

*Bifidobacterium breve*의 성장 특성과 생존력에 미치는 배양조건의 영향

박희경 · 허태련
인하대학교 생물공학과

Effect of Culture Conditions on the Growth Characteristics and Survival of *Bifidobacterium breve*

Hee-Kyung Park and Tae-Ryeon Heo
Department of Biotechnology, Inha University

Abstract

The effects of pH and L-cysteine HCl on the growth and stability of *Bifidobacterium breve* were studied. Significantly higher population was obtained by culturing at pH 6.0~6.5 than at any other pH. The cultures that had been grown at pH 5.5~6.0 were more stable during storage than those grown at other pH. The number of *B. breve* that had been grown at pH 5.5 and 6.0 remained as 2.4×10^7 /ml and 1.4×10^7 /ml, respectively, after 25 days of storage at 4°C. The β -galactosidase activity of *B. breve* grown at pH 5.5 and 6.0 was reduced only to 78~85% of the control after the same storage condition, whereas the culture grown at pH 7.0 exhibited a significant decline in population and β -galactosidase activity during storage at 4°C. The growth of *B. breve* was promoted by 0.05% L-cysteine HCl, and cells grown in MRS with 0.05~0.10% L-cysteine HCl were more resistant to hydrogen peroxide. With respect to the effect of osmoprotectants on the survival of *B. breve* subjected to freeze-drying, addition of 2 mM betaine or 2 mM trehalose increased the growth rate of cells grown under osmotic stress and also made the organism more osmotolerant. Furthermore, the betaine or trehalose increased the survivability of the cells after freeze-drying.

Key words: *Bifidobacterium breve*, β -galactosidase, betaine, trehalose, freeze-drying

서 론

Bifidobacterium spp.는 인체 장내에 서식하는 균종으로 장관 내에서 부패 미생물의 생육을 억제하여 변비나 암 등의 질환 예방, 항생제에 의한 미생물 균총 변화의 회복과 면역기능을 강화시켜 감염에 대한 저항성을 증대시켜 주는 유익한 생리작용을 하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 또한 *Bifidobacterium*의 균수 변동이 스트레스나 질병, 암, 노화 등과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라 *Bifidobacterium*이 첨가된 제품의 소비가 점점 증가되고 있다⁽²⁾. 이러한 제품으로 요구르트, 치즈, 분유, 아이스크림과 생균제제로서 그 가치가 크게 평가되고 있다. 이와같이 유제품과 생균제제 등에 이 균이 이용되기 위해서 생존력을 갖는 생균체를 직접 이용해야 하므로 *Bifidobacterium*이 생균

상태가 유지되어야 할 뿐만 아니라 저장시 균주의 안정성 등이 고려되어야 한다.

*Bifidobacterium*의 증식 및 생존성에 영향을 미치는 요인으로는 배지의 pH, 산의 종류, 혐기적인 조건, 생육인자의 특성, 탄수화물의 종류 등이 있다^(3,5). 제품에 포함된 *Bifidobacterium*이 오랫동안 활력을 유지하여야 할 뿐 아니라 장내에서 유익한 역할을 수행하기 위해 인체 소화기관 내의 위액, 각종 소화효소 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복하여야 한다^(6,7). 그러므로 유산균을 생균으로서 이용하기 위해서는 저장시 생존력을 증진시킬 수 있는 배양조건과 외부환경에 저장력이 있어 안정성을 증진시킬 수 있는 배양조건의 검토가 필요하다.

특히 배양 pH에 의해 생물학적, 에너지 대사에 변화가 생기게 되는데 이러한 변화로 인하여 대사과정과 물리학적 특성이 달라지게 된다⁽⁸⁾. *Bifidobacterium*은 균주와 성장환경에 따라 산소에 대한 내성이 달라진다. *Bifidobacterium* spp.에서는 reduced NAD-ox-

Corresponding author: Tae-Ryeon Heo, Department of Biotechnology, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

idase와 reduced NAD-peroxidase에 의해 산소의 저해를 방지하여 주는데 이러한 효소의 생성정도가 증식 환경에 따라 달라지기 때문이다⁽⁵⁾. L-cysteine HCl은 배지내의 산화-환원 전위를 낮추어 주므로써 혐기조건을 만들어 주어 *Bifidobacterium*의 성장에 유리한 환경을 제공한다. 그러나 이러한 혐기조건 정도의 따라 효소 생성정도가 다르게 되므로 산소에 대한 내성이 다르게 된다.

스타터나 제제 제조시 주로 사용되는 방법은 저온 저장과 동결건조 방법이 있다. 동결건조 공정시, 배지내에 수분활성도의 저하로 ionic strength가 증가하여 osmotic stress를 받게 된다⁽⁸⁾. 미생물은 수분활성도가 저하됨에 따라 compatible solute를 축적하여 균체내·외부 환경의 osmotic 평형을 유지시킨다. 이렇게 감소된 수분활성도 환경에서 단백질의 안정화와 생체막의 견고성을 부여하여 형태를 유지시켜 주는 물질로 polyols, amino acids, amino 유도체와 최근에 발견된 tetrahydropyrimidine이 있다⁽⁹⁾. 그러나 대부분의 유산균은 이러한 물질을 축적하지 못한다.

본 실험에서는 배양 pH에 의한 증식과 저장시 안정성을 조사하고, L-cysteine HCl을 농도별로 첨가하여 각 농도에서의 증식과 각각의 환경에서 증식한 *B. breve*의 산소에 대한 내성 정도와 betaine과 trehalose를 osmotic stress 환경에서 배양하였을 때 동결건조시 보호효과를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 한국과학기술연구원 유전공학센터 유전자 은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받은 인체유래의 *Bifidobacterium breve* KCTC 3220이었다. 각 균주는 활력 유지를 위해 Modified MRS 배지⁽¹⁰⁾에서 계대배양한 후 glycerol과 탈지분유를 냉동보호제로 사용하여 -70°C에서 저장하였다.

배양 pH에 의한 성장 특성과 저장기간동안 활력 유지

배양 pH 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 5.2, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 조절하여 각 pH에서 증식과 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 배양은 modified MRS 배지에 2%의 *Bifidobacterium breve*를 접종하여 2.5 l 배양조에서 pH를 유지하면서 37°C에서 배양하였고 질소가스로 혐기조건을 제공하였다. 배양 직후 *Bifidobacterium*을 멸균된 용기에 분주하여 4°C와

-20°C에서 40일동안 저장하면서 생균수와 β -galactosidase 활성을 측정하여 배양 pH에 대한 균주의 저장성을 비교하였다.

L-cysteine HCl이 *B. breve*의 성장과 과산화수소에 대한 내성에 미치는 영향

Modified MRS 배지에 0~0.20%의 L-cysteine HCl을 첨가하여 성장과 각 농도에서 증식한 *B. breve*의 과산화수소에 대한 내성을 조사하였다. 성장정도는 600 nm에서 흡광도로 측정하였고, 과산화수소에 대한 내성은 과산화수소 100 ppm 농도에서 각 시간별로 생균수를 측정하였다.

Betaine과 trehalose의 첨가 배양시 동결건조 안정성 조사

Sodium chloride의 농도는 0~0.7 M로 osmotic stress를 주어 배양하였고, 같은 sodium chloride 농도에서 2 mM의 betaine과 trehalose를 각각 첨가하여 동결건조시 보호효과를 조사하였다. 배양된 *B. breve*를 3,000×g에서 원심분리한 후 회수된 균체를 10% 탈지분유를 냉동보호제로 배양액에 첨가하여 -70°C에서 예비 동결시킨 후 동결건조기(Tokyo Rikakikai Co., EYELA, FD1)에서 6시간 동결건조를 실행하였다. 동결건조된 각각의 균주의 생균수를 측정하여 냉동보호효과를 조사하였다.

생균수 측정

Bifidobacterium breve 배양액을 0.85% sodium chloride 생리식염수에 십진 희석법으로 희석하여 modified MRS 한천 배지에 분주하여 도말한 후 혐기조건을 제공하기 위해 CO₂ 가스로 치환한 후 37°C에서 48시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

β -Galactosidase 활성도 조사

β -Galactosidase의 활성은 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)⁽¹¹⁾ 방법을 이용하여 분석하였다. 배양액으로부터 원심분리하여 얻은 균체와 동결건조된 *Bifidobacterium*을 0.01 M MgSO₄와 0.05 M β -mercaptoethanol을 포함하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하였다. Chloroform과 0.1% sodium dodecyl sulfate를 첨가하여 균체를 파쇄시켜 ONPG (4 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis., Mo)를 가한 후 37°C에서 반응시킨다. 1.0 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 정지시키고 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 3B)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. β -Galactosidase의 1

unit는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\beta\text{-Galactosidase (units/ml)} = 1000 \left(\frac{A_{420}}{t \times v} \right)$$

A : 420 nm에서 흡광도

t : 반응시간(min.)

v : 시료량

결과 및 고찰

배양 pH가 B. breve의 증식에 미치는 영향

배양 pH는 탄수화물 대사에 관여하는 주요 요인으로서, pH의 변화에 의해 단일발효에서 이상발효로 바뀌어지며 증식에도 영향을 미친다^[11,13]. 이렇듯 배양 pH에 의해 배양 균주의 물리적, 화학적 특성이 달라질 수 있다. Bifidobacterium spp.는 acetic acid와 lactic acid를 생산하는 이상발효를 하지만 배양 pH에 의해 균주의 물리적 특성이 변화하므로 Table 1의 결과와 같이 배양 pH를 5.2로 조절한 조건에서 최대 균체수가 18시간 배양 이후에 9.53 log cfu/ml로 다른 조건에 비하여 최대 균체수도 적었고, β-galactosidase 활성이 4415 U/ml로 활성이 낮았으며 배양시간이 오래 걸림을 알 수 있었다. pH 5.5에서는 최대 균체수가 9.87 log cfu/ml로 pH 5.2에 비하여 약간 증가된 균체수를 얻을 수 있었으며 β-galactosidase 활성도 7200 U/ml로 우수하였으며 배양시간도 16시간으로 단축되었다. pH 6.0에서는 균체수와 β-galactosidase 활성이 각각 10.36 log cfu/ml와 7360 U/ml로 약간씩 증가하였으며 pH 6.5와 pH 7.0의 조건에서는 최대 균체수 형성시간이 12~14시간으로 단축되었고 최대 균체수도 10.01~

9.56 log cfu/ml의 균체 수를 얻을 수 있었다. 이러한 결과로 보아 많은 수의 Bifidobacterium을 생산하기 위해서는 pH 6.0~6.5 조건하에서 배양하여야 함을 알 수 있었다. Bifidobacterium과 함께 제품에 많이 사용되는 L. acidophilus의 경우에는 이와는 다른 결과로 pH 5.0~6.0 사이에서 최대 균체수를 얻었다고 보고하고 있다^[14].

배양 pH가 저장시 안정성에 미치는 영향

미생물을 산업적으로 이용할 때, 냉동이나 냉장저장을 하므로 저온에 대한 미생물의 반응은 상당한 관심의 대상이 되어 왔다. 각각 다른 조건에서 배양한 B. breve를 4°C와 -20°C에서 저장하면서 생균력을 조사하였다. 4°C에서 저장실험한 결과 pH 6.0과 5.5에서 배양된 B. breve가 25일 저장 이후에도 2.4×10⁷/ml와 1.4×10⁷/ml로 10⁷/ml 이상을 유지한 반면에 pH 6.5에서 배양한 B. breve는 25일 이후 1.8×10⁵/ml, pH 7.0에서는 2.4×10²/ml로 활성이 각각 1.0×10⁻²%와 2.2×10⁻⁷% 감소하였다(Fig. 1). β-Galactosidase 활성도 pH 5.5와 6.0의 배양조건에서는 25일 이후에도 78~85%를 유지한 반면 pH 6.5와 7.0에서는 35~40%의 활성을 나타 내었다(Fig. 2). 이러한 결과로 보아 배양시에는 최적 pH가 6.0~6.5이지만 스타터나 제품제조시 활성을 유지하기 위한 배양 pH 5.5~6.0이 우수한 조건임을 알 수 있었다.

-20°C에서 저장시 20일까지는 배양조건에 따라 활성에 거의 차이를 보이지 않았지만 25일 이후 pH 6.5와 7.0에서 배양한 균주는 생균수가 급속히 감소하였고(Fig. 3) 40일 이후에도 pH 5.2~6.0사이에서 배양

Table 1. Effect of culture conditions on the growth characteristics and β-galactosidase activity of B. breve

Time (hrs.)	pH									
	pH 5.2		pH 5.5		pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0	
	Log cfu/ml	β-gal activity (u/ml)	Log cfu/ml	β-gal activity (u/ml)	Log cfu/ml	β-gal activity (u/ml)	Log cfu/ml	β-gal activity (u/ml)	Log cfu/ml	β-gal activity (u/ml)
0	4.77	90	4.34	85	5.13	138	5.02	220	4.90	220
2	4.97	120	4.34	100	5.22	400	5.15	425	5.20	275
4	5.80	148	4.40	115	5.40	950	6.19	735	5.70	1310
6	7.11	210	4.53	418	6.21	2500	6.55	2700	7.42	3055
8	7.31	423	5.69	418	7.83	7035	7.20	6000	8.84	3675
10	8.30	1629	7.14	1263	8.69	7160	8.38	7050	9.56	4190
12	8.80	2644	7.41	1876	8.90	7345	9.01	7460	8.74	5640
14	9.09	3330	8.89	1719	9.70	7360	10.01	7475	8.60	6010
16	9.23	4415	9.87	2475	10.36	7190	9.99	6680	8.57	6240
18	9.53	4300	8.44	4633	9.19	7075	9.13	5180	8.54	6100
20	8.94	3930	7.54	7240	8.99	6900	8.43	5600	8.50	6000
22	8.90	3740	7.50	7200	8.83	6872	8.40	5690	8.50	5800

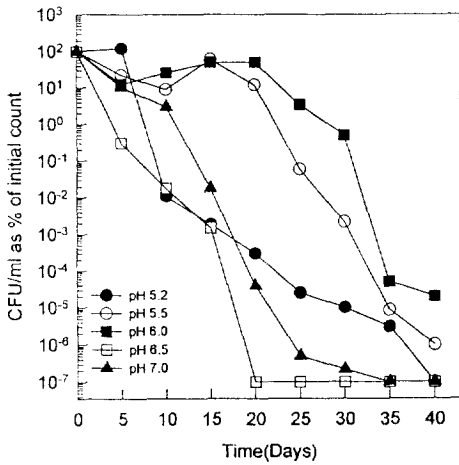


Fig. 1. Influence of viability at different pH on subsequent storage stability of *B. breve* at 4°C

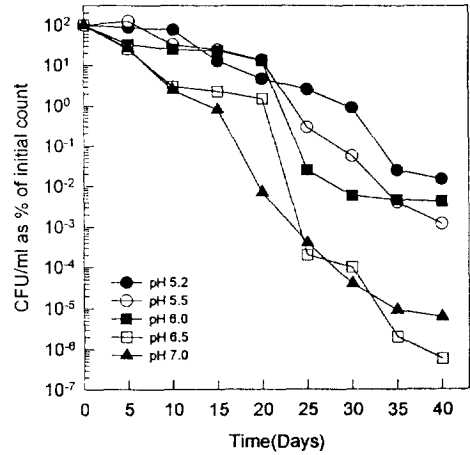


Fig. 3. Influence of viability at different pH on subsequent storage stability of *B. breve* at -20°C

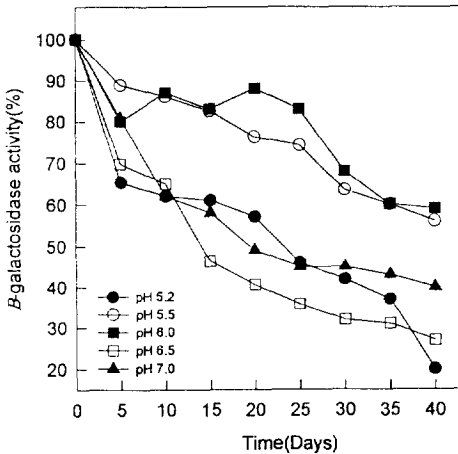


Fig. 2. Influence of β -galactosidase activity at different pH on subsequent storage stability of *B. breve* at 4°C

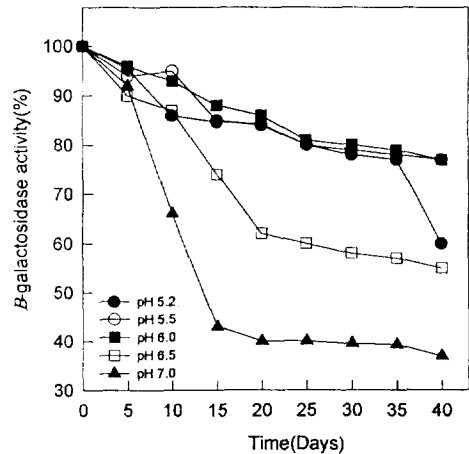


Fig. 4. Influence of β -galactosidase activity at different pH on subsequent storage stability of *B. breve* at -20°C

한 균주는 $10^2 \sim 10^3\%$ 의 생존율을 보이는 반면에 pH 6.5와 7.0에서 배양한 *B. breve*는 $10^5 \sim 10^6\%$ 로 생존율이 상당히 낮았다. β -Galactosidase 활력은 배양조건이 pH 6.5~7.0일 때 급격히 저하되었다(Fig. 4). Gilliland 등⁽¹⁴⁾은 pH 5.0에서 배양한 *Lactobacillus acidophilus*가 5°C에서 21일 저장 이후에도 생존수가 전혀 감소하지 않았다고 보고하고 있다. 그러나 *B. breve*는 이보다 pH가 높은 pH 5.5~6.0에서 저장시 활력이 가장 안정적으로 유지되었다.

B. breve 성장에 대한 L-cysteine HCl의 효과와 과산화수소에 대한 내성

L-cysteine HCl의 농도를 0~0.20%로 조절하여 첨가

하였다. 첨가하지 않은 조건에서는 흡광도가 0.546이고 0.02% 첨가하였을 때 0.960이었으며 0.05% 첨가하였을 때 2.097로 증식에 0.05% 이상 첨가시 성장에 유리한 조건을 제공함을 알 수 있었다. 0.10~0.20% 첨가하였을 때 흡광도 3.70 정도로 거의 같은 수준을 유지하였다(Fig. 5). *Bifidobacterium* 균주에 있어서 혐기배양을 하는 이유는 과산화수소(H_2O_2)의 축적의 방지를 위해서인데, 과산화수소가 축적되면 fructose-6-phosphate phosphoketolase를 불활성화시켜 발효과정의 경로가 저해된다⁽¹⁵⁾. *Bifidobacterium*은 혐기성 미생물로 과산화수소에 민감하므로, 이에 대한 효과를 조사하였다. L-cysteine HCl을 첨가하지 않고 배양한 *B. breve*가 과산화수소에 가장 저해를 받지 않았다. 100

ppm 과산화수소 농도에서 80분 노출시킨 후에 생존율이 1.6%인 반면 0.20% L-cysteine HCl을 첨가하여 가장 혐기적인 조건에서 배양한 *B. breve*는 과산화수소에 80분 노출시킨 후 생존율이 7.8×10^{-4} %이었다. 그러므로 가장 혐기적인 조건에서 배양한 것보다는 partial anaerobic 조건에서 배양한 *B. breve*가 과산화수소에 대하여 내성이 강하였다. 이는 증식하는 과정에서 배양환경에 적응하여 과산화수소에 대하여 내성이 생긴 것으로 추측되어진다. 이러한 결과는 Jan의 보고⁽¹⁵⁾에서와 같이 혐기적인 조건에서 배양한 *L. lactis*는 superoxide dismutase의 활성이 있으며 배지에 O₂의 농도

가 증가할수록 효소의 활성이 증가한다는 결과와 일치한다. 그러나 partial anaerobic 조건에서 배양시 *B. breve*의 흡광도가 0.546으로 증식이 낮았으므로 과산화수소에 내성이 강하긴 하지만 배양조건으로는 적합하지 않았다. 0.02~0.15% L-cysteine HCl을 첨가한 조건에서는 과산화수소에 80분 노출시켰을 때 생존율이 0.09~0.01%로 내성이 유사하였다. 0.05~0.10% L-cysteine HCl을 첨가하였을 때 증식도 우수하고(흡광도 3.74) 과산화수소에 대한 내성도 0.20% L-cysteine HCl을 첨가하였을 때보다 우수하였으므로 0.05~0.10% L-cysteine HCl을 첨가하여 배양하였을 때 증식이나 저장시 산소에 대한 피해를 줄일 수 있는 배양조건임을 알 수 있었다(Fig. 6).

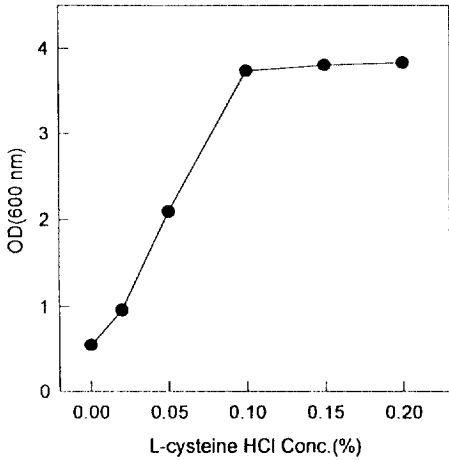


Fig. 5. Growth of *B. breve* after incubation (12 h at 37°C) in MRS with various concentrations of L-cysteine HCl

Betaine과 trehalose가 *B. breve*의 증식과 동결건조에 미치는 영향

미생물을 장기적으로 보존하기 위해 사용되는 동결건조 방법은 미생물 세포에 냉동, 건조 그리고 탈수시에 stress를 동시에 준다. 동결과정에서 생성되는 얼음 결정체에 의해 균체의 세포막 손상으로 세포내의 구조물이 누설되어 생존력이 저하되고, 세포내의 결합수가 제거됨으로써 수소결합이나 소수성 결합으로 구성되어 있는 세포막, 핵산, 효소 등과 같은 거대분자가 불안정하게 되었기 때문이라 할 수 있다⁽¹⁷⁾. Amino acid 유도체인 betaine은 osmoprotectant로 건조공정시 미생물의 활성을 유지시키는 기능을 갖고 있다⁽¹⁸⁾. Fig. 7에서와 같이 betaine을 2 mM 첨가한 경우 sodium chloride 0.1 M 농도에서 흡광도가 3.256으로 sodium

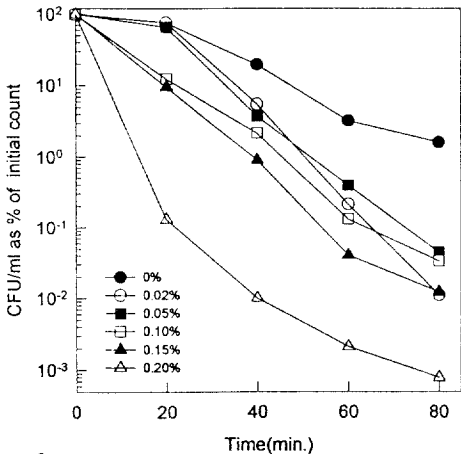


Fig. 6. Survival of *B. breve* grown at 0%, 0.02%, 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20% L-cysteine HCl after exposure to 100 ppm hydrogen peroxide

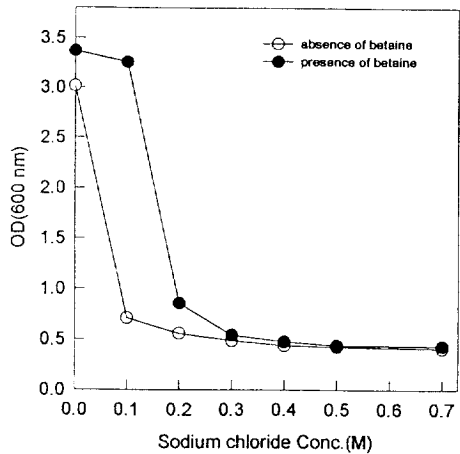


Fig. 7. Effect of sodium chloride on the growth of *B. breve* after 12 h of incubation in the presence or absence of betaine

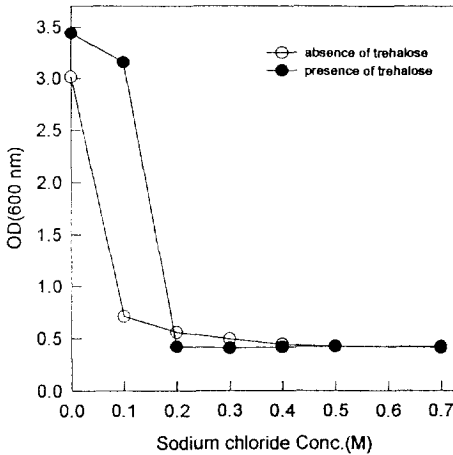


Fig. 8. Effect of sodium chloride on the growth of *B. breve* after 12 h of incubation in the presence or absence of trehalose

chloride를 첨가하지 않은 조건에서의 흡광도 3.375와 비교하여 증식에 거의 차이를 보이지 않는 반면에 betaine을 첨가하지 않고 sodium chloride만 첨가한 조건에서는 0.560으로 거의 증식을 하지 않았다. 그러나 sodium chloride 0.2 M 이상 첨가하여 준 배양조건에서는 betaine의 첨가 유·무에 상관없이 거의 증식이 되지 않았다. 그러므로 sodium chloride 0.1 M 이하의 농도에서 betaine이 osmoprotectant 역할을 함을 알 수 있었다.

Trehalose (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside)는 주요한 저장 탄수화물과 에너지 저장원으로 자연계에 널리 분포하는 물질로서 물리적 화학적 stress에 대한 보호작용을 하며^(19,20), 냉동과 동결건조시 세포막의 안정성에 관여한다. Betaine의 결과와 마찬가지로 trehalose를 첨가한 배양조건에서 sodium chloride 농도가 0.1 M일 때 흡광도가 3.155인 반면, trehalose를 첨가하지 않은 배양조건에서는 0.560으로 거의 증식을 하지 않았다(Fig. 8). Sodium chloride 0.2 M 농도일 때 trehalose를 첨가하여도 거의 증식을 하지 않았다. 이러한 결과로 인하여 trehalose도 *B. breve*의 osmoprotectant 역할을 함을 알 수 있었다.

동결건조에 대한 betaine과 trehalose의 효과를 조사한 결과 osmotic stress를 준 조건 즉, 0.1 M sodium chloride를 첨가하여 osmotic stress를 주면서 2 mM betaine이나 2 mM trehalose를 첨가한 배지에서 증식한 *B. breve*는 배양 직후 각각 5.3×10^9 /ml와 4.9×10^9 /ml에서 각각 1.8×10^9 /ml와 4.6×10^9 /ml로 동결건조시 거의 활력에 손상을 받지 않았으며(Table 2) osmotic

Table 2. Survival of freeze-dried *B. breve* by sodium chloride, betaine and trehalose in the growth medium and freeze-drying buffer

Additive	After incubation	After freeze-drying
No additive	1.4×10^9 /ml ¹⁾	1.1×10^8 /ml
2 mM Betaine (media)	4.6×10^9 /ml	1.2×10^8 /ml
0.15 M NaCl+2 mM Betaine (media)	5.3×10^9 /ml	1.8×10^9 /ml
2 mM Betaine (buffer)	1.4×10^9 /ml	1.6×10^7 /ml
2 mM Trehalose (media)	5.6×10^9 /ml	5.6×10^7 /ml
0.15 M NaCl+2 mM Trehalose (media)	4.9×10^9 /ml	4.6×10^9 /ml
2 mM Trehalose (buffer)	1.4×10^9 /ml	5.7×10^8 /ml

¹⁾Viable cell count of freeze-dried *B. breve* was determined after rehydration of freeze-dried powder in 10 ml sterile water

stress를 주지않고 betaine만 첨가하여 배양한 조건에서는 4.6×10^9 /ml에서 1.2×10^8 /ml로, trehalose만 첨가한 경우에는: 5.6×10^9 /ml에서 5.6×10^7 /ml로 각각 10^7 /ml와 10^8 /ml가 감소하였으며 위의 물질들을 배지에 첨가하지 않고 냉동보호제를 첨가하였을 경우에는 거의 보호효과를 나타내지 않았다.

요 약

*Bifidobacterium breve*의 최적 배양 조건과 안정성을 증진시킬 수 있는 배양조건을 조사하기 위하여 pH와 L-cysteine HCl의 첨가효과를 조사하였다.

최대 균체수를 얻기위한 pH 조건은 pH 6.0~6.5가 최적 배양 조건임을 알 수 있었다. 저장시의 최적 배양 조건은 pH 5.5~6.0에서 가장 우수하였다. pH 5.5~6.0에서 배양한 균주를 4°C에서 저장시 25일 이후에 2.4×10^6 /ml와 1.4×10^6 /ml로 10^6 /ml 이상을 유지하여 저장시 안정성이 우수한 반면 pH 7.0에서 배양한 균주는 2.4×10^6 /ml로 저장시 생존력이 상당히 낮았으며 pH 5.5와 6.0에서 배양한 균주의 β -galactosidase 활력은 25일 저장 이후에도 78~85%를 유지한 반면 pH 7.0에서 배양한 균주의 β -galactosidase 활력은 급격히 감소하였다.

L-cysteine HCl 첨가 효과는 0.05% 이상 첨가시 증식에 유리한 환경을 제공하였으며 과산화수소에 대한 내성은 0.05~0.10% L-cysteine HCl을 첨가한 배지에서 증식한 *B. breve*가 우수하였다. Osmoprotectant를 첨가하여 배양시 증식과 동결건조시 균주의 안정성에 대한 효과를 조사해 본 결과 2 mM betaine이나 2 mM trehalose를 첨가시 증식에도 효과가 있었으며 osmoprotectant 역할을 함을 알 수 있었다. 또한 동결건

조시에도 betaine이나 trehalose를 첨가하여 배양된 *B. breve*는 거의 손상을 받지 않음을 알 수 있었다.

문 헌

- Ishibashi, N. and Shimamura, S.: Bifidobacteria : research and development in Japan. *Food Technol.*, **6**, 126 (1993)
- Mitsuoka, T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Industr. Microbiol.*, **6**, 263 (1990)
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T. and Tomita, M.: Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3296 (1992)
- Combet-Blanc, Y., Kalamba, K.K. and Kergoat, P.Y.: Effect of pH on *Bacillus thermoamylovorans* growth and glucose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 656 (1995)
- Mckellar, R.C., Modler, H.W. and Mullin, J.: Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. *Bifidobacteria Microflora*, **12**, 75 (1994)
- Maffi, H.V.L. and Nobrega, F.J.: Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut*, **16**, 716 (1975)
- Dare, R., Magee, J.T. and Mathison, G.E.: *In-vitro* studies on the bacteriocidal properties of natural and sythetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.*, **5**, 395 (1972)
- Chirife, J. and Buera, M.P.: Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food system. *J. Food Sci.*, **59**, 921 (1994)
- Kets, E.P.W. and Bont, J.A.M.: Protective effect of betain on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FFMS Microbiol. Letters.*, **116**, 251 (1994)
- Roy, D., Dussault, F. and Ward, D.: Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft*, **45**, 500 (1990)
- Hekmat, S. and McMahon, D.J.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1415 (1992)
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. and Flandrois, J.P.: Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 610 (1995)
- Mozzi, F., Giori, G.S., Oliver, G. and Valdez, G.F.: Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, **49**, 667 (1994)
- Gilliland, S.E. and Rich, C.N.: Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus* grown at different pH. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1187 (1990)
- Leyer, G.J. and Johnson, E.A.: Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2075 (1992)
- Sanders, J.W., Leenhouts, K.H., Haandrikman, A.J., Venema, G. and Kok, J.: Stress response in *Lactococcus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the Lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.*, **177**, 5254 (1995)
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M.: Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592 (1995)
- Hutkins, R., Ellefson, W.L. and Kashket, E.R.: Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2275 (1987)
- Ling, Z.Y., Morimura, S. and Kida, K.: Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 204 (1995)
- Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. and Thevelein, J.M.: Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 109 (1995)

(1995년 12월 30일 접수)