

# Bifidobacteria와 유산균에 의해 생산되는 다당류의 특성

허철성 · 이정희 · 백영진 · 김현욱\*

한국야쿠르트 유업(주) 연구소

## I. 서 론

각종 발효유제품의 소비가 세계적으로 증가되는 추세에 있으며 국내시장에서도 소비가 증가되면서 발효유 제품의 다양화와 품질의 고급화 현상이 나타나고 있다.

발효유제품의 품질은 원료유의 조성, 열처리, 균질, 종균의 종류, 배양조건, 첨가되는 안정제의 종류에 의하여 영향을 받는다. 발효유의 견고성을 증진시키기 위하여 충고형분의 증가, 전분, carrageenan, guar gum, pectin, gelatin, sodium caseinate 등의 첨가 또는 점성물질을 생산하는 젖산균을 사용한다. 점성물질은 젖산균과 유단백질을 결합시켜 발효 유제품의 큰 결정인 유청분리 현상을 완화시키고, 점성을 증가 시키며, 점착성(adhesiveness)을 증가시켜서 요구르트의 물성을 향상 시킨다. 젖산균은 단독 또는 혼합배양시에 점성물질을 생산할 수 있으며, 이러한 젖산균을 이용하여 발효유제품은 국내에서도 생산 판매되고 있다. 점성물질을 생산하는 젖산균주를 이용한 발효유제품의 제조는 조직을 부드럽고 진하게 함과 동시에 제조공정중의 pumping, blending, 충전 등의 충격, 온도 및 물리적인 충격에 대하여 물성을 유지 시켜 준다.

점성물질을 이용한 발효 유제품은 scandinavian ropy milk인 viili, langfil, piima, laktofil 등이 있고, 코카서스 지방에서 주로 제조되는 알콜발효유인 kefir 와 상업적인 종균을 이용한 점성 요구르트 등이 있다( Rasic과 Kurmann, 1978). 특히 France,

Denmark, Netherland 등의 유럽국가는 안정제의 첨가를 법적으로 규제하고 있으며 소비자는 첨가물을 기피하기 때문에 발효 유제품 제조에 점성물질을 생성하는 젖산균의 사용이 중요하게 되었다.

발효유제품 제조에 사용되는 점성물질을 생산하는 젖산균은 *L. cremoris* var. *lactis*, *L. cremoris* var. *cremoris*, *L. salivarius* var. *thermophilus*, *L. delbrueckii* var. *bulgaricus*, *L. kefiranofaciens* 등이 있다(Rasic와 Kurmann, 1978).

Bifidobacteria의 점성물질은 1950년 Malyoth와 Bauer가 보고하였으며, Wang 등(1963)은 점성물질은 glucose, galactose, galacturonic acid, 6-deoxytalose로 구성되어 있으며 이 물질을 1969년에 'Bifidan'이라고 명명하였다. 그 후 bifidobacteria의 다당류는 Ohyama(1982)에 의하여 항암효과가 있다고 보고 되었다.

점성물질을 생산하는 bifidobacteria 및 유산균의 종류, 다당류의 종류와 특성, 생성기작, 이용성, 한국 유아의 분변에서 분리한 점성물질을 생산하는 bifidobacteria와 돌연변이 균주의 생리적 특성, 전자현미경적 관찰, 다당류와 요구르트 배양액의 물성학적 특성 등을 논하고자 한다.

## II. 미생물의 다당류

### 1. 미생물이 생산하는 다당류

미생물이 세포벽 밖에 침적시키는 세포체의 다

\*서울대 농생대 동물자원과학과

당류는 미생물의 종류, 생리적 상태에 따라 다양하며, 점성물질 형태로 배지 속에 분비되거나 세포벽이나 막과 연결된 capsule 형태로 생산된다. 분비된 체외 다당류는 한천배지나 액체배지에서 점성을 가진다. 지금까지 알려진 다당류 생성 박테리아는 *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Methylobacter*, *Chromobacterium*, *Alkaligenes*, *Aureobasidium*, *Sclerotium*, *Erwinia*, 젖산균등이 있으며, dextran, alginate, xanthan, gellan, pullulan, levan 등의 미생물 다당류가 산업적으로 이용되고 있다.

Dextran은 *L. mesenteroides*와 *L. dextranicum*에 의하여 생산되며, 생산균주, 기질, 배양조건에 따라 구조와 분자량에 차이가 있으며 식품, 화장품, 제약분야에서 사용된다. Xanthan gum은 *Xanthomonas*에 의하여 생산되며 온도, pH, 전해질 농도의 변화에도 점성이 거의 변하지 않는 우수한 물성학적인 특성을 가지고 있으며 식품 및 화학공업에서 각종 첨가제로 사용된다. *Aureobasidium pullulans*, *Azotobacter pullulans*에 의하여 생산되는 pullulan은 접착제, 각종 구조물, 코팅, 필름 등에 사용된다. *Streptococcus*가 생산하는 hyaluronic acid는 안과 수술용 viscosurgery 및 류마치스 치료용 윤활제로 사용되며, *Pseudomonas elodea*가 생산하는 gellan gum은 hetero다당으로서 미생물 및 식물조직 배양과 식품첨가제에 사용되고 있다. *Aspergillus terreus*가 생산하는 당단백질인 mutastein은 충치균인 *S. mutans*의 glycosyltransferase를 저해하여 치석 형성 저해제로서 사용된다. 또한 wellan, rhamsan도 안정제, 현탁제로 사용되고 있다.

진공포장 억제제가 점성물질을 생성하는 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*에 의하여 변패되기도 하며 제빵산업에서는 *Bacillus* spp., 염지용액에서 그람 양성, 호기성, oxidase 양성의 간균이, 주류산업에서는 *Leuconostoc*이 점성을 형성하는 변패를 일으키기도 한다.

미생물이 생산하는 다당류는 폐수처리시

sludge처리, 발효공업에서 균체 회수, 생분해성 천연 소재, 봉합사, 윤활제, 보습제, oil 산업, 사진 film, microcapsule 등으로 이용되고 있다.

## 2. 다당류의 기능

### 가. 에너지원

미생물이 다당류를 합성하는 것은 자연환경에서 생존을 위한 기능이라고 주장하고 있다 (Dudman, 1977).

미생물로부터 capsule이나 slime을 물리적, 효소적 방법, mutagenesis에 의한 돌연변이로 제거하였을 때 미생물의 성장에는 영향이 없었으며, 계속 배양할 경우 다당류를 다시 생산하거나 다당을 생산하지 못하는 변이주가 쉽게 나타난다. 미생물은 영양소가 부족할 경우 세포내에 저장된 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, glycogen을 에너지원으로 사용한다. 그러나 세포의 다당류는 에너지원으로서의 기능 보다는 환경의 변화에 대한 보호작용이 주된 기능으로 인정된다.

점성물질생성 미생물은 일반적으로 자신이 생산한 다당류를 이용할 수 없으나, *S. pyogenes*는 자체의 capsule을 hyaluronidase로 분해한다. 그러나 폐수와 같은 혼합배양 상태에서 *Xanthomonas campestris*, *Arthrobacter viscosus*는 성장을 위해 체외다당류를 이용하며, 바다에서 분리한 *Pseudomonas*는 *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*의 체외다당류를 에너지원으로 이용하였다(Dudman, 1977).

### 나. 숙주 방어체계 보호

Capsule 형성은 phagocytosis에 대한 저항성을 증가시킨다. 다당류를 생성하는 병원성 미생물이 인체를 침입할 때 다당류는 lysozyme을 불활성화시킨다. Capsule을 형성하는 미생물은 친수성이 커서 neutrophile의 식작용에 대한 저항성이 높다 (Dudman, 1977).

Capsule은 amoeba, protozoa의 식작용을 억제한다. 이들은 Gram 음성균을 양성균보다 쉽게 공격하며 Gram 음성균이 capsule을 더 많이 생성하는 경향이 있다(Dudman, 1977).

토양미생물은 다당류를 많이 생성 하며 건조에 대한 보호작용을 한다. 고체 표면에 부착하여 이온의 흡수기능은 토양미생물이 생성하는 다당류의 uronic acid와 ketal의 유리 carboxylic acid group의 기능에 기인하고 있다(Sutherland, 1972).

Capsule 용적의 약 90%가 수분이기 때문에 수분의 급격한 소실 또는 건조 상태에서 수분을 유지시키며, 단백질구조 속의 물분자가 다당류와 수소결합을 하여 단백질 구조의 변성을 방지한다. 미생물이 고체표면에 부착하여 다당류를 생성함으로써 거대분자를 분해, 흡수할 수 있게 하여 준다.

#### 다. 인지기능

공과식물이 생산하는 lectin은 *Rhizobium*이 생산하는 다당류를 인지하여 공생이 가능한가를 판별한다(Dudman, 1977). Tifolin A 라는 lectin은 생장과정중 또는 변이주에서 생성되는 다당류의 구성 성분 중에 한 가지 단당류의 변화도 인지한다.

#### 라. Bacteriophage 흡착

Capsule을 형성하는 미생물은 세포표면의 흡착부를 capsule 또는 slime이 피복함으로써 미생물이 bacteriophage에 대하여 저항성을 갖게 한다. Capsule이 있는 미생물을 용해하는 phage는 다당류에 대한 1차 흡착부위와 세포벽에 대한 2차 흡착부위의 2개의 흡착부위를 인지할 수 있어야 한다.

Sozzi 등(1978)은 점성 물질을 생성하는 *S. lactis*의 phage를 분리하여 점성물질만을 용해하는 phage와 점성물질과 숙주를 모두 용해하는 phage 두 종류를 보고하였다. 점성물질과 숙주에 모두 흡착할 경우 미생물은 사멸하고, 점성물질만을 용

해할 경우는 점성물질 생산능력만 소실하였다.

Lim 등(1991)은 phage가 흡착하는 *L. casei* S-1을 phage가 흡착하지 않는 *L. casei* LM-1균주로 돌연변이시켜 두 균주간에 생장, pH 변화, 당이용성 차이가 없었으나 돌연변이 균주의 세포벽 외부에 capsule이 형성되어 phage흡착을 방해한다고 하였다.

세포주위의 capsule 또는 slime층은 400 nm의 두께이고 이 두께는 8~10개의 bacteriophage 직경에 해당된다. Bacteriophage가 다당류를 인지하여 흡착하고 bacteriophage 꼬리는 glycan strand를 따라 움직이면서 bacteriophage의 base plate의 spike에 있는 endoglycosidase를 활성화시켜 bacteriophage 머리가 들어간다. Nucleic acid는 숙주 세포벽의 다른 흡착부위를 통하여 미생물내로 주입된다. 이 model은 적어도 2 개의 receptor가 필요하다. 즉 tail spike와 다당 사이의 효소작용 부위 그리고 세포벽과 막에 연결된 인지 부위이다.

### 3. 다당류의 종류와 구조

미생물의 다당류는 세포내, 세포벽, 세포외에 위치할 수 있다. 세포내의 다당류는 에너지 저장 물질로서 poly- $\beta$ -hydroxybutylate나 glycogen등이 있으며 세포벽 다당류는 세포벽의 구성 성분인 Gram 음성균의 lipopolysaccharide, 효모의  $\beta$ -glycan과 같은 성분이다. 세포외의 다당류는 세포벽 주위에 capsule을 형성하거나 세포벽 외부에 slime 형태로서 존재하는 미생물의 1차 또는 2차 대사산물이다.

다당류는 생합성기작과 구성성분에 따라 homopolysaccharide와 heteropolysaccharide의 2종류로 구분할 수 있으며, homopolysaccharide는 glucose, fructose 등의 한 종류의 단당류으로 구성된 다당류이며, heteropolysaccharide는 2-4종의 단당류로 구성되어 있다. 이 다당류는 acyl 또는 다른 기를 가지고 있고 직선형, 가지형으로 구분되

고 있다.

가. Homopolysaccharide

Dextran은 *S. viridans*, *S. mutans*, *L. mesenteroides*와 *L. dextranicum*과 같은 미생물에 의하여 합성되는 glucose만으로 이루어진  $\alpha$ -1.6결합의 기본 구조에  $\alpha$ -1.3결합의 가지를 가지는 다당류이다.

Levan은  $\alpha$ -2.6 결합을 가지는 fructose만으로 만들어진 homopolysaccharide이고 분자량은 1백만 이상이며 *Bacillus* spp., *S. salivarius*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*와 *Acetobacter*등이 생산

한다.

Cellulose는 *Acetobacter xylinum* 등에 의해 생산되며  $\beta$ -1.4결합을 가지는 glucose로 구성된 다당류이다.

Polysialic acid는 *E. coli*, *Neisseria meningitidis*에 의해 생산되는 N-acetylneuramic acid를 가지는 다당류이고, Glucan은 *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobia*, *E. coli*에 의해서 생성되는  $\beta$ -1.2결합을 가지는 glucose만으로 이루어진 다당류이다.

Table 1에 각종 homopolysaccharide의 구조와 생장 미생물을 정리하였다.

Table 1. Homopolysaccharides produced by several microorganisms (Pace, 1980)

Common name	Repeating unit	Microorganisms
Cellulose	- Glc- $\beta$ (1 → 4)Glc -	<i>Acetobacter</i> spp.
Curdlan	- Glc- $\beta$ (1 → 3)Glc -	<i>Agrobacterium</i>
Dextran	- Glc- $\alpha$ (1 → 6)Glc - Some 1 → 2, 1 → 3, and 1 → 4 linkages	<i>Acetobacter</i> spp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Glucan	- Glc- $\beta$ (1 → 2)Glc -	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Levan	- Fru 2 → 6 Fru	<i>Bacillus</i> spp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Pullulan	→ 6 {Glc- $\alpha$ (1 → 4)Glc- $\alpha$ (1 → 4)Glc} 1 →	<i>Pullularia pullulans</i>
Sceroglucan	- Glc- $\beta$ (1 → 3)Glc - 6 $\beta$ ↓ Glc	<i>Sclerotium glaucanum</i>

나. Heteropolysaccharide

미생물에 의하여 생산되는 다당류의 대부분이 heteropolysaccharide로서 3-4종 또는 그 이상의 단당류로 구성되며, 규칙적인 반복구조를 가지고 있다.

대부분의 다당류를 구성하는 단당류는 glucose, galactose, mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucuronic acid 등이며, acetyl, succinyl, pyruvyl 결

합을 하여 음전하를 띠고 있다.

Table 2에 heteropolysaccharide의 구조와 미생물을 요약 정리하였다.

4. 다당류의 합성

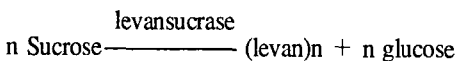
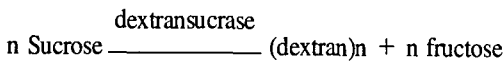
가. Homopolysaccharide

Homopolysaccharide의 대부분은 미생물이 분비

Table 2. Heteropolysaccharides produced by several microorganisms (Pace, 1980)

Common name	Repeating unit	Microorganisms
Alginate	- 4D - ManUA $\beta(1 \rightarrow 4)D$ - ManUA 1-;	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>
	- 4L - GlcUA $\alpha(1 \rightarrow 4)L$ - GlcUA	
Phosphomannan	O 	<i>Hansenula capsulata</i> <i>Hansenula holstii</i>
	→ 4(Man) <sub>n</sub> 1-O-P-O-	
Xanthan	O 	<i>Xanthomonas campestris</i>
	- Glc- $\beta(1 \rightarrow 4)Glc$ -	
	3	
	↑ $\alpha$	
	1	
	Man 6-OAc	
	2	
	↑ $\beta$	
	1	
	GlcA	
4		
↑ $\beta$		
1		
Man 4, 6-O Pyruvate		

하는 효소에 의하여 합성되며, levan과 dextran의 생합성 과정은 다음과 같다.



이 다당류들은 전구 물질인 sucrose 또는 oligonucleotide의 glycosyl부분을 glycosyltransferase에 의해 비환원말단기로 전이시켜 합성된다.

#### 나. Heteropolysaccharide

다당류를 생산하는 경로는 세포질에서 전구물질의 생산, 지질중간 대사산물에 의한 중합 또는 가지형성, 세포체외로 분비과정을 거치며 Gram 양성, 음성균 간에 약간의 차이가 있다(Whitfield, 1988).

Nucleotide diphosphate sugar 또는 nucleotide

monophosphate sugar가 glycosyl donor로 쓰이고 전구물질의 합성은 세포질 또는 세포막에서 glycosyl transferase가 중합기능을 한다.

미생물의 다당류 합성에는 적어도 6개의 효소들이 관여하며 체외 다당류의 생합성에 isoprenoid glycosyl carrier lipid가 관여하며 당을 차례로 이동시켜 반복구조를 형성한다. 관여하는 지질은 undecaprenol phosphate(C<sub>55</sub>-P)로서 반복구조의 형성, 소수성 세포막에서의 친수성 올리고당의 용해, 세포막 통과, lipid이용성의 제한에 의한 다당류 생성여부 결정등의 역할을 한다. Acetyl CoA와 phosphoenolpyruvate는 acetate와 pyruvate의 전구물질로서 지질 중간대사물이 이들을 다당류의 기본 구조에 부가시킨다.

### Ⅲ. 젖산균 및 bifidobacteria의 다당류

## 1. 점성물질생산 젖산균을 이용한 발효유제품

Slime 생성 젖산균은 오래 전부터 발효유에 이용되어 왔다. 즉 중온성 lactococci로 제조되는 nordic ropy 발효유제품인 tatnjolk, langmjolk, pitkapiima, langfil, taettemelk, viili, piima, filmjolk, laktofil 등과 유청분리방지, 조직의 개선을 위한 요구르트, kefir등이 있다. 이러한 제품에 사용되는 균주로서 *L. lactis*, *L. cremoris*, *L. lactis* var. *taette* 또는 *L. cremoris* var. *hollandicus*등이 보고되고 있다(Rasic and Kurmann, 1978).

점성물질 생성균주는 kefir의 제조에도 이용되고 있으며, kefir는 알콜을 포함한 코카서스지방의 발효유로서, kefir grain은 5~20 mm정도의 직경을 가지는 연한 황색의 포도송이형태의 끈적이는 물질이다. *L. brevis*와 *Leuconostoc sp.* 등의 젖산균과 5~10%의 효모가 kefir제조에 이용되고 있으며, 수용성 다당류에 의해 뭉쳐진 덩어리인 grain은 회수 건조하여 다시 kefir제조에 사용되고 있다.

Finland의 viili, Sweden의 langfil, Norway의 taette 등은 점성물질 생성균주인 *L. lactis* var. *cremoris*, *L. lactis* var. *lactis*를 사용하여 제조되는 점성 발효유제품으로서 점성은 균주들이 생산하는 capsule, 체외 다당류에 의한 것이며, 30℃보다는 17℃에서 점성이 더 강하게 나타난다. Laktofil은 filmjolk보다 더 끈적이는 조직을 가지며, Gradfil은 Scandinavian sour milk로서 *S. lactis*, *S. cremoris*가 점성과 산을 생성하고, *S. diacetyllactis*, *L. citrovorum*이 풍미를 생성한다. Filmjolk도 같은 균주를 사용하는 sour milk이다.

Kefir grain으로부터 점성물질을 생산하는 미생물을 분리하여 *Lactobacillus kefirifaciens*라고 하였고, 점성물질생산 lactobacilli는 30℃가 적정 성장온도이며, 15℃와 45℃에서는 성장하지 않는다.

Toba 등(1990)은 전자현미경과 광학현미경으로 kefir grain을 연구하여 grain에 짧은 간균, 긴 간균,

효모가 공존하며 긴 간균의 capsule에 실모양으로 미생물과 유단백질이 연결되어 있었으며, capsule이 kefir grain의 끈적이는 성질의 원인이라고 보고하였다. 또 그는 grain의 표면에는 짧은 간균, 안쪽에는 끈적이는 섬유상 물질과 효모가 존재한다.

점성물질생산 젖산균인 *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*가 요구르트 제조에 이용되고 있으며, 이 균주들은 점성물질을 생성하지 않는 요구르트 종균과 혼합되어 사용된다. Rasic과 Kurmann(1978)은 이들 균주의 비율을 조정하는 것이 요구르트 제조에 중요하며, 점성물질생산 균주는 우유배양에 끈적거림을 나타내거나 flavor나 aroma의 성분을 포집하는 성질이 있어 정치 요구르트보다는 진탕 요구르트에 적합하다고 하였다. 요구르트 균주는 산생성, aroma 생성, 단백질분해, 점성물질 생성과 다른 종균과의 경쟁력을 고려하여 선발하여야 한다. *S. thermophilus*의 점성물질 생성력은 산생성 능력, 단백질 분해, acetaldehyde생성과는 관련이 없다.

## 2. 점성물질 생성 촉진

젖산균이 생산하는 점성물질은 저온 배양, 생성균주 또는 점성물질을 생성하지 않는 균주와 혼합배양, 높은 pH, 냉동건조, 에너지원의 결핍 등에 의하여 점성물질의 생성이 촉진된다(Rasic과 Kurmann, 1978).

여러 연구자들에 의하면 저온에서의 배양이 점성물질 생성을 촉진한다는 사실이 밝혀졌으며, 이는 저온에서는 미생물의 생장이 늦어져 미생물체의 peptidoglycan, teichoic acid합성이 감소되어 체외 다당류의 생성이 증가되기 때문이라고 주장하였다. 높은 pH에서의 배양은 젖산균 성장중의 대수성장 기간이 연장됨으로써 생균수가 증가되고 결국 다당류의 생성이 많아진다. 높은 pH에서의 배양은 미생물의 정체성장 기간을 연장시키고 따라서 세포벽의 peptidoglycan과 teichoic acid합성이

감소됨으로써 다당류의 생성량이 많아지기도 한다.

점성물질을 생성하는 혼합균주 중에 소량 존재하는 점성물질 생성량이 높은 균주만을 순수분리함으로써 점성물질생성을 증가시킬 수 있고, *L. bulgaricus*나 *S. thermophilus*와 같이 공생효과가 있는 균주는 순수분리하여 단독배양함으로써 성장속도가 늦어지고 따라서 점성물질 생성이 증가될 수 있다.

Piima로부터 분리한 젖산균은 단독배양시 보다 *Geotrichum candidum*과 혼합배양시에 점성물질을 더 많이 생성한다고 보고하였으며 이는 우유표면에 곰팡이가 자라면서 산화환원 전위를 낮추어 주기 때문이다.

영양소의 부족은 성장속도를 지연시켜 배양시간을 증가시키므로써 점성물질 생성을 많게 한다 (Rasic과 Kurmann, 1978). 또한 산 생성이 늦어져서 일어나는 결과로도 해석할 수 있다. Rasic과 Kurmann(1978)은 젖산균을 동결건조를 함으로써 점성물질 생성이 많아진다고 보고하였으며, 이는 동결건조에 의한 활력의 저하로 인하여 산 생성과 생장이 늦어지고 그 결과로써 다당류의 생성이 많아진다고 설명할 수 있다.

### 3. 점성발효유의 전자현미경적, 물성학적 특징

요구르트의 물리적 성질은 원료유의 열처리, 칼슘함량, 유지방, 균질, 안정제, 산 생성, 미생물의 점성물질 분비 등에 의해서 종합적으로 결정된다.

요구르트의 유청분리는 총고형분의 증가, starch, carrageenan, guar gum, pectin, gelatin, sodium caseinate 등을 첨가하여 해결될 수 있다. 그러나 첨가물은 맛, 향, 촉감에 나쁜 영향을 주어 점성물질을 생성하는 종균의 이용이 추천되고 있다. 특히 Netherland, France 등에서는 안정제 첨가가 법적으로 규제되어 있어 점성물질을 생성하는 종균이 이용되고 있다.

요구르트의 물성은 화학적 조성, 가공, 취급, 충전에 의하여 물성이 영향을 받으며, 물성의 변화는 점도나 경도(firmness)로 표시되고 있다. 요구르트 배양액은 단백질과 무지유고형분의 1% 정도의 차이에 의해서도 점도의 차이가 나타난다.

일반적인 유제품의 물성은 시간 의존성이 높아서, pumping과 관의 이송, 냉각, 충전 과정중에 점도의 저하가 발생한다.

전자현미경을 이용한 유제품의 구조는 유단백질, 우유, cream, 유청분말에 관하여 많은 연구가 이루어 졌다. 또한 casein micelle, fat globule, 증점제, 유화제, 안정제, 젖산균 배양액의 전자현미경 관찰에 의해 complex형성, 응집, 망조적형성기작에 대한 많은 연구가 이루어 졌다.

다당류를 생성하는 젖산균의 성질과 전자현미경 연구는 *L. lactis* var. *cremoris*, *S. salivarius* var. *thermophilus*, *L. delbrueckii* var. *bulgaricus*의 우유 배양액에 대하여 이루어 졌다.

점성물질 생성 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*로 제조한 요구르트에 0-220 s<sup>-1</sup> shear rate가 가해질 때는 shear stress가 증가하고, 젖산균, 유단백과 점성물질간에 망 구조를 유지하지만 그 이상 초과할 경우에는 연결 구조가 파괴되어 shear stress가 저하되면서 평형을 유지하였다. 이때 전자현미경으로 망 구조를 관찰하고 유단백과 점성물질간 연결된 힘을 계산한 결과 150 pa이었다 그러나 shear rate가 800 s<sup>-1</sup>이상에서도 파괴된 점성물질 망 구조는 유단백질에 붙어서 덩어리진 형태로 점성에 영향을 주었다. 그러나 점성물질을 생성하지 않는 젖산균으로 제조한 요구르트에서는 유단백질 간의 약간의 연결구조 이외에 그러한 현상은 없었다 (Teggatz 와 Morris, 1990).

Toba 등(1990)은 viii로부터 분리한 *L. lactis* var. *cremoris*와 그 변이주를 전자 현미경 관찰한 결과 유산균과 유단백질이 점성물질로 결합되어 있음을 밝혔고, 점성물질 생산균주가 변이주에 비하여 점착성(adhesiveness)이 높고, 경도(hardness)가 작

았다고 보고하였다. 또한 점성물질 생산 균주는 유청분리를 방지하였으며 이는 여러 보고자에 의해 확인되고 있다.

발효유의 전자현미경 관찰에서 공동(void space or cavities)이 발견되었으며 젖산균의 대부분이 공동에 분포되어 있었다. 이 공동은 젖산의 생성에 의한 수축, 단백질 분해효소에 의한 분해, 젖산균이 생성하는 탄산가스, 시료준비 과정중에 일어나는 현상으로 설명하였다. 그러나 Toba 등(1990)은 단백질 분해효소가 없는 균주의 경우와 탄산가스 미생성균주에 의해서도 공동이 관찰됨을 보고하였다. 또한 시료의 전처리각 없는 동결처리 전자현미경상에도 관찰되는 것으로 보아 산 생성이 젖산균 주위로 부터 생성됨으로써 주위의 유단백질이 수축함으로써 생성될 가능성이 가장 크다.

#### 4. 젖산균 다당류의 구조

젖산균의 다당류 생산과 다당류의 구조에 관한

연구는 북유럽의 ropy milk로부터 시작되었으며 요구르트의 물성개량을 위한 점성물질 생성 균주의 이용이 증가하면서 부터 점성물질에 관한 연구가 활발해졌다.

초기 다당류의 구조 연구는 핀란드와 스웨덴의 ropy milk로부터 *L. lactis longi*의 다당류를 2.8%의 질소를 함유하는 물질로서, 단당류를 검출하지 못하였으나 Sharpe 등(1972)은 점성물질을 생성하는 *Lactobacillus*로 부터 다당류를 분리하여 Glucose만으로 구성된 glucan임을 밝혔으며, dextranase에 의해 분해되는  $\alpha$ -1,6결합을 가지고 있었다고 하였다. La Riviere 등(1967)은 kefir grain으로부터 점성물질을 생성하는 *L. brevis*를 분리하여 이 점성물질은 glucose, galactose가 1:1 비율로 구성되었으며, 질소화합물은 0.1%, 회분은 0.05%였다고 보고하였다.

젖산균이 생산하는 다당류의 구성성분을 요약하면 Table 3, 4와 같다.

Table 3. Properties of polysaccharides produced by *Lactobacillus* spp.

Microorganisms	Components	Molar ratio	Reference
<i>L. brevis</i>	glucose, arabinose		Pidoux <i>et al</i> (1988)
<i>L. bulgaricus</i> CRL420	glucose, fructose		Nanca de Nadra <i>et al</i> (1985)
<i>L. bulgaricus</i>	glucose, galactose, rhamnose	4:1:1	Cerning <i>et al</i> (1986)
<i>L. bulgaricus</i>	glucose, galactose, rhamnose	5:1:1	Gruter <i>et al</i> (1993)
<i>L. casei</i> CG11	glucose, rhamnose	75:15(%)	Kojic <i>et al</i> (1992)
<i>L. casei</i> CG11	glucose, galactose, arabinose, mannose		Cerning <i>et al</i> (1992)
<i>L. casei</i> NCIB4114	glucose, galactose, arabinose		Cerning <i>et al</i> (1992)
<i>L. helveticus</i>	glucose, galactose	1:2	Oda <i>et al</i> (1983)
<i>Lactobacillus</i> (kefir)	glucose, galactose glucose, galactose	1:1	LaRiviere <i>et al</i> (1967) Mukai <i>et al</i> (1988)
<i>L. kefiranofaciens</i>	glucose, galactose	1:1	Toba <i>et al</i> (1986)
<i>L. kefiranofaciens</i>	glucose, galactose	1:0.74~1.09	Toba <i>et al</i> (1987)
<i>L. kefiranofaciens</i> K1	glucose, galactose	0.9:1.1	Mukai <i>et al</i> (1990)
<i>L. kefiranofaciens</i>	glucose, galactose	1:0.88~0.9	Yokoi <i>et al</i> (1990)



Table 4. Properties of polysaccharides produced by *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* spp

Microorganisms	Components	Molar ratio	Reference
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	galactose, glucose, protein	2:1:—	Schellhaass(1983)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	rhamnose, glucose, galactose, phosphorus	1:1.5:1.8	Nakajima <i>et al</i> (1990)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SNT0495	glucose, galactose, rhamnose, phosphate	1.45:1.575:1	Nakajima <i>et al</i> (1990)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	protein, carbohydrate	47:29(%)	Nakajima <i>et al</i> (1990)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> LAPT3001	rhamnose, glucose, galactose, glycerol, phosphorus	0.87:0.68:0.57 0.67:1	Toba <i>et al</i> (1991)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> H414	galactose		Gruter <i>et al</i> (1992)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SBT0495	glucose, galactose, rhamnose phosphate	1.3:1.8:2.1:1	Nakajima <i>et al</i> (1992)
<i>Pediococcus</i> P	D-glucose		Llauberes <i>et al</i> (1990)
<i>S. thermophilus</i>	glucose, galactose, xylose, arabinose, rhamnose, mannose		Cerning <i>et al</i> (1988)
<i>S. thermophilus</i>	glucose, galactose, N-acetylgalactosamine	1:2:0.7	Doco <i>et al</i> (1990)
<i>S. thermophilus</i>	rhamnose, galactose	1:1.47	Ariga <i>et al</i> (1992)

### 5. 점성물질생성과 Plasmid DNA

젖산균의 점성물질 생산은 배양온도에 따라 불안정하며, 이 불안정성은 plasmid DNA와 관련이 있을 것이라고 추측하였다. Vedamuthu와 Neville (1986)는 *L. lactis* var. *cremoris*의 점성물질 생성은 18.5 Mdal plasmid과 관련이 있음을 밝혔고 점성물질 생성 plasmid를 점성물질을 생성하지 않는 lactococci에 전이시킬 수 있었다. Neve 등(1988)은 Sweden sour milk인 langfil, Finland의 viili로부터 *L. lactis* var. *cremoris*를 분리하여 각각 17 Mdal,

30 Mdal의 plasmid가 점성물질 생성에 관련이 있음을 보고하였고 이 plasmid의 제한효소 지도를 작성하였다. von Wright와 Tynkkynen(1987)은 plasmid가 없는 *L. lactis* var. *lactis* MG1614와 viili로부터 분리한 점성물질을 생성하는 *L. lactis* var. *cremoris* ARH87균주의 protoplast 전이에 의한 유당을 이용하지 못하고 점성물질 생성균주를 얻었으며, novobiocin으로 다시 plasmid를 소실시킴으로서 점성물질 생성형질이 30 Mdal plasmid와 직접적으로 관련이 있음을 증명하였고 이 plasmid를 pVSS라 명명하였다.

Vescovo 등(1989)은 *L. delburueckii* var. *bulgaricus* 201과 *L. casei* var. *casei* NCIB 4114의 plasmid DNA를 분리하여, *L. casei*의 경우는 4.5, 2.3 Mdal 의 plasmid가 존재하여 4.5 Mdal plasmid가 점성물질 생성 성질과 관련이 있었으며 *L. bulgaricus*의 경우는 plasmid가 없어 점성물질 생성 성질은 chromosomal DNA에 위치하고 있을 것이라 보고 하였다.

## 6. Bifidobacteria가 생산하는 다당류의 특성

Malyoth와 Baur(1950)는 bifidobacteria의 점성물질이 수분을 잘 흡수하고 공기에 노출되면 점성을 잃어 버리며, chinese ink로 염색하면 capsule을 확인할 수 있었다. Norris 등(1950)은 모유영양아에서 분리한 점성물질을 생성하지 않는 *L. bifidus*의 배양중에 매끄럽고 투명한 점성물질을 생성하는 변이주를 발견하였으며, 액체배지에서 점성이 생성되었다고 보고하였다. 변이주는 모균주와 영양요구성이 같고 혈청응집 반응에서 차이가 있었다. 변이주는 모균주로 다시 전환되지 않았으나 호기 상태에서 *L. parabifidus*와 같은 직선형 간균으로 변화하면서 점성을 잃었다.

그 후 이 다당류가 공기중에서 depolymerization 되어 점성을 잃는 것은 정상적인 다당류가 아니기 때문인지 모른다고 하였으며, pas 염색시에 점성물질을 생성하지 않는 모균주와 점성물질 생성 변이주 모두 균체내에 globule, 다당 덩어리가 나타

났으나 *L. parabifidus*의 경우는 나타나지 않았다. 이 다당류는 glucose를 함유하였다.

Wang 등(1963)은 *L. bifidus*의 다당류를 종이 chromatography, IR분석을 하여 glucose, galactose, galacturonic acid, 6-deoxy-talose로 구성되었다고 하였다. 다당류는 배양액 1 L에서 0.03~0.06 g이 생산되고, 탄소( $39.23 \pm 1.16\%$ ), 수소( $6.1 \pm 0.38\%$ ), 질소( $0.88 \pm 0.042\%$ )로 구성되었으며, 다당류는 물에 난용성이지만 용해시에는 점성이 있는 투명한 용액을 만들었다. 구성성분으로 보고된 nitrogen은 배지에서 오염되었고, fucose는 잘못 분석되었음을 지적하였다. 그들은 1963년에 *L. bifidus*의 다당류를 Bifidan으로 명명하고, 분자량은 200만으로 추정 하였다. Bifidan은 ascorbic acid와 공기중의 산소에 의하여 점도가 감소하고 이 현상은 hydroperoxy radical에 의한 것이라 하였다. 이 현상은 sodium diethyldithiocarbamate와 peroxidase에 의해 억제되었으나,  $H_2O_2$ 에 의하여는 억제되지 않았다.

Ohyama(1982)는 *B. longum*이 생산하는 다당류의 분자량이 2천만 이상으로 추정되며 탄소 38.03%, 수소 6.52%, 질소 0.24% 이었다고 하였다. 또 비선광도가  $112 \pm 5^\circ$  이고 TLC에 의해 glucose, galactose, galacturonic acid, 미확인 성분 등 4개의 성분을 밝혔다. 지금까지 보고된 bifidobacteria가 생성하는 다당류의 구조와 구성성분을 Table 5 에 요약하였다.

Table 5. Properties of polysaccharides produced by *Bifidobacterium* spp

Microorganisms	Components	Reference
<i>L. bifidus</i>	glucose, xylose, uronic acid, unidentified pentose, hexose	Vogel(1952)
<i>L. bifidus</i>	glucose, galactose, fucose, unidentified pentose	Norris et al(1954)
<i>L. bifidus</i>	glucose, galactose, galacturonic acid, 6-deoxy-L-talose	Wang and Norris(1963)
<i>B. bifidum</i>	glucose, xylose, uronic acid, unidentified pentose and hexose	Malyoth and Bauer (1950, 1951)
<i>B. bifidum</i> YIT 4002	glucose, galactose, mannose, rhamnose,	Watanabe et al(1978)
<i>B. longum</i>	glucose, galactose, unidentified 4 components	Ohyama(1982)

## 7. 젖산균 다당류의 항암효과

*Bifidobacteria*의 항종양효과는 세포벽성분 중의 하나인 peptidoglycan이 알려지는 등 젖산균체, 요구르트의 항암효과에 대한 보고는 많으나 capsule 점성물질등의 다당류의 항암효과에 대한 보고는 많지 않았다. Oda 등(1983)은 *L. helveticus* var *jugurti*의 다당류가 glucose와 galactose(2:1)로 구성되어 있으며, S-180복수암을 발생시킨 마우스에 20 mg/kg, 80 mg/kg의 다당류를 복강투여할 경우 각각 144%, 233% 수명 연장효과가 있었으며, 이 다당류는 *in vitro* 시험에서 세포독성이 없었다고 보고하였다. Kitazawa 등(1991b)은 Scandinavian ropy sour milk인 viili로부터 분리한 점성물질 생산 균주인 *L. lactis* var. *cremoris* KVS20의 동결건조 균체와 동결건조 viili를 50 mg/kg 수준으로 피하 접종하였을 때 ICR 쥐의 S-180 복수, 고형암의 억제효과가 있었으나, S-180 암세포에 대하여는 직접적인 암세포 사멸효과를 보여 주지 못하였다. 즉 항암효과가 숙주의 면역성과 관계있음을 시사하였다.

Kitazawa 등(1990)은 Finland와 Iceland에서 ropy sour milk의 소비가 많고 대장암 발생율이 낮음에 착안하여 3종류의 점성발효유인 viili, langfil, ropy yoghurt의 동결건조물을 마우스의 피하에 9일간 투여하여 시험한 결과 암세포 억제효과가 있다고 보고하였다. 3종류의 점성 발효유중 viili는 10 mg/kg, langfil은 50 mg/kg 투여할 경우에 항암효과가 좋았고, 이 항암효과는 carrageenan을 암세포 접종 이전에 투여하여 macrophage, phagocyte system을 억제시키면 없어졌으므로, 항암효과는 숙주의 macrophage와 T cell의 면역계와 연관이 있을 것이라 주장하였다. 그는 동일균주로 부터 capsule slime(CS)을 분리하여, 마우스에 100 mg/kg 수준으로 피하접종할 경우 peritoneal macrophage(PE-MO)의 세포독성이 3일째 급격히 올라가 5일에 최고치에 달한다고 보고하였다(Kitazawa 등 1991a). 또 균

체보다 CS가 M사멸 활성이 높으며 이는 CS가 암세포 억제 요인일 것이라고 하였으며, 이 다당류는 glucose, galactose, rhamnose로 구성된 phosphopolysaccharide였다고 보고하였다.

Shiomi 등(1982)은 젖산균과 효모가 다당에 의해 덩어리진 kefir grain을 뜨거운 물로 추출한 다당류를 경구투여한 결과 마우스에서 S-180, Ehrlich 고형암을 각각 21~81%, 40~49% 억제하였다. 또 피하접종에 의해서도 같은 효과를 보여주었으며 *in vitro* 실험에서는 암세포에 대한 독성효과가 없었다고 보고 하였다. Ohyama(1982)은 *B. longum*이 생산하는 다당류를 11.3 mg/kg~180 mg/kg수준으로 S-180 복수암을 유발시킨 마우스에 복강투여한 결과 수명율이 200~300% 늘어났다고 보고하였다. 젖산균의 항암기작은 명확치 않지만 숙주 매개성이고 세포성 면역계의 활성화에 기인하는 것으로 보고 있다

## IV. 인용문헌

1. Dudman, W. F. 1977. Role of surface polysaccharides in natural environments. in surface carbohydrates of the prokaryotic cell. I. Sutherland, ed. Academic press, New york, N. Y. pp. 357-414.
2. Kitazawa, H., T. Itoh, and T. Yamaguchi. 1991a. Induction of macrophage cytotoxicity slime products produced by encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Anim. Sci. Technol. 62:861-866.
3. Kitazawa, H., T. Toba, T. Itoh, N. Kumano, S. Adachi, and T. Yamaguchi. 1991b. Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from scandinavian ropy sour milk "viili". Anim. Sci. Technol. 62:277-283.
4. Kitazawa, H., T. Toba, T. Itoh, N. Kumano, and

- S. Adachi. 1990. Antitumor activity of ropy sour milks in murine solid tumor. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 61:1033-1039.
5. La Riviere, J. W. M., Kooiman, P., and K. Schmidt. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.* 59:269-278.
  6. Lim, K. S., Y. H. Jang, Y. J. Baek, and H. U. Kim. 1991. Characteristics of the bacteriophage resistant *Lactobacillus casei* LM-1. *Kor. J. Anim. Sci.* 33:730-737.
  7. Malyoth, G. and A. Bauer. 1950. Beobachtungen am *Bacterium bifidum*. *Z. Kinderheilk.* 68:358-367.
  8. Neve, H., A. Geis, and M. Teuber. 1988. Plasmid-encoded functions of ropy lactic acid streptococcal strains from Scandinavian fermented milk. *Biochimie.* 70:437-442.
  9. Norris, R. F., M. de Sipin, F. W. Zilliken, T. S. Harvey, and P. Gyorgy. 1954. Occurrence of mucoid variants of *Lactobacillus bifidus*. Demonstration of extracellular and intracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 67:159-166.
  10. Norris, R. F., T. Flanders, R. M. Tomarelli, and P. Gyorgy. 1950. The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*: A comparison of branched and unbranched strains. *J. Bacteriol.* 60:681-696.
  11. Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, K. Kambe, and F. Tsuchiya. 1983. Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 47:1623-1625.
  12. Ohyama, Y. 1982. Extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium*. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* 31:A258-259.
  13. Rasic, J. L., and J. L. Kurmann. 1978. Yoghurt-scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark.
  14. Sharpe, M. E., Gravie, I. E., and R. H. Tilbury. 1972. Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* 23:389-397.
  15. Shiomi, M., K. Sasaki, M. Murofushi, and K. Aibara. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35:75-80.
  16. Sozzi, T., J. M. Poulin, R. Maret, R. Pousaz. 1978. Isolation and some characteristics of phages of ropy strains of *Streptococcus lactis*. *Michwissenschaft.* 33:349-352.
  17. Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.* 8:143-213.
  18. Teggatz, J. A., and H. A. Morris. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yoghurt during shearing. *Food Microstruc.* 9:133-138.
  19. Toba, T., H. Nakajima, A. Tobitani, and S. Adachi. 1990. Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. *Intl. J. Food Microbiol.* 11:313-320.
  20. Toba, T., K. Arihara, and S. Adachi. 1990. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *Intl. J. Food Microbiol.* 10:219-224.
  21. Vedamuthu, E. R., and J. Neville. 1986. Involvement of a plasmid in production of ropiness(mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:677-682.
  22. Vescovo, M., G. L. Scolari, and V. Bottazzi. 1989. Plasmid encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnol. Lett.* 2:709-712.

23. Wang, M., E. Steers, and R. F. Norris. 1963. Extrapolysaccharide of mucoid *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* 86:898-903.
24. Wang, M., K. C. Tsou, and R. F. Norris. 1969. The depolymerization of "Bifidan", a polysaccharide of *Lactobacillus bifidus*, by ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophysics.* 131:513-520.
25. Whitfield. C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34:415-420.
26. von Wright, A., and S. Tynkkynen. 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* strain with a single plasmid associated mucoid phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1385-1386.