

유산균의 생존율 향상을 위한 동결건조보호제로서 호박분말의 효과

강창호*, 김용경, 한설화, 김진성, 정윤아, 백남수

Effect of Pumpkin Powder as Cryoprotectant to Improve the Viability of Freeze Dried Lactic Acid Bacteria

Chang-Ho Kang*, YongGyeong Kim, Seul Hwa Han, Jin-Seong Kim, Yulah Jeong, and Nam-Soo Paek

Received: 11 September 2017 / Revised: 13 October 2017 / Accepted: 23 October 2017

© 2017 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Food-grade protective agents such as sucrose, skim milk, and pumpkin powder were studied for their ability to improve the viability of freeze-dried lactic acid bacteria, including *Lactobacillus plantarum* MG989, *L. fermentum* MG901, *Streptococcus thermophilus* MG5139, *Lactococcus lactis* MG 534, *Enterococcus faecium* MG89-2, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* MG741. The best results were obtained with 5% sucrose contained 10% skim milk and 2% pumpkin powder; approximately 43.1 to 86.6% cell viability was observed during the freeze-drying process. During accelerated storage of freeze-dried lactic acid bacteria, those survival rate decrease rapidly, reaching 9.8~35.2% in 1 month. As a result, the group (5% sucrose, 10% skim milk, and 2% pumpkin powder) showed the protective effect much higher by 639.5% than the control group (5% sucrose and 10% skim milk). These results suggested that pumpkin powder was good candidate as a potential cryoprotectant agent.

Keywords: pumpkin powder, cryoprotective agent, lactic acid bacteria, freeze drying

1. INTRODUCTION

프로바이오틱스는 숙주의 장내미생물 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다 [1]. 현재

프로바이오틱스로 사용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*와 같은 유산균이 많이 사용되어지고 있다 [2]. 특히 프로바이오틱스 유산균은 장내균총의 안정화, 유해세균의 정착억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감, 변비억제 등의 다양한 효과를 가진다고 알려져 있다 [3-6]. 유산균이 프로바이오틱스로서 유용한 기능을 나타내기 위해서는 섭취한 많은 수의 균이 사람의 소화기관을 통과하여야 함으로, 유산균이 프로바이오틱스로 사용되기 위해서는 사람 장관의 위산과 담즙산에 대한 안정성을 기본적으로 보유해야 한다. 프로바이오틱스는 일반적으로 발효, 정제, 보관, 섭취 단계를 거쳐 인체 내에 들어오게 되는데, 산도, 산소, 열 등 주변 환경에 매우 민감하기 때문에 안정성이 보장된 유산균 제제기술개발은 프로바이오틱스 제품 개발에 있어 매우 중요한 요소이다 [7,8].

유산균의 지속적인 안정성유지를 위한 장기보존 방법으로 동결건조 방법을 주로 사용하고 있으며, 동결건조는 유산균체를 냉동 건조시켜 저장하는 방법 [9]으로 대부분의 유산균을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다. 동결건조 방법은 오염방지, 저장, 간편성의 장점을 가지고 있으나, 동결건조 과정에서 물리적, 생화학적 스트레스로 세포의 활성과 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 유산균의 생존율을 최대한 높일 수 있는 방법이 요구되고 있다 [10]. 현재 유산균의 동결건조 기술로 기능성 고분자 및 다당류로 캡슐화시키는 방법과 세포 보호제를 첨가하여 동결건조하는 방법이 주로 이용되고 있다 [11,12]. 동결건조 시에는 온도와 수분의 손실을 최소화하기 위해 탈지유 (skim milk), 전분 (starch)와 같은 고분자 물질과 glucose, lactose와 같은 저분자 물질 등이 이용된다 [12]. 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결 조건,

(주) 메디오젠
MEDIOPEN, Co., Ltd., Seoul 04157, Korea
Tel: +82-43-644-4216, Fax: +82-43-644-4215
e-mail: changho-kang@naver.com

건조 시간 등에 따라 다르며, 미생물의 종류에 따라서는 보호제가 생존율에 많은 영향을 미칠 수 있다 [13].

이에 본 연구에서는 다양한 유산균주의 동결건조 과정에서 생존율 증대를 위해 식품첨가 등급의 동결건조보호제를 탐색하고, 최적의 동결건조보호제 조건을 통해 가능성을 확인하고자 한다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 사용균주 및 보존

사용된 균주는 본 연구팀에서 보유하고 있는 *Lactobacillus plantarum* MG989, *Lactobacillus fermentum* MG901, *Streptococcus thermophilus* MG5139, *Lactococcus lactis* MG534, *Enterococcus faecium* MG89-2, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* MG741 6종을 사용하였다 [14,15]. 배양 배지로 *Bifidobacterium*속은 BL배지 (Nissui, Japan)를 사용하였으며, 그 외 5종은 MRS배지 (Difco, MI, USA)를 사용하였다. 배양온도는 *S. thermophilus* 균주는 42°C에서, 그 외 균주는 37°C에서 배양하였다. 실험균주의 장기보관방법으로 25% 글리세롤로 제조하여 -80°C에서 보존하여 유전적 변이를 최소화하였다.

2.2. 동결건조보호제 종류별 유산균의 생존율 확인

유산균의 생존율 향상을 위한 동결건조보호제로 식품첨가물 등급의 10% 탈지유 (Skim milk), 5% 자당 (Sucrose), 2% 호박분말 (Pumpkin powder)을 사용하였으며, 대조군으로 인산완충용액 (PBS; phosphate buffered saline)을 사용하였다. 균주를 7L 발효조 (KoBioTech Co., Ltd. Korea)에서 배양한 후 원심분리 (Supra 22K, Hanil Co. Ltd., Korea)를 5,000 rpm, 4°C로 30분간하여 균체를 회수한다. 회수된 균체는 각각의 동결건조보호제와 혼합하여 균질화한 후, -40°C로 동결시킨 다음 동결건조기 (Il Shin Co. Ltd., Korea)에서 건조하였다 [16]. 동결건조 후 건조된 균체는 분쇄하여 분말화시킨 다음 멸균 생리식염수 (0.85% NaCl)에 단계 희석하여 MRS 및 BL 배지에 도말한 후, 48~72시간 동안 배양하여 생존율을 비교하였다. 각각의 동결건조보호제 실험을 통해, 5% 자당을 기본구성으로 각 동결건조보호제를 혼합하여 동결건조보호제 조합에 의한 유산균 생존율의 효과를 검증하였다.

생존율(%) = 동결건조 후 시료의 CFU값 / 동결건조 전 시료의 CFU 값 × 100

2.3. 가혹 조건에서 동결건조 균 원료의 정시확인

대조군으로 5% 자당을 포함하여, 동결건조보호제로 10% 탈지유와 2% 호박분말을 사용하였다. 동결건조한 균 원료를 10 g씩 소분 및 밀봉하여 40°C에 1개월간 보관하면서 1주 간격으로 시료를 채취하여 멸균생리식염수에 단계 희석하여 MRS 및 BL 배지에 도말한 후, 48~72시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 가혹조건에서의 생존율을 확인하였다.

생존율(%) = 가혹조건에서의 시료의 CFU값 / 동결건조된 시료의 CFU 값 × 100

2.4. 통계처리

모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균값±표준편차로 나타내었으며, 실험결과와 통계적 유의성은 Minitab program (Minitab 16, Minitab Inc., State College, PA, USA) one-way 분산분석 (ANOVA)의 Turkey HSD test에 의해 시료간의 유의적 차이 ($p < 0.05$)를 검정하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 동결건조보호제별 생존율 확인

식품첨가등급의 3가지 동결건조보호제를 첨가하여 유산균의 동결보호효과를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 모든 동결건조보호제에서 동결건조 후 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 모든 실험균주에서 호박분말 (pumpkin)을 보호제로 사용하였을 경우 보호효과가 가장 우수한 것으로 확인하였으며, *B. lactis* MG741이 동결건조 직후 79.0±1.7%의 가장 높은 생존율을 나타내었으며, *L. plantarum* MG989와 *Lac. lactis* MG534가 각각 78.0±1.6%와 69.4±2.1%의 높은 생존율을 나타내었다. 실험에 사용된 모든 균주에서 호박분말을 동결건조보호제로 사용하였을 때 생존율이 40% 이상으로 매우 높은 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 호박분말의 주 원료로 사용되는 호박 (*Cucurbita maxima*)은 박과에 속하는 1년생 덩굴성 초본으로 남아메리카 페루가 원산지인 서양계 박으로 기호성 작물이며, 비타민 A, B1, B2, C의 함량이 높으며 그 외에도 칼슘, 나트륨, 인 등의 무기질 함량이 풍부한 것으로 알려져 있다 [17]. 일반적으로 건강식품으로 다양한 식품에 기능성 부재료로 사용되고 있으나, 현재까지 유산균의 동결건조보호제로 적용된 연구는 보고된 바 없다. 또한 호박분말은 섬유질, 무기질, 각종 비타민 등과 β -carotene을 비롯한 다양한 아미노산류가 풍부한 식품소재로서 [18], 본 연구에서는 동결건조보호제로 호박분말이 식품첨가등급의 경제적인 소재로 동결건조 과정 중에서 유산균을 보호해 주는 역할을 수행하는 것으로 사료된다. 동결건조보호제는 유산균의 생존율이 영향을 미치는 가장 중요한 인자이지만 종류에 따라 부작용을 야기할 수도 있다 [19]. 일반적으로 동결건조보호제로 사용되고 있는 탈지유의 경우에는 식품에 첨가할 경우 풍미에 영향을 미칠 수 있으며 섭취 시 유당불내증 등 소화에 어려움이 있으나, 호박분말의 경우 풍부한 섬유질에 식욕을 개선해주는 효능이 있으며 [20], 다양한 식품에 기능성 부재료 [21-23]로 사용하고 있어 부작용이 없는 소재가 될 수 있다.

3.2. 동결건조보호제 조합에 따른 유산균 생존율 확인

기본 동결건조보호제로 결정된 5% 자당에 첨가하여 사용할 수 있는 동결건조보호제 중 탈지유와 호박분말에 대한 생존

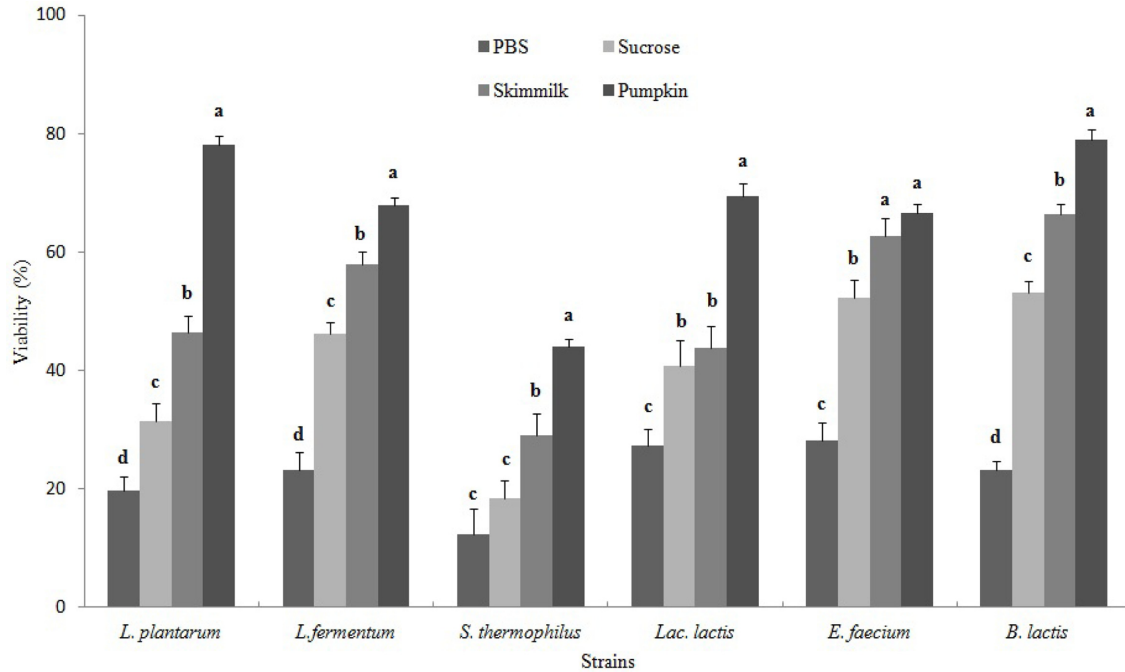


Fig. 1. Viability of lactic acid bacteria during freeze drying process depending on different protective agents. Data were expressed as mean \pm SD (n=3). Different characters were significantly different ($p<0.05$).

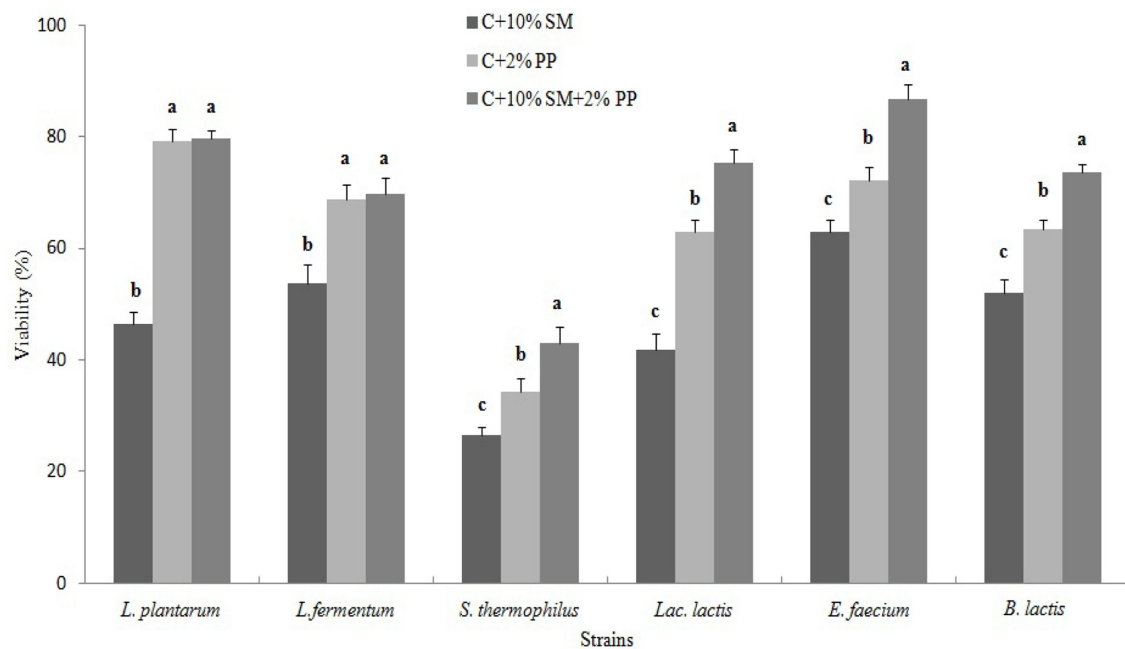


Fig. 2. Viability of lactic acid bacteria during freeze drying process depending on the combination of different protective agents. C, 5% sucrose; SM, skim milk; PP, pumpkin powder. Data were expressed as mean \pm SD (n=3). Different characters were significantly different ($p<0.05$).

율은 Fig. 2와 같다. *E. faecium* MG89-2 균주의 경우, 기본 보호제에 10% 탈지유와 2% 호박분말을 각각 혼합한 경우와 3가지 모두 혼합하였을 때 $62.8\pm2.4\%$, $72.2\pm2.3\%$, $86.6\pm2.7\%$

로 실험균주 중 가장 높은 생존율을 나타내었다. 실험에 사용된 모든 균주에서 기본 보호제에 10% 탈지유를 혼합한 조건보다 2% 호박분말을 혼합한 조건에서 생존율이 증가한 것을

Table 1. Survival rate of freeze-dried cell powder using the pumpkin powder as cryoprotectant after 1 month storage period at the 40°C

Strains		Survival rate(%) after 1 month storage period			
		1 week	2 week	3 week	4 week
<i>L. plantarum</i> MG989	C + 10%SM	36.0 ± 3.8	15.8 ± 2.3	11.3 ± 0.2	9.9 ± 0.2
	C + 2%PP	52.7 ± 2.4	36.1 ± 1.3	25.3 ± 0.3	13.4 ± 1.2
	C+10%SM + 2%PP	58.8 ± 3.1	42.0 ± 1.8	32.5 ± 0.3	19.1 ± 0.7
<i>L. fermentum</i> MG901	C + 10%SM	20.8 ± 1.3	16.7 ± 1.3	11.1 ± 2.0	1.1 ± 2.1
	C + 2%PP	48.3 ± 2.3	29.1 ± 2.5	20.1 ± 1.3	5.1 ± 1.9
	C+10%SM + 2%PP	59.1 ± 1.8	36.4 ± 1.9	23.5 ± 1.7	13.5 ± 2.0
<i>S. thermophilus</i> MG5139	C + 10%SM	16.2 ± 1.5	11.2 ± 0.4	6.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
	C + 2%PP	24.9 ± 1.3	17.1 ± 0.8	8.2 ± 0.4	2.5 ± 0.3
	C+10%SM + 2%PP	33.5 ± 1.4	27.0 ± 0.6	18.4 ± 0.3	9.8 ± 0.2
<i>Lac. lactis</i> MG534	C + 10%SM	32.8 ± 2.3	17.5 ± 0.3	7.2 ± 0.3	3.5 ± 0.1
	C + 2%PP	44.5 ± 4.3	25.7 ± 1.5	19.3 ± 1.1	12.7 ± 1.3
	C+10%SM + 2%PP	70.2 ± 3.3	37.6 ± 0.9	30.0 ± 0.7	23.9 ± 0.7
<i>E. faecium</i> MG89-2	C + 10%SM	40.0 ± 3.1	24.9 ± 1.3	11.9 ± 0.3	7.4 ± 0.4
	C + 2%PP	62.2 ± 4.1	53.8 ± 4.3	42.3 ± 1.4	26.4 ± 2.4
	C+10%SM + 2%PP	76.2 ± 3.6	66.1 ± 2.8	55.1 ± 0.9	35.2 ± 1.4
<i>B. lactis</i> MG741	C + 10%SM	44.0 ± 1.8	34.1 ± 0.7	26.3 ± 1.1	10.2 ± 0.2
	C + 2%PP	53.0 ± 3.5	42.3 ± 2.4	31.0 ± 1.8	19.8 ± 0.5
	C+10%SM + 2%PP	68.5 ± 2.7	53.5 ± 1.6	42.3 ± 1.5	28.5 ± 0.4

C: sucrose 5%, SM: skim milk, PP: pumpkin powder.

확인할 수 있었으나, 기본 보호제에 10% 탈지유, 2% 호박분말을 모두 혼합한 조건에서는 실험균주에 따른 유의적인 차이가 없었다. 기존의 연구결과 [13]에 따르면, 동결건조보호제는 미생물의 종류에 따라서도 생존율에 영향을 미친다고 알려져 있다. 본 연구에서도 실험균주에 따라 동결건조보호제 조성에 따른 생존율이 다르게 영향을 미치는 것을 확인할 수 있다.

3.3. 가속조건에서의 경시 변화

기본 보호제에 10% 탈지유를 첨가한 조건, 2% 호박분말을 첨가한 조건, 10% 탈지유와 2% 호박분말을 첨가한 총 3가지 조건에서 동결 건조된 균 원료에 대하여 가속조건 (40°C)에서 1개월간 보관하면서 1주 간격으로 확인한 생존율은 Table 1과 같다. 모든 실험균주에서 가속경시 1주차에서 기본 보호제와 10% 탈지유만을 혼합한 조건에 비해 호박분말을 동결건조보호제로 첨가한 경우 2배 이상의 높은 생존율을 확인할 수 있었으며, 가속경시 4주 후에도 매우 높은 생존율을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 호박분말은 단백질, 당, 무기질, 비타민을 포함하고 있으며, 단백질 및 당류가 균체를 포집 및 포괄하는 작용을 하며 동결 건조 후에는 건조균체의 세포벽과 결합하여 미생물을 코팅하여 균체를 보호하는 특성을 갖는 것으로 알려져 있다 [24]. 이를 통해 호박분말이 다양한 유산균주의 동결건조보호제 및 장기보존시 보호제로 사용가능함을 확인할 수 있었다.

4. CONCLUSION

본 연구는 다양한 유산균주의 동결건조 시 생존율을 높이기 위한 방안으로 기존의 동결건조보호제를 대체하기 위해 식품첨가물 등급의 다양한 동결건조보호제를 통한 생존율을 비교분석하였다. 호박분말은 단백질 및 당, 풍부한 무기질과 비타민으로 구성되어 있으며, 최근 기능성 식품소재로 많이 사용되고 있는 소재이다. 호박분말을 유산균의 동결건조보호제로 사용한 것은 본 연구가 최초로 시도되는 부분이며, 자당과 탈지유와 비교하였을 때 동결건조 후 실험에 사용된 모든 균주에서 모두 높은 생존율을 확인할 수 있었다. 또한 5% 자당과 2% 호박분말을 혼합한 조건에서 실험에 사용된 모든 균주에서 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 가속조건에서의 경시변화에서도 호박분말을 사용한 혼합동결건조 분산매 조건에서 호박분말을 사용하지 않은 동결건조분산매 조건에 비해 높은 생존율을 지속적으로 유지한 것을 통해 호박분말이라는 새로운 동결건조보호제를 선별한 것에 큰 의의가 있다고 사료된다.

REFERENCES

- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. (2001) *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. World Health Organization.
- Isolauri, E., S. Salminen, and A. C. Ouwehand (2004) Probiotics. *Best Prac. Res. Cl. Em.* 18: 299-313.
- Alander, M., R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, and A. von Wright (1999) Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamno-*

- sus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 351-354.
4. Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. G. Dobrogosz, and S. E. Lindgren (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 131-136.
 5. Seo J. G., G. S. Lee, J. E. Kim, and M. J. Chung (2010) Development of probiotic products and challengers. *KSBB J.* 25: 303-310.
 6. Vrese, M., A. Stegelmann, B. Ritcher, S. Fenselau, C. Laue, and J. Schrezenmeir (2001) Probiotics: Compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: S421-S429.
 7. Fukushima, Y., Y. Kawata, H. Hara, A. Terada, and T. Mitsuoka (1998) Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin a production in healthy children. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 39-44.
 8. Isolauri, E., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, and S. Salminen (2001) Probiotics: Effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444-450.
 9. Heckley, R.J. (1978) Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 24: 15-28.
 10. Park, I., C. M. Grant, P. V. Attfield, and I. W. Sawes (1997) The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3818-3824.
 11. Tao, X. Q., G. N. Lu, J. P. Liu, T. Li, and L. N. Yang (2009) Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6: 2470-2480.
 12. Zhao, G. and G. Zhang (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 99: 333-338.
 13. Yoon, S. S., H. O. Lee, and J. H. Yu (1986) Effect of the amino acid mixture on freeze-drying and preservation of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Korean J. Appl. Microbial. Bioeng.* 14: 421-426.
 14. Kang, C. H., Y. G. Kim, S. H. Han, Y. A. Jeong, and N. S. Paek (2017) Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Korean intestine origin. *KSBB J.* 32: 153-159.
 15. Kang, C. H., S. H. Han, Y. G. Kim, Y. A. Jeong, and N. S. Paek (2017) Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *KSBB J.* 32: 194-200.
 16. Bedu-Addo, F. K. (2004) Understanding lyophilization formulation development. *Pharm. Technol.* 28: 10-18.
 17. Kim, S.R., T. Y. Ha, H. N. Song, Y. S. Kim, and Y. K. Park (2005) Comparison of nutritional composition and antioxidative activity for kabocha squash and pumpkin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 171-177.
 18. Hidaka, T., T. Annmo, and S. Nakatsu (1987) The composition and vitamin a values of the carotenoid of sweet pumpkins of different colors. *J. Food Biochem.* 11: 59-64.
 19. Lim, Y. B., N. S. Park, and Y. M. Kim (2001) Screening of lactic acid bacteria for the development of probiotics and the effect of cryoprotectant agents. *Korean J. Food Nutr.* 14: 441-445.
 20. Heo, S. J., J. H. Kim, J. K. Kim, and K. D. Moon (1998) Processing of purees from pumpkin and sweet-pumpkin. *Korean J. Post-harvest Sci. Technol.* 5: 172-176.
 21. Woo, I. A., Y. S. Kim, H. S. Choi, T. H. Song, and S. K. Lee (2006) Quality characteristics of sponge cake with added dried sweet pumpkin powders. *Korean J. Food Nutr.* 19: 254-260.
 22. Han, C. W., W. J. Park, and S. K. Seung (2008) Optimization of preparation conditions and quality characteristics of sweet pumpkin stock. *Korean J. Food Preserv.* 15: 832-839.
 23. Chang, K. H., K. H. Cho, and M. K. Kang (2012) Optimization of the preparation conditions and quality characteristics of sweet pumpkin-doenjang sauce. *Korean J. Food Preserv.* 19: 492-500.
 24. Jeong, E. J., D. W. Moon, J. S. Oh, J. S. Moon, H. J. Eom, H. S. Choi, C. S. Kim, and N. S. Han (2012) Composition optimization of cabbage extract medium for cell growth of *Lactobacillus plantarum*. *KSBB J.* 27: 347-351.