

(S2-B)

냉동건조 조건에 따른 *Lactobacillus*와
*Bifidobacterium*속 균주의 보존성

김 태 한

일동제약주식회사, 중앙연구소

생산 현장에서 사용되고 있는 미생물 균주는 공인 균주 보존기관으로부터 분양받아 그대로 이용되는 경우는 거의 없으며 특수한 경로로 입수되었거나 자체내에서 분리, 개발된 특수한 성질의 균주인 경우가 대부분이다. 따라서 균주 보존도 계통 분류학적인 균종의 특성을 유지시키기 위한 방법 보다는 생산성에 미치는 여러가지 성질을 유지하는 데 초점을 맞추게 된다.

*Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*은 발효유제조, 건강 및 기능성 식품, 정장제 의약품 및 동물 약품에 널리 이용되고 있는 매우 중요한 산업용 균주이다. 이들 균주는 주로 발효산물을 이용하는 다른 산업용 균주와는 달리 Viability를 갖는 생균체를 직접 이용하는 경우가 더 많기 때문에 이들 균주의 보존성은 생산성과 직접적인 관련을 갖게 된다. 그러나 다른 균종에 비하여 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 속의 균주는 배양 및 보존 조건이 매우 까다롭고 요구성이 복잡하다. 이것은 대체로 이들 균주의 복잡한 영양요구성, 혐기성, pH에 대한 민감성, 무포자성 등의 특성에서 기인되는 많은 문제점 때문이다.

*Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*의 동결 건조방법에 대하여서는 그동안 많은 연구문헌과 특허자료가 나왔다. 이들은 대부분 동결건조 과정중 발생하는 동결손상을 막고 보존중 균의 Viability를 장기간 유지할 수 있는 여러가지 조건들을 설명하고 있다. 그러나 실제로 이들 방법을 적용하여 보면 일치되는 결과를 얻기는 매우 어렵다. 이것은 다른 미생물 균종의 동결 건조에서도 마찬가지겠지만 다음 조건들에 의하여 크게 영향을 받기 때문이라 생각된다.

- 1) Type of strain
- 2) Nutrition and age in culture
- 3) Suspending medium
- 4) Conditions of freezing and drying
- 5) Storage conditions
- 6) Method of rehydration

1. Lyophilization process

동결건조 과정은 각 실험실에서 사용하는 동결건조기의 종류, 사양에 따라 조금씩 달라질 수 있겠지만, 본 연구실에서의 Process를 요약하면 다음과 같다.

Culture broth



Adjustment of pH (7.0)



Cell harvest by centrifugation



Mixing in suspending medium



Pouring into ampoules



Lyophilization



Freezing temperature : -40°C



Vaccum degree : 0.05 Torr 이하



Drying time : 20 - 24 hrs



(Shelf 온도와 Sample 온도가 일치할 때 까지)

Capping



Preservation

2. 배양시간과 pH 보정의 영향

*Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*속의 균주들은 배양과정에서 발효산물로 다량의 유기산을 생성하며 균의 Viability는 이들 유기산에 의하여 심하게 영향을 받는다. 따라서 동결건조하고자 하는 배양액은 적당한 배양시간에 의한 일정 수준 이상의 pH 유지가 필요하다. 균주에 따라 내산성의 차이는 있지만 대체로 pH 4.5 이하에서는 Viability가 급격히 떨어진다. CaCO_3 나 KH_2PO_4 같은 Buffering agent의 첨가가 도움이 되지만 배양액 중의 Viable cell 수와 pH의 적정유지는 간단한 문제가 아니다. 특히 최종 배양액에서 Viability가 높게 나타나는 배양액 pH에서도 동결건조 중 Viability가 크게 떨어지는 경우가 있으며 이 때는 최종 배양액의 pH를 중성 범위로 보정하여 주면 동결건조 중 Viability를 크게 향상시키는 결과를 가져온다(1).

3. 분산매와 동결건조 보호제

동결건조한 균체의 Viability와 보존성에 가장 크게 영향을 미치는 요인은 동결건조시 사용되는 분산매와 동결건조 보호제이다. *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 균주의 동결건조에 일반적으로 사용되는 기본 분산매는 Lactose, Starch 등의 당류 (2,3)와 Skim milk (4,5,6)이다. 본 연구실에서의 결과로는 Lactose나 Starch보다 Skim milk가 우수하였으며 Lactose를 분산매로 사용하는 경우 건조 조건에 따라 냉동건조 후 시료가 매우 딱딱하여 필요에 따라 사용하는 것이 불편하였다. Lactose와 Starch를 혼합하여 사용하면 동결 건조 후의 성상은 양호하나 Skim milk보다 균의 생존율 및 보존성이 떨어진다(Table 1).

Table 1. Survival of freeze-dried *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains in basal suspending media

Strain	% Survival			
	NFSM 10%	Lactose 10%	Starch 10%	Lactose 5% + Starch 5%
<i>L. acidophilus</i>	36(12)	18(3)	28(<1)	22(2)
<i>L. bulgaricus</i>	86(24)	76(20)	64(20)	74(16)
<i>L. casei</i>	48(12)	36(16)	37(8)	42(10)
<i>Bi. longum</i>	24(<1)	8	<1	<1
<i>Bi. infantis</i>	16(<1)	<1	<1	<1

()는 4주 실온 보관 후의 생존율

지금까지 알려진 동결건조 보호제로서는 Na-glutamate, Glycine 등의 아미노산류 (7.8), Adonitol, Glycerol 등의 Polyols (9), NaHCO₃ (10) 등 다수가 보고되어 있다. 본 연구실에서 탈지분유를 기본으로한 분산매에 이들 보호제의 첨가 효과를 조사한 결과는 Table 2 와 같으며 상기 문헌들에서 나타난 결과와는 크게 차이를 보인다.

Table 2. Effect of protective substances on the survival of freeze-dried strains

Strain	Protective substances added to NFSM	% Survival	
		After Freeze-dried	After 4 weeks in R.T.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	None	28	<1
	Na-glutamate	38	11
	Adonitol	29	<1
	NaHCO ₃	40	26
<i>Bifidobacterium longum</i>	None	26	<1
	Na-glutamate	30	10
	Adonitol	24	<1
	NaHCO ₃	38	22

이와 같은 상이한 결과는 사용균주, 배양방법, 동결건조 조건 등이 서로 다르기 때문으로 생각된다. 본 연구실에서는 다수 문헌과 특히 자료에서 밝혀진 수종의 보호제에 관한 실험을 되풀이 하여 다음과 같은 성분의 새로운 분산매를 고안하였다.

Modified suspending medium

Skim milk	12%
Lactose	5%
Na-glutamate	1%
Gelatin	1%
NaHCO ₃	6%

상기 Modified suspending medium으로 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium longum*의 동결건조 실험을 12 차례 반복하였을 때의 실험결과 평균치는 Table 3과 같다.

Table 3. Global result of freeze-drying experiments using modified suspending medium.

Results of experiments		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	
Viable count of culture (x 10 ⁸ /ml)		42	48	
Weight of freeze-dried sample from 1000ml culture (g)		24	25	
Moisture of sample (%)		4.6	4.8	
Survival of sample	After freeze-dried	Viable Count (x 10 ⁸ /g)	1230	1180
		%	70	61
	After 4 weeks in R. T.	Viable Count (x 10 ⁸ /g)	1008	826
		%	57(82)	43(70)

4. 동결건조 후 수분 함량이 보존성에 미치는 영향

동결건조 직후 우수한 Viability를 나타내어도 장기간 보존할 때 Viability가 급격히 떨어지는 경우가 많다. 이와 같은 결과는 앞에서 지적한 바와 같이 분산 매의 종류, 보호제의 영향, 보존 조건 (실온 또는 냉장고 보존) 등에 의하여 크게 영향을 받을 수 있다. 그러나 특히 동결건조 후 시료의 수분 함량이 크게 영향을 준다는 사실을 알 수 있었다(11). 건조 시료의 수분함량은 마음대로 조절하기는 힘들으나 가능한 수분함량을 줄이는 것이 보존성에 효과적이다. 수분함량 4-8%에서는 크게 차이가 없으나 10% 이상이면 보존성이 크게 떨어진다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 수분 함량의 영향은 냉장고 보존보다 실온보존에서 더욱 뚜렷하였다. 동결건조 후의 수분함량은 일반적으로 동결건조 조건에 의하여 좌우되지만 동일한 조건에서도 Suspending medium 의 성분에 의하여 크게 좌우될 수도 있기 때문에 Suspending medium을 Design 할때 이 점에도 유의하지 않으면 안된다.

5. *Bifidobacterium* 균주의 단기간 간이 보존 방법

동결 건조한 균주를 실험이나 생산에 이용할 때에는 적당한 배지에서 2 - 3차례의 Activation 과정이 필요하다. 실험이나 생산을 되풀이 할 때 매번 장기간 보존한 동결건조 균주를 사용하기 보다는 Activation된 상태의 균주를 간편하게 단기간 보존하며 사용 할 필요가 있다. 이때 이용되는 Subculture 방법도 실험 결과나 생산성에 큰 영향을 줄 수 있다. *Lactobacillus* 균주는 일반적인 방법인 Agar stab culture 나 Fortified skim milk에 적당한 시간 배양하여 냉장고 보존하면 3-4 주는 균의 Viability 및 생리적 특성이 유지되지만 *Bifidobacterium* 균주는 일주일 이내에 Viability가 없어진다. 본 연구실에서는 적당한 액체 배지에서 배양한 대수기 말기의 *Bifidobacterium longum* 배양액을 멸균된 Fortified skim milk 에 20-30% 농도로 현탁하여 냉장고의 냉동실에 보존하면 2개월 이상 균의 Viability와 생리적 특성을 유지할 수 있음을 알았다(Table 4).

Table 4. The effect of subculture method of the activity of *Bifidobacterium longum*.

Subculture method	Activity* of strain preserved for (days)					
	1	2	3	7	14	28
Agar stab culture	0.4	0.2	0.2	NG**	NG	NG
Fortified skim milk culture	0.8	0.4	0.4	0.2	NG	NG
New method studied	1.2	1.2	1.2	1.2	1.0	0.7

* Acidity of the culture grown in skim milk for 12 hours

** No growth

발효유 조제 및 정장제 의약품 생산에 이용되는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 균주의 동결건조 방법에 관하여 몇 가지 조건을 검토하였다. 이와 같은 조건은 산업 균주의 특성, 각 연구실의 동결건조 조건에 따라 큰 차이를 나타낼 수 있으며 여기서는 검토하지 않았지만 동결건조 후 Rehydration 방법에 의하여서도 균의 Viability는 크게 좌우 될 수 있으므로 (12,13), 미리 Rehydration 조건을 확립해 두지 않으면 안된다.

References

1. 名川誠 등, 일본특허 61-265085. (1986)
2. Stadhouders 등, *Neth. Milk Dairy J.* 25:229 (1971)
3. 윤성식 등, *산업미생물학회지* 14:421 (1985)
4. Sinha, R.N. 등, *J. Food Sci.* 39:641 (1974)
5. Nagawa, M. 등, *J. Dairy Sci.* 71:1777 (1988)
6. 今井豊彦 등, 일본특허 61-40391 (1986)
7. Randolph, S.P. 등, US patent 3,897,307 (1975)
8. Obayashi, Y. 등, *J. Hyg.* 59:77 (1961)
9. Graciela, F. 등, *Appl. Environ. Microbiol.* 45:302 (1983)
10. 小木曾昇 등, 일본특허 63-22179 (1988)
11. Tatematsu, T. 등, *Jap. J. Freezing and Drying* 28:40 (1982)
12. Graciela, F. 등, *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1339 (1985)
13. Graciela, F. 등, *Milchwissenschaft* 41:286 (1986)