의 동정

점질물질을 생산하는 CK31, CK32, YK5, GK23 균주를 대상으로 16S rDNA의 전체 염기서열을 결정하여 nucleotide blast search를 수행한 결과, 침채류에서 발견된 4종의 균주는 모두 Enterobacteriaceae과(family)에 속하는 미생물들과 진화적 유연관계가 확인되었다. Fig. 2는 전체 16S rDNA 염기서열이 등록된 근연관계의 미생물들을 대상으로 *Escherichia coli* K12의 52번부터 1401번까지에 해당하는 16S rDNA 염기서열을 ClustalX program으로 정렬하여 TreeView program에 의해서 계통유전학적 tree를 완성한 결과이다. CK31은 *Enterobacter cowanii*와 CK32는 *Escherichia senegalensis*와 99%의 상동성을 나타내었고, YK5는 *Enterobacter asburiae*와 GK23은 *Enterobacter ludwigii*와 99%의 높은 상동성을 나타내었다. *Enterobacter*속 및 *Escherichia*속 박테리아들의 전체 16S rDNA 염기서열에 대한 정보가 충분하지 않고, 이들 균주간의 염기서열은 97% 이상의 높은 상동성을 가지고 있다(Table 1). 염기서열의 비교만으로는 확실한 결론을 내릴 수는 없지만, CK31과 YK5, GK23 균주는 *Enterobacter*속으로 CK32 균주는 *Escherichia*속으로 추정된다.

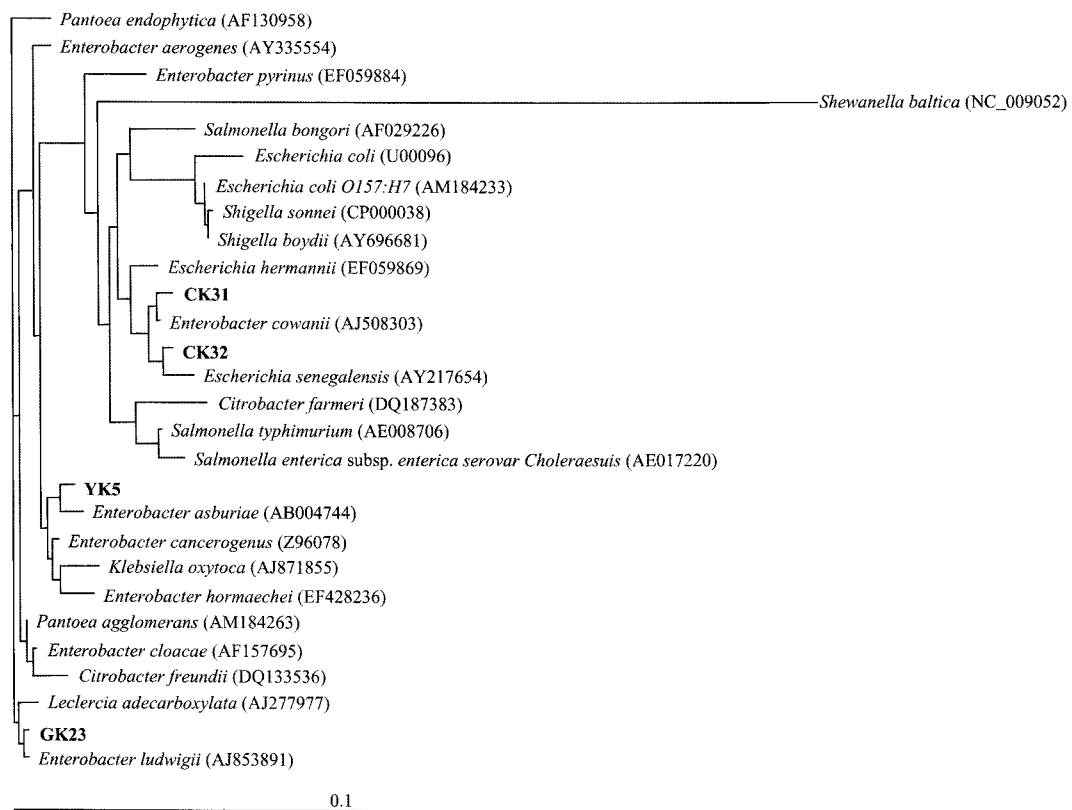


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing relationship between isolates and bacteria with full 16S rDNA sequence. The GenBank accession number is enclosed in parenthesis. Scale bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

Table 1. The % 16S rDNA sequence identities between bacteria isolated in this research.

	<i>E. asburiae</i>	<i>E. cowanii</i>	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. senegalensis</i>
<i>E. asburiae</i>	100			
<i>E. cowanii</i>	97	100		
<i>E. ludwigii</i>	99	97	100	
<i>E. senegalensis</i>	97	99	97	100

오이소박이 유래 다당 생성균의 검출

분리한 4종의 점질물 생성균이 대장균군에 속하는 것으로 판명됨에 따라, 균주 분리에 사용한 오이소박이, 총각김치, 파김치가 분변 또는 토양으로부터의 비분변성 요인에 의해 서 오염되었을 가능성을 가지고 있다.

한편, 김치발효의 주발효균인 *L. mesenteroides*가 dextran을 생성한다는 사실은 잘 알려져 있지만, 김치로부터 dextran을 생성하는 박테리아를 분리한 연구는 활발하게 진행되지 않았다[4, 7, 8]. 뿐만 아니라 오이소박이로부터 dextran 생성균의 검출은 아직 보고된 바 없다. 하지만, 오이소박이를 비롯한 발효 침체류에서는 약간의 점질성 물질의 존재가 관찰됨으로, 지금까지 보고되지 않은 점질물 생성 박테리아의 발효 관련성을 배제할 수는 없다. 따라서 Enterobacteriaceae 과 박테리아의 침체류 발효 관련성의 확인을 위해 비교적 위생이 양호하다고 판단되는 서울 및 경기도 소재 대형마트 5 곳으로부터 오이소박이를 구입하여, T-TBHIA 배지에서 점질물 생성균의 선별을 시도하였으나, 5종의 시료 모두로부터 점질물질을 생산하는 균주가 검출되지 않았다.

따라서, 본 실험에서 검출된 4종의 점질물 생성 박테리아는 침체류 발효 관련이 아닌 비위생적 제조에 의한 오염으로 판단된다.

CK31 균주가 생산하는 세포외 다당 분석

*L. mesenteroides*는 세포 외로 glucose로 구성된 dextran이라는 homopolysaccharide를 생성하지만, 박테리아가 생성하는 대부분의 EPSs는 여러 종류의 구성당을 가지고 있는 heteropolysaccharides인 것으로 알려져 있다. 또한 박테리아의 hetero형 EPSs는 종(species)에 따라서 차이가 있을 뿐만 아니라 균주(strain)에 따라서도 차이가 있는 것으로 보고되었다[2, 5].

HPLC에 의해 분리된 조다당 chromatogram (Fig. 3)에서는 비교적 좌우대칭이 잘 유지된 단일 peak가 검출되어, 비교적 정제도가 우수한 것으로 판단되며, CK31 균주는 분자량 약 420 kDa의 단일한 EPS를 세포 외로 생산하는 것으로 추정된다. Aditol acetate 유도체의 제조를 통한 조다당 중의 중성당 조성을 GC-FID로 분석한 결과, 표준 rhamnose, fucose, arabinose, mannose, galactose, glucose와 일치하는 peak들이 검출되었고, 이들 구성당의 mole%를 계산한 결

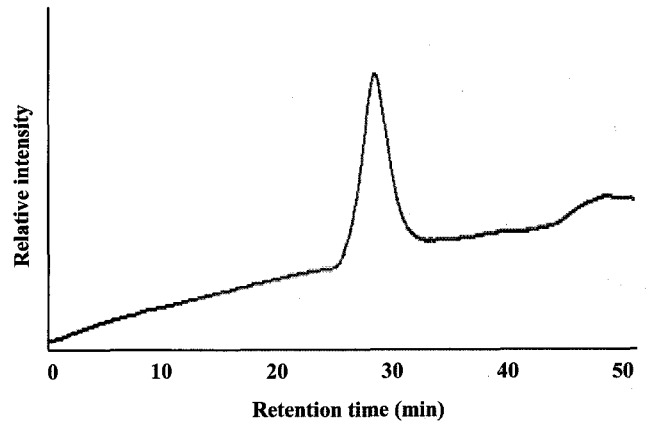


Fig. 3. Molecular weight determination of the exopolysaccharide produced by CK31 with HPLC.

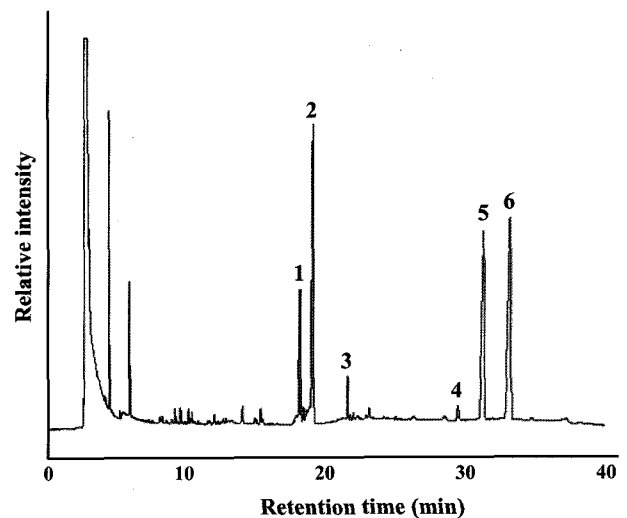


Fig. 4. Gas chromatogram of alditol acetate derivatives of the hydrolyzate of exopolysaccharide produced by CK31. Peak: 1, rhamnose; 2, fucose; 3, arabinose; 4, mannose; 5, galactose; 6, glucose.

과 13:32:3:1:24:27의 비율로 조성된 것으로 나타났다. 지금까지 보고된 *Enterobacter*속 세균이 생산하는 EPSs는 주로 rhamnose, fucose, galactose, glucose, glucuronic acid로 구성된 heteropolysaccharides인 것으로 알려져 있다[2, 5]. 본 연구에서 분리한 CK31이 생산하는 EPS는 소량의 arabinose와 mannose가 함유되어 있기는 하지만, 주요 중성당은 rhamnose 및 fucose, galactose, glucose로 구성되어 있어, 기존에 보고된 *Enterobacter*속 세균의 EPSs와 크게 다르지 않은 것으로 나타났다.

본 실험에서 분리한 CK31의 경우에는 비교적 다량의 EPS를 생산하고, EPS는 다양한 조성의 구성당으로 이루어져 있어 다양한 물성과 생리활성을 나타낼 수 있고, 식품이나 의약품으로의 적용 가능성을 가지고 있다. 또한 구성당 중, L-fucose는 자연계에서 쉽게 발견되지 않고, 항암활성 및 항염증활성을 가지고 있는 것으로 보고되어, 의료 및 화장품 산

업에서 높은 응용 가능성을 가지고 있다[2]. 향후, CK31에 대한 비병원성 검증을 비롯한 용도 개발 등의 많은 문제점들이 해결된다면, 산업화 가능성이 있는 균주로 사료된다.

요 약

탄닌 분해균 선발배지를 이용하여 탄닌 분해활성 보유 유산균을 발효 침채류로부터 분리하는 과정에서 오이소박이, 파김치, 총각김치로부터 다당류로 추정되는 점질물질을 생산하는 균주 4종을 선발하였다. 이들 균주의 16S rDNA 염기서열에 의한 계통유전학적 동정 결과, CK31은 *Enterobacter cowanii*, CK32는 *Escherichia senegalensis*, YK5는 *Enterobacter asburiae*, GK23은 *Enterobacter ludwigii*와 99% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내었다. 가장 많은 양의 점질물질을 세포 외로 생성하는 CK31 균주는 rhamnose, fucose, arabinose, mannose, galactose, glucose의 중성당 조성을 가지고 있는 분자량 약 420 kDa의 heteropolysaccharide를 생산하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 2006학년도 경기대학교 특성화사업 프로그램 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Bae, I. and J.-W. Huh. 2002. Isolation of *Lactobacillus* spp. producing exopolysaccharide and optimization of its production. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 169-175.
- Cescutti, P., A. Kallioinen, G. Impallomeni, R. Toffanin, P. Pollesello, M. Leisola, and T. Eerikainen. 2005. Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus*. *Carbohydr. Res.* **340**: 439-447.
- Cho, Y. R., J. Y. Chang, and H. C. Chang. 2007. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 104-109.
- 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. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**: 1085-1090.
- Isobe, Y., Y. Matsumoto, K. Yokoigawa, and H. Kawai. 2001. Properties of an extracellular polysaccharide produced by a strain of *Enterobacter* isolated from pond water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 1399-1401.
- Jones, T. M. and P. Albersheim. 1972. A gas chromatography method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.* **49**: 926-936.
- Kim, B.-J., B.-H. Min, J. Kim, and H.-U. Han. 2001. Isolation of dextran-producing *Leuconostoc lactis* from kimchi. *J. Microbiol.* **39**: 11-16.
- Kim, D. and D.-W. Kim. 1999. Facile purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 219-222.
- Kim, D.-J. and S.-Y. Lee. 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.
- Kwak, G.-S., S.-K. Kim, and H.-K. Jun. 2001. Purification and characterization of bacteriocin J105 produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* J105 isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 275-280.
- Kwon, D. Y., M. Koo, C. R. Ryoo, C.-H. Kang, K.-H. Min, and W. J. Kim. 2002. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 96-105.
- Lee, C.-W., C.-Y. Ko, and D.-M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolate. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
- Lee, S. Y. 1992. Current research status of food related microbial polysaccharides. *The Microorganism and Industry* **18**: 33-40.
- Min, S.-G., J.-H. Kim, S. Kim, H. S. Shin, G.-H. Hong, D.-G. Oh, and K.-N. Kim. 2003. Manufactures of functional kimchi using *Bifidobacterium* strain producing conjugated linoleic acid (CLA) as starter. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 111-114.
- Osawa, R. 1990. Formation of a clear zone on tannin-treated brain heart infusion agar by *Streptococcus* sp. isolated from feces of koalas. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 829-831.
- Page, R. D. 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Shin, D.-H., M.-S. Kim, J.-S. Han, D.-K. Lim, and W.-S. Bak. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 137-145.

(Received June 10, 2007/Accepted Aug. 2, 2007)