pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 3, pp. 121~128 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.3.121

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Review

식중독 원인 미생물 장기 보존 방법에 대한 고찰

김유진[1] · 김수민[1] · 김소연[1] · 윤요한[1,2]*
[1]숙명여자대학교 식품영양학과
[2]숙명여자대학교 위해분석연구센터

Review on Long-Term Preservation Methods for Microorganisms Causing Foodborne Diseases

Yujin Kim[1], Soomin Kim[1], Soyeon Kim[1], Yohan Yoon[1,2]*
[1]*Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea*
[2]*Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea*

(Received January 10, 2022/Revised May 26, 2022/Accepted May 27, 2022)

ABSTRACT - The rapid development of biotechnology has increased the importance of microorganisms or their genetic information. Thus, the Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization was established, and countries are working to secure industrially and academically useful bioresources to deal with the agreement. In the case of Korea, because 67% of bioresources are imported from abroad, we are required to secure domestic bioresources as well. The number of isolated foodborne illness-causing microorganisms is predicted to invrease based on the incresing number of outbreaks of foodborne illness each year. Consequently, appropriate long-term preservation methods are necessary to secure the isolated microorganisms for the purpose of research and resourcification. Therefore, the long-term preservation methods for bacteria, fungi, viruses, and protozoa were investigated in this study, from domestic and international bioresource banks, and the functions of the cryoprotectants were reviewed and discussed. This review should be informative in the preservation of microorganisms and contribute to the development of biotechnology.

Key words: Long-term preservation, Microorganism, Cryoprotectant, Foodborne illness

생명공학 기술의 급속한 발전으로 미생물을 비롯한 유전자원에 대한 중요성이 부각되고 있다. 이에 따라, 유전자원의 이용에 관한 각국의 이해관계에 대립이 발생하면서 '유전자원의 접근과 이용 시 발생하는 이익에 대한 공정하고 공평한 공유'에 관한 나고야의정서가 2010년 채택된 바 있다. 나고야의정서가 채택되면서 생물자원을 이용하고 고부가가치화하는 모든 분야에서 국외 생물유전자원의 국내 반입 시 원산국의 사전통보승인을 받고 이익 공유방법 및 절차에 대한 계약을 체결하며, 로열티를 지불하는 등 자원 확보 및 이용에 영향을 받게 되었다[1]. 이에 대응하기 위해서 각국에서는 산업적, 학술적으로 유용한 생물유전자원을 확보하고 있다. 특히 국내에서 생물자원 사용량 중 67%가 수입에 의존하고 있어[2], 해외 의존도를 낮추기 위해 국가적, 범부처 차원의 생물자원 확보가 요구되고 있다.

매해 지속적으로 식중독이 발생하고 있고[3], 이에 따라 보유 식중독 균주는 증가할 것으로 예상된다. 국내에서는 식품의약품안전처에서 국내 식중독 분리 균주를 자원화하고 식중독 원인 조사 등의 연구 목적으로 확보하고 있다. 식중독 균주의 해외 의존도를 낮추기 위해 연구자의 기탁 및 연구를 통한 균주의 양적 수집이 필요하나, 무엇보다 자원의 최적 보존 상태 확보 등 질적 수준이 마련되어야 한다.

국내에 대표적으로 식중독 세균과 같은 병원체를 다루는 균주 보존기관으로 질병관리청의 국가병원체자원은행(National

*Correspondence to: Yohan Yoon, Department of Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea
Tel: +82-2-2077-7585, Fax: +82-2-710-9479
E-mail: yyoon@sookmyung.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Culture Collection for Pathogens; Cheongju-si, Republic of Korea, NCCP), 한국생명공학연구원의 생물자원센터(Korean Culture for Type Cultures, KCTC; Jeongeup-si, Republic of Korea), 국립농업과학원 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection; Wanju-gun, Republic of Korea, KACC)이 존재한다. 국가병원체자원은행은 '병원체자원의 수집·관리 및 활용 촉진에 관한 법률' 제8조에 의해 설치 및 운영되어 병원체를 확보하고 자원화, 관리, 분양하는 업무를 수행한다. 또한 병원체 자원의 다양성 및 전문성을 고려하여 병원체 자원 별로 수집 네트워크를 구축하고 병원체자원전문은행으로 지정하여 병원체 자원을 효과적으로 관리하고 있다. 국가병원체자원은행은 2021년 기준으로 세균 4,875주, 곰팡이 481주, 바이러스 390주, 파생물질 1,489개 자원을 보유하고 있다[4].

생물자원센터는 미생물 자원의 확보, 보존 및 국내외 분양, 생물자원의 배양 및 보존과 관련하여 연구 인력을 교육하는 업무를 수행한다. 최근에는 질병치료, 미생물치료제제, 인체공생미생물, 프로바이오틱스 소재 등 고부가가치 창출을 위한 생물자원을 확보하고 있다[5]. 생물자원센터에서는 세균, 곰팡이, 바이러스 뿐만 아니라 효모, 식물세포주, 동물세포주, 미세조류, 고세균, 플라스미드 등의 생물자원도 보유하고 있다. 2021년 기준으로 세균 7,668주, 곰팡이 1,695주, 효모 511주, 식물세포주 733주, 미세조류 244주, 동물세포주 53주, 고세균 33주, 플라스미드 156개의 다양한 생물자원을 보유하고 있다[6].

국립농업과학원 미생물은행은 다양한 농식품미생물을 산업, 연구, 교육적으로 이용하기 위해서 미생물 자원을 수집하고 동정, 장기보존 및 정보화 하는 업무를 수행한다[7]. 보존하고 있는 생물자원은 세균, 곰팡이가 주를 이루며 이외에 효모, 방선균, 버섯, 유전자를 보유하고 있다. 2021년 기준으로 세균 11,815주, 곰팡이 13,510주를 보유하고 있다[8].

본 총설에서는 국내외 균주은행에서 사용하고 있는 미생물별(세균, 곰팡이, 원충, 바이러스) 최적의 보존 방법과 보존 시 사용되는 동결보호제의 역할 및 기능에 대해서 알아보고자 한다.

본 론

국내외 균주은행의 식중독 원인 미생물 보존 방법

본 총설에서는 미생물 중 식중독 원인 미생물로 조사된 세균, 곰팡이, 원충, 바이러스를 대상으로 장기 보존 방법을 조사하였다. 국내 균주은행은 국가병원체자원은행, 생물자원센터, 국립농업과학원 미생물은행을 조사하였으며, 국외 균주은행은 미국 유전자은행(American Type Culture Collection, ATCC; Virginia, USA), 독일 생물자원센터(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ; Braunschweig, Germany), 영국 국립표준배양균주보관소(NCTC, National Collection of Type Culture; Salisbury, UK), 영국 국립병원성바이러스은행(National Collection of Pathogenic Viruses; Salisbury, UK, NCPV), 영국 국립병원성진균은행(National Collection of Pathogenic Fungi; Bristol, UK, NCPF)을 대상으로 미생물 보존 방법을 조사하였다.

세균

국내외 균주은행에서는 모두 공통적으로 세균을 동결보존 및 액체질소 보존, 동결건조 방법으로 보존하고 있다. 동결보존은 동결보호제와 함께 균체를 멸균된 stock vial (cryotube) 또는 스트로(straw)에 무균적으로 넣고 -80°C의 초저온 냉동고(deep freezer) 및 -196–-150°C의 액체질소에 보존하는 방법이다. 동결보존 시 사용되는 동결보호제는 주로 glycerol을 사용하며, 미국 ATCC와 독일 DSMZ는 glycerol과 함께 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 동결보호제로서 사용하고 있다[9,10].

동결건조 방법은 균체와 동결보호제를 혼합한 뒤 멸균된 앰플(ampoule) 튜브에 넣고 -80°C 초저온 냉동고에 동결시킨 뒤, 동결건조기를 이용하여 건조시켜 4°C (2–8°C) 냉장 조건 및 암실에서 보존하는 방법이다. 동결건조 시에는 동결보호제로서 공통적으로 skim milk를 사용하고 있다. NCCP는 10% skim milk에 5% inositol을 혼합하여 사용하고 있으며[11], KACC에서는 12% skim milk를 단독으로 사용하거나, 12% skim milk에 7% trehalose를 혼합하여 사용하고 있다[7]. 국외에서는 미국 ATCC의 경우, 10% BSA (bovine serum albumin) 또는 20% sucrose medium을 사용하며[10] 독일 DSMZ에서는 10% skim milk 단독 또는 10% skim milk에 5% sodium glutamate를 혼합하여 사용한다[9]. 영국 NCTC에서는 5% inositol에 horse serum을 혼합하여 사용하고 있다.

일반적으로 실험자가 균주를 용이하게 생장시킬 수 있는 균주의 경우에는 위의 방법과 함께 동결보호제를 사용한다. 하지만 *Vibrio*종이나 *Campylobacter* 종, *Clostridium perfringens*가 장기 보존이 어려운 것으로 알려져 있어 일부 균주은행에서는 해당 균주에 대한 보존 최적 조건을 설정하고 있다. *Vibrio* 종의 경우, NCCP에서는 '병원체 맞춤형 최적 장기보존법 개발(2020)' 연구를 통해 5% inositol을 동결보호제로 사용할 때 *Vibrio*종의 재생률이 높은 것으로 나타나, 이를 동결건조 보존제로 사용하는 것을 제시하고 있다[12]. *Campylobacter* 종은 미국 ATCC에서도 배양이 까다로운 세균(fastidious bacteria)으로 따로 분류하고 있으며, 보존 중 손상에 민감하여 동결건조 시 균주를 안정화하기 위해 동결 전에 현탁배지에 0.5% sodium ascorbate를 첨가하여 사용하고 있다[10].

곰팡이

국내외 균주은행에서는 곰팡이를 액체질소 보존, 동결건조 방법으로 보존하고 있다. 곰팡이의 경우 세균과는 다르게 고체배지에서 균주를 키운 채로 포자 현탁액을 사용하여 동결보호제와 함께 stock vial에 넣어 동결한다. 또는 고체 배지 위의 균체를 코르크보러(cork borer)를 사용하여 균주가 활발히 자라는 가장자리 부위를 떼어내 플러그 agar (plug agar, 동그랗게 작은 조각으로 잘라낸 agar)로 만들고 이를 스트로(straw)에 채워 넣어 액체질소 보존, 동결 건조하는 방법을 사용하고 있다. KACC에서는 곰팡이의 장기보존법으로 액체질소 동결보존 방법과 동결건조 방법을 우선적으로 고려하여 보존한다[7]. 포자를 형성하는 곰팡이는 동결건조, 액체질소 동결보존법으로 보존 가능하나, 포자를 형성하지 않는 곰팡이는 동결건조 보존이 불가능하여 액체질소 보존방법과 함께 중기보존법(냉동고 보존법, 계대배양보존법, 물보존법, 광유보존법)으로 보존한다[7]. 식중독 원인 곰팡이인 *Penicillium* 종, *Fusarium* 종, *Aspergillus* 종은 포자를 형성하므로 액체질소, 동결건조 방법으로 보존한다.

동결 보존 시 -196–-150°C의 액체질소에 보존한다. 동결보존 시 사용되는 동결보호제는 주로 10% glycerol이나 DMSO를 사용한다. 동결 건조 시에는 세균과 마찬가지로 동결건조기를 이용하여 건조시켜 4°C (2–8°C) 냉장 조건 및 암실에서 보존한다. 이 때 사용되는 동결보호제는 주로 skim milk이며, skim milk를 단독으로 사용하거나 다른 물질을 혼합하여 사용한다. NCCP의 경우 10% skim milk에 5% inositol을 혼합하여 사용하며[11] KACC는 12% skim milk 단독으로 사용하거나 12% skim milk에 7% trehalose를 혼합하여 사용하고 있다[7]. 미국 ATCC에서는 20% skim milk를 단독으로 사용하고 있다[13].

바이러스

바이러스의 보존 절차는 국내외 균주은행 중 NCCP와 미국 ATCC에 마련되어 있었으며, 바이러스를 접종한 세포주의 배양액을 회수한 후 stock vial에 넣고 급속 냉동하기 위해 초저온 냉동고를 사용한 동결보존 방법을 사용하고 있다. NCCP의 경우 세균, 곰팡이와는 다르게 동결보호제를 사용하고 있지 않으며 생존력이 떨어지는 경우, 20–50% 농도가 되도록 FBS (fetal bovine serum)를 첨가하여 사용하고 있다[11]. 미국 ATCC에서는 일반적으로 바이러스의 동결 보존 시, FBS와 함께 DMSO를 첨가하거나 DMSO 대신 glycerol을 첨가한다. 특징적으로 식중독 바이러스 중 Adenovirus의 동결 보존 시, ATCC에서는 DMSO나 glycerol을 사용하지 않고 Adenovirus에 감염된 세포의 배양 배지를 그대로 stock vial에 취한 후 동결하는 방법을 제시하고 있다[14]. 반면, NCCP에는 식중독 원인 바이러스에 대한 특정적인 보존 방법이 마련되어 있지 않았다.

원충

원충은 본 연구에서 조사한 국내외 균주은행 중 미국 ATCC에서만 다루고 있었으며, 원충을 포함한 원생생물의 보존방법이 마련되어 있다[15]. ATCC에서는 원충을 장기보존 하는 경우에 액체질소 보존 방법을 사용할 것을 권고한다. 동결 건조 보존 방법은 동결하는 보존 방법에 비해 안정성이 떨어져 원충을 포함한 원생생물의 배양 및 보존 시 권장하지 않고 있다[15]. 원충 중에서도 식중독 원인이 되는 *Giardia* 종, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*의 경우에는 특정적인 보존 방법을 마련하여 제시하고 있다[15].

원생생물에서 가장 흔히 사용되는 동결보호제는 glycerol, methanol, DMSO이다. 그 중에서도 DMSO는 가장 널리 사용되고 있으며, 원생생물의 대부분 종에 사용이 가능하다[15]. DMSO의 농도는 2.5%에서 12.5%로, 종에 따라 다르게 적용된다. 식중독 원인이 되는 *Entamoeba* 종, *Giardia* 종, *Toxoplasma* 종의 동결 보존 시에는 DMSO가 각각 10%, 12%, 7.5%의 농도로 사용되고 있다[15]. *Entamoeba* 종은 10% DMSO에 3.5% sucrose와 20% heat-inactivated FBS를 첨가한 동결보호제를 사용하여 동결 보존한다. *Giardia* 종은 12% DMSO와 4% sucrose를 혼합한 동결보호제, *Toxoplasma* 종은 7.5% DMSO와 25% heat-inactivated FBS를 혼합한 동결보호제가 사용된다.

동결보호제의 역할

세균 및 곰팡이 동결보호제

세균과 곰팡이의 동결보호제는 공통적으로 사용되고 있다. DMSO, glycerol, skim milk, trehalose, inositol가 공통적으로 사용되며 세균에는 추가적으로 BSA, sodium ascorbate, sodium glutamate, FBS, sucrose가 주로 쓰이고 있다(Table 1).

DMSO는 세포독성이 낮고 경제성이 좋아 국내외 균주 은행에서 동결보호제로 많이 사용하는 물질 중 하나이다[16]. 세포의 동결점을 -73°C까지 낮춰주고, 용액 내 염 농도를 낮춰 삼투압으로 인한 스트레스를 억제한다[17]. Glycerol은 단백질 용해도를 감소시켜 구조적으로 안정성을 증가시키는 특징이 있고, 물 분자와 혼합되었을 때 낮은 온도(-37.8°C)에 도달하기 전까지 세포 바깥에 얼음 결정체가 형성되는 것을 방해하여 세포의 손상을 억제한다[16,18]. 또한 고농도의 glycerol에 노출되어도 독성이 낮은 것으로 알려져 있어 흔히 동결보호제로 사용되고 있다[16]. Trehalose는 glycerol 2개 분자로 이뤄진 화합물로, 흡습성이 높아 동결보호제로 사용되고 있다. 동결보존 과정 시 물 분자가 이동하여 세포 바깥에 얼음 결정을 형성하게 되는데 이로 인해 세포 탈수가 발생할 수 있다[19]. 탈수로 인해 발생하는 환경은 세포에 손상을 직접적으로 일으킬 수 있기 때문에 흡

Table 1. 세균 및 곰팡이 동결보호제의 역할

동결보호제	역할	출처
DMSO (dimethyl sulfoxide)	· 극성, 비극성 분자가 함께 존재하여 유기용매와 물이 쉽게 섞이도록 함. · 경제성이 좋고 세포독성이 낮아 보존제로 주로 사용되고 있음. · 상온 이하의 온도에서는 고체로 변하는 성질이 있어 동결 보존제로 적합함.	16)
	· 물과 생체액(biological fluids)의 동결점을 낮추고, 용액 내 염의 농도를 낮추어 삼투압으로 인한 쇼크(osmotic shock)를 억제함. · DMSO가 물과 혼합된 경우 최소 –73°C까지 동결점이 낮아짐.	17)
Glycerol	· Glycerol은 구조형성성(kosmotropic) 특성을 가지며 물 분자와 수소결합을 형성함. · 구조형성성 이온은 단백질의 용해도를 감소시키며 구조적으로 안정성을 증가시키는 특징이 있음.	16,18)
	· 물과 glycerol을 혼합하였을 때 매우 낮은 온도(-37.8°C)로 도달하기 전까지 얼음 결정체가 형성되는 것을 방해함.	16)
	· 고농도에서도 독성이 낮은 것으로 알려져 있음.	
Skim milk	· 흔히 사용되고 있는 동결 보호제로, 동결보존 시 1-10%의 농도로 사용됨. · 주로 동결보존보다는 동결건조 시 빈도 높게 사용되고 있음	17)
	· 동결 후 해동되었을 때 미생물의 생존능을 증가시키는 것으로 알려져 있음.	21)
Trehalose	· Glucose 2개 분자로 이뤄져 있는 화합물로, 높은 흡습성에 따라 동결 보호제로 사용되고 있음. · 무수(anhydrous) 형태의 trehalose는 즉시 수분을 머금어 수화됨. · 동결된 균주를 녹였을 때 trehalose가 기존의 동결 방법 대비 향상된 세포 생존율을 보임.	16)
Inositol	· 당알코올로, 단백질 구조를 안정화시켜 생체 내 효소 시스템이 동결로 인한 상해(cryo-damage)를 입지 않도록 함.	32)
	· 진핵생물, 원핵생물의 세포막에 분포되어 있으며, 삼투압 균형에 관여하는 것으로 알려져 있음.	33)
BSA (bovine serum albumin)	· 표면상에서 이온성을 갖는 단백질임. · 강하게 수화층(hydrating water layer)과 결합되어 DMSO로부터 직접적으로 세포가 닿지 않도록 하는 역할을 함.	23)
	· DMSO는 극성을 가져 수소결합이 용이하고 상대적으로 작고 조밀한 구조를 가져 직접적으로 세포에 DMSO가 닿으면 살아있는 세포 조직에 침투할 수 있음. · BSA를 이용하여 세포에 DMSO가 세포로 침투하는 현상을 방지할 수 있음.	22)
Sodium glutamate	· Sodium glutamate는 2개 이상의 작용기를 가지고 있는 물질임. · 동결보호제의 분자가 단백질 분자의 작용기에 이온결합 혹은 수소결합으로 '단백질-동결보호 복합체(protein-cryoprotectant complex)'를 형성함.	24)
	· 1-5%의 농도로 주로 glycerol이나 skim milk와 같은 화합물과 함께 사용됨.	17)
	· Sodium glutamate의 아미노기와 미생물이 갖는 단백질의 카르복실기 간의 반응으로 단백질 구조가 안정화됨. · Sodium glutamate가 더 많은 양의 잔류 수분을 보유할 수 있어 동결건조 시 동결보호제로서 역할을 함.	25)
FBS (fetal bovine serum)	· 세포의 회복에 도움을 주는 것으로 알려져 있음. 여러 세포주 및 조직을 동결보존 할 때 일반적으로 DMSO와 함께 사용하며, 비투과적인 동결보호제임.	26)
	· 동결 과정에서 손상된 세포로부터 나온 독성 물질을 중화(neutralized)시키며, 삼투압으로 인한 쇼크로부터 세포를 보호하는 것으로 가설화 되었음.	27)
Sodium ascorbate	· 세포막과 세포질에 있는 단백질과 효소의 안정성을 향상시킴.	28)
	· 저장 안정성을 증가시켜, 동결건조 및 보존 중 생존능에 영향을 미침.	29)
	· 동결건조 배지에 아스코르브산(ascorbate)을 첨가하여 산소로 인한 유해한 영향을 제거할 수 있음.	30)
Sucrose	· Sucrose는 저온(-45°C)에서 보존 중인 세포에 필요한 영양분을 제공하는 역할을 함.	16)
	· 동결 보존 후 배양 시 세포 회복과 생존율을 향상시켜 DMSO와 함께 사용할 때 효과적임.	16,31)
	· 미생물 동결보존 시 1-68% 농도(중간값: 10%) 범위로 많이 사용되고 있음.	17)

습성이 높은 trehalose가 동결보호제로 사용되고 있다. 위의 DMSO, glycerol, trehalose는 공통적으로 저분자의 세포침투형 동결보존제로, 세포 내 수분을 치환하여 세포를 동결시킬 때 얼음 결정체가 형성되는 것을 억제한다[20].

Skim milk는 1–10%의 농도로 동결건조하여 보존 시 흔히 사용되는 동결보호제이다. 동결 후 해동 시 미생물의 생존능을 증가시켜주는 것으로 알려져 있다[21]. BSA는 표면에 이온성을 띄어 강하게 수화층(hydrating water layer)

과 결합하는 특징을 갖는다. DMSO는 살아있는 세포에 침투할 수 있는 것으로 알려져 있는데[22], 이로부터 직접적으로 세포가 닿지 않도록 보호하는 역할을 한다[23]. Inositol은 당알코올이며, 단백질 구조를 안정화시켜 세포의 동결로 인해 생체 효소 시스템이 상해를 입지 않도록 보호한다[23]. Sodium glutamate는 단백질 분자의 작용기에 이온결합 또는 수소결합하여 단백질-동결보호 복합체(protein-cyroprotectant complex)를 형성하는 것으로 알려져 있다[24]. 또한 sodium glutamate가 갖는 아미노기가 미생물 단백질의 카르복실기와 반응하여 단백질 구조를 안정화시키고, 잔류 수분을 보유할 수 있는 특성으로 동결보호제로서 역할을 한다[25]. FBS는 다양한 단백질 및 생장인자가 혼합되어 있는 물질로, 세포의 회복에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. DMSO와 함께 주로 사용되고 있으며, 비투과적인 동결보호제이다[26]. 동결되는 동안 손상된 세포에서 나온 독성 물질을 중화하는 것으로 보고된 바 있으며, 삼투압으로 인한 스트레스로부터 세포를 보호한다고 가설화된 바 있다[27]. Sodium ascorbate는 세포막 및 세포질의 단백질과 효소를 안정화하며[28], 동결건조 보존 중인 세포의 저장 안정성을 증가시킨다고 알려져 있다[29]. Kurtmann 등[30]의 연구에 따르면, 아스코르브산(ascorbate)을 동결건조 배지에 첨가하였을 때 산소로 인한 유해한 인자를 제거할 수 있다. Sucrose는 저온(-45°C)에서 보존하고 있는 세포에 영양분을 제공하며[16], 동결 보존 후 세포의 회복 및 생존을 향상시켜 DMSO와 같이 사용되었을 때 효과적인 것으로 알려져 있다[16,31].

바이러스 동결보호제

바이러스의 보존 시 동결보호제를 사용하지 않는 것이 일반적이나, 생존력이 떨어지는 민감한 바이러스의 경우에는 DMSO와 FBS가 추가적으로 사용되고 있다(Table 2). 바이러스에서 DMSO의 동결보호제로서의 역할은 세균 및 곰팡이에서의 역할과 동일하다. Wallis 등[34]의 연구에 따르면, 바이러스 중에서도 특히 캡시드(capsid) 단백질을 가지는 바이러스에 대해 단기 및 장기 보존성이 우수하다. FBS는 단백질과 생장인자를 함유하며, 혈청 내 높은 단백질 함량으로 인해 전단 응력으로부터 개체를 보호하여 동결보호제로 많이 사용된다. 하지만 FBS는 바이러스가 세

Table 2. 바이러스 동결보호제의 역할

동결보호제	역할	출처
DMSO (dimethyl sulfoxide)	· 극성, 비극성 분자가 함께 존재하여 유기용매와 물이 쉽게 섞이도록 함. · 경제적이고 세포독성도 낮아 보존제로 주로 사용하고 있음. · 상온 이하의 온도에서는 고체로 변하는 성질이 있어 동결 보존제로 적합한 물질임.	16)
	· 물과 생체액(biological fluids)의 동결점을 낮추고, 용액 내 염의 농도를 낮추어 삼투압으로 인한 쇼크(osmotic shock)를 억제함. · DMSO가 물과 함께 섞여 있는 경우 최소 -73°C까지 동결점이 낮아짐.	17)
FBS (fetal bovine serum)	· 주로 DMSO나 glycerol과 같은 동결보호제(cryoprotective agent)와 함께 10-20% 농도로 혼합되어 사용되고 있음.	17)
	· 단백질을 많이 함유하며 생장인자가 혼합되어 있음. · 단백질 함량이 높아 전단 응력(shear stress)으로부터 개체를 안정화시켜, 동결 및 해동 과정에서 DMSO, glycerol 등의 동결보호제가 갖는 독성으로부터 세포를 보호해줄 수 있음.	37)

Table 3. 원충 동결보호제의 역할

동결보호제	역할	출처
DMSO (dimethyl sulfoxide)	· 극성, 비극성 분자가 함께 존재하여 유기용매와 물이 쉽게 섞이도록 함. · 경제적이고 세포독성도 낮아 보존제로 주로 사용하고 있음. · 상온 이하의 온도에서는 고체로 변하는 성질이 있어 동결 보존제로 적합한 물질임.	16)
	· 물과 생체액(biological fluids)의 동결점을 낮추고, 용액 내 염의 농도를 낮추어 삼투압으로 인한 쇼크(osmotic shock)를 억제함. DMSO가 물과 함께 섞여 있는 경우 최소 -73°C까지 동결점이 낮아짐.	17)
Sucrose	· Sucrose는 저온(-45°C)에서 보존 중인 세포에 필요한 영양분을 제공하는 역할을 함.	16)
	· 동결 보존 후 배양 시 세포 회복과 생존율을 향상시켜 DMSO와 함께 사용할 때 효과적임.	16,31)
	· 미생물 동결보존 시 1-68% 농도(중간값: 10%) 범위로 많이 사용되고 있음	17)
FBS (fetal bovine serum)	· 세포의 회복에 도움을 주는 것으로 알려져 있음. 여러 세포주 및 조직을 동결 보존할 때 일반적으로 DMSO와 함께 사용하며, 세포에 비투과적인 동결보호제임.	26)
	· 동결 과정에서 손상된 세포로부터 나온 독성 물질을 중화(neutralized)시킴. · 삼투압으로 인한 쇼크로부터 세포를 보호하는 것으로 가설화된 바 있음.	27)

포에 침투하는 현상을 억제하므로, 이를 고려하여 stock vial을 제조하고 동결보존해야 한다[35]. 또 다른 예시로, C형 간염 바이러스(hepatitis C virus)에 관한 연구에 따르면, 혈청 첨가 배지보다 혈청이 첨가되지 않은 배지(serum free media)를 사용하였을 때, C형 간염 바이러스에 감염된 세포에서 바이러스의 방출(viral release)이 향상되어 더 높은 감염력을 보인 바 있다[36]. 따라서, 바이러스의 특성에 따라 동결보호제의 사용 적합 유무를 판단하여 동결 보존 시 적절히 사용되어야 한다.

원충 동결보호제

식중독 원인이 되는 원충의 동결보호제로 DMSO가 공통적으로 사용되고 있으며, 종에 따라 sucrose 및 FBS가 추가되어 사용되고 있다(Table 3). 각 동결보호제의 역할은 세균 및 곰팡이 동결보호제의 역할에 언급한 바와 동일하다. 단, DMSO의 경우에는 세포 침투성 동결보호제로서 원생생물과 같이 크고 복잡한 구조를 가진 세포에 사용되는 것이 적합한 것으로 알려져 있고[38], 여러 선행연구에서도 DMSO가 원충을 보존하기에 가장 효율적인 것으로 나타났다[39]. FBS의 경우, 보통 열을 가하여 불활성화 시킨 FBS (heat-inactivated FBS)를 동결보호제로 사용한다. FBS에는 병원체로부터 세포를 보호하는 보체(complement)가 존재하는데, 보체가 *in vitro* 상의 원충 생장을 방해할 수 있어 이를 불활성하는 과정이 필요하다[40].

결 론

분리된 식중독 균주는 식중독 원인 조사, 분리 균주의 자원화(표준 균주 개발 등)로 활용이 될 수 있어 다양한 활용 및 고부가가치화를 위해 장기적이고 안정적인 보존이 요구된다. 이를 위해 식중독 세균의 경우 배양이 어렵거나 장기 보존이 어려운 자원은 최적의 보존 조건이 마련되어야 한다. 국내외 균주은행에서는 일반적인 균주에 대한 보존 방법은 잘 마련되어 있었으나, 현재 세균 중에서도 *Vibrio* 종 등 장기 보존이 어려운 세균의 경우, 최근 관련 연구를 통해 보존 방법이 보완되고 있다[12].

바이러스의 경우, 국내외 균주은행에서 모두 Norovirus, Rotavirus, Hepatitis E virus, Hepatitis A virus, Enteric Adenovirus, Sapovirus, Astrovirus 등 식중독 원인 바이러스에 특정적인 보존 방법을 제시하고 있지 않았다. 바이러스도 세균과 마찬가지로 각 바이러스의 특성에 따라 보존이 이뤄져야 하며 효율적으로 바이러스 자원 보존이 가능한 방법이 연구되어야 한다. 예로, 바이러스성 식중독의 원인의 대부분을 차지하는 인간 노로바이러스는 세포 감염모델에 적용이 어려워 바이러스 배양 및 장기보존이 어려웠다. 하지만 최근 장 상피 및 장 오가노이드(organoid, 유사 장기)를 이용한 증식 및 배양 방법이 다수 연구되면서[41-43], 배양 및 보존이 불가능했던 바이러스의 장기보존이 가능해질 것으로 전망된다.

곰팡이는 포자 형성 유무에 따라 보존 방법을 달리하여 정립된 방법으로 보존하고 있으며, 국내외 균주은행 중에서도 특히 KACC에서 잘 마련되어 있다. 원충의 경우, 미국의 ATCC를 제외하고 국내에는 정립된 방법으로 균주를 보존하고 있는 곳이 없는 실정이다. 앞으로 이를 전문적으로 보존하기 위해 최적의 보존 방법을 연구하여 마련하는 것이 요구될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20162MFDS013)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

ORCID

Yujin Kim https://orcid.org/0000-0002-0903-9871
Soomin Kim https://orcid.org/0000-0002-6012-1790
Soyeon Kim https://orcid.org/0000-0002-2120-0226
Yohan Yoon https://orcid.org/0000-0002-4561-6218

References

1. ABS Research Support Center, (2021, May 23). Nagoya protocol. Retrieved from https://www.abs.re.kr/app/absInfo/nagoyaView.do
2. Jin, T.E., Bioresources, the core material in the bioeconomy era. *Science & Technology Policy*, **25**, 20-25 (2015).
3. Food Safety Korea, (2021, June 2). Foodborne illness statistics. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02
4. NCCP (National Culture Collection for Pathogens), (2021, July 29). Holdings for pathogen resources. Retrieved from https://nccp.kdca.go.kr/main.do
5. KCTC (Korean Culture for Type Cultures), (2021a, July 29). Introduction of KCTC. Retrieved from https://kctc.kribb.re.kr/intro/introduction
6. KCTC (Korean Culture for Type Cultures), (2021b, July 29). Resource classification in KCTC. Retrieved from https://kctc.kribb.re.kr/search/resourceSearchResult?pageNumber=1&searchKeyword=&category=&selectAll=false&dna=false&typeStrain=false
7. National Institute of Agricultural Sciences (2010). Standard operation procedure for microbial resources management : Korean Agricultural Culture Collection (KACC). National Institute of Agricultural Sciences, Suwon-si, Republic of Korea, pp.1-242.
8. KACC (Korean Agricultural Culture Collection), (2021, July 29). Holding microbial strains of KACC. Retrieved from

http://genebank.rda.go.kr/microbeMain.do
9. CABRI (Common Access to Biological Resources and Information), (2020, April 10). CABRI guidelines – Micro-organism. Retrieved from http://www.be.cabri.org/guidelines/micro-organisms/MCover1.html
10. ATCC (American Type Culture Collection), (2020, June 2). ATCC® bacterial culture guide (tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages). Retrieved from https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide
11. NCCP (National Culture Collection for Pathogens). 2017. Standard operation procedure for NCCP, fourth ed. Korea National Institute of Health, Cheongju-si, Republic of Korea, pp. 1-530.
12. KCDC (Korea Centers for Disease Control and Prevention). 2016. Development of an optimal preservation methods on pathogen resources and reference strains for researches on infectious diseases. Korea National Institute of Health, Cheongju-si, Republic of Korea, pp. 18-23.
13. ATCC (American Type Culture Collection), (2020, Sep 1). ATCC® Mycology Culture Guide. Retrieved from https://www.atcc.org/resources/culture-guides/mycology-culture-guide#preservation
14. ATCC (American Type Culture Collection), (2020, Sep 1). ATCC® VIROLOGY GUIDE (tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs). Retrieved from https://www.atcc.org/resources/culture-guides/virology-culture-guide
15. ATCC (American Type Culture Collection), (2020, June 29). ATCC® PROTISTOLOGY CULTURE GUIDE (tips and techniques for propagating protozoa and algae). Retrieved from https://www.atcc.org/resources/culture-guides/protistology-culture-guide
16. Bhattacharya, S., 2018. Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences. In: Bozkurt, Y (Ed), Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process, IntechOpen Limited, London, UK, pp. 7-19.
17. Hubalek, Z., Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, **46**, 205-229 (2003).
18. Park, S.H., Contribution of Ions to Protein Stability Studied by Using a Variant Ubiquitin as a Model Protein. *J. Korean Chem. Soc.*, **60**, 82-87 (2016).
19. Wolfe, J., Bryant, G., Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, **39**, 103-129 (1999).
20. Kang, S.H., Joo, H.M., Park, S.I., Jung, W.S., Hong, S.S., Seo, K.W., Jeon, M.S., Choi, H.G., Kim, H.J., Cryobiological perspectives on the cold adaptation of polar organisms. *Ocean Polar Res.*, **29**, 263-271 (2007).
21. Cody, W.L., Wilson, J.W., Hendrixson, D.R., McIver, K.S., Hagman, K.E., Ott, C.M., Nickerson, C.A., Schurr, M.J., Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *J. Microbiol. Methods,* **75**, 135-138 (2008).
22. Marren, K., Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. *Phys. Sportsmed.*, **39**, 75-82 (2011).
23. Jena, S., Aksan, A., Effect of high DMSO concentration on albumin during freezing and vitrification. *RSC Adv.*, **7**, 43611-43620 (2017).
24. Seguro, K., Tamiya, T., Tsuchiya, T., Matsumoto, J.J., Cryoprotective effect of sodium glutamate and lysine-HCl on freeze denaturation of lactate dehydrogenase. *Cryobiology*, **27**, 70-79 (1990).
25. Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait*, **83**, 203-210 (2003).
26. Varma, V.P., Devi, L., Venna, N.K., Murthy, C., Idris, M.M., Goel, S., Ocular Fluid As a Replacement for Serum in Cell Cryopreservation Media. *PloS one*, **10**, e0131291 (2015).
27. Al-Farha, A.A.B., Khazandi, M., Hemmatzadeh, F., Jozani, R., Tearle, R., Hoare, A., Petrovski, K., Evaluation of three cryoprotectants used with bovine milk affected with Mycoplasma bovis in different freezing conditions. *BMC Res. Notes*, **11**, 1-6 (2018).
28. Shu, G., Yang, X., Lei, Z., Huang, D., Zhai, Y., Effects of Carbohydrates, Prebiotics and Salts on Survival of *Saccharomyces boulardii* During Freeze-Drying. *Acta Univ. Cibiniensis, Ser. E: Food Technol.,* **22**, 59-66 (2018).
29. Chen, H., Wang, J., Luo, Q., Shu, G., Effect of NaH-CO_3, $MgSO_4$, sodium Ascorbate, sodium glutamate, phosphate buffer on survival of Lactobacillus bulgaricus during freeze-drying. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, **5**, 771-774 (2013).
30. Kurtmann, L., Carlsen, C.U., Risbo, J., Skibsted, L.H., Storage stability of freeze–dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*, **58**, 175-180 (2009).
31. Bui, T.V., Ross, I.L., Jakob, G., Hankamer, B., Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. *PloS one*, **8**, e78668 (2013).
32. Qamar, A.Y., Fang, X., Kim, M.J., Cho, J., Myoinositol Supplementation of Freezing Medium Improves the Quality-Related Parameters of Dog Sperm. *Animals*, **9**, 1038 (2019).
33. Roberts, M.F. 2006. Inositol in bacteria and archaea. In: Majumder, A.L., Biswas, B.B. (Ed), Biology of inositols and phosphoinositides, Springer, Boston, MA, USA, pp. 103-133.
34. Wallis, C.R.A.I.G., Melnick, J.L., Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. *J. Virol.*, **2**, 953-954 (1968).
35. Szretter, K.J., Balish, A.L., Katz, J.M., Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr. Protoc. Microbiol.*, **3**, 15G-1 (2006).
36. Mathiesen, C.K., Jensen, T.B., Prentoe, J., Krarup, H., Nicosia, A., Law, M., Buck, J., Gottwein, J. M., Production and characterization of high-titer serum-free cell culture grown hepatitis C virus particles of genotype 1–6. *Virology*, **458**, 190-208 (2014).
37. Hernández, Y.G., Fischer, R.W., Serum-free culturing of mammalian cells-adaptation to and cryopreservation in fully

defined media. *ALTEX*, **24**, 110-116 (2007).
38. Thermo Scientific, (2020, August 28). A guide for proper cryogenic preservation. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D21111.pdf
39. James, E.R., Parasite cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, **49**, 201-210 (2004).
40. Han, B., Moretto, M., Weiss, L., Encephalitozoon: tissue culture, cryopreservation, and murine infection. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.*, **52**, e72 (2019).
41. Nguyen, M.T., Park, M.K., Ha, S., Choi, I.S., Choi, C., Myoung, J., Cell Culture Models of Human Norovirus: the End of the Beginning?. *Microbiol. Biotechnol. Lett.,* **45**, 93-100 (2017).
42. Yin, Y.B., de Jonge, H.R., Wu, X., Yin, Y.L. Mini-gut: a promising model for drug development. *Drug Discov. Today*, **24**, 1784-1794 (2019).
43. Zhang, D., Tan, M., Zhong, W., Xia, M., Huang, P., Jiang, X., Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication. *Sci. Rep.,* **7**, 1-12 (2017).