Kor. J. Food Hygiene 5 (1, 2), 27-34 (1990)

유산균이 생성하는 細胞外 다당류의 최적 생성조건에 관한 연구

姜國熙 · 丁厚吉

성균관대학교 낙농학과

Study on the Optimum Cultural Conditions for the Production of Extracellular Polysaccharide by Lactic Acid Bacteria

Kang, K.H. and H.K. Jeong

Department of Dairy Science Sung Kyun Kwan University Suwon 440-746, Korea

ABSTRACT-As a link in the studies on the extracellular polysaccharide by lactic acid bacteria, the experiment was conducted to investigate the viscosity variations of 10% reconstituted skim milk and optimum cultural conditions for the production of extracellular polysaccharide.

1. **The viscosity of 10% reconstituted skim milk cultured by *Str. thermophilus* 510 reached 5,000 CP at 41°C and on 5 days. Because it was the highest value among the microorganisms tested, *Str. thermophilus* 510 was chosen as a main test microoganism and studied on factors affecting maximum viscosity depending upon production of exopolysaccharide.**
2. **Absorbance of synthetic culture medium was highest at 41°C. Sucrose, in a member of carbohydrates, was the most effective carbon source for the production of exopolysaccharide within 5% concentration.**
3. **The production of exopplysaccharide was stimulated by Mg^{++}.**

keywords□ Lactic acid bacteria, Polysaccharide, Production

미생물이 생성하는 다당류에 관한 광범위한 연구는 1950년대 후반기부터 1960년대 초기에 이르는 동안 NRRL(Northern Regional Research Laboratory)에 의해서 행하여 졌으며(Jeanes 등, 1954) 지난 30여년에 걸쳐 산업적인 중요성이 크게 신장되었다. 즉, 세포막의 일부로서 존재하는 Intracellular Polysaccharide, 세포벽의 구조적 성분인 Cell-Wall Polysaccharide, 세포벽 외부에 존재하는 Extracellular Polysaccharide 등이다.

Sutherland(1972)는 세포외 다당류를 세포와의 구조적 관계에 따라 Slime, Capsular, Microcapsular의 세 가지 형태로 분류하였는데 총칭하여 Exopolysaccharide라고 하였다. Pace와 Righelato(1984)는 다당류를 편의상 중성 다당류와 산성 다당류로 대별하였으며 구성당과 결합양식에 따라 세분하였다.

한편 Sutherland(1972)는 세균의 세포외 다당류의 생합성의 그의 유전적 조절에 대하여 상세히 설명하였으며 Sidebotham(1974), Rasic과 Kurmann(1978), Kanbe(1981) 등은 다당류를 생합성하는 유산균의 종류와 생성물에 관하여 보고하였다. 또한 미생물이 생성하는 다당류가 Antitumor로서의 활성과 기능을 가지고 있으며 (Whistler 등, 1976)

Received for publication 13 April, 1990
Reprint request; Dr. K.H. Kang at above address

유산균이 생성하는 다당류가 제암효과를 가지며 인체내의 생리효과를 고양, 증진시킨다고 보고되어 있다(Kanbe, 1981 ; Keating, 1985).

위와 같은 견지에서 유산균을 우유에 배양하여 발효유 제품이 가지고 있는 본래의 영양학적, 생리학적, 임상학적 가치의 제고를 도모하고자 유산균이 생합성하는 다당류가 최대로 생성되는 조건을 찾는 것을 실험의 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험균주－실험에 사용한 유산균은 본 실험실에서 냉장보존인 *Str. thermophilus* 510 , *Str. thermophilus* SKD-1005, *Lb. bulgaricus* SKD-0003, *Lb. casei* YIT 9018 등이며 10% 환원멸균 탈지유에 2차계대하여 사용하였다.

생균수 측정－10% 환원멸균 탈지유에 2차계대 균액 1%를 접종, 37℃에서 M-17 Agar Medium(Terzaghi와 Sandine, 1975)에 평판 배양하여 48시간이 경과된 후에 형성된 집락의 수효를 계측하였다.

산도의 측정－유산균의 생육과 다당류의 생성에 연관되는 배양액의 적정산도는 유산 %로 나타내었다.

점도의 측정－세포외 다당류의 생성을 측정하기 위한 방법으로서 Synchro-Lectic Brookfield Viscometer LVF Model을 사용하여 점도를 측정하였다.

점도계의 UL(Ultra-Low) Adaptor에 배양액 60 ml를 계량하여 #3 Spindle로 6 RPM에서 30초 동안 회전시킨 후 그때의 눈금값에 Calibration Factor를 적용하여 겉보기 점도로 환산하였다(Bowles 등, 1955 ; Francis, 1965).

한편 배양액은 25℃로 조정하여 점도 측정시의 온도조건을 균일하게 유지하여 주므로써 온도에 따른 영향을 최소화 하였다(Peeples 등, 1962 ; Nielsen, 1977).

흡광도의 측정－유산균의 생육과 다당류 생성을 위한 인공합성배지로서 Elliker Broth(Elliker 등, 1956 ; Porubcan과 Sellars, 1973 ; Barach, 1979)와 M-17 Broth를 선택, 2차계대 균액 1%를 접종하여 배양하였다. 배양액의 흡광도는 Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter의 Filter 66을 사용하여 측정하였으며 OD(Optical Density) 값으로 환산하였다.

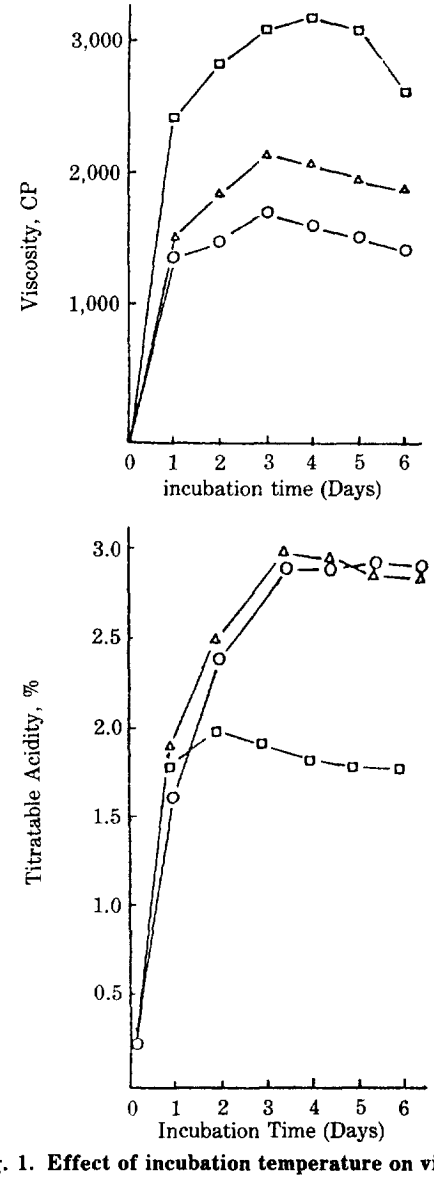

Fig. 1. Effect of incubation temperature on viscosity and acidity of 10% reconstituted skim milk cultured by *Lb. bulgaricus*.
-○- 37°C, -△- 41°C, -□- 45°C

결과 및 고찰

유산균주에 따른 영향－1) *Lb. bulgaricus* : *Lb. bulgaricus*가 다당류를 생합성한다는 사실은 Rasic과 Kurmann(1978), Kanbe(1981) 등에 의하여 보고되었으며 이 다당류는 Glucose, Galactose, Mannose, Arabinose 등의 탄수화물로 구성되어 있음을

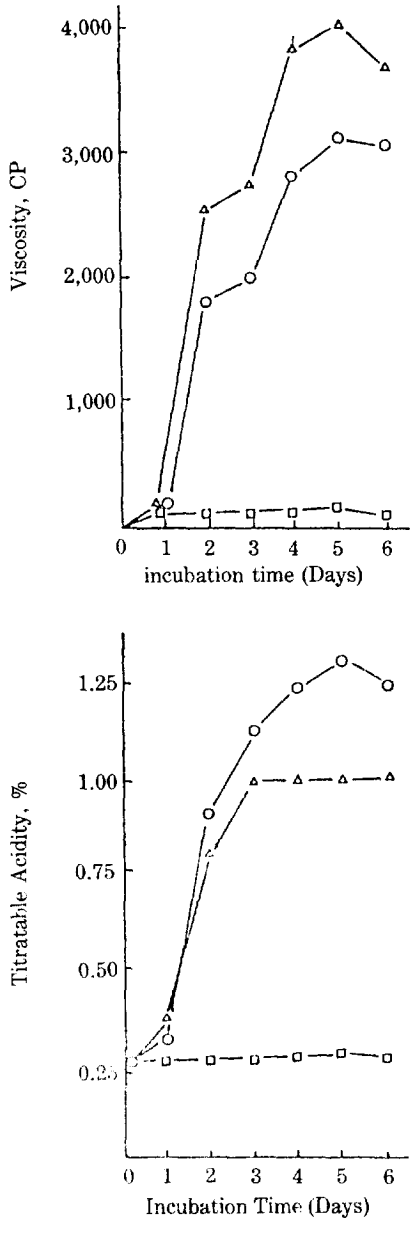

Fig. 2. The viscosity and acidity variations of 10% reconstituted skim milk cultured by *Lb. casei* YIT 9018 according to incubation temperatures.
-○- 37°C, -△- 41°C, -□- 45°C

밝혀졌다.

10% 환원탈지유에 시험균을 배양하면서 점도로서 나타낸 *Lb. bulgaricus*의 다당류 생성 능력을 살펴보면 45℃ 배양에서 4일째에 3,200 CP의 최대점도를 나타냈다. 산 생성력에 있어서는 37℃와 41℃에서 거의 유사한 산도를 가지지만 45℃ 배양의 경우에는 현저하게 낮은 산도값을 나타내었다(그림 1).

이렇듯 최대점도를 나타내는 온도와 최대산도를 나타내는 온도가 상이한 것은 다당류의 생성이 균의 생육과는 무관하게 이루어진다는 사실을 입증하는 것이다.

2) *Lb. casei* : *Lb. casei* YIT 9018이 Dextran을 생합성한다는 사실은 木村 등 (1974)에 의하여 보고되었으며 Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose 등의 탄수화물로 구성되어 있음이 밝혀졌다.

*Lb. casei*의 생육온도에 따른 탈지유 배양액의 점도 변화 양상은 다음과 같다(그림 2). 즉, 41℃에서 배양 5일째에 4,000 CP로서 최대점도를 나타냈다. 반면에 45℃에서는 배양액이 점성을 보이지 않는데 이는 균의 생육과 다당류의 생성이 거의 불가능하다는 것을 의미한다. 한편 산도의 변화를 보면 점도의 경우와 달리 37℃에서 가장 높은 산도를 나타냈다.

3) *Str. thermophilus* : *Str. thermophilus*는 전형적인 우유세균으로서 생육에 있어서 가장 좋은 배지는 우유이다. 따라서 인공합성 배지에서의 생존성이 낮다는 일반적인 특성을 가지고 있는데 Rasic과 Kurmann(1978)은 *Str. thermophilus*를 우유에 배양하면 협막이나 *Slime* 등의 다당류가 생성되어 발효유의 점조도에 매우 중요한 역할을 담당한다고 하였다.

Str. thermophilus 510과 *Str. thermophilus* SKD-1005를 10% 환원탈지유에 41℃로 배양했을 때 5일째에 *Str. thermophilus* 510이 5,000 CP의 최대점도를 나타내어 *Str. thermophilus* SKD-1005보다 약 1,200 CP 정도 더 높았다. 산도에 있어서는 *Str. thermophilus* SKD-1005가 배양 5일째에 최대산도를 나타내어 *Str. thermophilus* 510과 거의 동등한 값을 가지는데 반하여 *Str. thermophilus* 510은 배양 2일째에 최대산도에 이르러 서서히 감소하였다(그림 3).

이러한 형상은 *Str. thermophilus* 510의 생균수가 배양 1일째에 최대에 도달한 다음 4일째까지 10^8 CFU/ml 수준의 균수를 유지한 후 5일째에 급격히 감소하는 것과 유사함을 보여주고 있다(그림 4).

대부분의 경우에 있어서 다당류는 정상적인 대사산물로 생성되며 때로는 주산물이 되기도 한다. 지

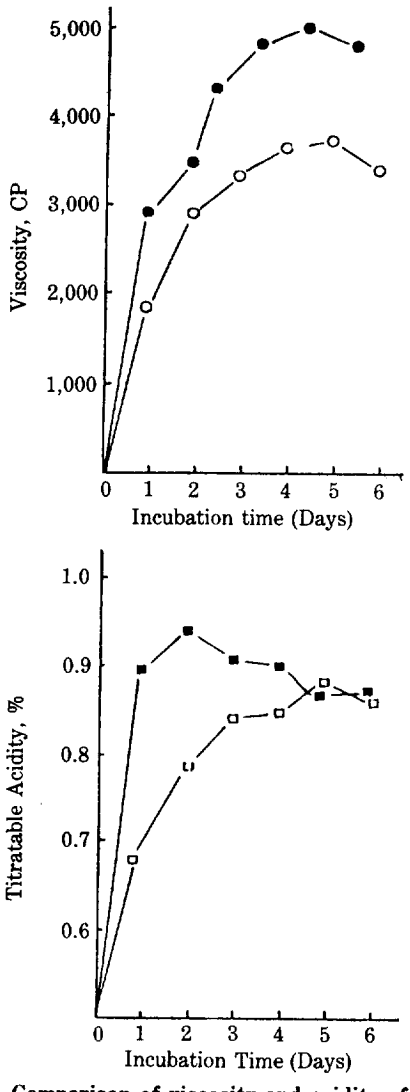

Fig. 3. Comparison of viscosity and acidity of 10% reconstituted skim milk cultured by *Str. thermophilus* 510 and *Str. thermophilus* SKD-1005.
Viscosity -●- *Str. thermophilus* 510
-○- *Str. thermophilus* SKD-1005
Titratable Acidity -■- *Str. thermophilus* 510
-□- *Str. thermophilus* SKD-1005

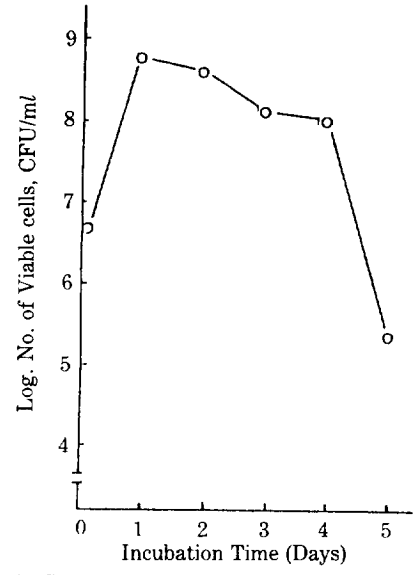

Fig. 4. Growth curve of *Str. thermophilus* 510 in 10% reconstituted skim milk at 37°C.

금까지 밝혀진 바에 의하면 세포외 다당류의 생성은 휴지세포와 연관되어 있음을 알 수 있는데(Slodki와 Cadmus, 1975) 이러한 합성효소의 활성때문에 균의 생육이 중단된 후에는 과량의 탄소원 존재하에서 Biopolymer의 생성이 지속될 수 있게 된다.

즉 세포의 다당류는 균의 생육과 세포분열이 종식된 후에도 계속해서 분비되는 것을 알 수 있다. 다당류가 합성되는 속도는 균체생육의 Exponential Phase에서 가장 빠르며 그 후로 점차 감소하게 된다. 그러나 대부분의 생성은 Exponential Phase 후기에 발생하는데 이는 Exponential Phase 후기에 잔존해 있는 과량의 탄수화물이 Stationary Phase 동안에 다당류의 합성에 이용되는 것으로 생각할 수 있다 (Wilkinson, 1958).

Str. thermophilus 510의 경우 초기생육이 왕성하여 배양 2일째에 최대산도에 이르러 서서히 감소하며 생균수는 배양 1일째에 최대에 도달하여 5일째에 급격히 감소하는 형상을 가지는데 배양액의 점도는 5일째에 최대에 이르게 된다.

따라서 균의 사멸과 더불어 다당류의 생성이 완전해지는 것으로 추론할 수 있다. 한편 최대점도를 나타내는 배양일 이후로 배양액의 점도가 감소하기 시작하는데 이는 주로 Autolysis에 의한 것이며(Jeanes 등, 1948 ; Jeanes 등, 1957) Macura와 Townsley(1984)는 점도가 감소나는 원인이 Extrachromosomal DNA, 즉 Plasmisd의 소실 때문이라고 하였다.

시험균의 최대점도를 비교한 결과 10% 환원 탈지유에 41℃로 배양했을 때 *Str. thermophilus* 510의 배양액이 가장 높은 점도로 나타냈다. 이렇듯 유산균

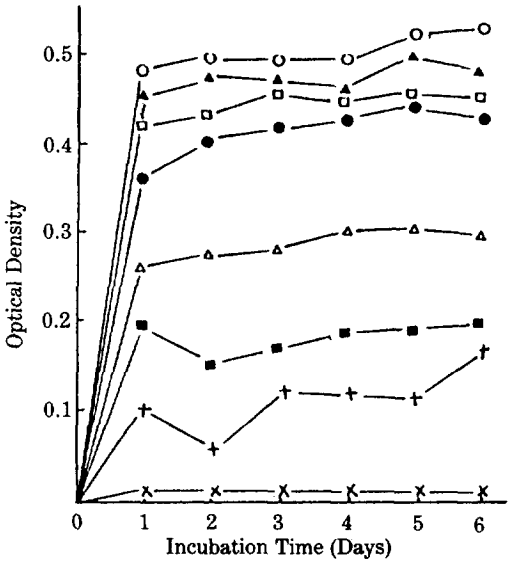

Fig. 5. Effect of substitution of carbohydrate components on absorbance of M-17 broth cultured by *Str. thermophilus* 510.

-●- Control (Lactose 0.5%)
-×- Maltose 0.5%
-△- Glucose 0.5%
-■- Fructose 0.5%
-+- Galactose 0.5%
-▲- Sucrose 0.5%
-○- Sucrose 5.0%
-□- Sucrose 10.0%

배양액의 점도에 상당한 차이가 인정되는 것은 유산균 자체가 지니고 있는 다당류 생성능력의 본래적인 특성·차이에 기인된다. 따라서 *Str. thermophilus* 510을 주 실험균으로 선택하여 다당류의 생성에 따른 최대점도에 영향을 미치는 요인들에 대하여 조사하였다.

생육물질의 영향—탄수화물을 이용하여 세포외 다당류를 생합성하는 방법에는 두 가지 형태가 있다. 하나는 다당류의 생성을 위하여 어떤 특정한 탄소원을 필요로 하는 것이며 다른 하나는 이용가능한 탄수화물로부터 다양하게 다당류를 합성하는 것이다.

따라서 탄소원에 의해서 다당류의 생성량과 종류가 결정되는데 이러한 영향은 대사과정 중 중간산물의 농도차에 기인한다. 왜냐하면 세포외 다당류가 생합성되는 기작은 세포벽이 합성되는 기작과 동일하거나 유사하기 때문이다(Sutherland, 1977).

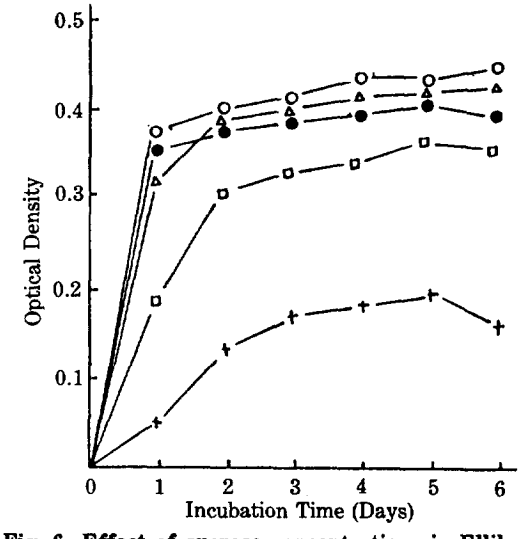

Fig. 6. Effect of sucrose concentrations in Elliker broth cultured by *Str. thermophilus* 510.

-●- Control
-○- 1% Sucrose
-△- 5% Sucrose
-□- 10% Sucrose
-+- 20% Sucrose

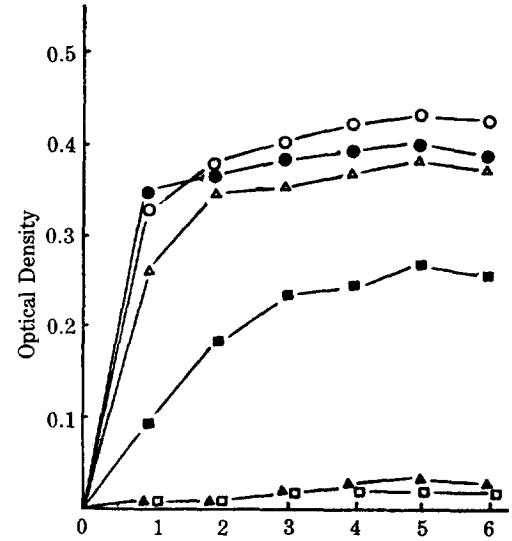

Fig. 7. Effect of metal ions on absorbance of Elliker broth cultured by *Str. thermophilus 510.*

-●- Control
-○- $MgCl_2$, $6H_2O$
-△- $CaCl_2$, anhydrous
-□- EDTA
-▲- $CoCl_2$
-■- $MuCl_2$, $4H_2O$

여러 가지 탄수화물(Hehre, 1951 ; Koepsell과 Tsuchiya, 1952 ; Hehre, 1953 ; Koepsell 등, 1953 ; Tsuchiya 등, 1955 ; Stauffer와 Leeder, 1978 ; Kobayashi 등, 1984)이 Dextran을 생성하는 기질로 사용된다고 보고되어 있으나 다당류를 합성하는 효소가 특이적으로 이용하는 탄소원은 Sucrose이다.

인공합성 액체배지를 사용하여 다당류 합성용 탄소원으로서 탄소화물의 영향을 살펴본 결과는 다음과 같다. 즉, M-17 Broth의 Lactose를 다른 탄수화물로 대체 사용했을 때 Sucrose가 가장 높은 흡광도를 나타내었으며 그 이외의 Glucose, Fructose, Galactose, Maltose 등은 OD값의 현저한 저하현상을 나타냈다(그림 5).

한편 Elliker Broth에서의 경우와 마찬가지로 5% 이내의 Sucrose 농도에서 가장 높은 흡광도를 나타내었는데(그림 6) 이는 Tsuchiya 등(1955), Berkeley 등(1979)의 결과와 일치한다.

금속염의 영향—다당류의 생합성에는 효소가 관여하며 금속염의 영향을 받게 된다. 따라서 각각의 금속염을 0.01%씩 첨가하여 다당류 합성효소의 활성을 촉진시키고(Neeley와 Hallmark, 1961 ; Tsumuraya 등, 1976) 그에 따른 흡광도의 증가 여부를 경시적으로 관찰하였다(그림 7).

Mg^{++}을 첨가했을 때 흡광도의 증가현상을 나타냈는데 이는 Mg^{++}이 Dextran의 합성에 중요한 역할을 담당하기 때문이다.

한편 EDTA를 첨가했을 때 흡광도의 변화가 거의 없는데 EDTA 등의 Chelating Agent는 금속이온과 경쟁적인 억제작용을 하기 때문에 효소로부터 금속이온을 분리하므로써 효소가 Sucrose에 작용할 때 촉매부위의 활성을 감소시키는 역할을 하게 된다.

국문요약

유산균이 생성하는 다당류에 관한 연구의 일환으로서 발효유 제품의 종균으로 널리 사용되고 있는 *Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* 등을 10% 환원멸균 탈지유에 배양하면서 다당류 생성에 따른, 우유 배양액 점도의 경시적 변화 및 다당류의 최적 생성 조건에 대하여 조사하였다.

1. 시험균 중에서 *Str. thermophilus* 510이 가장 높은 점도를 나타냈으며 41℃ 배양 5일째에 5,000 CP로서 다른 균에 비해서 1,000 CP 이상이 높았다.

2. 인공합성배지를 사용하여 흡광도를 측정한 결과 41℃에서의 흡광도가 가장 높았으며 다당류 합성을 위한 탄소원으로서는 Sucrose의 이용성이 1~5% 농도에서 가장 높았다.

3. 다당류 합성효소의 금속염에 대한 영향을 살펴본 결과 Mg^{++}의 효과가 인정되었다.

참고문헌

1. Barach, J.T. Improved enumeration of lactic acid Streptococci on Elliker agar containing phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**(1), 173-174 (1979).
2. Berkeley, R.C.W., G.W. Gooday, and D.C. Ellwood. "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases". p. 9. Academic Press. London, New York and San Francisco. (1979).
3. Bowles, R.L., R.P. Davie, and W.D. Todd. A method for the interpretation of Brookfield viscosities. *Modern Plastics.*, **33**(5), 140-148 (1955).
4. Elliker, D.R., A.W. Anderson, and G. Hannesson. An agar culture medium for lactic acid Streptococci and Lactobacilli. *J. Dariry Sci.*, **39**, 1611-1612 (1956).
5. Francis, P.S. Determination of thixotrophy and pseudoplasticity. *Method. Carbohyd. Chem.*, **5**, 207-211 (1965).
6. Hehre, E.J. The biological synthesis of dextran from dextrins. *J. Biol. Chem.*, **192** 161-174 (1951).
7. Hehre, E.J. Low molecular weight dextran as a modifier of dextran synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **5**, 4866 (1953).
8. Jeanes, A., C.A. Wilham, and J.C. Miers.

Preparation and characterization of dextran from *Leuc. mesenteroides*. *J. Biol. Chem.*, **176**, 603-615 (1948).
9. Jeanes, A., W.C. Haynes, C.A. Wilham, J.C. Rankin, E.H. Melvin, M.J. Austin, J.E. Cluskey, B.E. Fisher, H.M. Tsuchiya and C.E. Rist. Chracterization and classification of dextrans from ninty-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5041-5052 (1954).
10. Jeanes, A., C.A. Wilham, H.M. Tsuchiya, and W.C. Haynes. Properties of dextran isolated from whole cultures at various stages of incubation. *Arch. Biophys.*, **71**, 293-302 (1957).
11. Kanbe, M. Physiological activities of extracellular polysaccharide produced by lactic acid bacteria. *Japanese J. Dairy and Food Sci.* **30**(6), 219-225 (1981).
12. Keating, K. The role of cultured dairy products in the prevention of stomach cancer. *Cultured Dairy Products J.* **20**(2), 13-14 (1985).
13. Kobayashi, M., I. Yokoyama, and K. Matsuda. Activation of dextransucrase from *Leuc. mesenteroides* by the substrate, dextran. *Agr. Biol. Chem.* **48**(1), 221-223 (1984).
14. Koepsell, H.J. and H.M. Tsuchiya. Enzymatic synthesis of dextran. *J. Bacteriol.*, **63**, 293-295 (1952).
15. Koepsell, H.J., H.M. Tsuchiya, N.N. Hellman, A. Kazenko, C.A Hoffman, E.S. Sharpe, and R.W. Jackson. Enzymatic synthetis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.* **200**, 793-801 (1953).
16. Macura, D. and P.M. Townsley. Scandinavian ropy milk-Identification and characterization of endogeneous ropy Lactic Streptococci and their extracellular excretion. *J. Dairy Sci.* **67**, 735-744 (1984).
17. Neely, W.B. and J. Hallmark. Dextransucrase V and the role of metal ions in enzyme catalysis. *Nature* **191**, 385-386 (1961).
18. Nielsen, L.E., "Polymer Rheology", Marcel Dekker, Inc. New York and Basel (1977).
19. Pace, G.W. R.C. and Righelato. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Biochem. Eng.*, **15**, 41-70 (1984).
20. Peeples, J.L., I.A. Gould, C.D. Jones, and W.J. Harper. Forced convection heat transfer characteristics of fluid milk products. *J. Dairy Sci.* **45**, 303-310 (1962).
21. Porubcan, R.S. and R.L. Sellars. Agar medium for differentiation of *L. bulgaricus* from *Str. thermophilus*. *J. Dairy Sci*, **56**(5), 634 (1973).
22. Raisic, J.L. and J.A. Kurmann. "Yoghurt", Technical Dairy Publishing House. Copenhagen, Denmark (1978).
23. Sandford, P.A. Exocellular, microbial polysaccharides. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* **36**, 265-313 (1979).
24. Sidebotham, R.L. Dextrans. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* **30**, 371-444 (1974).
25. Slodki, M.E. and M.C. Cadmus. Production of microbial polysaccharides. *Adv. Appl. Microbiol.* **23**, 19-54 (1975).
26. Stauffer, K.R. and J.G. Leeder. Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation in whey or hydrolyzed whey. *J. Food Sci.* **43**, 756-758 (1978).
27. Sutherland, I.W. Bacterial exopolysaccharide. *Adv. Microbial Physiol.* **8**, 143-213 (1972).
28. Sutherland, I.W. "Surface Carbohydrate of the Prokarytic Cell". p. 27. Academic Press, London (1977).
29. Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. Improved medium for lactic acid Streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, **29**, 807-813 (1975).
30. Tsuchiya, H.M., N.N. Hellman, and H.J. Koepsell. Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 757-758 (1953).
31. Tshchiya, H.M., N.N. Hellman, H.J. Koepsell, T. Corman, C.S. Stringer, S.P. Rogovin, M.O. Bogard, G. Bryant. V.H. Feger, C.A. Hoffman, F.R. Senti, and R.W. Jackson. Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2412-2419 (1955).
32. Tsumuraya, Y., N. Nakamura, and T. Kobayashi. Dextransucrase and the role of

metallic ions in the formation of branch links in dextran synthesis. *Agr. Biol. Chem.* **40**(8), 1471-1477 (1976).

33. Whistler, R.L., A.A. Bushway, P.P. Singh, W. Nakahara, and R. Tokuzen. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, **32**, 235-275 (1976).
34. Wilkinson, J.F. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **22**, 46-73 (1958).
35. 木村義夫, 梅崎良則, 横倉輝男. *L. casei* YIT 9018 (やクルト均) の生産する菌體外多糖類とラ蝕發生に關する 2,3の 檢討. やクルト本社研究所(1974).