반응표면분석법을 활용한 다시마 김치 유래 유산균의 신바이오틱스 최적화

이창현¹ · 심진하¹ · 김진현¹ · 송예준² · 손은익² · 김영목^{2,3} · 유대웅^{1,4}

¹창원대학교 시니어 휴먼 에콜로지 협동과정(식품영양학전공), ²부경대학교 식품공학과
³부경대학교 식품연구소, ⁴창원대학교 식품영양학과

Optimization of Synbiotics of Lactic Acid Bacteria Derived from Kelp *Kimchi* Using the Response Surface Methodology

Changheon Lee¹, Jin Ha Sim¹, Jin Hyeon Kim¹, Ye-Jun Song², Eun-Ik Son²,
Young-Mog Kim^{2,3}, and Daeung Yu^{1,4}

¹Interdisciplinary Program in Senior Human Ecology (Food and Nutrition) and

⁴Department of Food and Nutrition, Changwon National University

²Department of Food Science and Technology and ³Institute of Food Science,
Pukyong National University

ABSTRACT The purpose of this study was the optimization of the synbiotics of *Lactobacillus plantarum* D-12 isolated and identified from kelp *kimchi* with inulin, which is widely used as a prebiotic, using encapsulation technology and response surface methodology (RSM). Inulin concentration [x_1 , (w/v)], inlet temperature [x_2 , °C], synbiotics yield (Y_1), and survival rate of *L. plantarum* D-12 (Y_2) were designated as independent and dependent variables for the optimization of the synbiotics of *L. plantarum* D-12 using RSM. Y_1 was increased by increasing x_1 and x_2 , whereas it decreased at x_1 over 30% due to adhesion loss in the spray dryer vessel due to the increasing stickiness of the synbiotic solution. Y_2 was decreased by increasing x_1 and x_2 . Based on the ANOVA result, response models for Y_1 and Y_2 obtained from RSM were suitably fitted to a quadratic model. The predicted optimum x_1 and x_2 were 32% and 80°C. Based on the predicted optimum x values (x_1 , x_2), the predicted Y values were 71.70% and 97.43% for Y_1 and Y_2 and the measured Y values were $75.35 \pm 0.58\%$ and $98.12 \pm 0.46\%$ for Y_1 and Y_2 , respectively. The results of this study are expected to contribute to the probiotic industry by confirming the potential of prebiotics as a replacement for existing coating materials through the synbiotic optimization of *L. plantarum* D-12 with inulin.

Key words: encapsulation, prebiotics, probiotics, response surface methodology, synbiotics

서 론

프로바이오틱스란 인간이 섭취하였을 때 장내 미생물을 일정 수준으로 회복시키는 균으로 20세기 초 Elie Metchnikoff에 의해 프로바이오틱스의 개념이 최초로 도입되었다(Jankovic 등, 2010). 이러한 프로바이오틱스 제품의 시장은 2017년 465억 4천만 달러에서 2024년 768억 5천만 달러로 성장할 것으로 예측된다(Bustamante 등, 2020a). 이러한 프로바이오틱스 시장의 증가는 프로바이오틱스 제품에 대한 소비자들의 건강상 이점에 대한 인식이 증가하고 있기

때문이다(Oyetayo, 2004). 기존 연구에 의하면 프로바이오틱스 제품은 소화계통의 장내 미생물 환경을 개선할 뿐만 아니라 피부, 구강, 생식기 및 호흡기에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Gu 등, 2008). 이러한 프로바이오틱스의 효과는 섭취량이 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g 또는 mL 이상을 섭취했을 때 효과가 발현되며(FAO/WHO, 2002), 프리바이오틱스를 포함한 제품의 경우 저장 기간에 프로바이오틱스의 생존율을 유지해야 한다고 알려져 있다(Bustamante 등, 2017).

Encapsulation은 여러 유형의 식품 가공 및 저장 기간에 품질 유지를 도모하여 소재화하는 기술로 유산균의 경우 생

Received 9 September 2021; Revised 14 October 2021; Accepted 15 October 2021

Corresponding author: Daeung Yu, Department of Food and Nutrition, Changwon National University, 20, Changwondaehak-ro, Uichang-gu, Changwon-si, Gyeongnam 51140, Korea, E-mail: duyuu@changwon.ac.kr

Author information: Changheon Lee (Graduate student), Jin Ha Sim (Graduate student), Jin Hyeon Kim (Graduate student), Ye-Jun Song (Graduate student), Eun-Ik Son (Graduate student), Young-Mog Kim (Professor), Daeung Yu (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

존을 및 생존 기간 향상을 목적으로 활용된다(Desmond 등, 2002). 유산균 encapsulation의 경우 동결건조를 활용하였지만 오랜 건조 기간, 높은 생산 비용 등의 단점을 가지고 있으며, 이러한 단점을 극복하기 위해 최근에는 생산율이 높고 건조 시간이 짧은 분무건조가 널리 적용되고 있다(Bustamante 등, 2017). 그러나 분무건조 기술은 높은 건조 온도로 인하여 열에 의한 DNA와 막, 리보솜 손상을 유발하여 캡슐화된 유산균의 안정성을 감소시킬 수 있다(Teixeira 등, 1995). 이러한 단점을 극복하기 위해 분무건조 중 열 및 탈수 손상 예방, 보관 조건 및 위장 조건 향상 등을 위해 말토덱스트린, 단백질, 다당류 등의 피복물질 사용이 연구되고 있다(Fritzen-Freire 등, 2012; Corcoran 등, 2004).

Lactobacillus plantarum D-12 균주는 다시마 김치로부터 분리 동정된 유산균 중 우수한 콜레스테롤 감소력과 높은 항산화성을 가지고 있으며 뛰어난 내산성 및 내담즙성을 가지는 것으로 확인되었다(Ryu 등, 2020). 최근 연구에서 유산균의 저장 안정성을 증가시키고 유익한 영향을 제공할 수 있는 프리바이오틱스에 관한 관심이 높아지고 있다. 이러한 프리바이오틱스로는 섬유질, 다당류 및 단백질 등이 존재하며, 이는 encapsulation 및 보관 중 열 및 탈수 손상 예방 작용으로 프로바이오틱스의 생존율 및 생존 기간을 향상시킬 수 있어 연구가 활발히 진행 중이다(Bustamante 등, 2017). 프리바이오틱스는 프럭토올리고당(fructooligosaccharide), 이눌린(inulin, INL), 갈락토올리고당(galactooligosaccharide) 등의 다당류로서 비소화성 식품 소재로 장내 박테리아를 선택적 증식을 통한 숙주의 장 건강을 향상시키는 물질이라고 알려져 있다(Gibson과 Roverfroid, 1995). INL은 마늘, 양파, 치커리 뿌리 등과 같은 다양한 식물에 존재하는 과당 중합체의 불균일한 혼합물로, 프리바이오틱스, 점도 조절제, 지방 또는 설탕 대체제, 식이섬유로 사용할 수 있는 기능성 식품 성분이다(Apolinário, 등 2014). INL 섭취는 체내 트리아실글리세롤 농도를 감소시켜 죽상동맥 경화증의 위험을 줄이고 장관 질환(과민성 장 질환 및 결장암)의 위험도 줄이며 칼슘, 마그네슘 및 철의 흡수를 향상시킨다(Shim 등, 2014). 이러한 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 혼합물인 신바이오틱스에 대한 연구가 활발하게 진행 중이며, 신바이오틱스의 섭취는 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 두 가지 효능을 모두 볼 수 있다(Bustamante 등, 2020b).

반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)이란 여러 개의 변수값이 복합적인 작용을 통하여 반응 변수값에 영향을 미칠 때 이러한 반응의 변화가 이루는 반응 표면에 대한 통계적인 분석을 통한 최적화 실험 계획법으로 실험에 영향을 주는 소수의 인자를 활용한 반응의 최적 반응을 찾기 위해 활용되는 기술이다.

따라서 본 연구의 목적은 encapsulation 기술 및 반응표면분석법을 활용하여 다시마 김치 유래 유산균(*L. plantarum* D-12)의 신바이오틱스 시 프리바이오틱스(INL)의 혼

합 농도 및 분무건조 온도에 따른 최종 신바이오틱스 생존율과 수율의 변화를 반응표면분석법을 활용하여 신바이오틱스 최적화를 도출하는 것이다.

재료 및 방법

재료

Lactobacillus plantarum D-12는 다시마 김치에서 분리 동정하여 사용하였으며, inulin은 Now foods(Now Foods Co., Bloomingdale, IL, USA)에서 maltodextrin은 Max-1000(Matsutani Korea, Sungnam, Korea)을 구매하였다. 유산균수 측정 시 사용되는 배지는 deMan Rogosa Sharpe medium(MRS; Difco, Detroit, MI, USA)을 사용하였으며 Bromocresol purple은 Samchun Pure Chemical Co., Ltd.(Seoul, Korea)에서 구매하였다. *L. plantarum* D-12는 genomic DNA(Chelex bead; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 동정하였다.

유산균 분리 및 동정

유산균 분리 동정은 Ryu 등(2020)의 연구에 따라 다시마 김치 25 g을 채취하여 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) 225 mL로 10배 희석 후 3분간 균질화를 진행하였다. Bromocresol purple을 0.002%(w/v) 첨가한 MRS agar 배지에 도말 후 37°C에서 24시간 배양하여 단일 집락 주변의 노란색으로 변한 것을 유산균으로 판단하여 분리하였다. 분리된 유산균은 MRS broth에 24시간 전 배양 후 genomic DNA(Chelex bead, Bio-Rad)를 추출한 후 27F와 1492R primer를 이용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 분석 결과는 National Center for Biotechnology Information의 database 자료와 비교하여 동정하였다.

유산균의 배양

분리 동정된 *L. plantarum* D-12는 사용 전까지 -70°C에서 동결 보관하였으며, 동결 보관된 *L. plantarum* D-12균은 해동 후 MRS broth 배지 500 mL에 1 mL를 현탁하여 37°C 진탕배양기(DS 301-FL, Dasol Science, Hwasung, Korea)에서 18시간 진탕배양 후 9 log₁₀ CFU/g 농도로 사용하였다(Ryu 등, 2020).

반응표면분석법 및 신바이오틱스 최적화

MINITAB 프로그램(MINITAB Ver. 19, MINITAB, State College, PA, USA)을 활용하여 프리바이오틱스(INL) 농도와 분무건조 입구 온도에 따른 신바이오틱스 최적화에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design, CCD)을 적용하여 다음과 같이 설정하였다. INL 농도와 분무건조 입구 온도를 독립변수로 하여 실험하였으며, maltodextrin을 피복 물질로 하여 실시한 예비 실험을 통해 획득한 최적 입구 온도 및 농도를 토대로 본 실험의 분무건조 입구 온도

Table 1. Coded levels and variables used in CCD for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Independent variables	Symbol	Range and level		
		-1	0	+1
Inulin concentration (%, w/v)	x_1	25	30	35
Inlet temperature (°C)	x_2	80	95	110

및 INL 농도를 설정하였다. 실험 범위에 따라 부호화 및 부호화가 되지 않은 실제 실험값을 각각 Table 1에 표기하였으며, CCD에 따라 13구간으로 설정하여 실험을 진행하였다 (Table 2).

독립변수(X_1 , X_2)와 종속변수(Y_1 , Y_2) 상호 간의 관계에 따라 제시되는 반응표면 회귀계수 및 분산분석 결과를 토대로 모델(model), 1차항(linear), 2차항(quadratic), 교차항(cross-product) 및 적합성 결여도(lack of fit) 각각의 유의성(P -value)에 대한 인정($P < 0.05$) 여부를 확인하였고, 이들 결과값에 대하여 최종적으로 결정계수(R^2)를 확인하여 최적 조건을 산출하였다. 또한, 이를 근거로 하여 독립변수 및 종속변수의 설계 모형 적합성은 반응 최적화 도구를 이용하여 종속변수에 대한 각각의 최대값(maximum value)을 설정하여 분석하였다. 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수는 건조 수율(Y_1), 유산균의 생존율(Y_2)로 설정하였고, 각 실험의 회귀분석 결과는 다음 2차항 회귀 모형 식으로 나타내었다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5X_1X_2$$

Y : 종속변수, X_1 , X_2 : 독립변수

b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 : 회귀변수

Table 2. Matrix CCD experimental design for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Run no.	Experimental factor			
	Coded values ¹⁾		Actual values	
	x_1	x_2	Inulin concentration (%, w/v)	Inlet temperature (°C)
1	0	0	30	95
2	-1	0	25	95
3	1	1	35	110
4	1	0	35	95
5	0	1	30	110
6	0	0	30	95
7	1	-1	35	80
8	0	0	30	95
9	0	0	30	95
10	-1	1	25	110
11	0	0	30	95
12	-1	-1	25	80
13	0	-1	30	80

¹⁾ x_1 = Inulin concentration (%), x_2 = Inlet temperature of spray dryer (°C).

유산균의 encapsulation

유산균의 encapsulation은 spray dryer(ADL311S, Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 활용하여 반응 표면분석법에 제시된 실험 조건 하에 시료 주입량(100 mL/h) 및 automizer pressure(120 kPa)를 고정하고 프리바이오틱스(INL)의 농도 및 분무건조 입구 온도를 달리하여 실험을 진행하였다.

신바이오틱스 수율

신바이오틱스 수율(%)은 유산균 배양액의 고형물 함량을 105°C 상압건조 가열법을 통하여 구한 후 배양액의 고형분 함량과 첨가된 INL 함량 대비 최종 신바이오틱스 무게(g) 비로 나타내었다(수식 1).

$$\text{신바이오틱스 수율(\%)} = \frac{\text{신바이오틱스 무게}}{\text{유산균 배양액의 고형물 함량} + \text{첨가된 inulin 함량}} \times 100 \quad (1)$$

유산균 생존율

유산균의 생존율은 pour plate법으로 분석하였으며, 신바이오틱스화 전 유산균 배양액은 1 mL, 신바이오틱스 분말은 1 g을 9 mL의 멸균 생리식염수에 10진 희석 후 MRS agar 배지와 혼합 분주하여 37°C 배양기(HQ-DI84, Core Tech, Uiwang, Korea)에서 48시간 배양 후 계수하여 수식 2에 의해 초기 유산균수 대비 신바이오틱스화 후 유산균수 비를 계산하여 생존율로 나타내었다.

$$\text{Survival rate (\%)} = N/N_0 \times 100 \quad (2)$$

N = 신바이오틱스화 후 유산균 수(log₁₀ CFU/g)

N_0 = 신바이오틱스화 전 유산균 수(log₁₀ CFU/g)

구조분석

신바이오틱스 입자 표면 구조는 scanning electron microscope(SEM)를 활용하여 분석하였다. 먼저, 샘플 분말들을 gold ion coating 한 후 주사전자현미경(CZ/MIRA I LHM/H.S, TESCAN, Brno, Czech)으로 분석하였으며, 주사전자현미경 조건은 5.0 kV, 500~1,000배율로 하였다. 동결건조된 *L. plantarum* D-12 분말을 대조구로 하여 신바이오틱스 *L. plantarum* D-12와 비교 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정 후 평균과 표준편차로 나타내었다. RSM 모델의 통계적 유의성 및 적합성 결여 그리고 회귀계수는 MINITAB(Minitab Statistical Software, version 19)의 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 통해 결정하였으며, P -value가 0.05 이하인 것을 유의미하다고 판단하였다.

Fig. 1. 3D plotted results of CCD for synbiotics of *L. plantarum* D-12 as function of (A) synbiotics yield (Y_1) and (B) survival rate (Y_2).

결과 및 고찰

신바이오틱스 제조

제시한 중심 합성 계획(CCD)에 따라 INL 농도 [X_1 25~35%(w/v)] 및 분무건조 입구 온도 [X_2 80~110°C]를 독립 변수로 부호화하여 13개의 조건에 의해 제조된 신바이오틱스의 수율과 유산균 생존율은 Table 3과 같다. 신바이오틱스 수율은 63~78%, 유산균 생존율은 83~100% 범위로 관찰되었다. 그리고 독립변수(INL 농도 및 입구 온도)에 따른 종속변수(신바이오틱스 수율 및 유산균 생존율)의 변화는 3차원으로 도형화하여 Fig. 1에 나타내었다. 유산균의 생존율은 INL의 농도가 증가함에 따라 미미하게 감소하는 경향을 나타냈는데, 이는 INL 농도의 증가에 따른 초기균수의 상대적 감소 때문이다. 신바이오틱스 수율은 INL 농도가 25%에서 30% 증가함에 따라 약 68%에서 75%로 약 7% 정도 증가하였으며, INL 농도가 35%까지 증가 시 수율은 다시 약 3% 정도 감소하는 추세를 나타내었다. 이는 고형분 함량

증가가 일정 농도까지는 수율 증가에 긍정적인 영향을 주지만 일정 농도를 넘어서게 되면 점도의 상승으로 분무건조실 벽면 점착으로 인한 수율 저하로 이어지게 되며 나아가 산업적으로는 상당한 경제적 손실을 유발한다. Lian 등(2002)의 연구에서 gelatin, gum arabic 및 가용성 전분을 피복물질로 사용하여 30% 이상의 농도로 증가시켰을 때 유산균의 생존율 및 수율 감소가 관찰되었고, Corrêa-Filho 등(2019)은 분무건조를 적용한 β -카로틴의 encapsulation 시 피복물질(gum arabic) 농도 및 입구 온도에 따른 β -카로틴의 encapsulation 수율 및 항산화력은 입구 온도와 피복물질 농도와 반비례 관계를 관찰하였다.

신바이오틱스화 전 유산균 수는 $9.26 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/mL의 범위로 측정되었으며, 신바이오틱스화에 따른 유산균 수는 $7.76 \pm 0.3 \sim 9.10 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/g 범위로 측정되었다. 신바이오틱스화에 따른 유산균 생존율은 입구 온도 80°C일 때 약 100% 생존율을 나타내었고 110°C로 증가함에 따라 생존율이 $7.16 \sim 8.15 \log_{10}$ CFU/g 범위로 약 84.47%로 감소하는 것을 확인할 수 있었지만, 이는 FAO/WHO(2002) 발표에 근거하여 $6 \sim 7 \log_{10}$ CFU/g 이상의 유산균을 함유하고 있어 섭취 효과(장내 미생물 환경을 개선)는 충분할 것으로 판단된다. 이러한 유산균의 생존율 감소는 DNA 및 RNA의 변성, 세포질 막의 탈수, 수분 감소에 따른 세포막의 파열과 같은 세포 손상에 의한 것으로 설명된다(Behboudi-Jobbehdar 등, 2013). 신바이오틱스 용액 고형분 함량이 증가할수록 점도가 같이 증가하여 더 높은 분무건조 입구 온도가 요구되며 이는 유산균의 생존율을 감소시킨다. Huang 등(2016)에 따르면 encapsulation 전 높은 고형분 함량은 분무건조기 입구 온도의 상승을 유발하고 이로 인해 건조 후 유산균 생존율 감소를 초래하며, 나아가 프로바이오틱스의 품질 저하를 초래하여 적정 농도의 고형분 함량이 요구된다. Bustamante 등(2020a)의 연구에서는 입구 온도를 90~110°C의 범위로 실험하였을 때 가장 낮은 온도인 90°C에서 가장 높은 *L. acidophilus* La-05 생존율이 관찰되었다. 또한, INL의 농도 증가에 따른 유산균 생존율 증가를 확인하여 INL은 피복물질 및 프리바이오틱스로써 유산균의 열적 안정성 증진 및 손상 예방 효과를 확인하였다.

Table 3. Experimental design for CCD and its results for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Run no.	Experimental factor			
	Synbiotics condition ¹⁾		Y_1 (yield, %)	Y_2 (survival rate, %)
	x_1	x_2		
1	30	95	75.84	$88.12 \pm 0.77^2)$
2	25	95	71.05	92.24 ± 0.11
3	35	110	72.49	84.07 ± 0.47
4	35	95	72.98	86.46 ± 0.52
5	30	110	73.82	84.07 ± 0.47
6	30	95	76.94	87.29 ± 0.11
7	35	80	73.54	100.43 ± 0.59
8	30	95	75.44	86.82 ± 0.17
9	30	95	78.89	83.46 ± 0.11
10	25	110	63.39	90.79 ± 0.13
11	30	95	78.95	87.14 ± 0.60
12	25	80	68.25	98.56 ± 1.35
13	30	80	74.29	97.47 ± 0.91
Predicted	32	80	71.70	97.43

¹⁾ x_1 =inulin concentration (%), x_2 =inlet temperature of spray dryer (°C).

²⁾ Mean $\pm$ SD.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) results of CCD for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Independent variables	P-value				
	Model	Linear	Quadratic	Cross-product	Lack of fit
Yield (Y_1)	0.002	0.016	0.001	0.322	0.364
Survival rate (Y_2)	0.000	0.000	0.001	0.031	0.748

신바이오틱스 최적화

INL 농도와 분무건조 입구 온도를 독립변수로 CCD에 따라 13구간으로 설정하여 실험을 진행하여 도출한 종속변수인 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)을 바탕으로 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스 시 최적 프리바이오틱스(INL) 농도와 분무건조 입구 온도를 MINITAB 프로그램의 response surface analysis by least-squares regression(RSREG)을 활용하여 예측하였다. 신바이오틱스의 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)에 대한 반응모형방정식의 간결화를 목적으로 일차항, 이차항 및 교차항에 대한 유의성을 살펴본 결과(Table 4), 유의성이 인정되는($P < 0.05$) 항은 수율(Y_1)의 경우 일차항(x_1 , x_2), 이차항(x_1^2 , x_2^2) 및 유산균 생존율(Y_2)의 경우 일차항(x_1 , x_2), 교차항(x_1x_2), 이차항(x_1^2 , x_2^2)이었고 나머지 항들의 유의성은 인정되지 않았다. 따라서 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)에 관한 반응모형모델은 $Y_1 = -189.5 + 11.17x_1 + 1.986x_2 - 0.1972x_1^2 - 0.01283x_2^2$ ($R^2 = 0.8969$, $P\text{-value} = 0.002$), $Y_2 = 326.3 - 3.88x_1 - 3.296x_2 + 0.1020x_1^2 + 0.01949x_2^2 - 0.0274x_1x_2$ ($R^2 = 0.9588$, $P\text{-value} = 0.000$)와 같다. 반응모형모델의 독립변수와 종속변수 간의 상관관계를 ANOVA 분석으로 살펴본 결과는 Table 4와 같다. 신바이오틱스 제조 최적화를 위한 수율(Y_1)에 대한 반응모형모델의 적합성 여부를 나타내는 적합결여 검증의 경우 $P\text{-value}$ 가 0.364로 0.05보다 높고, 결정계수(R^2)가 0.8969로 높으면서 모델값이 0.002로 0.05보다 낮아 설계된 모형이 적합한 것으로 판단되었고, 유산균 생존율(Y_2)의 경우 적합결여 검증의 $P\text{-value}$ 가 0.748로 0.05보다 높고, 결정계수(R^2)가 0.9588로 높으며, 모델값이 0.000으로 0.05보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Hou와 Regenstein, 2004).

RSM으로 분석한 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스 예측 최적화 INL 농도 및 분무건조 입구 온도는 32% 및 80°C로 도출되었다(Fig. 2 및 Table 5). 예측 최적 신바이오틱스 제조 조건으로 제조하였을 때 제조된 신바이오틱스의 예측 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)은 71.70% 및 97.43%로 예측되었다. Bustamante 등(2020a)의 연구에서 프리바이오틱스인 inulin, chia 및 flax seed와 *L. acidophilus* La-05를 결합한 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)을 RSM에 적용하여 반응모형모델식을 도출하였을 때, 2차 방정식 모델이 가장 적합하였으며, 프리바이오틱스의 높은 예측 농도와 낮은 예측 입구 온도는 본 연구의 예측 결과와 유사하였다. 예측 최적 INL 농도 및 입구 온도를 적용하여 *L. plantarum* D-12의 신바이오틱스화 시 신바이오틱스 수율

Fig. 2. Optimization conditions of synbiotics yield (Y_1) and survival rate (Y_2) of *L. plantarum* D-12 as functions of inulin concentration (x_1) and inlet temperature (x_2).**Table 5.** Predicted values from CCD and measured values of yield and survival rate of synbiotics of *L. plantarum* D-12 (%)

	Predicted	Measured
Yield	71.70	75.35±0.58 ¹⁾
Survival rate	97.43	98.12±0.46

¹⁾Mean±SD.

(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)은 Table 5와 같다. 신바이오틱스 수율 및 유산균 생존율은 75.35% 및 98.12%로 이는 예측 신바이오틱스 수율(Y_1) 값보다 약 3% 높게 나타났으며, 유산균 생존율(Y_2)은 약 1% 높게 나타나 신바이오틱스 *L. plantarum* D-12 제조를 위한 최적 모델이라 판단하였다.

신바이오틱스 구조분석

Fig. 3은 SEM을 활용한 *L. plantarum* D-12 동결건조 분말과 예측 최적화 조건으로 제조된 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스 구조분석 결과이다. 동결건조 분말과 신바이오틱스의 형태를 비교하였을 때, 동결건조 분말의 입자크기가 분무건조 분말의 입자보다 약 10배 더 큰 것을 확인하였다. Park 등(2015)의 연구에서는 동결 및 분무건조 공정을 활용

Fig. 3. Scanning electron microscope images of synbiotics of *L. plantarum* D-12. A: freeze dried powder and B: synbiotics of *L. plantarum* D-12.

한 파인애플의 미세캡슐 분말에서 동결건조 분말 입자의 크기는 501.57 μm , 분무건조의 경우는 42.58~53.32 μm 로 약 10배 차이를 나타내어 본 연구 결과와 비슷하였다. 형태학적으로는 신바이오틱스의 경우 구형 응집체 형성이 피복물질인 INL과 유산균의 구조적 네트워크에 기인한 것으로 전형적인 encapsulation 형태를 이루고 있으나, 동결건조 분말의 경우 구형이 없는 밧밧한 네트워크 형상을 나타내어 encapsulation 형태와 차이를 나타내었다(Bustamante 등, 2017). 또한, 신바이오틱스의 단일 입자 표면 구조에 있어 표면 형태의 불안정성은 분무건조 시 액체 방울의 증발로 입자의 수축이 발생하여 나타나는 전형적인 형태이다(Saénz 등, 2009). 신바이오틱스 구조분석 결과, 분무건조 적용 시 동결건조보다 신바이오틱스 분말 입자가 더 균일하고 encapsulation이 더 규칙적으로 치밀하게 형성되어 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스화 시 분무건조를 적용하는 게 더 적합한 것으로 사료된다.

요 약

Encapsulation 기술은 식품, 화장품 및 제약 등 산업계 전반에서 광범위하게 활용되는 기술로 식품 산업에서도 소제화 등에 널리 활용되고 있다. 본 연구에서는 이러한 encapsulation 기술 및 RSM을 활용하여 대체 피복물질인 프리바이오틱스(INL) 적용에 따른 다시마 김치 유래 *Lactobacillus plantarum* D-12의 신바이오틱스 최적화를 하고자 하였다. 분무건조 입구 온도의 증가에 따른 유산균 생존율 감소를 확인할 수 있었으며, 제조 수율에서의 피복물질 농도 증가는 일정 농도 초과 시 점도 상승으로 인해 수율의 감소를 야기

하였다. 신바이오틱스 제조 조건 최적화에 있어서 최적 프리바이오틱스 농도(x_1)는 32%(w/v), 입구 온도(x_2)는 80°C로 예측되었으며, 이는 예측 최적값 적용에 따른 실측값과 큰 차이가 없었다. 구조분석 결과, 분무건조 적용 시 신바이오틱스 분말 입자가 더 균일하고 encapsulation이 더 규칙적으로 치밀하게 형성되어 분무건조를 적용하는 게 더 적합하다. 본 연구 결과는 INL을 활용한 *Lactobacillus plantarum* D-12의 신바이오틱스 최적화를 통하여 기존 피복물질 대체제로 프리바이오틱스의 가능성을 확인하여 프로바이오틱스 산업에 크게 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(유산균이 살아있는 고농도 발효 GABA소금의 개발 및 상용화 계획 20200073).

REFERENCES

- Apolinário AC, de Lima Damasceno BPG, de Macêdo Beltrao NE, Pessoa A, Converti A, da Silva JA. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr Polym.* 2014. 101:368-378.
- Behboudi-Jobbehdar S, Soukoulis C, Yonekura L, Fisk I. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technol.* 2013. 31:1274-1283.
- Bustamante M, Laurie-Martínez L, Vergara D, Campos-Vega R, Rubilar M, Shene C. Effect of three polysaccharides (inulin, and mucilage from chia and flax seeds) on the survival of probiotic bacteria encapsulated by spray drying. *Appl Sci.*

- 2020a. 10:4623. <https://doi.org/10.3390/app10134623>
- Bustamante M, Oomah BD, Oliveira WP, Burgos-Díaz C, Rubila M, Shene C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiol.* 2020b. 65:245-264.
- Bustamante M, Oomah BD, Rubilar M, Shene C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chem.* 2017. 216:97-105.
- Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol.* 2004. 96:1024-1039.
- Corrêa-Filho LC, Lourenço MM, Moldão-Martins M, Alves VD. Microencapsulation of β -carotene by spray drying: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *Int J Food Sci.* 2019. Article ID 8914852. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>
- Desmond C, Ross RP, O'Callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-drying powders containing gum acacia. *J Appl Microbiol.* 2002. 93:1003-1011.
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group. London, ON, Canada. 2002.
- Fritzen-Freire C, Prudêncio E, Amboni R, Pinto S, Negrão-Murakami A, Murakami F. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res Int.* 2012. 45:306-312.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995. 125:1401-1412.
- Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, Chen SL, Luo ZL. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe.* 2008. 14:313-317.
- Hou PZ, Regenstien JM. Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. *J Food Sci.* 2004. 69:C393-C398.
- Huang S, Cauty C, Dolivet A, Le Loir Y, Chen XD, Schuck P, et al. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. *J Funct Foods.* 2016. 23:453-463.
- Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. *Curr Opin Biotechnol.* 2010. 21:175-181.
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int J Food Microbiol.* 2002. 74:79-86.
- Oyetayo VO. Phenotypic characterization and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. *Afr J Biotechnol.* 2004. 3:355-357.
- Park HM, Chae HY, Hong JH. Physicochemical properties and protease activities of microencapsulated pineapple juice powders by spray drying process. *Korean J Food Preserv.* 2015. 22:84-90.
- Ryu DG, Park SK, Kang MG, Jeong MC, Jeong HJ, Kang DM, et al. Antioxidant and cholesterol-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from kelp *Saccharina japonica* Kimchi. *Korean J Fish Aquat Sci.* 2020. 53:351-360.
- Saénz C, Tapia S, Chávez J, Robert P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficusindica*). *Food Chem.* 2009. 114:616-622.
- Shim YY, Gui B, Amison PG, Wang Y, Reaney MJT. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci Tech.* 2014. 38:5-20.
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Appl Bacteriol.* 1995. 78:456-462.