

Bifidobacterium infantis Maeil-K9 균주의 당 발효 특성 및 항생제 내성을 이용한 선택배지 개발연구

정병문* · 김응률 · 정후길 · 전호남

매일유업(주) 중앙연구소

현재 상업적으로 이용되고 있는 비피더스균인 *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 및 *Bif. infantis* Maeil-K9의 선택적 계수를 위한 선택배지 개발을 위하여 다양한 탄소원과 질소원 및 여러 항생제들에 대한 내성을 검토하였다. 탄소원의 경우 기본 생육배지에 각각 15 g/L 수준으로 첨가하여 각 균주의 생육성을 비교해 본 결과 amygdalin과 fructose가 가장 적합하였으며, 질소원의 경우 tryptone이 가장 적합한 것으로 나타났다. Amygdalin을 탄소원으로 이용한 경우 *Bif. lactis* Bb-12와 *Bif. infantis* Maeil-K9의 생육성이 우수하였으며, fructose를 이용한 경우 *Bif. longum* Bb-536의 생육성이 우수하였다. 항생제 내성 검토에 있어서는 doxycyclin을 1 mg/L 수준으로 첨가하는 것이 가장 적절하였으며, *Bif. lactis* Bb-12 및 *Bif. infantis* Maeil-K9의 생육에는 전혀 영향을 주지 않았으나, *Bif. longum* Bb-536의 생육은 완전히 억제시켰다. 그리고 저활성 균주에 대한 각 선택배지의 검출능을 알아보기 위하여 각 균주를 70°C, 4°C, 40°C에 2주간 보존 후 생균수를 측정 한 결과 amygdalin을 탄소원으로 이용한 배지에서는 40°C 보존균주의 검출능이 낮았으나, fructose를 탄소원으로 이용한 배지와 doxycyclin을 첨가한 배지의 경우 그 선택성이 매우 우수하였다.

Key words □ amygdalin, bifidobacteria, doxycyclin, fructose, selection media

비피더스균은 형태학적으로 막대형, Y형, V형 등 다양한 형태를 가지고 있으며 Gram+, 무포자, 비운동성, 편성형기성 등의 특징을 갖는 hetero발효 유산균(14)이다. 최근 bifidobacteria의 장내균총 유지, 병원성균에 대한 길항작용, 면역증강 등 건강증진과 관련된 기능성(3, 11, 12, 14)이 밝혀지면서 이들을 이용한 유제품 및 기능성 식품들이 많이 출시되고 있다. *Bif. infantis* Maeil-K9 균주는 2개월령 모유 영양아의 분변에서 분리된 균주로 일반적인 비피더스균의 특성 뿐만 아니라 장 정착성(6), 항균 활성(5), 항바이러스 활성(5) 등과 관련된 연구가 보고되어 있으며, 현재 상용화되어 제품에 이용되고 있다. 현재 상용으로 발효유나 infant formula 등에 이용되고 있는 비피더스균으로는 *Bif. longum*, *Bif. bifidum*, *Bif. infantis*, *Bif. lactis* 등(1, 13)이 있으며, 이들을 단독으로 사용하기도 하지만 생리학적 특성 및 기능성에 있어서 상호 보완적인 효과를 기대하기 위하여 복합적으로 사용하기도 한다. 그러므로 비피더스균을 복합적으로 첨가한 제품의 경우 제품 내에서의 특성 파악 및 생존성 조사를 위해서 이들을 선택적으로 계수할 필요가 있으며, 고활성 균주뿐만 아니라 저활성 균주에 대해서도 검출 능력이 뛰어난 선택배지의 개발이 요구되고 있다.

이러한 선택배지의 개발을 위해서는 특정 항생제를 이용(8, 9, 10, 18)하거나 당 발효능, 효소 생성능 등의 생화학적 특성을 이

용한 방법(4)이 주로 사용되고 있으며, 목적하는 균주의 손상을 최소화하는 방향으로 선택배지의 개발이 이루어져야 한다. 특정 탄소원 및 항생제를 이용하여 배지의 선택성을 부여하는 경우, 제품화를 위한 가공 공정 중의 온도, 습도, pH 등 외부환경에 의한 물리, 화학적 충격으로 균주 자체에 어느 정도 손상을 입게 되는데 이러한 균주들은 생육 요구성이 아주 민감하게 되어 *in vitro*상에서는 생육이 불가능할 수도 있다. 따라서 특수 목적을 위한 선택배지 개발을 위해서는 이와 같은 저활성 균주에 대한 검토가 수행되어야 하지만 현재까지의 많은 연구 보고의 경우 이와 같은 사항이 간과되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 현재 상업적으로 주로 사용하고 있는 상용 비피더스 균주와 *Bif. infantis* Maeil-K9균주에 대한 당 발효 특성 등의 영양 요구성을 파악하고 여러 항생제들에 대한 내성 및 저활성 균주에 대한 검토를 통해 이들 비피더스 균주가 혼합된 제품 내에서 *Bif. infantis* Maeil-K9균주의 선택적 계수를 위한 선택배지를 개발하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 현재 상업적으로 이용되고 있는 비피더스균주인 *Bif. lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 및 *Bif. infantis* Maeil-K9의 동결건조 균체분말을 이용하였으며, 멸균 생리식염수에 현탁 후 BL agar (Difco, USA) 배지에 도말하여 37°C에서 48시간

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-660-9144, Fax: 031-668-0247
E-mail: bmjung@maeil.com

동안 anaerobic chamber (Forma Scientific Inc., USA)내에서 혐기적으로 배양하였고 이 과정을 2~3회 반복하여 균주를 활성화시킨 후 실험에 이용하였다.

기본 생육배지

탄소원 및 질소원의 이용성 검토를 위해 이것들이 제외된 기본 생육배지로 potassium phosphate monobasic 2 g/L, potassium phosphate dibasic 1 g/L, L-cystein-HCl 0.5 g/L, ferrous chloride 0.01 g/L, tween80 1 g/L, antiformer 0.2 g/L, calcium chloride 0.15 g/L, magnesium chloride 0.5 g/L, agar 15 g/L를 첨가한 배지를 사용하였으며, 여기에 각각 탄소원 15 g/L, 질소원 20 g/L를 첨가하여 그 이용성을 검토하였다.

탄소원 종류별 이용성 비교

탄소원 이용성 비교를 위하여 1차로 API 50CH strip 및 50 CHL medium (bioMerieux, France)을 이용하여 72시간 배양 후 49종의 탄소원에 대한 이용성을 검토하였다. 실험균주에 대해서로 다른 발효양상을 보이는 탄소원 12종을 선발하여 기본 생육배지에 15 g/L 수준으로 각각 첨가한 후 각 균주별 생육성을 비교하였다. 또한 질소원 단독 첨가에 의한 집락 형성을 배제하기 위하여 각 source별 질소원을 사용하여 집락 형성능을 비교한 후 집락 형성에 영향을 주지 않는 질소원을 선발하여 실험에 이용하였다.

항생제 종류 및 농도별 내성 비교

항생제 종류 및 농도별 내성은 12종의 항생제가 농도별로 첨가된 Micronaut-S PEG Studie Platte C plate (Merlin, Germany)를 이용하여 조사하였다. 멸균 생리식염수에 McFarland 0.5 농도 수준으로 균체를 현탁한 후 L-cystein-HCl 0.5 g/L, sodium carbonate 0.2 g/L, calcium chloride 0.1 g/L가 함유된 MRS broth에 1% 접종하여 각 well당 100 μ l씩 분주하고 37°C, 24시간 혐기배양 후 620nm에서 흡광도를 측정하여 균체 성장율을 조사하였다. 이때 대조군에 비해 50% 이상 균체 성장이 억제된 시점의 항생제 농도를 IC₅₀ (inhibitory concentration) 값으로 정의하였다.

항생제 첨가배지에서의 생육성 비교

항생제 첨가배지의 제조는 먼저 BL agar를 121°C, 20분간 멸균하고 50°C정도로 냉각한 후 0.45 μ m syringe filter (Satorius, Germany)로 여과한 항생제를 농도별로 첨가하여 배지를 제조하였으며, 이때 항생제의 역가 보존을 위하여 배지 제조 후 곧바로 실험에 사용하였다.

저활성 균주에 대한 생육성 비교

저활성 균주의 생육성을 비교하기 위하여 각 균주의 동결건조 균체분말을 -70°C, 4°C, 40°C에 2주 동안 보존 후 각 탄소원이 함유된 배지 및 항생제가 첨가된 배지에서 배양하여 그 생육성을 비교함으로써 저활성 균주에 대한 선택배지의 검출능을 확인하였다.

결과 및 고찰

질소원의 선발

질소원의 선발은 동물 조직의 단백질에서 유래된 proteose peptone No.3, casein 유래의 tryptone, soy bean 유래의 soytone 등을 기본 생육배지에 20 g/L 수준으로 첨가하여 각 균주별 집락 형성능을 비교하였다. Table 1의 결과와 같이 soytone의 경우 탄소원이 첨가되지 않은 기본 생육배지에서도 집락 형성이 가능하였고, proteose peptone No. 3의 경우에도 pin-point 수준의 집락 형성이 관찰되었다. 그러나 tryptone의 경우 기본 생육배지에 탄소원이 첨가되지 않을 경우 집락 형성이 이루어지지 않아 기본 생육배지에 첨가되는 질소원으로서 가장 적합한 것으로 판단되었다. 이러한 질소원에 따른 집락 형성능에 차이를 보이는 이유는 이들 질소원은 각 기질을 효소분해시켜 만들어지기 때문에 어느 정도의 탄소원이 포함되어 있어 이 잔존하는 탄소원의 영향에 의해 집락 형성능에 차이를 보이는 것으로 판단된다.

탄소원의 선발

현재 상업적으로 이용되고 있는 비피더스균인 *Bif. lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 및 *Bif. infantis* Maeil-K9의 탄수화물 이용성을 조사하기 위해 API system을 이용하여 검토한 결과는 Table 2와 같다. *Bif. lactis* Bb-12의 경우 ribose, D-glucose, amygdalin 및 melibiose 등을 이용할 수 있었으며, *Bif. longum* Bb-536의 경우 L-arabinose, D-xylose, D-glucose, D-fructose 및 lactose 등을 이용할 수 있는 것으로 조사되었다. 또한 *Bif. infantis* Maeil-K9의 경우 L-arabinose, ribose, D-xylose, D-glucose, amygdalin, esculin, salicin, maltose, lactose, melibiose, saccharose 및 D-raffinose 등을 이용할 수 있었다. 이 결과는 일반적으로 보고되어 있는 비피더스 표준균주의 당발효 특성과는 상이한 결과를 나타내고 있으나 이는 대부분의 상업 종균의 경우 wild type이며, 생존성 및 안정성에 주안점을 두고 개발되고 있기 때문에 표준균주와는 어느 정도 차이를 보이는 것으로 판단된다. 또한 API system은 carbon source가 제외된 액상 배지에 균체를 현탁시켜 각각의 carbon source가 첨가된 ampule에 분주

Table 1. Comparison of bacterial growth in basic medium containing each nitrogen source

Nitrogen source (20 g/L)	<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9
No addition	-	-	-
Proteose peptone No.3	(+)	-	(+)
Tryptone	-	-	-
Soytone	+	+	+
All added	+	+	+

Results from 37°C, 72hrs incubation and anaerobic condition

Each nitrogen source was added to basic growth medium without carbon source

+: good growth(colony diameter > 0.5 mm), (+): poor growth(colony diameter < 0.5 mm), -: no growth

Table 2. Carbohydrate fermentation pattern of commercial bifidobacteria by API system

Carbohydrates	<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9	Carbohydrates	<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9
Control	-	-	-	Esculine	+	-	+
Glycerol	-	-	-	Salicine	-	-	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	Maltose	-	-	+
L-Arabinose	-	+	+	Lactose	-	+	+
Ribose	+	-	+	Melibiose	+	-	+
D-Xylose	-	+	+	Saccharose	-	-	+
L-Xylose	-	-	-	Trehalose	-	-	-
Adonitol	-	-	-	Inuline	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-	Melezitose	-	-	-
Galactose	-	-	-	D-Raffinose	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	Amidon	-	-	-
D-Fructose	-	+	-	Glycogene	-	-	-
D-Mannose	-	-	-	Xylitol	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	β-Gentiobiose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	D-Turanose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-
Mannitol	-	-	-	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	L-Fucose	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-
N-Acetyl gulcosamine	-	-	-	Gluconate	-	-	-
Amygdaline	+	-	+	2 Keto-gluconate	-	-	-
Arbutine	-	-	-	5 Kete-gluconate	-	-	-

Results from 37°C, 72hrs incubation and anaerobic condition
 +: Fermented, -: Non-fermented

한 후 산 생성 정도에 따라 그 생육도를 비교 검토하는 것으로, 첨가된 당의 농도나 ampule내의 환경, 균주의 활성도 등 생육조건에 따라 그 패턴이 약간씩 다를 수 있으므로 Bergey's Manual의 표준균주에 대한 당 이용성 결과와는 약간의 차이가 있을 수 있다고 사료된다.

최종적으로 tryptone 20g/L를 첨가한 기본 생육배지를 기본으로 1차 선발된 12종의 탄소원을 15 g/L 첨가하여 각 균주별 생육성을 비교해 본 결과는 Table 3과 같다. Maltose, glucose, melibiose, lactose 및 saccharose가 첨가된 배지의 경우 3균주 모두 집락 형성능이 우수하였으며, raffinose, xylose 및 arabinose가 첨가된 배지의 경우에 집락 형성은 관찰되었으나 pin-point 수준이었다. Amygdalin이 첨가된 배지의 경우 *Bif. lactis* Bb-12와 *Bif. infantis* Maeil-K9는 집락 형성능이 우수한 반면에 *Bif. longum* Bb-536은 집락 형성이 관찰되지 않았다. 또한 fructose가 첨가된 배지의 경우에는 *Bif. longum* Bb-536만이 집락을 형성하는 것으로 조사되었다. 이 결과는 API CHL kit를 이용한 결과와는 약간의 차이를 보이고 있으나 이는 첨가된 질소원의 종류, 첨가된 배지성분의 종류 및 농도, 배양환경 등에 의한 차이로 판단되어지며, 보다 정확한 당 발효능의 검토를 위해서는 여러 조건에서의 비교가 병행되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 상기

Table 3. Comparison of bacterial growth in basic medium containing each carbon sources

Carbon sources (15 g/L)	<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9
No addition	-	-	-
Raffinose	(+)	(+)	(+)
Amygdalin	+	-	+
Maltose	+	+	+
Ribose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Salicin	-	(+)	-
Melibiose	+	+	+
Xylose	(+)	(+)	(+)
Arabinose	(+)	(+)	(+)
Lactose	+	+	+
Saccharose	+	+	+
Fructose	-	+	-

Results from 37°C, 72hrs incubation and anaerobic condition
 Each carbon source was added in basic growth medium containing 20 g/L of tryptone
 +: good growth (colony diameter>0.5 mm), (+): poor growth (colony diameter<0.5 mm), -: no growth

결과로 미루어 볼 때 탄소원으로 amygdalin을 이용할 경우 *Bif. infantis* Maeil-K9과 *Bif. longum* Bb-536균주가 혼합된 제품에서 *Bif. infantis* Maeil-K9만의 선택적인 분리가 가능할 것이다.

항생제 내성 검토

각 균주에 대한 항생제 종류 및 농도별 내성을 알아보기 위하여 12종의 항생제가 농도별로 첨가된 Micronaut-S PEG Studie Platte C를 이용하여 대조군에 비해 50% 이상 균체 성장이 억제된 시점의 항생제 농도인 IC₅₀ 값을 조사해 본 결과는 Table 4와 같다. 각 항생제별로 IC₅₀ 값은 0.25~64 mg/L 수준으로 다양하게 나타났으나 대부분의 항생제의 경우 균주간의 내성은 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 doxycyclin의 경우 3균주간의 내성 차이가 *Bif. lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 및 *Bif. infantis* Maeil-K9에 대해서 각각 32, 0.5, 4 mg/L로 유의적인 차이를 보여 이를 BL agar배지에 각각 1, 10, 100 mg/L 수준으로 첨가한 후 생성되는 비피더스균의 집락수를 계수하여 그 차이를 비교하였다. Co-trimoxazole의 경우도 IC₅₀값이 *Bif. lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 및 *Bif. infantis* Maeil-K9에 대해서 각각 8, 64, 4 mg/L로 개체간의 유의적인 차이가 인정되었으나, 각 농도로 BL agar 배지에 첨가하여 생육성을 비교해 본 결과 그 차이가 뚜렷하게 나타나지 않아 본 실험에서 제외하였다. Table 5의 결과와 같이 *Bif. lactis* Bb-12의 경우 doxycyclin 무첨가구와 비교하여 1 mg/L 첨가시에는 그 생균수에 영향을 주지 않았으나 10 mg/L 이상의 농도에서는 균의 활성에 영향을 주는 것으로 나타났다. *Bif. longum* Bb-536의 경우 1 mg/L의 농도에서도 균의 생육이 관찰되지 않아 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났으며, *Bif. infantis* Maeil-K9의 경우는 1 mg/L이하의 농도에서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로 세균의 항생제 내성은 plasmid에 존재하는 유전자에 의한 것으로 알려져 있으나 비피더스균의 경우 *Bif. longum*과 *Bif. breve* 등 일부 균종의 plasmid에 대한 연구(2, 7, 16, 17)만이 보고되어 있는 실정이며, 이와 관련하여 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 그리고 doxycyclin은 tetracycline계 항생제로 현재까지 비피더스균의 선택배지와 관련하여 보고된 바가 없는 항생제로서 다른 항생제의 민감도와 비교(4, 8, 10, 18)하여 볼 때 비교적 적은 농도에서도 그 효능이 우수한 것으로 판단되었다.

저활성 균주에 대한 생육성 비교

특정한 탄소원 및 항생제를 이용한 선택배지 개발에 있어서

Table 4. Antibiotics resistance of commercial bifidobacteria by Micronaut-S PEG system

Antibiotics List	IC ₅₀ value* (mg/L)		
	<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9
Doxycyclin	32	0.5	4
Erythromycin	0.5	0.5	0.25
Co-trimoxazole	8	64	4
Ampicillin	1	1	1
Linezolid	1	0.5	0.25
Teicoplanin	1	0.25	0.25
Vancomycin	2	1	2
Imipenem	1	0.5	1
Streptomycin	0.25	0.25	0.25
Gentamicin	>16	>16	16
Moxifloxacin	8	4	1
Ciprofloxacin	8	8	8

*The concentration of antibiotics for 50% of growth inhibition

고려해야 할 사항 중의 하나는 활성이 높은 균주 뿐만 아니라 가공 처리시 열에 의한 손상, 발효유 제품 내에서의 산성물질에 의한 영향, 온도 및 습도 등과 관련된 외부 환경에 의한 영향 등 이러한 외부 충격에 의해 어느 정도 활성이 떨어진 균주에 대한 검토도 있어야 한다. 따라서 본 연구 수행을 통해 개발된 선택배지의 저활성 균주에 대한 검출능을 알아보기 위하여 각 균주의 동결건조 분말을 -70°C, 4°C, 40°C에 2주 동안 보존 후 탄소원을 이용한 선택배지 및 항생제를 이용한 선택배지에서의 생균수를 측정하였다. 먼저 Fig. 1에서와 같이 amygdalin을 탄소원으로 사용한 배지의 경우 냉동 및 냉장조건에 보존한 균주는 BL agar배지와 비교하여 그 차이를 보이지 않았으나 40°C에 보존한 균주는 amygdalin을 사용한 배지에서는 거의 검출되지 않았다. Amygdalin은 cyan배당체로서 생체내 효소에 의해 glucose, hydrogen cyanide, benzaldehyde로 분해되는 물질로 이 때 생성된 hydrogen cyanide가 독성물질로 작용하는데(15) 저활성 균주의 경우 이에 대한 내성이 떨어져 생육하지 못하는 것으로 사료된다. 따라서 amygdalin을 탄소원으로 이용하는 경우 저활성 균주에 대한 검출능이 낮아 *Bif. infantis* Maeil-K9균주의 선택배지로 이용하기에는 부적합한 것으로 판단된다. 그리고 *Bif. longum* Bb-536의 경우 fructose를 탄소원으로 이용하였을 때 냉동, 냉장 조건 뿐만 아니라 40°C에서 보존한 균주의 경우에도 BL agar배

Table 5. Comparison of bacterial growth in BL medium containing doxycyclin

Antibiotics	Concentration (mg/L)	Bacterial growth(CFU/g)		
		<i>Bif. lactis</i> Bb-12	<i>Bif. longum</i> Bb-536	<i>Bif. infantis</i> Maeil-K9
No addition	0	1.5×10^{11}	1.9×10^{10}	8.2×10^{10}
Doxycyclin	1	1.2×10^{11}	$< 10^6$	8.8×10^{10}
	10	2.0×10^9	$< 10^6$	5.0×10^8
	100	$< 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$

Results from 37°C, 72hrs incubation and anaerobic condition

참고문헌

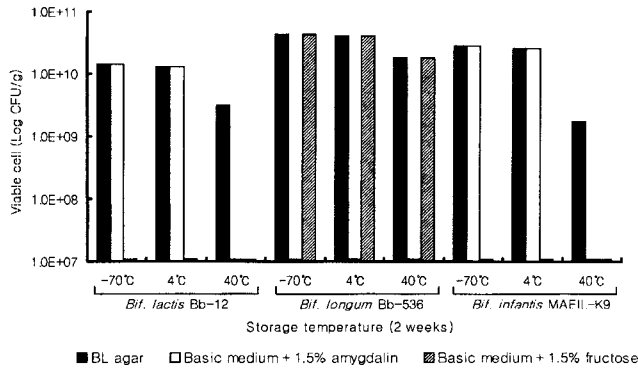


Fig. 1. Total viable cell number of temperature-shocked bifidobacteria in basic medium containing each carbon sources.

지와 비교하여 그 차이가 나타나지 않았다. 따라서 *Bif. infantis* Maeil-K9균주와 *Bif. longum* Bb-536균주가 혼합된 제품에서 *Bif. infantis* Maeil-K9균주의 선택적인 계수를 위해서는 먼저 BL agar를 이용하여 비피더스의 총균수를 계수한 다음 fructose를 탄소원으로 하는 본 선택배지에서 형성된 *Bif. longum* Bb-536균주의 콜로니수를 빼면 *Bif. infantis* Maeil-K9균주의 선택적인 계수가 가능할 것이다.

그리고 Fig. 2에서의 결과와 같이 *Bif. infantis* Maeil-K9균주와 *Bif. lactis* Bb-12균주의 경우 doxycyclin을 1mg/L수준으로 첨가한 BL agar배지에서 생육성을 비교해 본 결과 냉동, 냉장 조건뿐만 아니라 40°C에서 보존한 균주의 경우에도 BL agar배지와 비교하여 전혀 생균수의 차이가 나타나지 않았으며, *Bif. longum* Bb-536균주의 경우에는 본 배지에서 전혀 생육이 이루어지지 않았다. 따라서 *Bif. infantis* Maeil-K9균주와 *Bif. longum* Bb-536균주가 혼합된 제품 내에서 *Bif. infantis* Maeil-K9균주만의 선택적 계수를 위해서는 doxycyclin을 이용하는 방법이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

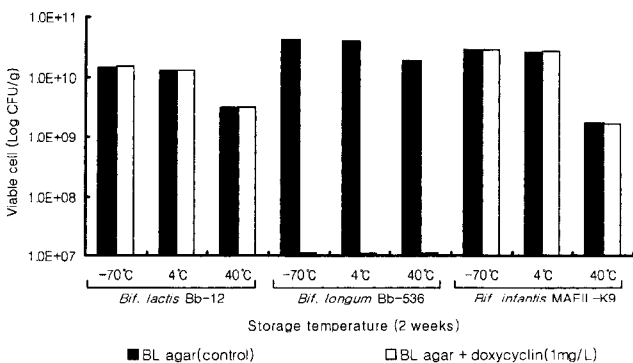


Fig. 2. Total viable cell number of temperature-shocked bifidobacteria in BL medium containing 1 mg/L of doxycyclin.

- Hirokazu, I., H. Masuda, T. Fujisawa, H. Suzuki, and T. Mitsuoka. 1993. Isolation and identification of *Bifidobacterium* sp. in commercial yoghurts sold in Europe. *Bifidobacteria Microflora*. 12, 39-45.
- Iwata, M. and T. Morishita. 1989. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9, 415-422.
- Jung, H.K., E.R. Kim, and S.L. Juhn. 2001. Adherence of probiotics to gastrointestinal track and their promoting factors. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* 19, 125-132.
- Kim, E.R., H.K. Jung, and S.L. Juhn. 1999. Selective detection and enumeration of *Bifidobacterium longum* MK-G7 by using sugar alcohol and antibiotics. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 19, 285-295.
- Kim, E.R., H.K. Jung, H.N. Chun, S.L. Juhn, B.S. Park, D.H. Yu, and J.H. Ju. 2002. Effects of bifidobacteria-derived crude peptidoglycan on protection against *E. coli* O157:H7 and rotavirus infection. *Bioscience Microflora*. 21, 251-257.
- Kim, E.R., Jung, H.K., Juhn, S.L., and Yu, J.H. 2001. Factors affecting the adherence of bifidobacteria to Caco-2 cell. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 21, 133-141.
- Lee, J.H., M.S. Park, K.H. Lee, and G.E. Ji. 2001. Characterization of plasmid from *Bifidobacterium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 1-6.
- Lee, J.J., M.S. Shin, S.H. Na, H.S. Bae, and Y.J. Baek. 1994. Selective media containing antibiotics for counting bifidobacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 309-315.
- Lee, M.K., W.S. Park, and K.H. Kang. 1996. Selective media for isolation and enumeration of lactic acid bacteria from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25, 754-760.
- Lee, S.K., D.K. Park, H.I. Oh, and J.H. Park. 1999. Selection and enumeration of bifidobacteria in fermented foods with various lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31, 751-756.
- Lee, S.M. and W.K. Lee. 2001. Effect of lactic acid bacteria on intestinal microbial enzyme activity and composition in rats treated with azoxymethane. *J. Microbiol. Sep.*, 154-161.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 3-24.
- Park, H.K. and T.R. Heo. 1995. Studies on the selective screening method of bifidobacteria used in yoghurt. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 214-219.
- Rasic, J.L. and J.A. Kurmann. 1983. *Bifidobacteria and Their Role*, Birkhuser Verlag Basel.
- Salkowski, Alicia A. and David G. Penney. 1994. Cyanide Poisoning in Animals and Humans. *A Review, Vet. Human Toxicol.* 35, 455-466.
- Sgobarti, B., V. Scardovi, and D.J. Leblanc. 1982. Plasmids in the genus bifidobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2121-2131.
- Sgobarti, B., V. Scardovi, and D.J. Leblanc. 1986. Relative structure in the plasmid profiles of *Bifidobacterium longum*. *Microbiologia*. 9, 415-422.
- Shin, M.S., J.J. Lee, I.Y. Suh, S.H. Na, and Y.J. Baek. 1994. Selective media for the isolation and counting of bifidobacteria in dairy products. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 210-216.
- Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa, and T. Mitsuoka. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy product. *Jpn. J. Bacteriol.* 33, 753-761.

(Received November 18, 2003/Accepted December 29, 2003)

ABSTRACT : Studies on the Selective Media for *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 Using Various Carbon Sources and Antibiotics

Byung-Moon Jung*, Eung-Ryool Kim, Hoo-Kil Jung, and Ho-Nam Chun (R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd. 480 Gagok-ri, Jinwi-myun, Pyungtaeksi 451-861, Korea)

To differentiate commercial bifidobacteria for *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Bif. longum* Bb-536 and *Bif. infantis* Maeil-K9, we studied the various carbon source, the nitrogen sources and antibiotics. Amygdalin and fructose were good candidates for carbon sources, and tryptone was suitable for nitrogen sources to design a new selective media for three commercial bifidobacteria. In the case of the amygdalin-containing medium as carbon sources, *Bif. lactis* Bb-12 and *Bif. infantis* Maeil-K9 showed good growth, and in fructose-containing medium, *Bif. longum* Bb-536 showed good growth. In antibiotics resistance study, the addition of 1 mg/L doxycyclin was very effective for differentiation of each bifidobacteria. Doxycyclin did not affect the growth of *Bif. lactis* Bb-12 and *Bif. infantis* Maeil-K9, but *Bif. longum* Bb-536 was completely inhibited by doxycyclin. Finally to confirm the selection capability of newly designed selective media, temperature-shocked bifidobacteria were cultured on them. As the results, fructose or doxycyclin containing medium showed for high growth for temperature-shocked bifidobacteria, but amygdalin containing medium showed low growth of temperature-shocked bifidobacteria.