

빵효모 저장성 향상을 위한 동결보호제로서의 투라노스 활용 연구

배고은¹ · 최성원¹ · 이병호² · 유상호^{1,*}

¹세종대학교 식품생명공학과, ²가천대학교 식품생명공학과

Application of turanose as a cryoprotectant for the improvement of Baker's yeast storability

Go-Eun Bae¹, Seong-Won Choi¹, Byung-Hoo Lee², and Sang-Ho Yoo^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Carbohydrate Bioproduct Research Center, Sejong University

²Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University

Abstract In this study, the protective effects of turanose on *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) were examined during the freeze-drying process to evaluate the feasibility of utilizing turanose as a novel cryoprotectant. The survival rate of the Baker's yeast cells improved substantially with a cryoprotective medium containing turanose in a substitution-dependent manner. In accordance with these survival rates, the yeast cell surfaces became smoother as the turanose content increased. Turanose with skim milk maintained the viability of the Baker's yeast, which improved substantially upon storage at -20°C . Thus, it is thought that turanose will exhibit excellent preservation effects during the distribution of Baker's yeast. Finally, these results suggest that turanose has the potential to be used as a novel cryoprotectant against various microorganisms.

Keywords: turanose, cryoprotectant, *Saccharomyces cerevisiae*, freeze-drying

서 론

미생물을 장기 보존하기 위한 가장 우수한 저장 방법은 동결이나 동결건조라고 할 수 있으나, 용해, 파열 등에 의한 세포막의 손상이 원인으로 인하여 미생물의 어느 정도의 사멸이 발생하게 된다(Pringle, 1981; Potts, 1994). 이를 억제하기 위하여 동결보호제가 활용되고 있으며, 이는 동결저장 시 수분과 결합하고, 세포내외의 빙결정 형성을 억제시킴으로써 미생물의 생존율을 높이게 되는 효과를 가지고 있다(Morgan 등, 2006). 따라서 동결 건조 과정에서 미생물의 생존율을 향상시키기 위해 다양한 동결보호제(예, 탈지 분유, 유청 단백질, 글리세롤, 포도당, 트레할로스, 자당, 유당)가 활용되어왔으며(Meng 등, 2008), 미생물 세포를 안정화하기 위해 동결건조 전에 동결보호제를 세포 배양물에 첨가하는 방법이 이용되어 왔다. 특히, 트레할로스(trehalose)는 열처리, 탈수, 동결, 고 에탄올 농도 등의 스트레스 조건에서 유산균, 비피더스균, 효모 세포 등의 생존율을 증가시켜, 동결보호제로서 생체막 보호에 가장 효과적인 소재 중 하나로 알려져왔다(Carvalho 등, 2002; Hino 등, 1990; Leslie 등, 1995). 최근에는 자당으로부터 생축매 기법인 효소적 구조변화 공정을 통해 투라노스의 산업적 대량 생산이 이루어졌으며, 대체 감미료로서의 이화학적 및 생리학 기능에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다(Park 등, 2016;

Wang 등, 2012). 본 연구에서는 이러한 기능성 이당류인 투라노스의 빵효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 동결 건조 과정에서의 동결보호 능력에 관한 실험을 통하여, 신개념의 동결보호제로서의 활용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 활용된 투라노스(turanose)는 왕 등의 방법에 따라 실험실에서 자체적으로 생산하였다(Wang 등, 2012). 트레할로스 및 자당(sucrose)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 빵효모(*S. cerevisiae*)는 ㈜오뚜기 연구소(Anyang, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 이외의 시약과 용매들은 ACS 등급의 것을 사용하였다.

투라노스의 동결건조된 빵효모에서의 동결보호 효과

YPD 배지(5 mL; Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종한 빵효모(*S. cerevisiae*)를 37°C 에서 48시간 동안 배양 후, 세포 배양액을 액상YPD 배지(250 mL)에서 추가로 48시간 동안 진탕배양하였다(37°C , 140 rpm). 배양된 효모를 원심분리(5,000×g, 10 min)한 후, 회수된 세포를 증류수로 2회 세척하고 새로운 액상 YPD 배지(25 mL)에 재현탁하였다. 이 현탁액(5 mL)을 다시 원심분리하여 효모세포와 배지를 분리한 후, 동결 보호 효과를 평가하기 위해 다양한 농도(0-12%, w/v)의 투라노스가 포함된 배지에 분산시켰다. 또한, 동결 보호제를 첨가하기 전에 배지를 121°C 에서 10분 동안 고압 멸균하였으며, 트레할로스(8%, w/w)는 대조군으로 비교하였다. 동결보호제로 활용될 투라노스 및 트레할로스는 $0.2\ \mu\text{m}$ 멤브레인 필터(Pall Acrodisc®, Port Washington,

*Corresponding author: Sang-Ho Yoo, Department of Food Science and Biotechnology, Carbohydrate Bioproduct Research Center, Sejong University, Seoul 05006, Republic of Korea
Tel: +82-2-3408-3221
E-mail: shyoo@sejong.ac.kr
Received January 12, 2022; revised February 9, 2022;
accepted February 9, 2022

NY, USA)를 사용하여 여과하여 멸균하였다. 빵효모 현탁액은 효모 세포의 수를 계수한 후(Jalali 등, 2012), -80°C 초저온냉동고(MDF-U52V, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 24시간 동안 동결시켰다. 동결된 세포 샘플은 동결 건조기에서 48시간 동안 동결 건조(FDA8512, IIShinBioBase, Dongducheon, Korea) 후, 세포 샘플을 표준 100 메쉬(Daihan Scientific Co., Wonju, Korea)로 균질화하였다.

생균세포 계수

동결 건조 전후의 동결 보호 배지에서 생존 가능한 빵효모 세포(CFU/mL)를 표준 poured-plate 방법으로 계수하였다. 동결 건조된 효모 세포를 증류수에 현탁시킨 후, 다양한 농도로 희석시켜 YPD 플레이트에 접종하고 37°C에서 48시간 동안 배양 후, 콜로니를 계수하여 빵효모 수를 CFU/g으로 나타내었다. 생존율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{생존률(\%)} = 100 \times \frac{\text{동결건조 후의 콜로니 수(CFU/g)}}{\text{동결건조 전의 콜로니 수(CFU/g)}}$$

세포표면 분석

백금(SCD 005, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein)으로 코팅한 *S. cerevisiae* 세포의 표면은 전계방출형 주사전자현미경(FE-SEM, S-4700, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 15 kV에서 10,000배의 배율로 관찰하였다.

저온 보관중 효모세포의 생존률 분석

저온 보관 중 세포 생존율에 대한 동결 보호제의 영향을 관찰하기 위해 사전 배양된 빵효모 세포 침전물을 5% (w/v)의 탈지유를 함유하는 동결 보호 배지에 분산시켰다. 빵효모 현탁액은 동결 건조처리 하였으며, 확보된 시료는 표준 100 메쉬로 균일화

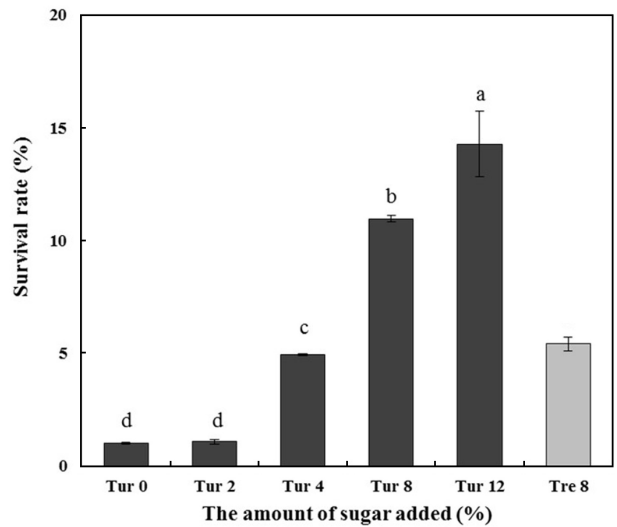


Fig. 1. Survival rate of *S. cerevisiae* cells after the freeze-drying process in the presence of cryoprotectant. The data are means±SD of triplicate experiments. The bars with the different letters are significantly different each other ($p < 0.05$).

한 후, 생존 세포의 안정성을 분석하기 위해 90일 동안 -20°C에서 보관하였다.

통계분석

통계처리는 SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) software를 이용하여 분석하였고, 처리구간의 평균간 비교는 Tukey의 HSD 다중검정을 통하여 유의성 검정($p < 0.05$)을 실시하였다.

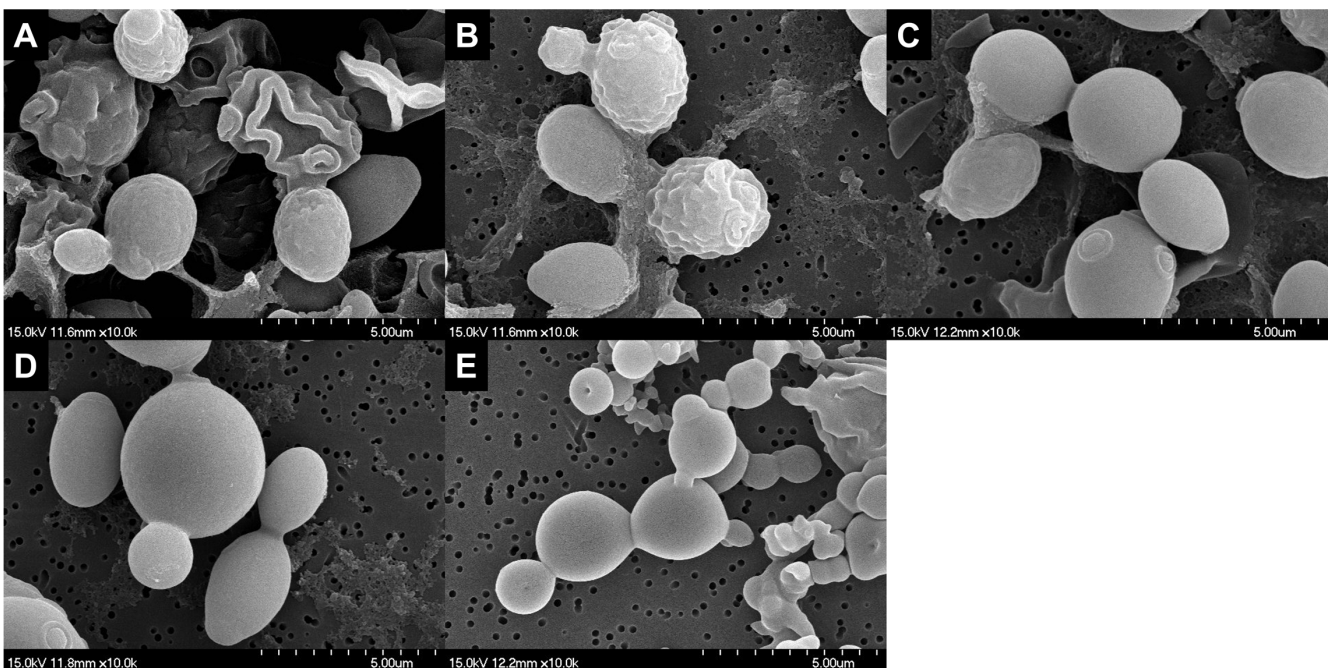


Fig. 2. The SEM microphotographs of *S. cerevisiae* after freeze-drying with 0% (A), 2% (B), 4% (C) and 8% (D) of turanose (w/v), and 8% (w/v) of trehalose (E). The single increment in the scale at the right bottom side of each image indicated 5 μm length.

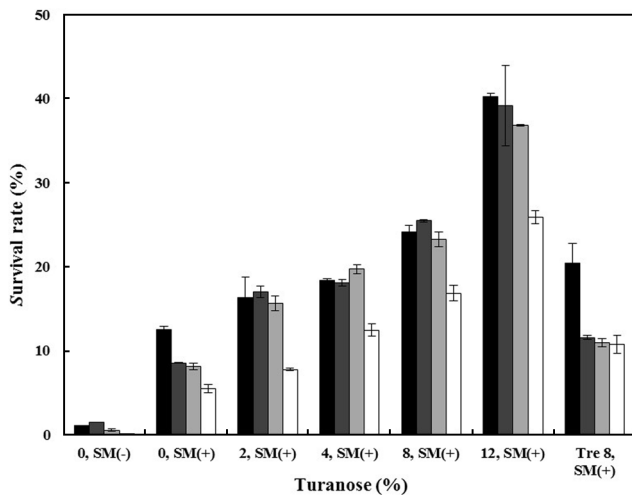


Fig. 3. Cell viability of *S. cerevisiae* after freeze-drying and storage at -20°C in the presence of cryoprotectant media for 90 days. The freeze-dried powder of yeast and medium mixture was stored for 0 (■), 30 (■), 60 (▨), and 90 days (□). The data are means \pm SD of triplicate experiments. The SM(+) indicates 5% of skim milk, and SM(-) means no skim milk.

결과 및 고찰

투라노스의 동결건조된 빵효모 동결보호능 평가

동결 건조된 빵효모(*S. cerevisiae*)의 세포 생존율을 측정하여 투라노스의 동결 보호 능력을 평가하였다(Fig. 1). 동결보호제가 첨가되지 않은 빵효모는 동결건조 후 대략 1.1% 정도만 생존하였으나, 12% (w/v)의 투라노스가 동결보호제로서 첨가된 시료의 경우, 생존율은 동일한 처리 조건에서 14.3%로 증가하는 효과가 나타났다. 또한, 대조군으로 활용된 8% 트레할로스의 경우, 4% 투라노스 처리된 효모 세포의 생존율(4.9%)과 통계적으로 유의한 차이($p < 0.05$)는 관찰되지 않았다. 또한, 대조군과 같은 농도(8%)의 투라노스 처리된 효모 세포의 생존율은 트레할로스 보다 대략 2배 정도(11.0%) 더 증가하는 효과가 나타났다(Fig. 1). 따라서, 본 연구 결과를 통해 투라노스는 투여량 의존적으로 트레할로스보다 효모 세포의 생존력 향상에 강한 동결보호 효과가 있음을 제시하였다.

동결 건조된 효모 세포의 표면 분석

투라노스가 포함된 보존배지에서 동결 건조된 빵효모의 표면 분석을 한 결과, 세포 생존에 충분한 양의 동결보호제와 함께 동결 건조했을 때, 효모 세포의 고유한 형태인 매끄러운 둥근 모양의 표면이 잘 보존되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 그러나, 동결보호제없이 동결 건조된 빵효모의 경우 탈수 및 손상되어 세포 표면에 영향을 주는 것이 확인되었으며(Fig. 2A), 4 및 8%의 농도로 투라노스 처리된 효모세포(Fig. 2C 및 2D)와 대조군으로 사용된 트레할로스(8%) 처리된 시료(Fig. 2E) 간에는 세포 표면 형태에서 명백한 차이가 없음을 확인하였다.

동결 건조된 빵효모의 장기간 냉동 보관에 대한 투라노스의 효과

산업적인 측면에서 빵효모의 품질을 향상시키기 위해서는 저장 및 유통 기간 동안 세포의 생존력을 향상시키는 것이 중요하다(Miyamoto-Shinohara 등, 2000). 저장 기간 중 빵효모 균주의

생존율에 대한 투라노스의 영향을 조사하기 위해 동결 건조 전에 세포를 5%(w/w) 탈지유와 함께 투라노스 또는 트레할로스의 동결 보호 배지에 분산시킨 후 최대 3개월간 냉동 보관하였다. 실험개시일(0일)에 투라노스 12% (w/w)와 탈지유 5%의 혼합물에서 효모 세포의 최대 생존율은 40.2%였으며, 60일 냉장 보관 후에도 생존율은 36.8%로 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 투라노스의 첨가가 동결보호제로 활용된 탈지유와 함께 동결 건조된 빵효모에 대하여 동결 보호 효과를 강화시킬 수 있는 효과가 있음을 확인하였다(Abadias 등, 2001). 또한, 세포를 동결 건조한 직후 대조군으로 사용된 트레할로스(8%)와 탈지유(5%)의 경우 20.4%의 생존율을 나타내었지만, 30일 후에는 11.6% 미만으로 감소한 후 30일부터 90일까지는 동일한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 반면에, 동결건조 후 초기 빵효모의 생존율은 투라노스(8%) 및 5% 탈지유에서 24.1%였으며, 60일 후에도 여전히 23.3%의 생존율을 유지하였다. 따라서, 현재 상업용으로 활용되고 있는 동결보호제인 트레할로스에 비해, 본 연구에서 실험한 투라노스가 세포 손상에 대한 보존 능력이 비슷하거나 훨씬 더 뛰어난 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 새로운 자당대체제인 투라노스의 동결건조 과정에서 빵효모로 널리 활용되고 있는 *S. cerevisiae*에 대한 동결 보호 효과를 평가하였다. 빵효모 세포의 생존율은 동결보호제로서 투라노스를 첨가함에 따라 증가되는 것을 확인하였으며, 세포 표면의 손상을 동결로부터 보호해주는 것을 규명하였다. 또한, 탈지유가 포함된 투라노스는 냉동보관 시(-20°C), 빵효모의 생존력이 크게 향상되는 것으로 확인되었으며, 이는 빵효모의 유통 과정에서 우수한 보존 효과를 기대할 수 있다. 따라서, 투라노스는 동결보호 능력이 강화된 신개념의 소재로서 활용이 기대된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(115035033HD020).

References

- Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Viñas I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 173-182 (2001)
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnol. Lett.* 24: 1587-1591 (2002)
- Hino A, Mihara K, Nakashima K, Takano H. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1386-1391 (1990)
- Jalali M, Abedi D, Varshosaz J, Najjarzadeh M, Mirlohi M, Tavakoli N. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Res. Pharm. Sci.* 7: 31-36 (2012)
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3592-3597 (1995)
- Meng X, Stanton C, Fitzgerald G, Daly C, Ross R. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 106: 1406-1416 (2008)

- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*. 41: 251-255 (2000)
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods*. 66: 183-193 (2006)
- Park MO, Lee BH, Lim E, Lim JY, Kim Y, Park CS, Lee HG, Kang HK, Yoo SH. Enzymatic process for high-yield turanose production and its potential property as an adipogenesis regulator. *J. Agric. Food Chem*. 64: 4758-4764 (2016)
- Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev*. 58: 755-805 (1994)
- Pringle MJ CD. Biomembrane structure and effects of temperature. 21-37. In: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. C. A. Morris GJ. Academic Press, New York, USA. 21-37 (1981).
- Wang R, Bae JS, Kim JH, Kim BS, Yoon SH, Park CS, Yoo SH. Development of an efficient bioprocess for turanose production by sucrose isomerisation reaction of amylosucrase. *Food Chem*. 132: 773-779 (2012)