



## 저장기간에 따른 동결건조 농후 발효유 내 유산균 생균수 변화

임예서 · 홍식 · 신용국 · 강신호\*

서울우유협동조합 중앙연구소

### Changes in the Viability of Lactic Acid Bacteria during Storage of Freeze-Dried Yogurt Snacks

Yeseo Lim, Shik Hong, Yong Kook Shin and Shin Ho Kang\*

R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 15407, Korea

#### Abstract

The majority of food drying processes are based on the use of thermal energy. However, such methods may deteriorate the quality of the final product. Freeze-drying is one of the most useful processes for drying thermosensitive substances. Food that contains beneficial bacteria, for example, is susceptible to heat treatment, but during freeze-drying beneficial bacteria are preserved in these food items. The primary goals of this study were to develop yogurt snacks and to compare the viability of lactic acid bacteria (LAB) in yogurt snacks under different freeze-drying temperatures. In addition, the survival of LAB during storage was investigated. Survival of LAB in freeze-dried yogurt snacks gradually decreased over 16 weeks of storage. LAB had a residual viability of 25.5% after 16 weeks of storage at room temperature. LAB survived better in freeze-dried plain yogurt snacks than in freeze-dried strawberry yogurt snacks during storage. Freeze-dried yogurt snacks contained 11.9% fat, 57.1% carbohydrate, and 18.7% protein. In conclusion, the viability of LAB in freeze-dried yogurt snacks depends on the temperature during freeze-drying: the higher the freeze-drying temperature, the lower the viability of LAB in yogurt snacks. The viability of LAB in yogurt snacks was also dependent on the moisture content and nutritional value.

Keywords: freeze drying, lactic acid bacteria, viability of lactic acid bacteria

#### 서 론

프로바이오틱스란 장내 균총의 균형을 개선함으로써 숙주의 건강에 긍정적인 역할을 하는 살아있는 미생물 균체를 지칭한다. 프로바이오틱스의 대표적인 건강 기능성으로는 유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 배변활동 원활 등이 있다. 그 밖에도 혈압강하, 지질대사 개선, 면역조절 작용, 감염 방어 작용, 알레르기 억제 작용, 항암작용 등의 기능성이 보고되고 있다(Schrezenmeir, 2001). 장내에서 이러한 건강 기능성을 나

타내기 위해서는 일정 수준 이상의 생균수가 유지되어야 한다. 그러므로 프로바이오틱스 제품의 경우, 유통기한 내에 일정 생균수가 유지되는 것이 매우 중요하다.

동결건조는 프로바이오틱스 균주를 보존하는 가장 일반적인 방법으로 미생물을 장기 보존하는데 효과적이며, 저장 및 유통 과정 중에서도 보관이 편리하다(Gwak, 2014). 하지만 동결 및 동결건조 공정을 거치며, 세포는 낮은 온도 및 수분 활성 등의 가혹한 조건하에서 그 생존율이 낮아지게 된다. 동결 건조 시 균주의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 동결 건조 조건, 동결방지제(Cryoprotectant)의 종류 및 저장 조건 등이 있다.

동결 보호제를 사용할 경우, 동결 및 동결건조 공정 중의

\* Corresponding author: Shin Ho Kang, R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 15407, Korea. Fax: +82-31-491-9179, E-mail: shkang@seoulmilk.co.kr

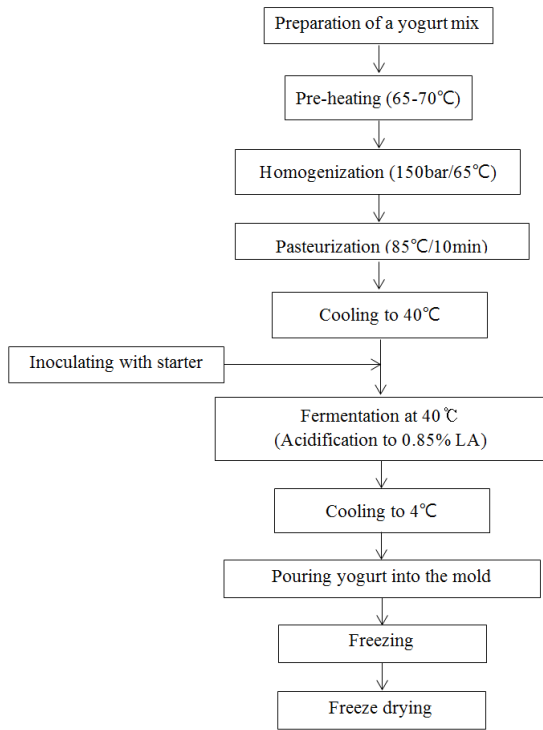


Fig. 1. Process for the manufacture of freeze dried yogurt.

유산균 생존율 및 유산균의 젖산 생성 능력을 높일 수 있다. 선행연구에 따르면, 당 및 단백질 성분들은 동결건조 공정 및 저장 기간 중의 세균 및 효모를 보호하여 그 생존율을 높인다고 보고하고 있다. 특히, 동결 건조 시 다양한 당이 서로 다른 락토바실러스 균에 보호작용이 있음이 보고되고 있다(Leslie *et al.*, 1995; Linders *et al.*, 1997; Selmer-Olsen *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2003, 2004). 또한 우유나 유단백 또한 일반적인 동결보호제로 사용되고 있다(Abraham *et al.*, 1990; Abadias *et al.*, 2001; Blanquet *et al.*, 2005; Otero *et al.*, 2007).

따라서 본 연구에서는 동결건조 공정 이후의 유산균 생균수를 높일 수 있는 농후 발효유를 개발하고, 유산균의 생존율을 높일 수 있는 동결건조 온도를 설정하고자 한다. 또한 동결건조 농후발효유의 저장기간 중의 유산균 생균수를 변화를 살펴봄으로써 농후 발효유의 종류에 따른 유산균 생존율 차이를 비교분석하고, 저장 기간 중의 유산균 생균수가 건강 기능식품 수준으로 유지되는지 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 농후 발효유의 제조

플레인 및 딸기 농후 발효유의 배합비는 Table 1과 같다. 배합비에 따라 요거트 믹스를 혼합한 후, 85°C에서 10분간 살균하고, 40°C까지 냉각하였다. 냉각한 요거트 믹스에 상업용

Table 1. The mixture ratio of yogurt mix

	Mixture ratio (%)	
	Freeze dried plain yogurt	Freeze dried strawberry yogurt
Raw milk	73.0	70.0
Skim milk powder	4.8	4.8
Whey protein isolate	0.9	0.9
Glucose	10.3	10.3
Purified water	11.0	11.0
Strawberry concentrate	-	3.0
Total	100.0	100.0

혼합 균주인 ABT-5(Chr Hansen, Milwaukee, Wis., U.S.A)를 접종하였다. 유산균을 접종한 후, 적정산도가 0.85%가 될 때까지 37°C에서 배양하였다. 적정산도에 도달하면, 20°C까지 냉각시켜 발효를 종료시키고, 동결건조를 위한 전처리를 실시하기 전까지 0~10°C 냉장온도에 보관하였다. 농후 발효유 내 당의 종류에 따른 유산균 생존율을 파악하기 위해 Table 1에 제시된 플레인 농후 발효유의 배합비를 구성하는 주요 당류인 포도당을 각각 1%, 4%의 이소말토올리고당으로 대체하여 비교 분석하였다.

### 2. 동결건조

동결 건조한 농후 발효유를 몰드에 붓고, -50°C에서 24시간 동안 동결하였다. 동결된 농후 발효유를 몰드로부터 제거한 후, 상업용 동결건조기를 통해 응축기 온도 -31°C, 압력 5mbar의 조건 하에서 24시간 동안 동결건조시켰다. 동결 건조 온도 조건에 따른 유산균 생균수를 살펴보기 위해 열판 온도를 조절하여 농후 발효유의 품온이 55, 70°C가 되도록 조정하였다.

### 3. 유산균 수 측정

플레인, 딸기 농후 발효유와 동결건조 샘플 내 유산균 생균수를 파악하기 위해 시료 1g을 취하여 멸균 생리 식염수에 십진희석법으로 희석한 후, BCP plate count agar(Eiken chemical Co. Ltd, Japan)에 표준평판법으로 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 평판 배지에 노란색 콜로니 수를 측정하여, 유산균 수를 CFU/g으로 표시하였다. 또한 저장기간에 따른 유산균 생균수를 파악하기 위해 일정 간격을 두고, 16주간 유산균 생균수 변화를 파악하였다.

### 4. 일반성분 분석

동결건조 농후 발효유 내 수분, 회분, 조지방, 조단백, 조회분 함량을 측정하였다. 탄수화물은 100에서 조지방, 조단백

질, 조회분 함량을 뺀 값으로 나타냈다. 수분은 105°C 상압 건조법으로 측정하였고, 조단백질은 Auto-Kjeldahl 법으로 측정하여 질소계수 6.25를 곱해 조단백질 함량(%)을 표시하였다. 조지방은 Soxhlet 추출장치로 추출하여 측정하였고, 조회분은 550°C 건식 회화법으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 동결건조 농후 발효유의 일반성분 분석

동결건조 농후 발효유의 일반 성분 함량은 Table 2와 같다.



Fig. 2. Freeze dried plain (left columns) and strawberry (right columns) yogurt snack.

Table 2. Energy nutrient composition of freeze dried yogurt snacks

FD yogurt snack variety	Carbohydrate (%)			Protein (%)	Fat (%)	Calories (kcal/100 g)
	Simple	Other	Total			
Plain	53.4	3.7	57.1	18.7	11.9	410.3
Strawberry	54.3	6.4	60.7	17.5	11.3	414.5

Table 3. Effects of freeze drying conditions on the viability of LAB in FD yogurt snacks

	Heating plate temperature	
	55°C	70°C
Viability of LAB in FD plain yogurt	1.4×10 <sup>10</sup> CFU/g	8.3×10 <sup>7</sup> CFU/g
Rehydration ratio	4.20	4.24

Table 4. The viability of lactic acid bacteria in plain yogurt and freeze dried plain yogurt

	Type of sugar		
	10.3% glucose	1% IMO+9.3% glucose	4% IMO+6.3% glucose
Plain yogurt	8.45×10 <sup>8</sup> CFU/g	9.25×10 <sup>8</sup> CFU/g	9.85×10 <sup>8</sup> CFU/g
Freeze dried plain yogurt	6.79×10 <sup>8</sup> CFU/g	7.86×10 <sup>8</sup> CFU/g	8.59×10 <sup>8</sup> CFU/g
The ratio of the lactic acid viability before and after freeze drying	80.3%	85.0%	87.2%

두 종류의 동결건조 농후 발효유의 단백질 함량은 17~18%, 지방은 11~12% 정도 함유하고 있다. 탄수화물은 동결건조 플레인, 딸기 농후 발효유의 경우, 각각 57.1, 60.7% 함유하였다. 탄수화물에서의 이러한 차이는 탄수화물 위주로 구성된 딸기 농축 과즙(65 °brix)의 첨가에 의한 것으로 보인다.

### 2. 동결건조 온도 조건에 따른 유산균 생균수 변화

동결된 농후 발효유의 품온이 55, 70°C가 유지되도록 가열 온도를 조절하여 건조시킨 뒤, 동결 건조물 내 유산균 생균수를 살펴보았다. Table 3을 통해 알 수 있듯이, 55°C에서의 동결건조물에 비해 70°C 동결건조물은 건조 비율은 높았지만, 유산균 생균수는 적었다. 온도는 유산균 생육에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나이다. *Streptococcus thermophilus*는 분무건조 시 배기 온도 조건에 따라 유산균의 생존율이 5~34% 범위에 있었다. 즉, 배기 온도가 높을수록 유산균의 생균수는 감소하였다(Brian *et al.*, 1997; Gardiner *et al.*, 2000). 이와 마찬가지로 동결건조에서도 열판 온도를 상승시킬 경우, 건조 효율이 좋아져 재수화성은 높아지지만, 유산균 사멸은 촉진되는 것으로 여겨진다. 또한 55°C에 비해 70°C 온도조건에서 동결 건조한 경우, 건조물의 갈변화 현상이 뚜렷하게 나타났다. 이는 높은 온도에서의 비효소적 갈색화 반응이 촉진되어 나타난 현상으로 사료된다.

### 3. 농후 발효유 내 당의 종류에 따른 동결건조 전후의 유산균 수 변화

농후 발효유 내 포도당의 일부를 이소말토올리고당으로 대체하였을 때, 발효유 내 유산균 생존율이 높아졌다(Table 4). 이소말토올리고당을 Prebiotics로 첨가하여 농후 발효유를 제조한 경우, *Bifidobacterium spp.*와 *Lactobacillus spp.*의 증식에 도움을 준다는 보고가 있다(Bansal, 2008). 4°C 냉장조건에서 4주간 유산균 생균수 변화를 살펴본 결과, 프럭토올리고당을 함유한 발효유 내 유산균 생균수가 대조군에 비해 높았다(Capela *et al.*, 2006). 이처럼 발효유 내에 포도당의 일부를 이소말토올리고당으로 대체했을 때, 유산균이 이를 분해하여 에너지원으로 활용함으로써 유산균의 생존율이 높아진 것으로 사료된다.

동결건조 공정을 거친 이후에도 포도당의 일부를 이소말토올리고당으로 대체하였을 때, 유산균의 생존율이 높았다 (Table 4). 이와 관련된 선행연구에서도 정상기세포(Stationary phase cell)에 설탕, 프럭토올리고당, 이눌린, 탈지분유 중 하나를 처리하였을 때, 대조군에 비해 동결 및 동결건조 이후, 저장기간 중의 세포 생존율이 높았다. 특히, 다른 첨가 물질에 비해 프럭토올리고당을 처리했을 때, 동결 및 동결건조 공정에 의한 세포 사멸 보호 능력이 뛰어났고, 대조군에서는 가장 낮은 세포 생존율과 세포막 완전성(membrane integrity)을 보였다(Clarrissa *et al.*, 2007). 이러한 점을 고려할 때, 동결 및 동결건조 시 이소말토올리고당이 유산균의 세포막 손상을 보호하여 그 생존율을 높인 것으로 보인다.

#### 4. 동결건조 농후 발효유 내 유산균 수 변화

농후 발효유를 동결 건조하였을 때 초기 유산균 생균수 대비 85% 정도의 유산균 생존율을 보였다. Brian 등(1997)에 따르면, 유산균의 생존율은 동결 공정에서는 큰 변화가 없었지만, 동결 건조 공정을 거치면서 크게 감소한다고 보고하고 있다. 이러한 점을 고려할 때, 본 연구에서의 유산균 생존율 감소 또한 동결 공정보다는 탈수에 의한 세포 손상에서 기인된 것으로 보인다. 농후 발효유 내 유산균 생존율은 동결건조 공정을 거치면서 감소했지만, 그 감소 정도는 크지 않았다. 이는 농후발효유 제조에 투입된 탈지분유와 원유에 의한 것으로 사료된다. 첨가된 무지유고형분이 유산균의 세포막 구성 성분을 안정화시켜 유산균의 세포손상을 최소화함으로써 생존율을 높인 것으로 보인다(Castro *et al.*, 1995). 선행연구에서도 김치유산균에 탈지유를 10% 첨가했을 때, 동결건조 이후 유산균 생존율이 증가하였고(Gwak *et al.*, 2014), *Lactobacillus salivarius*의 경우에도 대조군에 비해 탈지분유를 첨가하였을 때, 동결건조 이후 유산균 생존률이 높아졌다고 보고되고 있다(Gaber *et al.*, 2004).

동결 건조한 농후 발효유 내 유산균 생존율은 저장기간이 지남에 따라 점차적으로 감소하였다(Fig. 3). 온도는 저장기간 중 미생물의 생존율에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중 하나이다. 특히, 건조 공정을 거칠 경우, 저장기간 중의 안정성은 더욱 감소하게 되고, 저장 온도가 낮아질수록 유산균의 생존율은 높아지게 된다(Carvalho *et al.*, 2004). 이러한 점을 고려할 때, 상온에서의 보관 조건이 동결 건조한 농후 발효유 내 유산균 사멸 속도를 가속화시킨 것으로 보인다. 16주의 저장기간 이후, 플레인 및 딸기 농후 발효유 내 유산균 생존율은 각각 17.6%, 11.8% 수준으로 감소하였다. 이와 같은 농후발효유의 종류에 따른 유산균 생존율 차이는 동결 건조한 농후 발효유 내 잔여 수분 함량 차이로 보인다. 선행연구에서는 동결건조 분말 내 잔여 수분 함량 차이에 따라 저

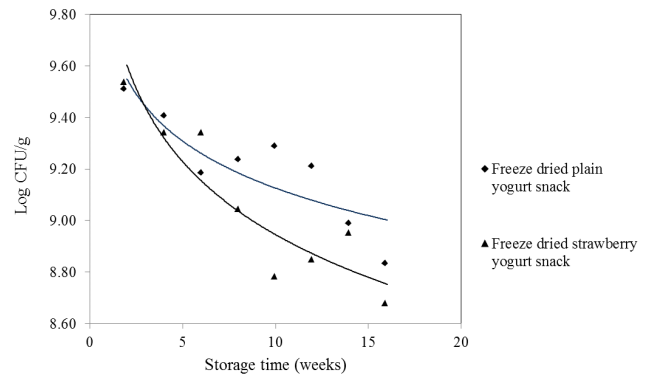


Fig. 3. Changes in the viability of lactic acid bacteria during storage.

장기간 중의 유산균 생균수에 차이를 보였다. 수분함량이 0%, 2.8%, 5.6%로 증가할수록 저장기간 중의 유산균 생존율이 높아졌다(Gaber *et al.*, 2004). 본 연구에서는 동결 건조한 딸기 농후 발효유에 비해 플레인 농후 발효유의 수분함량이 2% 가량 낮았다. 수분함량이 낮은 생육 조건에서는 세포를 구성하는 수분이 손실되고, 궁극적으로는 세포를 구성하는 단백질이 손상되게 된다(Mellor, 1978). 따라서 동결건조 딸기 농후 발효유에서의 낮은 수분함량은 유산균의 세포손상에 영향을 미쳤고, 궁극적으로 유산균의 사멸율을 높인 것으로 보인다.

## 요 약

본 연구에서는 동결건조 공정에 의한 유산균의 생균수 감소를 최소화 할 수 있는 농후 발효유를 개발하고자 하였다. 이를 위해 농후 발효유 제조에 첨가되는 당의 종류 및 구성을 달리하여 동결 건조 전후의 유산균 생존율을 비교 분석하였다. 그 결과, 포도당의 일부를 이소말토올리고당으로 대체하였을 때, 발효유 내 초기 유산균 생균수 및 동결건조 공정 이후의 유산균 생존율 또한 높아졌다. 또한 동결 건조 시 열판 온도가 낮을 경우, 건조 효율은 떨어지지만, 동결건조 이후의 동결건조 농후 발효유 내 초기 유산균 생존율이 높았다. 16주간의 저장기간에 따른 유산균 생균수 변화를 살펴본 결과, 상온보관 조건에서 유산균은 지수적으로 감소하였다. 하지만 16주가 경과한 후에도  $1.63 \times 10^8$  CFU/g의 생균수를 유지하여 약 0.6 g 이상의 동결건조 농후 발효유만 섭취하여도 체내에서 유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활 등의 건강기능성을 가질 수 있는 수준이었다. 하지만 본 연구에서는 식품 매트릭스에 따른 동결방지 효과를 파악할 때, 유산균 생균수를 유일한 지표로 삼았다는데 한계가 있다. 유산균 생균수뿐만 아니라, 유산균의 활성을 살펴보기 위해 동결건조 이

후의 젖산 생성능력이나 실질적으로 체내에 들어갔을 때 위액이나 담즙액에 대한 저항성 측면에서의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J. and Vinas, I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Food Microbiol.* 65: 173-182.
- Abraham, A., De Antoni, G. and Anon M. 1990. Effect of calcium on the cryopreservation of *L. bulgaricus* in different freezing media. *Cryobiology* 27:336.
- Bansal, T. and Garg, S. 2008. Probiotics: From functional foods to pharmaceutical product. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:267-287.
- Blanquet, S., Garrait, G., Beyssac, E., Perrier, C., Denis, S., Hébrard, G. and Alric, M. 2005. Effect of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried recombinant yeasts as novel oral drug delivery system assessed by an artificial digestive system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61:32-39.
- Brian, C. S. To and Etzel, M. R. 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J. Food Sci.* 62(3):576-578.
- Capela, P., Hay, T. K. C. and Shah, N. P. 2006. Effects of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* 39:203-211.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2004. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze dried *Lactobacilli delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. *Biotechnol. Progr.* 20:248-254.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J. Appl. Microbiol.* 94:947-952.
- 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. Biot.* 44:172-176.
- Gardiner, G. E., O'Sullivan, E. and Kelly, J. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microb.* 66(6):2605-2612.
- Gwak, H. J., Lee, N. R. and Park, H. W. 2014. Use of food-grade protective agents to improve the viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46(5):655-659.
- Leonie, J. M., Linders, W. F., Wolkers, F. A. and Hoeskstra, Klaas van't Riet. 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology.* 35:31-40.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. and Crowe, L. M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microb.* 61(10):3592-3597.
- Mellor, J. D. 1978. *Fundamental of freeze drying.* London: Academic Press. pp. 257-288.
- Otero, M., Espeche, M. and Nader-Macias, M. 2007. Optimization of the freeze-drying and survival throughout storage of freeze dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochem.* 42:1406-1411.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M. 2001. Probiotic, prebiotics, and synbiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):361S-4S.
- Schwab, C., Vogel, R. and Gänzle, M. G. 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 during freeze-drying. *Cryobiology* 55:108-114.
- Selmer-Olsen, E., Birkeland, S. E. and Sorhaug, T. 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *J. Appl. Microbiol.* 87:429-437.
- Zayed, G. and Roos, Y. H. 2004. Influences trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochem.* 39:1081-1086.

Received 10 September, 2015  
 Revised 17 September, 2015  
 Accepted 18 September, 2015