

乳酸菌의 凍結保存에 관한 研究

姜國熙, 李載英, 朴勇河, *白永振
成均館大學校 農科大學 酪農學科, *韓國 야쿠르트 研究所
(1981년 12월 28일 수리)

Studies on Frozen Storage of Lactic Acid Bacteria

Kook Hee Kang, Jai Young Lee, Yong Ha Park and Young Jin Baek*

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University,

*Han Kuk Yakult Institute for Microbiological Research

(Received December 28, 1981)

Abstract

Three common species of lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Streptococcus lactis* were tried to store in frozen state for various periods up to four months and their stabilities during the storage were evaluated. A needle of culture suspension was transferred to 10 ml of 10% reconstituted skim milk and frozen immediately.

After storage under said conditions the storage tubes were thawed and incubated under optimum growth temperatures for 48 hours after which plate counts and acidity determinations were made. The same incubation and analyses were repeated with organisms transferred from the previous culture tubes.

No significant deterioration in both survival and acid producing activity were observed during the four month storage except that some decrease in acid forming by *L. bulgaricus* appeared after 60 days of storage. Among the three species tested *L. casei* was found to be most stable and the fast was reconfirmed with scale-upped fermentation experiments using the same organism.

序 論

유산균을 유제품제조에 이용하는 생산공장에서, 그 種菌의 생리특성이 변화하지 않도록 보존해 나가는 기술은 제품의 품질관리를 위하여 매우 중요한 것이다. 현재, 공장에서 유산균을 보존하는 방법은 멸균탈지유에 종균을 접종하여, 적온에서 응고할때까지 1~2일간 배양, 이것을 냉장고(2~7°C)에 보존하면서 1~2주일에 1회씩 계대하고 있다. 川島⁽¹⁾ 등에 의하면, 이러한 방법으로 장기간에 걸쳐, 종균을 취급하면, 계대배양의 회수가 많아져, 오염의 기회가

높아지고, 또, 배지 원료유의 신선도와 조성의 차이, 배양온도와 시간의 차이, 배양환경의 불균일 등에 의하여, 종균의 활성이 자연히 약해진다고 하였다.

菌株의 장기보존법으로서, 凍結乾燥法과 低溫凍結法이 이용되고 있다. 森地^(2,3,4)는 凍結乾燥時에 세포보호물질을 첨가하여, 시험하였고, Stadhouders⁽⁵⁾ 등은 mother starter의 菌체를 농축하여 동결건조하고 2.6~10×10¹⁰/g(생존율 31~60%)의 분말을 얻었으며, 矢野⁽⁶⁾ 등은 탈지유에 균체를 희석하여 동결건조하면 균의 생존율이 높아진다고 하였다. 또한, 凍結法에 대

해서도 Heinemann⁽⁷⁾은 glycerin을 첨가하여 0°C 이하에서 보존하면 活力보존에 좋다고 하였고, 川島^(8,9,10) 등은 *L. bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. thermophilus*의 동결보존을 시험하였고, Simmons and Graham⁽¹¹⁾은 멸균탈지유 99ml에 유산균배양액 1 ml를 접종하여 凍結保存시험을 하였고, Mocquot and Hurel⁽¹²⁾은 -30°C에서 유산균을 7~8개월 보존할 수 있다고 하였으며, Baumann and Reinbold⁽¹³⁾는 -196°C에 치즈 Starter를 동결보존한 결과 活性이 감소되지 않았다고 하였다.

Waes⁽¹⁴⁾에 의하면, 芳香性菌인 *Leuc. cremoris*와 *Str. diacetilactis*를 -20~-30°C에 보존하는 경우, 4개월이 한계이며, -196°C에서는 더욱 좋은 성적을 얻었다. 金^(1,5)은 *L. bulgaricus*와 *Str. lactis*의 배양균액을 그대로 동결보존하는 경우보다, 균체를 세척하여 washed cell로서 동결보존하는 것이 酸生成力이 양호하다고 하였다.

저자는 우리나라에 널리 보급되어 있는 냉장고의 凍結庫에서 유산균을 동결보존하는 실용적인 간이동결법을 검토하였기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

시험균 :

当研究室에 보존중인 *Lactobacillus casei* SK-1, *Lactobacillus bulgaricus* SK-2, *Streptococcus lactis* SK-3를 사용하였다.

시험균의 배양

시험균을 실험에 사용하기 위하여, 10% 멸균 환원탈지유에 접종하여 유산균은 37°C, 유산구균은 30°C에서 약 42시간 배양하였다.

동결용 배지

10% 환원탈지유를 Screw cap 시험관(13×1.5 cm)에 10ml씩 分注하여 autoclave에서 121°C 15분간 멸균한 것을 사용하였다.

동결법

시험균을 동결용배지에 1白金耳씩 접종하여

Table 1. Effect of Suspending Medium on the Survival of *L. bulgaricus* during Frozen Storage for 7 days.

Suspending medium	Survival rate (%)*
Control (distilled water)	1.00
5% lactose	49.32 ± 8.76
5% peptone	61.74 ± 20.28
10% skim milk	94.73 ± 14.12

* survival rate means the ratio of the number of living cells before frozen to survival cells after 7-day frozen storage

즉시, 냉장고의 동결고(-15~-20°C)에서 4개월간 동결하였다.

融解배양시험

동결시험균을 적온에서 48시간 배양하고, 이것을 용해후 1代로 하였다. 이것을 다시 신선한 10% 환원탈지유 10ml에 1백금이 접종하여 적온에서 48시간 배양한 것을 용해후 2代로 하여, 산도와 생균수를 측정하였다.

酸度측정

生菌數측정은 姜⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 실시하였다.

結果 및 考察

凍結用培地の 선정시험

유산균의 동결분산매로서 탈지유가 매우 효과적이라는 것이 인정되어 있다. 즉, Rundnik⁽¹⁷⁾ 등은 cheese-starter 배양액의 동결보존에 16%의 환원탈지유를 사용하였고, 川島⁽¹⁵⁾ 등은 5~15%의 환원탈지유를 사용한 결과, 乳固形分含量이 높을수록 생존율이 높았다고 하였다. 著者는 동결용배지를 선정하기 위하여, 증류수, 5% 유당용액, 5% peptone 용액, 10% 환원탈지유를 사용하여 *L. bulgaricus* 배양액을 1백금이씩 희석하여 7일간 냉장고의 동결고에 동결시켰다가 생존율을 조사한 결과 표 1과 같이 10%탈지 환원유의 경우가 동결전 생존수에 대한 동결후 생존균수의 비율이 약 95%로서 최고효과를 나타내었으므로, 본 실험에도 이 조건을 이용하였다.

동결용시험균의 접종량

시험균의 동결에 있어서 菌과 共存하는 대사노폐물 특히 乳酸의 有害作用을 감소시키기 위하여 동결용배지 10ml에 시험균배양액 1白金耳를 접종희석하였다. 배양균액 1白金耳의 重量은 약 $0.0048 \pm 0.0011g$ 으로서, 동결용배지의 약 $\frac{1}{2000}$ 을 접종한 것이 되며, 접종후의 균의 농도는 1ml당 10^5 개 정도였다. 白金耳로 접종하는 것이 피펫으로 접종하는 것보다 오염의 기회가 적고 편리하였다. 접종량의 차이가 酸生成에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시험한 결과는 그림 1과 같다. 즉, *L. bulgaricus*의 탈지유배양균액 1白金耳, 1ml, 5ml를 10% 멸균환원탈지유 10ml, 9ml, 5ml에 각각 혼합하여 37°C에서 배양한 것인데, 배양 2일째부터는 접종량의 多小에 관계없이 산도가 거의 동일한 수준으로 증가하였다. 이러한 실험결과는 Cardwell and Martin⁽¹⁸⁾이 Cottage cheese starter의 접종량시험에서 1~10%의 접종량범위에서는 차이가 없었다고 하는 내용과 일치한다. 따라서 본 실험에서는 접종량

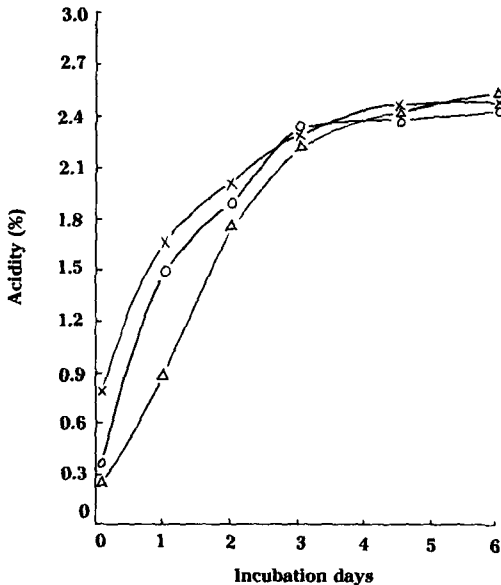


Fig. 1. Effect of Inoculum size on the Development of Acidity by *L. bulgaricus* in 10% Reconstituted Skim Milk.

- △ -, 1 loop inoculation to 10 ml skim milk.
- ○ -, 1 ml inoculation to 9 ml skim milk.
- x -, 5 ml inoculation to 5 ml skim milk.

을 최소로 하기 위하여 1白金耳로 하였다.

시험균의 10%탈지유에서 酸生成

본 실험에 사용한 시험균의 10% 탈지유에서의 酸生成은 그림 2와 같다. 여기서 *L. bulgaricus*는 배양 5일째에 최고산도를 나타냈으며, 약 2.81%였고, *L. casei*는 6일째에 최고산도 1.30%, *Str. lactis*는 배양 1일째에 최고산도 0.85%였고, 그 이후에는 거의 변화가 없었다.

凍結保存 후의 活性변화

본 실험은 유산균의 活性을 장기간 보존하는 것을 목적으로 한다. 유산균의 活力이 어느 정도로 유지 되어야 생산용 종균으로 활용할 수 있는냐 하는 문제는 한마디로 말하기 어렵지만, 본 실험에서는 对照菌(凍結하지 않고, 5°C 냉장고에서 1~2주일에 1번씩 계대하는 균)의 活性과 비교하여 95% 이상을 유지하였을때 活性이 높은 生産用種菌으로 가정하였다.

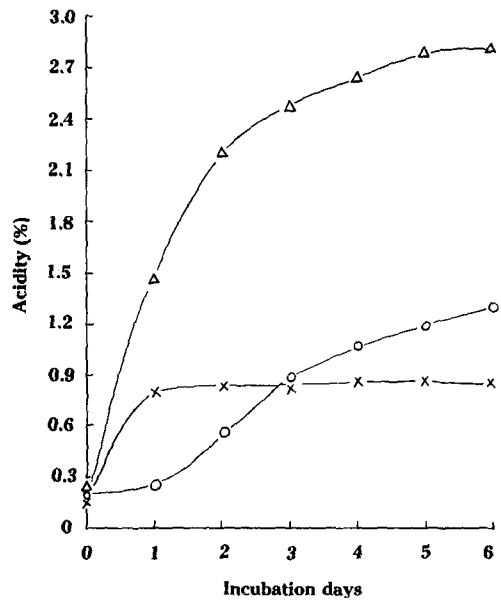


Fig. 2. Development of Acidity in 10% Reconstituted Skim Milk by *L. bulgaricus* at 40°C (△), by *L. casei* at 37°C (○), and by *Str. lactis* at 30°C (x).

시험균의 동결보존에 의한 활성변화는 生菌數와 酸生成力을 측정하여 对照菌의 것과 비교 표시하였다. 적온에서 48시간 배양한 동결시험균을 용해후 1代로 하고, 용해후 1代의 배양액 1白金耳를 10% 멸균환원탈지유 10ml에 접종하여 適溫에서 48시간 배양한 것을 용해후 2代로 하였다. 그 결과, 試驗菌의 活性은 凍結保存 기간이 길어짐에 따라 감소하는 현상이 시험균의 종류별로 다르게 나타났으며 어떤 것은 对照菌보다 약간 높게 나타난 것도 있었다.

전체적으로 볼 때, 용해후 1代보다 용해후 2代째에 活性의 증가가 나타났으나, 시험균의 종류에 따라서 큰 차이가 있었다.

*L. casei*의 동결후 활성변화는 그림 3에 나타난 것과 같다. 즉 용해후 1代의 生菌數 log值는 对照菌이 9.44였으며, 전체의 동결기간 동안 거의 변화가 없었고, 120일째에는 对照菌의 98.74%의 活性을 나타내고 있었으며, 용해후 2代째에는 더욱 증가하여 동결 120일째에 99.8%의 活性을 나타내었다. 그리고 산도에 있어서 融解

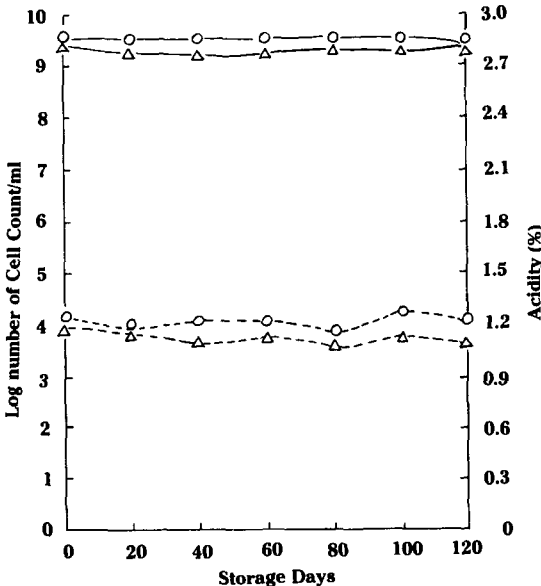


Fig. 3. Effect of Length of Frozen Storage on Survival and Acid Production by *L. casei*.

- Δ - Viable cells of 1st culture after thawing;
- ○ - Viable cells of 2nd culture after thawing;
- ... Δ ... Acidity of 1st culture after thawing; and
- ... ○ ... Acidity of 2nd culture after thawing.

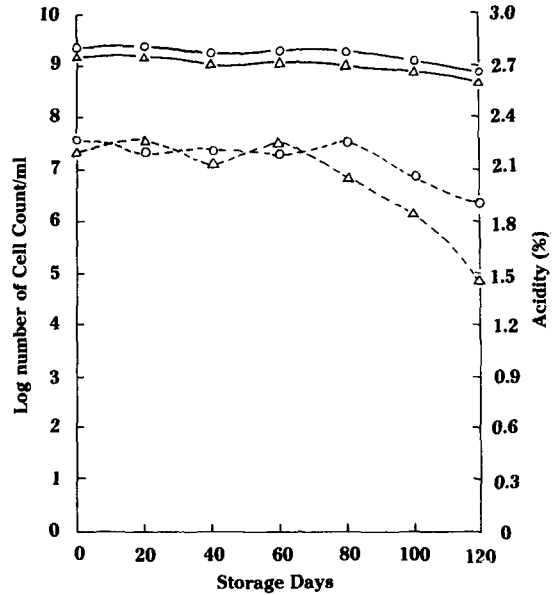


Fig. 4. Effect of Length of Frozen Storage on Survival and Acid Production by *L. bulgaricus*.

- Δ - Viable cells of 1st culture after thawing;
- ○ - Viable cells of 2nd culture after thawing;
- ... Δ ... Acidity of 1st culture after thawing; and
- ... ○ ... Acidity of 2nd culture after thawing.

後 1代는 동결기간이 지남에 따라 약간씩 감소하여 120일째에는 对照菌의 91.41%에 상당한 活性을 나타내었고, 이것이 融解後 2代째에는 98.31%로 회복되었다. 따라서 *L. casei*는 凍結에 대하여 매우 安定한 것으로 나타났다.

그러나, *L. bulgaricus*의 경우를 보면 그림 4와 같다. 融解後 1代의 生菌數는 凍結 기간에 따라 약간씩 감소되었고, 凍結 120일째에는 对照菌에 비하여 94.84%의 活性을 유지하였으며, 融解後 2代째에는 전반적으로 生菌數가 증가하여 凍結 120일째에는 对照菌 活力의 95.51%를 유지하였다. 그러나 酸도에 있어서 融解後 1代는 凍結 60일부터 급격한 감소현상이 나타나서, 凍結 120日에는 对照菌의 67.18%였으나, 融解後 2代에는 凍結 60日 以後부터 酸生成力의 회복이 현저하였고 凍結 120日에는 对照菌 活性의 84.80%를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, *L. bulgaricus*는 凍結에 의하여 生菌數의 감소보다는 酸生成力에 더 큰 장애를 받는다는 것을 알

수 있었다. 그러므로 *L. bulgaricus*의 凍結時에는 특별한 보호물질을 고려할 필요가 있다고 본다.

유산구균 *Str. lactis*는 그림 5에 나타난 것과 같이 용해후 1代의 生菌數는 동결기간이 경과함에 따라 약간씩 감소하여 동결 120일에는 对照菌 活性에 85.92%를 유지하였고, 이것이 용해후 2代에는 매우 安定한 活性을 나타내었으며, 동결 120일째에는 对照菌 活性의 99.50%를 나타내었다. 산도에 있어서, 용해후 1代는 동결기간의 경과에 따라서 점차 감소하며, 120일째에 91.07%의 活性을 나타내었고, 용해후 2代에는 95.85%로 회복되었다.

위에서 설명한 3 종류의 시험관 중에서 동결에 대하여 가장 安定한 것은 *L. casei*였으며, *Str. lactis*는 계대에 의한 活性회복이 매우 양호하였다. 그러나 *L. bulgaricus*는 凍結에 비교적 약한 것으로 보여지며, 生菌수보다 酸生成力의 회복이 크게 지연되는 것으로 나타났다. 이 결과는 川島⁽¹⁹⁾ 등의 내용과 일치하였다.

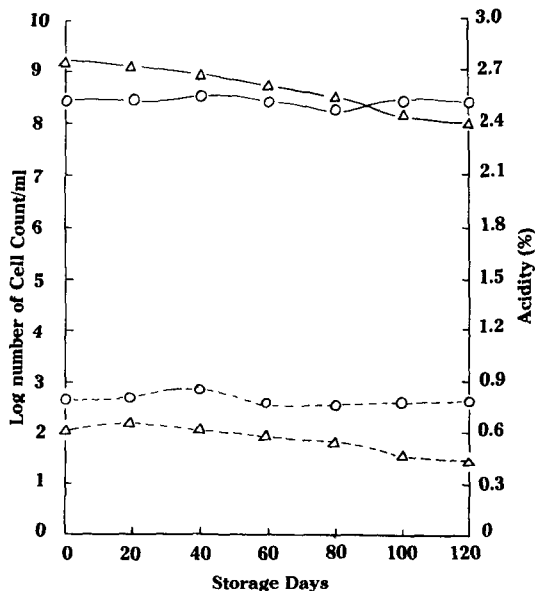


Fig. 5 Effect of Length of Frozen Storage on Survival and Acid Production by *str. lactis*

—△—, Viable cells of 1st culture after thawing;
 —○—, Viable cells of 2nd culture after thawing;
 ...△..., Acidity of 1st culture after thawing; and
 ...○..., Acidity of 2nd culture after thawing.

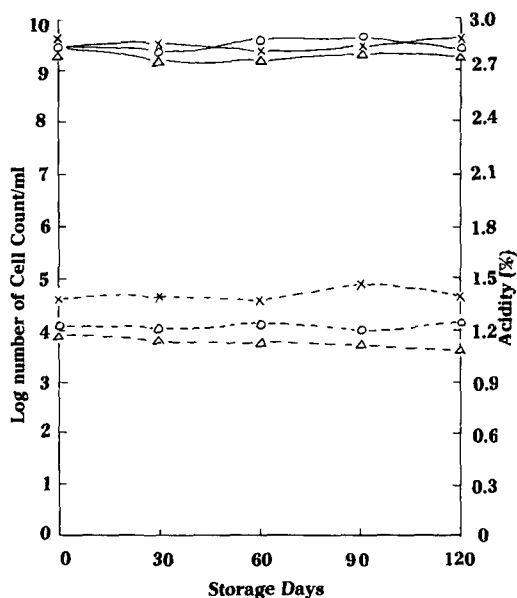


Fig. 6. Effect of Length of Frozen Storage on Survival and Acid Production by the Starter Cultured of *L. casei*.

—△—, Viable cells of mother starter;
 —○—, Viable cells of culture starter;
 —x—, Viable cells of seed starter;
 ...△..., Acidity of mother starter;
 ...○..., Acidity of culture starter; and
 ...x..., Acidity of seed starter.

이러한 凍結菌株를 사용하여 발효유의 starter 제조 시험을 실시한 결과는 그림 6과 같다. starter 제조에는 *L. casei*를 사용하였으며, 凍結菌株를 mother starter로서 사용하여 37°C에서 48시간 배양하고, 이것을 1000ml의 10% 멸균환원탈지유에 1ml 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 것을 culture starter로 하였고, 이것을 다시 5l의 seed starter에 점차 확대 배양하여 각 starter의 生菌수와 산도를 측정하였다.

각 단계의 starter에 있어서 동결기간에 따른 生菌수의 변화는 나타나지 않았으며, 동결 120일째에도 각 starter의 生菌수는 对照菌의 活性에 비하여 mother starter가 98.51%, culture starter가 99.75%, seed starter가 99.51%로서 실제의 生菌數는 각 starter 모두 10⁹/ml 이상을 나타내었다.

산도에 있어서는 mother starter의 경우 凍結

120일째에는 对照菌 活性의 91.16%를 나타냈으나, culture starter와 seed starter에서는 对照菌의 活性을 초과하여 culture starter가 100.45%, seed starter가 102.9%로서 生産用 starter로서 충분한 活性을 나타내었다.

이와 같이 유산균의 탈지유 배양액을 白金耳로 탈지유에 2000배 희석하여 동결 보존하는 것은 種菌의 계대회수를 줄이고, 同時에 오염의 기회를 제거하면서 活性을 유지해 나가는 방법으로 매우 간편한 방법으로 인정되었다.

本試驗에서 3종류의 유산균만을 사용하였지만, 다른 종류의 유산균도 凍結 과정에서 이와 같은 현상을 나타낼 것인지는 별도로 검토해야 하며, 동결기간의 경과에 따라 活性이 감소되는 경우에는 그것을 방지할 수 있는 세포보호 물질의 검토도 이루어져야 할 것이다.

要 約

乳酸菌의 凍結保存에 있어서 活性변화를 試驗하고, 乳酸菌을 種菌으로 사용하는 生産工場등에서 種菌의 活性이 감소되지 않고 장기간 보존할 수 있는 방법을 검토하였다.

10% 환원탈지유 10ml에 前培養한 試驗菌液을 1 白金耳 접종하여 냉장고의 凍結庫에 4개월간 저장하면서 starter로서의 活性을 측정하기 위하여 融解後 1代와 融解後 2代로 구분하였다.

凍結菌株를 適溫에서 48시간 배양한 것을 融解後 1代로 하고 이것을 10% 멸균환원탈지유 10ml에 계대배양한 것을 融解後 2代로 하였다.

本實驗의 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *L. casei*는 凍結保存에 대하여 매우 安定하며 凍結 120일간의 生菌수와 산도에 있어서, 각각 99.88%, 98.93%의 活性을 유지하였다.

2. *L. casei*의 融解後 2代의 凍結菌株를 발효유의 mother starter로 사용하여 culture starter, seed starter를 제조한 결과 凍結 120일째의 것도 충분한 活性度를 나타내었다.

3. *L. bulgaricus*는 凍結기간의 경과에 따라 生菌數보다 酸生成力의 감소현상이 크게 나타났으나 融解後 2代에는 회복되어, 120일째의 酸度가 96.20%를 유지하였다.

4. *Str. lactis*의 融解後 2代는 동결 120일째에 生菌수와 산도가 对照菌에 비하여 99.50%, 96.63%를 나타내었다.

参考文献

- 1) 川島拓司·兒玉輝子·前野正久(1963) 日畜會報 **34(3)**: 218-221.
- 2) 森地敏樹(1973), 酪農科學の研究 **22(4)** A 125-136.
- 3) 森地敏樹(昭和 42), 畜産試驗場年報 193-203
- 4) 森地敏樹(1971) 乳技協資料 **21**: 3-13.
- 5) Stadhouders, J., L.A. Jansen and G. Hup: Neth. Milk Dairy J., **23**, (182) (1969)
- 6) 矢野信礼, 森地敏樹, 入江良三郎, 見坊實: 日本農化, **34**, 1046 (1960)
- 7) Heinemann, B. (1958). J. Dairy Sci. **43(6)**: 705.
- 8) Cardwell, J.T. and J.H. Hartin (1956). J. Dairy Sci **42(2)**: 388-389.
- 9) 川島拓司·前野正久(1964) 日畜會報 **35(1)**: 55-59.
- 10) 川島拓司·前野正久(1964) 日畜會報 **35(3)**: 178-184.
- 11) Simmons, J.C. and D.M. Graham(1958).
- 12) Mocquot, G. and C. Hurel(1970), J. Soc. Dairy Technol **23**: 130.
- 13) Baumann, D.P. and G.W. Reinbold(1964). J. Dairy Sci. **49**: 259-264.
- 14) Waes, G.(1970). Revue Agric., Brux **23**: 1097
- 15) 金光洙(1978): 建國大學校大學院碩士學位論文.
- 16) 姜國熙(1981): 成大科學技術研究 **9**: 181-187.
- 17) Rundnik, A. W. and W.E. Glenn(1960). J. Dairy Sci. **43(6)**: 845.
- 18) Cardwell, J.T. and J.H. Hartin(1956). J. Dairy Sci. **42(2)**: 388-389.
- 19) 川島拓司·兒玉輝子·前野正久(1963): 日畜會報 **34(4)**: 288-293.