

동결건조커피 제조에 적합한 유산균 균주 선발

고봉수 · 임상호 · †한성희*

남양유업(주) 중앙연구소, *고려대학교 생물신소재연구소

Selection of Lactic Acid Bacteria suitable for Manufacture of Freeze-dried Coffee

Bong Soo Ko, Sang Ho Lim and †Sung Hee Han*

Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation, Sejong 30055, Korea

*BK21 Plus, Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

Abstract

Probiotic functional foods are known to have various functional effects such as intestinal regulation, modulation of immune system, reduction of allergies, and lowering of cholesterol. The purpose of this study was to select probiotic strain that is most suitable for freeze-dried coffee for the development of functional coffee products. The survival rate of probiotics, at drinking condition of coffee, at acid, at bile and after freeze-dried in coffee were measured on 1 strain isolated from commercial freeze-dried coffee, 8 strains used as fermented milk starter, 1 *Bifidobacterium* and 1 *Bacillus coagulans*. *Bacillus coagulans* showed the highest survival rate from 2.4×10^7 cfu/g to 2.0×10^7 cfu/g especially after freeze-drying. The results at drinking condition of coffee, at acid tolerance, at bile tolerance and at storage test showed significantly better survival rate of *Bacillus coagulans* than that of control (*Lactobacillus casei*). Especially, *Bacillus coagulans* showed 3.8-fold higher survival rate at acid tolerance (pH 1, 120 minutes) than control. Thus, the lactic acid-producing *Bacillus coagulans* is characterized as a probiotic strain suitable for functional coffee formulation and commercialization.

Key words: lactic acid bacteria, strain selection, freeze-dried coffee, probiotics

서 론

프로바이오틱스(probiotics)는 ‘충분한 양을 섭취하였을 때, 안전하고 건강에 도움이 되는 살아있는 균’이라고 정의되고 있다(FAO/WHO 2002; Gorbach SL 2002). Fuller R(1991)은 숙주가 살아있는 미생물을 일정 수준 섭취하였을 때, 숙주의 장내 미생물의 균형을 개선시키거나 면역계를 활성화시켜 건강증진효과를 나타내는 식품 보충제라고 probiotics를 정의하였다. 이러한 Probiotics로 불리기 위해서는 균주에 완전한 특성 분석이 이뤄져야 하며(Sanders 등 2003), 세균의 속과 종은 국제적으로 통용되는 방법으로 확인되어야 하고, 명명법은 Approved lists of Bacterial names의 기준에 의해 확정되어야 한다(Reid G 2003). 또한 장내 병원성 균의 성장을 저해하는

기능과 생존 및 기능적 특성이 유지되도록 생산과정뿐만 아니라, 저장기간 동안 안전성이 유지되어야 한다(Salminen 등 1998).

Probiotics 균주는 활성부위에서 생존하는 것이 중요한데, 최대 활성을 위해서는 균주가 특수부위에 서식과 증식할 수 있어야 하고, 낮은 pH와 고농도 담즙산염에 내성이 있어야 한다. 그리고, 면역시스템에 내성과 병원성, 알레르기성, 돌연변이 유발 발암성이 없어야 하며, 인체에 먹어도 안전한 generally recognized as safe(GRAS) 상태이어야 한다(Ravinder N 2012). 균주는 인체에서 분리된 것이 좋으며, 임상적으로 probiotics 균주를 사용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있고(Dunne 등 2001), 그 중 가장 흔하게 연구되고 있는 균주는 *Lactobacilli*와 *Bifidobacteria*이다(Saxelin M 1977). 이것은 사람으로부터 분리

† Corresponding author: Sung Hee Han, BK21 Plus, Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea. Tel: +82-2-940-2764, E-mail: sungheeh3@gmail.com

한 probiotics 균으로서 정장작용(Borriello 등 2003), 병원성 세균억제(Dave & Shah 1997) 등 유익한 작용을 한다고 알려져 있다. 현재 과학적으로 기능이 입증되어 health claim을 할 수 있는 probiotics 기능은 로타바이러스 및 항생제 관련 설사개선(Isolaure 등 2002), 유당 과민증 경감(Ouwehand 등 2002), 유아 식이성 알러지 증상 경감, 정장 작용 등이며, *in vivo* 수준에서 발암 위험 감소(Kumar 등 2011), 면역기능 조절(Matsuzaki 등 2000), 알레르기 저감, 혈압강하, 헬리코박터 피로리균 억제(Hamilton-Miller J 2003), 장내환경개선, 과민성 대장염 및 궤양성 대장염 경감, 식이성 콜레스테롤 경감(Pereira & Gibson 2002), 구강 내 감염증 경감 등의 효과를 들 수 있다.

요구르트, 냉동발효유, 치즈, 분유, 아이스크림, 냉동건조 요구르트, 과실주스, 커피 등 음료 같은 식품은 probiotics를 소비자에게 전달하는 좋은 운반체가 될 수 있다(Ravinder N 2012). 이들 중 커피는 매일 습관적으로 음용하기 때문에, probiotics를 전달하는 좋은 운반체로 판단된다(Benković 등 2015). Probiotics가 접목된 동결건조 커피를 개발하기 위해서는 균주와 커피의 적합한 조합, 균체 생존에 관계하는 커피 가공조건, 커피 유통기한 동안 균체 생존에 관계하는 제품기질, 포장 및 환경 등의 선택이 중요하다. 즉, 커피 음용 시, pH 3-5 산성 상태, hot 커피 용인 경우 뜨거운 물에서 생존이 가능하며, 가공조건인 동결건조 및 질소포장 환경에서도 유통기한 동안 안정적으로 균수가 유지되어야 한다. 또한 probiotics 균주로서 요구되는 장내 높은 생존율이 고려되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 상업화된 probiotics 균주와 동결건조커피에서 직접 분리한 유산균 1종이 동결건조커피 제조과정과 커피 음용 환경조건에서의 생육가능성을 조사하여 커피 배합에 최적인 probiotics 균주를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동결건조커피에서 유산균 분리 및 동정

동결건조커피에서 분리한 유산균은 커피에서의 내산성과 동결건조 중 건조기 heating plate 복사열에 견디는 내열성이 강할 것으로 판단하여, 국내외 유통 중인 동결건조커피 8종에 대하여 유산균 분리배지를 통해 유산균을 분리하였다. 동결건조커피 8종을 30°C의 멸균수로 1%(w/w)용액으로 제조한 후 BCP agar 배지(Eiken Chemical Co. Ltd, Japan)에 평판도말법을 이용하여 BCP의 보라색 배지가 노란색으로 변하는 균집을 분리하였다. 분리된 균집은 MRS 평판배지(Difco, Maryland, USA)에 2차로 도말하였으며, 배양 중 투명환을 나타내고 집락을 형성하는 균집을 각각 취하여 순수한 유산균이 얻어질 때까지 새로운 MRS 배지에 3회 반복하여 도말하였다. 집락의 형태 및 색상을 통해 순수한 유산균이라 판단되는 균

집에서 모양과 형태가 다른 유산균 5종을 1차로 선별하였고, 그 중 그람양성이면서 유산생성능력이 가장 우수한 유산균 1종을 최종 분리하였다. 분리한 유산균은 동정을 위해 Solgent사(Solgent, Co., Ltd.)에 의뢰하여 16S rRNA gene sequence를 수행하였다.

2. 균주 및 보존

Table 1에 나타난 것과 같이 11종의 균주를 실험에 사용되었다. 국내외에서 유통하고 있는 동결건조커피에서 분리한 *Lactobacillus zeae* 1종과 국내 발효유 starter culture 균주로 사용되는 *Lactobacillus acidophilus*의 7종, *Bifidobacterium* 1종, 건강기능식품에 사용하는 유산생성 *Bacillus coagulans* 1종을 -18°C 이하 온도에서 냉동보관하며 사용하였다. Capsule형 유산균 제제는 표면부상 및 침전 등으로 인한 소비자의 이물 오인 우려 등의 성상문제가 있어 본 실험 균주 대상에서 배제하였다.

3. 동결건조 후 균주 생존율

커피농축액(고형분 45%)에 11종 균주를 각각 0.1%(w/w) 첨가하여 -45°C deep freezer에 1일 동결한 후, 실험용 동결건조기(ilShinBioBase, Co, Korea)에 건조 조건을 설정(vacuum: 0.45

Table 1. Probiotic strains tested in this study

Species/strains	Source
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 3	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus casei</i> BGP 93	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus paracasei</i> BGP 2	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP 1	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Commercial culture (Italy)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Commercial culture (Italy)
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12	Commercial culture (Denmark)
<i>Bacillus coagulans</i> (GanedenBC30)	Commercial culture (USA)
<i>Lactobacillus zeae</i>	Freeze-dried instant coffee

torr, temp: 20~70°C, time: 8~10 h)하여 동결 건조하였다.

최종 동결건조기의 프로바이오틱스 생균수를 측정하여 생존율을 확인하였다. 유산균 총균수 측정은 *Lactobacillus* 속에 대해 사용하는 standard method(Marshall & ed 1992)를 변형하여 사용하였다. 즉, 검체시료를 0.1% peptone 용액에 희석하여 BCP agar(Eiken Chemical Co. Ltd, Japan) 평판배지에 도말한 후 37°C에서 72시간 배양하고, 30~300 사이의 황색 colony 수를 측정하였다. *Bifidobacterium* 속의 경우는, 검체시료를 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)에 희석하여 BS agar 배지에 0.05 mL 접종하여 멸균 초자봉으로 도말하고, 시료가 접종된 petri dish의 혐기적 배양을 위해 anaerobic jar (Oxoid, UK)에 gas-pak (BBL, USA)을 함께 넣고, 37°C에서 48~72시간 혐기성으로 배양하여 형성된 colony 수를 측정하였다.

Bacillus coagulans 생균수는 Ganeden 제조사에서 제공한 *Bacillus coagulans* 균주의 counting 표준방법에 따라서 실시하였다. 시료 1 g을 멸균 stomacher bag에 넣고 살균 peptone수 (0.1% peptone, pH 7.0) 199mL를 채워 150~200 rpm으로 5분간 혼합한 다음 5 N NaOH용액으로 pH 8.5±0.2로 조절하였다. 현탁 균질된 시료 20~30 mL를 50 mL용 coming 멸균 tube에 옮긴 다음 75°C water bath에서 30분간 배양(포자균 발아 유도) 후, 45°C 이하로 즉시 냉각시켰다. 냉각시킨 시료액 1.0 mL에 peptone수를 가하여 10진 희석법으로 희석하여 배지에 분주하고, 평판배양법으로 생균수를 측정하였다. 배지는 GYE 배지 조성 (Table 2)에 맞춰 만들어 사용했으며, 40±2°C의 incubator에서 48시간 동안 배양하여 형성된 colony 수를 측정하였다. 3회 반복 실험을 통해서 데이터를 얻었으며, colony 수는 log

Table 2. Composition of glucose yeast extract agar (GYE) medium

Constituents	Contents
Yeast extract powder	5.0 g
Peptone	5.0 g
D-Glucose	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.3 g
Trace mineral solution*	1.0 mL
DI water	1,000.0 mL
Agar	15 g

*Trace mineral Solution: NaCl 500 mg, FeSO₄ · 7H₂O 900 mg, MnSO₄ · H₂O, ZnSO₄ · H₂O 80 mg, CuSO₄ · 5H₂O 80 mg, CuSO₄ · 7H₂O 80 mg DI water 50 mL

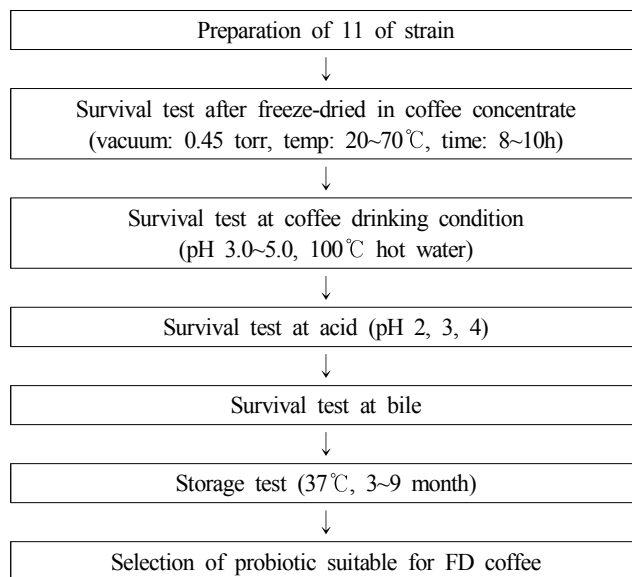


Fig. 1. Process flow for the selection of probiotic strain

cfu/g으로 나타내었다.

4. 균주의 커피 음용 환경 생존율

동결건조 프로바이오틱스 균주 생존율 시험을 통해 우수한 생존력을 나타낸 유산생성균 *Bacillus coagulans* 균주와 유산균 주 중 생존율이 가장 높은 *Lactobacillus casei* 균을 대조(control) 균으로 선발하여 커피 음용 환경 생존율 시험을 하였다. Instant coffee를 끓는 물에 음용하는 usage를 재현하기 위하여, 0.1 N HCl로 pH를 3.0~5.0로 조정된 끓는 물 100 mL에 프로바이오틱스 균주(생균수 *B. coagulans* 2.0×10⁷ cfu/g, *L. casei* 1.0×10⁸ cfu/g) 1 g를 첨가하고, 5분, 10분, 15분, 20분 보관 후 시료를 채취하여 즉시 냉각시킨 다음, 시료액 중의 생균수를 생균수 측정방법에 따라 생존율을 확인하였다.

5. 균주의 내산성 및 내담즙성

조제시료(생균수 *B. coagulans* 2.0×10⁷ cfu/g, *L. casei* 1.0×10⁸ cfu/g) 1 g을 0.1 N HCl로 pH 1.0, pH 2.0 및 pH 3.0로 조정된 Peptone water (0.1% peptone) 용액에 첨가 용해한 후 37°C에서 20분, 120분 동안 배양하면서 시료를 채취하여, 생균수 측정방법에 따라 균수를 측정하고 생존율을 확인하였다. 균주의 내담즙성 측정은 조제시료(생균수 약 *B. coagulans* 2.0×10⁷ cfu/g, *L. casei* 1.0×10⁸ cfu/g) 1g을 Oxgall(Sigma Chemical Co., St. Louis USA)이 0.3%, 0.5% 및 1.0% 농도로 첨가된 증식용 배지에 넣어 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후의 시료를 채취하여 생균수 측정방법에 따라 균수를 측정하고, 생존율을 조사하였다. 증식용 배지 사용은 *Lactobacillus* 속은 MRS 배지(Difco, Maryland, USA)를, *B. coagulans*균은 GYE 액체배지

를 사용하였다.

6. 가혹조건에서의 동결건조 프로바이오틱스 균주 경시 변화

선발된 균주가 함유된 동결건조커피 시료를 흡습이 되지 않도록 밀봉 포장한 다음, 유통 중 실온(0~30°C)보다 높은 가혹조건 온도로 실험 설계한 37°C 항온실에서 3, 6, 9개월간 보관한 후 시료를 채취하여 생균수를 측정하고 생존율을 확인하였다.

7. 통계처리

모든 결과의 통계적 분석은 SPSS(statistical package for social science, version 12.0) 통계 package를 사용하여 처리하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 분산분석(ANOVA) 및 사후 검정으로 Tukey's test를 실시하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 동결건조커피에서 유산균 분리 및 동정

동결건조커피에서 분리한 유산균은 커피의 산성에 견디는 내산성 능력과 동결건조 중 건조기 heating plate 복사열에 견디는 내열성이 강할 것으로 판단하여, 국내의 유통 중인 동결건조커피 8종에 대하여 유산균 분리배지를 통해 유산균을 분리하였다. 집락의 형태 및 색상을 통해 순수한 유산균이라 판단되는 군집에서 모양과 형태가 다른 유산균 5종을 1차로 선별하였고, 그 중 그람염색과 현미경 검경을 통해 그람양성이면서 유산생성능력이 가장 우수한 유산균 1종을 최종 분리하였다.

분리한 유산균은 동정을 위해 Solgent사(Solgent, Co., Ltd.)에 의뢰하여 16S rRNA gene sequence를 수행하였다. 유전자 염기서열 분석은 위해 세균의 분리동정에 사용되는 27F(5'-AGAGTTTATCCTGGC TCAG-3) primer와 16S 1492R (5'-GGTTACCTTGTGTTAACTT-3') primer를 사용하여 염기서열을 확인하였고, 확인된 염기 서열은 EZTaxon 프로그램을 이용하여 계통학적 위치를 검토한 결과, *Lactobacillus zeae* 균주로 동정되었다. 이는 Vanos & Bindschedler(1985)가 soluble coffee에서 분리한 유산균 중에서 우점(predominant)균으로 차지하고 있는 균이 *Lactobacilli*이며, 그 중 *L. plantarum* 균이 주종으로 검출된다고 보고한 바가 있어, 그 결과와 부분적으로 일치됨이 확인되었다. 향후 동결건조커피는 식물성 유산균 분리를 위한 시료로서 연구가치가 재확인되었으며, 상업적으로 유의한 유산균을 분리하기 위해서는 추가적으로 더 많은 연구조사가 필요하다고 판단된다. 또한, 동결건조커피에서 분리된 식물성 유산균주 *Lactobacillus zeae*는 식품소재로서 사용하기 위해서는 선행적으로 probiotics 기능 및 인체에 섭취 시 안전성

등 많은 임상학적 테스트가 필요하나, 본 연구 결과에서는 상업화된 유산균 및 유산생성균 10종과 함께 테스트를 실시하여, probiotic 균으로서 상업화 가능성을 확인하였다.

2. 동결건조 후 균주 생존율

커피농축액(고형분 45%)에 11종 균주를 각각 0.1%(w/w) 첨가하여 -45°C 급속 동결한 다음, 실험용 동결건조기(ilShin-BioBase, Co, Korea)를 통해 건조 후 생균수를 측정하고, 생존율을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다.

실험결과, 동결건조 후 일반 유산균은 초기균수 약 1.0×10^8 cfu/g 수준에서 최대 1.0×10^4 cfu/g 이하로 급격히 감소함으로써, 동결건조 커피용으로 적합하지 않음이 확인되었다. 그러나 spore forming 유산생성균 *B. coagulans* 균주 제제는 초기균수 2.4×10^7 cfu/g에서 동결건조 후에도 2.0×10^7 cfu/g으로 높은 생존율을 나타냈다. Gibson G(2010)에 의하면 일반적으로 요구르트 등에 사용하는 probiotic 균주는 열에 약하기 때문에 제조공정 중에 열처리를 하지 않지만, spore-forming 균주는 열처리 문제점의 한계를 극복할 수 있다고 보고하였다. 따라서 *B. coagulans* 균주가 열과 압력에 견디는 능력이 우수함을 재확인할 수 있었다. 동결건조 중 유산균의 급격한 유산균 사멸은 동결건조 중 낮은 온도와 고압의 진공조건에서의 균체 세포로부터 수분이 sublimation 하는 과정에서 이루어지는 것으로 판단된다. 그리고, Jalali 등(2012)은 동결건조 중 이러한 균 사멸을 줄이기 위해서 탈지분유 등 냉동보호제(cryoprotectants)를 사용함으로써 균 생존율을 최대 72~76% 유지할 수 있다고 보고한바 있다. Choi 등(2004)은 탈지분유 10%와 sucrose 5%를 기준 조성물로 하여 오미자, 구기자 등 생약 추출물을 2.5%까지 첨가하더라도 동결건조 시, 균체 생존율이 크게 떨어지지 않는다고 보고된 바 있다. 반면에, 커피농축액

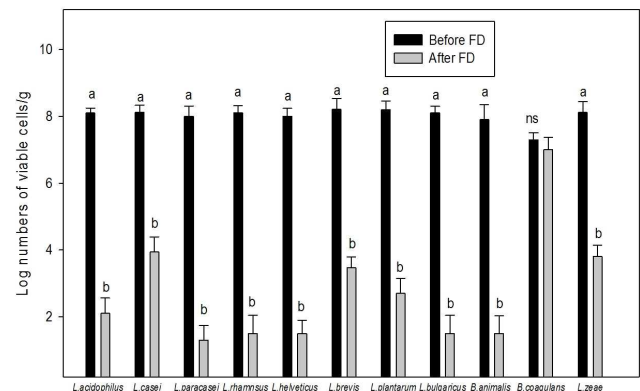


Fig. 2. Survival rate of strains after freeze-dried. Bars represent mean \pm S.D. (n=3). Different letters (a,b) in the bar mean significant difference at $p < 0.05$ level by Tukey's test. ns: not significant.

은 낮은 pH와 고농도 caffeine 등으로 인하여 균체 생존율 향상에 영향을 주는 냉동보호제의 기능이 떨어지는 것으로 판단되었다. 그러나, Spore forming 유산생성균 *Bacillus coagulans* 생존율이 높은 이유는 GanedenBC30 균제제 특성상 spore가 형성된 균체로서 spore 세포벽 손상에 영향을 덜 줌으로써 동결건조 중 외부의 온도와 진공압력, sublimation로 인한 탈수과정에 대한 생존율이 높은 것으로 판단된다.

3. 커피 음용 환경에서 균주 생존율

동결건조 테스트를 통하여 우수한 생존력을 나타낸 유산생성균 *Bacillus coagulans* 균제제와 유산균 모두 동결건조 후, 그 중 상대적으로 생존율이 높은 *Lactobacillus casei* 균주를 대조군으로 선발하였다. 이 균주로 시료조제(생균수 *B. coagulans* 2.0×10^7 cfu/g, *L. casei* 1.0×10^8 cfu/g) 후 hot 커피 음용 조건(pH 3~5, 100°C hot water)에서 생존율 테스트를 한 결과, Fig. 3과 같이 유산균에 비해 월등히 *Bacillus coagulans* 균주 제제가 우수한 생존력을 나타냈다. Park 등(2006)이 유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes* 균을 인삼차 음용 조건인 끓인 물을 타서 약 20분간 방치해도 균체 생존율이 77.6%에 달한다고 보고한 결과와 일치하였다. 이와 더불어, Samar 등(2013)은 probiotics 유산균을 대조군으로 microencapsulation하지 않은 균은 내열성이 65°C에서 20분간 가열할 경우, 초기 균수가 g당 log값 8.0 수준에서 3.0 수준으로 급격히 저하되지만, capsule 코팅물질인 alginate를 이용하여 2~4% 농도로 microencapsulation 처리함으로써 유산균의 내열성을 급격히 높일 수 있다고 보고한 바 있다. 따라서 향후 커피 첨가용으로서 capsule 유산균에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단되었다. 즉, 현재 상용화되어 있는 capsule형 유산균 제제는 커피에 첨가할 경우, 코팅 재질이 뜨거운 물에 즉시 용해되어 균체가 사멸되거나 또는

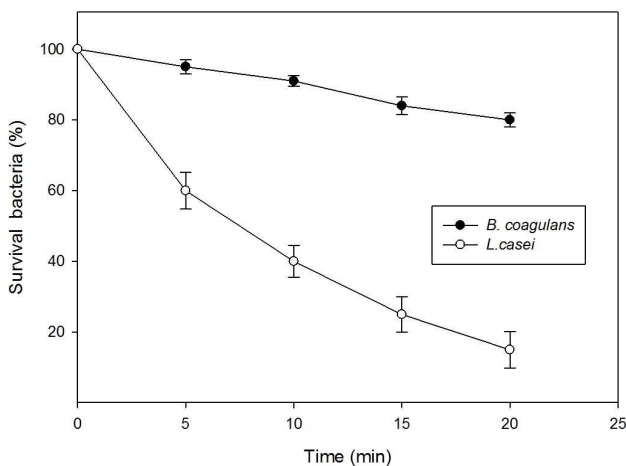


Fig. 3. Survival rate of *Lactobacillus casei* and *Bacillus coagulans* at boiled water.

부상 및 침전되는 경향을 나타내는 문제점이 있어 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 균주의 내산성

커피 검체 1 g을 pH 1.0, 2.0, 3.0로 조정된 peptone 수(0.1% peptone) 용액에 첨가해서 용해한 후 37°C에서 20분, 120분 동안 배양하면서 시료를 채취하여 생존율을 조사한 결과 Fig. 4와 같다. pH 2.0~3.0에서는 *Lactobacillus casei* 균주와 *Bacillus coagulans* 균 제제 모두가 우수한 생존력을 나타내었고, pH 1.0에서는 *Bacillus coagulans* 균제제가 더 우수한 생존력을 보여, 인체 내 위장(胃腸)에서도 생존가능성이 높음을 확인하였다.

Maathuis 등(2010)은 인체내 장 track 환경과 유사하도록 모형실험모델(TIM-1)을 통해 *Bacillus coagulans* 균제제(Ganeden-BC30)의 모형장기 투과 실험을 한 결과, 포자 발아율이 10%

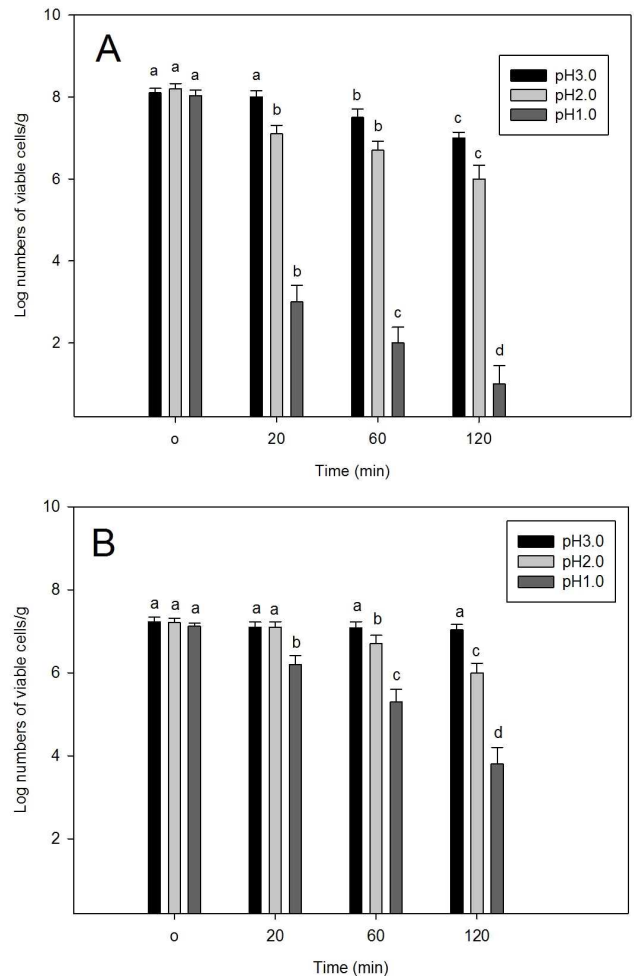


Fig. 4. Survival rate of *Lactobacillus casei*(A) and *Bacillus coagulans*(B) in various pH. Bars represent mean±S.D. (n=3). Different letters (a,b,c,d) in the bar mean significant difference at $p < 0.05$ level by Tukey's test.

미만이지만, 전체 생존율은 70% 이상이었다고 보고하였다. 또한, milk, lactose 또는 fructose 등과 함께 투과 시 *Bacillus coagulans* 균제제(GanedenBC30)가 소화율 상승에도 영향을 주는 것으로 보고하였다.

5. 균주의 내담즙성

인체 내 담즙 농도는 0.3%(Dunne 등 2001)에서 0.5%(Zavaglia 등 1998)로 실험 검체샘플 1 g을 0.3%, 0.5%, 1.0% oxgall이 함유된 유산균의 증식용 배지에 첨가해서 테스트 후 생존율을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. *Lactobacillus casei* 균주와 *Bacillus coagulans* 균제제 모두가 oxgall 0.3~1.0% 농도에서 2 시간까지도 우수한 생존력을 나타내어 인체 소화기관인 소장(小腸) 내에서 생존가능성이 우수함을 나타내었다.

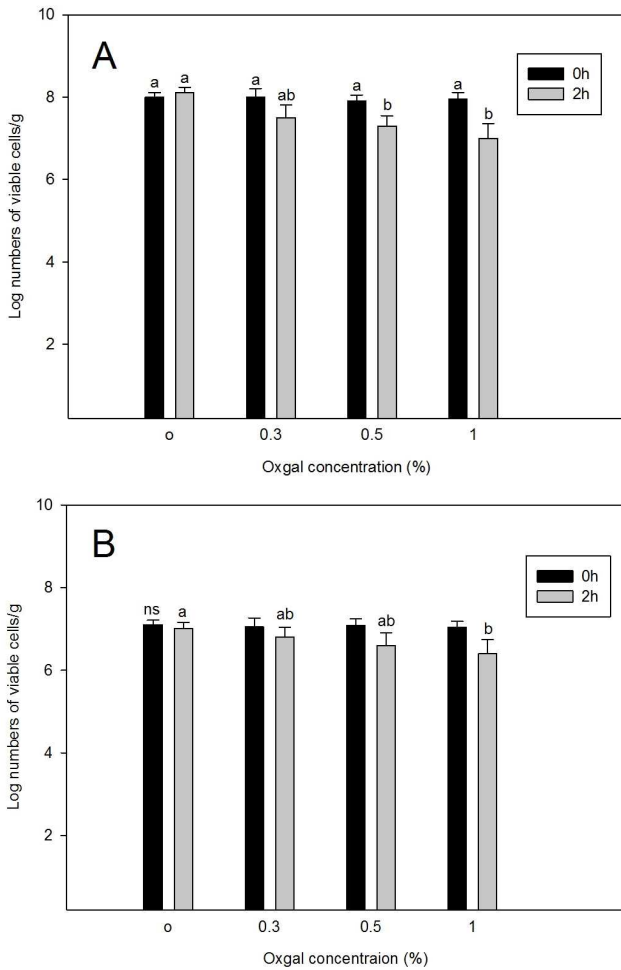


Fig. 5. Survival rate of *Lactobacillus casei*(A) and *Bacillus coagulans*(B) in various oxgall concentration(%) for 2h. Bars represent mean±S.D. (n=3). Different letters (a,b) in the bar mean significant difference at $p<0.05$ level by Tukey's test. ns: not significant.

6. 가혹조건에서의 동결건조커피 유산생성균주 경시변화

실험을 통해 생존력이 뛰어난 *Bacillus coagulans* 균제제가 함유된 동결건조커피를 제조 후 흡습이 되지 않도록 밀봉 포장한 다음, 37°C 항온실에서 9개월간 방치한 후 3개월 주기로 시료를 채취하여 생존수를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 그 결과, 동결건조상태로 보존 중에도 균 생존력이 초기 균수에 비해 80% 이상 유지됨이 확인되어, 장기간 유통환경이 동결건조 커피내의 *Bacillus coagulans* 균제제(GanedenBC30) 생존수 변화에 크게 영향이 없어 상업적 이용성이 높은 것으로 사료된다.

요 약

정장작용, 면역체계 조절, 알레르기 저감, 콜레스테롤 경감 등 여러 기능적 효능이 알려진 프로바이오틱스 건강기능 식품이 증가하고 있다. 본 연구에서는 기능성 커피 상품개발을 위하여 커피 배합에 최적인 probiotic 균주를 선발하고자 하였다. 국내의 유통 중인 동결건조커피에서 분리한 균주 1종, 발효유 스타터로 사용되는 균주 8종, *Bifidobacterium* 1종, *Bacillus coagulans* 1종으로 동결건조 후 생존율, 커피 음용 환경 생존율, 내산성 및 내담즙성을 측정하였다. *Bacillus coagulans*는 초기 균수 2.4×10^7 cfu/g에서 동결건조 후에도 2.0×10^7 cfu/g으로 높은 생존율을 나타냈고, 커피의 음용 환경, 내산성, 내담즙성 테스트에서도 대조균인 *Lactobacillus casei* 균에 비하여 우수한 생존율을 나타냈다. 특히, 내산성 테스트에서는 pH 1, 120분 조건에서 *Bacillus coagulans*이 대조균에 비하여 3.8배 높은 생존율을 나타냈다. 이에 포자형성을 특징으로 하는 유산생성 *Bacillus coagulans* 균제제를 기능성 커피 배합 및 상품화에 적

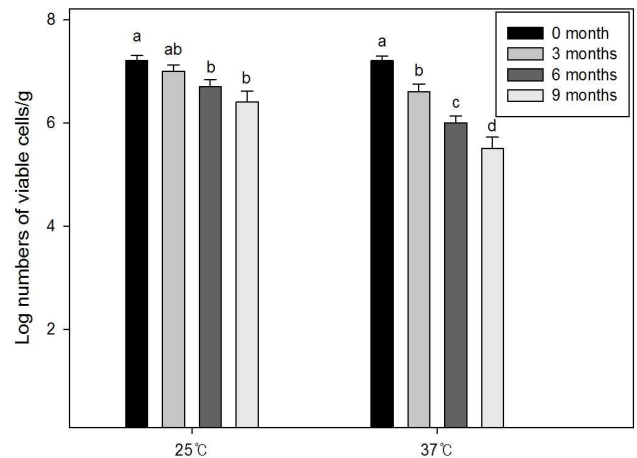


Fig. 6. Survival rate of *Bacillus coagulans* in freeze-dried coffee after 3~9 months at 37°C. Bars represent mean±S.D. (n=3). Different letters (a,b,c,d) in the bar mean significant difference at $p<0.05$ level by Tukey's test.

합한 probiotic 균주로 판단하였다.

References

- Benković M, Srećec S, Špoljarić I, Mršić G, Bauman I. 2015. Fortification of instant coffee beverages-influence of functional ingredients, packaging material and storage time on physical properties of newly formulated, enriched instant coffee powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:2607-2618
- Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V. 2003. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin Infect Dis* 36:775-780
- Choi JB, Shin YW, Paek NS, Kim YM. 2004. Influence of herbal extract on lactic acid bacteria growth and cryoprotectants. *Korean J Food & Nutr* 17:286-293
- Dave R, Shah NP. 1997. Viability of probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. *Int Dairy J* 7:31-41
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotics bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 73:386S-392S
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report (online)
- Fuller R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* 32:439-442
- Gibson G. 2010. *Bacillus coagulans* as a probiotic, Food Science and Technology Bulletin. *Functional Foods* 7:103-109
- Gorbach SL. 2002. Probiotics in the third millennium. *Dig Liver Dis* S2-S7
- Hamilton-Miller J. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob AG* 22:360-366
- Isolaure E, Kirjavainen PV, Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 50:54-59
- Jalali M, Abedi D, Varshosaz J, Najjarzadeh M, Mirlohi M, Tavakoli N. 2012. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerance* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in pharmaceutical sciences* 7:31
- Kumar M, Verma V, Nagpal R, Kumar A, Behare PV, Singh B, Aggarwal PK. 2011a. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1 induced liver carcinogenesis in rats. *Br J Nutr* 107:1006-1016
- Maathuis, AJH, Keller D, Farmer S. 2010. Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic *in vitro* model of the stomach and small intestine. *Beneficial Microbes* 1:31-36
- Marshall RT, ed. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, D.C.
- Matsuzaki, Takeshi, James Chin. 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology* 78:67-73
- Ouwehand, Arthur C, Seppo Salminen, and Erika Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:279-289
- Park SJ, Kim DH, Paek NS, Kim SS. 2006. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria (FGL). *Journal of Ginseng Research* 30:88-94
- Pereira DIA, Gibson GR. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 68:4689-4693
- Ravinder N. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett* 334:1-15
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16:658-72
- Salminen S, Boyley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 147-171
- Samar M, Zahar E, Leila N. 2013. The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotics by micro-encapsulation. A review. *Annals of Biological Research* 4:83-87
- Sanders ME, Morelli L, Tomkins TA. 2003. Sporeformers as human probiotics: *B. Sporelactobacillus* and *Brevibacillus*. *Compr Rev Food Sci F* 2:101-110
- Saxelin M. 1997. *Lactobacillus* GG-A human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev Int* 13:293-313
- Vanos V, Bindschedler O. 1985. The microbiology of instant coffee. *Food Microbiology* 2:187-197
- Zavaglia AG, Kociubinsky G, Pérez P, de Antoni G. 1998. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotics formulation. *J Food Prot* 61:865-873

Received 09 November, 2016
 Revised 28 November, 2016
 Accepted 15 December, 2016