

Kefir에서 분리한 *Streptococcus thermophilus* LFG를 배양한 산양유 발효물에서 분리된 다당체의 특성

임영순 · 이시경*

건국대학교 응용생물화학과

Characteristics of Exopolysaccharide Produced in Goat Milk Yogurt Cultured with *Streptococcus thermophilus* LFG Isolated from Kefir

Young-Soon Lim and Si-Kyung Lee*

Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the properties of crude exopolysaccharide (CEPS) produced by *Streptococcus thermophilus* LFG in goat milk. The yields of CEPS from yogurt cultured with *Str. thermophilus* LFG were greater at higher temperatures (40-45°C) than at lower temperatures (30-35°C). Goat milk yogurt had lower viscosity values than cow milk yogurt. However, the CEPS yield was higher in goat milk yogurt than in cow milk yogurt. The yields of CEPS from yogurt were also higher in cultured milk containing 3% glucose (14-21%), and 3% sucrose (4-16%) relative to the control yogurt. Antioxidant activities were higher in goat milk yogurt supernatant (21%) and its CEPS (28%) than cow milk yogurt supernatant (11%) and its CEPS (24%). The amino acid contents of CEPS were higher in yogurt using goat milk than that using cow milk. The CEPS extracted from goat milk yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG consists of carbohydrate (37% w/w) and protein (63% w/w). The CEPS consisted of monosaccharides such as glucose 56.45% (w/w), galactose 42.35% (w/w), galactosamine 1.37% (w/w), glucosamine 1.09% (w/w) and fucose 0.27% (w/w).

Key words : CEPS (crude exopolysaccharide), *Streptococcus thermophilus* LFG

서 론

미생물이 생성하는 다당체에 관한 연구는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*가 생성하는 dextran이 의료용 혈장증량제로 개발되었으며, xanthan gum(Fu and Tseng, 1990), pullulan(Dufresne and Lencki, 1990) 등을 비롯하여 많은 기초연구와 응용연구가 이루어져 왔다. 그동안 연구가 진행되어온 미생물 생성 다당류는 *Xanthomonas campestris*에 의한 xanthan gum을 비롯하여 *Aerobasidium pullulans*의 pullulan, *Sclerotium glaucanicum*의 polytran, *Acetobacter* sp., *Agrobacterium* sp.의 cellulose 및 *Mucorale* sp.의 chitosan 등을 대표적으로 들 수 있고, *Bacillus* sp.의 경우에도 많은 연구가 이루어져 왔는데, 동일 균주에서도 구조 및 특성이 다른 형태의 다당류가 생산되는 현상이 보

고되어 있다. *Bacillus* sp.의 다당류 생산 균주에는 *B. circulans*, *B. polymyxa* No.271, *B. polymyxa* C3, *B. polymyxa* No. 458, *B. polymyxa* var. *lactoviscosus*, *B. subtilis* FT-3, *B. subtilis* var. *polysaccharolyticum* 등이 알려져 있다(Yang, 1991). 이에 비하여 유산균을 이용한 다당류에 관한 연구는 비교적 적었다(Berg et al., 1993). 점질성 유산균주에 대한 연구들은 *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*(Kimmel et al., 1998), *Lactobacillus helveticus* var. *jugurti*(Oda et al., 1983), *Bifidobacteria*(Hur et al., 1995)와 *Streptococcus thermophilus*(Thierry et al., 1991) 등이 대표적이다.

미생물이 생산하는 다당체는 일반적으로 크게 세 가지 형태로 구분하여 세포막의 일부로 존재하는 세포내 다당, 세포벽의 구조적 성분인 구조 다당 및 세포벽 외부에 존재하는 세포외 다당으로 나누고 있다. 그 중 세포외 다당은 세포벽의 일부로서 세포벽 주위의 협막을 형성하거나 세포벽 외부의 점질물로서 발효중 축적되는 다당체를 말한다. 세포와의 구조적 관계에 따라 slime, capsular 및

*Corresponding author : Si-Kyung Lee, Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3759, Fax: 82-2-450-3726, E-mail: lesikyung@konkuk.ac.kr

microcapsular 등으로 분류하고, 이것을 총칭하여 세포외 다당체(exopolysaccharide: EPS)라 한다(Sutherland, 1972).

Sucrose가 함유된 배지에서 *Leuconostoc*, *lactobacilli*, *streptococci* 등의 유산균에 의해서 세포외적으로 생성되는 중성 다당류인 dextran은 1,6결합한 α -D-glucopyranosyl residue를 가지는 polyglucan이다. Dextran은 생리적으로 유용한 혈장 확장제로서 상업적으로 이용되고 있다(Aspinall, 1985). 유용 미생물에 의해 생성되는 다당류 성분은 antitumor로서의 활성과 기능을 가지고 있고, 유산균이 생성하는 다당류가 항암효과를 가지며 이들이 인체내의 생리효과를 증진시킨다고 보고하고 있다(Keating, 1985). Kitazawa 등(1990)은 고점성 발효유로부터 slime물질을 분리하여 분석한 결과 이 다당류는 glucose와 galactose 및 rhamnose로 구성된 phosphopolysaccharides로 밝혀졌다.

EPS는 미생물이 가장 많이 생성하는 다당류로 세포내 다당류나 세포벽 다당류와는 달리 배양으로부터의 회수가 용이하고 정제비용이 적게 들기 때문에 상업적 잠재력이 가장 높은 다당류라 할 수 있다(Margaritis and Pace, 1985; Sutherland, 1972). EPS는 발효유의 점도를 증가시키고 유산균과 유단백질을 결합시켜 발효유제품의 결점인 유청분리 현상을 완화시켜주며 제품에 천연 탁도를 주고, 제조 공정 중에 초래되는 온도변화 및 기계적, 물리적 충격에 대한 물성변화를 최소화하여 안정하게 유지시켜 주는 것으로 보고되었다(Schellhaass, 1983). 이러한 EPS의 기능에 대하여 Ruas-madiedo 등(2002)은 유산균으로부터 생성되는 EPS의 경우 항암 작용, 항궤양 작용, 면역증강 작용 및 콜레스테롤 저하의 활성을 높인 데 기여하거나 probiotics로서 인체 건강에 가능성이 있다고 보고하였다. Kang 등(1999)은 유산균이 생성하는 세포외 다당류의 기능을 4가지로 나누어 고찰하였는데, 식품의 물성을 안정화시키는 작용과, 항종양 효과, 항콜레스테롤 효과 그리고 미생물의 보호작용으로 구분하였다.

미생물이 생성하는 다당류에 관한 연구로서 새로운 종류의 미생물이 생성하는 다당류의 산업적인 중요성이 크게 신장되었다. 특히 유산균이 생성하는 EPS가 식용 다당류로서 안정제 및 유회제 등 다양한 용도로서의 이용이 가능하다는 장점 때문에 EPS를 생산하는 유산균에 대한 관심이 높아지고 있다 (Dick *et al.*, 1995). 미생물을 이용한 다당류의 생산은 배양시간, 배양 pH, 배양온도, O₂ 농도, 교반 등 환경요인과 탄소원의 종류 및 농도, 질소원의 종류 및 농도, 인산, 황, 칼륨, 마그네슘, 철, 칼슘 등과 같은 영양소의 함량 그리고 발효방식에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Ceming *et al.*, 1992; DeVuyst *et al.*, 1998).

따라서 본 연구에서는 산양유를 이용하여 점질성이 좋은 발효유를 제조하기 위해서, 또한 본 발효물로부터 생산되는 다당체를 이용할 목적으로 *Str. thermophilus*

LFG(Lim *et al.*, 2008)에 의한 다당체 생산을 위한 배양 조건을 설정하였으며, 산양유를 이용하여 생산한 발효물로부터 분리한 crude exopolysaccharide(CEPS)의 아미노산 조성과 항산화 특성을 우유를 이용한 발효물로부터 분리된 CEPS와 비교 연구하였다.

재료 및 방법

발효유 제조

산양유는 강원도 홍천소재 산양농장에서 Saanen품종으로부터 착유하여 냉장저장중인 신선한 산양유를 제공받았으며, 우유는 Holstein종으로부터 착유한 원유를 제공받아 발효유 제조에 사용하였다. 당 첨가 원료는 glucose, fructose 및 sucrose(Sigma Co., USA)을 1-3%씩 선택적으로 첨가하였으며, starter는 MRS액체배지에서 37°C로 24시간 동안 각각 2회 계대 배양하여 활성을 높인 후 1%씩 첨가하였다. 산양유와 우유를 각각 사용하여 원유를 50-60°C로 예열하는 예열공정과, 85°C에서 5분간 열처리하는 살균공정과, Kefir로부터 분리한 *Str. thermophilus* LFG(Lim *et al.*, 2008)를 이용하여 30-45°C에서 커드가 형성될 때의 발효물의 pH가 4.6이 될 때까지, 4-12시간동안 발효시키는 배양공정을 통하여 제조하면서 sample을 채취하여 실험에 사용하였으며, 원료유의 배양온도 및 첨가하는 당의 종류를 달리하여 비교하였다.

점질물의 생성과 다당체 분리

조건에 따라 배양된 산양유 발효액으로부터 crude 세포외 다당체(crude exopolysaccharide, CEPS)의 분리는 De Vuyst 등(1998)의 방법을 응용하여 분리하였다. 배양액을 14,000×g(4°C)로 30분간 원심분리하고 상등액을 취하여 filter paper(Whatman No.2)로 여과한 후 4배량의 ethanol(95%)을 가하여 4°C에서 20시간 동안 침전시켰다. 시료를 8,000×g(4°C)으로 10분간 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 동결건조한 것을 crude 세포외 다당체(crude exopolysaccharide: CEPS)로 정량하였다.

발효물의 점도측정

점도는 배양이 완료된 발효물을 300 rpm으로 2분간 교반하여 커드를 분쇄한 후 4°C에서 12시간 저장한 것을 시료로 사용하였다. 10°C의 시료 100 mL를 100 mL용 비커에 취하여 Brookfield Viscometer(Model DV-II+, Brookfield Engineering Lab. Inc., USA), spindle No. 3를 사용하여 6 rpm에서 1분 후의 점도를 측정하고 cP값으로 나타내었다.

CEPS의 탄수화물(총당) 및 단백질 함량 측정

발효유로부터 분리한 crude 세포외 다당체의 total sugar 함량은 glucose를 표준당으로 사용하여 phenolsulfuric acid

법으로 정량하였고, 단백질 함량은 Biuret법을 이용하여 bovine serum albumin을 표준물질로 사용해 정량하였다.

CEPS의 당 분석

Crude 세포의 다당체 중의 구성당 분석은 fucose, galactose, glucose 및 mannose 등 monosaccharides와, galactosamine과 glucosamine 등 amino sugar를 분석하였으며, 또한 유리당으로서 lactose에 대하여 분석하였다. Monosaccharides의 분석을 위해서는 CEPS 시료 0.15 mg을 2 M trifluoroacetic acid(TFA)에 녹인 후, 100°C에서 4시간 동안 가수분해시키고 evaporator를 이용하여 TFA를 완전히 제거한 뒤 분석용 시료로 0.1 µg을 주입하였다. Amino sugar의 분석을 위해서는 CEPS 시료 0.1 mg을 6 N HCl에 녹인 후 100°C에서 4시간 동안 가수분해시키고 60°C건조기에서 24시간 동안 HCl을 완전히 제거한 후 분석용 시료로 2 µg을 주입하였다. Lactose의 분석은 시료 0.2 mg을 300 µL정제수에 녹인 후 vortexing하고 0.2 µm membrane filter(Sartorius AG, Germany)로 여과하여 시료로 0.1 µg을 주입하였다. 분석장비 및 조건은 Bio-LC-600(Dionex, USA) system과 column은 CarboPac PA1(4.5×250 mm, Dionex, USA)을 이용하였으며, 이동상의 경우 단당류는 16 mM NaOH를 1.0 mL/min 유속으로 전개시켰으며, lactose는 0.5 M NaOH를 초순수 증류수와 혼합하고 1.0 mL/min 유속으로 전개시켜 분석하였다.

CEPS의 아미노산 분석

Crude 세포의 다당체 중의 총아미노산은 White 등(1986)의 Pico-Tag방법에 따라 HPLC(PU-980 pump, UV-975 detector, 807-IT integrator, JASCO, Japan)를 이용하여 분석하였다. 시료의 전처리 Crude 세포의 다당체 100 mg을 취하고 6 N HCl 15 mL를 가한 후 30초간 N₂ gas로 치환하고, 즉시 마개를 닫아 110°C의 오븐에서 2시간 가수분해시킨 후 냉각한 다음 시료 1 mL를 취하여 0.45 µm filter로 여과하였다.

여과된 시료 중 50 µL를 취하여 유리관에 넣고 건조시킨 다음 methanol 200 µL, H₂O 200 µL 그리고 trimethylamine 100 µL를 혼합한 용액 30 µL를 가하고 vortex하여 재건조시켰다. 그리고 여기에 유도체시약(methanol 350 µL, H₂O 50 µL, trimethylamine 50 µL, phenyl isothiocyanate 50 µL의 혼합액) 30 µL를 가하고 vortex한 다음 상온에서 10분간 정치한 후 다시 건조시키고, methanol 30 µL를 가하여 vortex한 후 다시 건조시킨 다음 Pico-Tag sample diluent 200 µL를 첨가하여 교반한 후 5 µL를 취하여 분석용으로 주입하였다. 이동상으로는 0.14 M sodium acetate trihydrate와 0.05% triethyl amine에 HPLC용 증류수를 가하여 1 L로 정용한 후 H₃PO₄로 pH 6.4로 조정하여 여과한 용액을 사용하였다. 분석에 사용된 column의 온도는 40°C, flow

rate는 1.0 mL/min 이었고 시료량은 5 µL로 하였다.

전자공여능에 의한 CEPS의 항산화 효과

전자공여능 측정은 Blois법(1958)에 의하여 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)에 대한 free radical 소거 효과로서 환원력을 측정하였다. 발효유 상등액을 동결건조하여 CEPS와 함께 시료로 사용하였으며, 시료 0.6 mL (1 mg/mL)에 1.5×10⁻⁴ M의 DPPH/MeOH 용액 2.4 mL를 가한 후, vortex mixer로 10초간 균일하게 진탕하고 실온에서 10분간 방치한 다음 spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu Co., Japan)로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였으며, 대조구는 증류수를 이용하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \frac{\text{시험구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}) \times 100$$

결과 및 고찰

배양 온도에 따른 *Str. thermophilus* LFG의 다당체 생산

Kefir로부터 분리한 *Str. thermophilus* LFG 균주가 생성하는 crude 세포의 다당체(crude exopolysaccharide, CEPS)를 생성하기 위하여 산양유와 우유를 이용하여 배양 온도에 따른 발효물의 점도 및 CEPS 분리량을 측정된 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

Fig. 1에서와 같이 발효물의 점도는 산양유와 우유 발효물 모두 30°C에서 12시간과 35°C에서 10시간 동안 배양 시 11,150과 12,330 cP이었으나, 40°C에서 6시간과 45°C에서 4시간 동안 배양 시에는 12,800과 14,550 cP로 나타나 40-45°C에서 발효유의 점도가 높았다. 또한 본 균주를 배양하였을 때 산양유 보다는 우유 발효물의 점도가 높았다. 한편 CEPS의 분리량은 Fig. 2에서와 같이 우유 발효물에

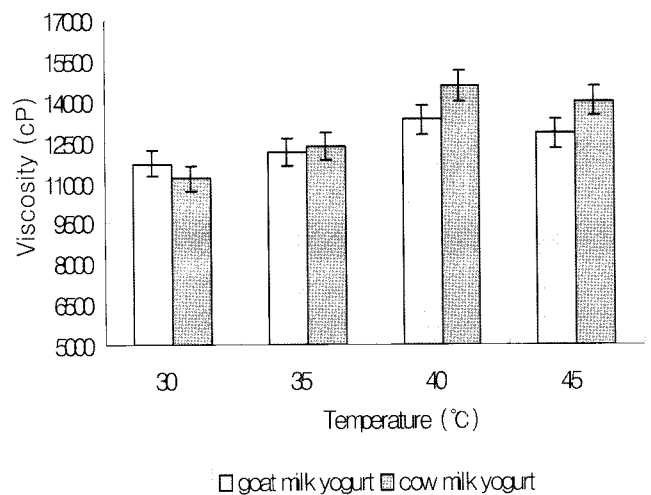


Fig. 1. Effect of incubation temperature on viscosity of yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG.

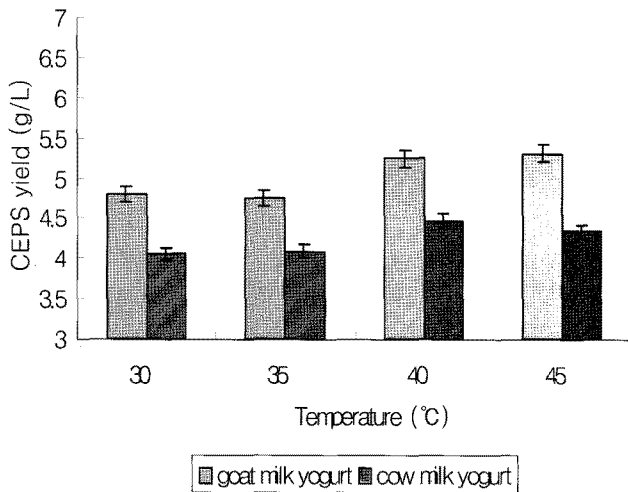


Fig. 2. Effect of incubation temperature on crude EPS (CEPS) yields of yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG.

서 4.06-4.46 g/L이었고 산양유 발효물에서는 4.74-5.30 g/L으로 산양유 발효물에서 높게 나타나 저온(30-35°C)보다는 고온(40-45°C)조건에서 높았다. 점도와 CEPS 분리량은 같은 유종을 사용하였을 경우 대부분 점도가 높을수록 CEPS 분리량도 높은 경향을 보였으나, 산양유와 우유 발효물의 비교에서는 산양유 발효물의 점도가 우유 발효물의 점도에 비하여 0-8.6% 정도 낮았지만 CEPS의 분리량은 14.9-18.2% 높게 나타났다.

이러한 결과는 *Str. thermophilus* Body 1으로 배양시킨 발효유에서 40°C보다는 31°C에서 EPS의 생산량이 높게 나타났다는 Kang 등(2005)의 보고와, EPS 생성에 대한 온도의 영향은 실험간 차이가 심하여 온도의 효과를 분명하게 제시하는 것은 가능하지 않다고 한 Ruas-Madiedo 등(2002)의 결과와 차이를 보였다. 반면에 De Vuyst 등(1998)은 유산균의 EPS 생성량이 배지조성과 같은 화학적 배지 조건과 온도, pH, 산소분압 등 물리적 발효조건이 중요하게 작용하여 *Str. thermophilus*는 30°C에서 42°C로 온도가 증가함에 따라 EPS 생성량도 증가하였으며, *L. delbrückii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772는 pH 6.0의 조건에서 35°C에서 45°C로 온도가 증가함에 따라 EPS의 생성량도 증가하였다고 하였으며, Zisu와 Shah(2003)는 *Str. thermophilus* 1257을 이용하여 24시간 동안 배양한 실험에서 37°C(458 ± 7.1 mg/L)보다 40°C(622 ± 11.5 mg/L)에서 높은 생산량을 보였다고 하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

당류 첨가에 따른 *Str. thermophilus* LFG의 다당체 생산

Str. thermophilus LFG로 배양한 산양유 및 우유 발효물의 점도와 다당체 생성에 미치는 주요 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 산양유와 우유에 각각 3%의 sucrose, glucose 및 fructose를 첨가하여 42°C에서 5시간 배양한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다.

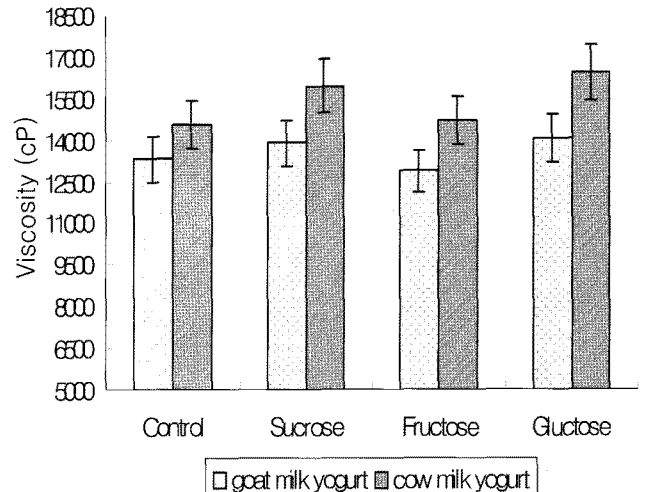


Fig. 3. Effect of saccharide sources on viscosity of yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG.

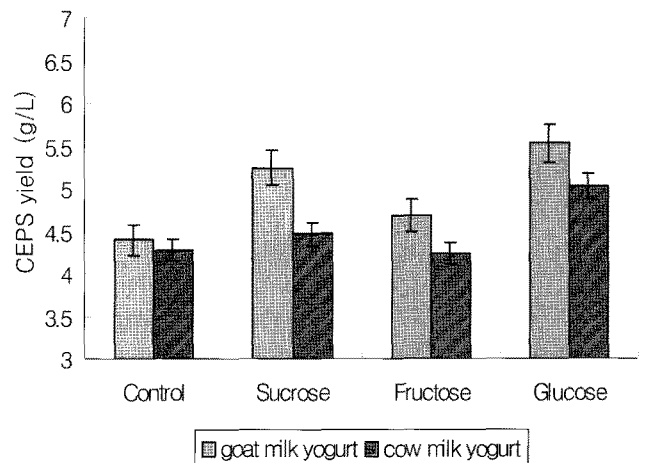


Fig. 4. Effect of saccharide sources on crude EPS (CEPS) yields of yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG.

Fig. 3에서와 같이 발효물의 점도는 각 탄소원간에 큰 차이는 보이지 않았으나, 전체적으로 우유 발효물이 산양유 발효물의 경우 보다 8-14% 정도 높은 점도를 보였다. 그러나 fructose 첨가구는 당분을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 유사하거나 오히려 다소 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 glucose를 첨가할 경우 산양유 발효물에서는 6%, 우유 발효물에서는 12%, sucrose 첨가구의 경우는 산양유 발효물에서 4%, 우유 발효물에서는 약 8%의 점도증가 효과를 보였다.

또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 CEPS 생산량은 산양유 발효물이 우유 발효물보다 4-9% 높은 수준을 보였으며, 당 첨가효과에 경우 fructose는 CEPS 생산에 상승효과가 없었으며, sucrose 첨가구에서 4-16%와 glucose 첨가구에서 14-21% 증가효과를 보였고, 산양유 발효물(16-21%)이 우유 발효물(4-14%)에서 보다 CEPS 생산량 증가효과가 높았다. Kang 등(1999)은 Elliker broth를 이용한 배지

에서 *Str. thermophilus*와 *L. acidophilus* CH-2의 당류 첨가에 의한 EPS의 생산량 조사 연구에서 탄소원간의 유의차가 크지 않았으나 그중 *Str. thermophilus*는 sucrose 첨가구에서 EPS 생산이 높았으며, *L. acidophilus* CH-2는 glucose 첨가구에서 높은 결과를 얻었다고 하였다. Mitsuda 등(1981)은 *B. polymyxa*에 의한 EPS 생산을 위한 탄소원 이용성 조사를 통해 EPS 생산에 가장 효율적인 탄소원은 glucose라고 하였고, 또한 Yang(1991)은 *B. polymyxa* D1균주의 다당류 생산에 sucrose가 가장 적절하며, glucose, fructose와 당밀 등을 첨가하였을 때 균체생육은 좋았으나 다당류 생산은 미약했다고 하였다. 따라서 본 실험결과는 Kang 등(1999), Mitsuda 등(1981) 및 Yang(1991)의 보고와 일치하지는 않았지만, 탄소원이 EPS의 생산에 미치는 영향은 크지 않으며, 탄소원 중 glucose와 sucrose가 EPS 생산에 비교적 높은 효과를 보이는 유사한 경향을 나타내었다.

이상의 실험에서 *Str. thermophilus* LFG를 이용한 발효물의 점도의 경우 산양유 발효물보다 우유 발효물이 8-14% 높은 점도를 보였고, 반면에 CEPS의 생산량은 우유 발효물보다 산양유 발효물이 4.9% 높은 생산성을 보여 산양유 발효물과 우유 발효유간에 점도와 CEPS 생산량에서 모두 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었다.

산양유 발효물은 우유 발효물에 비하여 낮은 점도를 보였는데, 이는 발효물의 커드를 형성하는 casein의 조성 차이에서 비롯된 것으로 α_2 -casein의 함량이 높은 우유 발효물의 단단한 커드가 점도에 영향을 미쳤으며, 산양유 단백질은 우유 단백질에 비하여 soft curd를 형성한다는 보고(Jenness, 1980)와 같은 특성에 기인하는 것으로 생각된다. 반면 CEPS의 생성은 산양유 발효물이 우유 발효물보다 높았는데, 이는 우유 성분에 비하여 산양유 성분들이 미생물효소 등에 의하여 더 잘 분해되고 미생물에 의해 더 잘 이용되어 대사산물로서 다당체를 더 많이 생산한 결과라고 생각한다. Ruas-Madiedo 등(2002)은 점도에 대한 EPS의 작용기작은 복잡하며, 단순히 EPS함량만으로 결정되는 것은 아니고 발효액내의 단백질 함량과 EPS와 단백질간의 상호작용 등에 영향을 받으며, EPS의 분자량과 중합체의 hardness도 발효유의 점도에 중요하게 작용한다고 하였다.

이상의 실험에서 일반적으로 발효유에서 EPS의 생산량이 높을수록 점도 값도 높게 나타나지만, 산양유와 우유에서처럼 발효물의 조성이 달라 발효물 curd의 hardness가 다를 경우에는 점도 값의 크기가 EPS 함량에 비례하지 않는 것을 알 수 있었다.

CEPS의 아미노산 분석

산양유와 우유를 이용하여 *Str. thermophilus* LFG 균주로 42°C에서 5시간 동안 배양한 후 분리한 CEPS중에 함유되어 있는 아미노산 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. The components of amino acid of crude EPS (CEPS) extracted from goat and cow milk yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG

Amino acid	Contents	
	Goat milk yogurt CEPS	Cow milk yogurt CEPS
Asp ¹⁾	8.73	5.50
Ser	13.61	11.94
Glu ²⁾	31.34	26.20
Gly	16.31	12.58
His	9.83	8.23
Arg	10.02	8.99
Thr	20.91	15.59
Ala	27.84	19.71
Pro	78.80	63.54
Tyr	8.25	4.69
Val	32.92	29.09
Met	7.24	5.27
Lys	12.54	12.59
Ile	25.68	24.53
Leu	45.99	40.01
Phe	14.75	12.24
Cys	0.72	0.32
Cys ²⁾	1.70	1.71
Trp	0.13	0.09

¹⁾ Aspartic acid and asparagine.

²⁾ Glutamic acid and glutamine.

³⁾ Cystine.

Table 1에서 보는 바와 같이 산양유 및 우유 발효물로부터 분리한 CEPS 모두에서 proline이 가장 많이 함유되어 있었고, leucine, valine, glutamic acid와 glutamine, alanine, isoleucine, threonine 순으로서, 산양유와 우유 발효물에서 분리한 CEPS에서 같은 경향을 보였다. 그러나 glutamic acid와 glutamine의 함량이 제일 높고 proline, leucine, lysine, aspartic acid, valine과 tyrosine 등의 순으로 함유되어 있는 원료유중의 아미노산 함량 비율(Kwon *et al.*, 1998)과는 다소 차이를 보였다. 또한 산양유 발효물로부터 분리한 CEPS중의 아미노산 함량이 우유 발효물로부터 분리한 CEPS중의 아미노산보다 lysine과 cystine을 제외한 대부분의 아미노산 성분이 높은 함량을 보였다.

CEPS에 의한 항산화 효과

산양유 및 우유에 *Str. thermophilus* LFG를 42°C에서 5시간 동안 배양시킨 발효물로부터 slime형태의 상등액 및 CEPS를 분리한 후 DPPH radical에 의한 전자공여 작용을 측정하여 항산화효과를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 우유 발효물로부터 분리된 상등액과 CEPS가 11-24%의 항산화 활성을 나타내었고, 산양유 발효물에서 분리된 상등액 및 CEPS는 21-28%의

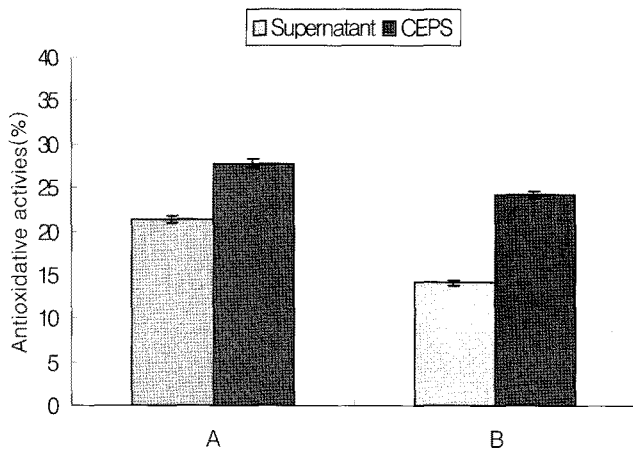


Fig. 5. Antioxidative activities of supernatant and crude EPS (CEPS) extracted from yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG. A : Supernatant and CEPS produced from goat milk yogurt. B : Supernatant and CEPS produced from cow milk yogurt.

활성이 있는 것으로 나타나 산양유 발효물에서 분리한 CEPS의 항산화 활성이 더 높았다. 또한 우유와 산양유 발효물의 상등액보다는 CEPS의 항산화 효과가 높은 것으로 나타났다.

Bae 등(2005)은 우유를 이용하여 구기자추출물을 첨가한 발효유의 항산화활성 연구에서 구기자 성분의 첨가구는 구기자 성분의 영향으로 10.26-88.84%의 높은 활성범위를 나타내었으나, 구기자 성분을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 4.5-11.5%를 보였다고 하여 본 실험에서 비교적 높은 활성을 보였다.

Yoo 등(2002)은 대두, 보리, 썩, 다시마 등의 항산화효과 조사에서 발효공정을 통하여 1.6-2.7배 항산화 효과의 증가를 확인하고, 특히 대두 발효물의 항산화 활성은 발효과정 중 분해되어 풍부하게 생성되는 아미노산과 펩타이드 성분들에 기인한다고 하였다. 불포화 lactoferrin은 철 이온과 결합함으로써 superoxide와 H_2O_2 로부터 iron-catalyzed hydroxyl radical 형성을 저해한다(Jeong, 1998). 이상에서 발효과정 중 우유 단백질에 비하여 효소분해가 용이하게 이루어지는 산양유 단백질이 비교적 유리아미노산을 많이 생성하였고, 높은 비율로 생성된 다당이 상등액과 CEPS 중에 함유되어 항산화활성에 기여하였다고 생각되며, 또한 상등액 보다는 CEPS에 다당과 lactoferrin 등의 생리활성 펩타이드 같은 항산화 성분들이 함유되어 있기 때문으로 생각한다.

인체내 산소 대사과정에서 생성되는 활성산소와 유리기 등은 불포화지방산을 손상시켜 유해한 peroxide를 만들게 되고, 이는 염증, 암, 동맥경화, 노화 등의 성인병을 유발시킬 수 있다(Rice-Evans and Diplock, 1993). 전자공여능은 유지의 자동산화 과정 중 생성되는 $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $R\cdot$ radical에 전자를 주어 안정한 물질로 전환시키거나 연쇄

산화반응을 지연시키는데 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

이상의 결과와 같이 *Str. thermophilus* LFG를 이용하여 배양한 산양유 발효물에서 분리한 CEPS의 항산화 활성이 비교적 높아 식품형태인 요구르트로 섭취할 경우 건강 기능적 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

산양유 발효물로부터 분리한 CEPS의 탄수화물(총당) 및 단백질 분석

Str. thermophilus LFG를 이용하여 42°C에서 5시간 동안 배양한 산양유 발효물에서 분리한 CEPS의 총당량과 단백질 함량은 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 CEPS의 총당함량이 37%이었으며 단백질함량이 63%로 높게 측정되었는데, 이는 산양유의 단백질 성분 중 발효과정을 통해 분해된 수용성 단백질들이 유산균에 의해 생합성된 다당체와 함께 slime 구성물을 형성하고 있으면서 ethanol에 의해 같이 침전되었기 때문이라 생각한다. 총당함량 비율에 맞춰 CEPS 중 EPS 생산량을 환산하면 우유 발효물은 1.50-1.65 g/L, 산양유 발효물은 1.75-1.96 g/L을 생산한 것으로 나타나며, 이는 De Vuyst 등(1998)의 *Str. thermophilus* LY03을 이용하여 42°C에서 24시간 동안 배양한 결과 0.35 g/L의 EPS를 생산했다는 보고에 비하여 높은 경향이지만, *Str. thermophilus* 1257를 이용하여 0.5%(w/v) 유청단백질을 첨가한 배지에서 37°C로 24시간 동안 배양한 결과 1.03 g/L의 EPS를 생산하였다는 Zisu와 Shah(2003)의 보고와 비교적 유사한 결과이다.

Str. thermophilus LFG 균주를 이용하여 배양시킨 산양유 발효물의 CEPS 중에 함유되어 있는 구성 단당류 및 lactose의 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 유리당으

Table 2. The contents of carbohydrate and protein of crude EPS (CEPS) extracted from goat milk yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG

Sample	Carbohydrate	Protein
CEPS	37	63

(unit: %, w/w)

Table 3. The contents of monosaccharide and lactose of crude EPS (CEPS) extracted from goat milk yogurt produced by *Str. thermophilus* LFG

Sugars	Contents	
	(g/100 g total sugar)	(g/100 g CEPS)
Glucose	56.45	20.06
Galactose	42.35	15.5
Galactosamine	1.37	0.5
Glucosamine	1.09	0.4
Fucose	0.27	0.1
Mannose	-	-
Lactose	69.67	25.5

로서 lactose 함량을 측정된 결과는 69.67%(w/w)가 함유되어 있었다. 가수분해한 후 구성당 분석을 한 결과는 단당류로 glucose가 56.45%(w/w)로 가장 높았으며, galactose와 fucose가 각각 42.35%(w/w) 및 0.27%(w/w) 함유되어 있었고 mannose는 측정되지 않았다. 또한 amino sugars로 galactosamine과 glucosamine이 각각 1.37%(w/w), 1.09%(w/w)을 함유하였다. 이상의 실험에서 *Str. thermophilus* LFG를 이용한 산양유 발효물에서 분리한 CEPS는 galactose와 glucose를 주성분으로 하며 아미노당인 galactosamine과 glucosamine이 복합체로 구성되어 있음을 확인하였다.

Kitazawa 등(1990)은 고점성 우유 발효유를 이용한 실험에서 slime물질을 분리한 후 분석하여 glucose, galactose와 rhamnose로 구성된 인산다당류라고 보고하였는데, 본 실험과 비교시 glucose와 galactose성분은 같은 구성을 보였으나 mannose와 amino sugar 등의 구성은 차이를 보였다. 이상에서 유사한 발효유라 하더라도 원료유 또는 starter 등 배양조건에 따라 생성되는 다당류의 조성은 다양하게 구성될 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

Kefir제품으로부터 분리한 *Str. thermophilus* LFG를 이용하여 산양유 발효유를 제조하고, 이의 다당체를 이용하기 위하여 발효조건 및 다당체의 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 배양온도에 따른 *Str. thermophilus* LFG로 제조한 발효물의 CEPS 생산성은 저온(30-35°C)에서 보다 고온(40-45°C)배양에서 높았으며, 점도는 우유발효물이 산양유 발효물 비하여 다소 높았지만, CEPS의 생성량은 우유 발효물(4.06-4.46 g/L)에서 보다 산양유 발효물(4.74-5.30 g/L)에서의 생산성이 높았다. 당류에 따른 CEPS생성량은 무첨가구에 비하여 glucose 3% 첨가구가 14-21%, sucrose 3% 첨가구가 4-16% 상승효과를 보였으며, fructose 3%의 경우는 첨가효과가 나타나지 않았다. 우유 발효물 및 산양유 발효물로부터 분리한 상등액과 CEPS의 전자공여능을 확인한 결과 우유 발효물의 상등액과 CEPS가 산양유 발효물의 상등액과 CEPS 보다 유의적으로 높은 전자공여효과를 나타내었다. 우유 및 산양유 발효물로부터 CEPS를 각각 분리하여 아미노산의 조성을 비교 분석하였을 때 전체적으로 산양유에서 분리한 CEPS에서 비교적 높은 아미노산 함량을 보였다. 산양유 발효물로부터 분리된 crude exopolysaccharide(CEPS)의 탄수화물함량은 37%, 단백질함량은 63%이었으며, 구성 당을 분석한 결과, glucose 56.45%, galactose 42.35%, fucose 0.27%(w/w)와 amino sugars로는 galactosamine 1.37%, glucosamine 1.09%를 함유하였다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 건국대학교 학술 진흥연구비 지원에 의한 논문임.

참고문헌

- Aspinall, G. O. (1985) The polysaccharides, Academic Press Co., New York, Vol. 3.
- Bae, H. C., Cho, I. S., and Nam, M. S. (2005) Effects of the biological function of yogurt added with *Lycium chinense* miller extract. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **47**, 1051-1058.
- Berg, J. C., Smiths, A., Pot, B., Ledebøer, A. M., Kersters, K., Verbakel, M. A., and Verrips, C. T. (1993) Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotech.* **7**, 189-205.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1202.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., and Desmazeaud, M. (1992) Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **75**, 692-699.
- DeVuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., and Degeest, B. (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 1059-1068.
- Dick, J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Ledebøer, A. M., and Verrips, C. T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2840-2844.
- Dufresne, R. J. and Lencki, R. (1990) The effect of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotech.* **32**, 526-532.
- Fu, J. F. and Tseng, Y. H. (1990) Construction of lactose utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 919-923.
- Hur, C. S., Lee, J. H., Baek, Y. J., and Kim, H. U. (1995) Characteristics of polysaccharide produced by bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Kor. J. Dairy Technol. Sci.* **13**, 27-39.
- Jenness, R. (1980) Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* **63**, 1605-1630.
- Jeong, D. H. (1998) Biological function of food. Sun Jin Mun Hwa Sa, Seoul, Korea, pp. 212-239.
- Kang, H. J., Baick, S. C., and Yu, J. H. (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.
- Kang, H. M. and Chung, C. I. (1999) A review on the functionality of exopolysaccharides produced from lactic acid bacteria. *Kor. Dairy Technol.* **17**, 101-108.
- Kang, H. M., Son, I. S., Um, Y. S. and Chung, C. I. (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 *Str. thermophilous* and *Lactobacillus* spp. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **19**, 121-126.
16. Keating, K. (1985) The role of cultured dairy products in the prevention of stomach cancer. *Cultured Dairy Products J.* **20**, 13-14.
 17. Kimmel, S. A., Roberts, R. F., and Ziegler, G. R. (1998) Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 659-664.
 18. Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., and Adachi, S. (1990) Anti-tumoral activity of slime-forming encapsulated *Lc. lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy fermented milk 'villi'. *Anim. Sci. Technol. Japan* **62**, 277-283.
 19. Kwon, Y. J., Kwon, J. H., Park, K. H., Park, Y. K., and Yang, H.C. (1998) Food chemistry. Young Ji Sa, Seoul, Korea, p. 156.
 20. Lim, Y. S., Kim, S. Y., and Lee, S. K. (2008) Characteristics of lactic acid bacteria from kefir made of goat milk. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 82-90.
 21. Margaritis, A. and Pace, G. W. (1985) Microbial polysaccharides. In *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon, Oxford. **3**, 1005-1044.
 22. Mitsuda, S., Miyata, N., Hirota, T., and Kikuchi, T. (1981) High-viscosity polysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Hakkokogaku Kaishi.* **59**, 303-309.
 23. Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M., and Tsuchiya, F. (1983) Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1623-1625.
 24. Rice-Evans, C. A. and Diplock, A. T. (1993) Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 77-86.
 25. Ruas-Madiedo, P., Hufenholtz, J., and Zoon, P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**, 163-171.
 26. Schellhaass, S. M. (1983) Characterization of exocellular slime produced by bacterial starter cultures used in the manufacture of fermented dairy products. Ph.D. thesis, Univ. of Minnesota, St. Paul, USA.
 27. Sutherland, I. W. (1972) Bacterial exopolysaccharide. *Adv. Microbial physio.* **8**, 143-213.
 28. Thierry, D., Didier, C., Patricia, R., Alain, L., and Bernard, F. (1991) Rapid isolation and estimation of polysaccharide form fermented skim milk *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *J. Dairy Res.* **58**, 147-150.
 29. White, J. A., Hart, R. J., and Fry, J. C. (1986) An evaluation of Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. *J. Automat. Chem.* **8**, 167-177.
 30. Yang, J. Y. (1991) Production and characterization of levan by *Bacillus polymyxa* D1. Ph.D. thesis, Seoul National Univ. Seoul, Korea.
 31. Yoo, H. J., Lee, S. H., Lee, D. S., and Kim, H. B. (2002) Antioxidant Activity of Fermented barley, wormwood, sea tangle and soybean. *Kor. J. Microbiol.* **38**, 230-233.
 32. Zisu, B. and Shah, N. P. (2003) Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1257. *J. Dairy Sci.* **86**, 3405-3415

(Received 2008.11.27/Revised 2009.1.6/Accepted 2009.1.6)