

乳業用乳酸菌の生産する細胞外多糖

福田 健二*・浦島 匡

(帯広畜産大学大学院畜産衛生学研究部門, 〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地)

Exopolysaccharides from dairy lactic acid bacteria

Kenji Fukuda* and Tadasu Urashima

(Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido, 080-8555 Japan)

Summary

Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used in food industries, especially for the production of fermented dairy products. During fermentation process, some dairy LAB produce exopolysaccharide (EPS), providing good mouthfeel properties to the products by modifying their textures. In general, EPS is divided into two groups based on their monosaccharide composition; homo-EPS and hetero-EPS. It is believed that the major physiological function of EPS is the first line of biological defense against phagocytosis, phage attack, antibiotics, toxic metal ions, and physical stresses such as desiccation and osmotic stress. Besides, EPS from dairy LAB exhibits bioactive characteristics, e.g., antimicrobial, anti-tumoral, hypotensive, prebiotic, immuno-stimulative, and cholesterol-lowering activities. In case of hetero-EPS from dairy LAB, so far its low yield confines the commercial use to some extent, despite of the potentially beneficial aspects for human health. In this review, origin, physicochemical properties, genetics, and biosynthesis of EPS from dairy LAB are overviewed. Furthermore, its possible applications in dairy industry and problems to be solved for the practical use are also mentioned.

1. はじめに

乳酸菌のなかでも *Bifidobacterium* 属, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Leuconostoc* 属, *Streptococcus* 属に代表される乳業用乳酸菌は, 乳加工, 特に発酵乳製品の生産に必須である。現在汎用されている乳業用乳酸菌は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* や *Streptococcus thermophilus* をはじめとする約10菌株だが, 基準株に限らず, 世界各地で作られる伝統的発酵乳製品から潜在的に有用な菌株

が数多く見出されており, 貴重な遺伝資源として将来的な利用が期待される^{1~14)}。

乳業用乳酸菌の利点が, 長い食経験に裏打ちされた高い安全性であることは言うまでもない。加えて, 乳酸菌由来酵素の働きにより生じたペプチド, 細胞壁など菌体由来成分, あるいは菌体そのものが整腸作用^{15~17)}, 血圧降下作用^{18,19)}, 抗菌作用^{20~22)}, 抗腫瘍作用^{23~25)}, 抗アレルギー作用^{26~28)}, 血中コレステロール低減作用^{29~31)}など様々な健康機能性を有することが示され, 乳業用乳酸菌の有益性が再認識されている。Adachi らによる粘性多糖ケフィラン³²⁾, Ishizaki らによる抗菌ペプチドナイシン³³⁾

* Fax: 0155-47-5577

E-mail: fuku@obihiro.ac.jp

に関する先駆的研究をはじめ、この分野では日本の研究グループによる貢献が大きい。

本稿は、乳業用乳酸菌が生産する有用物質の中でも細胞外多糖について概説する。細胞外多糖は、微生物が細胞外に分泌する多糖、あるいは微生物由来の分泌型酵素の働きにより細胞外で合成される多糖のことであり、exocellular polysaccharide, extracellular polysaccharide, exopolysaccharide と英語表記される。細胞外多糖は、その存在形態の違いから、菌体表面に共有結合した夾膜多糖 (capsular polysaccharide, 以下 CPS と略す) と菌体から遊離したスライム多糖 (slime exopolysaccharide, 以下 EPS と略す) に分類される。また、その組成の違いから、一種類の単糖により構成されるホモ型 (デキストランなど) と複数種の単糖から成るヘテロ型に分類される。乳業用乳酸菌が生産するのは主に後者であるため、ヘテロ型細胞外多糖に関する記述が中心となることを了承いただきたい。また、特に注記が無ければ、本稿中の CPS および EPS は全てヘテロ型を意味する。なお、乳酸菌全般が生産する細胞外多糖について、優れた総説が多数あるので参照されたい^{34~45)}。

2. 細胞外多糖生産能を有する乳業用乳酸菌

細胞外多糖を生産する乳酸菌は寒天培地上でムコイド型または曳糸性のコロニーを形成し、容易に判別することが可能である⁴⁴⁾。非ムコイド型あるいは非曳糸性であっても、CPS 生産菌は墨汁染色により簡便に検出できる。また、液体培養を行った際に、培地の粘濁性の増加により判別可能な場合がある。

ヨーグルトおよびそのスターターから、EPS を生産する *Lb. bulgaricus*^{46,47)} と *Str. thermophilus*^{48,49)} 株が数多く選抜されている。Cerning らは EPS を生産する中温性乳酸菌として *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lb. casei* ssp. *casei* を単離した⁵⁰⁾。この3菌種は、バターミルクやソーヤミルクなど発酵乳製品の製造にもよく用いられる。Van der Meulen らは市販の乳製品と穀物製品から

スクリーニングを行ない、発酵乳からホモ型 EPS 生産菌として *Leuconostoc citreum* 2.8 を、サワークリームからホモ型 EPS/CPS 生産菌として *Weissella confusa/cibaria* 38.2 を見出した⁵¹⁾。

伝統的発酵乳から、以下のように多数の EPS/CPS 生産菌が見出されている。ロシア・コーカサス地方原産のケフィール (Kefir) のスターターであるケフィール粒から、CPS を有する *Lactobacilli* が単離された^{52,53)}。また、チベットケフィールから EPS を生産する *Lb. kefirifaciens* ZW3⁵⁴⁾ や *Lb. plantarum* KF5⁵⁵⁾ が単離された。北欧の発酵乳ロングフィル (Långfil) やビリー (Viili) は強い粘濁性を示すが、そのスターターに用いられる *Lc. lactis* ssp. *cremoris* の5菌株 (ARH53, ARH74, ARH84, ARH87, B30) は EPS 生産能を有した⁵⁶⁾。また、インドやネパールの発酵乳ダヒ (Dahi) から *Lactobacillus* sp. CFR-2182⁵⁷⁾ と *Lb. fermentum* TDS030603⁵⁸⁾ が EPS 生産菌として単離された。さらに Behare らは、EPS を生産する中温性乳酸菌47株をダヒあるいは生乳から単離している⁵⁹⁾。また、非曳糸性の *Leuconostoc* sp. CFR 2181 も EPS 生産菌として単離された⁶⁰⁾。上述した以外にも、伝統的発酵乳は世界各地に多数存在する。これらが細胞外多糖生産菌の有望な分離源であることは間違いなく、今後、新規の菌株が発見される可能性は高い。

報告例は少ないが、チーズやバターからも細胞外多糖を生産する乳酸菌が見出されている。エジプトのハードタイプチーズであるラス (Ras) から検出された *Lactobacilli* の4.3%に、CPS の生産が認められた⁶¹⁾。また、ヤクの乳から作られたチュルピ (Churpi) チーズから検出された *Lactobacilli* の11%が、EPS 生産能を有していた⁶²⁾。ヒツジの乳から作ったバターであるダン (Dhan) から26種の乳酸菌が単離され、そのうち *Leuc. mesenteroides* ssp. *dextranicum* が唯一 EPS を生産する菌株であった⁶³⁾。

ヒト由来の乳酸菌からも、細胞外多糖生産能を有し、かつ乳業用乳酸菌として有望な菌株が見ついている。Francius らは、健康なヒト成人の糞便から

ら単離した *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103) に 2 種類の CPS が存在することを、原子間力顕微鏡を用いた観察により明らかにした⁶⁴⁾。森永乳業株式会社が保有する *Bifidobacterium longum* BB-79 株は EPS を生産する⁶⁵⁾。ヒト腸管から単離された *Bif. longum* ATCC 15707 株も、同様に EPS を生産する⁶⁶⁾。Ruas-Madiedo らは、*Bif. animalis*, *Bif. longum*/*Bif. infantis*, *Bif. longum*, *Bif. pseudocatenulatum* の 13 菌株と、*Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. vaginalis* の 10 菌株をヒト腸管から EPS 生産菌として単離した⁶⁷⁾。また、母乳で育てられた乳児の糞便から、*Bifidobacterium* spp. が EPS 生産菌として見出されている⁶⁸⁾。

3. 化学構造

既述したように、細胞外多糖は構成糖の違いからホモ型とヘテロ型に大別される。ホモ型は単一の単糖から構成されるため一次構造上のバリエーションはヘテロ型ほど多くないが、主鎖の結合様式、分子量、分岐構造に違いが見られる。乳業用乳酸菌の生産するホモ型細胞外多糖の大部分は α -1,6 結合を主鎖とするグルカン、すなわちデキストラン (Dextran) である。例えば、ダヒから単離された *Leuconostoc* sp. CFR 2181 が生産する EPS は α -1,6 結合から成るグルカンであり、 α -1,4 結合を含まないことが示唆された⁶⁰⁾。周知のようにデキストランを生産する代表的な乳酸菌は *Leuc. mesenteroides*⁶⁹⁾ であるが、Streptococci, Lactobacilli, Weissella の中でもデキストランを作る菌株が存在する^{51,70)}。また、デキストラン以外のホモ型細胞外多糖には、以下のようなものがある。*Lb. reuteri* 121 が生産するロイテラン (Reuteran) は、主として α -1,4 結合から成る α -1,4/1,6 グルカンである⁷¹⁾。興味深いことに、同菌株は β -2,6 フルクタンであるレバン (Levan) を合成することも確認されている⁷²⁾。ムタン (Mutan) は α -1,3 結合を 50% 以上含む α -1,3/1,6 グルカンであり、*Leuc. mesenteroides* や *Streptococcus* の数菌株からムタン合成酵素が見つかった^{73,74)}。*Lb. reuteri* 180 が生産する EPS180 も α -

1,3/1,6 グルカンであるが、 α -1,3 結合 (31%) と α -1,6 結合 (69%) の占める割合がムタンとは異なる⁷⁵⁾。オルタナン (Alternan) は α -1,3 結合と α -1,6 結合を交互に持つ α -1,3/1,6 グルカンであり、 α -1,3 結合の分岐を有する。*Leuc. mesenteroides* にオルタナンを生産する菌株の存在が知られている⁷⁶⁾。現在のところ、 β -グルカンを生産する乳業用乳酸菌は見つかっていない。

一方、ヘテロ型細胞外多糖の糖組成および化学構造は菌株によって大きく異なり、多様性に富む (表 1)。これは、ヘテロ型細胞外多糖が 3~8 糖から成る「繰り返し単位」の重合体であることに起因する。van Kranenburg らは、繰り返し単位の単糖組成の違いにより、ヘテロ型細胞外多糖を (I) ガラクトースのみから成るもの、(II) グルコースとガラクトースから成るもの、(III) グルコース、ガラクトース、ラムノースから成るものの主要 3 グループに分類した¹¹⁰⁾。これらに属する以外にも、上記 3 糖以外の構成単糖を含む細胞外多糖や、種々の置換基が付加した細胞外多糖が少なからず見出されている。以下、詳細について述べる。

繰り返し単位を構成する主要な単糖は D-グルコース、D-ガラクトース、L-ラムノースであり、これら構成単糖は α -または β -結合を介して重合している。通常、どの糖もピラノース型 (六員環) であるが、しばしば D-ガラクトースにフラノース型 (五員環) が見られる^{81,84,88,92,93,101,103,104,105,107)}。大部分の細胞外多糖は D-グルコースと D-ガラクトースを含むが、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* EU23 が生産する EPS⁸⁰⁾ のように D-グルコースと L-ラムノースから成るものや、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* H414 が生産する EPS⁹⁷⁾ のように D-ガラクトースからのみ構成されるものも存在する。食品由来 Lactobacilli が生産する細胞外多糖はガラクトース含有率が他の単糖より大きな場合が多く、これはガラクトースを主要な炭素源として利用するためと考えられる。これら 3 種の単糖と比較して出現頻度の低いものに、N-アセチル-D-グルコサミンや N-アセチル-D-ガラクトサミンといった N-アセチルア

表1 乳業用乳酸菌の生産するヘテロ型細胞外多糖の化学構造

菌株	培地	化学構造 ^{a)}	文献
<i>Bif. Longum</i> JBL05	栄養添加スキムミルク培地	β -D-GlcP-(1→6) β-D-Galp-(1→4) →4)-α-D-Galp-(1→4)-α-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-L-Rhap-(1→	77
<i>Lb. acidophilus</i> 5e2	還元スキムミルク培地	β-D-Galp-(1→4) →6)-α-D-GlcP-(1→3)-β-D-GlcP-(1→3)-β-D-GlcPNAc-(1→3)-α-D-Galp-(1→	78
<i>Lb. acidophilus</i> LMG9433	半合成培地	β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→6) β-D-GlcPNAc-(1→3) →4)-β-D-GlcPA-(1→6)-α-D-GlcP-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→	79
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> EU23	還元スキムミルク培地	α-L-Rhap-(1→3) →2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GlcP-(1→3)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcP-(1→4)-α-D-GlcP-(1→	80
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LBB.B26	還元スキムミルク培地	α-D-GlcP-(1→6) →3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→3)-β-D-Galp-(1→	81
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LBB.B332	還元スキムミルク培地	→3)-α-D-GlcP-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Galp-(1→	82
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB2074	還元スキムミルク培地	α-D-Galp-(1→3)-α-D-GlcP-(1→3) α-D-Galp-(1→6) →4)-α-D-GlcP-(1→3)-α-D-Galp-(1→	83
<i>Lb. helveticus</i> 766	スキムミルク培地	β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→2) β-D-Galp-(1→3) →3)-β-D-GlcP-(1→4)-β-D-GlcP-(1→6)-α-D-GlcP-(1→6)-α-D-Galp-(1→6)-α-D-GlcP-(1→	84
<i>Lb. helveticus</i> K16	スキムミルク培地	β-D-Galp-(1→4) β-D-GlcP-(1→2)-β-D-GlcP-(1→6) →4)-β-D-GlcP-(1→4)-α-D-GlcP-(1→4)-β-D-Galp-(1→	85
<i>Lb. helveticus</i> Lb161	還元スキムミルク培地	β-D-GlcP-(1→3) β-D-GlcP-(1→3) →4)-α-D-GlcP-(1→4)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→2)-α-D-GlcP-(1→3)-β-D-GlcP-(1→	86
<i>Lb. helveticus</i> NCC2745	栄養添加 MSK 培地	β-D-Galp-(1→6)-α-D-GlcP-(1→6) →3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→6)-α-D-GlcP-(1→3)-β-D-GlcP-(1→	87
<i>Lb. helveticus</i> TY1-2	還元スキムミルク培地	β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→3) →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-GlcP-(1→3)-β-D-GlcP-(1→5)-β-D-Galp-(1→	88
<i>Lb. kefirifaciens</i> WT-2B ^T	PYG 培地 コロ加水分解物添加培地	β-D-GlcP-(1→2) →6)-β-D-GlcP-(1→6)-β-D-Galp-(1→4)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→	89
<i>Lb. paracasei</i> 34-1	半合成培地	sn-glycerol 3-phosphate-(→3) →3)-β-D-GalpNAc-(1→4)-β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→	90
<i>Lb. pentosus</i> LPS26	半合成培地	→4)-α-D-GlcP-(1→3)-α-D-GlcPA4Ac-(1→3)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GlcPA-(1→3)-β-L-Rhap2Ac-(1→	91
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	HYLA ミルク培地	β-D-Galp-(1→6) →3)-β-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-α-D-GlcPNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Galp-(1→	92
<i>Lb. rhamnosus</i> KL37C	MRS 培地	→3)-α-D-GlcP-(1→2)-β-D-Galp-(1→6)-α-D-Galp-(1→6)-α-D-GlcP-(1→3)-β-D-Galp-(1→	93
<i>Lb. rhamnosus</i> RW-9595M, R	MRS 培地	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} & & 6 \\ & \diagdown & / \\ R & \text{C} & \alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)} \\ & / & \diagdown \\ \text{HO}_2\text{C} & & 4 \end{matrix}$ →3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcP-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-GlcP-(1→	94
<i>Lb. sp.</i> LM-17	MRS ^L 培地	β-D-GlcP-(1→2(6)) →6)-β-D-GlcP-(1→6(2))-β-D-Galp-(1→4)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→	95
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> B40	ホエーバーミエート	α-L-Rhap-(1→2) →4)-β-D-GlcP-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→	96
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H414	合成培地 スキムミルク	O-(→3) α-D-Galp-1-O-P-OH β-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→3) →4)-β-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-α-D-Galp-(1→	97
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B39	ホエーバーミエート	β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→4) →2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-GlcP-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→	98
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B891	ホエーバーミエート	(Ac) _{0.5} (→6) β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→6) →4)-α-D-GlcP-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→	99
<i>Str. thermophilus</i> 8S	栄養添加還元スキムミルク培地	→4)-α-D-Galp-(1→2)-β-D-Ribf-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcP-(1→7)-Sug-(1→4)-β-D-GalpNAc-(1→	100
<i>Str. thermophilus</i> EU20	還元スキムミルク培地	α-L-Rhap-(1→2) →6)-β-D-Galp-(1→6)-α-D-Galp-(1→3)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcP-(1→6)-α-D-Galp-(1→6)-β-D-GlcP-(1→	101
<i>Str. thermophilus</i> OR 901	栄養添加ホエー培地	β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→4) →2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-L-Rhap-(1→	102

表1 乳業用乳酸菌の生産するヘテロ型細胞外多糖の化学構造(つづき)

菌株	培地	化学構造 ^{a)}	文献
<i>Str. thermophilus</i> S3	還元スキムミルク培地	β -D-Galp2Ac _{3,4} -(1→6) →3)-β-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Galp-(1→	103
<i>Str. macedonicus</i> Sc136	還元スキムミルク培地	β -D-Galp-(1→6)-β-D-Glc-(1→6)-β-D-GlcNAc-(1→3) →4)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glc-(1→	104
<i>Str. thermophilus</i> SF12	栄養添加還元スキムミルク培地	β -D-Galp-(1→4) →2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glc-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→	105
<i>Str. thermophilus</i> SF120	栄養添加スキムミルク培地	α-D-Galp-(1→6) →3)-β-D-Galp-(1→3)-β-D-Glc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→	106
<i>Str. thermophilus</i> SF139	栄養添加還元スキムミルク培地	β -D-Galp-(1→6) →3)-α-D-Glc-(1→3)-β-D-Glc-(1→3)-β-D-Galp-(1→	105
<i>Str. thermophilus</i> ST1	還元スキムミルク培地	α-D-Glc-(1→4) β-D-Galp-(1→6) →3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glc-(1→4)-β-D-Glc-(1→6)-β-D-Glc-(1→	107
<i>Str. thermophilus</i> ST111	スキムミルク培地	β -D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→4) →2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→	108
<i>Str. thermophilus</i> THS	還元スキムミルク培地	β -D-Galp-(1→4)-β-D-Glc-(1→6)-α-D-Glc-(1→4) →3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glc-(1→	109

^{a)} Ac, acetyl group; D-Galp, D-galactose (pyranose); D-Galp, D-galactose (furanose); D-GalpNAc, N-acetyl-D-galactosamine (pyranose); D-Glc, D-glucose (pyranose); D-GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine (pyranose); L-Rhap, L-rhamnose (pyranose); D-Ribf, D-ribose (furanose); Sug, 3,9-dideoxy-D-threo-D-altronic acid.

ミノ糖が挙げられる。また、稀にL-フコースが検出される。乳業用乳酸菌では、*Str. thermophilus* MR-1Cが生産し8糖繰り返し単位をもつCPSにL-フコースの存在が確認された¹¹¹⁾。他にもいくつか稀に検出される構成単糖がある。例えば、*Lb. pentosus* LPS26が生産するCPSにD-グルクロン酸が含まれていた⁹¹⁾。また、*Str. thermophilus* 8Sが生産するEPSからD-リボースが見出された¹⁰⁰⁾。非常に珍しいことに、同EPSはノノン酸(3,9-dideoxy-D-threo-D-altronic acid)を主鎖中にエーテル結合を介した形で含むことも明らかにされている。構成単糖としてマンノースが検出された報告例もあるが、これは培地成分由来の可能性が高い。

繰り返し単位の主鎖に見出される単糖の結合様式は、1→2, 1→3, 1→4, 1→6結合である。また、*Lb. helveticus* TY1-2が生産するEPSはD-グルコピラノースとD-ガラクトフラノースがβ-1→5結合した構造を持つ⁸⁸⁾。繰り返し単位が直鎖状の細胞外多糖もあるが^{82,90,91,93,100)}、多くは分岐構造を持つ。分岐鎖の結合様式も、1→2, 1→3, 1→4, 1→6結合のいずれもが存在する。分岐の数は1から3、分岐鎖を構成する単糖の残基数も1から3の範囲である。分岐数および分岐鎖の単糖残基数は、いずれも数が大きくなるほど観察される頻度は少なくなる傾向にある。分岐数3のEPSは*Lb. delbrueckii* subsp.

bulgaricus NCFB2074⁸³⁾が、分岐鎖の単糖残基数3のEPSは*Str. macedonicus* Sc136¹⁰⁴⁾がそれぞれ生産する。

繰り返し単位の構成単糖が、糖質とは異なる成分による修飾を受けた例も見つかっている。*Lb. paracasei* 34-1が生産するEPSにはグリセロール-3-リン酸が付加していた⁹⁰⁾。*Lb. rhamnosus* RW-9595MおよびRW-9595Rが生産するEPSは、分岐鎖であるガラクトース残基にピルビン酸アセタールが付加していた⁹⁴⁾。また、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B891⁹⁹⁾および*Str. thermophilus* S3103³⁾の生産するEPSにアセチル基の付加が見出された。*Lc. lactis* subsp. *cremoris* B80の生産するEPSでは、分岐鎖であるガラクトース残基と主鎖がリン酸基を介して結合していることが明らかとなった⁹⁶⁾。

培地に添加する炭素源が、繰り返し単位を構成する糖の比率に影響を及ぼすという報告がある¹¹²⁻¹¹⁴⁾。例えば、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772はフルクトースを炭素源としたときグルコースとガラクトースのモル比が1:2.4のEPSを生産するが、フルクトースとグルコースの混合物を炭素源として生育したときはグルコース、ガラクトース、ラムノースのモル比が1:7.0:0.8の多糖を生産する¹¹²⁾。その理由として、フルクトースを

炭素源とした場合、dTDP-ラムノースの合成に必要な酵素の活性が検出限界以下であったためと著者らは結論している。また、*Lb. pentosus* LPS26は単糖組成の異なる2種の細胞外多糖 EPS A と EPS B を生産するが、炭素源を変えたところ両者の収量比が変わったと Sánchez らは報告している¹¹⁵⁾。一方、炭素源を変えても構成単糖の比率に影響はないという報告^{116,117)}もあり、菌株により異なる応答を示すことが予想される。また、次のような研究結果も報告されている。食品から細胞外多糖生産菌を網羅的にスクリーニングしたところ、ラムノースを構成単糖として含む細胞外多糖を生産する菌株は28%を占めた¹¹⁸⁾。ところが、ヒト由来乳酸菌ではラムノースを含む細胞外多糖を生産する菌株が占める割合は52%であった¹¹⁹⁾。Koskenniemi らはプロテオーム解析の手法により、産業的に利用されるホエイ培地と MRS 培地で生育した場合には、*Lb. rhamnosus* GG がそれぞれ異なるタンパク質発現プロファイルを与えることを示した¹²⁰⁾。これらの結果は、菌を取り巻く生育環境が細胞外多糖の組成に影響を及ぼす可能性を示唆している。特に、腸内細菌を一般的な培地で生育した場合、得られた細胞外多糖の構造が腸管内でのそれを反映していない可能性があり、注意を要する¹¹⁹⁾。

4. 生合成機構と遺伝的背景

細胞外多糖の生合成機構は、ホモ型とヘテロ型で大きく異なる。ホモ型の生合成機構は非常に単純である。すなわち、菌体から分泌されたグルカンスクラーゼあるいはフルクタンスクラーゼの働きにより、スクロースのみを基質として合成される¹²¹⁾。これらグリカンスクラーゼは通常の糖転移酵素とは異なり、糖ヌクレオチドを基質として要求しない。例えば、デキストランはデキストランスクラーゼがスクロースのグルコース残基をアクセプター分子に次々と転移し重合する。このとき、酵素反応の最初の段階でアクセプター分子として働くのもスクロースである。次いで、グルコースを付加されて伸長した糖鎖がアクセプター分子となる。また、フルクタ

ンの一種であるレバンは、レバンスクラーゼがスクロースのフルクトース残基をアクセプター分子に転移して合成される。このように、ホモ型はその細胞外多糖に特有な種類の酵素により合成されるのが特徴である。なお、グリカンスクラーゼはロイテランスクラーゼやムタンスクラーゼのように多糖の慣用名を冠して名付けられるのが通例となっている。

これに対し、化学構造の多様性から予想されるようにヘテロ型の生合成機構は複雑である。多くの酵素が関与する他段階反応により合成は進行するが、(I)細胞内への糖の取込み、(II)糖ヌクレオチドの合成、(III)繰り返し単位の合成、(IV)繰り返し単位の重合と細胞外への輸送の4段階に大きく分けられる(図1)。各段階について以下に述べる。

乳酸菌の糖の取込み経路は、ATP結合カセットトランスポーター系(ATP-binding cassette transporter)、ATPase系、パーミアアーゼ系(permease system)、ホスホエノールピルビン酸依存性ホストランスフェラーゼ系(phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system、以下PEP-PTSと略す)などが知られている^{122,123)}。糖の資化性や、どの取込み経路が他と比してよく用いられるかに関しては、菌の種類により異なる。例えば、ラクトースの取込みに*Lc. lactis*はPEP-PTSを用いるが¹²⁴⁾、*Str. thermophilus*はLacSパーミアアーゼ系を用いる¹²⁵⁾。乳業用乳酸菌が生産する細胞外多糖の生合成機構の模式図(図1)に、糖の取込み経路としてラクトースのATPase系、およびグルコース、ガラクトース、ラクトースのパーミアアーゼ系とPEP-PTSを示した。また、図中には示していないが、スクロースをPEP-PTSで取込みスクロース-6-リン酸からグルコース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を生成する経路も存在する¹²²⁾。なお、ATPase系とパーミアアーゼ系であれば糖はそのまま細胞内に取り込まれるが、PEP-PTSでは6位の炭素がリン酸化された形で取り込まれる。乳酸菌の糖の取込み経路について、より詳細な記述がDe Vuyst らの著書にある⁴⁵⁾。

取り込まれた糖を出発物質として、種々の酵素の

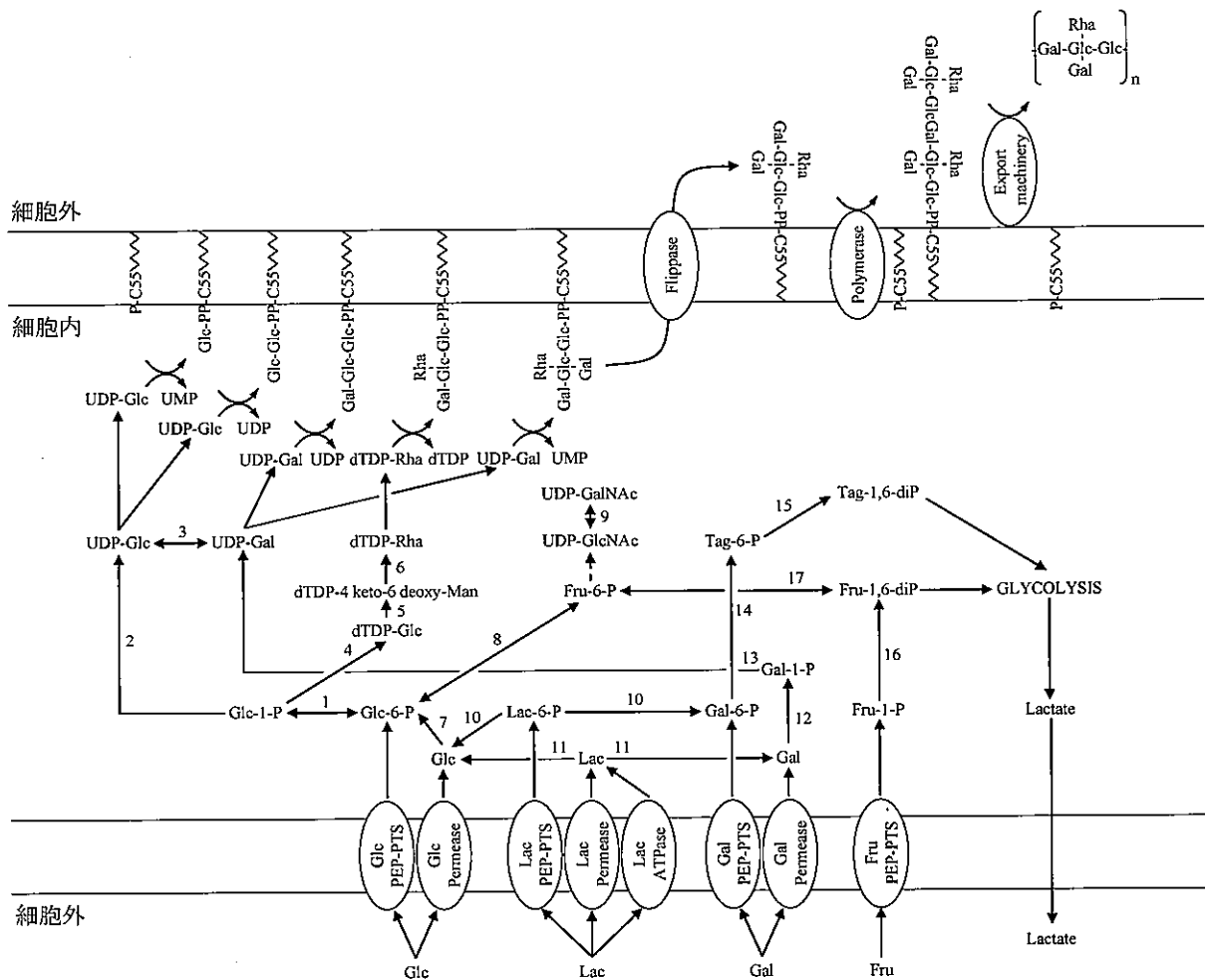


図1 ヘテロ型細胞外多糖の合成機構

Fru, fructose; Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetyl-galactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Man, mannose; P, phosphate; PEP-PTS, phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system; Rha, rhamnose; Tag, tagatose. 1, phosphoglucomutase; 2, UDP-galactose 4-epimerase; 3, UDP-glucose pyrophosphorylase; 4, dTDP-glucose pyrophosphorylase; 5, dehydratase; 6, epimerase reductase; 7, glucokinase; 8, phosphoglucose isomerase; 9, UDP-*N*-acetylglucosamine 4-epimerase; 10, phospho- β -galactosidase; 11, β -galactosidase; 12, galactokinase; 13, galactose-1-phosphate uridylyltransferase; 14, galactose 6-phosphate isomerase; 15, tagatose 6-phosphate kinase; 16, 1-phosphofructokinase; 17, 6-phosphofructokinase/fructose 1,6-bisphosphatase.

働きにより糖ヌクレオチドが合成される。PEP-PTSにより取り込まれたグルコースはグルコース-6-リン酸となり、これがホスホグルコムターゼ (図1反応1, 1-1と略す。以下同様) によりグルコース-1-リン酸に変換された後、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (1-2) が作用しUDP-グルコースが合成される。また、グルコース-1-リン酸からはdTDP-グルコースピロホスホリラーゼ (1-4)、デヒドラターゼ (1-5)、エピメラーゼレダク

ターゼ (1-6) の働きによりdTDP-ラムノースが合成される¹¹²⁾。グルコース-6-リン酸はホスホグルコースイソメラーゼ (1-8) によりフルクトース-6-リン酸に変換される。次いで、これが3種類の酵素の働きによりUDP-*N*-アセチルグルコサミンに変換され、さらにUDP-*N*-アセチルグルコサミン4-エピメラーゼ (1-9) の作用でUDP-*N*-アセチルガラクトサミンに変換される¹²⁶⁾。また、パーミアラーゼ系により取り込まれたグルコースは、グルコ

キナーゼ (1-7) によりグルコース-6-リン酸に変換される。本来グルコース-6-リン酸は解糖系の中間体であり、従ってこれをグルコース-1-リン酸に変換するホスホグルコムターゼ (1-1) は細胞外多糖の生合成にとって鍵となる酵素である³⁶⁾。ガラクトースは PEP-PTS でガラクトース-6-リン酸として取り込まれたあとタガトース-6-リン酸経路を経て解糖系に入るため、糖ヌクレオチドの合成には関与しない¹²⁴⁾。ところが、パーミアアゼ系により取り込まれたガラクトースはロロワール (Leloir) 経路の初期段階を経由して糖ヌクレオチドに変換される^{124,127)}。すなわち、まずガラクトキナーゼ (1-12) によりガラクトース-1-リン酸に変換され、さらに UDP-グルコースの共存下でガラクトースホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ (1-13) によりグルコース-1-リン酸と UDP-ガラクトースを生成する。PEP-PTS で取り込まれたラクトースはラクトース-6-リン酸となり、ホスホ β -ガラクトシダーゼ (1-10) によりグルコースとガラクトース-6-リン酸に加水分解され、それぞれ糖ヌクレオチド合成あるいは解糖系へと流れる¹²⁴⁾。また、ATPase 系あるいはパーミアアゼ系で取り込まれたラクトースは β -ガラクトシダーゼ (1-11) によりグルコースとガラクトースに加水分解され、糖ヌクレオチド合成の基質として利用される¹²⁴⁾。フルクトースは PEP-PTS による取込み経路が知られており¹²⁸⁾、1-ホスホフルクトキナーゼ (1-16) によりフルクトース-1-リン酸からフルクトース-1,6-二リン酸に変換された後、糖ヌクレオチド合成あるいは解糖系へと流れる。

繰り返し単位の合成は、細胞質において、細胞膜の成分であり脂質キャリアとして働くウンデカプレニルリン酸 (C55-P) にプライミング酵素と呼ばれる糖転移酵素が糖ヌクレオチドの糖残基を転移することで始まる。プライミング酵素をコードする遺伝子の欠損株は EPS を生産できなくなる¹²⁹⁻¹³²⁾ ことから、同酵素が細胞外多糖の生合成に必須であることが示された。また、Minic らは *Str. thermophilus* のプライミング酵素がホスホグリコシルトランスフ

ェラーゼであり、その活性は200番目のチロシン残基のリン酸化により制御されることを示した¹³¹⁾。プライミング酵素により単糖残基が1分子付加した C55-P に対し、順次糖転移酵素が作用することで繰り返し単位が完成する。従って、繰り返し単位の多様性を決める要因として、糖転移酵素の数や種類、あるいは基質特異性が重要な役割を果たすと考えられる。化学構造の解析からフコース¹¹¹⁾、リボース¹⁰⁰⁾、グルクロン酸⁹¹⁾、ノノン酸¹⁰⁰⁾といった糖が細胞外多糖の構成単糖として見出されたが、これらに対する糖ヌクレオチドや糖転移酵素についてほとんど明らかになっていない。また、グリセロール-3-リン酸⁹⁰⁾、ピルビン酸アセタール⁹⁴⁾、アセチル基^{99,103)}などの置換基による修飾が、生合成のどの段階で、どの酵素によりなされるのか不明である。

完成した繰り返し単位は、フリッパーゼにより細胞外すなわちペリプラズム間隙へ移行すると推定される。Lamothe らは、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lfi5 の EPS 生合成関連遺伝子群を解析し、繰り返し単位が細胞質で合成された後、*epsN* 遺伝子にコードされたタンパク質の働きでペリプラズム側へ移行するという仮説を提唱した¹³³⁾。次いで、ポリメラーゼによる繰り返し単位の重合、鎖長の決定、輸送マシナリーによる外膜外への輸送が行われると推定されるが、その分子メカニズムは、乳酸菌が属するグラム陽性菌においてほとんど明らかにされていない。関連遺伝子群の特徴から、グラム陽性菌もグラム陰性菌とよく似た機構で細胞外多糖を分泌するであろうと考えられているが、もちろん全く同じ訳ではない。例えば、チロシンキナーゼ-ホスファターゼが共同して繰り返し単位の重合を制御するが、大腸菌 *Escherichia coli*¹³⁴⁾ のチロシンキナーゼは N 末端に 2 箇所、C 末端に 1 箇所の膜貫通部位 (活性中心を含む) を持つのに対し、*Str. thermophilus*¹³¹⁾ のチロシンキナーゼは C 末端側の膜貫通部位を持たない。また、*Str. thermophilus* のチロシンキナーゼはホスファターゼのリン酸化に必要なだが *E. coli* では必要としない。LaPointe らは *E. coli* を宿主として *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 の

Wzb タンパク質の組換え体を作製し、部位特異的変異の導入により、その酵素学的性質を調査した¹³⁵⁾。その結果、同タンパク質は O-ホスファターゼであり、可逆的なチロシンリン酸化を介し細胞外多糖の重合を制御することが示唆された。同様の働きをもつ *Str. pneumoniae* Rx1-19F の CpsB タンパク質と Wzb タンパク質は同じ基質に作用することが可能であり、共によく似た酵素学的性質を示したが、金属イオンに対する要求性が異なっていた。細胞外多糖の生合成の最終段階については未だ不明なことが多い。また、菌種により少しずつ異なる重合制御を受けている可能性もある。しかし、この段階は細胞外多糖の物性を決める上で非常に重要なため、産業利用の観点からも全容の解明が待たれる。

ヘテロ型細胞外多糖の生合成において、繰り返し単位の重合以降に関わる酵素群をコードする遺伝子は、ひとつの独立した遺伝子クラスターとして存在する。中温性乳酸菌はプラスミド上に、高温性乳酸菌はゲノム上に細胞外多糖遺伝子クラスターが存在する。ほぼ共通の構造として(I)調節遺伝子、および(II)重合と輸送に関与するタンパク質、(III)糖転移酵素の遺伝子群が順番に並んでおり、通常、糖転移酵素遺伝子の下流に再び重合と輸送に関与するタンパク質をコードする遺伝子が存在する。一般に、同遺伝子クラスターのサイズはおよそ11~22 kb の範囲である⁴⁵⁾。5'末端側に位置する調節遺伝子および重合と輸送に関与するタンパク質の遺伝子群は、他の部分と比較して菌種間での相同性が高い。また、これら遺伝子群はポリシストロニックな転写様式を示すことが知られている。近年、DNA 配列解析法の進歩により、細胞外多糖遺伝子クラスターの解析例が飛躍的に増加した。その結果、調節遺伝子を含まないもの^{40,136,137)}、insertion sequence (IS) が挿入されたもの^{40,137)}、トランスポザーゼ遺伝子が挿入されたもの¹³⁶⁾が見出された。このような不規則構造を持つ遺伝子クラスターは欠失や重複などを伴う遺伝子の再構成により形成されたと考えられるが、これが細胞外多糖の生合成に影響を与えないことを明らかにした例は、筆者らの報告を含め僅かであ

る^{136,138)}。また、菌株間で観察される細胞外多糖遺伝子クラスターの多型は *Str. thermophilus* でよく研究されており、遺伝子の水平伝播により生じたものと考えられている¹³⁹⁻¹⁴¹⁾。

5. 生理的役割と物性

微生物がエネルギーを消費してまでヘテロ型細胞外多糖を生産する第一の理由は、乾燥、浸透圧ストレス、ファゴサイトーシス、フェージによる攻撃、毒性物質などの外的要因に対する防御と考えられている⁴⁵⁾。次に、物質表面への付着およびバイオフィーム形成が挙げられる。つまり、細胞外多糖は環境ニッチ (niche) におけるコロニー形成を促進し、菌の生存により有利に働く¹⁴²⁾。他にも、宿主との相互作用や細胞認識などが提唱されている。大部分の微生物は自ら作り出した細胞外多糖を分解することができないため、通常、細胞外多糖をいわゆる「非常食」として利用することはないと考えられている³⁴⁾。例外的に、口腔内細菌である *Str. mutans* はデキストランの分解によって生じたオリゴ糖を資化することが知られている¹⁴³⁾。また、一部の乳業用乳酸菌も細胞外多糖を分解する可能性が示された。Pham らは *Lb. rhamnosus* R を27時間培養すると上清中の分解酵素により EPS の分子量が低下し、培養液の粘性が減少することを見出した¹⁴⁴⁾。細胞外多糖の分解により培養液の粘性が低下する現象は、*Str. thermophilus*¹⁴⁵⁾など他のいくつかの菌種でも観察されている。死菌体から漏出した酵素により分解されたと考えられるが、飢餓状態において細胞外多糖を資化している可能性もあり、その詳細は不明である。

上述したような細胞外多糖の示す生理的役割を担保する物性は、主に粘性 (viscosity) である。粘性を示す物質は固有の粘度を持つ。溶液中で細胞外多糖は水和状態にあり、多糖分子が接する水分子との摩擦抵抗の和がすなわち粘度である。つまり、分子量が同じ細胞外多糖でも、コンパクトに折りたたまれた (占有面積が小さい) ものよりも長く伸びた構造を持つ (占有面積が大きい) ものが粘度は大

きい。一般に、乳酸菌の生産するヘテロ型細胞外多糖の分子量は 10^6 g/mol以上の高分子であるため、強い粘性を示すものが多い。また、溶液中ではランダムコイル構造をとるものと考えられる^{146,147}。ヘテロ型細胞外多糖の濃度と粘性の間に明らかな相関はなく、粘性に影響を与える要因として、微視的には構成単糖の組成、単糖残基の結合様式、分岐の有無、置換基の有無が、巨視的には重合度、多糖分子の実効電荷 (net charge)、分岐鎖の長さや単糖組成が考えられる。特に、分岐鎖の長さや単糖組成は細胞外多糖が空間に占める割合に寄与するため、結果として粘性に大きな影響を与える¹⁰⁴。 *Str. thermophilus* Rs 株の培養液は曳糸性を示さないが、Sts 株は曳糸性を示す。両菌株が生産する EPS は全く同じ繰り返し構造を持ち、分子量が Rs 株では 2.6×10^6 Da, Sts 株では 3.7×10^6 Da という点のみ異なっていたことから、EPS の分子量が培養液の粘性に影響を及ぼすことが示唆された¹⁴⁸。Petry らは *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の生産する EPS において同様の見解を示している¹⁴⁹。 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495 が生産するリン酸化多糖ビーリアン (Viilian) は高分子電解質として振る舞い、0.1 M の塩化ナトリウム添加により粘性が低下した¹⁵⁰。Tuinier らは、 β -1,4 結合が α -1,4, α -1,6, β -1,3, β -1,6 結合と比較して多糖分子に一層の剛性を賦与すること、また、分岐鎖の存在が多糖分子の剛性に影響を及ぼすことを示し、その結果として高い粘性を与えると推察した^{151,152}。van den Berg らは、中性 EPS は粘性に寄与するが弾性 (elasticity) には寄与せず、逆に酸性 EPS は弾性に寄与するが粘性には寄与しないことを示した¹⁵³。

乳業用乳酸菌の細胞外多糖には、産業利用上重要と考えられる物性として、増粘性の他にゲル化性、乳化性、分散懸濁性、結着性、被膜性、起泡性、離水防止性、氷結晶防止性、耐塩性、耐酸性、耐熱性、相乗作用性などが期待される。細胞外多糖を乳製品に利用する際は、特に乳タンパク質との相互作用¹⁵⁴を考慮に入れねばならないが、これに関して第7章に後述する。

6. 健康機能性

乳業用乳酸菌の生産するヘテロ型細胞外多糖は様々な健康機能性を示す。これまでに、プレバイオティクス (prebiotics) 作用、血圧降下作用、抗菌作用、抗腫瘍作用、免疫賦活作用について報告がある。以下、各々について記述する。

プレバイオティクス効果については特に期待されるが、Tsuda らによる *Lb. plantarum* 301102S 変異株の生産する EPS¹⁵⁵ についての報告以外、現在までにそのような例は見当たらない。第5章に既述したように大部分の細胞外多糖は難分解性であり、プレバイオティクス効果を示さないと予想される。事実、Cinquin らは固定化培養細胞による試験管内大腸モデルを用いた実験から、*Lb. rhamnosus* RW-9595M の生産する EPS は乳児腸管内に存在するプロバイオティクス (probiotics) によって資化されず、プレバイオティクス効果を有しないと結論した¹⁵⁶。しかし、最近になって *Lb. plantarum* strain No. 14¹⁵⁷ や *Bifidobacterium* spp.⁶⁸ において細胞外多糖は胆汁酸や低 pH 環境から菌体を保護し、プロバイオティクス乳酸菌が生きのまま大腸へ到達するのを助ける可能性が示唆された。プレバイオティクスは「大腸内の有益菌の増殖を促進する、あるいはその代謝を活性化することで、宿主の健康に有利に作用する難消化性の食品成分」と定義される¹⁵⁸。従って、細胞外多糖も広義のプレバイオティクスと言えるかも知れない。また、Vincent らは *Str. macedonicus* Sc136 が生産する EPS の繰り返し構造の一部としてラクト-N-テトラオースあるいはラクト-N-ネオテトラオースのコア構造である β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp の存在を見出したことから、同 EPS がプレバイオティクス効果を潜在的に有する可能性に言及している¹⁰⁴。

Lb. kefiranofaciens WT-2B^T はケフィランを生産する。Maeda らは同ケフィランを100および300 mg/kg 体重ずつ食餌に混ぜて SHRSP/Hos ラットへ30日間経口投与したところ、濃度依存的かつ有

意な血圧低下を観察し、その主な要因が血清脂質の低下であると推察した⁸⁹⁾。

生産菌株や構造は未同定だが、Songらはケフィールから分離したEPSに抗ウイルス活性を見出した。すなわち、1%のEPS存在下でMA104細胞にヒト、ウシ、ブタのロタウイルスを感染させた場合、感染阻害率はそれぞれ72.52 ± 6.48, 36.06 ± 7.63, 81.66 ± 1.11%であった¹⁵⁹⁾。*Bacillus cereus*は土壌中や植物表面などに広く分布し、耐熱性の芽胞を形成するため乳の汚染菌として深刻な有害性をもたらす¹⁶⁰⁾。*B. cereus* B10502はエンテロトキシンを生産し培養ヒト腸細胞の剥離と傷害を引き起こすが、Medranoらは300から1000 mg/Lのケフィランに強い保護効果を見出した¹⁶¹⁾。また、Wangらは*Lb. reuteri*が生産するEPSに大腸菌由来エンテロトキシンによるブタ赤血球の凝集を防ぐ効果があることを示した¹⁶²⁾。

Lb. acidophilus 606が生産するCPSはヒト大腸癌細胞株HT-29に対して抗腫瘍作用を示す¹⁶³⁾。Kimらは、同CPSが直接Beclin-1とGRP78を誘導し、また、間接的にBcl-2とBakを誘導することでHT-29細胞のオートファジー性細胞死を促進した結果、抗腫瘍作用を示すことを明らかにした。また、*Lb. rhamnosus* ATCC 9595が生産するEPSも抗腫瘍作用を有することが示唆された¹⁶⁴⁾。

乳業用乳酸菌のヘテロ型細胞外多糖が示す健康機能性のうち、免疫賦活作用に関する報告が最も多い。Kitazawaらは*Lc. lactis* ssp. *cremoris* KVS20の生産する細胞外多糖がB細胞の分裂促進因子であることを明らかにした¹⁶⁵⁾。同じくKitazawaらはSarcoma-180癌細胞を移植したマウスに同菌株の凍結乾燥菌体を腹腔内投与したところ、癌細胞の成長阻害を観察した¹⁶⁶⁾。試験管内実験において同菌株はSarcoma-180癌細胞に対する細胞毒性を示さなかったことから、その抗腫瘍作用はマウス免疫機能の賦活化に起因することが示唆された。さらに、Kitazawaらは*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1が中性EPSと酸性EPSを生産し、そのうち酸性EPSのみマウスの脾臓細胞およびバイエル板細

胞の分裂促進活性を有することを見出し、同活性には酸性EPSに付加したリン酸基が重要であることを示した¹⁶⁷⁾。また、宿主の免疫賦活作用を介し、同活性が抗腫瘍作用に関連すると推察した。MakinnoらはOLL1073R-1株の酸性EPSを高分子画分と低分子画分に分画し、そのうち高分子画分がリン酸化EPSであることを明らかにした¹⁶⁸⁾。同高分子画分をマウス脾臓細胞に添加したところインターフェロン(IFN) γ の産生が増加し、さらにマウスに経口投与した場合はナチュラルキラー細胞の活性化が認められた。*Lb. rhamnosus* RW-9595Mが生産するEPSのうち、分子量10⁶ Da以上の画分と10⁴ ~ 10⁵ Daの画分はマウス脾臓細胞およびヒト末梢血単核細胞の分裂を促進し、また、10⁶ Da以上の画分はヒトとマウスのTNF, IL-6, IL-12 p40, およびマウスIFN γ の産生を促した¹⁶⁹⁾。また、BleauらはRW-9595M株が生産する高分子量EPSはマウス由来マクロファージの抗炎症性IL-10産生を抑制するのに対し、16~30個の繰り返し単位から成る同EPSの加水分解物はIL-10産生を促すと報告した¹⁷⁰⁾。同じ細胞外多糖であっても、重合度により正反対の免疫応答を引き起こすという結果は大変興味深い。*Lb. kefirifaciens* ATCC 43761が生産するケフィラン100 mg/kg体重を一週間にわたってマウスへ経口投与したところ、IgG産生細胞に変化は見られなかったが、小腸および大腸固有層におけるIgA産生細胞数が増加した¹⁷¹⁾。これがIL-4産生細胞の増加に伴う現象ではなかったことから、T細胞非依存性免疫応答の起きた可能性が示唆された。Yasudaらは*Lb. casei* ShirotaのCPS遺伝子をノックアウトした変異株を作製し、その死菌体をマウスマクロファージ由来RAW264.7とJ774.1細胞あるいはマウス脾臓細胞に添加して宿主の免疫系に及ぼす影響を調査した¹⁷²⁾。その結果、変異株は野生株よりも供試細胞のTh1およびTh2サイトカイン産生量を増加させた。興味深いことに、変異株はRAW264.7細胞のIL-6産生を増加させたが、野生株はこれを著しく抑制する結果となった。IL-6はリポ多糖により誘導されることが知られてい

る。つまり、*Lb. casei* Shirota の CPS が菌体表層に存在するリボ多糖を物理的に「マスク」し、過剰な免疫応答を抑制していると考えられる。以上のように、細胞外多糖によって免疫応答は様々である。これは、細胞外多糖の構造多様性に起因すると考えられる。Kitazawa らの研究以外に細胞外多糖の構造と免疫賦活作用の関連について言及した例はほとんど無いため、今後の検証が待たれる。

補足として、細胞外多糖生産能を有する *Str. thermophilus* を用いて作製した発酵乳に、慢性胃炎に対する治癒効果が認められた¹⁷³⁾。また、細胞外多糖を生産する乳業用乳酸菌に大腸炎の治癒効果¹⁷⁴⁾やコレステロール低減作用¹⁷⁵⁾が報告されている。しかしながら、これらの健康機能性と細胞外多糖との直接の関連性は不明である。細胞外多糖の健康機能性を検証する上で留意しなければならないのは、*in vitro* と *in vivo* によるアッセイでは往々にして異なる結果が出ることと、試料として用いる細胞外多糖の精製度によって結果が大きく左右されることである。また、*in vivo* の実験を実施する際は、細胞外多糖の消化性についての検証も必要であろう。

7. 乳産業への利用

これまでのところ、乳業用乳酸菌の生産する細胞外多糖そのものが添加物として製品に利用された例はほとんどない。その理由として、収量の低さが挙げられる。例えば増粘剤として市場に流通しているヘテロ型 EPS に、植物病原菌 *Xanthomonas campestris* の生産するキサントガムがある¹⁷⁶⁾。その収量は 10 g/L 以上に達するが、乳酸菌の細胞外多糖は数 10～数 100 mg/L に過ぎない。従って、細胞外多糖生産性の乳酸菌を用いて発酵乳製品を作る、という形で専ら利用されてきた。これは、粘性を利用して乳製品の口当たりを改善する¹⁷⁷⁾、あるいは保水性 (water retentivity) を利用して離漿 (syneresis) を防ぐ¹⁷⁸⁾ことを主な目的とする。以下、製品別の利用研究例と、粘性または保水性以外に利用可能性が示された物性について述べる。

健康を志向して低脂肪、無脂肪のヨーグルトが好

まれるようになったが、それらは口当たりに問題のあることが多い。口当たりの良し悪し (滑らかあるいは粒々感) に影響を与えるのはヨーグルトの微細構造であり、その形成には乳脂肪が大きく寄与している。従って、低脂肪あるいは無脂肪ヨーグルトでは、乳脂肪に代わる増粘安定剤として細胞外多糖生産菌の利用が期待されている。走査型電子顕微鏡を用いた観察により、ヨーグルトはカゼインミセルがネットワークを形成しゲル様の微細構造をとることが知られている¹⁷⁹⁾。タンパク質ネットワークの間隙には、ホエーと微生物が存在する。一方、細胞外多糖生産菌をスターターとして用いると、網状の細胞外多糖が乳タンパク質と微生物を結び付けるため、通常のスターターを用いた場合とは異なる微細構造をとることが推察された¹⁸⁰⁾。つまり、曳糸性の細胞外多糖生産性乳酸菌をスターターとして用いない場合はタンパク質ネットワークの間隙が大きく不均一であるが、用いた場合は間隙が小さく均一となる。この傾向は、攪拌型ヨーグルトよりも静置型ヨーグルトにおいて顕著である。Hassan らは共焦点レーザー顕微鏡による観察から、攪拌型ヨーグルトの場合、細胞外多糖は凝集したタンパク質のネットワークとは別に、小孔状構造として局在することを明らかにした¹⁷⁸⁾。この構造がタンパク質の一層の凝集とゲル化を防ぎ、離漿防止や口当たりの改善に役立つと考えられる。細胞外多糖が製品のテクスチャに及ぼす作用は、その濃度とは関係がなく、むしろ分子量や構造 (構成単糖の種類、単糖間の結合様式、分岐鎖や置換基の有無、分子の回転半径など) が重要であると推察されている^{177,181-183)}。細胞外多糖が酸性多糖である場合、多糖とタンパク質の静電相互作用も大きく寄与している¹⁵⁴⁾。一方、ヨーグルトの硬さや弾性はタンパク質成分の影響によるところが大きい¹⁸⁴⁻¹⁸⁶⁾。また、Ramchandran らは、ヨーグルトを冷蔵保存した際、細胞外多糖にスターター菌の生存を保護する効果があることを報告した¹⁸⁷⁾。

チーズもやはり低脂肪化が模索されたが、脂肪が少なくいと製造過程でカゼイン繊維が癒着してしま

い、離漿の増加につながる。このようなチーズは硬くゴムのような質感となり、伸びも悪くなる^{188,189}。低脂肪化に伴う悪影響を補う効果が低脂肪(6%)モッツァレラチーズのスターター乳酸菌に見出され¹⁹⁰、さらに *Str. thermophilus* MR-1C の CPS が保水効果を示す本体であることが変異体を用いた実験により証明された¹¹¹。低脂肪(15%)チェダーチーズでも同様の効果を示す菌株として *Lc. lactis* subsp. *cremoris*^{191,192}が、パネラチーズからは *Str. thermophilus*¹⁹³が見出された。

細胞外多糖がアイスクリームに及ぼす影響について、以下のような報告がある。Kelvinらは、曳糸性の細胞外多糖生産菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483や LB18 を用いた発酵乳を原料として用い、アイスクリームを試作した¹⁹⁴。その結果、メカニズムの詳細は不明であるが、市販の増粘安定剤と同等の効果を確認した。

ゲル化する食品由来の多糖類には、寒天、アルギン酸、ゼラチン、ペクチン、デンプンなどがあり、ゼリー、ジャム、羊羹など食品の加工に汎用されている。乳酸菌の細胞外多糖では、ケフィランにゲル化能が報告されている¹⁹⁵。さらに、ケフィランにはフィルム形成能があることも明らかとなった。Piermariaらは、ケフィラン100gに対しグリセロール25g以上を添加するとフィルムの伸展性と柔軟性が著しく改善することを示した¹⁹⁶。その性能は低密度ポリエチレンと同等かあるいはそれ以上であり、幅広い応用が期待される。また、Mitsueらは0.5%ケフィラン水溶液と無水コハク酸を用いてアシル化したコハク化ケフィランの0.5%水溶液に、0.5%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液と同等以上のヒト皮膚に対する保湿効果を認めた¹⁹⁷。このように、乳酸菌の生産する細胞外多糖に関して、食品以外の利用可能性が示されている。

8. おわりに

乳酸菌が生産する細胞外多糖、特にヘテロ型細胞外多糖は、多様な構造に基づいた多彩な機能を示す。その構造と機能の相関にはまだ不明な点が多

く、今後の課題として挙げられる。発酵乳製品の製造に細胞外多糖生産能を有する乳酸菌を利用することは既に行なわれているが、細胞外多糖の応用範囲をさらに拡大するには、多糖そのものを添加剤として利用可能にすることが必要であろう。そのためには、生産量の向上が不可欠となる。ヘテロ型細胞外多糖の生合成は細胞膜の構成脂質を利用しているため、遺伝子改変による生産量の増加には限界がある。従って、培養工学的手法による(組換え体を用いた)大量生産系の確立が課題である。また、遺伝子改変技術を応用し、望ましい物性あるいは健康機能性を有するテララーメード多糖の作出が期待される。乳酸菌の生産する細胞外多糖が数多く実用化され、乳製品の高付加価値化や新製品の開発に貢献することを願う。

文 献

- 1) Chammas, G. I., Saliba, R., Corrieu, G., and Beal, C.: Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *Int. J. Food Microbiol.*, 110, 52-61 (2006)
- 2) Mufandaedza, J., Viljoen, B. C., Feresu, S. B., and Gadaga, T. H.: Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 147-152 (2006)
- 3) Pinto, M. G. V., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., and Holzapfel, W. H.: *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.*, 109, 205-214 (2006)
- 4) Collado, M. C., Surono, I. S., Meriluoto, J., and Salminen, S.: Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal

- colonization. *J. Food Prot.*, 70, 700–705 (2007)
- 5) Ortu, S., Felis, G. E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L. A., Dellaglio, F., and Zanetti, S.: Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *Int. Dairy J.*, 17, 1312–1320 (2007)
 - 6) Ozkalp, B., Ozden, B., Tuncer, Y., Sanlibaba, P., and Akcelik, M.: Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Lait*, 87, 521–534 (2007)
 - 7) Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Guigas, C., Franz, C., and Holzapfel, W. H.: Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr. Microbiol.*, 56, 315–321 (2008)
 - 8) Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H. K., and Holzapfel, W. H.: Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.*, 126, 57–64 (2008)
 - 9) Rashid, M. H. U., Togo, K., Ueda, M., and Miyamoto, T.: Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk ‘Dahi’. *Anim. Sci. J.*, 80, 70–78 (2009)
 - 10) Wang, Y. P., Xu, N., Xi, A. D., Ahmed, Z., Zhang, B., and Bai, X. J.: Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 341–347 (2009)
 - 11) Watanabe, T., Hamada, K., Tategaki, A., Kishida, H., Tanaka, H., Kitano, M., and Miyamoto, T.: Oral administration of lactic acid bacteria isolated from traditional South Asian fermented milk ‘Dahi’ inhibits the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 271–278 (2009)
 - 12) Wu, R., Wang, L. P., Wang, J. C., Li, H. P., Menghe, B., Wu, J. R., Guo, M. R., and Zhang, H. P.: Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J. Basic Microbiol.*, 49, 318–326 (2009)
 - 13) Fernandez, E., Alegria, A., Delgado, S., and Mayo, B.: Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *Int. Dairy J.*, 20, 142–148 (2010)
 - 14) Wuyundalai, Lu, F. X., Sun, H. G., Cao, G. Q., Lu, Y. P., and Lu, Z. X.: The antibacterial properties and strain identification of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 screened from Chigee. *Milchwissenschaft*, 65, 144–148 (2010)
 - 15) Vanderhoof, J. A., Whitney, D. B., Antonson, D. L., Hanner, T. L., Lupo, J. V., and Young, R. J.: *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J. Pediatr.*, 135, 564–568 (1999)
 - 16) Xiao, S. D., Zhang, D. Z., Lu, H., Jiang, S. H., Liu, H. Y., Wang, G. S., Xu, G. M., Zhang, Z. B., Lin, G. J., and Wang, G. L.: Multicenter, randomized, controlled trial of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB in patients with chronic diarrhea. *Adv. Ther.*, 20, 253–260 (2003)

- 17) Olivares, M., Diaz-Ropero, M. P., Gomez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., Martin, R., Lopez-Huertas, E., Rodriguez, J. M., and Xaus, J.: Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.*, 107, 104–111 (2006)
- 18) Meisel, H., and Bockelmann, W.: Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 207–215 (1999)
- 19) Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., and Gobetti, A.: Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5297–5305 (2003)
- 20) Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., and Klaenhammer, T. R.: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52, 384–387 (1989)
- 21) Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L., Hernandez, P. E., and Nes, I. F.: Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4321–4330 (1997)
- 22) Bernet-Camard, M. F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L., and Hudault, S.: The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2747–2753 (1997)
- 23) Rafter, J. J.: The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand. J. Gastroenterol.*, 30, 497–502 (1995)
- 24) Pool-Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rummey, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scassellati-Sforzolini, R., and Rowland, I.: *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer*, 26, 365–380 (1996)
- 25) Ohashi, Y., Nakai, S., Tsukamoto, T., Masumori, N., Akaza, H., Miyanaga, N., Kitamura, T., Kawabe, K., Kotake, T., Kuroda, M., Naito, S., Koga, H., Saito, Y., Nomata, K., Kitagawa, M., and Aso, Y.: Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer. *Urol. Int.*, 68, 273–280 (2002)
- 26) Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S.: *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115, 278–287 (1998)
- 27) Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T.: The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 135, 205–215 (2004)
- 28) Kalliomaki, M. A., and Isolauri, E.: Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol. Allergy Clin.*, 24, 739–752 (2004)
- 29) Pereira, D. I. A., McCartney, A. L., and Gibson, G. R.: An in vitro study of the probiotic

- potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4743–4752 (2003)
- 30) Ha, C. G., Cho, J. K., Lee, C. H., Chai, Y. G., Ha, Y. A., and Shin, S. H.: Cholesterol lowering effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from human feces. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 1201–1209 (2006)
- 31) Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., and Lee, M. S.: Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 358–361 (2007)
- 32) Toba, T., Abe, S., Arihara, K., and Adachi, S.: A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2673–2674 (1986)
- 33) Matsusaki, E., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: Purification and identification of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Fac. Agr. Kyushu U.*, 40, 73–85 (1995)
- 34) Cerning, J.: Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 7, 113–130 (1990)
- 35) Cerning, J.: Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463–472 (1995)
- 36) De Vuyst, L., and Degeest, B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153–177 (1999)
- 37) Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V.: Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.*, 19, 597–625 (2001)
- 38) De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., and Degeest, B.: Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 11, 687–707 (2001)
- 39) Degeest, B., Vaningelgem, F., and De Vuyst, L.: Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 11, 747–757 (2001)
- 40) Jolly, L., and Stingle, F.: Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 11, 733–745 (2001)
- 41) Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P.: An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 163–171 (2002)
- 42) Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., and Moineau, S.: Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *J. Dairy Sci.*, 86, 407–423 (2003)
- 43) Welman, A. D., and Maddox, I. S.: Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.*, 21, 269–274 (2003)
- 44) Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilan, C. G.: Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 88, 843–856 (2005)
- 45) De Vuyst, L., and De Vin, F.: Bacterial/Animal/Yeast Polysaccharides: 2.15 Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. in *Comprehensive Glycosciences*. H. Kamerling ed. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 477–519 (2007)
- 46) Denadra, M. C. M., Desaad, A. M. S., Holgado, A. A. P. D., and Oliver, G.: Extracellular

- polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL-420. *Milchwissenschaft*, 40, 409-411 (1985)
- 47) Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., and Landon, M. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.*, 8, 625-628 (1986)
- 48) Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., and Landon, M. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 10, 255-260 (1988)
- 49) Ariga, H., Urashima, T., Michihata, E., Ito, M., Morizono, N., Kimura, T., and Takahashi, S.: Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus sajivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 isolated from commercial yogurt. *J. Food Sci.*, 57, 625-628 (1992)
- 50) Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., and Desmazeaud, M.: Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 75, 692-699 (1992)
- 51) Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G. F., and de Vuyst, L.: Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 250-258 (2007)
- 52) Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., and Adachi, S.: Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterisation of its extracellular polysaccharide. *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 257-264 (1991)
- 53) Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., and Crescenzi, V.: Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 69-74 (1999)
- 54) Wang, Y. P., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., and Song, S. Y.: Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43, 283-288 (2008)
- 55) Wang, Y. P., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., and Bai, X. J.: Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.*, 82, 895-903 (2010)
- 56) Yang, Z. N., Huttunen, E., Staaf, M., Widmalm, G., and Tenhu, H.: Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *Int. Dairy J.*, 9, 631-638 (1999)
- 57) Vijayendra, S. V. N., Palanivel, G., Mahadevamma, S., and Tharanathan, R.: Physico-chemical characterization of a new heteropolysaccharide produced by a native isolate of heterofermentative *Lactobacillus* sp. CFR-2182. *Arch. Microbiol.*, 191, 303-310 (2009)
- 58) Leo, F., Hashida, S., Kumagai, D., Uchida, K., Motoshima, H., Arai, I., Asakuma, S., Fukuda, K., and Urashima, T.: Studies on a neutral exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum*. *J. Appl. Glycosci.*, 54, 223-229 (2007)
- 59) Behare, P., Singh, R., and Singh, R. P.: Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi — an Indian fermented milk. *J. Dairy Res.*, 76, 90-97 (2009)
- 60) Vijayendra, S. V. N., Palanivel, G., Mahadevamma, S., and Tharanathan, R. N.:

- Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. *Carbohydr. Polym.*, 72, 300–307 (2008)
- 61) Ayad, E. H. E., Omran, N., and El-Soda, M.: Characterisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. *Lait*, 86, 317–331 (2006)
- 62) Prashant, Tomar, S. K., Singh, R., Gupta, S. C., Arora, D. K., Joshi, B. K., and Kumar, D.: Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli from Churpi cheese. *Dairy Sci. Technol.*, 89, 531–540 (2009)
- 63) Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E., and Karam, N. E.: Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, 60, 177–183 (2009)
- 64) Francius, G., Lebeer, S., Alsteens, D., Wildling, L., Gruber, H. J., Hols, P., De Keersmaecker, S., Vanderleyden, J., and Dufrêne, Y. F.: Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano*, 2, 1921–1929 (2008)
- 65) Roberts, C. M., Fett, W. F., Osman, S. F., Wijey, C., O’Connor, J. V., and Hoover, D. G.: Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *J. Appl. Microbiol.*, 78, 463–468 (1995)
- 66) Andaloussi, S. A., Talbaoui, H., Marczak, R., and Bonaly, R.: Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 995–1000 (1995)
- 67) Ruas-Madiedo, P., Moreno, J. A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., and de los Reyes-Gavilan, C. G.: Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4385–4388 (2007)
- 68) Alp, G., and Aslim, B.: Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16, 101–105 (2010)
- 69) Van Tieghem, P.: On sugar-mill gum. *Ann. Sci. Nature Bot. Biol. Veg.*, 7, 180–203 (1878)
- 70) Bailey, R. W., and Oxford, A. E.: The nature of the capsular polysaccharides of the dextran-producing organisms *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum* and *Streptococcus bovis*. *J. Gen. Microbiol.*, 20, 258–266 (1959)
- 71) Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., van der Maarel, M. J., and Dijkhuizen, L.: Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology*, 150, 2099–2112 (2004)
- 72) Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F., and Dijkhuizen, L.: Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3008–3014 (1999)
- 73) Sidebotham, R. L.: Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30, 371–444 (1974)
- 74) Mooser, G.: Glycosidases and glycosyltransferases. *The Enzymes*, 20, 187–221 (1992)
- 75) van Leeuwen, S. S., Kralj, S., van Geel-Schutten, I. H., Gerwig, G. J., Dijkhuizen, L.,

- and Kamerling, J. P.: Structural analysis of the α -D-glucan (EPS180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase GTF180 enzyme. *Carbohydr. Res.*, 343, 1237–1250 (2008)
- 76) Côté, G. L., and Robyt, J. F.: Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3)- α -D-glucan. *Carbohydr. Res.*, 101, 57–74 (1982)
- 77) Kohno, M., Suzuki, S., Kanaya, T., Yoshino, T., Matsuura, Y., Asada, M., and Kitamura, S.: Structural characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* JBL05. *Carbohydr. Polym.*, 77, 351–357 (2009)
- 78) Laws, A. P., Chadha, M. J., Chacon-Romero, M., Marshall, V. M., and Maqsood, M.: Determination of the structure and molecular weights of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 when grown on different carbon feeds. *Carbohydr. Res.*, 343, 301–307 (2008)
- 79) Robijn, G. W., Gallego, R. G., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydr. Res.*, 288, 203–218 (1996)
- 80) Harding, L. P., Marshall, V. M., Elvin, M., Gu, Y. C., and Laws, A. P.: Structural characterisation of a perdeuteriomethylated exopolysaccharide by NMR spectroscopy: characterisation of the novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* EU23. *Carbohydr. Res.*, 338, 61–67 (2003)
- 81) Sánchez-Medina, I., Gerwig, G. J., Urshev, Z. L., and Kamerling, J. P.: Structure of a neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB. B26. *Carbohydr. Res.*, 342, 2430–2439 (2007)
- 82) Sánchez-Medina, I., Gerwig, G. J., Urshev, Z. L., and Kamerling, J. P.: Structural determination of a neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB. B332. *Carbohydr. Res.*, 342, 2735–2744 (2007)
- 83) Harding, L. P., Marshall, V. M., Hernandez, Y., Gu, Y. C., Maqsood, M., McLay, N., and Laws, A. P.: Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. *Carbohydr. Res.*, 340, 1107–1111 (2005)
- 84) Robijn, G. W., Thomas, J. R., Haas, H., van den Berg, D. J. C., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Carbohydr. Res.*, 276, 137–154 (1995)
- 85) Yang, Z. N., Staaf, M., Huttunen, E., and Widmalm, G.: Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16. *Carbohydr. Res.*, 329, 465–469 (2000)
- 86) Staaf, M., Yang, Z. N., Huttunen, E., and Widmalm, G.: Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161. *Carbohydr. Res.*, 326, 113–119 (2000)
- 87) Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S. J. F., and Stinglele, F.: *Lactobacillus helveticus* glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis. *Glycobiology*, 12, 319–327 (2002)
- 88) Yamamoto, Y., Nunome, T., Yamauchi, R.,

- Kato, K., and Sone, Y.: Structure of a exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.*, 275, 319-332 (1995)
- 89) Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., and Kitamura, S.: Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B^T. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5533-5538 (2004)
- 90) Robijn, G. W., Wienk, H. L. J., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydr. Res.*, 285, 129-139 (1996)
- 91) Rodriguez-Carvajal, M. A., Sánchez, J. I., Campelo, A. B., Martínez, B., Rodríguez, A., and Gil-Serrano, A. M.: Structure of the high-molecular weight exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Carbohydr. Res.*, 343, 3066-3070 (2008)
- 92) Landersjö, C., Yang, Z. N., Huttunen, E., and Widmalm, G.: Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromol.*, 3, 880-884 (2002)
- 93) Lipiński, T., Jones, C., Lemercinier, X., Korzeniowska-Kowal, A., Strus, M., Rybka, J., Gamian, A., and Heczko, P. B.: Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 338, 605-609 (2003)
- 94) Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Begin, A., and Roy, D.: Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochem. J.*, 363, 7-17 (2002)
- 95) Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., and Crescenzi, V.: Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 69-74 (1999)
- 96) van Casteren, W. H. M., Dijkema, C., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J.: Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr. Polym.*, 37, 123-130 (1998)
- 97) Gruter, M., Leeflang, B. R., Kuiper, J., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.*, 231, 273-291 (1992)
- 98) van Casteren, W. H. M., Dijkema, C., Schols, H. A., Beldman, G., and Voragen, A. G. J.: Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39. *Carbohydr. Res.*, 324, 170-181 (2000)
- 99) van Casteren, W. H. M., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J.: Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.*, 327, 411-422 (2000)
- 100) Faber, E. J., van Haaster, D. J., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 8S containing an open chain nononic acid. *Eur. J. Biochem.*, 269, 5590-5598 (2002)
- 101) Marshall, V. M., Dunn, H., Elvin, M., McLay, N., Gu, Y., and Laws, A. P.: Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*

- EU20. *Carbohydr. Res.*, 331, 413–422 (2001)
- 102) Bubb, W. A., Urashima, T., Fujiwara, R., Shinnai, T., and Ariga, H.: Structural characterisation of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. *Carbohydr. Res.*, 301, 41–50 (1997)
- 103) Faber, E. J., van den Haak, M. J., Kamerling, J. P., and Vliegenthart, J. F. G.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydr. Res.*, 331, 173–182 (2001)
- 104) Vincent, S. J. F., Faber, E. J., Neeser, J. R., Stinglele, F., and Kamerling, J. P.: Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 11, 131–139 (2001)
- 105) Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Favre, N., and Neeser, J. R.: Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3512–3518 (1997)
- 106) Navarini, L., Abatangelo, A., Bertocchi, C., Conti, E., Bosco, M., and Picotti, F.: Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFi20. *Int. J. Biol. Macromol.*, 28, 219–226 (2001)
- 107) Säwén, E., Huttunen, E., Zhang, X., Yang, Z. N., and Widmalm, G.: Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, 47, 125–134 (2010)
- 108) Vaningelgem, F., Van der Meulen, R., Zamfir, M., Adriany, T., Laws, A. P., and De Vuyst, L.: *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium. *Int. Dairy J.*, 14, 857–864 (2004)
- 109) Nordmark, E. L., Yang, Z. N., Huttunen, E., and Widmalm, G.: Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* THS. *Biomacromol.*, 6, 105–108 (2005)
- 110) van Kranenburg, R., Vos, H. R., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M.: Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: Complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.*, 181, 6347–6353 (1999)
- 111) Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., and Broadbent, J. R.: Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2147–2151 (1998)
- 112) Grobden, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J., and de Bont, J. A. M.: Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 279–284 (1996)
- 113) Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J., and Desmazeaud, M.: Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3427–3431 (2000)
- 114) Audy, J., Labrie, S., Roy, D., and LaPointe, G.: Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. *Microbiology*, 156,

- 653–664 (2010)
- 115) Sánchez, J. I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., and Rodríguez, A.: Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 7495–7502 (2006)
- 116) Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., and Simonet, J. W.: Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 664–672 (1998)
- 117) Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motohima, H., and Urashima, T.: Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. *Carbohydr. Polym.*, 79, 1040–1045 (2010)
- 118) Ruas-Madiedo, P., Salazar, N. and De Los Reyes-Gavilán, C. G.: Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. in *Bacterial Polysaccharides*. M. Ullrich ed.: Caister Academic Press, Norfolk, pp. 279–312 (2009)
- 119) Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Ruas-Madiedo, P.: Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J. Dairy Sci.*, 92, 4158–4168 (2009)
- 120) Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Savijoki, K., Tynkkynen, S., de Vos, W. M., Kalkkinen, N., and Varmanen, P.: Proteome Analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG using 2-D DIGE and mass spectrometry shows differential protein production in laboratory and industrial-type growth media. *J. Proteome Res.*, 8, 4993–5007 (2009)
- 121) Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., and Remaud-Siméon, M.: Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 11, 675–685 (2001)
- 122) Thompson, J.: Lactic acid bacteria: model systems for *in vivo* studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie*, 70, 325–336 (1988)
- 123) 乳酸菌研究集談会編：「乳酸菌の科学と技術」, 学会出版センター, 東京, pp. 104–111 (1996)
- 124) de Vos, W. M., and Vaughan, E. E.: Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15, 217–237 (1994)
- 125) Foucaud, C., and Poolman, B.: Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J. Biol. Chem.*, 267, 22087–22094 (1992)
- 126) Degeest, B., Vaningelgem, F., Laws, A. P., and De Vuyst, L.: UDP-*N*-acetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of *N*-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3976–3984 (2001)
- 127) Grossiord, B. P., Luesink, E. J., Vaughan, E. E., Arnaud, A., and de Vos, W. M.: Characterization, expression, and mutation of the *Lactococcus lactis galPMKTE* genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. *J. Bacteriol.*, 185, 870–878 (2003)
- 128) Saier, M. H. Jr, Ye, J. J., Klinke, S., and Nino, E.: Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase system and

- evidence for the Embden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, 178, 314–316 (1996)
- 129) van Kranenburg, R., Vos, H. R., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M.: Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: Complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.*, 181, 6347–6353 (1999)
- 130) Dabour, N., and LaPointe, G.: Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7414–7425 (2005)
- 131) Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D., and Renault, P.: Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J. Bacteriol.*, 189, 1351–1357 (2007)
- 132) Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrene, Y., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J.: Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 3554–3563 (2009)
- 133) Lamothe, G. T., Jolly, L., Mollet, B., and Stinglele, F.: Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch. Microbiol.*, 178, 218–228 (2002)
- 134) Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J., and Duclos, B.: Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.*, 181, 3472–3477 (1999)
- 135) LaPointe, G., Atlan, D., and Gilbert, C.: Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochem.*, 9, 10 (2008)
- 136) Dan, T., Fukuda, K., Sugai-Bannai, M., Takakuwa, N., Motoshima, H., and Urashima, T.: Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2656–2664 (2009)
- 137) Audy, J., Labrie, S., Roy, D., and Lapointe, G.: Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. *Microbiology*, 156, 653–664 (2010)
- 138) Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., and Morona, R.: Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 35, 1431–1442 (2000)
- 139) Bourgoin, F., Pluvinet, A., Gintz, B., Decaris, B., and Guédon, G.: Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene*, 233, 151–161 (1999)
- 140) Pluvinet, A., Charron-Bourgoin, F., Morel, C., and Decaris, B.: Polymorphism of eps loci in *Streptococcus thermophilus*: sequence replacement by putative horizontal transfer in *S. thermophilus* IP6757. *Int. Dairy J.*, 14, 627–634 (2004)
- 141) Rasmussen, T. B., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E., and Pedersen,

- M. B.: *Streptococcus thermophilus* core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4703–4710 (2008)
- 142) Hufner, E., Britton, R. A., Roos, S., Jonsson, H., and Hertel, C.: Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Syst. Appl. Microbiol.*, 31, 323–338 (2008)
- 143) Colby, S. M., and Russell, R. R. B.: Sugar metabolism by mutans streptococci. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 80S–88S (1997)
- 144) Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., and Cerning, J.: Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2302–2310 (2000)
- 145) De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B.: Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 1059–1068 (1998)
- 146) Goh, K. K., Hemar, Y., and Singh, H.: Viscometric and static light scattering studies on an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* NCFB 2483. *Biopolymers*, 77, 98–106 (2005)
- 147) Sánchez-Medina, I., Frank, M., von der Lieth, C. W., and Kamerling, J. P.: Conformational analysis of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB. B26. *Org. Biomol. Chem.*, 7, 280–287 (2009)
- 148) Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G.: The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydr. Res.*, 310, 269–276 (1998)
- 149) Petry, S., Furlan, S., Waghorne, E., Saulnier, L., Cerning, J., and Maguin, E.: Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221, 285–291 (2003)
- 150) Oba, T., Higashimura, M., Iwasaki, T., Matser, A. M., Steeneken, P. A. M., Robijn, G. W., and Sikkema, J.: Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide “viilian” from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Polym.*, 39, 275–281 (1999)
- 151) Tuinier, R., ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P. A., and de Kruif, C. G.: Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide. *Phys. Rev.*, 60, 848–856 (1999)
- 152) Tuinier, R., van Casteren, W. H., Looijesteijn, P. J., Schols, H. A., Voragen, A. G., and Zoon, P.: Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*, 59, 160–166 (2001)
- 153) van den Berg, D., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J., Ledebøer, A. M., and Verrips, C. T.: Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0–1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2840–2844 (1995)
- 154) Girard, M., and Schaffer-Lequart, C.: Attractive interactions between selected anionic exopolysaccharides and milk proteins. *Food Hydrocoll.*, 22, 1425–1434 (2008)

- 155) Tsuda, H., and Miyamoto, T.: Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.*, 16, 87–92 (2010)
- 156) Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., and Lacroix, C.: Comparative effects of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and fructo-oligosaccharides on infant gut microbiota tested in an *in vitro* colonic model with immobilized cells. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57, 226–238 (2006)
- 157) Nagata, Y., Hashiguchi, K., Kamimura, Y., Yoshida, M., and Gomyo, T.: The gastrointestinal transit tolerance of *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 depended on the carbon source. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2650–2655 (2009)
- 158) Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401–1412 (1995)
- 159) Song, J. O., Kim, T. J., and Kim, Y. H.: Inhibitory effect on rotavirus by exopolysaccharides extracted from kefir. *Kor. J. Food Sci. Anim. Res.*, 27, 538–542 (2007)
- 160) Christiansson, A., Bertilsson, J., and Svensson, B.: *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.*, 82, 305–314 (1999)
- 161) Medrano, M., Pérez, P. F., and Abraham, A. G.: Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 1–7 (2008)
- 162) Wang, Y., Gänzle, M. G., and Schwab, C.: Exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 4863–4866 (2010)
- 163) Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S., and Kim, S. H.: Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51, 123–130 (2010)
- 164) Kim, J. U., Kim, Y., Han, K. S., Oh, S., Whang, K. Y., Kim, J. N., and Kim, S. H.: Function of cell-bound and released exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 939–945 (2006)
- 165) Kitazawa, H., Yamaguchi, T., and Itoh, T.: B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 75, 2946–2951 (1992)
- 166) Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., and Yamaguchi, T.: Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian røp sour milk, “viiili”. *Anim. Sci. Technol.*, 62, 277–283 (1991)
- 167) Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., and Itoh, T.: Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 169–175 (1998)
- 168) Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., and Oda, M.: Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J. Dairy Sci.*, 89, 2873–2881 (2006)
- 169) Chabot, S., Yu, H. L., De Leseleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M.,

- Roy, D., Lacroix, M., and Oth, D.: Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ mouse splenocytes. *Lait*, 81, 683-697 (2001)
- 170) Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., and Lamontagne, L.: Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 666-675 (2010)
- 171) Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Farnworth, E., and Matar, C.: Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36, 254-260 (2006)
- 172) Yasuda, E., Serata, M., and Sako, T.: Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4746-4755 (2008)
- 173) Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A. V., Mozzi, F., and de Valdez, G. F.: Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Dairy Sci.*, 92, 2423-2434 (2009)
- 174) Şengül, N., Aslım, B., Uçar, G., Yücel, N., Işık, S., Bozkurt, H., Sakaogulları, Z., and Atalay, F.: Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. *Dis. Colon Rectum*, 49, 250-258 (2006)
- 175) Tok, E., and Aslim, B.: Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as prebiotic. *Microbiol. Immunol.*, 54, 257-264 (2010)
- 176) García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., and Gómez, E.: Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.*, 18, 549-579 (2000)
- 177) Marshall, V. M., and Rawson, H. L.: Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34, 137-143 (1999)
- 178) Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., and Qvist, K. B.: Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *J. Dairy Sci.*, 86, 1632-1638 (2003)
- 179) Kalab, M., Allan-Wojtas, P., and Phipps-Todd, B. E.: Development of microstructure in set-style nonfat yogurt—a review. *Food Microstruct.*, 2, 51-66 (1983)
- 180) Hess, S. J., Roberts, R. F., and Ziegler, G. R.: Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *J. Dairy Sci.*, 80, 252-263. (1997)
- 181) Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M., and Zoon, P.: Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *Int. Dairy J.*, 12, 689-695 (2002)
- 182) De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adrianly, T., Marshall, V., Degeest, B., and Vanin-gelgem, F.: Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *Int. Dairy J.*, 13, 707-717 (2003)

- 183) Doleyres, Y., Schaub, L., and Lacroix, C.: Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. *J. Dairy Sci.*, 88, 4146–4156 (2005)
- 184) Rawson, H. L., and Marshall, V. M.: Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32, 213–220 (1997)
- 185) Shihata, A., and Shah, N. P.: Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 765–772 (2002)
- 186) Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., and Shah, N. P.: Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.*, 16, 40–51 (2006)
- 187) Ramchandran, L., and Shah, N. P.: Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.*, 92, 895–906 (2009)
- 188) Park, J., Rosenau, J. R., and Peleg, M.: Comparison of four procedures of cheese meltability evaluation. *J. Food Sci.*, 49, 1158 (1984)
- 189) Mistry, V. V., and Anderson, D. L.: Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. *Food Struct.*, 12, 259–266 (1993)
- 190) Perry, D. B., McMahon, D. J., and Oberg, C. J.: Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 80, 799–805 (1997)
- 191) Awad, S., Hassan, A. N., and Halaweish, F.: Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Composition and proteolysis. *J. Dairy Sci.*, 88, 4195–4203 (2005)
- 192) Dabour, N., Kheadr, E. E., Fliss, I., and LaPointe, G.: Impact of ropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *Int. Dairy J.*, 15, 459–471 (2005)
- 193) Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A. E., and García-Garibay, M.: Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *LWT-Food Sci. Technol.*, 42, 1508–1512 (2009)
- 194) Goh, K. K. T., Nair, R. S., and Matia-Merino, L.: Exploiting the functionality of lactic acid bacteria in ice cream. *Food Biophys.*, 3, 295–304 (2008)
- 195) Piermaria, J. A., de la Canal, M. L., and Abraham, A. G.: Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocoll.*, 22, 1520–1527 (2008)
- 196) Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., and Abraham, A. G.: Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocoll.*, 23, 684–690 (2009)
- 197) Mitsue, T., and Fujio, Y.: Study of stability and properties of kefir and succinyl kefir for application to cosmetics and foods. *Jpn. J. Food Chem.*, 5, 230–235 (1998)