

Lactobacillus acidophilus RMK567의 동결건조 겔처로 제조한 요구르트에서 GABA 생성력

임상동¹ · 유성호 · 양해동² · 김상기² · 박승용*
천안연암대학 축산학과, ¹한국식품연구원, ²임실치즈농협

GABA Productivity in Yoghurt Fermented by Freeze Dried Culture Preparations of *Lactobacillus acidophilus* RMK567

Sang-Dong Lim¹, Sung-Ho Yoo, Hae-Dong Yang², Sang-Ki Kim², and Seung-Yong Park*
Department of Animal Science, Cheonan Yonam College University, Cheonan 330-802, Korea
¹Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea
²Imsil Cheese Corp., Imsil, Jeonbuk 566-200, Korea

Abstract

γ -Aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus* RMK567 was cultivated in 50 L of sterilized MRS broth using a fermenter at 40°C for 24 h. The cell number was increased to 10.04±0.13 Log CFU/mL with a growth rate constant (*k*) of 0.454 generation/h and a generation time (*g*) of 2.303 h after a lapse of a lag phase (*L*) of 5.16 h. A total of 487 g of cell paste with 40.5% moisture was harvested with viable cell number of 12.48 Log CFU/g cell paste. The cell pastes after preparation with glycerol, glucose, and polydextrose as cryo-protectants were lyophilized under a vacuum of 84 m torr. A total of 408 g of freeze dried (FD) cell powders were mixed with a commercial strain of *Streptococcus thermophilus* to prepare of three types FD starter cultures with the viable cell numbers of 12.42 (FDA-GY), 12.60 (FDB-GG) and 12.91 (FDC-GP) Log CFU/g. During preservation the FD cultures at -18°C, the cell viability of the FD starter cultures were rapidly dropped to below 3.24% of the day of storage. No significant difference was found in the cell viabilities among three types of FD starters cultures, but significant difference (*p*<0.01) was found in storage periods. Yoghurts fermented through FD starter culture of *L. acidophilus* RMK567 were determined to contain 155.16±8.53 ppm, 243.82±4.27 ppm, and 198.64±23.46 ppm of GABA, respectively. This study shows that GABA production activity of *L. acidophilus* RMK567 is not affected during the freeze drying process and would be available for commercial production of yoghurt containing high GABA content.

Key words : *Lactobacillus acidophilus* RMK567, yoghurt, freeze drying, cryo-protectants, GABA production

서 론

발효유의 기능성 소재 개발은 conjugated linoleic acid, angiotensin-I-전환 효소 활성 억제 펩타이드, 면역증진 펩타이드 등을 생성하는 젖산균에 있어서 최근에는 골밀도 증진 펩타이드를 생성하는 젖산균(Imm, 2007) 등, 미생물학적 연구가 중심이 되어 활발히 진행되는 추세에 있다. 새로운 기능성 소재의 하나로 알려지고 있는 γ -aminobutyric acid(GABA)는 chloride ion channel을 통하여 세포 내로 유

입되어 heteromer 구조의 GABA_A receptor 또는 monomer 구조의 GABA_B와 결합하게 되는데 GABA가 결합하는 수용체의 종류에 따라서 신경억제를 통한 불안감 해소 또는 기억력 증강이나 조울증의 발현 등에 영향을 준다. 이것은 뇌의 정보전달 기능에 있어서 glutamic acid의 흥분 유발과 GABA의 흥분 억제라는 상반된 신호의 조절에 의한 균형유지로 정상적인 뇌의 기능을 가능케 한다고 알려져 있다(茅原 紘, 2002). GABA를 생성하는 효소인 glutamate decarboxylase(GAD)는 Schales 등(1946)이 고등 식물체에서 분리하여 연구하였고, 동물의 순환계에서 GABA의 작용모드는 Stanton(1963)에 의해서 연구되었다. 그 후 현미(Oh *et al.*, 2002; Oh and Oh, 2003), 녹차 잎을 비롯한 식물체(Chang *et al.*, 1992)와 미생물 등 생물학적

*Corresponding author : Seung-Yong Park, Department of Animal Science, Cheonan Yonam College University, Choongnam 330-802, Korea. Tel: 82-41-580-1082, Fax: 82-41-580-1241, E-mail: sympark@yonam.ac.kr

방법에 의해서 글루타민산으로부터 GABA를 생성하는 연구(Hayakaya *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 1997)가 이루어져 녹차의 일종인 Gabaron tea의 개발(Omori *et al.*, 1987)과 그 응용효과가 과학적으로 밝혀지게 되었다. 국내에서는 GABA 생성력이 우수한 젖산균으로서 김치에서 *Lactobacillus brevis* OPY-1(Park and Oh, 2005), 숙성 치즈에서 *L. buchneri*(Park and Oh, 2006), 원유에서 *L. acidophilus* RMK567(Lim *et al.*, 2009) 등의 젖산균을 발굴한 연구들이 이루어졌다. 낙농식품인 발효유제품 개발과 관련하여 현미발아 과정에 chitosan을 첨가하면 glutamate decarboxylase 활성이 증가하여 GABA 함량을 증가하는 사실을 밝혀내고 이를 요구르트에 응용한 연구(Park and Oh, 2005)가 이루어졌다. 최근 Santivarankna 등(2008)은 동결 젖산균의 건조 공정에 따른 동결상해(cryo-injury), 열상해(thermal injury) 및 탈수에 의한 불활성화, 저장중 불활성화 기작을 고찰하였으며, 기타 생존률에 영향을 주는 요인으로는 본래적 내성, 수분함량 또는 수분활성도 및 젖산균 세포 회수시기 등(Lorca and de Valdez, 1999; Shin 2003)이 있다. 동결건조 컬처의 저장 중 사멸은 저장 초기에 급격하게 일어나는 것은 세포막을 구성하는 지방조성 중 포화지방산의 비율이 증가하여 세포막의 유연성이 감소하고, 탈수에 의한 세포막의 파괴가 증가하기 때문(King and Su, 1993)이며, 저장 중 생물학적 산화과정이 진행되어 자유 라디칼이 증가하고, 자유 라디칼이 지방산의 친수성을 높여 막 단백질간의 수소결합을 약화시키기 때문(van de Guchte *et al.*, 2002)으로 알려져 있다. 최적 생육온도보다 낮은 온도에서 성장한 세포는 phosphatidylglycerol과 diglycosyldiglycerol 함량이 높아져서 동결과 해동에 대한 저항성이 더 높아지며(Fernandez *et al.*, 2001), 동결건조 스타터의 장기저장 중 생존력에 영향을 주는 요인으로는 수분함량 또는 수분활성도(Higl *et al.*, 2007; Kurtmann *et al.*, 2009), 저장온도(Silva *et al.*, 2002), 산소농도(Kurtmann *et al.*, 2009), 저장온도가 낮은 경우 및 무산소 조건(Castro *et al.*, 1997) 등이 알려져 있다. 젖산균의 냉동내성에 관하여는 배양 중 성장단계별 생존률(Lorca and de Valdez, 1999; Shin, 2003) 또는 성장 적온과 최저 생장온도에서의 배양과 같은 환경적 스트레스에 의한 생존률에 대한 연구(Shin, 2003; Yu *et al.*, 2005a, 2005b)가 국내에서 수행되었다. 그러나 GABA 젖산균을 동결건조 스타터로 상품화하는 과정에 필요한 대량의 젖산균 세포를 얻기 위한 배양조건과 동결건조공정에서 젖산균 세포의 생존성에 대한 연구는 국내에서는 아직까지 시도되지 않았다.

본 연구는 GABA 생성력이 높은 선발 젖산균인 *L. acidophilus* RMK567을 상업용 동결건조 컬처로 생산하기 위하여 회수한 세포 펠렛의 동결건조 공정과 저장 중 생존률을 알아보고, 동결건조 컬처로 제조한 요구르트의 GABA 함량과 동시에 동결건조 공정이 GABA 생성력에

미치는 영향을 알아보기 위한 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

GABA 생성 젖산균

국내 원유에서 순수 분리하여 보존 중인 GABA생성력이 우수한 젖산균으로서 16S rDNA에 의한 동정 결과 *L. acidophilus*로 밝혀진 RMK567 균주를 사용하였다.

GABA 생성 젖산균 배양

보존 중인 *L. acidophilus* RMK567을 3회 이상 MRS broth에서 계대배양을 통하여 활력을 회복시켰다. 세포배양을 위하여 fermenter(Ko-Biotech Co., Korea)에 MRS broth 50 L를 조제하고, 121°C에서 15분간 멸균한 후 39°C로 냉각한 다음 *L. acidophilus* RMK567을 18시간 배양한 MRS broth 1%를 무균적으로 접종하였다. Fermenter의 배양온도는 40±0.5°C로 조정하였고, 배지는 40 rpm의 속도로 완만하게 교반하였으며, 무균공기는 공급하지 않았다. 배양 중에 일어나는 각종의 변화는 fermenter에 장착된 pH meter, DO meter 및 thermometer로 수집하였다. 특히 멸균한 2 N NaOH 또는 1 N KOH 용액을 멸균 reservoir에 채우고 배지의 pH가 5.20 이상 유지되도록 30초당 1초씩 자동공급하였다.

세포회수 및 동결건조

Fermenter에서 배양 24시간 때에 배양액의 온도를 12°C로 낮추어 냉각한 후 원심분리기용 저장탱크에 이송하였다. 젖산균 세포는 균체 회수용 원심분리기(Domoe, Japan)를 16,000 rpm/min으로 회전시켜 cell paste 형태로 회수하였다. 동결보호제로서 glycerol(GR grade, Duksan Chem., Korea), glucose와 polydextrose(Food grade, Samyang Co., Korea) 등을 Table 1과 같이 glycerol(FD-GY), glycerol+glucose(FD-GG), glycerol+polydextrose(FD-GP) 등으로 배합하여 10% 환원탈지유 500 mL에 각각 첨가한 후 121°C에서 5분간 멸균하여 냉각하였다. 각 첨가구에 cell paste를 150 g씩 첨가하고 -45°C로 동결한 후 동결건조기(Freeze Dryer, 증발용량 50 kg, Operon, Korea)에서 냉열기 온도 -50°C, 냉열관 온도 -20°C, 84 mtorr의 진공 하에서 건조하여

Table 1. Composition of cryo-protectants used for freeze drying of the cell paste of *L. acidophilus* RMK567

Cultures	Carrier	Cryo-protectants		
	SMP ¹⁾	Glycerol	Glucose	Polydextrose
FD-GY	100 g	50 mL	-	-
FD-GG	75 g	50 mL	25 g	-
FD-GP	75 g	50 mL	-	25 g

¹⁾SMP: skim milk powder (Samik Dairy & Food, Korea)

FD cell powder를 제조하였다.

동결건조 컬처 제조와 보존

L. acidophilus RMK567 균주로 제조한 FD cell powder (FD-GY, FD-GG, FD-GP)를 각각 100 g와 GABA 생성력이 없는 것으로 확인된 상업용 균주 *S. thermophilus*(CSL, Abiassa, Canada)를 10% 환원탈지유에서 18시간 배양하여 동결건조시킨 분말 50 g과 탈지분유 50 g를 혼합하여 최종 3종류의 FD starter cultures(FDA-GY, FDB-GG, FDC-GP)를 제조하였고 각각 플라스틱 bags에 넣어 밀봉하여 냉장고(LG Electronics, Korea)에서 -18°C로 저장하였다.

요구르트 제조

요구르트 배양탱크(100 L, Buseong Eng., Korea)에 원유를 기초로 하는 요구르트 베이스 70 L을 조제한 후 90°C에서 5분간 살균하였다. 요구르트 베이스는 40°C로 냉각하고 *L. acidophilus* RMK567의 FD culture를 1.0-2.0% 접종하였다. 요구르트 배양 후 최종 pH 4.40이 되는 7시간 때에 배양탱크에 냉각수를 공급하여 요구르트를 4°C로 급속히 냉각시켜 배양을 종료하였다. GABA 생성 기질로서 MSG를 첨가하여 총 4회 요구르트를 제조하였으며, 첨가 수준은 MSG 맛이 느껴지지 않는 0.02% 수준과 GABA 생성량을 고려하여 0.04% 또는 0.05% 수준 첨가하였으며, 대조구로서는 상업용 균주인 ABT-B(Samik Dairy & Food, Korea)를 1.0% 접종하여 요구르트를 제조하였다.

젖산균 측정

Fermenter에 장착된 시료 채취용 밸브를 통하여 무균적으로 채취한 *L. acidophilus* RMK567 배양액, 원심분리 공정 후의 cell paste, 동결보호제와 혼합하여 동결한 deep frozen cell, 동결건조 공정 후 FD cell powder, *S. thermophilus*와 혼합한 FD starter cultures, 2주 및 4주 보존한 cultures, 70 L의 용량으로 제조한 요구르트 등 각 시료의 젖산균 함량을 측정하였다. 측정 시료는 1 mL 또는 1 g을 취하여 0.1% 펩톤용액에서 십진법으로 희석하고 1회용 멸균 petri dish에 분주한 후 멸균 MRS agar를 분주하여 37°C의 항온배양기(Vision Scientific, Korea)에 넣고 48시간 배양하여 나타난 전형적인 젖산균 균락을 계수하여 로그 값(Log CFU/mL)으로 환산하였다.

수분함량 측정

Cell paste와 FD cell powder의 수분함량은 Moisture Determination Balance(FD-600, Kett, Japan)를 이용하여 120°C에서 15분간 건조하여 구하였다.

γ -Aminobutyric acid(GABA) 정성분석

GABA 정성분석은 한국기초과학지원연구원에서 실시하

였다. 요구르트 시료 50 μ L를 취하여 건조 시킨 후 PICO-tag 방법을 이용하여 hydrolysis 및 PITC labeling을 하였다. PITC labeling된 시료를 200 μ L의 solvent A에 용해한 후 0.45 μ m Millipore filter로 여과하여 HPLC injector에 loading하였다. HPLC system은 2기의 Hewlett Packard 1100 series pumps, Waters gradient controller, 및 HP 1100 series autosampler로 구성되었다. 분석용 column은 Nova-Pak C₁₈ column(3.9 \times 300 mm, 4 m, Waters, USA)이었으며, detector는 HP 1100 series detector를 사용하여 254 nm에서 검출하였다. 용출 용매 A는 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN의 혼합용액(pH 6.1)이었으며, 용출 용매 B는 60% CH₃CN 이었다. 용매 A의 flow rate를 1.0 mL/min 로 15분간 용출시키다가 15분에서 18분까지는 12%의 용매 B로 용출하였다. 다시 용매의 flow rate를 1.5 mL/min로 높이고 8분에서 20분까지 용매 B를 20%로 높였고, 20분에서 32.5분까지 46%로, 32.7분부터 용매 B를 100%로 하여 3분간 column을 세척하였다. 그 후 새로운 시료의 injection을 위하여 flow rate를 1.0 mL/min, 용매를 A로 각각 바꾸어 4분간 reconditioning 하였다.

GABA 정량분석

GABA 정량분석은 한국식품연구원에서 실시하였다. 요구르트 시료의 전처리는 Zhang과 Bown(1997)의 방법과 같이 eppendorf tube에 시료 0.1 g과 methanol 400 μ L를 넣고 잘 섞은 다음 60-70°C로 예열된 water bath에서 약 30분간 완전히 고형화 시켰다. 여기에 70 mM LaCl₃ 1 mL을 가하여 잘 섞고 13,600 \times g에서 5분간 원심분리한 후에 상등액 700 μ L과 0.1 M KOH 160 μ L를 eppendorf tube에 첨가한 다음 3-5분간 교반하였다. 다시 13,600 \times g에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 1/5 희석하여 550 μ L를 cuvette에 넣었다. GABA 함량 측정은 Lim 등 (2009)의 방법에 준하여 실시하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 동결보호제의 종류별 저장기간에 따른 생존수에 관한 자료의 통계처리는 SAS(1996)의 General Linear Model Procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 평균 간의 유의성 검정($p < 0.01$)은 Duncan의 다중검정법으로 유의적인 차이를 비교하였다.

결과 및 고찰

L. acidophilus RMK567의 세포 배양

L. acidophilus RMK567의 생장에 관하여 얻은 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 50 L의 MRS broth에 *L. acidophilus* RMK567을 접종한 후의 생균수는 6.76 Log CFU/mL이었으며, 배양 15시간 때에 9.92 Log CFU/mL,

Table 2. Change of pH and viable cell numbers of *L. acidophilus* RMK567 in MRS broth in a fermenter

Incubation time (h)	pH ¹⁾	DO ²⁾	Viable cell number (Log CFU/mL)
0	6.58	9.22	6.76±0.03
15	5.02	0.18	9.92±0.04
18	5.06	0.18	9.73±0.45
21	5.24	0.18	10.01±0.11
24	5.26	0.17	10.04±0.13

¹⁾pH was controlled by 1 N KOH or NaOH.

²⁾DO means dissolved oxygen.

21시간 때에 10.01 Log CFU/mL의 생균수에 도달하였다. 젖산균 세포는 젖산균 수가 10.04 Log CFU/mL에 도달한 24시간 때에 회수하였다. 배양 중 pH를 5.2 이상으로 유지하기 위하여 KOH 또는 NaOH를 공급하였으나, 급격한 생균의 증식이 이루어지는 12시간 이후에는 pH가 5.0 수준으로 떨어졌으며, 정체가 시작된 21시간 때부터는 젖산 생성속도가 감소하여 다시 pH 5.2 수준을 유지할 수 있었다. 동결 및 동결건조 과정에서 높은 생존력을 위해서는 젖산균 배양 중의 적정 pH가 5.5 이상으로 유지되는 것이 필수적이지만(Sandine, 1996), 본 연구에서는 이보다 약간 낮은 수준이었다. 그러나 젖산균에 있어서 동결건조의 적정 pH는 4.6-4.8이라는 Schweigart (1971)의 주장에 비할 때 배양 종료시의 최종 pH 5.26은 적절한 범위에 해당된다고 볼 수 있다.

L. acidophilus RMK567를 배양하는 중의 생장에 관하여 얻어진 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 생장률 상수(k)는 0.454이었으며, 이때 유도기(L)는 5.16시간, 세대 시간(g)은 2.203시간으로 나타났다.

Fermenter에서 배양한 *L. acidophilus* RMK567을 원심분리하여 회수한 cell paste에 대한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 배양액을 세포회수용 원심분리기의 여과막으로부터 회수한 cell paste의 총 중량은 487.5 g(수분함량 40.5%)이었으며, 이는 배양액에 함유된 젖산균의 97.4%에 해당하는 양이었다. Cell paste의 생균수는 12.48 Log CFU/g 이상으로 매우 높았다.

FD cell powder의 생균수

Table 4에서 보는 바와 같이 3종류의 동결보호제와 cell

Table 3. Growth rate of *L. acidophilus* RMK567 in 50 L MRS broth in a fermenter

Generation time ¹⁾ (g)	Lag phase time ²⁾ (L)	Growth rate constant ³⁾ (k)
2.203 h	5.16 h	0.454 generation/h

¹⁾ $g = 1/k$.

²⁾ $L = \log N_t - \log N_0 \times k/0.301$

³⁾ $k = (\log N_t - \log N_0)/0.301 \times g$.

Table 4. Viable cell numbers and moisture contents of the cell paste, FD cell powder, and FD starter cultures of *L. acidophilus* RMK567

Products	Weight (g)	Moisture (%)	Viable cell number (Log CFU/g)
Cell paste	487.5	40.5	>12.48
FD cell powder			
FD-GY	185	ND ¹⁾	12.28±0.04
FD-GG	85	ND	12.77±0.00
FD-GP	138	ND	12.93±0.01
FD starter cultures ²⁾			
FDA-GY	285	4.25	12.42±0.21
FDB-GG	185	3.90	12.60±0.24
FDC-GP	238	4.08	12.91±0.03

¹⁾ND : Not determined.

²⁾FD starter cultures were prepared by mixing 100 g of FD cell powder of *L. acidophilus* RMK567 with 50 g of *S. thermophilus* (CSL, Abiasa, Canada) in the range of the cell number of $\times 10^8/g$ and 50 g of carrier.

paste를 혼합하고 동결건조한 FD cell powder(FD-GY, FD-GG, FD-GP)에 산생성력이 높은 *S. thermophilus*(CSL, Abiasa, Canada)를 혼합하여 제조한 FD starter cultures (FDA-GY, FDB-GG, FDC-GP)의 수분함량은 각각 4.25%, 3.90%, 및 4.08%이었다. FD starter culture의 생균수는 각각 12.42(FDA-GY), 12.60(FDB-GG) 및 12.91(FDC-GP) Log CFU/g이었다. 동결건조에 의한 세포 사멸률은 사용한 동결보호제 중에서 glycerol 이외의 당류를 첨가한 FDC-GG와 FDB-GP가 약간 낮은 것으로 보였으나, 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이와 같이 높은 생균수는, 동결건조를 대신할 수 있도록 조절된 저온진공 탈수조건에서 Response Surface Methodology(RSM)에 의해 설정된 조성인 비지방성 유성분 107.1 g, glycerol 41.0 g 및 Ca 5.6 7 g 일 때 가장 생존률이 높았다는 King과 Lin(1995)의 조성 과 유사한 조성의 동결보호제를 사용한 결과로 보인다.

FD starter culture 저장 중 생존률

L. acidophilus RMK567의 FD starter cultures들의 저장 중 생존률은 Table 5와 같다. 3종류의 FD starter cultures의 생균수는 저장 2주일 이내에 97% 이상 사멸하였다. 저장 2주일 후 FDA-GY는 2.45%, FDB-GG는 1.56%, FDC-GP는 3.24%의 매우 낮은 생존률을 보였다. 저장 8주까지 생균수는 다시 약 90% 정도 감소하여 저장 2주일 후의 생균수에 비하여 각각 15.92%, 13.21%, 8.29%가 생존하였다. 그러나, 동결 건조 직후의 생균수에 비하여 99% 이상 사멸하였다. 저장중인 FD starter cultures의 생균수 감소는 저장기간에 따라 유의적인 차이가 $p < 0.01$ 수준에서 인정되었으나, 동결보호제 처리구간에는 유의성이 인정되지 않았다. 산업적으로 사용되는 동결보호제로서 trehalose-borate가 있으며(Conrad *et al.*, 2000), gelatin(Champagne

Table 5. Survival rate of the cells in three types of FD starter cultures of *L. acidophilus* RMK567 during storage at -18°C

Storage period	FDA-GY		FDB-GG		FDC-GP	
	Cell No. (Log CFU/g)	Survival rate (%)	Cell No. (Log CFU/g)	Survival rate (%)	Cell No. (Log CFU/g)	Survival rate (%)
0 d	12.42±0.21 ^{a,A}	100.0	12.60±0.24 ^{a,A}	100.0	12.91±0.03 ^{a,A}	100.0
2 wk	10.84±0.02 ^{b,A}	2.45	10.82±0.06 ^{b,A}	1.56	11.41±0.09 ^{b,A}	3.24
4 wk	10.49±0.21 ^{b,A}	1.16	10.18±0.04 ^{b,A}	0.35	10.14±0.01 ^{b,A}	0.17
8 wk	10.04±0.06 ^{b,A}	0.39	9.94±0.08 ^{b,A}	0.21	10.33±0.02 ^{b,A}	0.27

^{a,b}Means with the same letter in the column are not significantly different ($p < 0.01$).

^AMeans with the same letter in the row are not significantly different ($p < 0.01$).

등, 1996)은 저장온도에 의한 영향을 최소화시키며, sucrose, maltose, lactose, glucose, fructose 및 sorbitol 등은 membrane phase transition temperature(T_m)을 낮추어 줌으로써 생존성을 높여 준다(Linders *et al.*, 1997)고 하였다. Carrier로서는 탈지유가 25% 농도까지 *L. acidophilus*의 생존력에 가장 우수하나 40% 이상이 되면 거대 입자를 생성하여 건조시간을 지연시키게 되어 세포가 외부에 노출되는 시간이 길어져 열 상해(heat damage) 또는 동결 상해(cryo-injury)를 받게 된다(Espina *et al.*, 1979)고 하였다. 서로 다른 동결보호제의 혼합사용은 synergistic 효과(Santivarankna 등 2007)가 있는 것으로 알려졌으나, Oldenhof 등(2005)은 membrane phase behavior 또는 건조 세포의 단백질 2차 구조에 부정적인 효과를 주기도 한다고 하였다. 본 연구에서 사용한 20%의 무지고형분과 glycerol, glucose, polydextrose 등 3종류의 동결보호제는 동결건조 과정에서 일어나는 동결상해 방지 효과는 높았으나 저장 중에 일어나는 세포사멸 방지 효과는 크지 않은 것으로 보이며, glycerol 단독 효과에 비하여 혼합사용 효과가 크지 않았던 것으로 나타났다.

동결건조 후 저장 중 생존률은 Yu 등(2005^b)이 유아의 변에서 분리한 *L. acidophilus* KH-1를 생장적온에서 배양한 후 -20°C에서 냉동 보존하였을 때의 생존율 8.22% 및 9.86%보다 본 연구에서 얻어진 결과는 약간 낮은 수준이었지만, *L. lactis* LL41-1를 냉동 저장하였을 때 저장 1일 후 생존율은 83%이었고 2주일 후 생존율이 82% 수준(Kim 등, 1998)에 비하면 매우 낮은 수준이었다. 저장 전 동결보호제 처리구 별 생균수는 각각 12.28 (FDA-GY), 12.77(FDB-GG) 및 12.93(FDC-GP) Log CFU/g이었으며, 저장 8주일 후 생균수는 각각 10.04, 9.94, 및 10.33으로 감소하였다. 이 결과로 볼 때, 저장 초기에는 glycerol+polydextrose를 혼합 첨가한 FDC-GP 겔체의 생존수가 비교적 높은 편이었으나 모든 겔체가 유의적인 감소($p < 0.01$)를 보였다. 2주일 이후부터는 감소정도가 완화되면서 비교적 높은 생존률을 유지한 반면에 glucose를 혼합 첨가한 FDB-GG구는 8주일 후에는 0.21% 밖에 생존하지 못하여 생존률이 가장 낮은 편이었다. 저장기간 중 동결보호제 종류에 따른 생균수 감소경향이나 생존률에는 유의적 차이는

없는 것으로 나타났다. 본 연구에서 동결건조 후의 세포 농도 및 생존수는 매우 높았으나 저장 초기의 생존률이 매우 낮았던 이유는 세포배양 중 대수 증식기에 pH가 5.0 수준으로 낮게 유지된 점과 저장 중 비교적 높은 수분함량(3.9-4.25%)으로 인한 높은 수분활성도(Higl *et al.*, 2007), FD culture를 저장하는 온도 4°C보다 훨씬 낮은 -18°C에서 저장하였기 때문(Castro *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005)으로 판단된다. 그러나 -20°C에서 저장한 생균수도 4°C에서 저장하였을 때와 같이 높은 생균수를 유지하였다는 상반된 견해(Champagne *et al.*, 1996)도 보고되었다.

FD starter culture의 GABA 생성력

70 리터의 용량으로 제조한 요구르트에서 GABA 생성 여부를 HPLC 크로마토그램에서 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. Glutamic acid의 peak는 5분 경에 작은 peak로 용출이 되었으며, GABA peak는 threonine peak의 shoulder peak로 나타난 alanine에 이어서 12.5분 경에 용출이 되었다.

Table 6에서 요구르트의 GABA 함량을 정량 분석한 결과를 보면 pH 4.40에 도달한 배양 7시간 때에 MSG 농도에 따라서 GABA 생성량의 차이가 나타났다. 0.02% MSG를 첨가한 요구르트의 GABA 농도는 155.16±8.53 ppm, 0.04% MSG를 첨가한 요구르트에서는 243.82±4.27 ppm, 0.05% MSG를 첨가한 요구르트에서는 그보다 낮은 198.64±23.46 ppm 이었다. Park과 Oh(2006)는 숙성치즈에서 분리한 *L. buchneri* OPM-1과 *Lactobacillus* ssp. OPM-2가 1.0% MSG를 함유한 MRS broth에서 배양 48시간 동안 생성한 GABA 함량은 시간당 각각 92 및 117 mg/L로서 높은 GAD 활성능력을 보였다고 하였다. Lim 등(2009)은 상업용 발효유제품에 사용하는 젖산균들을 1.0% MSG를 첨가한 10%의 환원탈지유에 접종하여 35°C에서 18시간 배양한 결과 *L. acidophilus* 균주들은 pH 4.52-4.21에서 22.65-32.50 ppm, *S. thermophilus* 균주는 pH 4.3에서 30.53 ppm을 생성하였다고 보고하였다. 이 결과들과 비교할 때 *L. acidophilus* RMK567의 FD starter culture로 제조한 요구르트에서 배양 7시간 만에 생성한 GABA 함량은 그보다 5-10배 높은 결과이었다. 한편 김치에서 분리한 *L. brevis* OPY-1균주로 발효한 GABA 현미요구르트의 137 µg/g (Park

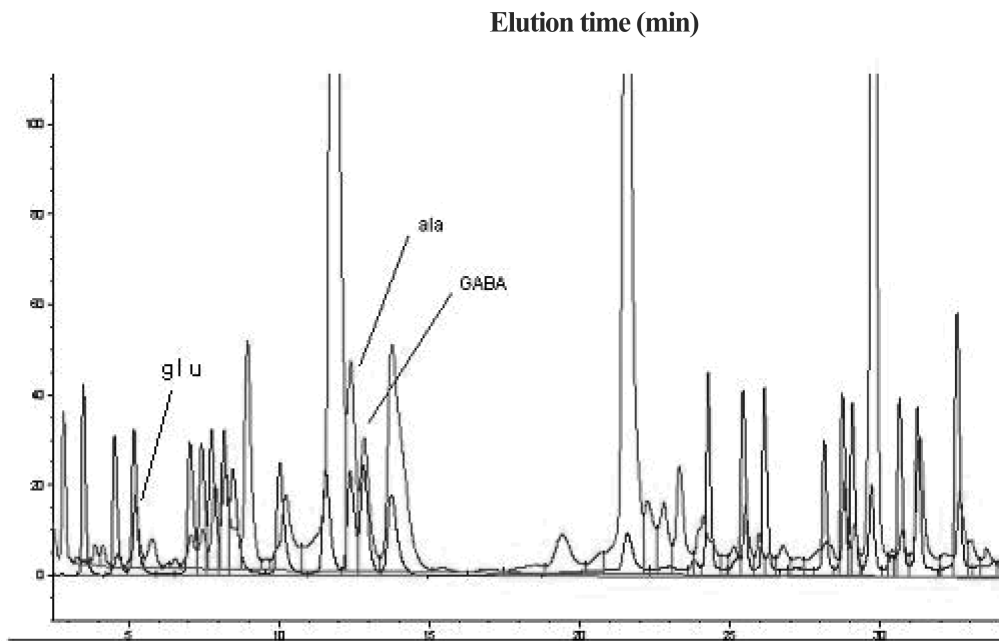


Fig. 1. A chromatogram of amino acids and GABA of a yoghurt sample fermented by 1.0% of *L. acidophilus* RMK567 (FD-GP culture) at 40°C for 7 h.

Table 6. Comparison of GABA concentration in yoghurts with different levels of MSG by the FD starter cultures of *L. acidophilus* RMK567 at 40°C for 7 h incubation

FD Cultures	MSG level	Inoculum ¹⁾	GABA (ppm)	pH ²⁾
ABT-B ³⁾	0.00%	1.0%	0.00± 0.00	4.40
FDA-GY	0.02%	1.0%	155.16± 8.53	4.40
FDB-GG	0.04%	2.0%	243.82± 4.27	4.40
FDC-GP	0.05%	1.0%	198.64±23.46	4.40

¹⁾Freeze dried culture was directly inoculated into the formulated yoghurt base (70 L) and incubated at 40°C;

²⁾Fermentation was stopped at the final pH 4.40.

³⁾ABT-B is a commercial brand of yoghurt FD culture (Samik Dairy & Food, Korea).

and Oh, 2005)의 결과보다도 약간 높은 수준에 해당하는 것이었다. Champagne 등(1996)은 α - 및 β -galactosidase와 같은 효소활성은 20°C에서 저장할 때에는 4°C나 -20°C보다 2배 이상 더 감소되었으며, 생균수는 100배 이상 감소하였다고 하여 동결건조 중에 생균수 감소뿐만 아니라 효소활성에도 영향을 줄 수 있다는 사실을 시사해 주었다.

Table 6에서 보여준 FD culture에 의한 GABA 생성 수준을 Fig. 2에서 0.1% MSG를 첨가한 12% 환원탈지유에 *L. acidophilus* RMK567 계대배양한 균주를 접종하고 배양시간에 따라 측정된 pH와 GABA 생성수준과 비교해보면, 배양 7시간에 생성된 GABA 함량 200-300 ppm보다 약간 낮거나 같은 수준이었다.

0.1%의 MSG를 함유하는 12% 환원탈지유에 계대배양

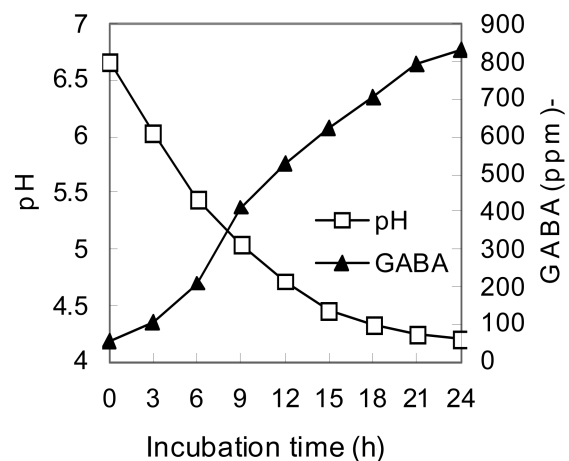


Fig. 2. Changes of pH and GABA concentration in 12% reconstituted skim milk containing 0.1% MSG by *L. acidophilus* RMK567 at 40°C.

한 *L. acidophilus*를 접종하여 배양 18시간때에 도달한 pH는 4.50 수준이었으며, GABA 함량은 600 ppm 이었다. 그러나 FD starter culture로 제조한 요구르트는 배양 17시간에 pH 4.05에 도달하였으며, GABA 생성량도 374.94 ppm으로 증가하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 *L. acidophilus* RMK567의 GABA 생성력은 동결건조 공정에 의하여 감소하지 않는 것으로 보이며, 특히 낮은 산성 환경에서도 생성력이 높게 유지되는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 획득한 세포배양 공정 및 동결건조 공정 조건에 의하여 제조된 *L. acidophilus* RMK567의 FD starter culture는 GABA 함량이 높은 요구르트의 상업적 제조에 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

GABA 생성 젖산균으로 선발한 *Lactobacillus acidophilus* RMK567 균주를 멸균한 50 L의 MRS broth가 들어 있는 fermenter에 접종하여 40°C의 발효온도에서 24시간 배양하였다. *L. acidophilus* RMK567 생균수는 10.04±0.13 Log CFU/mL이었으며, 이때 5.16시간의 유도기(L)를 거쳐 2.203 시간의 세대시간(g)으로 증식하였으며, 성장률상수(k)는 0.454세대/h 이었다. 50 L의 MRS 배양액으로부터 회수한 cell paste의 총 중량은 487 g, 수분함량은 40.5%이었으며, 생균수는 12.48 Log CFU/g 이었다. Cell paste에 glycerol, glucose 및 polydextrose 등의 동결보호제를 첨가하여 -45°C에서 deep frozen하고 84 mtorr의 진공 하에서 3시간 동결건조하여 총 408 g의 FD cell powder를 생산하였다. FD cell powder에 *Streptococcus thermophilus*를 혼합한 FD starter cultures의 수분함량은 4.25%, 3.90%, 및 4.08%이었으며, 생균수는 각각 12.42(FDA-GY), 12.60(FDB-GG)과 12.91(FDC-GP) Log CFU/g이었다. 모든 FD starter cultures는 -18°C 저장 초기부터 급속히 사멸하여 3.24% 이하의 생존률을 보였다. 각 동결보호제 처리구 간의 생균수 차이는 유의성을 보이지 않았으나, 저장기간에 따른 유의성은 $p < 0.01$ 수준에서 관찰되었다. 원유를 기초로 하는 요구르트 조제액에 MSG의 농도를 0.02%, 0.04% 및 0.05%를 첨가하고, FD starter culture로 배양한 요구르트의 GABA 함량은 각각 155.16±8.53 ppm, 243.82±4.27 ppm 및 198.64±23.46 ppm 이었다. 이 결과는 *L. acidophilus* RMK567의 FD starter culture가 동결건조 공정에 의하여 GABA 생성력이 감소하지 않았으며, GABA 함량이 높은 요구르트 제조에 유용하다는 사실을 보여주는 것이었다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 한국식품연구원과 2008년도 임실치즈농협 연구용역사업에 의하여 천안연암대학 유가공기술센터에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Castro, H. P., Teixeira, P. M., and Kirby, R. (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 172-176.
2. Champgne, P., Mondou, F., Raymond, Y., and Roy, D. (1996) Effects of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **29**, 555-562.
3. Chang, J. S., Lee, B. S., and Kim, Y. G. (1992) Changes in γ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 315-319.
4. Sandine, W. E. (1996) Commercial Production of Dairy Starter Cultures, In: Dairy Starter Cultures. Cogan, T. M. and J.-P. Accolas, (eds.), VCH Publishers, Inc., NY, pp. 191-197.
5. Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., and de Pablo, J. J. (2000) Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiol.* **41**, 17-24.
6. Espina, F. and Packard, V. S. (1979) Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *J. Food Prot.* **42**, 149-152.
7. Fernandez, M., M. L., de Valdez G. F., and Anibai, D., E. (2001) Effects of lipid composition on the stability cellular membranes during freeze-thawing of *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 179-184.
8. Hayakaya, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Taniguchi, R., and Oda, K. (1997) Production of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Seibutsu Kogaku.* **75**, 239-244.
9. Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Forst, P., Skibsted, L. H., Kulozik, U., and Risbo, J. (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnol. Prog.* **23**, 794-800.
10. Higuchi, T., Harashi, H., and Abe, K. (1997) Exchange of glutamate and γ -aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* **179**, 3362-3364.
11. Imm, J. Y. (2007) Effect of milk peptide on bone metabolism. Proceed. 64th Symposium. Korean Soc. of Dairy Sci. and Technol., Seoul. Korea, pp. 41-47.
12. Kim, W. S., Khunajakr, N., and Dunn, N. W. (1998) Effects of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. *Cryobiol.* **37**, 86-91.
13. King, V. A. E. and Su, J. T. (1993) Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process Biochem.* **28**, 47-52.
14. King, V. A. E. and Lin, H. J. (1995) Studies on the effects of protectants on *Lactobacillus acidophilus* strain dehydrated under controlled low-temperature vacuum dehydration and freeze-drying by using response surface methodology. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 191-196.
15. Kurtmann, L., Carisen, C. U., Risbo, J., and Skibsted, L. H. (2009) Storage ability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiol.* **58**, 175-180.
16. Lim, S. D., Kim, K. S., and Do, J. R. (2009) Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 15-23.
17. Linders, L. J. M., de Jong, G. I. W., Meerdink, G. and Vantriet, K. (1997) Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *J. Food Eng.* **31**(2), 237-250.
18. Lorca, G. L. and de Valdez G. F. (1999) The effect of suboptimal growth and growth phase on resistance of *Lactobacil-*

- lus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiol.* **39**, 144-149.
19. Oh, S. H., Lee, I. T., Park, K. B., and Kim, B. J. (2002) Changes in the levels of water soluble protein and free amino acids in brown rice germinated in a chitosan/glutamic acid solution. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **6**, 515-519.
 20. Oh, S. H. and Oh, C. H. (2003) Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci. Biotechnol.* **12**, 248-252.
 21. Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Fonseca, F., Passot, S. P., and Marin, M. (2005) Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An *in situ* Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnol. Prog.* **21**, 885-892.
 22. Omori, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T., and Higuchi, M. (1987) Effects of anaerobically treated tea (gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Nogeigaku Kaishi.* **62**, 1449-1451.
 23. Park, K. B. and Oh, S. H. (2005) Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 518-522.
 24. Park, K. B. and Oh, S. H. (2006) Isolation and characterization of *Lactobacillus buchnri* strains with high γ -aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Sci Biotechnol.* **15**, 86-90.
 25. Santivarankna, C., Kulozik, U., and Foerst, P (2007) Alternative drying process for the industrial preservation of lactic acid bacteria cultures. *Biotechnol. Prog.* **23**, 302-315.
 26. Santivarankna, C., Kulozik, U., and Foerst, P. (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter culture preserved by drying processes. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1-13.
 27. SAS (1996) SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute Inc., Cary, NA. USA.
 28. Schales, O., Mims, V., and Schales, S. S. (1946) Glutamic acid decarboxylase of higher plants. *Arch. Biochem.* **10**, 455-465.
 29. Schweigart, F. (1971) The drying of lactic acid bacteria cultures for Mahewu production. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **4**, 20-23.
 30. Shin J. G. (2003) Physiological properties of lactic acid bacteria exposed to low growth temperature. Ph.D. thesis, Seoul National University, Suwon, Korea.
 31. Silva, J., Carvalho, A. S., Ferreira, R., Vitorino, R., Amado, F., Domingues, P., Teixeira, P., and Gibbs, P. A. (2005) Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 775-782.
 32. Stanton, H. C. (1963) Mode of action of gamma-aminobutyric acid on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **143**, 195-200.
 33. Tsvetkov, T. and Brankova, R. (1983) Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different protectants. *Cryobiol.* **20(3)**, 318-323.
 34. Yu, K. H., Kwon I. K., and Kim, G. Y. (2005a) Effects of sub-optimal temperature incubation on the resistance of *Lactobacillus acidophilus* CT 01 to storage and drying. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**, 92-97.
 35. Yu, K. H., Kang S. N., and Park S. Y. (2005b) Physiochemical characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KH-1 isolated from the feces of a breast-fed infant. *J. Food Sci. Nutr.* **10**, 333-339.
 36. van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., and Maguin, E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 187-216.
 37. Zhang, G. and Bown, A. W. (1997) The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochem.* **446**, 1007-1009.
 38. 茅原 紘 (2002) GABAの機能解明と新素材開発の可能性. *Japan Food Science* **41**, 39-43.

(Received 2009.4.20/Revised 2009.6.19/Accepted 2009.6.19)