KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 5, pp. 655~659 (2014)
http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.5.655

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

연구노트

유산균 생존율 향상을 위한 식품첨가물 등급의 동결보호제 탐색

곽현정 · 이나라 · 김태운 · 이종희 · 최학종 · 장자영 · 박해웅*
세계김치연구소 연구개발본부

Use of Food-Grade Protective Agents to Improve the Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria

Hyun Jung Gwak, Na Ra Lee, Tae-Woon Kim, Jong-Hee Lee, Hak-Jong Choi, Ja Young Jang, and Hae Woong Park*
R&D Division, World Institute of Kimchi

Abstract Food-grade protective agents, namely, skim milk, yeast extract, soy powder, and trehalose, were studied for their ability to improve the viability of freeze-dried lactic acid bacteria (LAB), including *Weissella cibaria* SW1-1, *Lactobacillus plantarum* A-1, *Lactobacillus sakei* 2-12 24, and *Leuconostoc citreum* 3526. The best results were obtained with 10% soy powder; approximately 90% cell viability was observed during the freeze-drying process. Increase in the concentration of soy powder did not cause a proportional increase in the survival rate of LAB. Further, no significant difference was observed when two agents were combined in a 1:1 ratio ($p<0.05$).

Keywords: Lactic acid bacteria, freeze drying, cryo-protective agent, viability

서 론

김치는 숙성 중 다양한 유산균에 의해 발효되는 대한민국의 대표적인 전통식품이다. 김치는 주재료인 배추나 무 등을 소금에 절인 후, 고춧가루, 마늘, 생강, 파, 젓갈 등의 여러 가지 부재료를 첨가하여 적당한 온도에서 일정기간 발효된 식품으로, 비타민과 무기질 및 식이섬유를 함유하고 있으며 김치유산균의 정장효과, 항산화, 항암 및 항동맥 경화성 등의 영양생리학적 기능으로 세계적인 건강식품으로 가치를 인정받고 있다(1-3). 발효식품인 김치는 사용하는 재료의 종류가 매우 다양하여 같은 배합비로 김치를 제조해도 내재하는 미생물의 종류와 수에 따라 품질이 달라지며 혼입되는 미생물을 동일하게 조절해도 재료에 따른 성분의 차이나 숙성 및 저장환경에 따라서 미생물의 생육속도가 다르게 된다. 또한 숙성 중 우점되는 유산균의 종류에 따라 품질과 맛에 많은 영향을 미치므로 품질 균일화가 어려운 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 김치 제조 시 종균을 첨가하여 종균이 숙성 중의 김치에서 지배균으로 성장하여 김치의 미생물 조성을 조절함으로써 김치의 맛을 균일하게 조절하는 기술이 필요하다(4).

미생물 첨가제란 각종 발효산업에서 특정미생물에 의한 발효과정을 유도하기 위해 기질 또는 식품에 접종하는 미생물 스타터이다. 김치발효가 자연발효에서 미생물 첨가에 따른 발효조절로 패러다임이 변화함에 따라 우수 김치유산균 자원을 김치 미생물 첨가제로 개발하여 정체되어 있는 김치산업을 활성화시킬 수 있는 기술개발이 절실하다(5). 유럽이나 일본 등의 선진국에서는 발효 제품에 이용할 미생물 첨가제 개발이 활발히 이루어지고 있으나 국내 김치, 젓갈 산업체의 경우 대부분 영세하여 일부 대기업을 제외하고는 독자적으로 미생물 첨가제를 연구 · 개발하는 회사는 거의 없는 상태이다. 최근 김치에서 분리한 유산균의 기능성 규명 및 미생물 첨가제를 사용한 김치의 저장기간 연장에 관한 연구가 진행되었지만(6-9), 현장에서 유산균 안정성 및 안전성이 보장된 유산균 제제기술 개발에 관한 심도 있는 연구는 미흡한 실정이다. 미생물 첨가제는 액상, 분말상 등으로 제형화 할 수 있으나 액상형은 보관이 비교적 어렵고 유통 과정 중 품질 유지에 어려움이 있으나 분말 제제는 품질 유지 및 사용이 용이하다는 장점이 있다. 또한, 미생물의 동결건조는 대부분의 미생물을 장기 보존하는데 효과적이며 저장 및 유통 과정 중에서도 보관이 편리하다. 그러나 동결건조 과정 중 균체의 손상을 받아 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 미생물 생존율을 최대한 높일 수 있는 동결건조 보호제의 선택이 중요하다. 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결건조 시 조건, 건조 조건 등에 따라 다르며 미생물의 종류에 따라서 보호제가 생존율에 영향을 미칠 수 도 있다(10, 11). 본 연구에서는 숙성된 배추김치로부터 분리한 우수한 유산균을 이용하여 경제적인 면에서 저렴한 식품첨가등급의 보호제를 사용하여 동결건조 과정 중 생존율이 극대화된 김치 미생물 분말형 첨가제를 개발하고 김치제품에 바로 적용할 수 있는 식품첨가물 등급의 보호소재를 선발하고자 하였다(12).

*Corresponding author: Hae Woong Park, R&D Division, World Institute of Kimchi, Gwangju 503-360, Korea
Tel: 82-62-610-1728
Fax: 82-62-610-1850
E-mail: haewoong@wikim.re.kr
Received February 19, 2014; revised July 16, 2014; accepted July 22, 2014

재료 및 방법

사용균주 및 보존

숙성된 배추김치로부터 분리된 *Weissella cibaria* SW1-1, *Lacto-*

bacillus plantarum A-1, *Lb. sakei* 2-12 24, *Leuconostoc citreum* 3526 균주를 사용하였다. 실험 균주는 유산균 배양에 적합한 MRS broth (Lactobacilli MRS agar, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 활성화 시킨 후, MRS agar plate에 접종하여 4°C에서 4주 간격으로 계대 배양하면서 보관하였다. 실험 균주의 장기 보관방법으로 글리세롤 최종농도 20%로 미생물 현탁액을 제조하여 −80°C에서 보존하여 유전적 변이를 최소화 하였다(13).

시험균주의 포집 및 계수

MRS broth에 0.2% bromophenol blue (BPB, Fisher Scientific Co., Springfield, New Jersey, USA) 지시약 1%를 첨가하여 MRS-BPB 배지를 제조하였다. 미생물 현탁액 100 μL을 도말 후 30°C에서 36-48시간 동안 배양하여 미생물 군집의 숫자를 계수하였다.

동결건조

실험 균주의 초기농도를 각각 2.8×10^9 CFU/mL로 고정한 후, 균 현탁액 1 mL과 동결보호제 용액 1 mL을 혼합하여 동결보호용액이 유산균에 충분히 확산되게 하기 위하여 1시간 동안 보관한 후 2시간 동안 −20°C에서 보관한 후 −80°C에서 2시간 보관하여 냉동시킨 후 동결건조기(EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 −80°C에서 24시간 동안 동결건조 하였다(14-17).

보호제 종류별 유산균의 생존율 검정

김치미생물 생존율 향상을 위한 동결건조보호제로 식품첨가등급의 탈지유(Difco, Detroit, MI, USA), 효모추출물(Difco, Detroit, MI, USA), 콩가루(TATUA, Morrinsville, NewZealand), Trehalose (WAKO, Osaka, Japan)를 사용하였다. 각 보호제 농도를 10%(v/v)로 설정하고 0.9% 생리식염수를 대조구로 사용하여 동결건조 후 생존율을 비교하였다. 각 보호제를 1:1의 비율로 혼합하여 보호제의 최종농도 10%가 되도록 설정하고 동결보호제 조합에 의한 유산균 생존율의 상승효과를 검증하였다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복 측정하여, 그 평균값으로 나타내었으며, SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 19, SPSS Inc, Chicago IL, USA), software package 프로그램을 이용하여 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)과 시료간의 차이 유무를 파악하기 위한 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$의 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

보호제별 김치미생물의 생존율 검정

네 가지 식품첨가등급의 동결보호제를 첨가하여 김치미생물의 동결보호효과를 검정한 결과 모든 경우에서 동결보호제를 사용

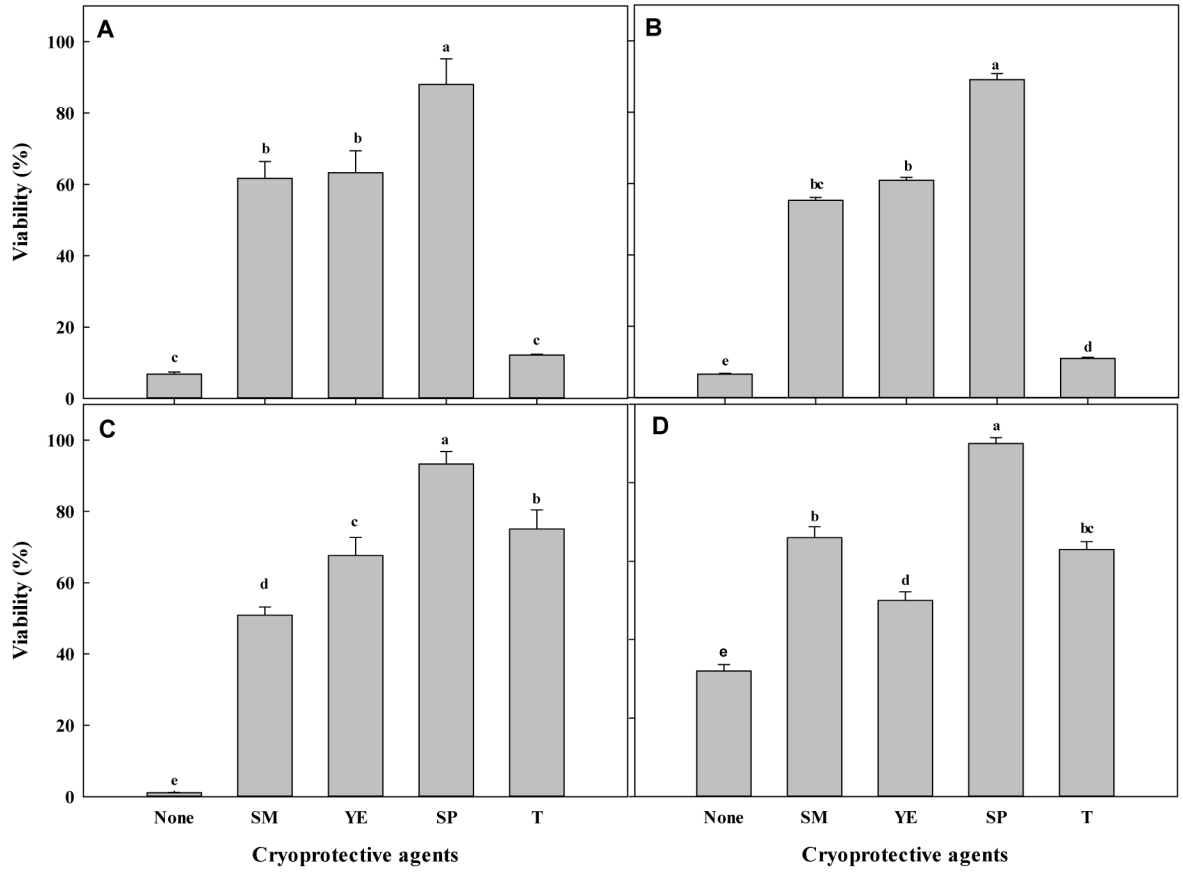

Fig. 1. Viability of lactic acid bacteria, e.g., *W. cibaria* SW1-1 (A), *Lb. plantarum* A-1 (B), *Lb. sakei* 2-12 24 (C) and *Leu. citreum* 3526 (D) during freeze drying process depending on different protective agents. SM, Skim milk; YE, Yeast extract; SP, Soy powder; T, Trehalose. Data were expressed as mean±SD (n=3). Different characters were significantly different ($p<0.05$).

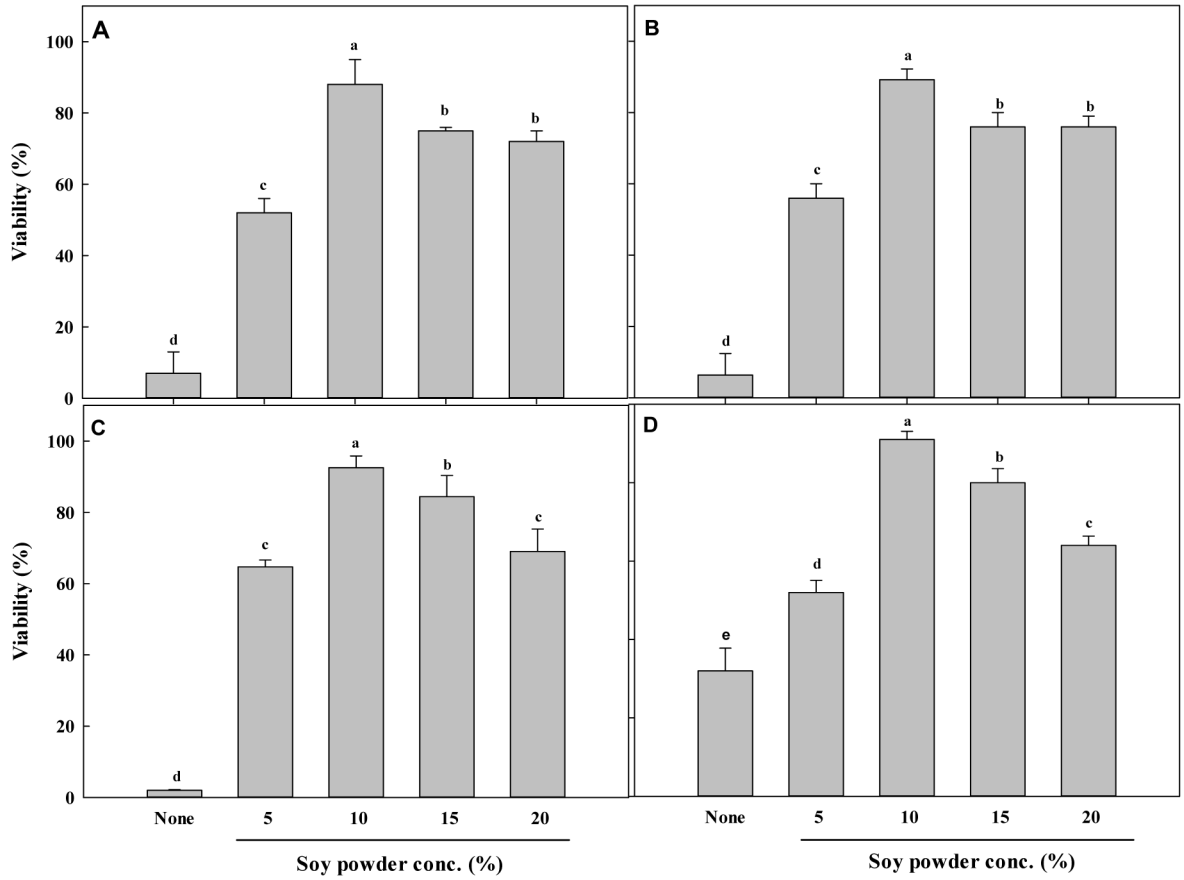

Fig. 2. Viability of lactic acid bacteria, e.g., *W. cibaria* SW1-1 (A), *Lb. plantarum* A-1 (B), *Lb. sakei* 2-12 24 (C) and *Leu. citreum* 3526 (D) during freeze drying process depending on the content of soy powder. Data were expressed as mean±SD (n=3). Different characters were significantly different (p<0.05).

하지 않은 처리구보다 생존율이 증가하였다(Fig. 1). 네 가지 균주 모두에서 콩가루를 보호제로 사용하였을 경우 보호효과가 우수하여 *Lb. sakei* 2-12 24 균주의 경우 동결건조 직후 93%의 가장 높은 생존율을 나타내었다. *W. cibaria* SW1-1 및 *Lb. plantarum* A-1의 경우에서도 각각 88%와 89%의 높은 생존율을 기록하였다. *Leu. citreum* 3526의 경우에서도 90%의 생존율을 나타내었다. 콩은 단백질, 섬유질, 무기질, 지질, 각종 비타민 등과 lysine을 비롯한 다양한 아미노산류가 풍부한 식품소재로서(18-20), 본 연구에서 동결보호제로 선정한 콩가루는 식품첨가등급의 경제적인 소재로 동결건조 중 실험균주를 보호해 주는 역할을 수행하여 동결건조 중 김치미생물의 생존율 향상에 크게 기여하였다. 일반적으로 동결보호제로 널리 사용되고 있는 탈지유는 식품에 첨가할 경우 풍미에 영향을 미칠 수 있으며 또한 섭취 시 유당소화 불량 및 유당불내증 환자의 경우 섭취하는데 어려움이 있으나 콩가루를 사용할 경우 이러한 점을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 식물성 단백질과 칼슘 및 철분이 풍부하여 단백질이 보강되고 풍미가 향상될 수 있다. 본 실험에 사용한 콩가루는 9.7%의 질소함량과 sodium, phosphorus, chloride, potassium, calcium 등의 무기염류가 함유되어 동결건조 과정 중 탈지유에 비해 높은 보호효과가 나타난 것으로 사료된다. 효모추출물 처리구에서도 60%이상 보호효과를 기록하여 동결보호제로서의 가능성을 제시하였고, 일반적으로 유산균의 동결보호제로 사용되는 탈지유 처리구에서 실험균주의 생존율은 각각 50-60% 수준으로 나타내어 본 연구결과 중 보호효과가 뛰어난 콩가루보다 비교적 낮은 수준이었다. 천연 비환원성당인 trehalose는 단백질의 동결에 의한 보호작용 건조에 따른 세포 보호 작용 등을 수행하여 미생물의 생명 보전 및 건조에 의한 영향에 작용하는 보호물질로서(21), *W. cibaria* SW1-1 및 *Lb. plantarum* A-1 균주의 경우 20% 미만의 낮은 생존율을 기록하였으나, *Lb. sakei* 2-12 24와 *Leu. citreum* 3526의 경우에는 각각 75%, 63%의 비교적 높은 생존율을 나타내어 미생물의 종류에 따른 생존율의 차이를 확인하였다. 또한 동결 보호제 종류별 유산균의 생존율에 미치는 효과는 균의 차이, 보호제 농도의 차이 등에 영향이 있는 것으로 나타났다.

이상 사용된 식품첨가등급의 네 가지 보호제는 유산균제제의 동결보호효과가 탁월하여 건조과정 중 미생물의 생존율을 극대화 시키는 장점이 있다. 실제 미생물제제의 제조 시 동결건조 중 발생하는 유산균의 손실을 최소화하여 초기비용을 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 향후 내산성, 내담즙성, 장내부착능 향상을 고려한 보호제 조합이 연구된다면 김치미생물을 이용한 미생물첨가제 및 장내균총 조절용 프로바이오틱스 제품개발 등 다양한 산업적 이용방안에 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

동결건조 보호제 농도에 따른 김치 미생물 생존율 조사

보호제 별 실험균주의 생존율이 가장 우수한 콩가루를 사용하여 농도에 따른 영향을 조사하였다. 모든 실험균주에서 동결건조 후 생존율은 콩가루 농도 의존적으로 증가하지 않았다. *Leu. citreum* 3526 균주의 경우 콩가루 10% 처리구에서 동결보호 직후 94%의 가장 높은 생존율을 기록하였으며, 15% 및 20%로 증

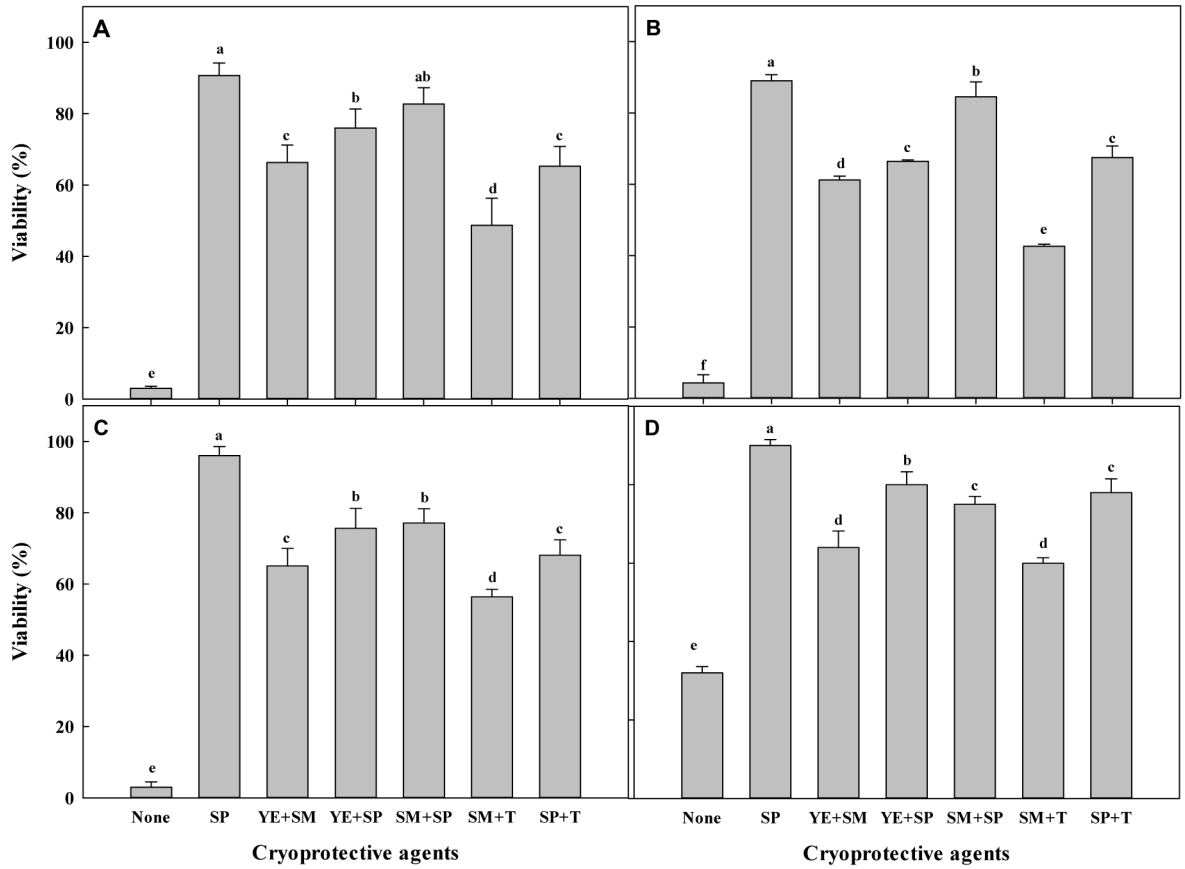

Fig. 3. Viability of lactic acid bacteria, e.g., *W. cibaria* SW1-1 (A), *Lb. plantarum* A-1 (B), *Lb. sakei* 2-12 24 (C) and *Leu. citreum* 3526 (D) during freeze drying process depending on the combination of different protective agents. SM, Skim milk; YE, Yeast extract; SP, Soy powder; T, Trehalose. Data were expressed as mean±SD (n=3). Different characters were significantly different (p<0.05).

가하였을 때 생존율은 각각 88%, 64%로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). *W. cibaria* SW1-1, *Lb. plantarum* A-1 및 *Lb. sakei* 2-12 24 균주의 경우에서도 *Leu. citreum* 3526와 유사한 경향을 나타내어 10% 처리구에서 각각 88%, 89%, 93%의 높은 생존율을 나타내었지만, 15%이상 증가하였을 때 유산균의 생존율은 70-84% 수준으로 동결보호효과가 감소하였다. 이는 유산균의 동결건조 시 탈지유의 농도를 10%에서 15%로 증가하였을 때 생존율이 58%에서 42%로 감소하였던 임 등(22)의 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 동결건조 중 유산균 보호효과가 극대화 될 수 있는 동결보호제의 적정농도가 있다고 판단되었다.

동결건조 보호제 조합에 따른 김치 미생물 생존율 검정

두 가지 동결보호제를 조합에 따른 김치 미생물의 모든 경우에서 40% 이상의 생존율을 나타내었다. 특히, *Lb. sakei* 2-12 24 균주의 경우 탈지유와 콩가루를 조합하여 동결보호제로 첨가하였을 때, 79%의 생존율을 나타내어 10% 탈지유를 단독으로 처리하였을 경우보다 상승효과를 나타내었다. 효모추출물의 경우 단독으로 사용하였을 경우보다 콩가루나 탈지유를 혼합하여 사용하였을 때 10-20%의 보다 높은 생존율을 나타내었다. Trehalose 처리구의 경우에도 단독으로 사용하는 것 보다 콩가루나 탈지유와 조합하여 사용하였을 경우 김치 미생물의 생존율이 약 5% 증가하였다. Zayed 등(23)에 의하면 trehalose를 단독으로 사용할 경우 34%의 생존율을 보였지만 탈지유나 설탕과 혼합하여 사용할 경우 78% 이상의 생존율을 나타내어 보호제 혼합 사용시 생존율 상승 효과를 확인하였다. *W. cibaria* SW1-1 균주에서도 효모추출물과 탈지유를 조합하여 동결보호제로 첨가하였을 때 66%의 생존율을 나타내었고, 효모추출물과 콩가루를 조합한 처리구에서는 76%의 생존율을 나타내어 10% 탈지유를 단독으로 처리하였을 경우 62% 생존율보다 비교적 높은 상승효과가 있는 것으로 나타났다. Trehalose를 탈지유나 콩가루와 조합한 처리구에서는 각각 48%, 65%의 생존율을 나타내어 상기 조합은 동결보호제로 사용하는 것은 적합하지 않다고 판단하였다. *Lb. plantarum* A-1균주의 경우 탈지유와 콩가루를 조합한 처리구에서 85%의 생존율을 나타내어 탈지유 단독 처리구의 생존율에 보다 24% 상승하였다. *Leu. citreum* 3526의 경우에서도 효모추출물 단독으로 사용시 50%의 생존율을 나타내었으나 콩가루와 효모추출물을 혼합하여 사용한 보호제의 생존율은 80%로 혼합하여 사용한 처리구에서 보호효과가 30% 상승하였다. Otero 등(24)에 의하면 동결보호제로서 탈지유 6%를 단독으로 사용하는 것 보다 유당과 설탕을 탈지유에 각각 혼합하여 사용한 처리구에서 보호효과가 10% 이상 상승된다고 보고하였다. 본 연구에서도 탈지유 단독처리구보다 콩가루와 1:1 조합인 경우 생존율의 증가를 확인하였다.

요 약

김치제조가 미생물첨가에 따른 발효조절로 패러다임이 변화함에 따라 김치에서 분리한 유용 미생물의 분말형 제제 기술을 위한 식품첨가등급의 우수한 보호제를 탐색하고자 하였다. 모든 실

험균주에서 보호제를 사용할 경우 무처리구보다 높은 생존율을 나타내었고, 특히 10% 콩가루를 동결보호제로 사용하였을 때 90% 수준의 높은 보호효과를 나타내었다. 콩가루의 농도를 증가시킨 경우 동결건조 후 실험균주의 생존율은 농도 의존적으로 증가하지 않았다. 두 가지 보호제를 1:1의 비율로 조합하여 적용할 경우 생존율 향상에 관한 상승효과는 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가 식품개발사업 연구비 지원(#311041-3) 및 세계김치연구소 주요사업(KE1403-1)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

References

1. Yang EJ, Chang HC. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 36: 276-284 (2008)
2. Kim YS, Shin DH. Hygienic superiority of Kimchi. J. Food Hyg. Safety 23: 91-97 (2008)
3. Lim JH, Park SS, Jeong JW, Park KJ, Seo KH, Sung JM. Quality characteristics of Kimchi fermented with abalone or sea tangle extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 450-456 (2013)
4. Moon SH, Chang HC, Kim IC. Development of a novel medium with Chinese cabbage extract and optimized fermentation conditions for the cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 1125-1132 (2013)
5. Jin HS, Kim JB, Yun YJ, Lee KJ. Selection of Kimchi starters based on the microbial composition of Kimchi and their effects. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 671-675 (2008)
6. Bae HJ, Lee JY. Quality characteristics of Kimchi with added stevioside containing sweetener. Korean J. Food Cult. 28: 99-106 (2013)
7. Kim HJ, Shin HK, Yang EJ. Production and fermentation characteristics of Mukeunji with a mixed starter. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 1467-1474 (2013)
8. Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park KJ, Park MS. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 446-452 (2011)
9. Seo JH, Lee H. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 681-687 (2007)
10. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze dried bacteria. J. General Appl. Microbiol. 54: 9-24 (2008)
11. Lim YB, Paek NS, Kim YM. Screening of lactic acid bacteria for the development of probiotics and the effect of cryoprotectant agents. Korean J. Food Nutr. 14: 441-445 (2001)
12. Lee KW, Park JY, Chun JY, Han NS, Kim JH. Importance of *Weissella* species during Kimchi fermentation and future works. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 38: 341-348 (2010)
13. Dianawati D, Mishra V, Shah N. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. Food Res. Int. 51: 503-509 (2013)
14. Bedu-Addo FK. Understanding lyophilization formulation development. Pharm. Technol. 28: 10-18 (2004)
15. Santagapita PR, Mazzobre MF, Buera MP. Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. Food Res. Int. 47: 321-330 (2012)
16. Zhou ZD. Li GY, Li YJ. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. Int. J. Biol. Macromol. 47: 21-26 (2010)
17. Lee JS, Cha DS, Park HJ. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J. Agr. Food Chem. 52: 7300-7305 (2004)
18. Joung SE, Cho SH, Lee HG. A study on the effects of processing method on the quality of soybean da-sik. Korean J. Soc. Food Sci. 13: 356-363 (1997)
19. Jeong KH, Seo JH, Kim JH, Kim KS, Jeong YJ. Monitoring on characteristics of soybean flour hydrolyzed by various proteolytic conditions. Korean J. Food Preserv. 13: 71-76 (2006)
20. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 46: 205-229 (2003)
21. Shi P, He P, Teh TKH, Morsi YS, Goh JCH. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. Powder Technol. 210: 60-66 (2011)
22. Lim YB, Paek NS, Kim YM. Screening of lactic acid bacteria for the development of probiotics and the effect of cryoprotectant agents. Korean J. Food Nutr. 14: 441-445 (2001)
23. Zayed G, Roos YH. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. Process Biochem. 39: 1081-1086 (2004)
24. Otero MC, Espeche MC, Nader-Macias ME. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. Process Biochem. 42: 1406-1411 (2007)