

凍結 및凍結乾燥가 Lactic Starter Cell 에 미치는 影響

李尙基·朴茂榮

韓國科學院 生物工學科
(1980년 2월 21일 수리)

Effect of Freezing and Lyophilization on Lactic Starter Cell

Sang Ki Rhee and Moo Young Park

Department of Biological Sciences and Engineering Korea Advanced Institute of Science
(Received February 21, 1980)

Abstract

Trials of investigating the effect of freezing and lyophilization, as the practical lactic starter preservation methods, on the viability and lactic acid producing activity of *Lactobacillus bulgaricus* NLS-4 have been carried out. After the treatments, both of viability and activity were decreased. However, when the initial cell cocentration was increased, the survival rate against freezing could be raised to 46% and the activity to 0.25% lactic acid whereas those against lyophilization were 22% and 0.29% lactic acid, respectively. There were further increased maximally when the cell suspension was subjected to freezing and lyophilization after the addition of protective agents such as glycerol and the G. C. G. S. suspending medium.

緒 論

醱酵乳製品工場에서 품질관리상 무엇보다도 중요한 것은 醱酵에 직접 관여하는 乳酸菌의 活性을 높이 유지시키는 일이다. 이를 위해 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법은 滅菌한 全脂乳 또는 脫脂乳등에 乳酸菌을 접종하여 適溫에서 培養한 후 2~5°C의 냉장고에서 保存하면서 1주일 간격으로 이 접종조작을 되풀이하는 방법이다. 그러나 이 방법은 빈번한 접종 조작으로 인해 bacteria phage나 다른 微生物에 의한 汚染의 기회가 많아지고 長期間 경과하면, 使用하는 原料乳와 脫脂乳의 鮮度 및 조성상의 차이, 培養溫度 및 時間의 차이, 培養菌 保存環境의 不一致 등의 要因으로 인해 배양 乳酸菌의 活性도에 影響을 받게 되므로 均一한 活性도를 유지시키는 일이 쉽지 않다. 이러한 缺點을 補完하기 위한 방법이 凍結^{1,2)} 및 凍結乾燥法^{3,4)}이다. 現在 産業의으로 가장 많이 쓰이고 있는 凍結保存法은 butter用 냉장고, ice cream

硬化室, 또는 stocker 시설을 갖추고 있는 醱酵乳製品工場에서는 凍結을 위한 특별한 설비가 필요치 않으며, 비교적 長期間 活性도를 保存할 수 있는 상당히 有利한 方法이다. 또한 凍結乾燥法은 높은 活性도를 유지하면서 菌株의 長期保存이 가능하고, 繼代培養이 필요없이 rehydration 후 직접 starter로 利用할 수 있으며⁵⁾, 混合培養의 경우 菌株間의 balance를 유지시킬 수 있고 保存에 별다른 제약이 따르지 않는다⁶⁾는 長點이 있다. 그러나 이러한 方法들은 製造過程中 凍結, 乾燥 등 여러 단계를 거치는 관계로 微生物의 生存度 및 活性도가 낮다는 致命적 弱點을 지니고 있다. 凍結 및 凍結乾燥時 微生物의 生存度 및 活性도는 微生物의 種類, 培養時 培地の 營養도와 微生物의 成熟度(age), 微生物濃度, 懸濁溶液(suspending solution)의 組成, 凍結速度 및 方法, 乾燥方法 및 程度, 保存條件 및 使用時의 reconstitution 方法 등 여러가지 生物學的, 物理化學的인 因子의 影響을 받게 되지만⁶⁾ 이 중에서 가장 重要하면서도 손쉽게 조절할 수 있는 因子가 微生物濃度 및 保護物

質의 첨가이다.

본 研究에서는 yogurt 醱酵에 관여하는 菌株인 *Lactobacillus bulgaricus* 株를 使用하여 凍結 및 凍結乾燥에 따른 使用菌의 生理, 즉 生存度 및 活性도에 미치는 影響을 조사하였고 保護物質 첨가 후의 그 保護效果를 관찰하였다.

實驗材料 및 方法

1. 使用菌株 및 培地

美國 Oregon 주립대학의 W. E. Sandine 博士로부터 分讓받은 *L. bulgaricus* NLS-4 를 使用하였다. 種菌은 滅菌한 11% non-fat-milk (NFM)를 培地로 하여 37°C에서 18時間 培養후 10% (v/v) glycerol 을 첨가하여 -20°C에서 凍結保存하였다. 培養實驗用으로는 凍結保存中인 種菌을 37°C에서 녹인 후 3차례 繼代培養하여 菌株을 充分히 活性化시킨 후 使用하였다. 培地로는 11% NFM 및 TIP^{7,8)} 培地를 使用하였으며 TIP 培地の 組成은 9% lactose, 4% tryptone, 1.4% yeast extract, 0.014% MnSO₄·4H₂O 였다.

2. 菌株의 培養 및 收穫

Bio Flo C-30 Chemostat (New Brunswick Scientific Co. N. T.)의 稼動容積을 500 ml로 하여 11% NFM을 培地로 使用한 경우는 pH 조절없이 200 rpm 정도의 攪拌만으로 45°C에서 培養하였고, 半合成培地인 TIP 培地の 경우에는 1N KOH 溶液으로 pH를 6.5로 自動조절 시키면서 38°C에서 200 rpm의 攪拌速度로 18時間 培養後 收穫하여 ice bath에 1時間 保管했다가 5°C, 5,000 rpm에서 5分間 원심분리하여 上澄液을 제거하고 滅菌한 0.1% tryptone 水로 2~3차례 씻어 내었다. 침전된 乳酸菌을 滅菌한 11% NFM 培地에 再懸濁시킨 後 濃縮 starter로 使用하였다.

3. 凍結 및 凍結乾燥

凍結의 경우 -50°C의 methanol을 冷媒로 하여 急速凍結시켰다. 이 때 保護物質로서 glycerol을 10% 첨가하였으며 對照群에는 glycerol代身 11% NFM을 10% 첨가하였다. 生菌數 測定時에는 37°C에서 解凍(thawing)시킨 후 적당 배율로 희석하여 使用하였다. 凍結乾燥時에는 50 ml의 vial에 微生物을 分注한 후 -50°C에서 急速凍結시켜 lyophilizer(The Vir Tir Co., N. Y.)에 연결시킨 다음

진공상태에서 24시간 乳燥시켰다. 保護物質의 첨가 효과를 관찰하기 위해 滅菌한 G. C. G. S. 懸濁溶液을 전체용량의 10%되게 첨가시켰고 對照群에는 11% NFM을 첨가하였다. G. C. G. S. 懸濁溶液의 組成은 5% gelatin, 5% sodium citrate, 2% M. S. G., 10% sucrose 였다. 生菌數를 測定하기 위해서는 乾燥前과 同量的 滅菌한 11% NFM을 첨가하여 室溫에서 乾燥乳酸菌을 完全히 溶解시킨 후 적당비율로 희석하여 使用하였다. 이상의 實驗方法을 綜合하여 Fig. 1에 表示하였다.

4. 生菌數測定

채취한 試料를 0.1% tryptone 水로 적당히 희석하여 triplicate로 lactic agar plate⁹⁾에 도말하였다. 이것을 37°C의 항온기에서 72시간 培養한 후 나타난 colony 數를 측정하여 그 평균값을 구했다. 使用菌株은 培養條件에 따라 chain을 形成하므로 生菌數 測定誤차를 줄이기 위해 희석時 super mixer (Lab-line Instruments, Inc)를 使用하여 充分히 混合후 도말하였고 이 誤差를 감안하여 生成된 colony 數는 colony forming unit (CFU)로 정의하였다.

5. 乳酸生成活性도의 測定

L. bulgaricus 種은 homo fermentation을 하는 관계로 거의 乳酸만을 生成한다¹⁰⁾. 따라서 0.1N NaOH 溶液으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 다음 式에 의해 % lactic acid를 구했다.

$$\begin{aligned} & \% \text{ lactic acid} \\ &= \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{m. e. lactic acid}}{\text{weight of sample in gram}} \times 100 \end{aligned}$$

여기서 乳酸의 molecular equivalent는 0.009이고 계산의 편의상 試料의 무게는 9g으로 통일하였다.

6. 生存度の 決定

凍結 및 凍結乾燥 結果 나타나는 生存度の 測定은 아무 처리없이 一般的 培養을 한 結果 나타난 生菌數를 對照群으로 하여 對照群에서 나타난 生菌數에 대한 凍結 및 凍結乾燥 處理후 나타난 生菌數의 비율을 %로 표시하였다.

Viability (%)

$$= \frac{\text{CFU after freezing or lyophilization}}{\text{CFU of control}}$$

7. 비교活性度の 決定

對照群으로 使用한 試料를 새로운 11% NFM 에 10% (v/v) 接種한 후 45°C의 수조에서 8時間 培養시켜 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.3까지 調整시켰을 때 소모된 NaOH量(ml)을 100으로 하여 凍結 및 凍結乾燥處理후 같은 方法으로 배양한 다음 調整했을 때 소모된 NaOH量을 비교하여 %로 표시하였다.

R. A. (%) =

$$\frac{\text{ml of 0.1N NaOH required titration after treatments}}{\text{ml of 0.1N NaOH required for titration of control}}$$

結果 및 考察

1. 凍結 및 凍結乾燥가 生存度 및 活性도에 미치는 影響

우선 對照群으로 使用하기 위하여 凍結 및 凍結乾燥, 그리고 初發微生物濃度(initial cell conun-

ation)가 11% NFM 培地에서 培養한 *L. bulgaricus* NLS-4의 生存度에 어떤 影響을 미치고 있는가를 살펴 보았다(Table 1). 그 結果 원심분리과정을 거쳐 微生物을 約 4.2배 농축시킨 경우와 시키지 않은 경우 각각을 살펴볼 때 凍結시킴으로써 生存度는 각각 25%와 46%를 나타냈고 凍結乾燥에 따른 生存度는 이 보다 낮아 각각 9%와 22%를 나타냈다. 이는 凍結乾燥시킨 경우 乾燥과정에서도 많은 微生物이 死滅하고 있기 때문인 것으로 思料된다¹⁾. 그러나 凍結乾燥時의 死滅率도 濃縮에 의해 微生物濃度を 높여 주면 낮아지는 것으로 미루어 凍結이나 凍結乾燥時 微生物의 높은 生存度を 유지시키기 위해서는 微生物의 濃度を 높이는 것이 필요함을 알 수 있었다. 이는 비록 微生物濃도와 生存度間의 直線적인 關係는 없다²⁾고 하더라도 微生物自體가 protective colloid로 作用하기 때문에 相對的으로 生存도가 높아지는 것으로 추측된다.

凍結 및 凍結乾燥 처리후의 活性度の 유지경도는 醱酵工場에서 繼代培養 없이 starter 로서의 直

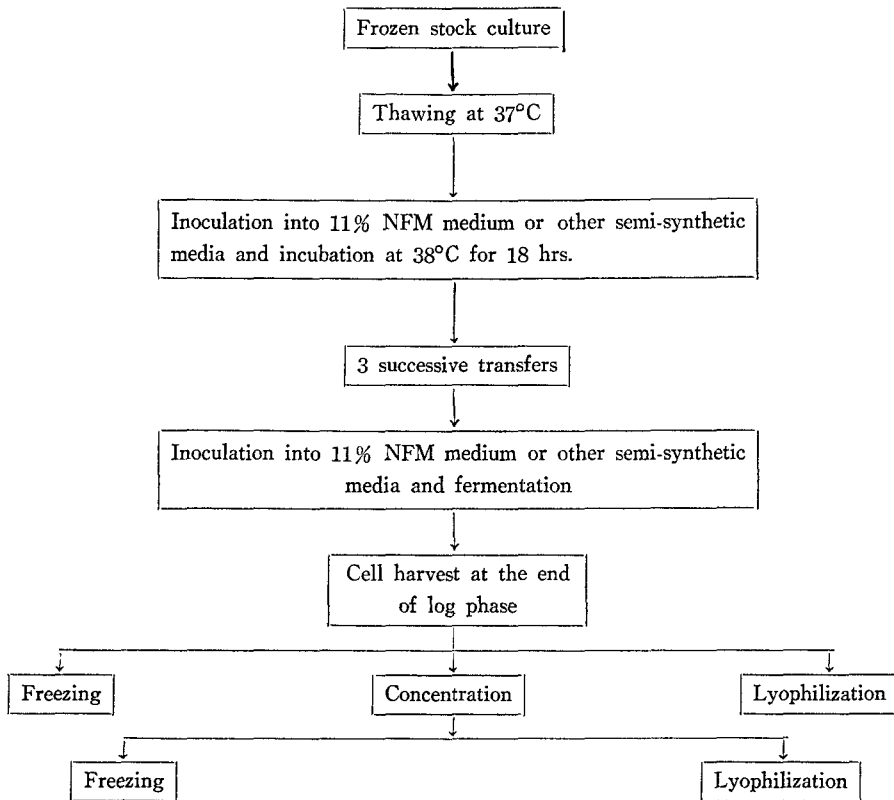


Fig. 1. Flow Diagram Showing Ways of Preparing Culture.

Table 1. Effect of Freezing, Lyophilization and Initial Cell Concentration on the Survival of *L. bulgaricus* in 11% NFM Medium.

Treatment	Before centrifuge		After centrifuge	
	Viable counts(/ml)	Viability (%)	Viable counts(/ml)	Viability (%)
Before treatment	5.2×10^5	100	2.2×10^6	100
After freezing	1.3×10^5	25	1.0×10^6	46
After lyophil'n	4.8×10^4	9	4.9×10^5	22

Table 2. Effect of Freezing, Lyophilization and Initial Cell Concentration on the Production of Lactic Acid by *L. bulgaricus* in 11% NFM Medium.

Treatment	Before centrifuge		After centrifuge	
	pH	% Lactic acid	pH	% Lactic acid
Before treatment	5.25	0.30	5.04	0.33
After freezing	5.51	0.23	5.40	0.25
After lyophil'n	5.39	0.25	5.28	0.29

Table 3. Effect of Freezing, Lyophilization and Initial Cell Concentration on the Survival of *L. bulgaricus* in the TIP Medium.

Treatment	Before centrifuge		After centrifuge	
	Viable counts(/ml)	Viability (%)	Viable counts(/ml)	Viability (%)
Before treatment	9.1×10^8	100	2.9×10^9	100
After freezing	3.0×10^8	33	1.6×10^9	55
After lyophil'n	2.4×10^8	26	1.5×10^9	51

Table 4. Effect of Freezing, Lyophilization and Initial Cell Concentration on the Lactic Acid Production by *L. bulgaricus* in the TIP Medium.

Treatment	Before centrifuge		After centrifuge	
	pH	% Lactic acid	pH	% Lactic acid
Before treatment	4.44	1.01	4.21	1.15
After freezing	5.29	0.61	4.67	0.82
After lyophiliz'n	4.72	0.75	4.43	1.03

접의인 사용가능성 여부를 가능하기 때문에 매우 중요하다. Table 2에서 보듯 동결이나 동결乾燥시킨 후의 활성도의 차이는 對照群과 비교하여 큰 차이는 나타나지 않았고 동결乾燥시킨 경우의 활성도가 동결시킨 경우 보다 약간 높게 나타났으며 특히 농축시킨 후 동결乾燥시킨 경우는 對照群과 거의 비슷했다. 이와 같이 동결 및 동결乾燥處理 전후의 활성도의 차이가 현저하지 않고 특히 농축 후 동결乾燥시킨 경우는 對照群과 거의 같은 정도의 활성을 나타낸 것으로 보아 starter 로시의 直接的인 사용가능성이 높음을 알 수 있었다. 한편 培

養條件을 改善하여 半合成培地인 TIP培地를 사용하여 *L. bulgaricus* NLS-4를 培養한 경우 11% NFM培地를 사용한 경우보다 微生物이 全般的으로 約 1,800倍 정도 증가하였고 濃縮에 의해 ml 당 최고 2.9×10^9 까지 얻을 수 있었다. 동결 및 동결乾燥 後의 生存度도 11% NFM에서 培養한 경우보다 높은 것으로 미루어 微生物濃度가 生存度의 增加에 重要的 要因임을 再確認하였다(Table 3). 또한 活性도의 경우도 微生物濃度가 큰 만큼 빠른 시간에 乳酸醱酵가 進行됨을 알 수 있었다 (Table 4).

2. 保護物質의 첨가효과

初發微生物濃度を 높이는 外에 抗凍結劑들을 처리하여 菌株의 生存度와 活性度를 높게 유지시킬 수가 있다. 保護物質을 첨가하면 凍結時의 氷晶(ice crystal) 生成을 방지 또는 지연시킬 수 있고 解離가능한 鹽의 量에 따라 微生物 細胞膜의 속성을 변화시켜 微生物의 生存度 및 活性度を 높여줄 수 있기 때문이다⁶⁾. 凍結時 抗凍結劑로서 가장 많이 사용되고 있는 것은 glycerol 이며^{1,12)} 이 밖에 L-glutamic acid, yeast extract, 微生物醱酵產物 등이 保護效果를 나타냄이 확인되었다¹³⁾. 凍結乾燥時에는 G. C. G. S. 懸濁溶液이 效果의 이라는 報告³⁻⁵⁾가 있고, 이 밖에 glutamic acid¹³⁾, lactose¹⁴⁾, skim milk⁶⁾, serum⁶⁾ 등이 保護物質로서 알려져 있으나 각 物質의 保護效果는 菌株의 種, 또는 株에 따라 정도의 차이가 나고 있다⁶⁾. 본 연구에서는 抗凍結劑로서 凍結時 glycerol 을 10% 첨가하여 이 용액의 微生物 生存度 및 活性도에 대한 保護效果를 관찰하였으며 凍結乾燥時에는 G. C. G. S. 懸濁溶液을 使用하였고, 對照群으로서는 11% NFM 을 10% 첨가하였다. Table 5에서 보듯 11% NFM 배지에서 培養한 경우 glycerol 을 첨가하면 生存도가 約 1.6배 증가하였고 微生物濃度を 높여준 경우의 glycerol 의 保護效果는 더욱 현저하였다. 活性度面에서도 glycerol 의 보호효과를 確認할 수 있었고 TIP 培地를 使用한 경우에도 生存度 및 活性도에 미치는 glycerol 의 보호효과를 확인하였으며 生存도의 경우 11% NFM 培地를 使用한 경우보다 전반적으로 높게 나타났으나 비교活性도의 경우에는 전반적으로 낮은 값을 보여 주었다. 凍結時 glycerol 을 첨가한 경우 11% NFM 培地에서의 生存度 增加幅이 微生物을 농축시킨 경우보다 농축시키지 않은 경우가 더 큰 사실, 즉 일단 微生物濃度を 높여 주면 抗凍結劑의 첨가 효과가 현

저하지 않은 點으로 미루어 微生物의 生存度는 抗凍結劑의 첨가보다 微生物濃도에 의해 더 큰 影響을 받음을 알 수 있고, 活性度面에서는 微生物濃도보다는 抗凍結劑에 의해 더 큰 影響을 받고 있음을 알 수 있다. 그러나 TIP 培地를 使用한 경우에는 活性度面에서도 抗凍結劑보다 微生物濃도에 의해 더 큰 影響을 받는 것으로 보아 生存度 및 活性도의 유지에 가장 重要한 因子는 微生物濃도임이 確認되었다. glycerol 의 保護效果에 대한 反應機作은 아직 正確히 說明되고 있지 못하나 glycerol 이 물보다 氷점이 낮으므로 微生物 細胞內의 물과 glycerol 이 치환되어 細胞의 파괴를 방지하기 때문인 것으로 간주되고 있다¹⁵⁾. 그러나 그 正確한 반응기작의 究明을 위해서는 分子水準에서의 研究가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Bannikova *et al.*⁵⁾ 및 Speckman³⁾ *et al.*에 의해 凍結, 乾燥 및 保存期間中 다른 懸濁溶液에 비해 월등한 效果가 있는 것으로 報告된 G. C. G. S 懸濁溶液을 첨가한 경우에도 生存度 및 活性도의 增加를 확인할 수 있었다(Table 6). 11% NFM 培地에서 培養한 경우 G. C. G. S 懸濁溶液을 첨가하면 生存도의 增加率이 約 3.1倍인 것으로 미루어 그 保護效果가 탁월함을 알 수 있었고 濃縮시킨 경우의 增加率은 이 보다 약간 떨어졌다. 比較活性도의 경우도 G. C. G. S 懸濁溶液의 保護效果를 確認할 수 있었다. 그러나 凍結乾燥時 G. C. G. S 懸濁溶液을 첨가한 경우에는 凍結時 glycerol 의 첨가효과와는 달리 生存度 및 活性도가 첨가물질에 의해 더 큰 影響을 받고 있는 것으로 보아 保護物質의 첨가는 凍結보다 凍結乾燥時 더 重要한 要因이 됨을 알 수 있었다. G. C. G. S. 懸濁溶液의 各成分이 乳酸菌의 生存度 및 活性도에 미치는 保護效果에 대한 反應機作도 아직 正確히 규명되고 있지 못하나 이들 物質이 微生物 細胞의 透過성과 삼투압에 影響을 미치고 있기 때문인 것으로 간주되

Table 5. Protective Effect of Glycerol on the Survival and Relative Activity of *L. bulgaricus* Cultured in 11% NFM and TIP Media against Freezing.

Medium	Addition (10×)	Before centrifuge		After centrifuge	
		Viability (%)	R. A. (%)	Viability (%)	R. A. (%)
11% NFM	Skim milk	24	76	46	80
	Glycerol	39	84	50	90
TIP	Skim milk	33	60	55	81
	Glycerol	40	71	62	95

Table 6. Protective Effect of G. C. G. S. Suspending Medium on the Survival and Relative Activity of *L. bulgaricus* Cultured in 11% NFM and TIP Media against Lyophilization.

Medium	Addition (10%)	Before centrifuge		After centrifuge	
		Viability (%)	R. A. (%)	Viability (%)	R. A. (%)
11% NFM	Skim milk	9	83	22	96
	G. C. G. S.	28	110	30	126
TIP	Skim milk	26	74	51	102
	G. C. G. S.	57	75	79	108

고 있으며⁶⁾, 分子水準에서의 說明으로는 단백질 구조의 *integral part* 로 作用하고 있는 물과 첨가 물질간에 수소결합등의 안정된 결합을 이룸으로써 보호효과를 나타낸다는 說⁶⁾이 있고, Morichi *et al.*¹⁶⁾은 glutamic acid의 $-NH_2$ 基와 $\gamma-COOH$ 基간에 수소결합을 이루고 또한 glutamic acid의 親水性이 높아 건조과정중 적당한 水分의 유지를 돕기 때문에 보호효과가 나타난다고 報告하고 있다. 培養液을 11% NFM代身 TIP 培地로 바꾼 경우 전반적으로 生存度 및 活性度の 증가가 현저함을 알 수 있었다. 이것은 微生物濃도가 11% NFM 培地에서 보다 약 1,800 倍정도 농축되었음에 기인하는 것으로서 生存度 및 活性度 유지에 微生物濃도가 얼마나 重要한가를 다시 한번 입증해 주고 있다. glycerol 및 G. C. G. S 懸濁溶液을 첨가한 경우의 保護效果面에서도 11% NFM을 사용한 경우와 비슷한 경향을 보였고 生存도는 전반적으로 높은 값을 나타냈으나 比較活性도가 비교적 낮은 값을 보여준 것은 凍結시킴으로써 나타나는 乳酸生成에 관여하는 酵素의 파괴가 11% NFM 培地에서 보다 심각하기 때문인 것으로 추측된다.

要約

乳酸菌의 效率的인 保存問題로서 *Lactobacillus bulgaricus* NLS-4 를 使用하여 凍結 및 凍結乾燥法이 이 菌株의 生存度 및 活性도에 미치는 影響을 조사하였다.

凍結 및 凍結乾燥 處理後 全般的인 生存度 및 活性도는 저하되나 初發微生物濃도를 높여준 경우 모두 증대되어 凍結時에는 최고 生存度 및 活性도가 각각 46% 및 0.25% lactic acid 였고 凍結乾燥時에는 22% 및 0.29% lactic acid 였다.

凍結 및 凍結乾燥 處理前 保護物質로서 각각 10%

glycerol 과 G. C. G. S. 懸濁溶液을 첨가한 경우 對照群인 10% skim milk 를 첨가한 경우보다 生存度 및 活性도가 증가하여 凍結時에는 최고 생존도 62%, 최고 비교활성도 95%를 나타냈고 凍結乾燥時에는 각각 79%, 126%를 나타냈다. 結論의으로 是 微生物濃도가 生存度 및 活性도를 높이기 위한 가장 重要한 因子임을 알 수 있었고 保護物質의 첨가도 效果의임을 알 수 있었다.

參考文獻

1. Kawashima, T., T. Kodama, and M. Maneo: *Jap. J. Zotech Sci* **34**, 218 (1963)
2. Kawashima, T., T. Kodama, and M. Maneo: *ibid.* **34**, 288 (1963)
3. Speckman, C. A., W. E. Sandine, and P. R. Elliber: *J. Dairy Sci.* **57**, 165 (1973)
4. Stadhouders, J., L. A. Jansen, and G. Hup: *Neth Milk Dairy J.* **23**, 182 (1969)
5. Bannikova, L. A., and I. V. Logoda: VIII Int. Dairy Congr. I. E. 277 (1970)
6. Heckly, R. J.: *Adv. Appl. Microbiol.* **3**, 1 (1961)
7. Bergire, J. L.: *Le Lait.*, **48**, 1 (1968)
8. Pettersson, H. E.: *Appl. Microbiol.* **29**, 133 (1975)
9. Elliker, P. R., A. W. Anderson, and G. Hannesson: *J. Dairy Sci.* **39**, 1611 (1956)
10. Doelle, H. W.: *Bacterial metabolism*, Academic Press, N. Y., p. 622 (1975)
11. Steel, K. J., and H. E. Ross: *J. Appl. Bacteriol.* **26**, 370 (1963)
12. Gilliland, S. E.: *J. Dairy Sci.* **54**, 1129 (1971)

13. Kawashima, T., T. Kodama, and M. Maneo:
Jap. J. Zotech. Sci. **35**, 48 (1964)
14. Kojima, M., and T. Uemura: J. Agr. Cnem.
35, 376 (1961)
15. Gibson, C. A., G. B. Landerkin, and P. M.
Morse: J. Dairy Res. **32**, 151 (1965)
16. Morichi, T., R. Irie, N. Yano, and H.
Kembo: J. Gen. Appl. Microbiol. **9**, 149
(1963)