

프로바이오틱스의 동결보호 및 장관안정성 개선을 위한 첨가제 효과 분석

정은지¹, 문대원¹, 오준석¹, 문진석², 김광엽², 최혜선³, 한남수^{2*}

Analysis of Ingredient Mixtures for Cryoprotection and Gastrointestinal Stability of Probiotics

Eun Ji Jeong¹, Dae Won Moon¹, Joon Suk Oh¹, Jin Seok Moon², Kwang Yup Kim², Hye Sun Choi³, and Nam Soo Han^{2*}

Received: 21 March 2015 / Revised: 12 May 2015 / Accepted: 26 May 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Current drying and encapsulation methods for probiotics manufacturing are complicate and cost-burdened processes. The aim of this study was to develop a simple ingredient mixture to make probiotic granules via one-step process, providing not only a cryoprotective effect during freezing and drying but also high survival ratio in gastrointestinal tract. As cryoprotectants, commercially available ingredients including skim milk, monosaccharide (trehalose or glycerin), maltodextrins (with low or high degree of equivalents) were used. Their cryoprotective effect during lyophilization and survival ratios in artificial gastric juice and bile salt were measured against 3 strains of lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, and *Lactococcus lactis*). As results, 3 mixtures with different compositions showed a cryoprotective effect on LAB tested and the best composition was dependant upon LAB; skim milk 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, and

NaCl 1% was for *Lb. plantarum* and *Lc. lactis*, and maltodextrin 10% instead of skim milk was for *Lb. brevis*. In addition, those mixtures showed similar survival effect on LAB tested. These results demonstrate that skim milk or maltodextrins with trehalose, glycerin, and NaCl can be effectively used for one-step lyophilization of LAB as an alternative method of encapsulation.

Keywords: Probiotics, Lactic acid bacteria, Acid tolerance, Bile resistance, Cryoprotectant agents, freeze drying

1. INTRODUCTION

현재 식품의약품안전처가 분석한 ‘2013년 건강기능식품 생산실적’에 따르면 국내 프로바이오틱스는 2012년 대비 생산액이 55% 증가하였고, 이는 유산균과 장내면역, 장내미생물의 중요성에 대한 소비자의 인식이 높아진데 따른다 [1]. 프로바이오틱스란 ‘체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균’으로 정의되며, 유익한 유산균 증식, 유해균 억제 또는 배변활동 원활에 도움을 준다. 유산균을 비롯한 세균들이 프로바이오틱스로 인정받기 위해서는 위산과 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달한 후, 장에서 증식하고 정착하여 장관 내에서 유용한 효과를 나타내어야 한다 [2]. 그러므로 프로바이오틱스로서 유산균이 갖추어야 할 중요한 특성이 가공과정과 섭취 후 장내에서 생존력이 높아야 한다는 점이다 [3]. 균체를 저장하는 방법인 동결건조는 미생물을

¹주식회사 토비코

¹TOBICO Inc., # 4104 Beonyoungwan, Chungnam TechnoPark, 136 Jiksan-ro, Jiksan-eup, Seobuk-gu, Cheonan 331-858, Korea

²충북대학교 식품생명공학과

²Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Tel:+82-43-261-2567, Fax: +82-43-271-4412

e-mail: namsoo@cnu.ac.kr

³농촌진흥청 국립농업과학원

³Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Wanju 565-850, Korea

효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법으로 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등 장점이 있는 반면 동결건조 과정에서 균체가 손상을 받아 생존율이 크게 감소할 수 있다 [4-6]. 따라서 동결건조시 세포 손상을 보호하기 위하여 동결보호제 (cryoprotectant agents)를 흔히 사용하는데, 이는 미생물의 종류에 따라 그리고 보호제의 성분에 따라 서로 다른 영향을 미칠 수도 있다 [7]. 그러므로 동결건조 과정중에서의 생존과 동결건조 후 장기간 보존을 위해서는 그 미생물의 종류 및 특성에 맞는 적절한 동결보호제의 사용이 필요하다.

유산균이 살아있는 상태로 대장에 도달하기 위해서는 염산이 존재하는 위와 담즙이 분비되는 소장을 통과하여야 하며, 이 때 대부분의 미생물은 사멸하거나 원래 갖고 있던 활성이 저하된다 [8,9]. 따라서, 프로바이오틱스의 장내 정착률을 향상시키기 위하여 위산과 담즙의 세포 손상을 감소시키기 위한 조치가 균체 생산 과정에서 추가로 필요하다 [9]. 이를 위해 대부분의 프로바이오틱스 제품은 유산균을 동결건조한 분말 형태로 코팅하거나 식물성 캡슐에 담는 형태가 많다.

프로바이오틱스 건조 균주를 코팅 또는 캡슐화하기 위한 최근 연구에 따르면, 대부분 동결건조와 코팅으로 구분되는 2단계 이상의 다단공정을 제안하고 있다 [10-13]. 하지만, 이러한 다단공정은 높은 생존율을 제공하는 반면, 실제 생산 현장에 적용될 때에 공정이 복잡하고 다량의 첨가제들이 소요되는 문제점이 있다. 또한, 이러한 다단공정에서 프로바이오틱스의 높은 생존율을 유지하기 위해서는 매우 엄격한 공정관리 기술이 함께 확립되어야 한다. 한편, 사료용과 같은 프로바이오틱스 상품의 경우에는 비용과 효율을 함께 고려하여, 최소한의 첨가물을 이용하여 최소단계로 생산하는 공정의 개발이 필요하다. 이를 위해 첨가물의 조성을 결정할 때, 유산균의 동결보호 효과와 장내 환경 생존 효과를 모두 조사하는 것이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 서로 다른 프로바이오틱스 유산균을 대상으로 동결건조시 위장과 소장 환경에서 높은 생존율을 보이는 동결보호첨가제의 조성을 찾고자 하였다. 이를 위해, 전통 발효식품에서 선발된 3종 유산균 (*Lactobacillus plantarum* JSA22, *Lactobacillus brevis* JSB22, *Lactococcus lactis* I13)에 대하여, 냉동 및 건조시 단백질 변성방지 효과 및 흡습성이 낮은 trehalose를 기반으로 기존 산업체에서 주로 사용하는 다당류 및 단백질 성분들로 동결건조 과정과 인체내의 소화 환경에서의 유산균의 활성 실험을 수행하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 사용 균주 및 성장 배지

본 연구에서 사용된 균주는 국립농업과학원 발효이용과에서 분양 받은 *Lactobacillus plantarum* JSA22 (KACC91973P), *Lactobacillus brevis* JSB22 (KACC91760P) 그리고 *Lactococcus lactis* I13 균주를 사용하였다. 상기 균주들은 보존을 위하여 균배양액을 10% skim milk와 10% glycerin (w/v)로 조

성된 보관액에 혼합하여 -80°C 초저온 냉동고에서 보관하였으며, 멸균된 MRS 배지 (Difco, USA)에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하였고 3회 이상 계대배양을 거친 균주를 실험에 사용하였다.

2.2. 동결보호제 첨가 및 동결건조

동결보호제의 재료는 모두 식품원료인 skim milk (Seoulmilk, Korea), maltodextrin (dextrose equivalent, DE 14~19, Daesang, Korea), low DE maltodextrin (DE 10~12, Daesang, Korea), trehalose (Samyang genex, Korea), glycerin (LG H&H, Korea), NaCl (Young Jin Green Foods, Korea)을 사용하였다.

3회 이상 계대배양을 거친 균주를 MRS medium에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액을 원심분리기 (DHC-250A, Hanil, Korea)로 분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 다양한 조성의 동결보호제를 각 균주에 1:1로 혼합한 뒤 샘플링하여 생균수를 측정하였다. -80°C 초저온 냉동고 (DF8517, Ilshinlab., Korea)에서 12시간 동결 후, 동결건조기 (FD8508, Ilshinlab., Korea)로 실온 (25~29°C)에서 응축기 온도 -80°C, 압력 5 mmTorr 이하의 조건에서 72시간 건조하고 생균수를 측정하였다. 동결보호제 조성은 Table 1과 같다. 동결건조된 균체는 분쇄하여 분말화시킨 다음 4°C 냉장보관하여 실험에 사용하였다.

2.3. 인공 위액 저항성

체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공 위액 내성 실험을 실시하였다. Kobayashi 등 [8,14]의 방법을 변형하여 1 N HCl로 pH 2.1으로 조정된 Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)에 pepsin (Sigma, USA)을 1,000 unit/mL 가 되도록 첨가하여 인공위액을 조제하였다. 인공위액 9 mL에 각각의 동결건조된 균주를 1 g씩 넣고 0시간과 2시간 경과 후, 샘플링하여 멸균 생리 식염수로 단계별로 희석하고 Lactobacilli MRS Agar medium (Difco, USA)에 도말하였다.

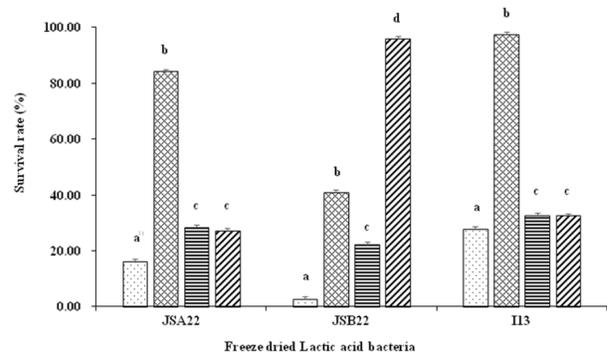


Fig. 1. Survival rate of freeze dried lactic acid bacteria. □ : Mixture 1 (Control), ■ : Mixture 2 (skim milk), ▨ : Mixture 3 (저 DE Maltodextrin), ▩ : Mixture 4 (maltodextrin), JSA22: *Lactobacillus plantarum*, JSB22: *Lactobacillus brevis*, I13: *Lactococcus lactis*; ¹⁾Within same figure, different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) at Duncan's multiple range test.

그리고 37°C 배양기에서 24시간 배양한 다음 집락의 수를 측정하였다. 대조군은 Lactobacilli MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA) 에서 배양하여 실험구와 동일하게 실험하였다.

2.4. 인공 담즙액 저항성

모든 인공 담즙액은 Lactobacilli MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA)에 0.45 µm filter로 여과한 oxgall (Difco, USA)용액을 0.3% 첨가하여 제조하였다 [15,16]. 인공 담즙액 9 mL에 각각의 동결건조된 균주를 1 g씩 넣고, 0시간과 2시간 경과 후, 샘플링하여 멸균 생리 식염수로 단계희석하고 Lactobacilli MRS Agar medium (Difco, USA)에 도말하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 다음 집락의 수를 측정하였다. 대조군은 Lactobacilli MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA)에서 배양하여 실험구와 동일하게 실험하였다.

2.5. 통계분석

통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA) program을 이용하여 각 측정 군의 평균과 표준편차를 산출하였으며 분산분석을 실시한 후 Duncan의 다중검정을 실시하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 동결건조 보호효과

동결건조는 유산균을 가장 효과적으로 보존할 수 있는 방법이지만, 동결 건조시 동해(凍害)로 인한 세포손상이 일어나게 된다. 이를 경감할 목적으로, 식품산업에서 흔히 사용하는 단백질, 다당, 올리고당, 단당 성분들로 동결보호제를 제조하고 이들을 각각 처리하여 동결건조하였다 (Table 1). 동결건조 후 생존율을 비교한 결과, 각각의 대조구와 실험구간 유의적 차이가 나타났다 ($p < 0.05$). 세가지 유산균 모두 보호제를 첨가한 경우에서 첨가하지 않은 대조구에 비해 높은 생존율을 보였다. 특히, *Lb. plantarum* JSA22는 동결보호제를 첨가하지 않은 1번 조성보다, skim milk 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, NaCl 1%로 구성된 2번 조성에서 유의한 증가가 크게 나타났다. 또한, *Lb. brevis* JSB22는 동결보호제를 첨가한 2, 4번 조성에서 높은 생존율 나타냈으며, 특히 maltodextrin을 첨가한 4번 조성은 가장 큰 유의적 차이를 보였다. 반면, *Lc. lactis* I13은 skim milk를 주로 포함하는 2번 조성에서 가장 효과가 높은 생존율을 보였다. 특히, 본 균주는 자체 생존율이 다른 균주에 비해 동해에 높은 저항력이 있는 것으

로 판단되며, 이는 성장과 함께 생성되는 대사물질 중 다당류 등이 원심분리시 균체와 함께 침적되어 균체를 포집 및 포괄하는 작용을 한 것으로 판단된다 [17].

본 실험에서 동결보호제의 첨가 유무와 종류에 따라 그 영향을 살펴본 결과, 동결건조 전과 후 생존율은 균주에 따라 그리고 동결보호제 조성에 따라 차이가 있었다. *Lb. plantarum* JSA22와 *Lc. lactis* I13은 skim milk 포함 동결보호제가 높은 유의적 차이를 보였고, *Lb. brevis* JSB22의 경우에는 maltodextrin 포함 동결보호제 조성에서 높은 생존율을 보였다. 특히, *Lb. brevis* JSB22 경우 동결건조시 심각한 세포 손상이 수반되므로 반드시 동결보호제의 첨가가 필요하다고 판단된다.

3.2. 인공 위액 저항성

유산균3종을 인공 위액에서 2시간 처리한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *Lb. plantarum* JSA22의 경우 동결보호제를 처리한 2, 3, 4번 조성이 동결보호제를 넣지 않은 1번 조성보다 비교적 높은 균수 ($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL)를 나타내었다 (Fig. 2-A). 특히 동결보호제를 처리하지 않은 1번 조성과 비교하였을 때 2, 4번 조성은 유의적 차이가 있었다. *Lb. brevis* JSB22도 동결보호제를 첨가하지 않은 1번 조성에 대해 동결보호제를 첨가한 2, 4번 조성이 유의적 차이를 보였다 (Fig. 2-B). *Lc. lactis* I13 역시 동결보호제를 첨가한 모든 조성에서 유의적 차이를 보였으며, 특히 2, 4번 조성에서 유의적 효과가 보다 높았다. 결론적으로, 3균주 모두 동결보호제를 처리하지 않았을 때보다 동결보호제를 처리시 인공 위액에 대한 내성을 보였다. 특히 *Lb. plantarum* JSA22, *Lc. lactis* I13의 경우 10% skim milk, 15% trehalose, 0.5% glycerin, 1% NaCl조성의 동결보호제가 생균수 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL을 유지하여 가장 높은 생존율을 보였다.

3.3. 인공 담즙액 저항성

동결보호제 조성별 동결건조 균체에 0.3% oxgall을 함유한 인공 담즙액에 각각 2시간 처리한 결과, 4가지 조성 모두 생균수 10^{10} CFU/mL 이상으로 유의한 차이를 나타내어 인공 담즙에 대한 저항성을 보였다 (Fig. 3). *Lb. plantarum* JSA22의 경우 2, 3, 4번 조성이 동결보호제를 첨가하지 않은 1번 조성보다 유의적 효과를 보였다. *Lb. brevis* JSB22는 동결보호제를 넣지않은 1번 조성에 비해 2, 3, 4번 조성은 모두 유의적 차이를 보였고, *Lc. lactis* I13의 경우도 3, 4번 조성이 1번 조성과는 다른 유의적 차이가 나타나 높은 생존율을 보였다. 요약하면, 본 실험에 사용한 3개 균주 모두 공통적으로 인공

Table 1. Composition of cryoprotectant mixtures

Mixture number	1	2	3	4
Composition	Control	Skim milk 10% Trehalose 15% Glycerin 0.5% NaCl 1%	Low DE maltodextrin 10% Trehalose 15% Glycerin 0.5% NaCl 1%	Maltodextrin 10% Trehalose 15% Glycerin 0.5% NaCl 1%

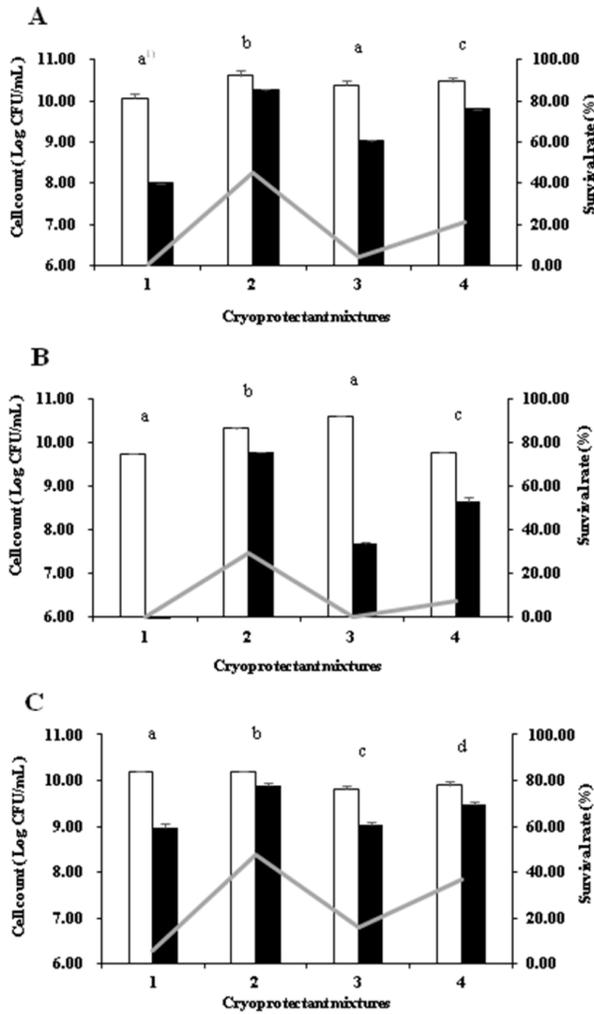


Fig. 2. Survival rate of lactic acid bacteria in artificial gastric acid. □ : 0 hr, ■ : 2 hr, — : survival rate; A: *Lactobacillus plantarum* JSA22, B: *Lactobacillus brevis* JSB22, C: *Lactococcus lactis* I13; ¹⁾Within same figure, different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) at Duncan's multiple range test.

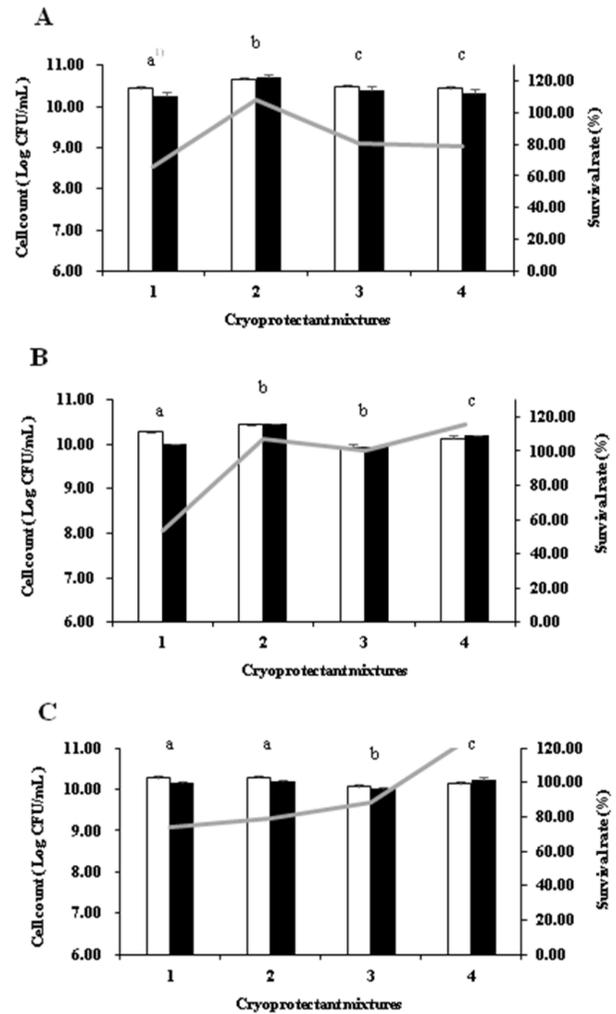


Fig. 3. Survival rate of lactic acid bacteria in artificial bile juice. □ : 0 hr, ■ : 2 hr, — : survival rate; A: *Lactobacillus plantarum* JSA22, B: *Lactobacillus brevis* JSB22, C: *Lactococcus lactis* I13; ¹⁾Within same figure, different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) at Duncan's multiple range test.

담즙산에 대해 일정 수준의 저항성을 갖고 있었으며, 첨가한 동결보호제에 의해 그 저항성이 더 향상되었다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 3가지 유산균 균주를 프로바이오틱스 분말 상품으로 제조하기 위해 몇가지 첨가물 조성에 대해 동결보호 및 장관 내 안정성 향상 효과를 조사하였다. 종래 연구된 마이크로캡슐화 코팅 [10]은 알지네이트나 검류 등을 첨가하는 추가공정이 필요하여, 소규모 생산 라인에 적용하기에는 시간 소요와 비용 상승의 부담이 있었다. 또한 기존 동결보호제 연구들은 동해 방지 효과를 주로 조사하였으나, 본 연구에서는 동결보호 효과와 함께 각각의 유산균의 위산과 담즙산에

대한 내성 향상 효과도 함께 분석하였다.

본 실험을 위해 동결보호제를 첨가하지 않은 균주와 각기 다른 동결보호제 조성 3가지를 제조하여 각각의 균주에 처리하여 동결건조한 후, SPSS Program을 이용하여 통계처리한 결과, 동결건조 전과 후 생존율은 *Lb. plantarum* JSA22과 *Lc. lactis* I13 경우 skim milk 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, NaCl 1% 조성 동결보호제에서 유의적 차이를 보였다. 또한, *Lb. brevis* JSB22는 동결보호제의 첨가가 큰 영향력을 나타냈으며, maltodextrin 10%, trehalose 15%, glycerin 0.5%, NaCl 1% 조성에서 가장 큰 유의적 차이를 보였다. 결과적으로 3균주 모두 동결보호제를 첨가하지 않았을 때보다 동결보호제를 첨가했을 때, 동결건조 후에 생존율이 높았다. 또한 인공 위액 저항성을 알아보기 위해 동결 건조 후의 유산균을 인공 위액에서 2시간 배양하였다. 그 결과 3균주 모두 동결보호제

를 첨가한 조성이 동결보호제를 첨가하지 않은 조성에 비해 높은 유의적 효과를 보였다. 특히, *Lc. lactis* I13의 경우 maltodextrin을 10% 첨가한 동결보호제와 10% skim milk를 첨가한 동결보호제에서 유의한 효과를 보였으며, 나머지 2균주는 10% skim milk를 첨가한 동결보호제가 효과가 있었다. 인공 담즙액에 대한 저항성의 경우도 동결보호제를 첨가하지 않은 조성보다 동결보호제를 첨가한 조성이 유의적 차이를 보이며, 생존율과 10^{10} CFU/mL 이상의 높은 균수를 나타내었다. 이와 같이 동결보호제를 첨가하였을 때 동결 및 위액과 담즙액에 대한 보호효과가 향상되었으며, 그 효과는 유산균에 따라 최적 동결보호제 조성이 각각 달랐다. 본 실험에서 사용한 동결보호제 조성을 각종 프로바이오틱스 생산에 적용한다면, 유산균이 위장과 소장에서 생존하여 보다 많은 균체가 대장으로 이동할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 본 연구는 기존 연구되었던 복잡한 다단계 코팅기술보다 간편하면서 동시에 높은 유산균 생존 효과를 제공하여 다양한 프로바이오틱스 제품 제조에 적용 가능할 것으로 판단된다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구사업으로 국립농업과학원 농업기술연구 개발사업 과제 (PJ907153030 52013)의 지원에 의한 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. The Korea Food and Drug Administration, Available from: <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=24741&cmd=v>. (2014).
2. The Korea Food and Drug Administration, Available from: <http://www.foodnara.go.kr/hfoodi>. (2014).
3. FULLER, Ray (ed.). (2012) *Probiotics: the scientific basis*. pp. 111-144. Springer Science & Business Media, London.
4. Heckley, R. J. (1978) Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 24: 15-28.
5. Morich, T. (1973) Lactic acid bacteria in animal industry. *Japanese J. Zootech. Sci.* 44: 535-553.
6. Deman, J. C., M. Rogosa, and M. E. Shape (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130.
7. Heckley, R. J. (1961) Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* 3: 1-28.
8. Yun, H. J., Y. J. Lee, S. H. Yeo, H. Y. Park, H. D. Park, S. Y. Baek (2013) Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Korean soy sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 41: 190-197.
9. Hood, S. K. and E. A. Zittola (1998) Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53: 1514-1516.
10. Kwak, H. S. and A. Feucht (2013) Microencapsulation of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 229-238.
11. Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder, and J. Scher (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104: 467-483.
12. Heidebach, T., P. Forst, and U. Kulozik (2010) Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.* 98: 309-316.
13. Cook, M. T., G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, and V. V. Khutoryanskiy (2014) Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. *Int. J. Pharm.* 466: 400-408.
14. Kobayashi, Y., K. Tohyamat, and T. Terashima (1974) Biological characteristics of *Lactobacillus* Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Nihon Saikingaku Zasshi* 29: 691-697.
15. Shin, M. S., J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh, and Y. J. Baek (1998) Characteristics of *Bifidobacterium* spp. Isolated from Korean faces for probiotics. *Korean J. Dairy Sci.* 20: 273-282.
16. Paik, H. D., M. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim (2002) Characterization of bacillus polyfermenticus SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 73-78.
17. Cell biotech Co., Ltd. (2011) Lactic acid bacteria having multi-coating layers and preparing method thereof. *Korea Patent*, 10-2011-0093074.