

다양한 배지 환경이 *Lactobacillus paracasei* KLB 58의 Exopolysaccharide (EPS) 생산량에 미치는 영향

이 충 영 · 전 정 민 · 이 해 인 · 김 민 희 · 정 미 경 · † 소 재 성
인하대학교 공과대학 해양과학 생물공학과
(접수 : 2007. 5. 30., 게재승인 : 2007. 12. 4.)

Exopolysaccharide (EPS) Production by *Lactobacillus paracasei* KLB58 in Modified Medium under Different Growth Conditions

Choong-Young Lee, Jeong-Min Jeon, Hae-In Lee, Min Hee Kim, Mi-Kyoung Jung, and Jae-Seong So†
Department of Marine Science and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2007. 5. 30., Accepted : 2007. 12. 4.)

Various probiotic *Lactobacillus spp.* are known to produce exopolysaccharide (EPS) which has potential health promoting functionality. A *Lactobacillus paracasei* strain producing EPS was isolated from healthy human. This strain, named *L. paracasei* KLB58, was grown on modified MRS medium. Experiments were conducted under various growth conditions to optimize the EPS production. Our study showed that incubation temperature played an important role in EPS production. When incubation temperature was changed from 37°C to 25°C, the increase of EPS production (28.1 mg/ml) was the highest in our experiment. The type of carbon source in the medium also affected EPS production. Galactose was the most effective for EPS production among the carbon sources examined. Using galactose, glucose, lactose and sucrose, the amount of released EPS was 38.9 mg/ml, 35.6 mg/ml, 21.76 mg/ml and 16.9 mg/ml, respectively. However, acidity in growth medium inhibited EPS productivity due to the low growth yield. When grown at pH 4, *L. paracasei* KLB58 could only produce EPS of 14.6 mg/ml. When the initial amounts of nitrogen and carbon sources were examined, EPS production was not significantly affected by nitrogen source while carbon source affected considerably.

Key Words : Exopolysaccharide (EPS), *Lactobacillus paracasei* KLB 58

서 론

Probiotic bacteria로 주로 사용되는 균주인 *Lactobacilli*와 *Bifidobacteria*의 일부 균주는 exopolysaccharide (EPS)를 생산한다. EPS를 생산하는 균주의 건강 증진 효과는 biopolymer의 생물학적 활성과 밀접한 관련이 있으며, EPS가 prebiotics 또는 항암, 항레양, 또는 면역조절 기능 등을 가지고 있어 인체내 건강에 기여한다고 보고된 바 있다(2).

특히 EPS 생산 유산균은 식품의 질과 관련되어 식품 산업에서 중요한 균주로 생각되어지고 있다. 식품에 사용되는 많은 유산균은 세포의 다당류 (exopolysaccharide, EPS)를 생산하여

식품의 점도를 증가시키거나, 안정화 그리고 수화 작용을 하는 것으로 알려져 있다(11). 또한 맛과 입안의 감촉을 좋게 하여, 유제품의 품질을 향상시킨다. 예컨대, 치즈 가공과정에 EPS 생산 유산균을 사용하는 경우 수분보존력이 향상되어 저지방 치즈의 품질을 높인다. 뿐만 아니라, 유산균에서 분리된 다당류는 다양한 식품에 천연 첨가제로 사용되어 식품의 안정성, 점성, 분산성, 그리고 교질화 등에 중요한 효과를 제공하며, 동·식물성 식품의 섭취 시 저작에도 중요한 역할을 한다(12). 본 연구에서 사용하는 *Lactobacillus spp.*는 Lactic acid bacteria (LAB)에 속하는 균주 중 하나로 식품의 질과 관련되어 식품 산업에서 중요한 균주이며, LAB가 생산하는 EPS 또한 천연 발효 유제품의 질과 점도를 향상시킬 수 있는 안정된 첨가물로 사용되어 더욱 큰 관심이 되어왔다(11).

유산균의 EPS는 그 이용성이 무궁한 반면 생산성이 적다는 것에 한계가 있어 이를 최대화하는 연구가 수행되어왔고, 보고된 실험결과 다양한 배지 조건과 환경이 EPS 생산에

† Corresponding Author : Department of Marine Science and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7516, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : sjaeseon@inha.ac.kr

영향을 줄 수 있다고 제시된 바 있다(7, 8, 12). 따라서 본 연구에서는 배지 환경에 따른 EPS의 생산성 변화와 EPS 생산에 영향을 미치는 중요한 인자를 찾는 데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험균주 선택

높은 다당 (Exopolysaccharide) 생산성을 가지는 균주를 찾기 위해서 여섯의 질에서 분리된 100개의 유산균을 colony 관찰을 통해 외형상 다당을 많이 생산해 내는 10가지 균을 선택하였다. 이렇게 선별된 균주들로부터 다당류를 조분리한 후 페놀-황산법을 이용하여 정량하였고(3), 높은 생산량을 가진 *Lactobacillus paracasei* KLB 58이 선택되었다.

실험배지

기본적인 EPS 생산을 추적하는 실험에서는 MRS 배지를 사용하였으나, 배지 내 다당이 분리되는 것을 방지하기 위해서 일반적인 MRS 배지의 개선이 필요하였다. 먼저 beef extract (10 g), yeast extract (5 g), bacto tryptose (10 g)는 1 L 증류수에 하루 동안 투석막 (Molecular cut 7000 Da)을 통해서 투석을 실시하여 배지내 고분자 다당 물질을 제거하였고, 증류수에 나머지 성분인 Tween 80 (1 ml), Ammonium citrate (2 g), Sodium acetate (5 g), K₂HPO₄ (2 g)을 첨가하여 투석용 MRS인 실험 배지를 만들었다.

EPS 분리 방법

투석한 실험 배지에 *Lactobacillus paracasei* KLB 58을 1% 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양된 배지를 원심분리 (7000 rpm, 15 min)하여 세포를 제거하고 상등액만 얻었다. 이렇게 얻어진 상등액은 단백질을 제거를 위해 최종 농도 10%가 되도록 trichloroacetic acid를 첨가하였고, 2시간 후에 4℃에서 1시간 동안 정치시켜 원심분리 (8000 rpm, 20 min)를 통해 침전된 단백질을 제거하고 상등액만 취하였다. 이 상등액에 3배 부피의 에탄올을 첨가한 후 -20℃에서 침전시켰다. 침전시킨 상등액을 다시 원심분리 (11,000 rpm, 40 min)를 통해서 EPS 침출물을 얻었다. 이렇게 얻어진 EPS 침출물을 3차 증류수에 녹인 후 투석막 (7000 Da molecular cut)을 이용하여 하루 동안 투석하였다. EPS 침출물이 포함된 투석된 용액을 동결 건조시키고 EPS를 분리하였다.

EPS 정량 방법

분리한 EPS는 페놀-황산법을 이용하여 정량하였다(3). 분리된 EPS 30 μl와 5% phenol 30 μl를 잘 섞어 96 well plate에 분주한 후 황산 100 μl를 빠르게 96 well plate에 넣어준다. 그 후 발색된 정도를 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 EPS 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

pH에 따른 EPS 변화량

배지 내 초기 pH가 EPS 생산량을 변화시키는 요인이 되

는지를 알아보기 위해서 pH 조건을 다음과 같은 조건으로 (pH 7, pH 6, pH 5, pH 4) 준비하였고, 10분 간격으로 시료를 취하여 1시간 동안 EPS 생산량 변화를 관찰하였다 (Fig. 1(A)).

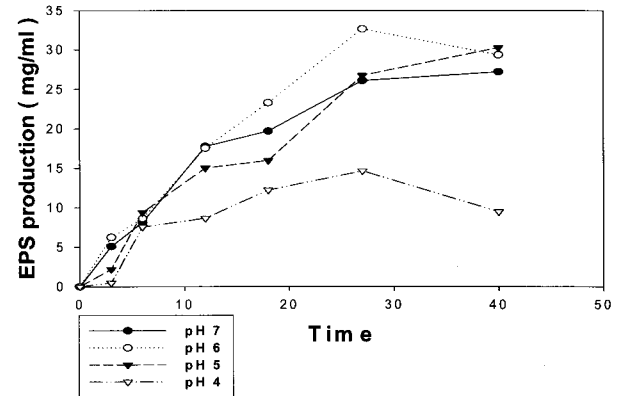


Figure 1(A). Effect of pH on EPS production.

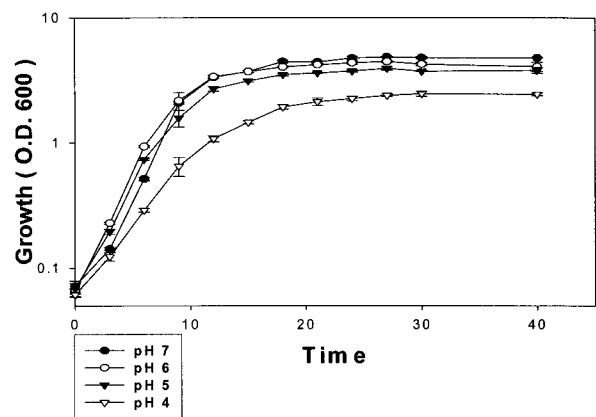


Figure 1(B). Effect of pH on the growth of *L. paracasei* KLB58.

배지 내 초기 pH가 낮을수록 *L. paracasei* KLB 58의 성장속도가 느려졌으며, pH가 4일 때 가장 느려졌다(Fig. 1(B)). EPS 생산량도 pH가 4인 경우 가장 낮았으나, 배지 내 초기 pH가 5일 때 최대 EPS 생산량은 pH 7과 비슷하였고, EPS 생산량은 각각 26.74 mg/ml, 26.08 mg/ml이었다. 그러나 배지 내 초기 pH가 6인 경우 *L. paracasei* KLB58의 최대 성장률은 pH 7일 때보다 낮았지만, EPS 생산량은 pH 6인 경우 배양 시간 10분부터 증가하기 시작하여, 20분 후에는 pH가 7인 경우보다 생산량이 높아졌음을 알 수 있었다. 30분 후 EPS 최대 생산량 (32.64 mg/ml)을 얻을 수 있었고, 서로 다른 pH 조건에서 pH가 6일 때 가장 높은 EPS 생산량을 얻을 수 있었다. EPS 생산을 수율 (EPS 최대 생산량 / 최대 성장률) 측면에서 본다면 pH가 4일 때를 제외하고, pH가 7보다 낮은 모든 배지에서 EPS 생산 수율이 높음을 관찰할 수 있었으며, pH가 6일 때 EPS 생산량과 수율을 높이기 위해 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다. 즉 *L. paracasei* KLB 58인 경우 EPS 생산 수율이 정상조건인 pH가 7일 때보다 산성의 조건에서 높다는 것이 관찰되었다. 산성의 조건은 균의 세포막 형태에 변형을 가져올

수 있으며 이런 물성의 변화가 세포막에 형성되는 EPS 생산량에 변화를 준다고 보고된 바 있다(10).

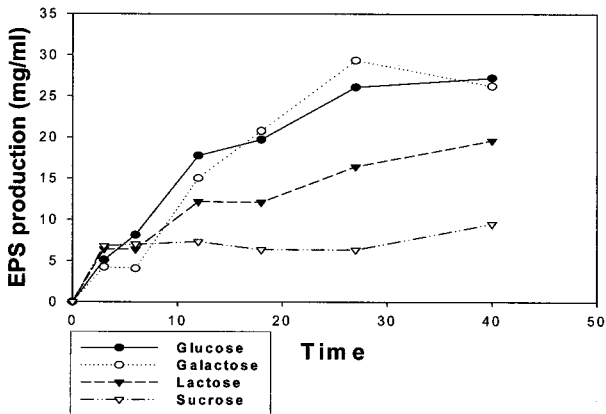


Figure 2(A). Effect of different carbon source on EPS production.

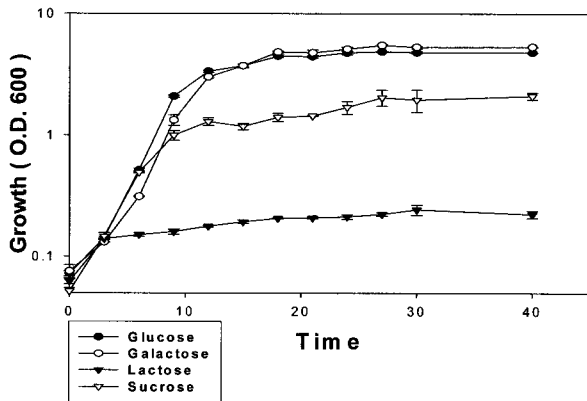


Figure 2(B). Effect of different carbon source on the growth of *L. paracasei* KLB58.

배지 탄소원과 EPS 생산량 변화

초기 탄소원으로 glucose, galactose, sucrose, lactose 4가지를 사용하였다. galactose를 배지 탄소원으로 사용했을 때 균의 성장이 가장 빨랐으며(Fig. 2(B)), EPS 생산량도 29.33 mg/ml로 가장 높았다(Fig. 2(A)). 그러나 이탄당인 sucrose나 lactose를 사용한 경우는 최대 성장률(Fig. 2(A)) 과 EPS 생산량 모두 낮았으나(Fig. 2(B)), lactose는 EPS 생산 수율면에서 다른 어떤 탄소원보다 더 높은 효율을 얻을 수 있었다. 이는 homopolysaccharide 형태의 EPS가 생산될때 나타난다고 보고된 바 있다(11). 또한 homopolysaccharide는 세포막에서 바로 EPS로 전환되고, 탄소원으로 lactose를 이용하는 경우 EPS 함성량이 상대적으로 높다고 알려졌다(9). *L. paracasei* KLB 58 역시 위와 같은 보고를 통해 EPS 생성 메커니즘에 대하여 추론할 수 있었다.

온도와 EPS 생산량 변화

온도는 25°C, 32°C, 37°C 그리고 42°C에서 EPS 생산 변화량을 측정하였다. 온도가 25°C일 때 EPS 생산량은 L당 63.7 mg/ml로 가장 많이 생산되었고, 42°C일 때는 L당 19.9 mg/ml로 가장 낮은 EPS 생산량을 보였다(Fig. 3(A)). EPS

생산량은 온도가 낮아질수록 점차 높아졌다. *L. paracasei* KLB 58은 성장하기에 알맞은 최적 온도가 37°C보다 낮은 32°C에서도 비슷한 성장률을 보였고, 25°C인 경우는 37°C일 때보다는 다소 적지만 거의 비슷한 성장을 보였다. 하지만 42°C일 때는 37°C일 때보다 상대적으로 *L. paracasei* KLB 58의 성장률이 낮았다(Fig. 3(B)). 최근 연구에 따르면 균이 성장하기에 알맞은 최적의 온도보다 낮은 환경에서 EPS 생산이 증가한다는 보고가 되었으며(5, 11), *L. paracasei* KLB58도 이런 경향을 갖고 있는 것을 다음과 같은 그래프를 통하여 알 수 있었다.

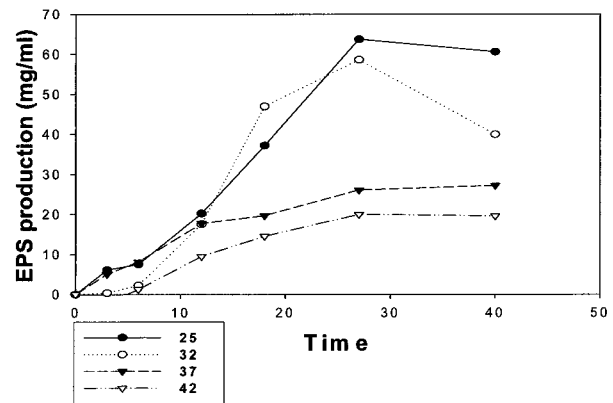


Figure 3(A). Effect of temperature on EPS production.

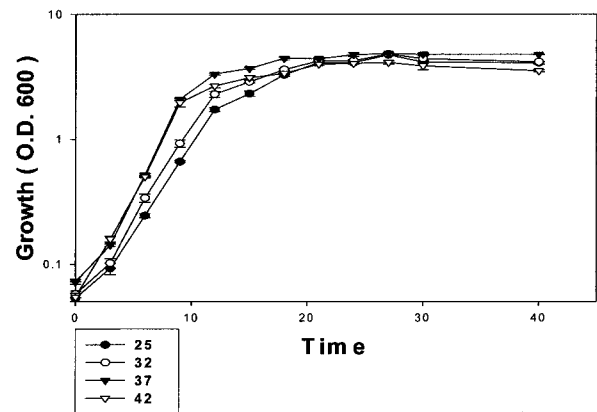


Figure 3(B). Effect of temperature on the growth of *L. paracasei* KLB58.

초기 탄소원 양과 EPS 생산량 변화

배지의 탄소원으로 glucose를 사용하였고, glucose의 양을 최소 20 g/L부터 최대 80 g/L까지 20 g씩 증가시켰을 때 탄소원의 증가에 따른 EPS 생산변화를 관찰하였다. EPS 생산은 glucose를 20 g/L로 사용했을 때보다 다음과 같은 3가지 조건 (40 g/L, 60 g/L, 80 g/L)의 경우에 EPS 생산량이 모두 증가하였으며, 특히 40 g/L로 glucose 사용량을 변화시켰을 때 EPS가 18 mg/ml 이상 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4(A)). 반면에, glucose의 양이 60 g/L인 경우 EPS 생산이 20분까지는 증가하는 경향을 보였으나 시간이 지남에 따라 감소하였고, glucose의 양이 80 g/L인 경우 EPS 생산 증가가 뚜렷이 나타나지 않았다. 이는 EPS 생산

에 적절한 탄소원의 농도가 40 g/L라는 것을 확인할 수 있었다. 탄소원의 증가에 따른 *L. paracasei* KLB 58의 성장 변화를 관찰하였다. glucose양을 20 g/L에서 40 g/L로 증가시켰을 때, *L. paracasei* KLB 58의 성장이 상당히 빨랐으며, 40 g/L 이상인 경우에는 *L. paracasei* KLB 58의 성장이 소폭 증가하였다(Fig. 4(B)). 일반적으로 유산균의 경우 EPS 생산량은 다른 균에 비해서 적다고 보고되었으며, 유산균의 glucose는 해당 과정 등의 대부분이 발효에 이용되며 이 중 일부분만 EPS로 전환된다고 알려졌다. 또한 EPS 생산량 증가는 탄소원의 공급량을 증가시킬 뿐만 아니라, EPS 합성에 필요한 glucose의 공급량도 증가시킨다고 보고되었다(5, 7).

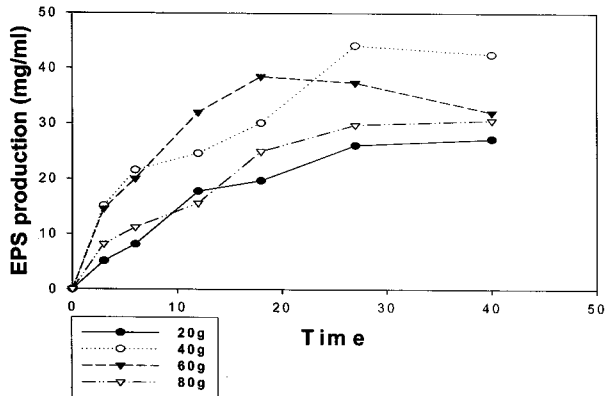


Figure 4(A). Effect of the amount of carbon source on EPS production.

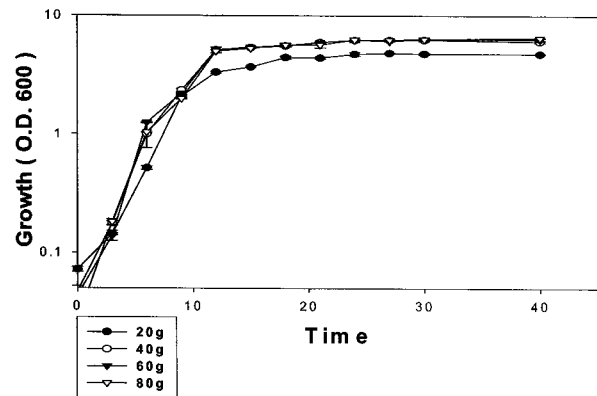


Figure 4(B). Effect of the amount of carbon source on the growth of *L. paracasei* KLB58.

초기 질소원 양과 EPS 생산량 변화

질소원의 증가에 따른 EPS 생산량 변화 관계를 알아보기 위해서 casamino acid를 질소원으로 이용하여 EPS 생산량을 관찰하였다. EPS 생산 변화는 30 g/L에서 50 g/L로 casamino acid의 양을 변화시켰을 때 약 5 mg/ml로 큰 증가를 보이지 않았다(Fig. 5(A)). *L. paracasei* KLB 58의 성장은 casamino acid의 양을 50 g/L까지 변화를 주었을 때 평균의 성장도 증가하였으나, 그 이상인 70 g/L를 넣어주었을 때는 균의 성장이 증가하지 않았다(Fig. 5(B)). 몇 가지 보고된 연구결과에서는 탄소원과 질소원의 비가 EPS 생산

량에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나(1,6) 본 연구에서는 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

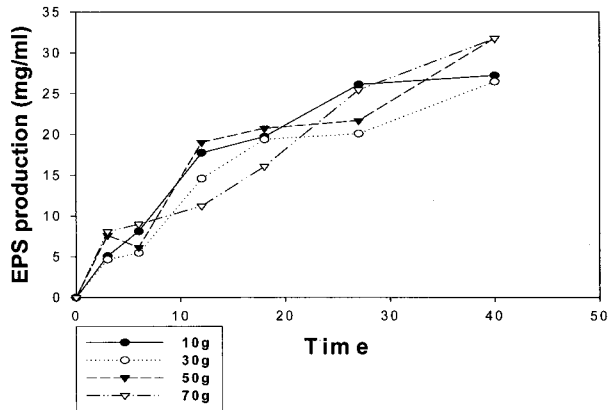


Figure 5(A). Effect of the amount of nitrogen source on EPS production.

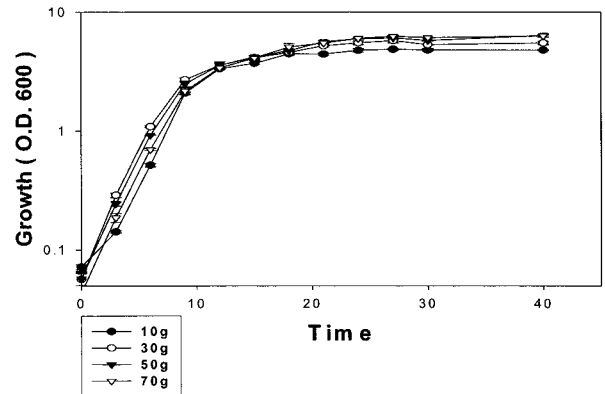


Figure 5(B). Effect of the amount of nitrogen source on the growth of *L. paracasei* KLB58.

요약

EPS 생산량이 다양한 환경 인자 요소에 의해 달라진다는 것이 여러 연구를 통해 알려졌다(1, 5, 10, 11). 본 연구에서는 환경인자를 다음과 같은 요소 (온도, 탄소원, pH, 질소원과 탄소원)로 변화시켜 보면서 관찰하였다. 다양한 환경인자 중 EPS 생산량에 가장 큰 영향을 준 요소는 온도였다. 온도를 37°C에서 25°C로 낮추었을 때 EPS 생산량은 2배 이상 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3(A)). 탄소원으로 galactose를 사용했을 때 EPS 생산이 가장 효율적이었으나(Fig. 2(A)), 수율 면에서는 lactose를 이용했을 때 가장 효과적이었다(Fig. 2(B)). 그러나 lactose를 사용했을 때 *L. paracasei* KLB 58의 성장이 매우 저조하였다. 이에 대한 균체량을 증가시킬 수 있는 방법을 모색한다면, EPS 생산하는데 있어 lactose가 훌륭한 탄소원으로 사용될 가능성이 있다고 여겨진다. 반면에, 질소원의 양을 증가시켰을 때의 EPS 생산량의 증가는 거의 변함이 없었다. 5가지 환경요소 (온도, 탄소원, pH, 질소원과 탄소원)를 변화

시켜본 인자 중 질소원의 양을 변화시켰을 때 EPS 변화가 가장 적었고, 탄소원의 증가는 EPS 생산의 증가를 가져왔다.

감 사

본 연구는 인하대학교 해양과학·생물공학과와 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Andrew, L., Y. Gu, V. Marshall (2001), Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Biotechnol Adv.* **19**, 597-625.
- Degeest, B. and L. D. Vuyst (1999), Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium, *Appl Environ Microbiol.* **65**, 2863-2870.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- Hassan, A. N., R. Ipsen, T. Janzen, K. B. Qvist (2003), Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides, *J. Dairy Sci.* **86**, 1632-1638.
- Lin, E.-S., Y.-H. Chen (2007), Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media, *Bioresource Technol.* **98**, 2511-2517.
- Maite, D., A. Munduate, A. Perea, and A. Irastorza (2003), Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions, *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 113-120.
- Petry, S., S. Furlan, M.-J. Crepeau, J. Cerning, and M. Desmazeaud (2000), Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium, *Appl Environ Microbiol.* **66**, 3427-3431.
- Pham, P. L., I. Dupont, D. Roy, G. Lapointe, and J. Cerning (2000), Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its degradation during prolonged fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2302-2310.
- Pierre, M., S. Bozonnet, C. Albenne, G. Ja, R.-M. Willemot, and R.-S. Magali (2001), Homopolysaccharide from lactic acid bacteria, *Int. dairy J.* **11**, 675-685.
- Shih, I.-L., K.-L. Tsai, and C. Hsieh (2007), Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*, *Biochem. Eng. J.* **33**, 193-201.
- Tallon, R., P. Bressollier, and M. C. Urdaci (2003), Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56, *Res. Microbiol.* **154**, 705-712.
- Van, D. B. D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kanerling, J. F. G. Vliegthart, A. M. Ledebouer, 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.
- Van Kranenburg, R. I., C. Boels, M. Kleerebezem, and W. M. De Vos (1999), Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: Approaches for the production of existing and novel polysaccharides, *Curr. Opin. Biotech.* **10**, 498-504.