

## 도축 폐혈액 단백질을 이용한 Probiotics 생산에서의 동결건조 조건

현창기\* · 신현길

한동대학교 생물식품공학부

**Optimization of Freeze-drying Conditions for Probiotics Production with Animal Blood Proteins Added Medium.** Hyun, Chang Kee\* and Heun Kil Shin. School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang 791-940, Korea - A probiotic-strain of *Lactobacillus* sp. was cultured in bovine blood plasma-based (BBPB) medium and freeze-dried to prepare a probiotic product as an animal feed additive. The cell mass produced in the medium,  $5.2 \times 10^9$  CFU/ml, was high enough to be commercialized and was 74% of that in MRS medium. The survival rate of *Lactobacillus* sp. against freeze-drying was affected by the conditions for treatment of cultured BBPB broth before freeze-drying such as pH adjustment, volume reduction and freezing rate. It was also found that the blood protein hydrolysate remaining in broth also enhanced the survival rate. Among various protective substances, sucrose showed a high stabilizing effect with 10% (w/v) addition, by which the maximum survival rate (48.3%) and viable cell count ( $3.0 \times 10^{10}$  CFU/g) were obtained.

**Key words:** bovine blood plasma proteins, slaughterhouse, probiotics, *Lactobacillus* sp., freeze-drying

도축폐기물인 가축혈액은 혈장과 혈구 부분으로 나누어 볼 때 혈장부분에는 6-8%를 차지하는 albumin 및 globulin이 존재하며, 혈구부분에는 주로 globin으로 이루어진 28% 이상의 단백질 성분이 있어 혈액 자체가 하나의 고농도 단백질 용액이라 할 수 있다[18]. 그러나 이렇듯 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 유용 가치가 높은 원료자원임에도 불구하고 우리나라의 경우만 하더라도 연간 약 6만톤 이상 생산되고 있는 이 가축혈액은 거의 대부분 폐기되고 있어 자원의 낭비는 물론 환경의 주요 오염원이 되고 있는 실정이다[19]. 현재 가축혈액의 일부분은 혈분(blood meal) 형태로의 동물성 단백질 농후 사료첨가제, 식품공업에서의 유화제, 안정제, 착색제, 의약품 소재 또는 실험용 시약원료 등에 이용되고 있다[17, 18]. 현재까지 가축혈액의 응용을 위한 연구가 계속되고 있지만 아직 그 이용분야가 많지 않고 이용량이 극히 제한되어 있어 보다 많은 분야에 특히 대량으로 이용할 수 있는 용도를 개발해야 하는 실정이다[4, 5, 9, 14, 24]. 한편 가축혈액의 혈구부분은 methemoglobin으로 쉽게 산화되어 암적색을 나타내므로 이 상태로 사료 또는 식품에 첨가하면 미량에 의해서도 최종제품에 바람직하지 않은 색상을 내어 좋지 않은 영향을 미친다. 따라서 그동안 가축혈액을 탈색시키기 위해 아세톤 등에 의한 화학적 처리와 효소적 처리 등의 많은 연구가 진행되었으나, 이러한 공정은 생산비용이 높은 단점을 가지고 있

다[8, 22]. 따라서 본 연구에서는 수집된 가축혈액으로부터 간단한 원심분리만으로 얻어지는 혈장성분을 대량으로 이용할 수 있는 응용분야를 검토하여 보았다. 본 연구에 앞서 혈장 단백질을 유산균 배양을 위한 배지의 질소원으로 이용하는 배양실험을 통해 산업화의 가능성에 대해 보고한 바 있다[11]. 특히 본 연구에서는 가축의 장내 세균총 개선을 통해 건강을 유지하고 항생제 사용을 줄이기 위한 사료첨가용 생균제, 즉 probiotics를 생산하는데 목적을 두고 있다[6, 10, 12, 20]. 즉 혈장 단백질 성분은 유산균 배양의 질소원으로 이용되는 한편, 배양액의 동결건조에 의해 생산되는 최종제품에는 유산균에 의해 이용되지 않은 단백질 가수분해물 성분이 잔여하므로 동물성 단백질의 공급원으로 동시에 사료에 첨가되는 부가효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 probiotics의 산업적인 생산에 초점을 맞추어 배양액의 동결건조에 의한 제제화를 시도하였다. 이를 위하여 혈장 단백질을 이용하여 배양한 배양액의 동결건조과정에서 균체의 안정성에 영향을 미치는 조건들과 혈장 단백질 성분의 안정화 효과를 조사하였다. 즉 균체의 생존율을 극대화하기 위한 최적조건을 조사하고, 경제적으로 대량생산이 가능하도록 생존생균수를 최대화할 수 있는 동결건조 안정제를 선발하였다.

### 재료 및 방법

#### 혈액시료 채취 및 혈장의 분리

혈액시료는 경북 포항시 소재의 도축장인 (주)명신산

\*Corresponding author

Tel. 82-562-60-1361, Fax. 82-562-61-4603

E-mail: ckhyun@han.ac.kr

업으로부터 도축 즉시 위생적으로 채취한 소 혈액 3 L에 40% trisodium citrate 용액 48 ml를 첨가하여 잘 혼합함으로써 혈액 응고를 억제하여 사용하였다. 주된 단백질 원으로 사용될 혈장은 혈액시료를 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 채취하였다.

**균주 분리**

실험에 사용한 균주는 (주)과학축산이 국내에서 시판하고 있는 활성미생물 복합제인 프로세락(Procelac®)으로부터 유산균을 분리하여 사용하였다. 제제 1 g을 10 ml의 멸균 0.85% saline 용액에 현탁시킨 후, 동일한 용액으로 10배, 100배 희석시킨 현탁액 20 µl를 MRS 고체배지에 도말하여 30℃ 및 37℃에서 배양하였다. 가장 많이 발생한 집락(총 집락수의 95%이상)을 다시 MRS 고체배지에 접종하여 순수분리하였다. 분리한 균주는 MRS 고체배지 상에서의 집락의 성상, MRS 배양액의 성상을 관찰하였고 pH변화, lactic acid 측정 kit(Behringer Mannheim, GmbH, Germany)에 의해 배양액 중 유산이 다량 생성되는 것을 확인하였다. 또한 Minitek system(BBL, USA)을 이용한 실험으로부터 catalase 음성, 그람 양성 간균이라는 결과를 얻음으로써 *Lactobacillus sp.*라는 것을 확인하였다[7].

**BBPB 배지의 제조 및 배양조건**

*Lactobacilli* 배양의 rich medium인 MRS 배지(Difco, Detroit, USA)의 조성을 기초로 하여, MRS 배지의 질소원을 제외한 모든 성분을 2배의 농도로 용해시킨 용액에 질소원으로는 혈장 가수분해물을 1:1(v:v)로 혼합함으로써 bovine blood plasma-based(BBPB) 배지를 제조하였다[11]. 혼합되는 혈장 성분의 농도에 따른 영향을 조사하기 위하여 혈장 가수분해물의 양을 달리한 4종류의 BBPB 배지를 제조하고 각각을 0.1 plasma, 0.5 plasma, 1 plasma, 2 plasma 배지로 구분하였다. 즉 기존 배지제조방법[11]에 따라 혈장 가수분해물을 혼합한 배지를 1 plasma로 하고, 혈장 가수분해물을 증류수로 2배, 10배 희석하여 동일한 방법으로 혼합한 배지를 각각 0.5, 0.1 plasma로 하였다. 또한 2 plasma의 BBPB 배지는 MRS 배지의 질소원 외의 모든 성분을 직접 혈장 가수분해물 원액에 용해시켜 제조하였다.

균주의 종배양은 250 ml flask에 150 ml의 MRS 액체 배지를 넣고 멸균한 후 균주를 MRS 고체배지로부터 접종하여 37℃에서 24시간 동안 정치배양하였다. 종배양액 5 ml을 2,000 rpm에서 10분간 무균적으로 원심분리하여 얻어진 침전 균체를 멸균 0.85% saline 용액 5 ml에 재현탁시켜 주배양액인 BBPB 배지 500 ml에 접종하고 37℃에서 54시간 동안 정치배양하면서 균의 생육정도를 조사하였다.

**생균수 측정**

배양액 시료를 멸균 0.85% saline 용액을 이용하여 적당한 균농도로 희석한 후 MRS 고체배지에 희석액을 20 µl씩 도말하였다. 동결건조에 의해 분말화된 시료의 경우는 분말 1 g을 10 ml의 멸균 0.85% saline 용액에 현탁시킨 후 배양액 시료와 동일하게 처리하였다. 각 고체배지는 37℃에서 30시간 배양한 후 형성된 집락의 수를 세어 생균수를 측정하였다. 각 시료에 대해서는 동일하게 처리된 3개의 배지에 대한 결과의 평균값으로 생균수를 결정하였다[15].

**동결건조 및 생존율 산출**

동결건조 전의 배양액은 pH가 3.7정도로 매우 낮으므로 우선 중성으로 조절한 후, 동결건조시간을 단축시키기 위해 배양액의 부피를 1/10로 줄이고 얻어진 농축 배양액을 동결건조하였다. 즉 배양액 100 ml를 1 N NaOH 용액으로 pH 6.4가 되게 한 후, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 90 ml를 버리고 남은 침전물과 상등액을 균일하게 재현탁하였다. 얻어진 농축 배양액은 10 ml 유리 피펫을 이용하여 정확히 부피를 측정 한 후, 미리 칭량한 conical tube에 옮겨 넣어 tube의 무게와 시료의 부피를 기록해 두었다. Tube를 -50℃(또는 -15℃)에서 동일한 기온기로 눕히고 3시간 동안 동결시킨 후 동결된 시료를 즉시 동결건조기(일신산업)에 장착하여 24시간 동안 건조하였다. 건조된 시료는 즉시 무게를 측정하고 분말을 고루 분쇄한 후 생균수를 측정하였다. 동결건조에 대한 생존율은 다음과 같이 계산하였다;

$$\text{동결건조시의 안정화 효과(\% survival)} = \frac{\text{동결건조 직후의 생균수(CFU/g)}}{\text{동결건조 전의 생균수(CFU/g)}} \times 100$$

$$\begin{aligned} &(\text{단, 동결건조 전의 생균수} = \text{생균수 결과값(CFU/ml)}) \\ &\times \frac{\text{동결건조 전의 부피(ml)}}{\text{동결건조 직후의 무게(g)}} \end{aligned}$$

**결과 및 고찰**

**BBPB 배지에서의 배양**

본 연구에 앞서 진행된 일반 유산균주를 이용한 BBPB 배지에서의 최적화 실험결과를 바탕으로[11] 본 연구에서 분리한 probiotics용 *Lactobacillus sp.*에 대해서도 동일한 배양실험을 실시한 결과, BBPB 배지에서의 최고 생육생균수는  $5.2 \times 10^9$  CFU/ml로서  $7.1 \times 10^9$  CFU/ml을 기록한 MRS 배지에 대하여 약 74%의 생육도를 나타내었고  $10^9$  cells/ml이상의 높은 생균수를 나타내었다(Fig. 1). 보통 probiotics 생산에서의 유산균 배양액이  $10^9$  CFU/ml 수준임을 감안할 때[1, 13] 혈장 단백질을

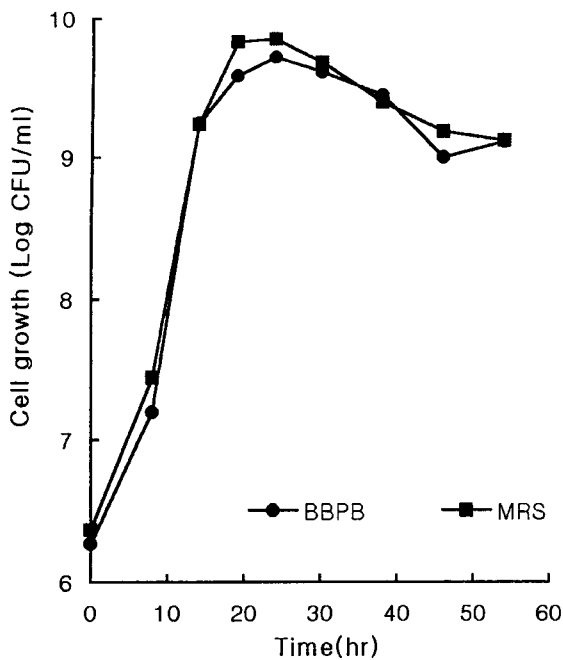


Fig. 1. Comparison of the cell growth of *Lactobacillus* sp. in MRS and BBPB media.

이용하여 probiotics를 경제적으로 생산할 수 있는 충분한 가능성을 가지고 있음을 시사하고 있다. 즉 폐혈액 단백질 성분을 이용하여 생균제용 유산균을 배양함으로써, 기존의 두가지 사료첨가제로 이용되고 있는 동물성 단백질 첨가제 및 probiotics의 기능을 함께 갖춘 새로운 사료첨가제를 경제적으로 생산할 수 있어서, 폐자원의 고부가가치화는 물론 고급 사료첨가제의 저렴한 생산이 가능하게 된다.

#### 동결건조 조건의 최적화

Probiotics 생산에 있어 생산성을 결정하는 가장 중요한 요소는 균체의 동결건조에 대한 안정성이라 할 수 있다[1, 13]. 동결건조과정 중의 안정화에 관한 많은 연구 문헌이 있지만 실제적인 적용에 있어서는 일치되는 결과를 얻기 힘들데, 그것은 균주, 배양액 성분, pH, 배양시간, 동결건조 방법, 동결건조 보호제 등의 여러 가지 요인이 균체의 안정화에 영향을 미치기 때문이다[13, 19]. 본 연구에서는 BBPB 배양액으로 얻어진 높은 생균수를 동결건조과정에서 최대한 높게 유지해 줄 수 있는 조건을 조사하였다. Probiotics 생산을 위한 적정 배양시간을 결정하기 위하여 배양시간에 따라 16시간(mid-log phase), 20시간(late-log phase), 24시간(early stationary phase), 28시간(stationary phase)에서의 배양액에 대하여 동일한 조건으로 동결건조시킨 후 각각의 생존율을 비교하였다. 16시간과 20시간 배양액에 대해서는 생존율이 7.5%로서 차이가 없었으며, 그에 비하여 24, 28시간 배양액의

Table 1. Effects of several conditions on the survival of *Lactobacillus* sp. for freeze-drying

Conditions	Viable cell count (CFU/g)		% Survival
	before freeze-drying	after freeze-drying	
<i>pH adjustment</i>			
pH 3.7*	$6.4 \times 10^{10}$	$4.4 \times 10^9$	6.8
pH 6.4**	$6.3 \times 10^{10}$	$4.6 \times 10^9$	7.3
<i>10-fold concentration</i>			
the culture broth	$6.5 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^9$	6.6
the concentrate	$6.2 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^9$	7.3
<i>Freezing temperature and sample weight</i>			
-50°C, 19.12 g	$6.2 \times 10^{10}$	$3.9 \times 10^9$	6.4
-50°C, 10.04 g	$6.2 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^9$	7.6
-50°C, 4.98 g	$6.2 \times 10^{10}$	$5.6 \times 10^9$	9.1
-15°C, 19.74 g	$6.4 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^9$	1.8
-15°C, 9.79 g	$6.4 \times 10^{10}$	$2.4 \times 10^9$	3.9
-15°C, 5.18 g	$6.4 \times 10^{10}$	$3.6 \times 10^9$	5.9

\*The pH of the cultured broth was not adjusted before freezing.

\*\*The pH of the cultured broth was adjusted to 6.4 before freezing.

경우 생존율이 각각 7.3%, 7.0%로 감소하였으나 동결건조 전의 배양액 및 동결건조 후의 생균수는 24시간째가 가장 높았기 때문에 동결건조를 위한 배양시간은 24시간으로 결정하였다. 배양시간에 따른 생존율 감소는 노화된 세포의 수가 증가되어 생존율에 미약하게 영향을 미치는 것으로 추정된다.

한편 동결건조 전 배양액의 pH는 3.7정도로써 배양과정에서 발효산물로 생성된 다량의 유기산이 함유된 상태이다. 따라서 생성된 유기산(또는 그에 의한 낮은 pH)이 동결건조 후의 생존율에 영향을 주는지 알아보기 위하여 배양액의 pH를 보정하였을 때 생존율의 변화를 조사하였다. 1 N NaOH 용액으로 농축 배양액의 pH를 6.4로 보정한 것과 보정하지 않은 것을 비교한 결과, 보정하지 않는 경우 유기산(낮은 pH)에 의해 다소 생존율이 저하되는 것으로 나타나(Table 1), pH를 보정하는 것이 동결건조 안정성을 높이는데 유리함을 보여주었다.

또한 동결건조 전 배양액을 농축하여 동결시간과 건조시간을 단축하는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 농축하지 않은 원래의 배양액과 농축 배양액으로 구분하여 동결건조 후의 생존율을 비교하였다. 배양액의 농축은 산업적으로 이용되고 있는 연속식 원심분리기의 농축능력을 감안하여 원래 배양액에 대하여 10배로 농축하는 조건으로 실시하였다. 실험 결과, 농축 배양액의 경우가 원래 배양액의 경우보다 다소 높은 생존율을 보여줌으로써(Table 1) 배양액의 농축에 의한 동결시간 및 건조시간의 단축이 동결 및 건조과정에 의한 유산균의 손상을 줄여주는 것으로 추정된다.

또한 동결속도와 시료의 양에 따라 동결시간 및 건조 시간이 달라지는 것이 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 동결속도는 -50℃의 deep freezer에서 3시간 동안 동결하는 것과 일반 냉장고의 -15℃ 냉동실에서 5시간 동안 동결하는 것으로 구분하였고, 농축 배양액 시료의 양은 약 5, 10, 20 g으로 구분하여 동결건조하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 생존율을 높이기 위해서는 급속한 동결에 의한 건조공정이 유리한 것으로 나타났으며, 시료의 양에 의해서도 유의성 있는 생존율의 차이를 보여 주었다.

이상과 같은 실험 결과, 최적 동결건조조건은 24시간 배양한 배양액 100 ml를 pH 6.4로 보정한 뒤 10배로 농축하여 -50℃에서 3시간 동안 동결한 후 건조하는 것으로 결정하고, 이후 실험은 이러한 조건에서 계속 진행하였다.

**혈장 단백질 성분의 동결건조 안정화 효과**

배양 중 유산균에 의해 이용되지 않고 배양액 중에 남아있는 혈장 단백질의 가수분해물 성분에 의한 동결건조 안정화 효과를 조사하였다. BBPB 배지에서 배양한 일정 부피의 배양액을 원심분리하여 균체 침전물로부터 상등액을 분리해낸 후, 멸균 0.85% saline용액으로 침전물을 원래의 부피가 되도록 다시 현탁시켜 동결건조하고 원래 배양액의 동결건조 결과와 비교하였다. 또한 혈장 단백질 성분의 안정화 효과를 평가하기 위하여 대조구로는 MRS 배지에 대하여 동일한 조건으로 실험하여 결과를 비교하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 MRS 배지 성분 및 BBPB 배지성분은 공히 동결건조 안정화 효과를 보여주었으며, 두 배지의 안정화 효과는 유사한 수준이었다. 이러한 안정화 효과는 BBPB 배지의 경우에는 함유되어 있는 혈장 단백질 가수분해물의 아미노산, 펩타이드 또는 단백질 성분들, MRS 배지의 경우에는 yeast extract, peptone, beef extract 등 질소원 성분들에 의한 것으로 추정되었다[1, 13, 21].

**Table 2. Effects of the components in MRS and BBPB media on the survival of *Lactobacillus* sp. after freeze-drying**

Samples	Viable cell count (CFU/g)		% Survival
	before freeze-drying	after freeze-drying	
<i>MRS medium</i>			
cultured cell	8.0 × 10 <sup>10</sup>	5.7 × 10 <sup>9</sup>	7.1
resuspended cell*	7.8 × 10 <sup>10</sup>	2.2 × 10 <sup>9</sup>	2.8
<i>BBPB medium</i>			
cultured cell	6.2 × 10 <sup>10</sup>	4.5 × 10 <sup>9</sup>	7.3
resuspended cell*	6.3 × 10 <sup>10</sup>	2.0 × 10 <sup>9</sup>	3.2

\*The cells cultured in MRS and BBPB medium was resuspended in 0.85% saline solution after centrifugation.

또한 BBPB 배지에 첨가되는 혈장 가수분해물의 농도에 따른 동결건조 후의 생존율을 조사하였다. 혈장 가수분해물의 혼합 농도별로 제조된 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 plasma 배지에서 각각의 stationary phase에 이를 때까지(모든 배지에서 24시간째 도달) 배양한 배양액 시료에 대해 동일한 조건으로 동결건조하였다. 각 배양액의 생존율을 비교한 결과, 혈장 단백질 가수분해물의 농도가 0.1, 0.5, 1 plasma로 높아질수록 생존율은 상승되었으며 2 plasma의 생존율은 1 plasma보다 약간 높은 수준의 생존율을 나타내었다(Table 3). 이러한 결과는 앞서 추정된 바와 같이 BBPB 배지의 질소원 성분으로 첨가한 혈액 단백질 가수분해물이 동결건조 공정에 대해 유산균의 손상을 막아주는 동결건조 보호제로서의 역할도 하고 있음을 뒷받침해 주고 있다. 즉 혈장성분을 이용하여 유산균을 배양하고 그 배양액을 제제화하는 방법에 의해 혈장성분은 유산균 발효에 의한 탈취 등으로 질이 개선되는 한편, 유산균 역시 혈장분종의 단백질 또는 펩타이드에 의한 안정화로 제제화 공정에서 생존 생존수가 증가하는 상호 보완효과를 기대할 수 있으므로 이 방법이 더욱 유리함을 보여 주고 있다.

**동결건조 안정제의 선정**

동결건조 조건과 함께 균체의 생존율과 보존성에 큰 영향을 주는 또하나의 요인은 동결건조 안정제라 할 수 있다. 안정제로는 현재까지 당류, 당알콜류, 아미노산류, 단백질 가수분해물 등의 물질들이 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[2, 3, 21, 23]. 배양액의 동결건조를 통한 제제화에 의해 실제 probiotics로서의 상품화를 위해서는 값싼 동결건조 안정제를 첨가하여 동결건조에 대한 생존율을 극대화할 수 있도록 하여야 한다. 본 연구에서도 앞에서 최적화된 동결건조 조건과 더불어 BBPB 배양액에 첨가하여 안정화 효과를 나타내는 안정제를 조사하였다. 즉 glycine, monosodium glutamate, sucrose, lactose, starch, sorbitol, skim milk, 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 대두 가수분해물(soybean hydrolysate) 등 동결건조 안정화 효과가 있다고 알려져 있고[2, 3, 21, 23] 산업적인 이용이 가능하며 사료에 적합한 소재들을

**Table 3. Effect of the concentration of bovine blood plasma hydrolysate in BBPB medium on the survival of *Lactobacillus* sp. after freeze-drying**

Plasma concentration	Viable cell count (CFU/g)		% Survival
	before freeze-drying	after freeze-drying	
0.1 plasma	7.9 × 10 <sup>8</sup>	9.5 × 10 <sup>6</sup>	1.2
0.5 plasma	8.2 × 10 <sup>9</sup>	3.1 × 10 <sup>8</sup>	3.8
1 plasma	7.1 × 10 <sup>10</sup>	5.0 × 10 <sup>9</sup>	7.0
2 plasma	9.4 × 10 <sup>9</sup>	5.6 × 10 <sup>8</sup>	7.5

**Table 4. Effects of sucrose and skim milk on the survival of *Lactobacillus* sp. after freeze-drying**

Protective substances added	Viable cell count (CFU/g) after freeze-drying	% Survival
Non-addition	$4.5 \times 10^9$	7.3
Sucrose		
1%	$6.3 \times 10^9$	10.1
5%	$2.1 \times 10^{10}$	33.8
10%	$3.0 \times 10^{10}$	48.3
20%	$2.8 \times 10^{10}$	45.2
Skim milk		
1%	$4.8 \times 10^9$	7.7
5%	$9.1 \times 10^9$	14.7
10%	$1.2 \times 10^{10}$	19.3
20%	$1.4 \times 10^{10}$	22.6

동결전에 0, 1, 5, 10, 20%(w/v)의 농도로 첨가하여 유산균 안정화 효과를 검증하였다. 우선 동일한 농축 배양액을 20 ml씩 5개로 나누어 각 안정제를 0, 1, 5, 10, 20%(w/v)의 농도로 첨가하여 녹인 배양액 시료들에 대하여 동결건조 후의 생존율을 비교하였다. 그 결과, sucrose와 skim milk가 각각 10-20%의 농도에서 우수한 동결건조 안정화 효과를 나타내었고, 그 중에서도 sucrose의 경우가 높은 안정화 효과를 보여서 10%를 첨가할 때 48.3%라는 높은 생존율을 나타내었는데 이것은 무첨가시의 생존율인 7.3%보다 6.6배가 넘는 생존율이었다(Table 4). Lactose와 카세인 가수분해물, 대두 가수분해물은 미약한 효과를 보여주었으며 glycine과 monosodium glutamate 등의 아미노산류와 starch 및 sorbitol은 안정화 효과를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 sucrose가 보편적인 감미료이며 저렴한 가격 등의 장점을 가지면서 가장 안정화 효과가 좋았기 때문에 가장 적절한 동결건조 안정제로 선정할 수 있었다. 또한 sucrose를 첨가하여 얻어진 제제의 생균수는 최대  $3 \times 10^{10}$  CFU/g으로서 산업화 가능성이 충분한 것으로 판단되었다. 본 연구에서 *Lactobacillus* sp. 균주를 분리해 낸 활성 미생물 복합제(Procelac®) 제품의 사양에서는 1 kg의 제품이  $1 \times 10^{8-9}$  CFU/kg 정도의 생균수를 나타낸다고 명시하고 있다. 따라서 본 연구에서 얻어진 제제를 이용하여 미생물 복합제를 생산할 경우에는, 3-30 mg정도를 1 kg의 여타 성분(소의 제1위 내용추출물, 각종 소화효소)에 첨가하여(3-30 ppm, w/w) 1 kg의 최종제품을 만들 수 있게 된다. 저장 또는 유통 중의 생존율 감소를 감안하더라도 100 ppm 이하의 미량만 사용하여도 사료첨가제의 적정 생균수를 얻을 수 있을 것이다.

결론적으로 혈장을 이용하여 저렴하게 배지를 제조, 유산균을 배양함으로써 경제성이 확보되는 한편, 동결건조에 의한 제제화 과정에서 혈장 단백질 성분의 안정화 효과와 함께 안정제로 선발된 sucrose에 의해 생균수가

최대  $3 \times 10^{10}$  CFU/g인 우수한 제제가 생산될 수 있다는 실험결과로부터, 도축 폐혈액을 이용한 probiotics의 생산은 폐자원의 고부가가치화라는 의미는 물론, 새로운 고급 사료첨가제의 경제적인 생산이 충분히 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 요 약

본 연구는 도축 폐기물인 가축혈액의 이용을 위해 사료첨가제로서 혈분 성분이 함유된 유산균 probiotics의 생산을 목적으로 하여 수행되었다. 혈액으로부터 얻은 혈장을 질소원으로 이용한 BBPB 배지에, 시판 중인 미생물 사료첨가제로부터 분리된 probiotics용 *Lactobacillus* sp.를 배양하여 대조구인 MRS 배지의 74%에 이르는 높은 생균수를 얻을 수 있었다. 얻어진 배양액의 동결건조는 배양시간, 배양액의 pH 보정, 배양액의 농축, 급속동결 등의 조건에 의해 균체의 생존율이 영향을 받았으며, 24시간 배양한 배양액을 pH 6.4로 보정한 뒤 10배로 농축하여 -50°C에서 3시간 동안 동결한 후 건조하는 조건으로 최적화되었다. BBPB 배지에 잔여하는 혈장 단백질 성분은 유산균의 동결건조 안정화 효과도 가지고 있는 것으로 나타났고 그 수준은 MRS와 유사하였다. 제제화를 위한 동결건조 안정제로는 sucrose가 높은 효과를 나타내었고 10% 첨가시 48.3%의 생존율로  $3.0 \times 10^{10}$  CFU/g의 유산균 제제를 얻을 수 있었다. 본 연구에서의 동결건조조건을 이용하면 도축 폐혈액을 이용한 probiotics의 산업적 생산이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 농림수산 첨단기술개발사업에 의해 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Brennan, M., B. Wanismail, and B. Ray. 1983. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. *J. Food Protect.* **46**: 887-892.
- de Valdez G. F., G. S. de Giori, H. A. P. de Ruiz, and G. Oliver. 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* **20**: 560-566.
- de Valdez G. F., G. S. de Giori, H. A. P. de Ruiz, and G. Oliver. 1985. Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1339-1341.
- Dive, D., J. M. Piot, F. Sannier, D. Guillochon, P. Charet, and S. Lutrat. 1989. Use of hemoglobin enzymic hydrolysates, prepared on a pilot-plant scale, as a nitrogen

- source for the cultivation of three species of Tetrahymena. *Enzyme Microbiol. Technol.* **11**: 165–169.
5. Drepper, G. and K. Drepper. 1979. A method of manufacturing new protein products from animal blood for food and feed use. *Fleischwirtschaft* **59**: 1252–1258.
  6. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365–378.
  7. Gilliland, S. E. and M. L. Speck. 1977. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products *J. Food Protect.* **40**: 760–762.
  8. Halasz, A., F. Mietsch, J. Feher, I. Szalma, E. Greskovits, I. Farkas, L. Fal, and I. Illes. 1984. Process for preparations of protein compositions for use in the food industry. *PCT Int. Appl. WO* 8403,202.
  9. Hald-Christensen, V., J. Adler-Nissen, and H.S. Olsen. 1979. Method for preparing a food material from blood. *U.S. patent* 4,262,022.
  10. Hong, S. S., W. J. Kim, S. K. Cha, and B. H. Lee. 1996. Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 128–131.
  11. Hyun, C. K. and H. K. Shin. 1997. Utilization of animal blood proteins as nitrogen sources for the cultivation of lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 218–223.
  12. Kim, H. S. 1988. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cul. Dairy Prod. J. Aug.*: 6–9.
  13. Kim, T. H. 1994. Developments of pharmaceuticals using lactic acid bacteria. *Bioindustry News* **7**: 28–35.
  14. Knapp, F. W., R. H. Schmidt, W. J. Mauldin, and E. M. Ahmed. 1978. Evaluating cheese-like emulsions from animal blood proteins and whey solids. *J. Food Protect.* **41**: 257–258.
  15. Koch, A. R. 1994. Growth measurement, pp. 248–277. *In* P. Gerhardt. (ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM, Washington.
  16. Ledward D. A. and R. A. Lawrie. 1984. Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **34B**: 223–228.
  17. Ockerman, H. W. and C. L. Hansen. 1988. Blood utilization, pp. 233–255. *In, Animal By-Product Processing*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
  18. Park, H. K. and 15 authors. 1994. The past and present of meat utilization, pp. 24–25. *In, The Science and Utilization of Meat*, Seon-Jin Publishers, Seoul.
  19. Stampf, G., M. Jelinek-Nikolics, A. Nagykalai, M. Raskai, and Z. Tobel. 1986. Experimental production of tablets from lyophilized lactobact, a preparation containing cultures of various *Lactobacillus* strains. *Acta Pharm. Hung.* **56**: 3–7.
  20. Technical insights, Inc. 1994. Enzymes and microbes in feeds, pp. 141–146. *In, Biomarkets*, Technical insights, Inc., Fort Lee.
  21. Tsvetkov, T. and R. Brankova. 1983. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* **20**: 318–323.
  22. Tybor, P. T., C. W. Dill, and W. A. Landmann. 1975. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *J. Food Sci.* **40**: 155–159.
  23. Yoon, S. S., H. O. Lee, and J. H. Yu. 1986. Effects of the mixture of some amino acids on the freeze-drying and preservation of *Lactobacillus casei* YIT9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 421–426.
  24. Yoshikawa, M. and H. Chiba. 1991. Bioactive peptides from food proteins. *Kagaku to Seibutsu* **29**: 454–458.

(Received January 12, 1998)