

## Research Article

# 세포외다당류(EPS) 고생산능 보유 신규 균주 *Leuconostoc mesenteroides* KFOM0089의 유전체 특성

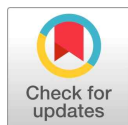
윤형락·배찬일·곽윤수·엄수정·서희연·김소명·김미주\*

경희대학교 식품생명공학과

## Genomic Characterization of a Novel *Leuconostoc mesenteroides* KFOM0089 Strain with High Exopolysaccharide (EPS)-Production Ability

Hyeong-Rak Yoon, Chan-Il Bae, Yoon-Soo Gwak, Su-Jeong Eom, Hui-Yeon Suh, So-Myeong Kim, and Mi-Ju Kim\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea



Received: Dec 16, 2025

Revised: Jan 30, 2026

Accepted: Feb 19, 2026

\*Corresponding author :Mi-Ju Kim  
Department of Food Science and  
Biotechnology, Kyung Hee  
University, Yongin 17104, Korea.  
Tel: +82-31-201-2659  
E-mail: mijukim@khu.ac.kr

### ORCID

Hyeong-Rak Yoon  
<https://orcid.org/0009-0006-5248-1258>  
Chan-Il Bae  
<https://orcid.org/0009-0007-4475-812X>  
Yoon-Soo Gwak  
<https://orcid.org/0009-0004-5464-9195>  
Su-Jeong Eom  
<https://orcid.org/0009-0000-8508-6111>  
Hui-Yeon Suh  
<https://orcid.org/0009-0000-8715-953X>  
So-Myeong Kim  
<https://orcid.org/0009-0002-5374-2756>  
Mi-Ju Kim  
<https://orcid.org/0000-0002-8467-8999>

### Abstract

Exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria (LAB) are valuable biomolecules widely utilized in food, microbiology, and bioprocessing, and their structural and functional diversity underscores their high research potential. This study aimed to identify LAB strains with strong EPS-producing ability and to elucidate the genomic basis of EPS biosynthesis in a selected strain. Twenty-seven LAB isolates from various sources were screened for EPS production under sucrose-supplemented conditions. Several isolates exhibited mucoid colonies, among which *Leuconostoc mesenteroides* KFOM0089 showed the highest EPS yield after lyophilization. Screening under various carbohydrate conditions showed that KFOM0089 produces EPS exclusively under sucrose-supplemented condition. Whole-genome sequencing (WGS) of KFOM0089 based on the Oxford Nanopore Technology platform was conducted. Subsequently, functional genome annotation based on KEGG, COG, and CAZy databases identified genes involved in sucrose metabolism and EPS formation. Together with the absence of typical Wzx/Wzy-dependent or ABC transporter - dependent gene clusters, these findings suggest that KFOM0089 likely synthesizes dextran or levan type EPS through a sucrose-dependent extracellular pathway. In addition, no antibiotic resistance or virulence factor genes were detected. Our results provide combined phenotypic and genomic insights into EPS production by *L. mesenteroides* KFOM0089 and highlight its potential for development as a functional EPS-producing strain.

### Keywords

exopolysaccharides, lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, whole-genome sequencing, biosynthesis pathway

## 서 론

Exopolysaccharides (EPS)는 미생물이 세포 외부로 분비하는 고분자 다당류로, 여러 단당류가 글리코사이드 결합을 통해 반복적으로 연결된 구조를 가진다. EPS는 구성 단당류의 종류와 결합 방식에 따라 단일 단당류를 기반으로 하는 homopolysaccharides (HoPS)와 다양한 단당류가 복합적으로 포함된 heteropolysaccharides (HePS)로 구분된다(Lynch *et al.*, 2018). EPS는 그 구조적·기능적 다양성에 따라 식품, 미생물학, 바이오 공정 등 다양한 산업 분야에서 폭넓게 활용되고 있는데, 일반적으로 점도 증가, 겔 형성, 보습성 향상과 같은 물리적 특성을 제공할 뿐만 아니라 항산화·항균 작용, 면역 조절 등 다양한 생리기능도 보고된 바 있어 연구적 가치가 높다(Rana and Upadhyay, 2020).

유산균이 생산하는 EPS는 높은 안전성, 기능성, 식품 적합성을 기반으로 산업적 가치가 더욱 부각되고 있다(Liu *et al.*, 2017). 상당수의 유산균 종은 미국 FDA에서 GRAS(generally recognized as safe)로 분류되며, 전통적으로 다양한 발효 식품에서 널리 이용되어 왔다(Doo *et al.*, 2024). 특히 최근에는 합성 첨가물을 최소화한 클린 라벨(clean label) 식품에 대한 소비자 수요가 증가함에 따라, 자연 발효 미생물에서 기원한 천연 구조물질로서의 EPS가 더욱 각광받고 있다(Santos *et al.*, 2025). *Leuconostoc mesenteroides*는 sucrose를 기질로 HoPS인 dextran을 생산하는 대표적인 유산균으로 알려져 있으며, 발효유 및 식물성 발효식품에서 점도 증가, 텍스처 개선 등 품질 향상에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고된 바 있다(Naessens *et al.*, 2005; Sarwat *et al.*, 2008). *Weissella* 속 균주 역시 다양한 구조적 특성을 지닌 EPS를 생산하며, 제빵 품질 향상, 식품의 점질성 및 보습성 강화, 프로바이오틱 기능성 부여 등 식품 및 건강 분야에서 폭넓은 활용 가능성이 제시되고 있다(Ma *et al.*, 2025). 더불어 일부 유산균 유래 EPS는 장내 미생물 균형을 개선하는 프리바이오틱 기능도 보고되는 등 기능성 소재로서의 잠재력 역시 크다(Kang *et al.*, 2023a; Pourjafar *et al.*, 2023).

그러나, 동일한 유산균 종 내에서도 균주마다 EPS의 생합성 여부, EPS의 생산량 및 생화학적 특성, 그리고 생합성 경로에서 큰 차이를 보인다(Li *et al.*, 2025). 미생물의 EPS 생합성은 일반적으로 Wzx/Wzy-dependent pathway, ABC transporter-dependent pathway, synthase-dependent pathway, extracellular pathway의 네 가지 주요 경로로 구분되는데, 각 경로마다 EPS 중합 방식과 수송 방식이 달라 생성되는 EPS의 구조와 특성에도 차이를 만든다(Liang *et al.*, 2024). 이러한 EPS 생합성 경로는 각 균주가 보유한 개별 유전자 및 유전자 클러스터의 구성에 의해 결정된다.

이에 최근 EPS 생합성 미생물 연구에서는 차세대 염기서열 분석법을 활용한 전장 유전체 분석(whole-genome sequencing, WGS)이 활발히 이루어지고 있는 실정이다(Zhao *et al.*, 2023). 따라서 우수 EPS 생산 균주를 확보하고 해당 균주의 EPS 생합성능을 정확히 이해하기 위해서는 유전체 분석에 기반한 생합성 경로 규명이 필수적이다.

본 연구에서는 한국 전통 발효식품으로부터 다양한 유산균을 분리하고, 이들 중 가장 우수한 EPS 생산능을 보이는 균주를 선별하였다. 이후 WGS를 수행하여 해당 균주의 EPS 생합성 관련 유전적 특성을 규명하였으며, 이를 통해 신규 EPS 생산 균주의 기능성과 산업적 활용 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 유산균 분리 및 선정

김치, 식혜 등 다양한 전통 발효식품 시료로부터 유산균을 분리하였다. 각 시료 25 g을 0.85% saline 225 mL에 균질화하여 탈리한 후 10배수 희석을 진행하였다. 희석액은 MRS 한천배지(MB Cell, Seoul, Korea)에 도말하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 집락은 형태적 특징을 기준으로 선별하여 두 차례 계대배양한 뒤, MRS 액체배지(MB Cell)에 37℃에서 24시간 배양하여 활성화하였다. 활성화된 배양액은 최종 농도 30%(v/v) 글리세롤과 혼합한 후 -80℃에서 보관하며 후속 실험에 사용하였다.

분리 균주의 동정을 위해 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit for Microorganisms (Biofact, Daejeon, Korea)를 사용하여 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. DNA 순도는 NanoReady Touch spectrophotometer (Life Real, Hangzhou, China)를 이용해 확인하였으며, DNA 농도는 Qubit 4 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)를 사용하여 정량하였다. 16S rRNA 유전자(V1-V9)를 증폭하기 위해 다음 프라이머를 활용하여 PCR을 수행하였다: 27F, 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'; 1492R, 5'-CGGYTACCTTGTTACGACTT-3'. PCR 조건은 초기 변성(95℃, 3분) 1 cycle, 변성(95℃, 30초)-결합(55℃, 2분)-신장(72℃, 30초)의 35 cycles, 최종 신장(72℃, 5분) 1 cycle 순으로 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Bionics (Seoul, Korea)에 의뢰하여 시퀀싱하였다.

최종적으로 각 발효식품 시료에서 독립적으로 분리된 유산균 균주를 확보하였으며, 동일 식품군에서 동일 종이 중복 분리된 경우에도 서로 다른 시료에서 유래한 경우에는 각각을 독립 균주로 간주하여 실험에 포함하였다.



## EPS 스크리닝

유산균의 EPS 생성 여부는 MRS 한천배지에 sucrose를 10%(w/v) 첨가한 배지에서 점액성 집락 형성 여부로 확인하였다. 점액성 집락이 관찰된 균주는 MRS 액체배지에 37 °C에서 두 차례 계대배양하고, 두 번째 배양액의 600 nm에서 흡광도(GENESYS™ 140/150 Vis/UV-Vis Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 1.0에 도달했을 때 crude EPS 추출에 사용하였다.

EPS 추출은 Kang 등(2023b)의 방법을 일부 변형하여 진행하였다. Sucrose를 5%(w/v) 첨가한 MRS 액체배지 1 L에 세포 현탁액을 2%(v/v) 접종하여 37 °C에서 24시간 배양하였다. 배양액은 원심분리(5,000 rpm, 10분)하여 상층액을 회수하고, 80% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 최종 농도 4%(v/v)까지 첨가하였다. 혼합액을 4 °C에서 16시간 동안 보관한 뒤 동일 조건(5,000 rpm, 10분)으로 원심분리하고, 상층액을 취해 95% cold ethanol을 상층액의 두 배 부피만큼 첨가하였다. 4 °C에서 16시간 동안 EPS를 침전시킨 후, 침전물은 원심분리(5,000 rpm, 10분)로 회수하여 SnakeSkin™ dialysis tubing (10 kDa MWCO; Thermo Fisher Scientific)에 넣어 4 °C에서 36시간 투석 후 동결건조하여 EPS를 회수하였다.

EPS 생산능이 우수한 균주는 sucrose, glucose, fructose, maltose, lactose, galactose를 각각 10%(w/v) 첨가한 MRS 한천배지에 도말하고 점액성 집락 형성 여부를 확인하여 균주의 탄소 원별 EPS 생산능을 평가하였다.

## 균주 전장 유전체 분석

전장 유전체 분석을 위해 추출된 gDNA로부터 Native Barcoding Kit 24 (SQK-NBD114.24; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK)를 사용하여 library를 준비하였다. 준비된 library는 R10.4.1 flow cell에 로딩하여 MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies)에서 약 100x depth가 확보될 때까지 시퀀싱하였다. 생성된 원시 시퀀싱 데이터는 Guppy Basecaller v6.1.3의 Super Accuracy 모드로 실시간 basecalling 하였으며, Nanoplot v1.42.0을 사용하여 read 품질을 평가하였다. 이후 Nanofilt v2.8.0을 이용해 Q score > 15인 read만을 선별하여 후속 분석에 사용하였다.

## 유전체 assembly 및 annotation

생성된 원시 시퀀싱 데이터는 Flye v2.9.6을 사용하여 *de novo* assembly를 수행하였다. Assembly로 생성된 contigs는 QUAST

v5.3.0 및 BUSCO v6.0.0를 사용하여 assembly 품질을 평가한 뒤 Prokka v1.14.6를 이용하여 유전자 예측과 기능 분류를 진행하였다. EPS 생성 경로를 예측하고자 run\_dbCAN v5.2.1을 활용하여 CAZyme (Carbohydrate-Active Enzymes)을 annotation 하였으며, eggNOG-mapper v2.1.13을 이용하여 COG (Clusters of Orthologous Groups) 기반 유전체 annotation을 수행하였다. 또한 BlastKoala v3.1을 이용해 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway 중 starch and sucrose metabolism을 포함한 주요 탄수화물 대사 경로를 검토하였다. AntiSMASH 8.0을 이용하여 EPS 생합성 관련 유전자 클러스터를 탐색하였으며, pygenomeviz v1.6.0을 이용하여 Mibig 데이터베이스에 등재된 유산균 EPS 생합성 유전자 클러스터와 비교 분석하였다. 마지막으로, DIAMOND v2.1.11 기반 CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) 및 VFDB (Virulence Factor Database) 상동성 분석을 통해 항생제 내성 유전자 및 병원성 관련 인자를 확인하여 균주의 안전성을 평가하였다.

## 비교유전체 분석

본 균주와 NCBI RefSeq에서 확보한 *L. mesenteroides* 278개 균주의 유전체 데이터에 대해 FastANI v1.34를 이용해 ANI (Average Nucleotide Identity)를 산출하였다. 이 중 본 균주와 높은 ANI 값을 보인 5개 균주를 선별하여 Roary v3.13.0 기반 범유전체 분석을 수행하였으며, 이를 통해 core gene과 strain-specific gene을 도출하였다.

## 시각화

유전체 annotation의 시각화는 R의 dplyr, tidyr, ggplot2, data.table, colorspace 패키지와 GraphPad Prism v8.0.2를 이용하였으며, 비교유전체 분석 결과의 시각화는 R의 tidyverse, pheatmap, ape 패키지와 Jvarkit 웹 도구를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

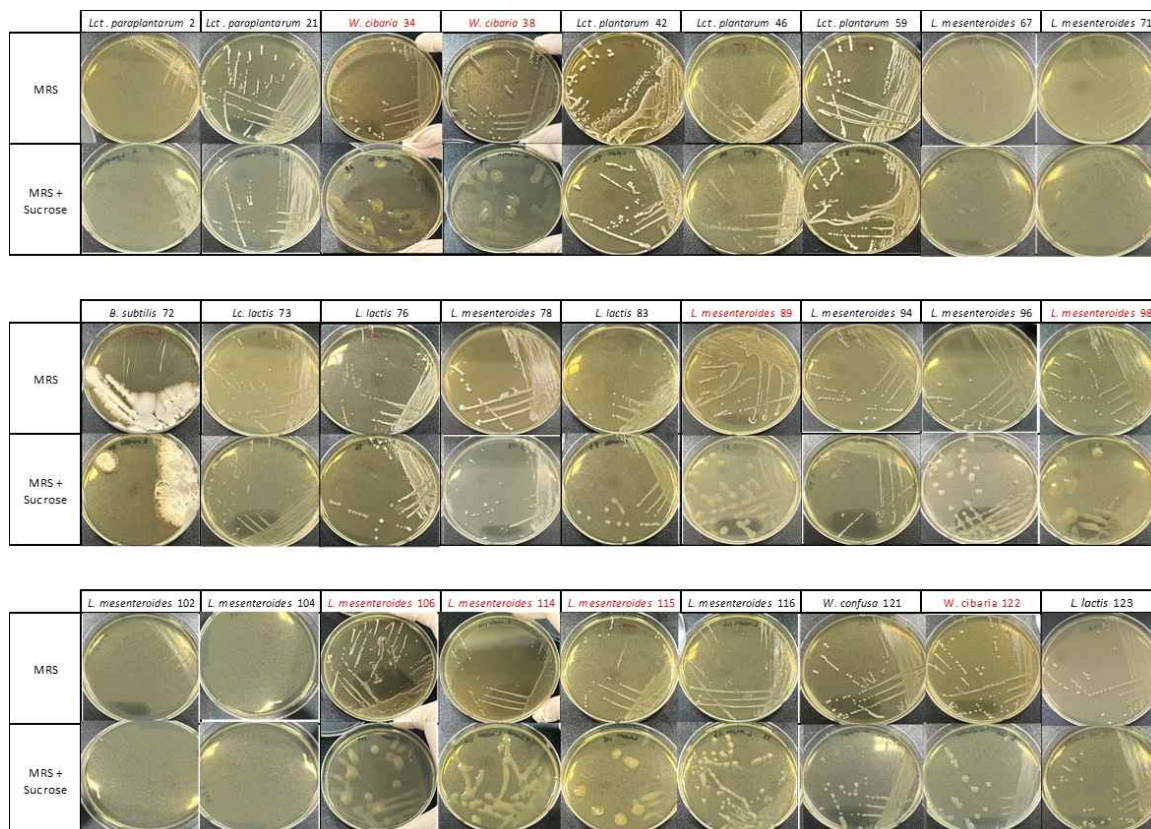
### 실험 균주의 EPS 생산능 스크리닝

동정 후 실험에 사용한 27개 균주 목록은 Table 1에 나타났다. 이들 균주를 대상으로 MRS 한천배지와 sucrose를 10%(w/v) 첨가한 MRS 한천배지에서의 점액성 집락 형성을 비교하여 EPS 생산 여부를 1차 스크리닝하였다(Fig. 1). 그 결과, *L. mesenteroides* KFO0089, KFOM0098, KFOM0106, KFOM0114,



**Table 1.** 27 Lactic acid bacterial strains used in this study

| No. | Species                                  | Strain   | Source             | No. | Species                          | Strain   | Source             |
|-----|------------------------------------------|----------|--------------------|-----|----------------------------------|----------|--------------------|
| 1   | <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> | KFOM0002 | Cabbage kimchi     | 15  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0089 | Green onion kimchi |
| 2   | <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> | KFOM0021 | Salted cabbage     | 16  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0094 | Gat kimchi         |
| 3   | <i>Weissella cibaria</i>                 | KFOM0034 | Salted cabbage     | 17  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0096 | Yeolmu kimchi      |
| 4   | <i>Weissella cibaria</i>                 | KFOM0038 | Dried radish       | 18  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0098 | Green onion kimchi |
| 5   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>     | KFOM0042 | Dongchimi          | 19  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0102 | Kkakdugi           |
| 6   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>     | KFOM0046 | Cabbage kimchi     | 20  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0104 | Kkakdugi           |
| 7   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>     | KFOM0059 | Green onion kimchi | 21  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0106 | Yeolmu kimchi      |
| 8   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>         | KFOM0067 | Altari kimchi      | 22  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0114 | Pumkin sikhye      |
| 9   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>         | KFOM0071 | Green onion kimchi | 23  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0115 | Pumkin sikhye      |
| 10  | <i>Bacillus subtilis</i>                 | KFOM0072 | Green onion kimchi | 24  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | KFOM0116 | Pumkin sikhye      |
| 11  | <i>Lactococcus lactis</i>                | KFOM0073 | Baek kimchi        | 25  | <i>Weissella confusa</i>         | KFOM0121 | Cabbage kimchi     |
| 12  | <i>Leuconostoc lactis</i>                | KFOM0076 | Oisobagi           | 26  | <i>Weissella cibaria</i>         | KFOM0122 | Cabbage kimchi     |
| 13  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>         | KFOM0078 | Oisobagi           | 27  | <i>Leuconostoc lactis</i>        | KFOM0123 | Sikhye             |
| 14  | <i>Leuconostoc lactis</i>                | KFOM0083 | Radish             |     |                                  |          |                    |



**Fig. 1.** Screening of exopolysaccharide (EPS) production by 27 lactic acid bacterial strains. Strains that formed mucoid colonies under the sucrose condition were considered EPS producers and these EPS-producing strains are highlighted in red.

KFOM0115 5종과 *Weissella cibaria* KFOM0034, KFOM0038, KFOM0122 3종이 sucrose 조건에서 점액성 집락을 형성하여 해당 균주 8종을 EPS 생산 균주로 간주하였으며, 그 외 균주에서는 점액성 집락이 확인되지 않았다. 한편, 동일 균종 내에서도 EPS 생산능의 차이가 관찰되어 *L. mesenteroides* KFOM0067, KFOM0071, KFOM0078, KFOM0094, KFOM0096, KFOM0102, KFOM0104, KFOM0116 균주 8종은 점액성 집락을 형성하지 않았는데, 이전 연구에서 동일 종에 속한 균주마다 EPS 생산여부에 차이가 있음이 보고된 바 있다 (Yamanaka *et al.*, 2011). Dimopoulou 등(2014)에 의하면 EPS 생산 특성에 차이를 보이는 *Oenococcus oeni* 50개 균주의 유전체 비교 결과, EPS를 생산하는 균주에서는 *eps1*·*eps2* 유전자 클러스터와 함께 glycoside hydrolase (*dsrO*, *dsrV*, *levO*) 및 glycosyltransferase (*gtf*, *it3*, *it4*) 유전자가 주로 확인된 반면, EPS를 생산하지 않는 균주에서는 이러한 유전자들이 결여되어 EPS 생합성 잠재력에 뚜렷한 차이가 있음이 보고되었다. 이러한 선행 연구들은 동일 종 내에서도 EPS 생산능이 균주 보유 유전자의 조합 및 클러스터 구성에 따라 크게 달라질 수 있음을 시사하며, 본 연구에서 관찰된 *L. mesenteroides* 균주 간 EPS 생성 차이 역시 유전적 다양성에 기인했을 가능성이 크다고 사료된다. 선별된 8종 균주로부터 crude EPS를 추출하며 투석 및 동결건조 단계 직후 각각 정량하였다(Fig. 2). 투석 후 정량에서는 KFOM0034 균주가 2.48 g/L로 가장 높은 값을 보였으나 KFOM0089 균주에서 2.47 g/L가 도출되어 EPS 생산량 차이가

명확하지 않았다. 반면, 동결건조된 시료의 정량 결과, KFOM0089 균주가 0.66 g/L로 가장 높은 EPS 생산량을 나타냈고 KFOM0106 균주 및 KFOM0034 균주가 각각 0.61 g/L, 0.59 g/L로 뒤를 이었다. 투석 단계는 배지 유래 오염물질, 염류, 저분자 탄수화물 및 단백질을 제거하여 EPS의 순도를 높이기 위한 필수 과정이지만 용액 내 잔류 수분이 포함되어 있어 투석 직후 정량 결과로는 EPS 생산량 비교에 어려움이 있다(Yadav *et al.*, 2024). 동결건조는 투석 후 남아 있는 잔류 수분을 제거하여 순수 EPS 분획만을 측정하게 해 주는 핵심 단계로, 선행 연구에서 동결건조된 EPS 분말 내 수분함량이 3.38% 수준까지 감소하였다고 보고된 바 있다(Tian *et al.*, 2025). 따라서 본 연구에서는 수분 및 저분자 오염 성분의 영향을 최대한 배제한 생산량 비교를 위해 투석 후 동결건조된 시료의 정량 값을 기준으로 균주 간 EPS 생성능을 평가하였다.

이어서 KFOM0089 균주는 6종의 당(sucrose, glucose, fructose, maltose, lactose, galactose)을 10%(w/v) 첨가한 MRS 한천배지에서 탄소원별 EPS 생산능을 비교하였다(Fig. 3). 그 결과, 점액성 집락은 sucrose 조건에서만 형성되어, 해당 균주는 sucrose 특이적인 EPS 생합성 경로를 가지는 것으로 판단된다. 이는 일반적으로 *L. mesenteroides*가 생합성하는 EPS가 sucrose 기반 glucan 계열인 점과 일치한다(Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

### 유전체 assembly 품질 평가

KFOM0089 균주의 유전적 특성을 확인하기 위해 전장 유전체 분

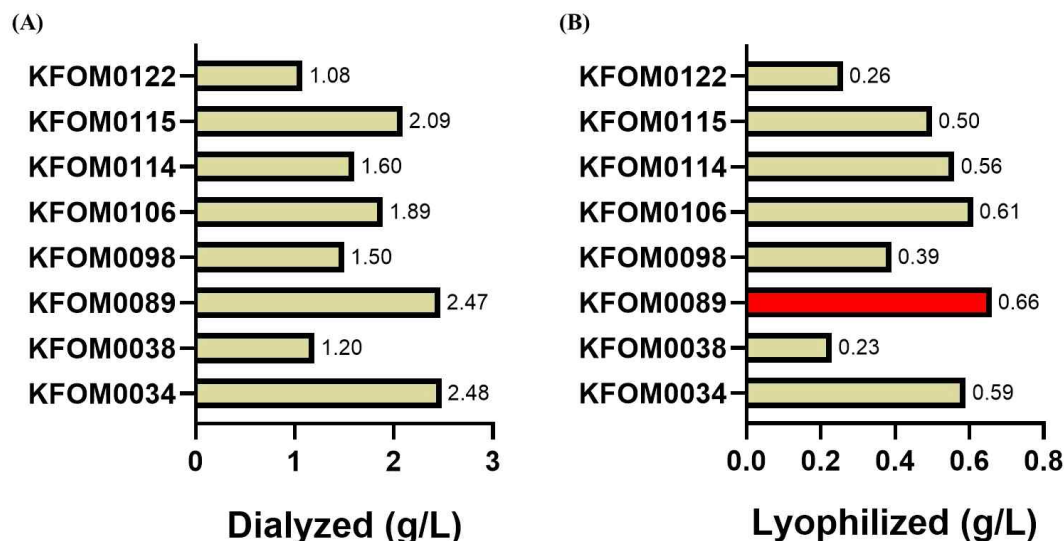
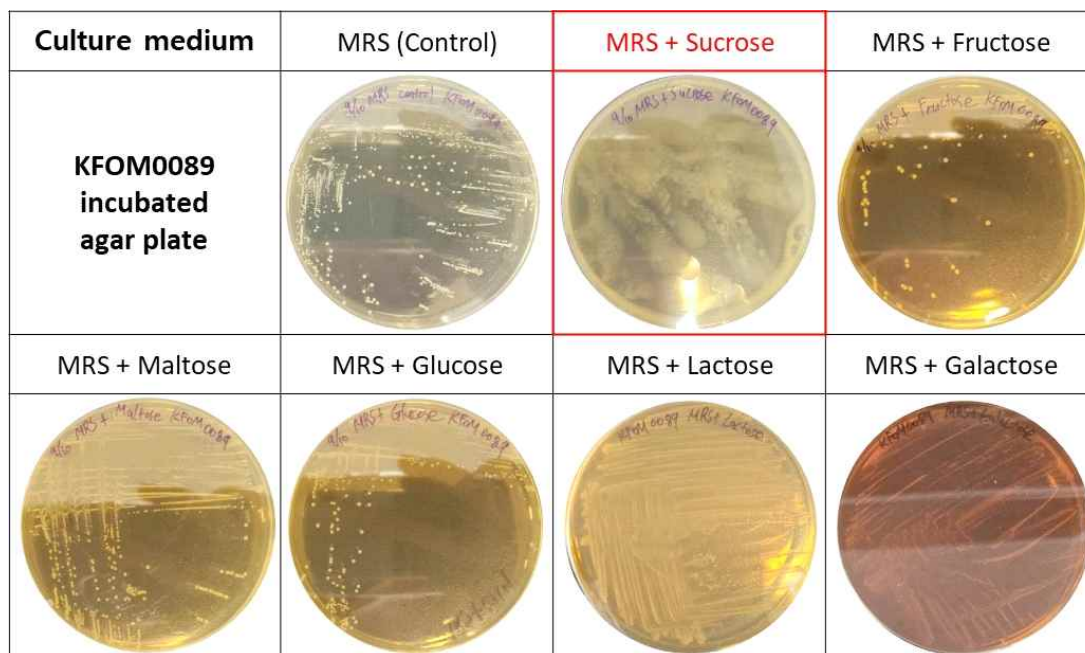


Fig. 2. Crude EPS quantification of 8 EPS-producing strains after (A) dialysis and (B) lyophilization, expressed as the grams of yield per volume of culture broth used. Yield values (g/L) are shown at the end of each bar.



**Fig. 3.** Screening of EPS production by *L. mesenteroides* KFOM0089 on MRS agar supplemented with different carbon sources (from top left to right: control, sucrose, fructose, maltose, glucose, lactose and galactose). Plate forming mucoid colonies is highlighted in red.

석을 수행하였다. 전장 유전체 데이터는 Flye를 이용해 assembly 하였으며, QUAST 및 BUSCO를 통해 assembly 품질을 평가하였다. 총 assembly 길이는 2,034,897 bp였으며, 3개의 contig로 구성되어 높은 연속성을 나타냈다. N50 값은 1,977,497 bp로, 대부분의 염색체가 하나의 연속된 contig로 assembly되었음을 보여주었다. 평균 GC 함량은 37.63%였고, 식별 가능한 N<sup>o</sup> 갭은 존재하지 않았다. BUSCO 분석 결과, 351/367(95.6%)개의 complete 유전자가 회수되었으며(single-copy: 349, duplicate: 2), 2개의 조각화된 유전자와 14개의 결손 유전자가 확인되었다. 이는 KFOM0089 균주의 높은 assembly 품질을 시사한다.

### 유전체 annotation

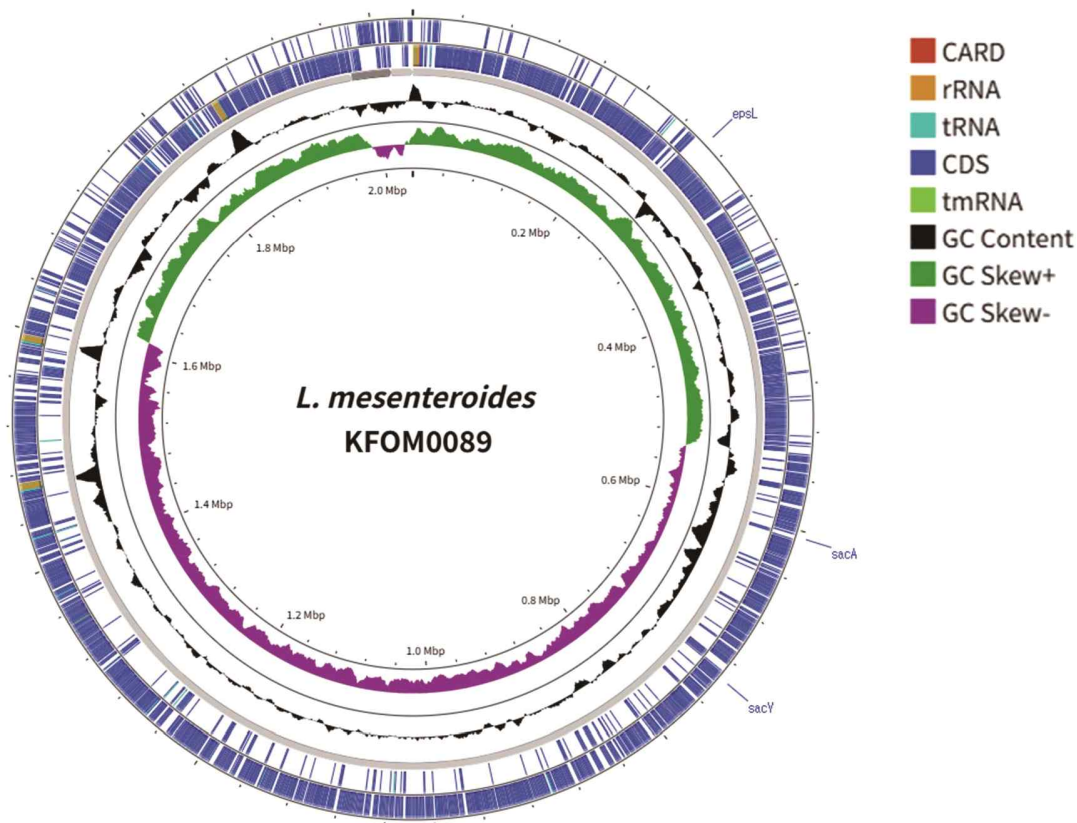
Prokka annotation 결과에 기반한 KFOM0089 균주의 전장 유전체 서열을 나타냈다(Fig. 4). 1,998개의 단백질 코딩 서열(CDS), 12개의 rRNA 유전자, 71개의 tRNA 유전자, 1개의 tmRNA가 확인되었으며, 플라스미드는 발견되지 않았다.

KFOM0089의 탄수화물 활성효소를 CAZy 데이터베이스 기반으로 분류한 결과, 다섯 개의 주요 classes(GH, GT, PL, CE, CBM)에 속하는 다양한 family가 확인되었으며(Table 2), 특히 GH70과 GH68 family에 속하는 유전자가 각각 2개씩 검출되었다. 이 중 GH70 family는 sucrose로부터 dextran을 비롯한 다양한  $\alpha$ -글

루칸을 합성하거나 다형성의 가지(branching) 구조를 형성하는 glucansucrase 계열 효소가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(Meng *et al.*, 2016). 또한 GH68 family는 일부 *L. mesenteroides* 균주(S81, NTM048)에서 levansucrase로 기능하며 levan 합성을 담당하는 것으로 알려져 있다(Ishida *et al.*, 2016; Taylan *et al.*, 2019). 이전 연구에서는 균주 간 GH68 유전자 copy 수 차이가 EPS 생산량 차이를 유발할 수 있음이 제시된 바 있으며(Fernandez de Ullivarri *et al.*, 2025), 이는 GH68과 GH70 family 유전자의 존재가 본 연구에서 KFOM0089 균주가 가장 높은 EPS 생산량을 보인 결과를 설명하는 유전적 요인일 가능성을 나타낸다.

기능적 범주 분석을 위해 COG 데이터베이스에 기반한 분류를 수행하였다(Fig. 5A). KFOM0089의 COG 분포 분석 결과, carbohydrate transport and metabolism (G) 카테고리에 150 개의 유전자가 속하였다. 이는 본 균주가 다양한 당 대사 경로를 보유하고 있으며, 특히 sucrose 대사와 연관된 기초적인 대사 기반을 갖추었음을 시사한다. 또한 cell wall/membrane/envelope biogenesis (M) 카테고리에는 95개의 유전자가 분류되었는데, 이 중에는 glycosyltransferase 계열 효소가 포함되어 있다. 이러한 glycosyltransferase 기반의 막 연관 생합성 기작은 EPS의 체외 배출과 cell-surface assembly에 필수적 요소로 알려져 있어





**Fig. 4.** Circular genome plot of *L. mesenteroides* KFOM0089. From the outer to the inner ring represents the CDS (with the inner ring representing the forward strand and the outer ring representing the reverse strand), RNA, GC content and GC skew.

(Soumya and Nampoothiri, 2021), 본 균주가 EPS 중합뿐만 아니라 세포의 분비 과정과도 연관될 가능성을 뒷받침한다.

KEGG 데이터베이스 기반 기능 매핑을 통해 KFOM0089 균주의 대사 네트워크를 파악하여 이후 EPS 생합성에 관여하는 유전자군의 기능적 역할을 해석하고자 하였다(Fig. 5B). KO (KEGG Orthology) 수준에서 확인된 유전자들은 대사, 신호전달, 유전정보 처리 등 다양한 경로에 분포하였으며, 특히 탄수화물 대사(carbohydrate metabolism) 관련 경로에 126개의 유전자가 매핑되었다. KFOM0089 균주는 sucrose 외 탄소원에서는 점액성 집락을 형성하지 않기 때문에 starch and sucrose metabolism 경로를 집중적으로 분석하였다(Fig. 5C). KFOM0089 균주는 sucrose로부터 glucose와 fructose를 유도하거나, 다양한  $\alpha$ - 및  $\beta$ -glucan의 합성·분해에 참여하는 반응 단계가 확인되었다. 이 중 EPS 생합성 경로에 포함되는 glucansucrase (EC 2.4.1.5)와 levansucrase (EC 2.4.1.10)의 유전자가 모두 확인되었으며, 이를 토대로 sucrose를 기질로 본 균주가 생산하는 EPS의 잠재적 유형을 dextran 혹은 levan으로 예측할 수 있었다. 또한 경로 전

반에는 glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate 등의 중심 대사 중간체 형성 단계에 대응하는 여러 효소 유전자도 포함되어 있어, sucrose 유래 탄소 흐름이 기본적인 해당 과정(glycolysis) 및 탄수화물 관련 보조 대사 경로로 연결될 수 있는 구조가 제시되었다. 추가로, sucrose 외 당원을 기질로 사용하는 EPS 합성 경로는 확인되지 않아 KFOM0089 균주는 sucrose 기질 특이적인 EPS 생합성 경로를 가지는 것으로 사료된다.

AntiSMASH 분석을 통해 KFOM0089 균주 유전체 내 EPS 생합성 관련 유전자 클러스터의 존재 여부를 평가한 결과, HePS 클러스터(MiBiG accession: BGC0000765.3)와 유사한 영역이 검출되었으나 상동성은 매우 낮게 나타났다(Fig. 5D). 또한 sucrose 기반 EPS 합성 경로 외의 대안적 EPS 생합성 가능성을 확인하고자 해당 유전자 클러스터를 대상으로 MiBiG 데이터베이스에 등록된 다양한 EPS 생합성 유전자 클러스터와 synteny 분석을 수행하였다(Table 3). 그 결과, 어떠한 클러스터와도 구조적 유사성이 검출되지 않았는데, 이는 KFOM0089 균주의 EPS 생합성 관련 유전자 클러스터가 기존에 알려진 HePS 생합성 유전자 클러스터와 기능

**Table 2.** Classification of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) identified in *L. mesenteroides* KFOM0089 into 5 CAZy classes (GH, GT, CE, PL, CBM) and their corresponding families and gene counts

| CAZy classes                      | Families | Number of genes |
|-----------------------------------|----------|-----------------|
| GT (Glycoside transferase)        | GT2      | 1               |
|                                   | GT4      | 16              |
|                                   | GT8      | 1               |
|                                   | GT28     | 2               |
|                                   | GT30     | 1               |
|                                   | GT32     | 1               |
|                                   | GT47     | 1               |
|                                   | GT51     | 1               |
|                                   | GT58     | 1               |
|                                   | GT83     | 15              |
|                                   | GT111    | 1               |
|                                   | GT113    | 1               |
| GH (Glycoside hydrolase)          | GH0      | 2               |
|                                   | GH1      | 6               |
|                                   | GH2      | 1               |
|                                   | GH3      | 2               |
|                                   | GH5      | 2               |
|                                   | GH8      | 1               |
|                                   | GH13     | 15              |
|                                   | GH23     | 2               |
|                                   | GH25     | 4               |
|                                   | GH28     | 2               |
|                                   | GH32     | 5               |
|                                   | GH36     | 1               |
|                                   | GH38     | 1               |
|                                   | GH42     | 3               |
|                                   | GH43     | 1               |
|                                   | GH65     | 2               |
|                                   | GH68     | 2               |
|                                   | GH70     | 2               |
|                                   | GH73     | 2               |
|                                   | GH84     | 1               |
|                                   | GH91     | 1               |
|                                   | GH92     | 1               |
|                                   | GH130    | 1               |
| CE (Carbohydrate esterase)        | CE4      | 1               |
|                                   | CE9      | 1               |
|                                   | CE12     | 1               |
| CBM (Carbohydrate-binding module) | CBM48    | 1               |
|                                   | CBM50    | 10              |

이 구분됨을 시사한다.

HePS는 일반적으로 Wzx/Wzy-dependent 또는 ABC-transporter-dependent 경로를 통해 세포 내에서 단당류 구조가 중합되는 방식으로 알려져 있다(Schmid *et al.*, 2015). 본 연구의 CAZyme 및 KEGG annotation 결과와 종합하였을 때 KFOM0089 균주에서는 다중 EPS 합성 및 수송에 기여하는 전형적인 HePS 클러스터 구성 요소가 명확히 확인되지 않았으나, glucansucrase(GH70) 및 levansucrase(GH68)와 같이 sucrose를 기질로 HoPS를 생성하는 데 관여하는 효소 유전자는 명확히 annotation되었다. 이는 KFOM0089 균주가 전형적인 Wzx/Wzy 또는 ABC-transporter 의존 경로를 통한 HePS 합성보다는 단일 sucrose 기반 경로를 통해 HoPS를 생성할 가능성이 높음을 시사한다.

추가로, KFOM0089 균주의 CARD 및 VFDB 상동성 분석 결과, 항생제 내성 유전자와 병원성 관련 인자는 확인되지 않아 유전적 안전성을 확보하였다.

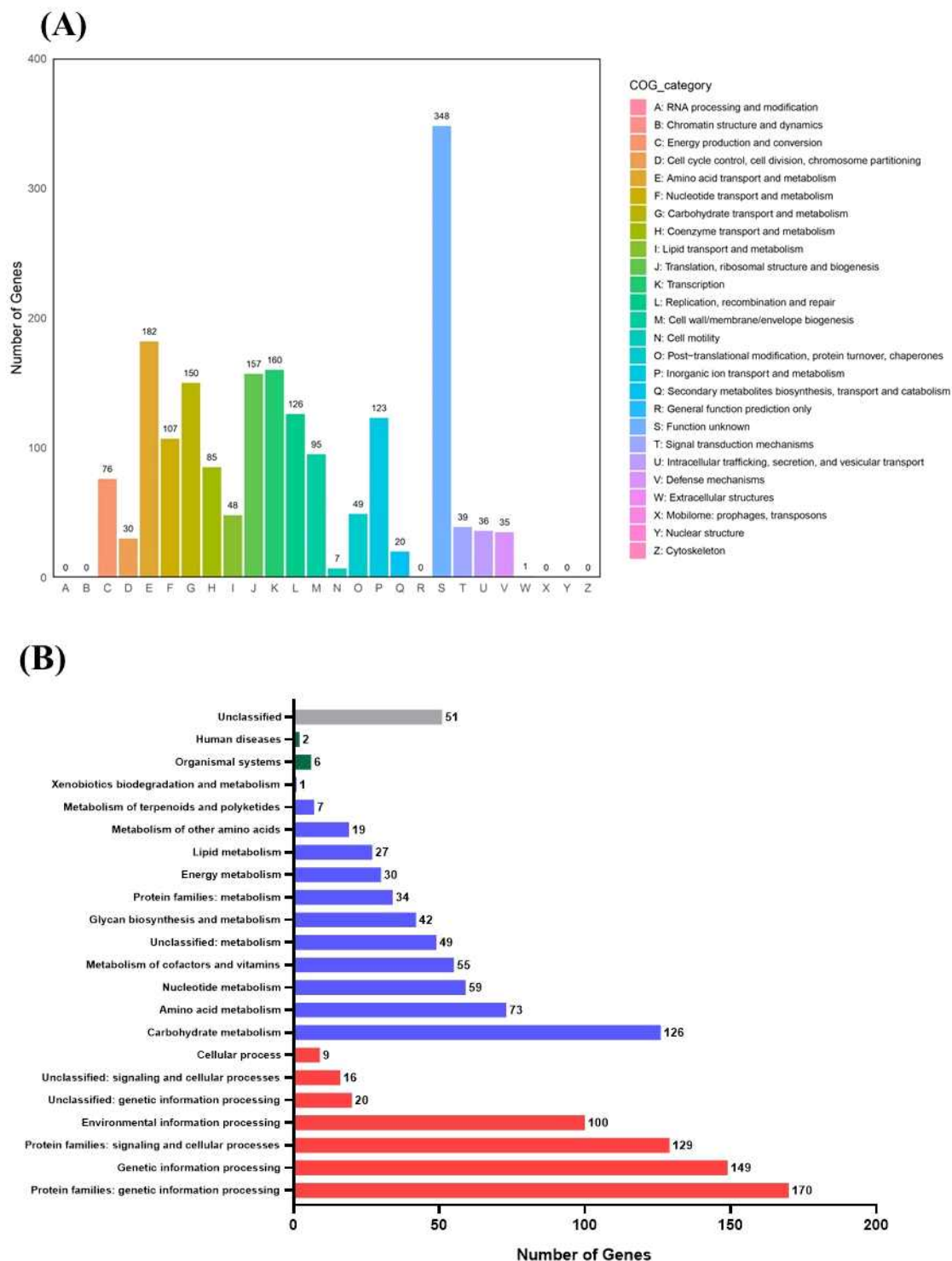
## 비교유전체 분석

KFOM0089 균주와 NCBI의 *L. mesenteroides* RefSeq 균주 278개를 대상으로 ANI 분석을 수행하였다(Fig. 6A). 세균 종 수준 분류의 ANI 기준치는 96% 이상으로 제시된 바 있다(Ciufo *et al.*, 2018). 본 연구에서 전체 ANI 값은 97.32-99.88% 범위에 분포하였으며, KFOM0089 균주는 모든 *L. mesenteroides* 균주와 96%를 상회하는 값을 보여 본 균주가 명확히 *L. mesenteroides* 종에 속함을 확인하였다.

KFOM0089의 유전체적 특징을 균주 수준에서 보다 명확히 평가하기 위해 ANI 상위 5개 균주를 대상으로 Roary 기반 판게놈 분석을 수행하였다(Fig. 6B). 6개 균주 전체에서 총 1,669개의 core gene이 확인되었으며, 각 균주별로 36-138개의 strain-specific unique gene이 존재하였다. 특히 KFOM0089는 83개의 unique gene을 보유하여, 가장 가까운 근연 균주들과 비교하더라도 독립적인 유전적 구성을 갖고 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 KFOM0089이 *L. mesenteroides* 종 내에서 고유한 유전체적 특징을 지닌 신규 균주임을 뒷받침한다.

본 연구에서 분석한 *L. mesenteroides* KFOM0089의 전장 유전체 서열은 NCBI GenBank database에 등록하였으며(GenBank accession number: JBTOLN000000000), 해당 유전체 assembly에 사용된 원시 시퀀싱 데이터 및 샘플 정보는 NCBI Sequence Read Archive (SRA)에 등록하였다(BioProject accession number: PRJNA1402674).

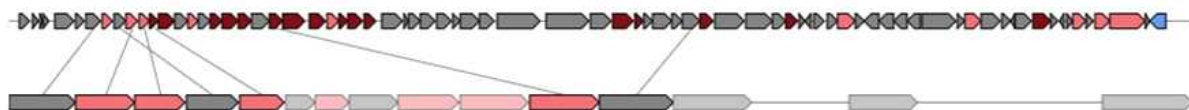




**Fig. 5.** Functional annotation of *L. mesenteroides* KFOM0089, summarizing the distribution of genes across major functional categories based on (A) COG classification and (B) KEGG database. (C) KEGG pathway map of starch and sucrose metabolism from this strain. (D) AntiSMASH prediction of the putative EPS biosynthetic gene cluster in KFOM0089.



KFOM0089: 254,315 - 337,870 nt



BGC0000765.3: 457-18,083 nt

**Fig. 5. Continued**

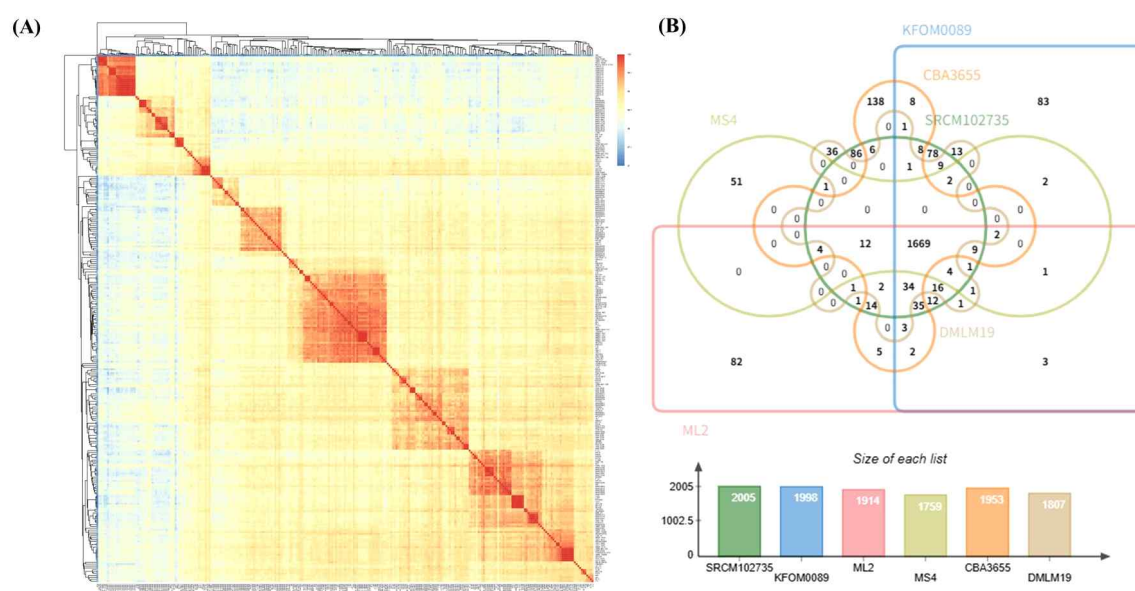
본 연구는 EPS 생산능이 우수한 유산균을 발굴하고, 선별된 균주의 EPS 생산 특성을 유전체적으로 규명하고자 수행되었다. 총 27개의 유산균 균주에 대해 sucrose 조건에서 EPS 생산능을 스크리닝한 결과, *L. mesenteroides* KFOM0089 균주가 가장 높은 EPS 생산능을 보였다. KFOM0089 균주는 sucrose 조건에서만 EPS를 생산하여 sucrose 의존적 경로를 통해 EPS를 합성함을 확인하였다. 전장 유전체 분석 및 기능 유전자 annotation 결과, sucrose 대사와

EPS 생성에 연관된 유전자가 확인되었으나, 일반적인 heteropolysaccharide 생합성에 관여하는 Wzx/Wzy-dependent pathway나 ABC transporter-dependent pathway의 대표적 유전자 클러스터는 검출되지 않았다. CAZyme 및 KEGG annotation과 MIBiG 데이터베이스 기반 synteny 분석 결과, KFOM0089 균주는 sucrose 기반 extracellular synthesis 경로를 통해 HoPS를 생성할 가능성이 높은 것으로 판단된다. 더불어, 항생제 내성 및 병원성 관련 유전자가 확인되지 않아 잠재적 프로바이오틱 균주로서의 안전성도 확인되었다.

**Table 3.** Gene list used for comparative synteny analysis between KFOM0089 and EPS biosynthesis gene clusters deposited in the MIBiG database

| No.             | Accession    | Main product                | Size (nt) | Source                                    |
|-----------------|--------------|-----------------------------|-----------|-------------------------------------------|
| Q <sup>1)</sup> |              |                             | 83,556    | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFOM0089 |
| 1               | BGC0001894.2 | Heteropolysaccharide (HePS) | 30,297    | <i>Lactobacillus plantarum</i>            |
| 2               | BGC0000764.3 | Exopolysaccharide           | 16,963    | <i>Lactococcus lactis</i>                 |
| 3               | BGC0000765.3 | Exopolysaccharide           | 22,198    | <i>Lactobacillus johnsonii</i>            |
| 4               | BGC0000803.3 | Exopolysaccharide           | 19,797    | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG         |
| 5               | BGC0000761.5 | Exopolysaccharide           | 28,120    | <i>Methylobacillus</i> sp. 12S            |
| 6               | BGC0000762.3 | Exopolysaccharide           | 20,766    | <i>Rhizobium leguminosarum</i>            |
| 7               | BGC0000729.3 | Capsular polysaccharide     | 19,233    | <i>Klebsiella pneumoniae</i>              |
| 8               | BGC0000742.3 | Capsular polysaccharide     | 2,815     | <i>Streptococcus agalactiae</i>           |

1) query.

**Fig. 6.** (A) Heatmap showing the whole-genome average nucleotide identity (ANI) comparison of 279 *L. mesenteroides* strains, including KFOM0089. (B) Roary-based pangenome analysis of KFOM0089 and its 5 closest strains based on ANI, revealing core and strain-specific gene distribution.

종합적으로, *L. mesenteroides* KFOM0089는 우수한 세포외다당류(EPS) 생산능을 갖춘 신규 균주로서, 점도 및 물성 안정화가 요구되는 발효식품의 보조 스타터뿐만 아니라 화장품 제형 안정화를 위한 기능성 소재 생산 균주로 활용될 잠재성이 높다. 또한, 향후 발효 조건의 최적화와 EPS의 구조적·기능적 특성 규명을 통해 본 균주 유래 EPS를 활용한 기능성 바이오 소재 개발의 기반을 구

축할 수 있을 것으로 기대된다.

## References

- Ciufo S, Kannan S, Sharma S, Badretin A, Clark K, Turner S, Brover S, Schoch CL, Kimchi A, and



- DiCuccio M (2018) Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**(7), 2386–2392.
2. Dimopoulou M, Vuillemin M, Campbell-Sills H, Lucas PM, Ballestra P, Miot-Sertier C, Favier M, Coulon J, Moine V, Doco T, Roques M, Williams P, Petrel M, Gontier E, Moulis C, Remaud-Simeon M, and Dols-Lafargue M (2014) Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PLoS one.* **9**, e98898.
3. Doo H, Kwak J, Keum GB, Ryu S, Choi Y, Kang J, Kim H, Chae Y, Kim S, Kim HB, and Lee JH (2024) Lactic acid bacteria in Asian fermented foods and their beneficial roles in human health. *Food Sci. Biotechnol.* **33**(9), 2021–2033.
4. Fernandez de Ullivarri M, Buttner C, Wijman J, Heintz E, Ross P, McCusker MP, and Hill C (2025) Cold induced expression of a novel levansucrase gene sacB1 enhances exopolysaccharide production and stress resilience in *Leuconostoc mesenteroides*. *Sci. Rep.* **15**, 22980.
5. Ishida R, Sakaguchi K, Matsuzaki C, Katoh T, Ishida N, Yamamoto K, and Hisa K (2016) Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 produces a levan exopolysaccharide with immunomodulating activity. *Biotechnol. Lett.* **38**(4), 681–687.
6. Kang MJ, Jeong H, Kim S, Shin J, Song Y, Lee BH, Park HG, Lee TH, Jiang HH, Han YS, Lee BG, Lee HJ, Park MJ, and Park YS (2023a) Structural analysis and prebiotic activity of exopolysaccharide produced by probiotic strain *Bifidobacterium bifidum* EPS DA-LAIM. *Food Sci. Biotechnol.* **32**, 517–529.
7. Kang YJ, Kim TJ, Kim MJ, Yoo JY, and Kim JH (2023b) Isolation of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from pa-kimchi and characterization of exopolysaccharides. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **51**(2), 157–166.
8. Li H, Jin Y, Li H, Zhao J, Stanton C, Ross RP, Chen W, and Yang B (2025) Understanding exopolysaccharides from lactic acid bacteria: synthesis, functions, and applications. *J. Agric. Food Chem.* **73**(36), 22110–22132.
9. Liang S, Wang X, Li C, and Liu L (2024) Biological activity of lactic acid bacteria exopolysaccharides and their applications in the food and pharmaceutical industries. *Foods.* **13**(11), 1621.
10. Liu Z, Zhang Z, Qiu L, Zhang F, Xu X, Wei H, and Tao X (2017) Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J. Dairy Sci.* **100**(9), 6895–6905.
11. Lynch KM, Zannini E, Coffey A, and Arendt EK (2018) Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**(1), 155–176.
12. Ma W, Liu X, Jing Y, Zhang M, Zhang X, Wang C, Khan MZ, and Zhu M (2025) *Weissella*: From beneficial probiotics to opportunistic pathogens—a review. *Nutrients.* **17**(19), 3162.
13. Meng X, Gangoiti J, Bai Y, Pijning T, Van Leeuwen SS, and Dijkhuizen L (2016) Structure-function relationships of family GH70 glucansucrase and 4, 6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**(14), 2681–2706.
14. Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, and Vandamme EJ (2005) *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**(8), 845–860.
15. Pourjafar H, Ansari F, Sadeghi A, Samakhah SA, and Jafari SM (2023) Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides: isolation, characterization, and applications in the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63**(26), 8194–8225.
16. Rana S and Upadhyay LSB (2020) Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **157**, 577–583.
17. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, and Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides



- produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**(2-3), 163-171.
18. Santos C, Raymundo A, Moreira JB, and Prista C (2025) Exploring the potential of lactic acid bacteria fermentation as a clean label alternative for use in yogurt production. *Appl. Sci.* **15**(5), 2686.
  19. Sarwat F, Qader SAU, Aman A, and Ahmed N (2008) Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.* **4**(6), 379-386.
  20. Schmid J, Sieber V, and Rehm B (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* **6**, 496.
  21. Soumya MP and Nampoothiri KM (2021) An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* **184**, 1014-1025.
  22. Taylan O, Yilmaz MT, and Dertli E (2019) Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **136**, 436-444.
  23. Tian T, Wan B, Xiong Y, Wang H, An Y, Gao R, Liu P, Zhang M, Miao L, and Liao W (2025) Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide from *Acetilactobacillus jinshanensis* BJ01 in *Baijiu* fermentation grains. *Foods*. **14**(13), 2162.
  24. Yadav MK, Song JH, Vasquez R, Lee JS, Kim IH, and Kang DK (2024) Methods for detection, extraction, purification, and characterization of exopolysaccharides of lactic acid bacteria-A systematic review. *Foods*. **13**(22), 3687.
  25. Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Sugimori C, Nambu T, Obata N, Walker CB, Leung KP, and Fukushima H (2011) Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms. *BMC Infect. Dis.* **11**(1), 228.
  26. Zhao X, Liang Q, Song X, and Zhang Y (2023) Whole genome sequence of *Lactiplantibacillus plantarum* MC5 and comparative analysis of eps gene clusters. *Front. Microbiol.* **14**, 1146566.