

## 전통 장류로부터 Exopolysaccharide 생성 유산균의 분리 및 특성

윤혜주<sup>1,2</sup>, 이유정<sup>1</sup>, 여수환<sup>1</sup>, 박혜영<sup>1</sup>, 박희동<sup>2</sup>, 백성열<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

<sup>2</sup>경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Received : February 14, 2013 / Revised : April 29, 2013 / Accepted : April 30, 2013

**Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria from Korean Soy Sauce and Soybean Paste. Yun, Hye Ju<sup>1,2</sup>, You Jung Lee<sup>1</sup>, Soo-Hwan Yeo<sup>1</sup>, Hye Young Park<sup>1</sup>, Heui-Dong Park<sup>2</sup>, and Seong Yeol Baek<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Fermented Food Division, Department of Agro-food Resource, NAAS, RDA, Suwon 441-853, Korea, <sup>2</sup>School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea**

Three slime-forming lactic acid bacteria were isolated from traditional Korean fermented soy sauce and soybean paste and shown to produce exopolysaccharides (EPS) in sucrose media. By isolating the strains, examining their morphological characteristics and determining their 16S rDNA sequences, N58-5 and K6-7 were identified as *Leuconostoc mesenteroides* and N45-10 as *Leuconostoc citreum*. The acid and bile tolerances of these three strains were investigated. Amongst the three lactic acid bacteria, *Leuc. citreum* N45-10 exhibited the highest viability ( $10^5$ - $10^6$  CFU/ml) in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 0.3) for 2 h, in artificial gastric juice for 2 h and in 0.3%, 0.5% oxgall for 24h. *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5 and *Leuc. citreum* N45-10 were grown in sucrose liquid medium and 8.16 g/L, 3.65 g/L, 16.17 g/L of EPS was collected, respectively. The hydrolyzed EPS was analyzed by HPLC in order to determine the sugar composition of EPS. *Leuc. mesenteroides* K6-7 and N58-5 showed two peaks indicating glucose and fructose, thus they were determined to be hetero-type polysaccharides. *Leuc. citreum* N45-10 showed only the glucose polymer, indicating it to be a homo-type polysaccharide. In addition, all three lactic acid bacterial hemolysis did not demonstrate a clear zone in blood agar in the area surrounding a lactic acid bacteria colony.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, soy sauce, *Leuconostoc* sp.

### 서 론

유산균은 자연계에 널리 분포하고 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 채소 등의 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 향상에도 기여하고 있다[25].

미생물 생성 다당류에 관한 연구는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 dextran [12]이 혈장 증강제로 개발된 이래 pullulan [7], xanthan gum [8] 등을 비롯한 여러 가지 다당류에 대한 기초 및 응용 연구가 진행되어 왔다. 미생물이 생성하는 다당류는 상업적으로 이용되는 식물 다당

류에 비해 물성이 다양하고 독특하며, 부가가치가 매우 높아 각종 산업의 기능성 신소재로서의 잠재력이 매우 크다[32].

미생물 유래 다당류는 크게 세포벽의 일부로 존재하는 intracellular polysaccharide, 세포벽 구조성분인 structural polysaccharide, 세포벽 외부에 존재하는 extracellular polysaccharide 등으로 나눌 수 있다. 특히 extracellular polysaccharide는 세포와의 구조적 관계에 따라 slime, capsular, microcapsular의 세 가지 형태로 분류할 수 있으며 이들을 총칭하여 exopolysaccharide (EPS)라 한다[30].

EPS는 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 험막을 형성하거나 세포벽 외부에 점질 형태로서 발효 중에 축적되는 미생물 다당류로, 1차 또는 2차 대사산물이다[14]. EPS는 에너지원으로 이용되는 것은 아니고 건조, 식균작용, 항생제, 독성 화합물, 삼투압 스트레스 등과 같은 외부환경으로부터 자신을 보호하는 작용을 한다[13]. EPS는 미생물이 가장 많이 생성하는 다당류로, 배양액으로부터 회수가 쉽고 정제비용이 적어 상업적인 잠재력이 가장 높은 다당류이다[31]. 최

#### \*Corresponding author

Tel: +82-31-299-0581, Fax: +82-31-299-0554

E-mail: dunkbis@korea.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

근에 유산균이 생성하는 EPS가 식용 다당류로서 제품의 점도를 높이고 안정제, 유화제, 겔화 및 수분 결합물질 등 다양한 용도로 사용이 가능하므로 EPS를 생산하는 유산균에 대한 관심이 점차 높아지고 있다[33].

유산균이 생성하는 EPS는 크게 homo-polysaccharide와 hetero-polysaccharide로 나뉘어 진다. Homo-polysaccharide는 주로 프락토오스와 글루코오스와 같은 한 가지 형태의 당으로만 구성되어 있는 다당류로, *Streptococcus salivarius*와 *Str. mutans*가 생산하는 fructan type의 levan과 inulin이 있으며, glucan type으로는 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*와 *Leuc. mesenteroides subsp. dextranicum*가 생산하는 dextran과 *Leuc. mesenteroides*가 생산하는 alternan, *Str. mutans*와 *Str. sobrinus*가 생산하는 mutan 등이 있다[5, 25]. Hetero-polysaccharide는 2종류 이상의 당, 주로 glucose, galactose, fructose, rhamnose가 서로 다른 비율로 구성되어 있으며, 경우에 따라 N-acetyl aminosugar, phosphate, acetyl, glycerol과 같은 당이 아닌 물질들이 존재하기도 한다. 주로 *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lac. casei*, *Lac. sake* 등의 중온성 유산균들과 *Lac. acidophilus*, *Lac. delbrueckii subsp. bulgalicus*, *Str. thermophilus* 등의 고온성 유산균들에서 생산된다. 일반적으로 hetero-polysaccharide는 homo-polysaccharide에 비해 생산성이 낮으며, 일시적으로 생산된다는 특성이 있다. 이러한 현상은 미생물에서 EPS 생산에 관여하는 코딩 유전자의 불안정성에 따른 손실 또는 재배열에 기인하며, EPS 생산의 유전적 불안정성은 산업적 이용성에 심각한 문제가 된다[6, 25].

최근 EPS가 과거의 단순 물성기능 소재가 아닌 생리기능 소재로 주목을 받고 있다. 유산균 중 *Bifidobacteria* 유래 EPS와 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgalicus*, *Lac. helveticus var. jugurti*로부터 유래한 EPS에 항암효과가 있다고 보고 되었다[17]. 지금까지 유산균에서 생성된 EPS에 관한 많은 연구가 이루어졌으나, 대부분 요구르트와 치즈 등과 같은 발효 유제품에서 분리한 유산균에 국한되고 우리나라 전통 발효식품에서 분리한 유산균에 관한 연구는 미흡한 실정이다[19].

전통 장류는 예로부터 전승된 우리나라의 대표적인 대두 발효 식품으로서 곡류 단백질에서 부족되기 쉬운 필수 아미노산, 지방산, 유기산, 미네랄 및 비타민류 등의 영양소를 보충해줌으로써 영양학적으로 중요한 기능을 가진다[3]. 최근, 전통발효식품에 대한 새로운 인식과 관심이 높아짐에 따라 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며[3, 21], 특히 장류에서 생리활성 물질과 항암효과에 대한 많은 연구 결과로 장류에 대한 이미지가 새롭게 변화하고 있다[21]. 발효과정 중 미생물이 생산하는 2차 대사산물의 혈전용해능, 항산화능, 항암활성, 면역증강, 혈압강하 및 항균효과 등 다양한 생

리활성이 보고됨에 따라 기능성 식품으로서 전통장류에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다[2, 22]. 이와 같이 간장 및 된장과 같은 전통 장류의 기능성에 관한 연구가 활발하게 진행되면서 전통 장류에서 분리된 유산균의 활용에 대한 인식이 재평가되고 있다.

따라서 본 연구에서는 전통 장류에서 분리한 유산균 중 EPS 생산 유산균을 선별하였고, 내산성, 인공위액 및 인공담즙 저항성 시험을 통하여 선별 유산균의 장내 생존 가능성을 조사하였으며, EPS를 분리, 정제하여 그 특성에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 실험에서 사용한 재래식 간장과 된장은 경기도 양주시와 남양주시 지역의 재래시장에서 구입하거나 가정에서 직접 담근 장류를 수집하였으며, 표준균주 *Leuc. mesenteroides* KACC12312는 농촌진흥청 한국농업미생물보존센터에서 분양 받아 사용하였다. 분석에 사용한 시약은 Sigma Aldrich (ST. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 균주 배양 및 선별

수집한 장류 시료 10 g을 90 ml의 0.85% NaCl로 현탁하여 MRS 고체배지에 100 µl 도말하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 미생물의 형태적 차이를 이용하여 1차 선별하고, 유산균으로 확인된 균주를 슈크로오스 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% dipotassium phosphate, 0.5% diammonium citrate, 5% sucrose, pH 7.0)에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 mucoid colony를 나타내는 점질균을 선별하였다. 이 균주를 슈크로오스 액체배지에 배양하여 점성물질을 분비하는 것을 재확인한 다음 EPS 생성 균주로 선별하여 실험에 사용하였다.

### EPS 생산 균주의 동정

DNA 유전자 염기서열 분석은 Solutions for Generic Technologies (Solgent)사에 의뢰하여 분석하였으며, primer로는 Universal PCR primer 27F(5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다. 계통수 작성은 Lasergene사의 DNASTAR pro software (SeqMan Pro)와 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 Advanced blast search 프로그램을 통하여 GenBank에 보고된 유사 균주와의 염기서열을 비교, 계통분류학적 유연관계를 분석 하였으며, MEGA v4.0을 이용하여 Tamura-Nei distance model과 neighbor-joining

method [26]에 의해 계통수를 작성하였다.

### 내산성 및 인공위액 저항성

분리 균주의 산 저항성은 단순 산성 pH에 대한 내성실험과 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액 내성실험을 실시하여 확인하였다. 산성 pH에 대한 내성은 0.05 M sodium phosphate 용액(pH 3.0)을 사용하여 측정하였다[24]. 인공위액 내성 실험은 Kobayashi 등[18]의 방법을 변형하여 1 N HCl로 pH 3.0으로 조정된 MRS 액체 배지에 펩신을 1,000 unit/ml가 되도록 첨가하여 인공위액을 조제, 실험하였다. EPS 생성을 위해 분리 균주를 슈크로오스 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후, 원심분리(10,000 × g, 5 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 제거된 상징액과 동량의 0.05 M sodium phosphate 용액(pH 3.0)과 인공위액을 각각 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 평가하였다. 대조균은 MRS 배지에서 배양하여(37°C, 48 h), EPS를 생성하지 않은 조건에서 실험구와 동일하게 처리하였다.

### 인공 담즙 저항성

인공 담즙은 MRS 액체배지에 0.45 µm filter로 여과한 oxgall 용액을 0.3% 첨가하여 제조하였다[28]. 담즙에 대한 저항성은 슈크로오스 액체배지에 균주를 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 다음 인공위액에 2시간 처리하여 후 인공 담즙 저항성을 실험하였다. 인공 위액 처리를 거친 유산균 배양액을 원심분리(10,000 × g, 5 min, 4°C)하여 상징액을 제거, 균체를 회수하였으며 회수된 균체에 조제된 인공 담즙액을 제거한 상징액과 동량으로 첨가하여 현탁시킨 후 37°C에서 24시간 배양하였고, 생균수를 측정하여 인공 담즙에 대한 저항성을 조사하였다. 대조균은 MRS 배지에서 배양하여(37°C, 48 h), EPS를 생성하지 않은 조건에서 실험구와 동일하게 처리하였다.

### EPS 분리, 정제 및 정량

분리균주를 슈크로오스 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% dipotassium phosphate, 0.5% diammonium citrate, 5% sucrose, pH 7.0)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 EPS를 생성시켰다. 이 배양액을 4°C에서 원심분리(10,000 × g, 25 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수된 상징액에 2배 냉각된 95% 에탄올을 첨가하여 4°C에서 15시간 침전시켰다. 이 침전물을 다시 원심분리(10,000 × g, 25 min, 4°C)하여 회수하고, 남은 에탄올을 건조시킨 다음 동결건조하여 이를 crude EPS로 하였다[29].

crude EPS를 정제하기 위해 배양액에 trichloroacetic acid

를 최종농도 4%(w/v)가 되도록 첨가하고 4°C에서 2시간 처리한 후 원심분리(10,000 × g, 25 min, 4°C)하여 균체와 침전된 단백질을 제거하였다. 상징액은 회수한 후 0.2 µm filter로 여과하여 남은 단백질을 제거하고, 회수된 상징액에 2배량의 95% 에탄올을 첨가하여 4°C에서 15시간 침전시켜 분리하였다. 침전물은 원심분리(10,000 × g, 25 min, 4°C)하여 회수하였고, 남은 에탄올을 건조시킨 후 3차 증류수에 용해하여 dialysis sack에 넣고 4°C에서 24시간 동안 투석한 다음, 동결 건조하였다[34]. 배양액에 대한 EPS의 생성량은 g/L로 나타내었다.

### EPS 구성 당 분석

EPS의 구성 당은 EPS 가수분해물을 HPLC (Waters Co., USA)로 분석하였다. EPS를 2 N 황산으로 100°C에서 6시간 동안 가수분해하고, 1 N NaOH로 중화한 다음 0.45 µm filter로 여과하여 EPS 가수분해물 시료로 사용하였다. 분석 컬럼은 탄수화물 분석용 컬럼(carbohydrate analysis column) (3.9 mm × 300 mm, Waters Co., USA)을 사용하였으며, 이동상으로는 75% (v/v) 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하였다. 이동상의 유속은 1.5 ml/min으로 하였으며, 시료는 auto-sampler를 이용하여 20 µl 주입하여 RI (Refractive Index) 검출기로 검출하였다.

### 용혈성 및 젤라틴 액화시험

혈액 한천배지(tryptic soy agar에 5% sheep blood 첨가)에 분리한 유산균을 도말하고, 37°C에서 48시간 배양한 다음 균체 주위에 투명환의 생성여부로 용혈성을 판단하였다[20]. 젤라틴 영양 배지(beef extract 0.3%, peptone 0.5%, gelatin 12%)에 분리 균주를 접종한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 젤라틴 영양배지를 4°C에 약 4시간 동안 냉장 방치하여 배지의 응고 여부를 확인하였다. 배지가 응고되지 않으면 액화 반응 양성으로 판정하였다[27].

### 결과 및 고찰

#### EPS 생성 유산균의 선발 및 동정

전통 장류 시료에서 미생물의 형태적 차이를 분석, 1차 선별하여 약 1,000여 균주를 선발하였고, 유산균으로 확인된 약 200균주를 슈크로오스 배지에 배양하여 점성물질을 분비하는 균주 중 높은 활성을 보이는 N45-10, K6-7 및 N58-5의 3균주를 선발하였다. 생성된 EPS는 투명하면서 물엿 정도의 퍼짐을 나타냈으며 N45-10균주가 가장 많은 EPS를 생성하였다.

선발한 3종류 유산균의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과, N45-10, K6-7, N58-5는 *Leuconostoc* sp.와 높은 상동

성을 나타냈다. 그리고 균주의 계통학적 유연관계를 16S rDNA 유전자 염기서열을 기초로 *Leuconostoc* 속의 표준 종들과의 유사도를 조사한 결과, N45-10 균주는 *Leuc. citreum* 과 K6-7, N58-5 균주는 *Leuc. mesenteroides*와 100% 상동성을 보여 기존에 알려진 유산균으로 동정되었다.

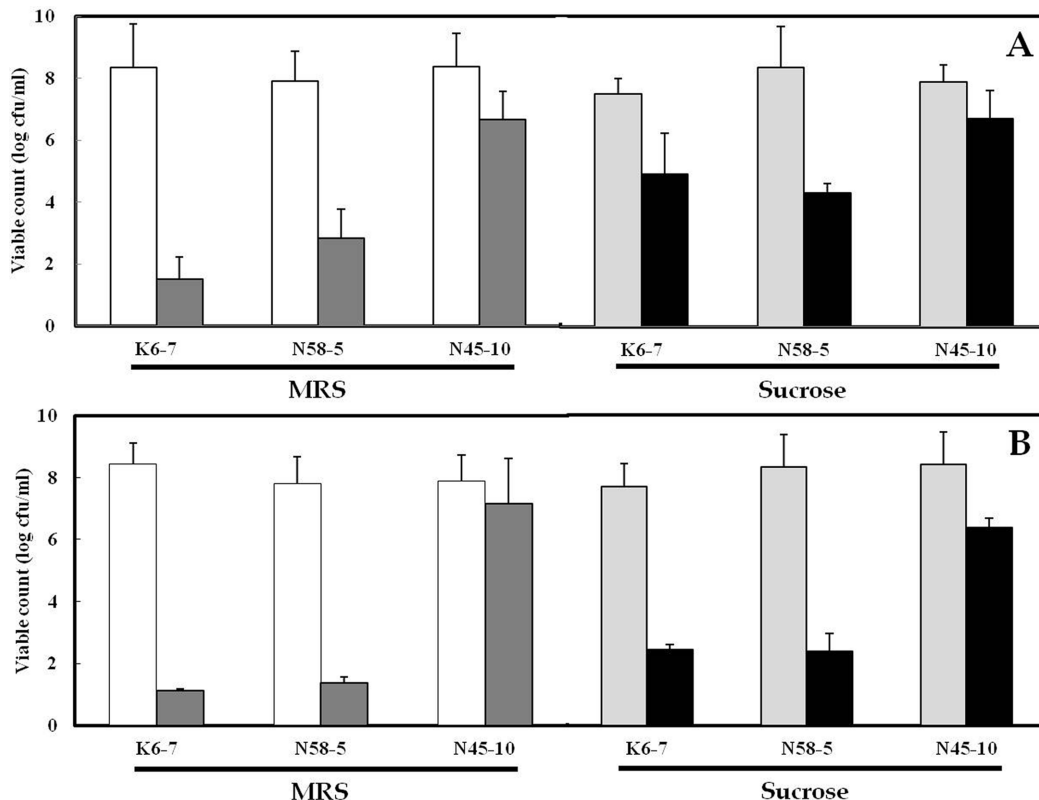
### 내산성 및 인공 위액 저항성

유산균이 살아있는 상태로 장내에 도달하기 위해서는 염산과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하여야 하며, 이 때 위의 pH는 상당히 큰 가변성을 지니고 있고 음식물의 섭취여부에 따라 pH 2-8의 범위를 나타낸다[10]. 따라서 위에 도달하는 대부분의 미생물은 사멸하거나 원래 갖고 있던 활성이 저하된다. 전통 장류에서 선발된 EPS 생성 유산균 N45-10, K6-7 및 N58-5의 산 저항성에 대한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 슈크로오스 액체배지에서 EPS 생성을 유도한 균주를 0.05 M sodium phosphate 용액(pH 3.0)이나 인공 위액에서 2시간 처리했을 때 생균수는 EPS를 생성하지 않은 균주보다 높게 나타났다. 3균주 중에서 N45-10은 EPS 생성 유무와 상관없이 높은 생균수( $10^5$ - $10^6$  CFU/ml)를 유지했을 뿐만

아니라 높은 내산성을 가지고 있어 위장에서 장으로 이동할 수 있는 가능성이 시사되었다. 이 결과는 김치에서 김 등[15]이 분리한 *Leuc. kimchii* GJ2, *Leuc. citreum* C3, *Leuc. mesenteroides* C11 균주 및 이 등[20]이 분리한 *Lac. plantarum* NO.1 균주가 EPS를 생성하였을 때 0.05 M sodium phosphate 용액(pH 3.0)이나 인공 위액에서 2시간이 경과한 후에도 사멸하지 않고 초기균수를 유지하여 높은 내산성을 나타내었다는 결과와 유사하였다. 반면 K6-7, N58-5 균주는 N45-10 균주보다 비교적 낮은 생균수( $10^1$  CFU/ml)를 나타내었다.

### 인공 담즙 저항성

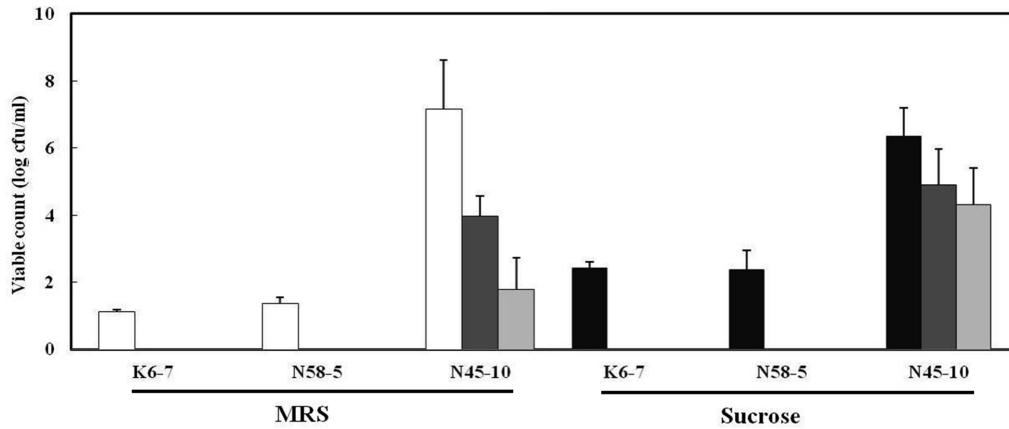
유산균이 장내에서 정상적인 기능을 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다[23]. 섭취된 유산균은 실제로 위를 통과하여 장으로 이동되는 것을 고려하여 선발된 3균주를 인공 위액에서 2시간 처리한 후, 0.3% 및 0.5% oxgall을 함유한 인공 담즙액에 처리하였다. 그 결과 *Leuc. mesenteroides* K6-7과 N58-5는 거의 사멸하였으나, *Leuc. citreum* N45-10은 비교적 높은 생균수( $10^3$ - $10^4$  CFU/ml)를



**Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from Korean fermented soy sauce and soybean paste in 0.05 M sodium phosphate (A) and artificial gastric juice (B).**

Cells were precultured in MRS medium at 37°C for 48 h (□) and sucrose medium at 37°C for 48 h (▤), subsequently treated in 0.05 M sodium phosphate (pH 3.0) (▨) and artificial gastric juice (pH 3.0) (■) for 2 h, respectively.





**Fig. 2. Bile tolerance of lactic acid bacteria from korean fermented soy sauce and soybean paste against 0.3% and 0.5% oxgall.** Cells were precultured in MRS medium at 37°C for 48 h, subsequently treated in artificial gastric juice for 2 h (□) and sucrose medium at 37°C for 48 h, subsequently treated in artificial gastric juice for 2 h (■) subsequently and than in 0.3% oxgall (■) and 0.5% oxgall (■) for 24 h.

유지하는 것으로 보아 담즙액 저항성이 가장 우수하였다(Fig. 2). 또한 N45-10 균주는 김 등[15]이 보고한 김치에서 분리한 *Leuc. kimchii* GJ2, *Leuc. citreum* C3, *Leuc. mesenteroides* C11이 높은 내산성의 기능을 지니면서 동시에 담즙에 대한 높은 저항성을 나타낸다는 결과와 유사하였다. 유산균의 EPS 생성 유무에 따른 담즙 저항성을 비교한 결과, MRS 배지보다 슈크로오스 배지에 배양하였을때, 생균수가 더 높게 나타났다. 이것은 EPS 생성이 유산균의 세포벽 주위에 보호막으로 작용한 결과로 생각된다.

**EPS 분리, 정제 및 정량**

선발된 유산균의 탄소원으로 슈크로오스를 이용하여 EPS 생성능을 조사하였다. *Leuc. citreum* N45-10과 *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5를 슈크로오스 액체배지에 배양한 후, 에탄올 침전법을 이용하여 각각 16.173, 8.167 및 3.652 g/L의 crude EPS를 회수하였다(Table 1). *Leuc. citreum* N45-10은 *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5 보다 2-5배(16.173 g/L) 이상 높은 EPS 생산량을 나타내었다. 이

**Table 1. Production of exopolysaccharides by the lactic acid bacteria isolated from korean fermented soy sauce and soybean paste.**

| Strains                               | EPS (g/L)      |
|---------------------------------------|----------------|
| <i>Leuc. mesenteroides</i> KACC 12312 | 1.973 ± 0.229  |
| <i>Leuc. mesenteroides</i> K6-7       | 8.167 ± 0.332  |
| <i>Leuc. mesenteroides</i> N58-5      | 3.652 ± 0.670  |
| <i>Leuc. citreum</i> N45-10           | 16.173 ± 0.521 |

Values are means ± SD (n = 3).

는 김 등[15]이 김치에서 분리한 *Leuc. citreum* C3에서 16.46 g/L의 EPS가 생산되었다는 결과와 유사하였다.

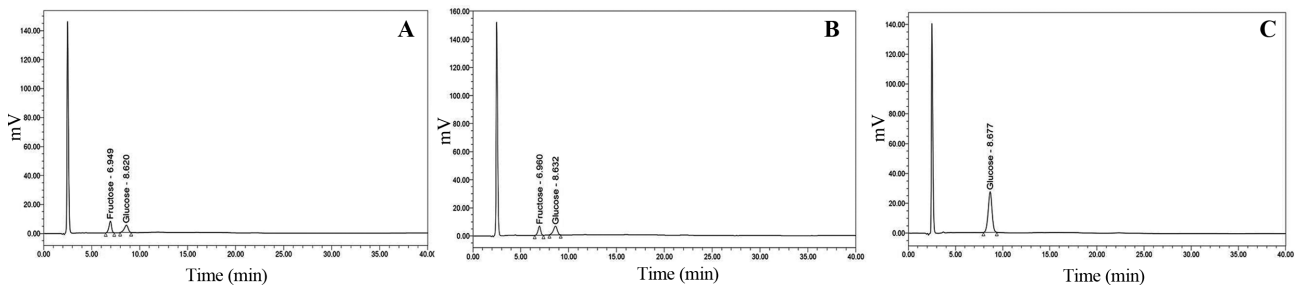
**EPS 구성 당 분석**

EPS 가수분해물을 HPLC로 분석한 결과, *Leuc. citreum* N45-10는 글루코오스, *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5는 프락토오스와 글루코오스가 주요 구성당으로 동정되어(Fig. 3) *Leuc. citreum* N45-10이 생산한 EPS는 homo-polysaccharide로, *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5이 생산한 EPS는 hetero-polysaccharide로 구분되었다[5, 6, 25]. 따라서 *Leuc. citreum* N45-10과 *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5의 EPS 생산량은 homo-polysaccharide과 hetero-polysaccharide의 차이에 기인한 것으로 나타났다.

**유산균의 안전성**

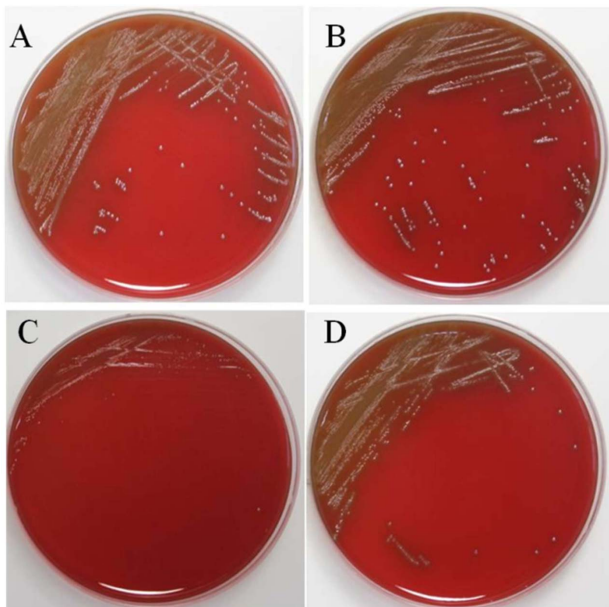
유산균은 전통적으로 식품에 사용되어 왔기 때문에 오랜 세월 동안 안전하다고 인지되어 왔다(GRAS, generally recognized as safe). 이러한 유산균은 인간의 건강에 유용하며 안전하다고 생각되기 때문에 안정성 및 독성연구가 요구되지 않았다. 그러나 여러 종류의 감염부위에서 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*의 일부 종(Species)이 분리되어[1, 4, 9] 식품 및 의약품 등에 분리한 새로운 유산균을 상업적으로 사용할 때에는 안전성 확보가 중요하다고 생각되어 분리 유산균의 안전성 실험을 하였다.

용혈은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용이다[16]. 생체내 용혈은 주로 비장, 간장, 골수세포 내피계 세포에서



**Fig. 3.** HPLC chromatograms of acid hydrolyte of exopolysaccharides produced by the lactic acid bacteria isolated from korean fermented soy sauce and soybean paste.

(A) *Leuc. mesenteroides* K6-7, (B) *Leuc. mesenteroides* N58-5, (C) *Leuc. citreum* N45-10.

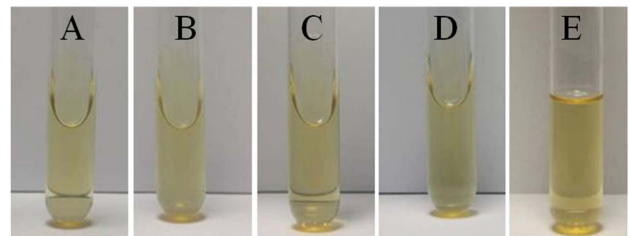


**Fig. 4.** Hemolysis test of the lactic acid bacteria isolated from korean fermented soy sauce and soybean paste.

(A) *Leuc. mesenteroides* K6-7, (B) *Leuc. mesenteroides* N58-5, (C) *Leuc. citreum* N45-10, (D) *Leuc. mesenteroides* KACC 12312.

일어나며, 세포내에서 용혈 현상이 일어나면 적혈구의 산소 운반 기능이 없어져 생체내에 치명적인 결과를 가져온다. 선발된 유산균의 안전성을 증명하기 위해 용혈성 유무를 평가하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 본 연구에 사용한 3종류의 유산균 모두 용혈성검사서 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환이 나타나지 않아 안전성이 확인되었다.

세균의 병원성은 세포의 침입능력에 좌우되는 경우가 많으며, 세포침입에는 단백질 분해력이 필요하다. 젤라틴 액화 시험은 젤라틴을 가수분해하는 능력을 판정하는 시험으로 단백질 분해능을 조사하는 방법 중 하나이다[11]. 선발 유산균의 단백질 분해능을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.



**Fig. 5.** Gelatin liquefaction test of the lactic acid bacteria isolated from korean fermented soy sauce and soybean paste.

(A) *Leuc. mesenteroides* K6-7, (B) *Leuc. mesenteroides* N58-5, (C) *Leuc. citreum* N45-10, (D) *Leuc. mesenteroides* KACC 12312, (E) Positive control.

3종류 유산균 모두 젤라틴 액화능을 나타내지 않았으며, 이러한 결과는 세포 침입을 위한 단백질 분해 능력이 없음의 의미하는 것으로 *Leuc. citreum* N45-10과 *Leuc. mesenteroides* K6-7, N58-5의 안전성이 입증되었다.

## 요 약

전통 장류에서 점성물질을 분비하는 유산균을 분리하고 높은 활성을 보이는 N45-10, K6-7 및 N58-5의 3균주를 선발하였다. 선발한 3균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 N45-10은 *Leuc. citreum*, K6-7, N58-5는 *Leuc. mesenteroides*로 동정되었다. 산 저항성과 인공위액 저항성은 3균주 중에서 *Leuc. citreum* N45-10이 높은 생균수( $10^5$ - $10^6$  CFU/ml)를 나타내어 산 저항성과 인공위액 저항성이 가장 우수하게 나타났으며, 인공 담즙 저항성은 *Leuc. citreum* N45-10은 높은 생균수( $10^3$ - $10^4$  CFU/ml)를 유지하여 담즙액 저항성이 우수하게 나타났다. 3균주들 중에서 *Leuc. citreum* N45-10은 EPS 생성량이 가장 많았고, MRS 배지에서 배양하여 EPS가 생성되지 않았을 때보다 슈크로오스 배지에서 배양하여 EPS를 생성하였을 때 생균수가 더 높게 나타났

다. 이것은 EPS 생성이 유산균의 세포벽 주위에 보호막으로 작용한 결과로 생각된다. 선발 유산균 3주의 EPS 생산량은 슈크로오스 액체배지에서 각각 16.173, 8.167, 3.652 g/L였으며, *Leuc. citreum* N45-10은 글루코오스로만 이루어진 homo-polysaccharide, *Leuc. mesenteroides* K6-7과 N58-5는 프락토오스, 글루코오스로 구성된 hetero-polysaccharides로 동정되었다. 선발 유산균 3주 모두는 용혈 음성반응을 나타내고, 젤라틴 액화능을 나타내지 않아 안전성이 확인되었다.

## Acknowledgement

This work was supported of Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ006764) Rural Development Administration, Korea.

## References

- Aguirre, M. and M. D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.
- Ahn, Y. S., Y. S. Kim, and D. H. Shin. 2006. Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 82-87.
- Bernard, F. G., Z. Alexandre, M. Robert, and M. Catherine. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.* **37**: 123-131.
- Brook, I. 1996. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J. Med. Microbiol.* **45**: 21-6.
- 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.
- Duboc, P. and B. Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**: 759-768.
- Dufresne, R., J. Thibault, A. Leduy, and R. Lencki. 1990. The effects of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotech.* **32**: 526-532.
- Fu, J. F. and Y. H. Tseng. 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 919-923.
- Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* **92**: 45-67.
- Hood, S. K. and E. A. Zittola. 1998. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* **53**: 1514-1516.
- Isenberg, H. D. 1992. Gelatin liquefaction test. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 1, pp. 1.19.42-1.19.43. American Society of microbiology, Washington D.D., USA.
- Jeanes, A., D. A. Wilham, H. M. Tsuchiya, and W. C. Haynes. 1957. Properties of dextrans isolated from whole cultures at various stages of incubation. *Arch. Biochem. Biophys.* **71**: 293-302.
- 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. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**: 84-91.
- Kim, D. J. and S. Y. Lee. 2001. Isolation of exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 370-375.
- Kim, H. J. and H. C. Chang. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 196-203.
- Kim, Y. M., U. K. Park, J. S. Mok, and D. S. Chang. 1995. Physiological characteristics of *Listeria monocytogenes* YM-7. *J. Korean Fish Soc.* **28**: 443-450.
- Kimmel, S. A., R. F. Roberts, and G. R. Ziegler. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 659-664.
- Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-697.
- Lee, J. J., Y. M. Lee, H. C. Chang, and M. Y. Lee. 2007. Acute toxicity of *Leuconostoc kimchii* GJ2, an exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from kimchi, in mice. *J. Life Sci.* **17**: 561-567.
- Lee, Y. and H. C. Chang. 2008. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 106-114.
- Lee, Y. N., M. J. Sin, and B. N. Kim. 1991. A study on the present state of traditional food. *Korean J. Dietary. Culture.* **6**: 71-81.
- Oh, J. H., B. J. Lee, H. R. Paik, S. C. Jung, K. S. Baik, and S. K. Choi. 2009. Isolation of bacteria from chunggukjang prepared by rice straw and identification of protease secreted. *J. Life Sci.* **19**: 397-402.
- 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. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**: 73-78.
- 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. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
- 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.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor joining-methods: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

27. Shin, H. J. 2004. Studies on the probiotic characteristics of *L. paracasei* LA44 isolated from Korean feces. Department of Food Biotechnology Graduate School Sungkyunkwan University.
28. 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. *Korean J. Dairy Sci.* **20**: 273-282.
29. 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.
30. Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **8**: 143-213.
31. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnol.* **16**: 41-46.
32. Sutherland, I. W. 1996. Extracellular polysaccharides. pp. 613-657, In H. J. Rehm and G. Reed (eds.), *Biotechnology: A Multi-Volume Comprehensive Treatise*. 2nd, completely revised ed., vol. 6, VCH, Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
33. Van den Berg, D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, A. M. Ledebøer, and C. T. Verrips. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2840-2844.
34. Yang, Z., E. Huttunen, M. Staaf, G. Widmalm, and H. Tenhu. 1999. Separation, purification and characterization of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *Int. Dairy J.* **9**: 631-638.