

아미노산 혼합용액이 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 동결건조 및 저장성에 미치는 영향

윤성식* · 이해옥 · 유주현

*부천공업전문대학 식품영양과, 연세대학교 공과대학 식품공학과
(1986년 9월 12일 수리)

Effect of the amino acid mixture on freeze-drying and preservation of *Lactobacillus casei* YIT 9018

Sung-Sik Yoon*, Hae-Ok Lee and Ju-Hyun Yu

*Department of Food & Nutrition, Bucheon Technical College, Bucheon, Kyunggi-Do, Korea
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received September 12, 1986)

This study was attempted to find out effective storage methods of *Lactobacillus casei* YIT 9018, industrial strain for fermented milk production, without severe bacterial death and activity deteriorations. The cryoprotective effect of the amino acid mixture consisting of glycine and DL-glutamic acid on the test strain were examined and also compared with those other protectants already reported. The apparent protective effect by the amino acid mixture was observed to controls. Both glycine and DL-glutamic acid prevented the freezing death of test strain and his effect of *L. casei* YIT 9018 had reached stationary stage in MRS-broth 18h after inoculation. Cells harvested from stationary stage were most resistant to freezing damage. The viability of the test strain was affected by rehydration media and the recovery of viable cells was increased about threefold when amino acid mixture was used for rehydration. The presence of non-fat milk solid (NFMS), sucrose and lactose in amino acid mixture increased viability of the test strain up to 85%. In this case, optimal concentrations of NFMS, sucrose and lactose were 10%, 7.5-10%, 7.5-10%, respectively.

발효공업에 있어서 미생물의 stability를 유지하고 degeneration을 방지하는 일은 대단히 중요한 문제이다. *Streptomyces*를 이용한 항생물질 생산의 경우, 계속적인 계대를 거치면서 미생물의 형태적 생리적 변화가 수반되었다는 보고는 많다⁽¹⁾. Perlman 등⁽²⁾은 streptomycin을 생산하는 *S. griseus*에서 계속적인 계대를 인하여 항생제 생성능의 현저한 감소를 보고한 바 있다. 유산균에도 예외는 아니어서 발효유 제조시 starter의 산생성력이 심하게 감소하는 현상이 가끔 일어나고 있다. 여러번 계대하여 사용하는 starter는 거의 예외없이 생리적, 형태적

변화가 일어나서 발효유 생산에 큰 차질을 야기하고 있는 현실을 생각해 볼 때 유산균을 장기간 보존하고, 그 유용한 성질을 전혀 잃지 않도록 유지하는 연구가 시급한 실정이다. 현재 발효유 제조시 사용되는 유산균의 장기보존 방법은 동결건조(freeze-drying 혹은 lyophilization) 방법이다. 이것은 동결건조용 현탁용액에 미생물을 현탁시켜 동결시킨 후 감압하에서 건조하는 방법이다. 그러나 건조과정중 미생물의 동결손상이 필연적으로 발생하는데, 이 현상을 막고자 여러가지 동결보호제가 연구되어 왔다^(3,4). *Lactobacillus casei*는 대표적인 발효유

및 유산균 음료 제조용 starter로서 산생성 속도는 비교적 느리지만 생성량이 대단히 많은 특성때문에 국내에서 널리 사용되고 있다. 따라서 본 연구는 *L. casei*의 보존방법을 확립하고자 glycine과 glutamic acid로 구성된 아미노산 혼합용액을 기본 현탁용액으로 사용하여 동결건조 및 rehydration을 실시하고 그 효과를 기존의 동결보호제들과 비교 검토한 성적이다.

재료 및 방법

사용균주 및 균체생육용 배지

본 실험에 사용한 *Lactobacillus casei* YIT 9018주는 한국야쿠르트 연구소에 동결보존중인 것을 10% 탈지유(Non-fat milk solid, NFMS, Difco) 배지에서 최소한 3대 계대한 후, MRS-broth⁽⁵⁾로 옮겨 2일 간격으로 계대배양 하였다.

동결보호제

기존의 동결보호제로는 분석용 단당류 4종류(glucose, galactose, fructose, glycerol), 이당류 2종류⁽⁶⁾(lactose, sucrose), 아미노산 2종류(glycine, DL-glutamic acid) 그리고 탈지분유(NFMS)를 선정하였고, 대조용으로는 생리적 식염수를 사용하였다. 기본 현탁배지인 아미노산 혼합용액은 glycine과 DL-glutamic acid를 각각 0.1M의 stock solution으로 제조한 다음 등량씩 혼합하였다.

생균수 및 흡광도 측정

미생물의 생균수 측정용 배지로는 BCP 한천배지(森榮)를 사용하였으며, 37°C에서 48시간 후 나타

- MRS Broth, 1l
 - Inoculation, *Lactobacillus casei* YIT 9018
 - Incubation, 37°C, 18~24h
 - Cell harvest, 8,000×g, 20min
 - Washing, 2 times with physiological saline
 - Adding cryoprotectant solutions to final volume, 100 ml
 - Mixing thoroughly
 - Standing for 30 min
 - Pouring into ampoule
 - Freezing, -25°C,
 - Drying, 100μHg, 5 h
 - Resuspending in rehydration media to original volume, 100ml
 - Concentrate of freeze-dried *L. casei* YIT 9018
- Fig. 1. Preparation of concentrate of freeze-dried *L. casei* YIT9018

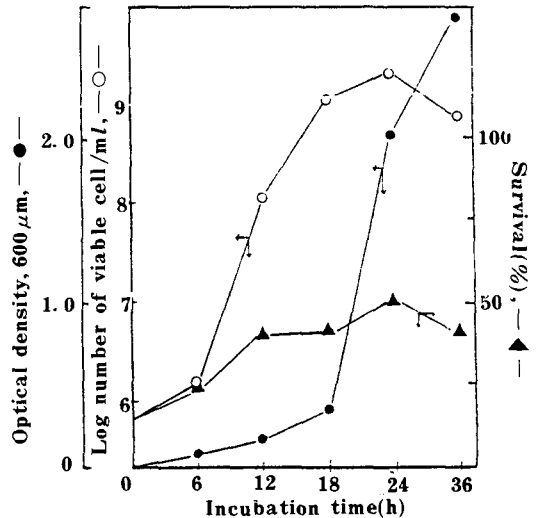


Fig. 2. Relations between growth stage and viability of *L. casei* YIT 9018 cultured in MRS-broth, 37°C.

난 집락을 기록하였다. 균체의 생존율은 다음 공식에 따라서 계산하였다.

$$\text{생존율 (S, \%)}^{(7)} = \frac{\text{동결건조후 생균수 (cfu/ml)}}{\text{동결건조전 생균수 (cfu/ml)}} \times 100$$

또한 흡광도는 Double beam spectrophotometer (Varian Co.)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

산 생성량의 측정⁽⁸⁾

동결건조 유산균의 활력은 산생성량으로 측정하였다. *L. casei* YIT 9018주를 미리 80°C에서 30 min 멸균한 10% NFMS 배지 40 ml에 접종하고 37°C에서 경시적으로 측정하였다.

동결건조 및 Rehydration

활력이 왕성한 *L. casei* YIT 9018주를 1l의 멸균 MRS 배지에 접종하여 배양한 다음 8000×g에서 20 min 간 원심분리하여 균을 회수하고 (Sorvall RC-2 Refrigerated Centrifuge) 멸균식염수로 세척하였다. 여기에 동결보호제 액을 넣어서 충분히 혼합시킨 후 30 min 간 냉장고에서 방치하였다. 이것을 약 1.5~2 ml씩 ampoules에 주입한 후 -25°C의 alcohol shell freezer (Labconco Corp.)에 넣어서 신속동결을 행한 다음 80~100 torr에서 5시간 동안 건조하였다. 건조가 끝난 분말은 미리 멸균하여 실온에 보관중인 rehydration media에 충분히 재현탁시켰다 (Fig. 1). 이상의 실험방법에 기술하지 아니한 것은 상법에 준하였다.

Table 1. Cryoprotective effect of glycine, glutamic acid and the mixture of glycine and glutamic acid on the viability of *L. casei* YIT 9018

Suspending media	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Viability (%)
Distilled water	8.7×10^9	8.2×10^7	1.0
Saline, 0.85%	8.7×10^9	6.8×10^8	7.8
Glycine, 0.1 M	6.4×10^9	1.1×10^9	17.7
DL-Glutamic acid, 0.1M	8.5×10^9	3.3×10^9	38.5
Amino acid mixture*, 0.2M	9.0×10^9	5.4×10^9	60.0

*Glycine+DL-Glutamic acid

결과 및 고찰

생육곡선 및 생존율

MRS 배지에 0.4% 접종한 *L. casei* YIT 9018 주는 접종후 약 6 시간부터 활발하게 생육하기 시작하였으며 24시간만에 최대의 생육을 보였다. 또 cell의 age에 따른 동결건조의 감수성을 검토한 결과 약 24시간 균이 가장 우수하였으며 이 결과는 성숙한 cells이 동결건조에 가장 저항성이 크다는 Heckly⁽⁹⁾의 주장과 일치하였다(Fig. 2).

아미노산 혼합용액의 동결보호 효과

우선 glycine과 DL-glutamic acid의 효과를 몇 종류의 기지의 보호제들과 상호 비교하였다. 대조구는 1% 미만인데 비하여 위 아미노산은 각각 17%, 38% 정도의 생존율을 나타냈다. 특히 위 2가지 아미노산을 함께 섞은 용액은 60%의 비교적 양호한 효과를 보여 주었다(Table 1). 이와같은 아미노산 용액의 보호효과는 Na-glycerophosphate를 사용하여 동결손상을 방지했다는 Vedamuthu⁽¹⁰⁾의 보고와 관련지어 볼때 아미노산 용액의 완충력이 기여하고

Table 2. Cryoprotective effect of several sugars and non-fat milk solid(NFMS) on the viability of *L. casei* YIT9018

Suspending media	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Survival (%)
Glucose, 5%	4.4×10^9	1.6×10^9	36.3
Galactose, 5%	4.3×10^9	1.4×10^9	32.5
Fructose, 5%	3.8×10^9	9.9×10^8	26.0
Sucrose, 5%	4.4×10^9	1.9×10^9	43.1
Lactose, 5%	3.8×10^9	1.4×10^9	36.8
NFMS, 5%	4.1×10^9	1.1×10^9	26.8
Glycerol, 5%	4.0×10^9	2.0×10^9	50.0

Table 3. Cryoprotective effect of the amino acid mixture supplemented with several sugars and non-fat milk solid(NFMS) on the viability of *L. casei* YIT 9018.

Suspending media	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Viability (%)
Amino acid mixture* +Glucose, 5%	8.0×10^9	6.8×10^9	85.0
Amino acid mixture* +Lactose, 5%	7.4×10^9	6.5×10^9	87.8
Amino acid mixture* +Sucrose, 5%	7.5×10^9	6.9×10^9	92.0
Amino acid mixture* +NFMS, 5%	7.0×10^9	6.7×10^9	95.7

*Glycine+DL-Glutamic acid, 0.4M

있다고 생각되었다. 또 기지의 보호제들과 비교할 때도 상당히 효과적임을 확인할 수 있었다(Table 2). 일반적으로 glycerol과 당류와 같은 poly올⁽¹¹⁾는 세포 내에서 작용하는 물질로서 건조과정중 물대신 세포성분과 수소결합할 수 있는 성질때문에 효과적인 것으로 생각되어 왔다⁽⁹⁾. Table 3은 glycine과 DL-glutamic acid 혼합용액에 당류 및 NFMS를 첨가하여 비교한 것으로 4개 시험구 모두 85% 이상의 우수한 동결 보호효과를 나타냈다. 따라서 아미노산 혼합용액에 이들을 첨가할 경우 상승효과를 얻을 수 있다고 생각되었다.

젓당 및 자당 농도의 영향

아미노산 혼합용액에 젓당과 자당을 농도를 달리하여 첨가한 다음 보호효과를 측정한 결과는 Table 4 및 5와 같다. 2가지 모두 우수한 효과를 가지고 있었으며 농도가 증가할수록 생존율도 따라서 증가하는 경향이였다. 자당의 경우 10% 첨가시 97.5%의 생존율을 나타냈다. 이와같은 결과는 Stadhouders⁽⁶⁾등의 보고와 유사한 경향을 보였다.

Table 4. Survival of *L. casei* YIT 9018 after freeze-drying as a function of lactose concentrations

Lactose concentrations	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Survival (%)
Lactose, 2.5%	7.2×10^9	6.2×10^9	86.1
Lactose, 5.0%	7.4×10^9	6.5×10^9	87.8
Lactose, 7.5%	8.1×10^9	7.5×10^9	92.6
Lactose, 10%	7.8×10^9	7.4×10^9	94.8

Basal suspending media: Glycine+DL-Glutamic acid 0.2M

Table 5. Survival of *L. casei* YIT 9018 after freeze-drying as a function of sucrose concentrations

Sucrose concentrations	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Survival (%)
Sucrose, 2.5%	7.7×10^9	6.6×10^9	85.7
Sucrose, 5%	7.5×10^9	6.9×10^9	92.0
Sucrose, 7.5%	7.7×10^9	7.4×10^9	96.1
Sucrose, 10%	8.0×10^9	7.8×10^9	97.5

Basal suspending media: Glycine + DL-Glutamic acid 0.2 M

NFMS 농도의 영향

Sinha 등⁽¹²⁾은 skim milk에 ascorbic acid, thiourea, ammonium chloride를 강화시켰을때 유산균의 동결보호 효과가 뛰어났다는 주장을 한 바 있다. 본 실험에서는 탈지분유 농도에 따른 건조후 생존율을 측정하였으며, 5~10%의 농도가 가장 적당하였다 (Table 6). NFMS의 작용기전은 분명하지 않으나 탈지분유중에 존재하는 유당이나 casein이 효과를 내는 것으로 추측되었다.

아미노산 혼합용액의 농도와 저장성

아미노산 혼합용액의 농도별 생존율은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 0.1 M이 가장 효과적이었으며, 저장성에는 0.5 M 용액을 사용하여 건조한 것이 가장 효과적이었다 (Fig. 4). 한편 Obayashi 등⁽¹³⁾은 Soluble starch와 Na-glutamate를 각각 5%씩 사용했을 때 저장성이 가장 우수하였다고 보고한 바 있다.

산생성량의 측정

동결건조 전후의 생균수 변화만 가지고는 생리적 성질의 변화를 파악할 수 없으므로 산생성량을 조사하여 원래의 그것과 비교하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 아미노산 혼합용액에 NFMS를 첨가한 경우 가장 높은 산생성을 보였으며 균체의 생존율

Table 6. Survival of *L. casei* YIT 9018 after freeze-drying as a function of non-fat milk solid (NFMS) concentrations

NFMS concentrations	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Survival (%)
NFMS, 2.5%	8.2×10^9	7.5×10^9	91.4
NFMS, 5.0%	7.9×10^9	7.5×10^9	94.9
NFMS, 10%	9.6×10^9	9.2×10^9	95.8
NFMS, 15%	9.1×10^9	8.2×10^9	90.1

Basal suspending media: Glycine + DL-Glutamic acid, 0.2 M

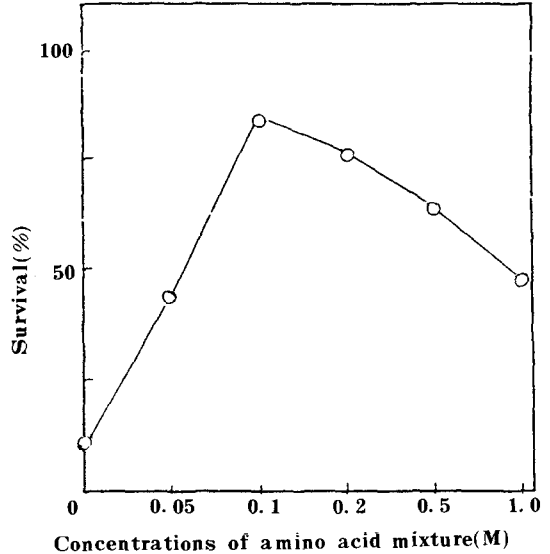


Fig. 3. Effect of concentrations of the amino acid mixture on survival of *L. casei* YIT 9018 after freeze-drying

과도 비슷한 경향을 나타냈다. 이상의 아미노산 효과는 아마도 두 아미노산이 균체내의 생리적 성분인 핵산의 합성전구 물질로 작용할 뿐만 아니라 혼합용액은 중성 pH 부근에서 비교적 우수한 완충 효과를 나타낸 것이 주요한 원인으로 추측되었다. 따

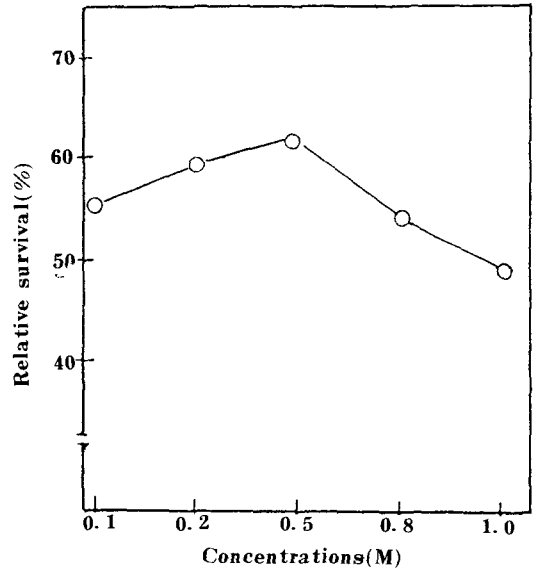


Fig. 4. Effect of concentrations of the amino acid mixture on preservation of *L. casei* YIT 9018, room temp., 30 days

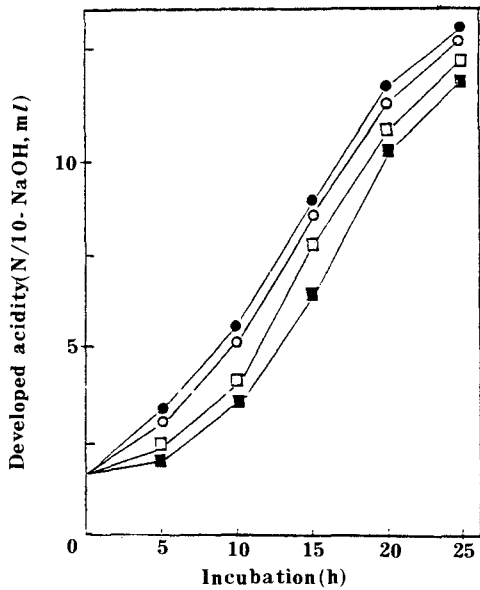


Fig. 5. Effect of suspending media on the acid production by freeze-dried *L. casei* YIT 9018 in milk, 37°C.

- : Physiological saline □ : Gly+Glu, 0.5M
- : Gly+Glu, 0.5M+NFMS, 10%
- : Gly+Glu, 0.5M+Sucrose, 10%

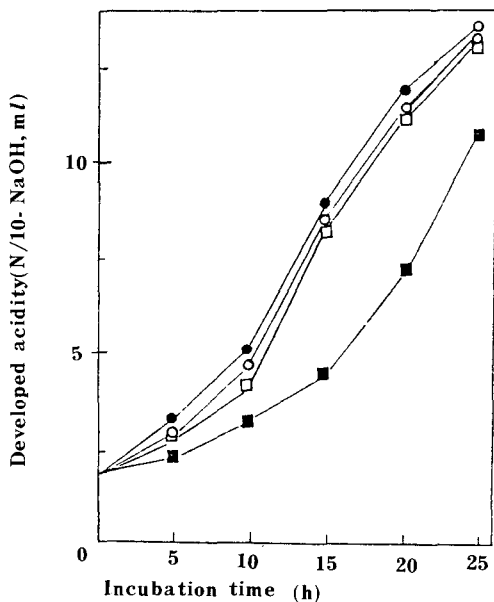


Fig. 6. Effect of rehydration media on the acid production by freeze-dried *L. casei* YIT 9018 in milk, 37°C.

- : Physiological saline □ : Gly+Glu, 0.5M
- : Gly+Glu, 0.5M+NFMS, 10%
- : Gly+Glu, 0.5M+Sucrose, 10%

Table 7. Effect of rehydration media on the survival of freeze-dried *L. casei* YIT 9018

Rehydration media	Count before drying, cfu/ml	Count after drying, cfu/ml	Survival (%)
Saline, 0.85%	6.4×10^8	3.6×10^8	5.6
Glycine, 0.1M	6.4×10^8	3.1×10^8	4.8
DL-Glutamic acid, 0.1M	6.4×10^8	4.0×10^8	6.3
Amino acid mixture*, 0.2M	6.4×10^8	9.0×10^8	14.1
Amino acid mixture* + Sucrose, 10%	6.4×10^8	1.1×10^9	17.2
Amino acid mixture* + NFMS, 10%	6.4×10^8	1.2×10^9	18.8

*Glycine+DL-Glutamic acid, 0.2M
 Suspending media: physiological saline, 0.85%

라서 유산균 동결건조시에는 위 두 아미노산과 탈지분유의 사용이 크게 중요하다고 생각되었다.

Rehydration의 영향

동결건조후 rehydration은 미생물의 생존에 큰 영향을 미친다. Morichi 등⁽¹⁴⁾은 20-25°C의 온도가 rehydration에 가장 양호하였다고 보고하였으며 Speck 등⁽¹⁵⁾은 *L. bulgaricus*의 경우 Spray-drying cells과 Freeze-drying cells 간에는 온도에 대한 감수성에 차이가 있었다고 주장하였다. Leach와 Scott⁽¹⁶⁾도 rehydration medium에 따른 생존율의 차이를 보고한 바 있다. Table 7과 같이 아미노산 혼합액은 사용한 경우 대조구에 비해서 약 3배의 생존율이 상승되었으며, 산생성력도 아미노산 혼합액에 NFMS를 10% 첨가한 경우 가장 우수하였다(Fig. 6).

요 약

Lactobacillus casei YIT 9018은 국내의 발효유 제조에 널리 사용되고 있으며, 이에 대한 효과적인 동결건조 방법을 확립하기 위하여 glycine과 glutamic acid를 함유한 아미노산 혼합액을 기본 현탁 배지로 사용하여 동결건조 및 rehydration을 실시하고 그 효과를 기존의 보호제들과 비교하였다.

아미노산 혼합액은 대조구에 비해서 현저한 동결 보호 효과를 가지고 있었다. 또 glycine과 DL-glutamic acid는 단독 사용시보다 혼합할 경우 더욱 효과적이었으며 이때의 최적농도는 0.1M이었다. *L. casei* YIT 9018주는 MRS 배지상에서 접종후 18시간만에 정상기에 들어갔으며 24시간 후에는 최대생육을 나타냈다. 또 이 24시간 균체가 동결건조에 대하여 가장 저항성이 큰 것으로 판명되었다. 아미노

산 혼합액에 sucrose, lactose 등의 이당류 및 NFMS를 첨가하면 85% 이상의 높은 생존율을 기대할 수 있으며, 최적농도는 당류의 경우 7.5~10% (w/v), NFMS의 경우는 10% 정도였다. 이상의 결과로 보아 동결후의 생존율을 높이고 활력을 유지하기 위해서는 아미노산 혼합액에 NFMS의 첨가가 바람직하다고 생각되었다. 한편, rehydration media에 따라서도 생존율이 변하였는데 아미노산 혼합액은 대조구에 비해 약 3배의 동결 보호효과를 나타냈다.

사 사

본 연구를 수행하는 동안 물심양면으로 도와주신 한국야쿠르트 유통부장님과 연구소 김영한 부소장님께 진심으로 감사사를 드립니다.

참고문헌

1. Reusser, F.: *Advances in Microbiol.*, AP, Vol 5, 189-215 (1963)
2. Perlman, D., R.B. Greenfield and E. O'Brien: *Appl. Microbiol.*, **2**, 199 (1954)
3. Gilliland, S.E. and M.L. Speck: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 107 (1974)
4. Porubcan, R.S. and R.L. Sellars: U.S. Patent, 3,897,307 (1974)
5. De Man, J.C.A., M. Rogosa and M.E. Sharpe: *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130 (1960)
6. Stadhouders, J., G. Hup and L.A. Jansen: *Neth. Milk Dairy J.*, **25**, 229 (1971)
7. Yang, N.L. and W.E. Sandine: *J. Dairy Sci.*, **62**, 908 (1979)
8. Speckman, C.A., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Dairy Sci.*, **57**, 165 (1973)
9. Heckly, R.J.: *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol. 3, AP, 1-76 (1961)
10. Vedamuthu, E.R.: U.S. Patent, 3,975,545 (1975)
11. Graciela, F. De Valdéz, G.S., De Giori, A.A.P., De Ruiz Holgado and G. Oliver: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 302 (1983)
12. Sinha, R.N., A.T. Dudani and B. Ranganathan: *J. Food Sci.*, **39**, 641 (1974)
13. Obayashi, Y., S. Ota and S. Arai: *J. Hyg.*, **59**, 77 (1961)
14. Morichi, T., R. Irie and N. Yano: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 137 (1967)
15. Speck, M.L. and R.P. Meyers: *J. Bacteriol.*, **52**, 657 (1946)
16. Reach, R.H. and W.J. Scott: *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 259 (1959)